

## 猪细小病毒 NS1 基因的原核表达及重组蛋白的复性

金喜新<sup>1,2</sup>, 崔保安<sup>1\*</sup>, 魏战勇<sup>1</sup>, 刘占通<sup>1,2</sup>, 王学斌<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>河南农业大学 河南省动物食品安全重点实验室 郑州 450002)

(<sup>2</sup>河南省畜牧局 郑州 450008)

**摘 要** 利用 PCR 技术扩增出 PPV NS1 基因抗原区。将目的基因与原核表达载体 pGEX-4T-1 进行连接并转化,重组质粒经鉴定并测序。测序结果表明,目的基因插入的位置、大小和读码框均正确,通过试验摸索并确定了表达 NS1 基因的最佳诱导条件: IPTG 终浓度为 1.0mmol/L,诱导时间为 10h,温度为 37℃,其表达量占全菌蛋白的 29.8%。表达产物经 SDS-PAGE 分析,得到分子量约为 52kDa 的重组蛋白且以包涵体形式存在。重组蛋白经 Western blot 检测,结果证明重组蛋白可被 PPV 阳性血清识别。用 8mol/L 尿素变性溶解包涵体,再用稀释方法和还原型、氧化型谷胱甘肽系统相结合的方法对重组蛋白进行复性。ELISA 检测表明,复性后的重组蛋白有良好的生物活性。

**关键词**: 猪细小病毒; NS1 基因; 原核表达; 变性; 复性

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0126-05

猪细小病毒(Porcine Parvovirus, PPV)是引起母猪繁殖障碍的主要病原之一,其特征是母猪妊娠前期受到感染时,经胎盘使胚胎或胎儿受到侵袭,引起母猪流产、不孕、产畸形胎、死胎、木乃伊胎及弱胎等,另外还可以引起仔猪的皮炎和腹泻,其它类型的猪感染后无明显临床特征<sup>[1-4]</sup>。2004 年,国内宋云义等对来自 7 个猪场的 157 份猪血清抗体进行了检测,结果表明猪场阳性率 100%<sup>[5]</sup>,近年来,PPV 又常同乙型脑炎病毒、圆环病毒、猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒等协同作用而加重了其危害<sup>[6]</sup>。所以,加强对 PPV 的检测、监测及预防十分紧迫。NS1 基因编码 PPV 最主要的非结构蛋白 NS1 蛋白,NS1 蛋白是细小病毒基因组本身编码的反式激活蛋白,对 PPV 早期和晚期的转录都发挥着重要的调节作用<sup>[7]</sup>。NS1 蛋白只有在 PPV 进行复制时才可大量表达,PPV 在 DNA 合成起始时感染宿主细胞,在感染细胞的细胞质中可分离出 NS1,而在成熟的病毒颗粒子中含量很少或分离不出 NS1<sup>[8]</sup>。灭活疫苗很难刺激机体产生针对 NS1 蛋白的抗体,而自然感染猪却可产生大量抗体,因此,检测非结构蛋白 NS1 的抗体可以用来区别灭活疫苗免疫猪和自然感染猪<sup>[9]</sup>。本试验将 NS1 基因在大肠杆菌中进行了高效表达,重组蛋白进行初步纯化,以期用 NS1 基因表达的蛋白作为鉴别诊断制剂,建立猪细小病毒病的

检测方法,同时为 NS1 重组蛋白作为抗原用于制备特异性单克隆抗体奠定了物质基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 病毒、菌株和载体**: PPV HN-1 株由本实验室从患有繁殖障碍性疾病的母猪胎盘中分离,经过鉴定并保存,通过多次传代已适应 PK-15 细胞(购自中国兽药监察所),能够引起细胞拉网、脱落等细胞病变。大肠杆菌菌株 BL21、pGEX-4T-1 原核表达载体均购自 Promega 公司并由本实验室保存。

