

常秋燕, 郭富城, 冶眩青, 等. 牛病毒性腹泻病毒 N<sup>pro</sup> 蛋白的原核表达及裂解效率[J]. 江苏农业学报, 2019, 35( 5 ): 1161-1166.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.05.023

## 牛病毒性腹泻病毒 N<sup>pro</sup> 蛋白的原核表达及裂解效率

常秋燕<sup>1,2</sup>, 郭富城<sup>1,2</sup>, 冶眩青<sup>1,2</sup>, 李凌浩<sup>1,2</sup>, 王悦萦<sup>1,2</sup>, 刘萍<sup>1,2</sup>, 苏强<sup>1,2</sup>, 马鹏<sup>1,2</sup>,  
李林杰<sup>1,2</sup>, 金丽<sup>1,2</sup>, 马晓霞<sup>1,2</sup>, 冯玉萍<sup>1,2</sup>

(1. 西北民族大学生物医学研究中心, 甘肃 兰州 730030; 2. 西北民族大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730030)

**摘要:** 为了研究牛病毒性腹泻病毒 N<sup>pro</sup> 蛋白的催化切割效率, 首先扩增 GSTZ 毒株的 N<sup>pro</sup> 基因, 克隆至原核表达载体 pET-28a(+) 上, 使其在表达菌 *E. coli* BL21 (DE 3) 中表达, 确定正确的 N<sup>pro</sup> 基因碱基序列, 然后构建含有切割位点的 pET-28a-N<sup>pro</sup>-GFP 重组融合质粒, 在原核表达系统中研究 N<sup>pro</sup> 蛋白的切割效率。结果显示, GSTZ 毒株的 N<sup>pro</sup> 蛋白成功地在原核表达系统中表达, 重组融合蛋白质 N<sup>pro</sup>-GFP 在原核表达系统中的切割效率约为 60.28%。

**关键词:** 牛病毒性腹泻病毒; N<sup>pro</sup> 蛋白质; 原核表达; 裂解效率

**中图分类号:** S852.65<sup>+</sup>3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)05-1161-06

## Prokaryotic expression and splitting decomposition rate of N<sup>pro</sup> protein of bovine viral diarrhea virus

CHANG Qiu-yan<sup>1,2</sup>, GUO Fu-cheng<sup>1,2</sup>, YE Xuan-qing<sup>1,2</sup>, LI Ling-hao<sup>1,2</sup>, WANG Yue-ying<sup>1,2</sup>, LIU Ping<sup>1,2</sup>,  
SU Qiang<sup>1,2</sup>, MA Peng<sup>1,2</sup>, LI Lin-jie<sup>1,2</sup>, JIN Li<sup>1,2</sup>, MA Xiao-xia<sup>1,2</sup>, FENG Yu-ping<sup>1,2</sup>

(1. Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China; 2. College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China)

**Abstract:** In order to research the catalytic cleavage efficiency of bovine viral diarrhea virus N<sup>pro</sup> protein, the N<sup>pro</sup> gene in GSTZ strain was amplified and cloned into prokaryotic expression vector pET-28a(+) in *E. coli* BL21 (DE 3) to determine the correct base sequence of N<sup>pro</sup> gene. Then the pET-28a-N<sup>pro</sup>-GFP recombinant fusion plasmid containing the authentic cleavage site was constructed. The cleavage efficiency of N<sup>pro</sup> protein was studied in prokaryotic expression system. The results showed that N<sup>pro</sup> protein of GSTZ strain was successfully expressed in prokaryotic expression system, and the cleavage efficiency of recombinant fusion protein N<sup>pro</sup>-GFP in prokaryotic expression system was about 60.28%.

**Key words:** bovine viral diarrhea virus; N<sup>pro</sup> protein; prokaryotic expression; cleavage efficiency

收稿日期: 2019-01-10

基金项目: 2017 年度甘肃省高等学科科研项目 (2017B-80); 兰州民海生物工程有限公司项目 (XBMu-2015-Bc-11); 西北民族大学研究生科研创新项目 (Yxm2016138、Yxm2018138)

