

人诺如病毒 NS6 蛋白的表达、纯化及活性验证

袁越¹ 新燕¹ 庞立丽² 段招军²

¹内蒙古医科大学基础医学院免疫学专业,呼和浩特 010000;²国家卫生健康委员会医学病毒和病毒病重点实验室 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所,北京 102206

通信作者:新燕,Email:xinyan_2505@126.com,电话:0471-6657562;庞立丽,Email:cactusea@163.com,电话:010-58900899

【摘要】 目的 在大肠埃希菌中表达人诺如病毒(norovirus, NoV) NS6 非结构蛋白,为了获得高纯度且具有酶活性的人诺如病毒 NS6 蛋白。**方法** 将 NoV NS6 蛋白基因克隆至原核表达载体 pDE1 中,转化至 *E. coli* BL21 感受态细胞中进行表达,产物经亲和及分子筛层析纯化。NS6 蛋白在 37 °C 条件下,酶切融合蛋白 15VP1-6P,检测其酶切活性。**结果** NS6 蛋白在大肠埃希菌中获得了稳定、高效表达,纯化后纯度可达 95% 以上。NS6 蛋白能够切割含 3C 酶切位点的融合蛋白。**结论** 在大肠埃希菌中成功表达了具有酶切活性的 NoV 非结构蛋白 NS6,为进一步研究 NoV 的致病机制奠定了基础。

【关键词】 人诺如病毒;非结构蛋白 NS6;亲和层析;分子筛;酶切

基金项目:国家科技重大专项(2018ZX10301408)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.06.018

Expression, purification and activity verification of human norovirus NS6 protein

Yuan Yue¹, Xin Yan¹, Pang Lili², Duan Zhaojun²

¹Department of Immunology, Basic School of Medical Science, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; ²NHC Key Laboratory of Medical Virology and Viral Diseases, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: Xin Yan, Email:xinyan_2505@126.com, Tel:0086-471-6657562; Pang Lili, Email:cactusea@163.com, Tel:0086-10-58900899

【Abstract】 Objective To express the NS6 nonstructural protein of human norovirus (NoV) in *Escherichia coli*, and to detect its enzymatic activity after purification. **Methods** Human NoV NS6 gene was cloned into the prokaryotic expression vector pDE1 and then was transformed into *E. coli* BL21 for expression. NS6 protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography and Superdex 200 pg column. The activity of NS6 protein was determined by digestion of fusion protein 15VP1-6P at 37 °C. **Results** Human NoV NS6 protein was stably and highly expressed in *E. coli*. After purification, the expressed product reached a purity of more than 95%, and the relative molecular weight of NS6 protein was about 23×10^3 Da. NS6 protein could cleave the fusion protein containing rhinovirus 3C cleavage site. **Conclusions** The nonstructural protein NS6 of human NoV was successfully expressed in *Escherichia coli*, which laid a foundation for further study on the pathogenesis of human NoV.

【Key words】 Human norovirus; Nonstructural protein NS6; Affinity purification; Gel filtration chromatography; Enzymatic digestion

Fund programs: National Science and Technology Major Project (2018ZX10301408)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.06.018

人诺如病毒(norovirus, NoV),最早被称为诺瓦克病毒(norwalk viruses),于 1972 年在美国诺瓦克镇暴发急性胃肠炎患者的粪便标本中被首次发现。由于 NoV 的传染性极强,因此又被喻为“肠道流

感”。NoV 是导致急性胃肠炎暴发的首要病因,各年龄组人群均易感^[1-3]。根据 NoV 的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RdRp)区和衣壳蛋白区的核苷酸序列,现将其分为至少 7 个基因组,GI、GII、GIII、G

IV、GV、GVI 和 GVII^[4]。通过系谱进化分析显示, GII4 是在全球流行较广的毒株, 一直处于快速变异中, 每一次突变都会引起一轮全球性的胃肠炎暴发^[5]。因此, 开展 NoV 的针对性预防和控制具有重要意义^[6]。