**1.1.2 酶和试剂**: 蛋白酶 K 和 T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司。限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I、*Taq* 酶、DNA Marker DL 2000 和异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自大连宝生物公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自杭州维特洁生物技术有限公司,质粒提取试剂盒购自北京博大泰克生物公司,PPV 阳性血清购自 Svanova Biotech AB(Sweden),辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG 购自 BETHYL 公司,其它常规试剂均为分析纯。

#### 1.2 病毒制备

按常规细胞培养方法<sup>[1]</sup>,使用 PK-15 细胞,用 RPMI 1640 培养液加 10% 无牛病毒性腹泻病毒抗体的胎牛血清作为 PK-15 细胞的培养液(pH 7.2);在

基金项目: 国家“十五”食品安全重大攻关专项(2001BA804A30-11)

\* 通讯作者。Tel: 86-371-63558878; E-mail: baocanui@henan.edu.cn

作者简介: 金喜新(1979-),男,河南信阳人,从事动物疫病分子病原学及分子免疫学研究。

其他作者: 田永军

收稿日期: 2006-03-15; 接受日期: 2006-06-21; 修回日期: 2006-07-05

细胞传代时直接接种 PPV 病毒,按 1000 TCID<sub>50</sub> 接种 PK-15 细胞,接种 3~4d 待细胞出现明显病变后,收获病毒,冻于 -20℃ 备用。

### 1.3 引物的设计与合成

以 GenBank 公布的 NADL-2 株(Accession:NC-001718)为参照序列,用 Primer Premier 5.0 生物软件设计出了 NS1 上游引物和下游引物,上游引物 P1 带有 *Eco*R I 酶切位点,下游引物 P2 带有 *Sal* I 酶切位点,上、下游引物之间扩增片段长 624bp。引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成,引物的序列如下:P1 5'-CTGAATTCGCTGACTGGGTATCGCT-3';P2:5'-CCGTCGACTCCTGTCTGTTTAGTAC-3'。

### 1.4 PPV NS1 基因的扩增

参照文献 [10] 进行 NS1 基因的提取,以提取的 PPV DNA 作为模板进行 PCR 反应,PCR 反应采用 50 $\mu$ L 反应体系:10 $\times$  PCR buffer 5 $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 6mmol/L, dNTPs 浓度为 100 $\mu$ mol/L,上下游引物(50 $\mu$ mol/ $\mu$ L)各 0.5 $\mu$ L,模板 8 $\mu$ L,最后用灭菌双蒸水添加至 50 $\mu$ L。反应条件为:96℃ 3min;94℃ 1min;56℃ 50s;72℃ 1.5min,进行 32 个循环,72℃ 10min,-4℃ 保存。

取 PCR 产物 6 $\mu$ L 与 2 $\mu$ L 上样缓冲溶液(溴酚蓝)混合后,在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶中含 0.5 $\mu$ g/mL 溴化乙锭(EB),电泳缓冲液为 1 $\times$  TAE,70V~120V,5min~15min 电泳完毕后以 Marker DL 2000 为对照,在紫外凝胶透射仪里观察,观察扩增片段的长度。

### 1.5 原核表达载体的构建与鉴定

目的基因和原核表达载体 pGEX-4T-1 质粒用 *Eco*R I、*Sal* I 进行酶切,纯化回收的目的片段与表达载体连接,连接物转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞。

碱裂解法快速提取质粒,筛选电泳时较阳性移动慢的重组质粒为模板,进行 PCR 鉴定,PCR 扩增体系和反应条件参照 1.4 进行。模板添加 1 $\mu$ L。

用 *Eco*R I、*Sal* I 对 PCR 鉴定阳性质粒进行酶切分析,电泳观察酶切结果。将 PCR 扩增、酶切鉴定均为阳性的质粒命名为 pGEX-NS1-HN1,阳性菌液过夜培养,送宝生物(大连)有限公司测序。

### 1.6 重组质粒的诱导表达

将测序正确的阳性重组菌 10 $\mu$ L 接种至 3mL 2XYT 培养液(100 $\mu$ g/mL Amp<sup>+</sup>)中,37℃ 培养过夜。取过夜培养物 200 $\mu$ L 接种于 20mL 2XYT 培养液中,培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~1.0 时,加入 IPTG 至终浓度 1.0mmol/L,37℃ 诱导表达,并每隔 1h 收一次菌。对不同的阳性克隆分别表达,筛选出表达量高的克隆,