作者简介: 常秋燕 (1991-), 女, 河北衡水人, 硕士研究生, 研究方向为病原生物学与动物疫病防治。

通讯作者: 冯玉萍, (E-mail) fyp@xbmu.edu.cn; 马晓霞, (E-mail) max-iaoxia956@163.com

牛病毒性腹泻病毒 (Bovine viral diarrhea virus, BVDV) 属于黄病毒科 (Flaviviridae) 瘟病毒属 (*Pestivirus*), 能够引起动物高热、沉郁、不食、下痢、减奶以至停奶、反刍停止, 引发动物白细胞减少, 导致牲畜患结膜炎、空腔黏膜充血以及出现溃疡斑, 怀孕母牛可能流产或产出畸形胎儿, 新生小牛发生致死性腹泻, 严重危害养殖业的发展<sup>[1-3]</sup>。BVDV 病毒粒子呈

球形,有囊膜,直径约为 40~60 nm。病毒基因组为单股正链 RNA,长约 12.5 kb<sup>[4]</sup>,包括 5'非编码区(5'-UTR)、一个开放阅读框(Open reading frame, ORF)和 3'非编码区(3'-UTR)。在 5'-UTR 内部含有内部核糖体进入位点序列,调控病毒蛋白质进行非 cap 依赖性的翻译。基因组的 ORF 编码约 4 000 个氨基酸的多聚蛋白质,在病毒自身蛋白酶和宿主蛋白酶共同作用下裂解为 12 个成熟蛋白质,依次为 N<sup>pro</sup>、Capsid、Erns、E1、E2、P7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B。Capsid、Erns、E1 和 E2 是 BVDV 的 4 个结构蛋白质,与基因组 RNA 共同构成病毒粒子,其他蛋白质为病毒的非结构蛋白质,与蛋白质加工、病毒复制以及对细胞抗病毒防御的逃逸有关<sup>[5]</sup>。

BVDV 病毒基因组编码的第一个非结构蛋白质 N<sup>pro</sup>是瘟病毒属特有的病毒蛋白质,肝炎病毒属和黄病毒属的成员中没有此蛋白质,因此 N<sup>pro</sup>对于病毒的复制不是必需的<sup>[6]</sup>。N<sup>pro</sup>是一个半胱氨酸蛋白酶,能将自身从病毒多聚蛋白质 Cys168 和 Ser169 间切割下来,形成病毒的衣壳蛋白质(多聚蛋白质中 N<sup>pro</sup>下游紧邻的结构蛋白质)完整的 N 末端,在切割完成之后,N<sup>pro</sup>不再有蛋白酶活性,不能催化切割其他多聚蛋白质<sup>[7-8]</sup>。序列比对发现 N<sup>pro</sup>与其他蛋白酶没有同源性,因此瘟病毒属的 N<sup>pro</sup>蛋白在半胱氨酸蛋白酶家族中组成一个新的肽酶亚家族 C53<sup>[9]</sup>。N<sup>pro</sup>融合表达靶蛋白质技术就是利用 N<sup>pro</sup>的自裂解活性将靶蛋白质与非靶蛋白质切割开,从而使下游蛋白质生成完整的 N 末端序列。N<sup>pro</sup>没有跨膜区域,不能分泌到细胞外<sup>[10]</sup>。在感染的细胞中,游离的 N<sup>pro</sup>还可以抑制干扰素  $\alpha/\beta$  的产生,通过诱导干扰素调节因子 3(Interferon regulatory factor 3, IRF3)蛋白酶体的降解,破坏 I 型干扰素的产生,这表明 N<sup>pro</sup>蛋白可能在病毒拮抗宿主抗病毒过程中发挥重要作用<sup>[11-13]</sup>。有研究结果表明 N<sup>pro</sup>蛋白与病毒的毒力有关,这有待深入研究,但该蛋白质与病毒的复制能力没有直接相关性。Tratschin 等<sup>[14]</sup>在 1998 年发现 N<sup>pro</sup>基因被替换后,猪瘟病毒(CSFV)在细胞内的复制没有发生明显变化。后来,Mayer 等<sup>[15]</sup>通过体内实验将温和型和 CSFV 毒株 Alfort/187 和强毒力株 Eystrup 的 N<sup>pro</sup>基因缺失,发现毒力减弱,而将强毒力株 Eystrup 的 N<sup>pro</sup>基因替换成无毒力疫苗株 Riems 的 N<sup>pro</sup>基因后,毒力依然很强,说明 N<sup>pro</sup>蛋白与病毒毒力相关,但是并没有起到直接的决定性作用。