NoV 属于杯状病毒科, 基因组为单股正链 RNA, 全长为 $7.3 \sim 7.7 \times 10^3$ 个核苷酸, 其基因组包括 3 个开放阅读框 (open reading frames, ORFs), 分别为 ORF1、ORF2 和 ORF3。其中 ORF1 编码 6 个非结构蛋白, 分别为 P48、NTP 酶、P22、3C 样蛋白酶 (3C-like protease, 3CLpro)、VPg 和 RdRp^[7]。NS6 蛋白即 3C 样蛋白酶, 属于糜蛋白酶样蛋白酶家族的一员, 与细胞内的胰凝乳蛋白酶样丝氨酸蛋白酶 (chymotrypsin-like serine proteases) 的结构相似, 与小 RNA 病毒的 3Cpro 具有相同的氨基酸序列基序^[8]。本研究旨在获得具有酶活性的人 NoV NS6 重组蛋白, 为深入开展人 NoV 致病性研究以及 NoV 病毒感染和天然免疫的关系研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、蛋白及菌株 大肠埃希菌 DH5 α 、大肠埃希菌 BL21 感受态细胞均购自北京全式金生物技术有限公司; 人工合成的 GIIP4NoV 感染性克隆质粒、带有 GST 标签的鼻病毒 RC15 VP1 融合蛋白 15VP1-6P (具有 3C 蛋白酶切位点), 由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所腹泻室实验室保存。载体 pDE1 购自北京擎科新业生物技术有限公司。

1.2 主要试剂及仪器 HISTRAP HP 亲和层析柱购自瑞典 GE; pDE1 定向表达试剂盒购自北京擎科新业生物技术有限公司; 电泳凝胶回收试剂盒购自上海浩然生物科技有限公司; 凝胶过滤层析纯化柱 superdex 200 pg 购自瑞典 GE 公司; IPTG 购自美国 Sigma 公司; Color prestained protein standard 购自美国 NEW England Biolabs 公司; Tryptone、Yeast Extract 为英国 Oxoid 公司产品。

1.3 重组原核表达质粒的构建 根据 NoVGIIIP4 感染性克隆的 NS6 基因序列, 设计引物, 序列如下: 4H6PDEF: 5'-CACCGCCCCACCAAGCATC-3', 4H6R: 5'-TTATTCAAGTGTAGCTTCTCC-3'。以 NoVGIIIP4 感染性克隆为模板, 进行 PCR 扩增。将扩增产物纯化后与 pDE1 载体连接, 构建融合表达 his 标签的 GIIP4NS6 蛋白原核表达质粒, 转化大肠埃希菌 DH5 α 。提取质粒, 送公司测序, 序列正确的质粒命

名为 pDE1-NoV-NS6。

1.4 蛋白的表达及纯化 重组原核表达质粒转化 BL21 (DE3) 感受态细胞 37 °C 培养过夜, 挑取单菌落, 接种含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C, 180 r/min 过夜震荡; 取 15 ml 按 1:100 比例加至 1.5 L 无抗生素的 LB 液体培养基中, 37 °C, 180 rpm 震荡 3.5~4 h。加入 600 μ l 浓度为 1 mol/L 的 IPTG, 16 °C 180 rpm 震荡过夜; 6 000 \times g 离心 10 min, 收集菌体, 100 ml PBS 重悬, 置冰浴超声裂解, 超声 4 s 间隔 7 s, 共 70 min; 13 000 \times g 高速离心 1 h。将上清上镍柱, 用 10 倍柱体积的洗脱液分别洗脱 5 次。洗脱液成分: 50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl 和不同浓度的咪唑 (20、50、100、150、300、500 mmol/L) (pH 8.0)。用 20 mmol/L Tris、50 mmol/L NaCl、pH8.0 溶液平衡 superdex 200 pg 分子筛层析纯化柱, 将亲和层析纯化后的目的蛋白加入 15 ml PBS, 用 Amicon Ultra-15 10 K 浓缩管, 3 000 rpm 浓缩至 1 ml, 取 1 ml 进行分子筛层析纯化, 收集目的蛋白样品, 进行 15% SDS-PAGE 分析。