并用未诱导的菌液和空载体作为空白和阴性对照。用 15% 的聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 检测<sup>[11]</sup>。

### 1.7 Western blot 分析

经 SDS-PAGE 后,将凝胶上的蛋白转印至硝酸纤维素膜(NC)上,用辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG 作为二抗进行 Western blot 分析。电转印完毕后在 NC 膜上用铅笔做好标记。将蛋白标准分子量剪下,置于氨基黑染色液中迅速染色,脱色。其余 NC 膜用 PBST 冲洗,加入封闭液,4℃ 过夜。封闭结束后,用 PBS 冲洗 NC 膜 4~5 次,加入 PBST 按照 1:800 (按照试剂说明书的要求稀释)倍稀释的猪细小病毒阳性血清,37℃ 作用 3h。加入稀释好的羊抗猪 IgG (二抗),室温下作用 1.5h。将 NC 膜转移到底物溶液中,等出现明显条带时,立即转入 PBST 缓冲液中终止显色,室温保存。

### 1.8 重组蛋白的变性与复性

**1.8.1 包涵体的制备** 按最佳条件诱导表达重组菌 500mL,离心诱导培养的重组 pGEX-NS1-HN1 工程菌,用蒸馏水洗两次,再用 1/10 原培养体积的 TE1 [10.0mmol/L Tris-HCl (pH8.0),1.0mmol/L EDTA] 缓冲液重悬细菌沉淀。在细菌悬液中加入溶菌酶至终浓度为 200mg/L 和 1/10 体积的 1% Triton X-100,30℃ 作用 15~30min 后,于冰浴中超声裂解细菌(80W、作用 10s、间隔 10s、30 次)此时溶液由粘稠变为清亮。4℃、10000r/min 离心 10min 收集包涵体沉淀。

**1.8.2 包涵体的变性** 分别用 TE2 [10.0mmol/L Tris-HCl (pH8.0),1.0mmol/L EDTA,2mol/L 尿素]、TE3 [10.0mmol/L Tris-HCl (pH8.0),1.0mmol/L EDTA,1% Triton X-100 (V/V)] 溶液各洗涤包涵体沉淀 3 次,4℃、10000r/min 离心 10min 收集沉淀。加 10mL 变性液 [8mol/L 尿素,20.0mmol/L Tris-HCl (pH8.0),10.0mmol/L DTT] 溶解沉淀,室温放置 1h 以上。4℃、12000r/min 离心 10min 收集变性溶解的上清液,去除不溶性杂质。

**1.8.3 重组蛋白的复性** 利用紫外可见分光光度计测定变性溶解的 NS1 蛋白浓度,在变性液中加入相应体积的稀释液 [20.0mmol/L Tris-HCl (pH8.0),2.0mmol/L EDTA],调整蛋白终浓度在 100 $\mu$ g/mL 以下并使溶液中尿素浓度保持在 1mol/L,然后加入还原型谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG),使其终浓度分别达到 1mmol/L 和 0.1mmol/L,4℃ 放置 20h 以上进行蛋白复性。复性后用缓冲液 [20mmol/L Tris-G (pH8.0)] 透析 48h,每 6h 换液 1 次,透析完成

即溶液中不含尿素,再用 PEG28000 浓缩透析液,浓缩后的蛋白过滤除菌,小量分装冻存于  $-70^{\circ}\text{C}$  备用。

**1.8.4 复性蛋白浓度、活性的测定:**复性蛋白浓缩后,用紫外分光光度计测定样品在 260nm 和 280nm 波长的吸光值,按照公式计算样品中蛋白质含量:蛋白质浓度 ( $\text{mg/mL}$ ) =  $(1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}) \times$  稀释倍数。