在宿主细胞中,BVDV 转录翻译为 1 条多聚蛋白质,只有 N<sup>pro</sup>蛋白完整地多聚蛋白质的 N-末端自我催化切割下来,病毒的其他蛋白质才可以行使各自的功能,辅助病毒复制包装成完整的病毒。尽管在抗病毒过程中,对 N<sup>pro</sup>蛋白的研究为抗病毒药物的研发提供了一种独特的方法,但是由于 N<sup>pro</sup>蛋白细胞内自催化活性以及反式催化活性的缺失,在体外研究 N<sup>pro</sup>的裂解效率是非常困难的<sup>[16]</sup>。因此,本研究通过构建含有切割位点的 N<sup>pro</sup>基因和绿色荧光蛋白质(Green fluorescent protein, GFP)基因的重组融合质粒,在原核表达系统中研究 N<sup>pro</sup>蛋白的切割效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒、病毒

*E.coli* DH5 $\alpha$  和 *E.coli* BL21(DE3)菌株,购买于北京全式金生物技术有限公司。pET-28a(+)表达载体由本实验室保存。BVDV GSTZ 病毒株(GenBank 登录号:MF172980.1)由本实验室分离并鉴定。

### 1.2 试剂

TRIzol 购买于 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒、PCR 试剂盒、限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Eco* R I 购买于大连宝生物工程有限公司,质粒提取试剂盒购买于北京索莱宝生物技术有限公司,胶回收试剂盒购买于兰州美伯生物技术有限公司,蛋白质非预染与预染 Marker 购买于美国 Thermo scientific 公司,鼠源 His 单抗、鼠源 GFP 单抗、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 购买于美国 Sigma 公司。

### 1.3 N<sup>pro</sup>基因扩增

MDBK 细胞接种 1MOIGSTZ,待细胞出现病变后,反复冻融 3 次,超速离心取上清液,提取病毒 RNA,进行反转录。PCR 扩增 N<sup>pro</sup>基因。上游引物(N<sup>pro</sup>-F)序列为 5'-CCGGAATTCATGGAGTTGATTTCAAATGAACCTT-3',下游引物(N<sup>pro</sup>-R)序列为 5'-CGCGGATCCTTAGACGGGAGATACCCAATGT-TCAACG-3',斜体部分为添加的 *Eco* R I、*Bam* H I 酶切位点与保护性碱基。1%琼脂糖凝胶电泳,电压 200 V,电流 200 mA。切胶回收目的片段。*Eco* R I、*Bam* H I 双酶切验证重组质粒。

### 1.4 重组质粒 pET-28a-N<sup>pro</sup>的构建与表达

利用 PCR 引物中 5'端引入的 *Eco* R I、*Bam* H I 酶切位点和保护性碱基,将 N<sup>pro</sup>基因连接到原核表达载体 pET-28a(+)上,构建重组质粒

pET-28a- $N^{pro}$ 。将表达质粒 pET-28a 与纯化后的  $N^{pro}$  PCR 产物进行 *Eco* R I、*Bam* H I 酶切,回收纯化酶切产物。用 T4 DNA 连接酶 16 °C 过夜连接,转化感受态细胞 *E.coli* DH5 $\alpha$ ,涂布于含有卡那霉素(Kan)的 LB 平板上,37 °C 恒温培养过夜。第 2 d,挑取菌斑于 37 °C、220 r/min 振荡培养 12 h,抽提质粒进行酶切验证。将阳性质粒送上海金唯智生物工程有限公司进行测序,测序阳性质粒命名为 pET-28a- $N^{pro}$ 。将重组质粒 pET-28a- $N^{pro}$  转化表达菌 *E.coli* BL21 (DE3),37 °C 振荡培养至 OD 值达到 0.6~0.8,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,培养 6 h。收集菌体,加入磷酸盐缓冲溶液超声波裂解,高速离心后分别收集上清液和沉淀,沉淀中加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液煮沸 10 min,进行 SDS-PAGE 电泳。然后将 SDS-PAGE 蛋白质胶进行考马斯亮蓝染色,观察蛋白质表达情况。同时设立空载体和未诱导表达对照。进一步进行 Western Blot 检测鉴定,一抗为 1:2 000 稀释的鼠源抗 His 标签单克隆抗体,二抗为 1:5 000 稀释的 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG。