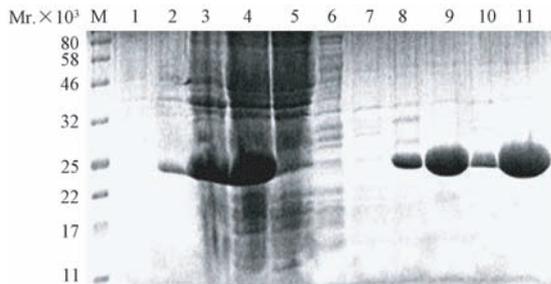
1.5 酶切功能的验证 15VP1-6P 蛋白是本科室构建的鼻病毒 RC15 VP1 融合蛋白, 带有 GST 标签, 在 15VP1 和 GST 之间有鼻病毒 3C 蛋白酶切位点 (LEVLFQ↓GP)。取 3 μ g 纯化的 15VP1-6P 蛋白分别与 10 μ g 纯化后的 NoVGIIIP4 NS6 蛋白、5 μ g 鼻病毒 GST-3C 蛋白或 PBS 混合 (缓冲液组分如下: 50 mmol/L Na₂PO₄ (pH8.0), 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT), 置于 37 °C 孵育 24 h 后, 进行 15% SDS-PAGE 分析。

2 结果

2.1 重组质粒 重组质粒 pDE1-NoV-NS6 的序列鉴定结果显示, GIIP4 NS6 基因已正确插入到 pDE1 载体中, 在基因的 5' 端融合 his 标签, 成功构建重组质粒 pDE1-NoV-NS6。

2.2 NS6 蛋白表达及纯化鉴定 用 15% SDS-PAGE 电泳分析结果表明, NoVGIIIP4 NS6 蛋白在相对分子质量约 23×10^3 处可见特异性蛋白条带, 与目的蛋白相对分子质量相符, 且蛋白多以可溶性形式表达, 结果参见图 1。亲和层析并浓缩后的 GIIP4 NS6 蛋白含量为 16.7 mg/ml; 纯化后的蛋白纯度可达 90%; 经 superdex 200 pg 分子筛层析纯化柱进一步纯化后, 纯度达 95% 以上。

2.3 NS6 蛋白酶切活性鉴定 GIIP4 的 NS6 蛋白



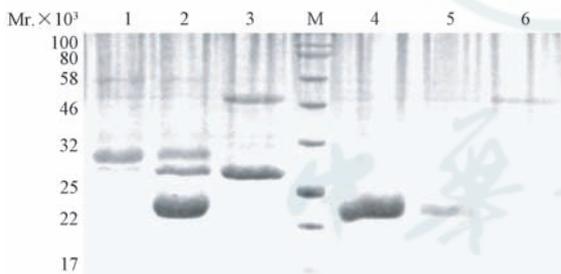
M: Color prestained protein standard; 1: 经 IPTG 诱导前; 2: 经 IPTG 诱导后; 3: 沉淀; 4: 上清; 5: 流穿液; 6、7: 20 mmol/L 咪唑洗脱; 8: 50 mmol/L 咪唑洗脱; 9: 100 mmol/L 咪唑洗脱; 10: 150 mmol/L 咪唑洗脱; 11: 300 mmol/L 咪唑洗脱

图 1 表达及纯化的 NS6 蛋白及 SDS-PAGE 鉴定

M: Color Prestained Protein Ladder; 1: the IPTG before induction; 2: after induced by IPTG; 3: precipitation; 4: supernatant; 5: flow-through liquid eluting 6, 7: 20 mmol/imidazole; 8: 50 mmol/L imidazole elution; 9: 100 mmol/L imidazole elution; 10: 150 mmol/L imidazole elution; 11: 300 mmol/L imidazole elution