复性后的蛋白作为抗原包被酶标板,用 PPV 阳性血清进行间接 ELISA 试验,看纯化的蛋白有无活性,同时以未复性的包涵体裂解液作对照。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增结果

用引物对 P1/P2 扩增 PPV NS1 基因,取  $6\mu\text{L}$  PCR 产物与  $2\mu\text{L}$  上样缓冲液混合后,在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,以 Marker DL 2000 为对照,凝胶电泳显示该片段约为 624bp,与预期结果相符,对照组水没有扩增出条带。因此初步确定已获得 PPV NS1 片段。

### 2.2 重组质粒的鉴定结果

小量制备的 pGEX-NS1-HN1 质粒,经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切及 PCR 鉴定。0.8% 琼脂糖凝胶电泳,双酶切结果显示,酶切后有两条带,一条约 4.9kb,与 pGEX-4T-1 载体大小一致,另一条约 0.6kb,与 PPV NS1 大小一致。PCR 扩增产物片段长度约 0.6kb,与目的基因大小一致,对照组水没有扩增出条带。表明 PPV NS1 插入载体的位置和大小正确。

### 2.3 PPV NS1 基因序列分析与比较

序列测定结果表明,特异引物扩增出 PPV HN1 株 NS1 基因核苷酸长度为 624bp( NS1 基因全长的 Accession :AY789533),与预期大小一致。将所测 NS1 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列与国内外普遍流行的毒株( NADL-2 株, Accession :NC-001718; Kress 株, Accession :U44978; China 株, Accession :AY583318) 进行序列比较,结果发现核苷酸同源性达到 99.2% 以上,氨基酸同源性达到 99.0% 以上,不同毒株之间核苷酸、氨基酸同源性极高,说明 NS1 基因具有高度保守性。

### 2.4 NS1 蛋白主要抗原区在大肠埃希氏菌中的诱导表达

通过不同诱导时间、温度和诱导剂浓度对重组菌进行诱导表达,确定 NS1 基因最佳表达条件: IPTG 浓度为  $1.0\text{mmol/L}$ ,诱导温度为  $37^{\circ}\text{C}$ 、诱导时间为 10h。而在诱导 8h、10h、12h 等不同时间时,NS1 基因的表达量区别并不明显。将表达物上清、沉淀

超声裂解物上清和尿素溶解沉淀等不同样品分别进行电泳,结果在沉淀中 NS1 蛋白含量最高,从而说明表达产物以包涵体形式存在。

### 2.5 表达产物的 SDS-PAGE 及免疫印迹分析

表达产物的 SDS-PAGE 经过染色、脱色后发现诱导菌在 52kDa 处有一条特别粗的蛋白带,与预期目的融合蛋白大小一致,未诱导菌没有出现这一条带,经诱导的空载体在 29kDa 处有一明显的蛋白带,这条带的分子量正是谷胱甘肽-S-转移酶(GST)融合表达载体 GST 的分子量,与预期一致(图 1-A)。

原核表达的 NS1 融合蛋白经 SDS-PAGE,用羊抗猪 IgG 为二抗进行免疫印迹检测,结果出现 1 条特异性的抗原-抗体结合带,根据分子量的大小推测,这条带的分子量与目的蛋白的分子量相同,从而证明原核表达的目的蛋白是 NS1 融合蛋白。NS1 融合蛋白的大量表达为进一步做蛋白纯化及以此为诊断抗原建立诊断方法奠定了物质基础(图 1-B)。