### 1.5 重组融合质粒 pET-28a- $N^{pro}$ -GFP 的构建与表达

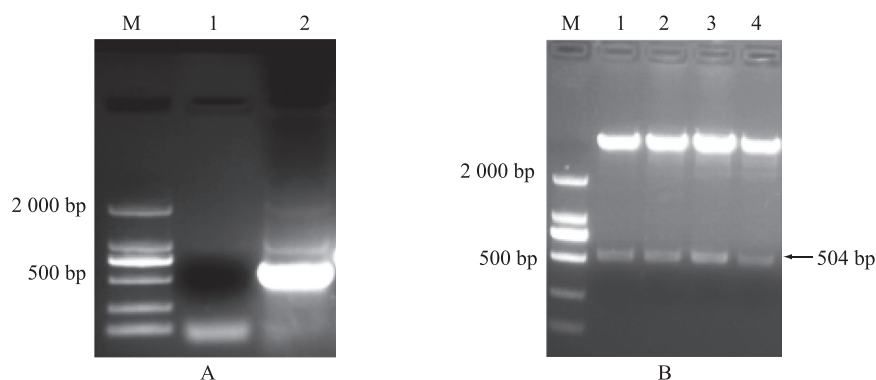
将测序正确的  $N^{pro}$  基因与 GFP 基因进行融合,中间添加 GSTZ 毒株 Capsid N-末端的 12 个碱基(TCA-GACACAAAA),送上海金唯智生物工程有限公司进行合成,合成序列如下:ATGGAGTTGATTTCAAATG-AACTTTTATACAAAACATACAAACAAAAACCTGT-AGGAGTGGAGGAACCAGTTTATGATCGGGGAGGG-AAACCTTTATTTGGTGAGAAGGGGACAGTCCACC-ACCAATCGACGCTAAAGCTCCACATAAGAGAGG-AGAGCGCGAAGTCCCTACCAATTTGGTGTCCCTA-CCGAAGAGAGGTGACTGCAGATCGGGTAACAATA-GAGGTCTGTGAGCGGAATCTATCTTAAGCCAGG-GCCACAATTCTACCAGGACTATGTAGGGCCGGTC-TACCACAGAGCCCCGCTGGAGCTATTCGAGGAAG-GGTCTATGTGTGAAACAACCAAACGGATAGGGAG-AGTGAAGTGGCAGTGATAGCAAGCTATACCATATT-TATGTGTGTATAGATGGATGTATAATAGTGAAGA-GTGCCACGAGAAGTAACCAGAGGGTATTGAGATG-GGTCCACAACAAGCTCAACTGCCCTCTATGGGTT-ACAAGTTGCTCAGACACAAAAAGTGAGCAAGGGCGA-GGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCTTGCTC-GAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCA-

CGGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTA-CGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACC-GGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGA-CCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCG-CTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTC-AAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGC-GCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAA-GACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACC-CTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACT-TCAAGGAGGACGGCAACATCTCTGGGGCACAAGCT-GGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATC-ATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTG-AACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCA-GCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACAC-CCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGAC-AAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA-AAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCT-GCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTC-GGCATGGACGAGCTGTACAAG。斜体部分为  $N^{pro}$  的切割位点。将重组融合质粒 pET-28a- $N^{pro}$ -GFP 转化表达菌 *E.coli* BL21 (DE3),37 °C 振荡培养至 OD 值达到 0.6~0.8,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,培养 6 h。收集菌体,加入 PBS 超声波裂解,高速离心后分别收集上清液和沉淀,沉淀中加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液煮沸 10 min,进行 SDS-PAGE 电泳。将经 IPTG 诱导后的 pET-28a- $N^{pro}$ -GFP 进行 Western Blot 检测鉴定,一抗为 1:2 000 稀释的鼠源抗 GFP 标签单抗,二抗为 1:5 000 稀释的 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG,检测  $N^{pro}$  的切割效率。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒 pET-28a- $N^{pro}$ 的构建

提取 GSTZ 毒株感染 MDBK 细胞上清液中的病毒 RNA,进行 RT-PCR,扩增  $N^{pro}$  基因片段,得到约 500 bp 的基因片段(图 1A),切胶回收目的片段。利用 PCR 引物中 5' 端引入的限制性内切酶 *Eco* R I、*Bam* H I 酶切位点和保护性碱基将  $N^{pro}$  基因连接到原核表达载体 pET-28a (+) 上,构建重组质粒 pET-28a- $N^{pro}$ 。重组质粒双酶切验证结果(图 1B)显示,阳性质粒中含有约 500 bp 的  $N^{pro}$  基因,与预期相符。对阳性克隆进行 DNA 测序,选取与参考序列完全一致的重组质粒用于后续表达试验。