Fig.1 Expression and purification of NS6 protein and identification by SDS-PAGE

切割 15VP1-6P 的酶切产物经 15% SDS-PAGE 分析显示, NoVGHP4 NS6 蛋白在 37 °C 能对 15VP1-6P 进行酶切, 但是酶切效率低于鼻病毒 3C 蛋白。15VP1-6P 酶切前的相对分子质量大小 56×10^3 , 酶切后形成的两个蛋白的相对分子质量大小分别为 30×10^3 和 26×10^3 , 结果参见图 2。



M: Color prestained protein standard; 1: 15VP1-6P 与 PBS 反应; 2: 15VP1-6P 被 NS6 酶切; 3: 15VP1-6P 被鼻病毒 GST-3C 酶切; 4, 5: NS6 与 PBS 反应; 6: 鼻病毒 GST-3C 与 PBS

图 2 37 °C 条件下 NS6 蛋白切割目的蛋白 15VP1-6P 的 SDS-PAGE 分析

M: Color Protein Ladder; 1: 15VP1-6P was reacted with PBS; 2: 15VP1-6P was cut by NS6 enzyme; 3: 15VP1-6P was cut by rhinovirus GST-3C enzyme; 4, 5: NS6 and PBS; 6: rhinovirus GST-3C and PBS

Fig.2 SDS-PAGE analysis of 15VP1-6P digested by NS6 protein at 37 °C

3 讨论

NoV 是非细菌性急性胃肠炎的主要病原之一,

具有高度感染性, 10~100 个病毒颗粒就能引起感染; 与流感病毒相似, 传播迅速易引起疾病暴发, 造成严重的公共卫生问题。NoV 在体外培养困难, 阻碍了 NoV 致病机制的研究。近些年, 随着 NoV 感染性克隆和重组表达蛋白研究, 人们对 NoV 蛋白功能有了更深的认识。NoV 非结构蛋白在病毒基因组的复制、翻译以及拮抗宿主免疫反应的过程中起到非常关键的作用^[9]。NS6 即 3C 样蛋白酶, 它的作用不仅仅是复制装配, 在调节天然免疫反应中也具有重要的作用。有研究显示 C 组鼻病毒的 3C 蛋白可以切割 MAVS, 影响 RIG-I 的表达, 抑制天然免疫反应, 关于诺如病毒的 3C 蛋白的功能研究知之甚少^[10]。

人 NoV NS6 蛋白在病毒粒子的复制和组装过程中具有重要作用。NS6 可将病毒基因组 ORF1 编码的一个多聚蛋白水解为 6 个非结构蛋白。NS6 蛋白不仅裂解自身蛋白, 还可以裂解宿主细胞内的蛋白, 如裂解多聚腺苷酸结合蛋白 (poly A-binding protein, PABP) 以抑制宿主蛋白的合成。但是目前对于 NS6 蛋白研究尚不全面, 其具体作用机制, 尤其是作用靶蛋白仍不清楚, 需要进一步研究。

本研究首先在大肠埃希菌 BL21 中高效表达了具有蛋白酶活性的 GHP4 NS6 蛋白, 使 NS6 蛋白在可溶性状态及低温的条件下进行表达, 并保留了 NS6 蛋白的生物活性, 占菌体总蛋白含量的 30% 以上。经亲和层析和凝胶过滤纯化可获得纯度达 95% 以上的 GHP4 NS6 蛋白。通过体外实验对 GHP4 NS6 蛋白的酶切活性鉴定, 证实 GHP4 NS6 蛋白在 37 °C 对鼻病毒 3C 的酶切底物具有酶切活性, 但是酶切效率不高。NS6 酶切条件的优化和底物特征有待进一步研究。GHP4 NS6 上的 His 标签简化了蛋白酶本身的纯化过程, 进而在很大程度上降低了蛋白酶的生产成本。