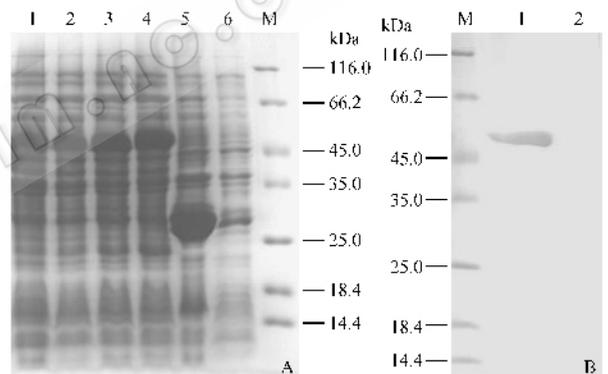


图 1 NS1 基因表达产物的鉴定及生物活性分析

Fig.1 Identification of expression products of NS1 gene and analysis of its biological activity. A :Detection of the NS1 protein with SDS-PAGE. 1 ~ 4. NS1 expression products in *E. coli* BL21; 5. pGEX-4T-1 expression products in *E. coli* BL21, as negative control; 6. *E. coli* BL21 with recombinant plasmids without induction, as blank control; M. Protein molecular weight marker (MW marker). B :Western blot analysis on the expression products. M. MW marker; 1. Western blot analysis on NS1 protein; 2. Western blot analysis on the expression GST, as negative control.

### 2.6 重组蛋白的变性、复性及复性后的反应原性检测

**2.6.1 包涵体的变性:**细菌破碎后,呈乳白色,溶液不粘稠。SDS-PAGE 分析结果显示,用  $2\text{mol/L}$  尿素洗涤后杂蛋白去除并不明显,再用 1% TritonX-100 洗涤后,包涵体中的杂蛋白明显减少,电泳结果可见杂蛋白条带变淡。

用  $8\text{mol/L}$  尿素溶解包涵体,使 NS1 蛋白变成还原态蛋白质。从试验结果来看,  $8\text{mol/L}$  尿素能很好

地溶解 NS1 包涵体,溶解后的溶液很清亮、透明,离心后几乎没有沉淀,说明蛋白变性很彻底。

**2.6.2 包涵体的复性:**在包涵体变性液中加入复性液后,发现尿素溶解后的包涵体液无浑浊现象,20h 缓慢复性后,有少量白色絮状沉淀出现,结果证明蛋白的回收率较低,达 30% 左右。取 10 $\mu$ L 进行电泳(图 2)。

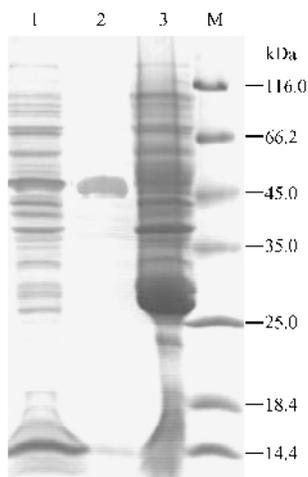


图 2 复性后 pGEX-NS1-HN1 蛋白 SDS-PAGE 的鉴定

Fig.2 Identification of the pGEX-NS1-HN1 protein after renaturation with SDS-PAGE. 1. Inclusion bodies washed by water 2. The pGEX-NS1-HN1 protein after renaturation 3. pGEX-4T-1 expression products in *E. coli* BL21, as negative control ;M. MW marker.

**2.6.3 复性蛋白浓度、活性的测定:**用紫外分光光度计测定样品在 260nm 和 280nm 波长的吸光值,通过公式计算得到 pGEX-NS1-HN1 蛋白的最终浓度为 0.4301mg/mL。

pGEX-NS1-HN1 变性蛋白和复性蛋白都可以和阳性血清反应,但复性蛋白与 PPV 阳性血清的反应性明显高于变性蛋白,复性后重组蛋白最小检出量为 2.29 $\mu$ g/mL,变性而没有复性的蛋白最小检出量为 56.11 $\mu$ g/mL,其提高程度达 25 倍左右,为进一步建立 ELISA 诊断试剂盒的试验打下了良好的基础。

### 3 讨论

完整的 PPV 粒子中含有一单股线状 DNA,链长约 5.0kb,5' 端编码的 3 种非结构蛋白是 NS1、NS2、NS3,NS1 蛋白是感染 PPV 中主要的非结构蛋白。目前认为 NS1 蛋白具有解旋活性,拓展了病毒 DNA 末端发夹结构,对病毒 DNA 的复制是必需的<sup>[12]</sup>,但其诸多功能的作用机理还不清楚<sup>[13]</sup>,猪细小病毒的研究主要集中在病毒的结构蛋白方面,而非结构蛋白的研究少有报导,NS1 蛋白的免疫原性及其在