A:  $N^{pro}$  基因的 PCR 扩增结果, M 为 DNA 分子量标准 (DL2000), 1 为双蒸水 (阴性对照), 2 为  $N^{pro}$  基因; B: 表达质粒双酶切结果, M 为 DNA 分子量标准 (DL2000), 1~4 为 pET-28a- $N^{pro}$ 。

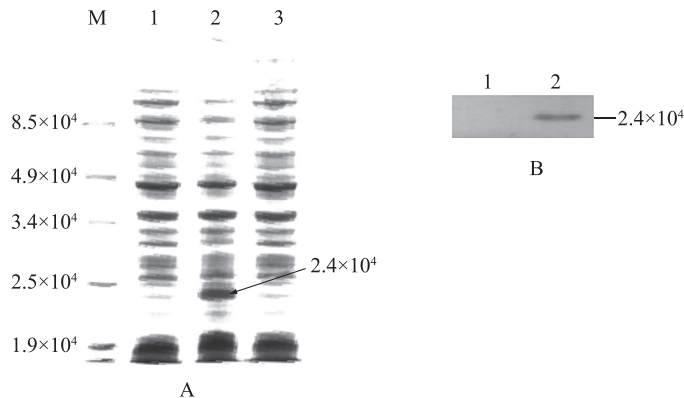
图 1 BVDV 病毒  $N^{pro}$  基因扩增和表达质粒 pET-28a- $N^{pro}$  酶切鉴定

Fig.1 Amplification of bovine viral diarrhea virus (BVDV)  $N^{pro}$  gene and identification of recombination plasmid pET-28a- $N^{pro}$  by restriction enzymes digestion

## 2.2 重组质粒 pET-28a- $N^{pro}$ 的诱导表达与 Western Blot 鉴定

用 IPTG 诱导 pET-28a- $N^{pro}$  和 pET-28a 转化的表达菌 *E.coli* BL21 (DE3), 收集菌体, 超声波裂解, 煮沸后进行 SDS-PAGE 电泳。结果显示, pET-28a- $N^{pro}$  表

达菌用 IPTG 诱导后其裂解液电泳图谱中出现相对分子量约为  $2.4 \times 10^4$  的目的条带, 与  $N^{pro}$  蛋白大小相符 (图 2A)。Western Blot 检测鉴定结果显示, pET-28a- $N^{pro}$  转化表达菌诱导后出现约为  $2.4 \times 10^4$  的目的条带, 而 pET-28a 对照中没有出现此条带 (图 2B)。



A:  $N^{pro}$  蛋白质的诱导表达结果, M 为非预染蛋白质分子量标准, 1 为未诱导的 pET-28a- $N^{pro}$  转化菌, 2 为 IPTG 诱导的 pET-28a- $N^{pro}$  转化菌, 3 为 IPTG 诱导的 pET-28a 转化菌; B:  $N^{pro}$  蛋白质的 Western Blot 鉴定结果, M 为预染蛋白质分子量标准, 1 为 IPTG 诱导的 pET-28a 转化菌, 2 为 IPTG 诱导的 pET-28a- $N^{pro}$  转化菌。

图 2 重组的 BVDV 病毒  $N^{pro}$  蛋白质的诱导表达与 Western Blot 鉴定

Fig.2 Induced expression and Western blot identification of recombinant BVDV  $N^{pro}$  protein