目前关于人 NoV 非结构蛋白的研究更多是源于体外非感染性的人 NoV 单一基因表达的研究或是通过对其他杯状病毒或者小 RNA 病毒非结构蛋白的研究。因此, 关于人 NoV 非结构蛋白研究的真实性及完整性有待更多更好的模型及深入研究。获得具有酶切活性的 GHP4 NS6 蛋白, 解析蛋白酶的结构特点以及研究细胞内的裂解底物的种类, 对于深入了解蛋白酶作用机制非常必要, 对 NoV 感染的防治具有重要的科学价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 袁越:实验操作、数据处理、论文撰写;新燕、庞立丽、段招军:研究指导、论文修订

参考文献

- [1] Dolin R. Noroviruses--challenges to control[J]. N Engl J Med, 2007, 357(11):1072-1073. DOI: 10.1056/NEJMp078050.
- [2] Sweeney TR, Roque-Rosell N, Birtley J R, et al. Structural and mutagenic analysis of foot-and-mouth disease virus 3C protease reveals the role of the beta-ribbon in proteolysis[J]. J Virol, 2007, 81(1):115-124. DOI: 10.1128/JVI.01587-06.
- [3] 宋灿磊,袁佳春,曹志城,等. 新型 GII.4 诺如病毒重组株感染疫情的分子流行病学研究[J]. 中华预防医学杂志,2013,47(12):1114-1117. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2013.12.010.
- [4] Vinje J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(2):373-381. DOI: 10.1128/JCM.01535-14.
- [5] Siebenga J J, Vennema H, Zheng D P, et al. Norovirus illness is a global problem; emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007[J]. J Infect Dis, 2009, 200(5):802-812.

DOI: 10.1086/605127.

- [6] Kapikian A Z, Wyatt R G, Dolin R, et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis[J]. J Virol, 1972, 10(5):1075-1081.
- [7] 高志勇,刘白薇,侯力予,等. 诺如病毒急性胃肠炎疫情中患者的感染特征分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2017,31(1):38-41. DOI: 10.3760/cma.j.issn.
- [8] 袁越,袁鑫,新燕,等. 人诺如病毒非结构蛋白的结构和功能[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2017,31(5):479-482, 封3. DOI: 10.3760/cma.j.issn.
- [9] Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JW, et al. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment[J]. EMBO J, 2003, 22(11):2852-2859. DOI: 10.1093/emboj/edg251.
- [10] Pang L L, Yuan X H, Shao C S, et al. The suppression of innate immune response by human rhinovirus C[J]. BiochemBiophys Res Commun, 2017, 490(1):22-28. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.169.

(收稿日期:2018-04-20)

(本文编辑:陈培莉)

· 文献速览 ·

人用新型狂犬病疫苗

Hildegund C. J. Ertl. New Rabies Vaccines for Use in Humans[J]. Vaccines (Basel), 2019, 7(2):54. DOI: 10.3390/vaccines7020054

尽管有疫苗,狂犬病每年仍夺去 55 000 多人的生命。在大多数情况下,狂犬病疫苗是在人暴露于狂犬病动物后接种的;暴露前接种主要针对与病毒接触的高危人群。大多数人的狂犬病是由犬传播的。通过大规模的犬类疫苗接种运动和加强监测计划来控制犬狂犬病,导致许多国家的人狂犬病病例数下降,但在其他国家却没有成功。动物疫苗接种计划也不适合控制在一些中美洲国家很常见的蝙蝠传播引起的人狂犬病。此外,可以实施更广泛的暴露前疫苗接种,特别是在高度流行的边远地区。由于目前疫苗的多剂量方案,暴露前免疫对大多数国家来说并不具有成本效益,这就需要开发新的狂犬病疫苗,这种疫苗与现有疫苗一样安全,但在单剂量接种后实现保护性免疫,最重要的是成本较低。本文讨论了处于临床前试验后期或已进行临床试验的新型狂犬病疫苗及其替代现有疫苗的潜力。

(吕新军 编译)