细胞毒性、病毒的复制等方面的作用有待于深入的研究。目前,国内殷华平等<sup>[14]</sup>只是对 NS1 基因进行克隆和分析的研究,没有对非结构蛋白进行表达及初步应用进行研究。

笔者参照 GenBank 发表的猪细小病毒 NADL-2 核苷酸序列,设计了 1 对扩增 NS1 基因的引物,利用该引物对扩增出 NS1 基因,并成功构建了 pGEX-NS1-HN1 重组质粒。经过 IPTG 诱导,成功表达出与预期目的蛋白分子量相符的重组蛋白(约为 52kDa)。

外源基因表达的蛋白常形成包涵体,影响了蛋白的自然结构和抗原活性,本实验选择 GST 融合表达系统,初步设想是为用亲和层析法纯化包涵体蛋白奠定基础。目前亲和层析所用的固定化配体有金属、脂质体和分子伴侣,这些介质寿命短,价格昂贵,所获得蛋白纯度虽高可量小,本试验提纯的蛋白是作诊断抗原,需要规模化生产,经 SDS-PAGE 分析融合蛋白,发现目的融合蛋白是以包涵体形式存在,参考秦睿玲等<sup>[15]</sup>的方法,对包涵体分离、洗涤,初步纯化目的融合蛋白,可以达到作为间接 ELISA 包被抗原的要求,从经济和技术方面考虑,本实验选择用常规方法提取包涵体。

包涵体除了目的蛋白外,还有 RNA 聚合酶亚基、细菌膜蛋白、RNA、DNA 以及脂质、肽聚糖、脂多糖等<sup>[16]</sup>成份,这些杂质会影响总体蛋白复性速率,一般在包涵体溶解之前用温和的表面活性剂(如 Triton X-100)或低浓度的变性剂(如尿素)等除去大部分杂质。在重组蛋白 pGEX-NS1-HN1 的分离纯化中,用 1% Triton X-100 缓冲液加 2mol/L 尿素,洗涤包涵体 3 次,包涵体蛋白随杂质蛋白明显减少也丢失一部分,但 pGEX-NS1-HN1 融合蛋白明显纯化。

目前较为成熟的复性技术可分为液相复性(稀释复性、透析复性和超滤复性)和固相复性(各种层析法复性)<sup>[17]</sup>,本试验选用了一次性稀释复性,克服了透析法的耗时长、超滤法受仪器限制及层析所用固定化配体价格贵等缺点,本法经济实惠,便于规模化生产重组蛋白。分子内二硫键正确形成是蛋白质复性的又一关键点,谷胱甘肽氧化法通过控制还原型和氧化型谷胱甘肽的比例来较好地控制氧化复性速度,反应条件温和,该法是目前复性时促进二硫键形成的理想方法,本研究证明了该法的良好效果。

复性后的重组蛋白经过 ELISA 检测,重组蛋白的抗原活性好,能满足作为诊断试剂的需要。因此,用 NS1 蛋白作为包被抗原,并结合 ELISA 方法的优

点研制而成的 NS1-ELISA 方法, 可用于区别自然感染和灭活疫苗免疫猪群<sup>[18]</sup>。该方法的推广普及, 将对 PPV 的根除具有极其重要的作用。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [ 2 ] Cartwright SF, Huck RA. Virus isolated in association with herd infertility, abortion and stillbirths in pigs. *Vet Rec*, 1967, **81**: 196 - 197.
- [ 3 ] Leman AD, Straw B, Galock RD. Diseases of Swine. Sixth Edition. Iowa City: Iowa State University Press, 1986, 411 - 424.
- [ 4 ] Mengeling WL. Prevalence of porcine parvovirus induced reproductive failure. *J Am Vet Med Assoc*, 1978, **172**: 1291 - 1294.
- [ 5 ] 宋云义, 孟庆干, 王楚端. 规模化猪厂细小病毒病的血清学调查研究. *动物科学与动物医学* 2004 **21**(6): 54 - 55.
- [ 6 ] 胡慧琼, 王红宁. 猪细小病毒诊断与防方法研究进展. *养猪*, 2004 **1**: 34 - 37.
- [ 7 ] Legendre D, Rommelaere J. Terminal regions of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice are involved in cytotoxicity and promoter trans inhibition. *J Virol*, 1992, **66**(10): 5705 - 5713.
- [ 8 ] Molitor TW, Joo HS, Collett MS. Identification and characterization of a porcine parvovirus nonstructural polypeptide. *J Virol*, 1985, **55**(3): 554 - 559.