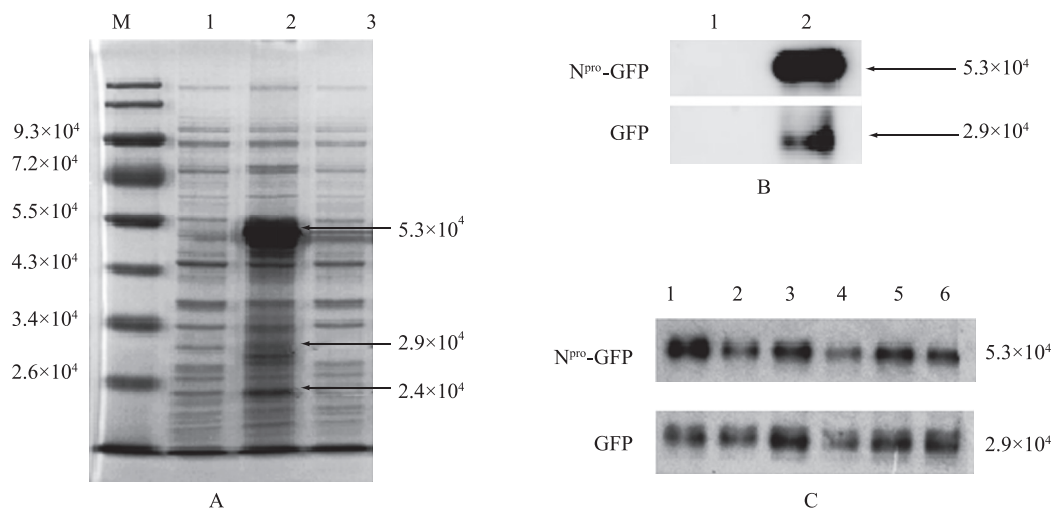
## 2.3 重组融合质粒 pET-28a- $N^{pro}$ -GFP 的诱导表达以及裂解效率鉴定

用 IPTG 诱导重组融合质粒 pET-28a- $N^{pro}$ -GFP 转化的表达菌 *E.coli* BL21 (DE3), 收集菌体, 超声波裂解, 煮沸后进行 SDS-PAGE 电泳。结果显示, pET-28a- $N^{pro}$ -GFP 转化菌用 IPTG 诱导后其裂解液电泳图谱中出现相对分子量约为  $5.3 \times 10^4$ 、 $2.9 \times 10^4$  和

$2.4 \times 10^4$  的目的条带, 分别与重组融合蛋白质  $N^{pro}$ -GFP、GFP、 $N^{pro}$  大小相符 (图 3A)。Western Blot 检测鉴定结果显示, pET-28a- $N^{pro}$ -GFP 转化表达菌诱导后出现约  $5.3 \times 10^4$  和  $2.9 \times 10^4$  2 条目的条带, 与  $N^{pro}$ -GFP、GFP 大小相符 (图 3B、图 3C)。利用 Image J 软件对  $N^{pro}$ -GFP 蛋白条带进行灰度计算, 测得  $N^{pro}$  蛋白的裂解效率 (表 1)。融合蛋白质  $N^{pro}$ -GFP



在表达菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中的裂解效率为 60.28%。



A: 重组蛋白质 N<sup>pro</sup>-GFP 的诱导表达结果, M 为预染蛋白质分子量标准, 1 为未诱导的 pET-28a-N<sup>pro</sup>-GFP 转化菌, 2 为 IPTG 诱导的 pET-28a-N<sup>pro</sup>-GFP 转化菌, 3 为 IPTG 诱导的 pET-28a 转化菌; B: 重组蛋白质 N<sup>pro</sup>-GFP 的 Western Blot 鉴定结果, 1 为 IPTG 诱导的 pET-28a 转化菌, 2 为 IPTG 诱导的 pET-28a-N<sup>pro</sup>-GFP 转化菌; C: 不同表达菌株的重组蛋白质 N<sup>pro</sup>-GFP 的裂解效率鉴定结果, 1~6 为 6 个 pET-28a-N<sup>pro</sup>-GFP 转化菌。

图3 重组融合蛋白质 N<sup>pro</sup>-GFP 的诱导表达及 N<sup>pro</sup>蛋白酶切效率鉴定  
Fig.3 SDS-PAGE analysis of induced expression and efficiency of enzyme digestion of recombinant protein N<sup>pro</sup>-GFP

表1 融合蛋白质 N<sup>pro</sup>-GFP 的裂解效率

Table 1 Cleavage efficiency of N <sup>pro</sup> -GFP fusion protein			
组号	蛋白质	蛋白质条带面积(μm <sup>2</sup> )	裂解率(%)
1	N <sup>pro</sup> -GFP	91	49.4
	GFP	89	
2	N <sup>pro</sup> -GFP	34	65.3
	GFP	64	
3	N <sup>pro</sup> -GFP	62	58.7
	GFP	88	
4	N <sup>pro</sup> -GFP	29	60.8
	GFP	45	
5	N <sup>pro</sup> -GFP	52	60.6
	GFP	80	
6	N <sup>pro</sup> -GFP	47	66.9
	GFP	95	

### 3 讨论

牛病毒性腹泻是由黄病毒科瘟病毒属的牛病毒性腹泻病毒引起的以高热、白细胞减少为特征的一种传染病,给养殖业带来了巨大的经济损失<sup>[2]</sup>。其中 N<sup>pro</sup>蛋白是 BVDV 病毒基因组编码的第一个非结构蛋白质,又称 p20 或前导蛋白酶,是所有瘟病毒成

员中编码的第一个蛋白质,由 168 个氨基酸残基组成,是一种具有蛋白质水解酶活性的半胱氨酸蛋白酶,具有与木瓜样半胱氨酸蛋白酶活性中心相似的序列,其中 Cys69 和 His130 这两个位点是蛋白酶的活性中心,能够催化 N<sup>pro</sup>蛋白自身从多聚蛋白质链上裂解下来,从而形成成熟的蛋白质<sup>[17]</sup>。N<sup>pro</sup>蛋白主要在宿主细胞的细胞质中分布,其中第 49 位组氨酸残基(His49)是其蛋白质水解酶活性的必需基团,可催化 Tyr164 和 Val165 间肽键的断裂,另外已经证明猪瘟病毒中 N<sup>pro</sup>蛋白裂解位点附近的 Cys168 和 Ser169 也比较保守<sup>[18]</sup>。通过对比 BVDV、猪瘟病毒(CSFV)和羊边界病病毒(BDV)3 种病毒 N<sup>pro</sup>基因所编码的氨基酸序列,发现其同源性比较高,并且 Glu22、His49 和 Cys69 残基高度保守,这 3 个氨基酸残基是保持 N<sup>pro</sup>蛋白酶裂解活性所必需的<sup>[7]</sup>。有研究者报道 N<sup>pro</sup>蛋白锌配位的残基发生突变后,锌结合和 IRF3 相互作用的功能均会消失,由此可见该蛋白质结合锌的功能对某些蛋白质之间的相互作用是必不可少的<sup>[19]</sup>。Zogg 等<sup>[20]</sup>对 BVDV-3/HoBi-like 毒株非结构蛋白 N<sup>pro</sup>的晶体结构及其催化活性中心进行了全面细致的分析,发现该蛋白质裂解前后的中间复合体结构有 3 个活化相关元件,作为基本的、酸性的和亲核性的可催化水解活性基团,具有非常

独特的作用。目前,从非结构蛋白质 N<sup>pro</sup>的特殊结构角度出发,开辟一条可自行裂解融合蛋白质及作为药物靶向的新途径,成为新的研究热点<sup>[21]</sup>。

由于在翻译过程中 N<sup>pro</sup>具有自裂解催化功能,很难从细胞提取物中测定其裂解活性,因此 Rumenapf 等<sup>[6]</sup>研究 N<sup>pro</sup>蛋白酶活性时在无细胞体外翻译系统中将蛋氨酸(35S)进行标记,Achmuller 等<sup>[22]</sup>将 N<sup>pro</sup>蛋白进行突变。为了在体外研究 N<sup>pro</sup>的裂解活性,我们在大肠杆菌表达系统中表达了 N<sup>pro</sup>-GFP 融合蛋白质,由于 N<sup>pro</sup>蛋白不稳定,一旦催化切割下来,极易被降解掉,所以我们通过蛋白质免疫印迹方法测定 GFP 的表达量,从而确定 N<sup>pro</sup>蛋白的裂解效率,为进一步研究 N<sup>pro</sup>的功能提供一种简单的方法。

将通过 RT-PCR 扩增得到的 GSTZ 毒株 N<sup>pro</sup>基因测序结果在 GenBank 中进行比对,发现其基因序列虽然与 C24V(GenBank 登录号:AF091605.1)不同,但是两者编码的氨基酸序列是相同的,这说明 BVDV 基因的突变没有影响 N<sup>pro</sup>蛋白的酶切活性。重组融合质粒 pET-28a-N<sup>pro</sup>-GFP 表达结果显示,N<sup>pro</sup>蛋白在体外具有切割活性,可以将 GFP 蛋白从 C-末端精确切割下来,但是没有完全切割,切割效率为 60.28%,这可能与选择的表达载体、表达系统等有关。因此还有待进一步研究影响 N<sup>pro</sup>酶切的相关因素。

本研究应用大肠杆菌表达系统成功表达了 N<sup>pro</sup>蛋白以及 N<sup>pro</sup>-绿色荧光蛋白质(GFP)融合蛋白质,该融合蛋白质含有 N<sup>pro</sup>蛋白酶的切割位点,这为我们在体外研究 N<sup>pro</sup>的切割效率提供了底物,也为进一步研究 N<sup>pro</sup>蛋白奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] 王雪枝. 牛病毒性腹泻病毒 E0 蛋白质单抗与多抗制备及实验感染小鼠的研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2014.
- [2] 陈博言. 兽医传染病学[M]. 北京:中国农业出版社, 2006.
- [3] 顾蓓蓓,王妍钰,李双洁,等. 生物制品中牛病毒性腹泻病毒 RT-PCR 及套式 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(8): 30-32.
- [4] MEYERS G, THIEL H J. Molecular characterization of pestivirus [J]. Adv Virus Res, 1996, 47: 53-118.
- [5] LINDENBACH B D T H J, RICE C M. Flaviviridae: The viruses and their replication [M]. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- [6] RUMENAPF T, STARK R, HEIMANN M, et al. N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis [J]. J Virol, 1998, 72(3): 2544-2547.
- [7] STARK R, MEYERS G, RUMENAPF T, et al. Processing of pestivirus polypeptide; cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus [J]. J Virol, 1993, 67(12): 7088-7095.
- [8] WISKERCHEN M, BELZER S K, COLLETT M S. Pestivirus gene expression; the first protein product of the bovine viral diarrhoea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity [J]. J Virol, 1991, 65(8): 4508-4514.
- [9] RAWLINGS N D, BARRETT A J, BATEMAN A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40: 343-350.
- [10] TAMURA T, SAKODA Y, YOSHINO F, et al. Selection of classical swine fever virus with enhanced pathogenicity reveals synergistic virulence determinants in E2 and NS4B [J]. J Virol, 2012, 86(16): 8602-8613.
- [11] BAUHOFFER O, SUMMERFIELD A, SAKODA Y, et al. Classical swine fever virus Npro interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation [J]. J Virol, 2007, 81(7): 3087-3096.
- [12] CHEN Z, RIJNBRAND R, JANGRA R K, et al. Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by Npro from a cytopathic bovine viral diarrhoea virus [J]. Virology, 2007, 366(2): 277-292.
- [13] GIL L H, ANSARI I H, VASSILEV V, et al. The amino-terminal domain of bovine viral diarrhoea virus Npro protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism [J]. J Virol, 2006, 80(2): 900-911.
- [14] TRATSCHIN J D, MOSER C, RUGGLI N, et al. Classical swine fever virus leader proteinase Npro is not required for viral replication in cell culture [J]. J Virol, 1998, 72(9): 7681-7684.
- [15] MAYER D, HOFMANN M A, TRATSCHIN J D. Attenuation of classical swine fever virus by deletion of the viral N(pro) gene [J]. Vaccine, 2004, 22(3/4): 317-328.
- [16] GOTTIPATI K, ACHOLI S, RUGGLI N, et al. Autocatalytic activity and substrate specificity of the pestivirus N-terminal protease Npro [J]. Virology, 2014, 452/453: 303-309.
- [17] 崔保安,朱 沙,陈圣先. 牛病毒性腹泻病毒蛋白质特性的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2003(2): 32-34.
- [18] 孙宏进,陶 洁,朱礼倩,等. 牛病毒性腹泻病毒的分子生物学研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2011, 43(2): 99-103.
- [19] JOHNS H L, DOCEUL V, EVERETT H, et al. The classical swine fever virus N-terminal protease N(pro) binds to cellular HAX-1 [J]. J Gen Virol, 2010, 91(Pt 11): 2677-2686.
- [20] ZOGG T, SPONRING M, SCHINDLER S, et al. Crystal structures of the viral protease Npro imply distinct roles for the catalytic water in catalysis [J]. Structure, 2013, 21(6): 929-938.
- [21] 张 倩. 猪源 BVDV-2 非结构蛋白质 N~(pro) 的原核表达及其对猪 PBMCs 和相关细胞因子的影响[D]. 扬州:扬州大学, 2016.
- [22] ACHMULLER C, KAAR W, AHRER K, et al. N(pro) fusion technology to produce proteins with authentic N termini in *E. coli* [J]. Nat Methods, 2007, 4(12): 1037-1043.

(责任编辑:张震林)