- [ 9 ] Madsen ES, Madsen KG, Nielsen J, *et al.* Detection of antibodies against porcine parvovirus nonstructural protein NS1 may distinguish between vaccinated and infected pigs. *Vet Microbiol*, 1997, **54**(1): 1 - 16.
- [ 10 ] 赵俊龙, 陈焕春, 吕建强, 等. 猪细小病毒 PCR 检测方法的建立与应用. *中国兽医学报*, 2003, **23**(2): 142 - 144.
- [ 11 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 候云德, 等译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998.
- [ 12 ] Ranz AI, Manclus JJ, Diaz-Aroca E, *et al.* Porcine parvovirus: DNA sequence and genome organization. *J Gen Virol*, 1989, **70**(10): 2541 - 2553.
- [ 13 ] 刘艳华, 范伟兴, 王锡乐, 等. 猪细小病毒 SD-68 株 NS1 基因的克隆与序列分析. *中国病毒学* 2004 **19**(4): 353 - 355.
- [ 14 ] 殷华平, 郭万柱, 徐志文, 等. 猪细小病毒(PPV) SC1 株非结构蛋白 NS1 基因的克隆和序列分析. *中国预防兽医学报* 2005, **27**(6): 504 - 508.
- [ 15 ] 秦睿玲, 张西臣, 李建华, 等. 柔嫩艾美球虫间接 ELISA 检测方法的建立. *中国兽医科技* 2004 **34**(7): 60 - 63.
- [ 16 ] Maachupalli-Reddy J, Kelley BD, De Bernardes Clark E. Effect of inclusion body contaminants on the oxidative renaturation of hen egg white lysozyme. *Biotechnol Prog*, 1997, **13**(2): 144 - 150.
- [ 17 ] 于德强, 何 询. 重组蛋白复性技术研究进展. *生物技术通讯* 2004 **15**(1): 67 - 69.
- [ 18 ] 陈进会, 郭万柱. 猪细小病毒检测技术研究进展. *动物医学进展* 2005 **26**(8): 34 - 37.

## Prokaryotic expression of the NS1 gene of PPV and renaturation of the recombinant protein

JIN Xi-xin<sup>1,2</sup>, CUI Bao-an<sup>1\*</sup>, WEI Zhan-yong<sup>1</sup>, LIU Zhan-tong<sup>1,2</sup>, WANG Xue-bin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Henan Key Laboratory for Animal Food Safety, Zhengzhou 450002, China)

(<sup>2</sup> Henan Animal Husbandry Bureau, Zhengzhou 450008, China)

**Abstract** The antigen of NS1 gene of PPV was amplified by PCR, and the amplified fragments were cloned into the prokaryotic expression vector pGEX-4T-1. The insert position, the size and the frame were identified by PCR, restriction enzyme digestion and the sequence analysis of the recombinant plasmids. The sequence analysis results of pGEX-NS1-HN1 showed that the prokaryotic expression vector was successfully constructed. The target gene was successfully expressed in the host cell BL21 when induced with IPTG. The expression was optimized with proper inducing conditions of 1.0mmol/L IPTG, 10 hours and 37°C induction. The expression of the target protein added up to 29.8% of the total bacterial protein. The results of SDS-PAGE indicated that molecular weight of the expressed protein was about 52kDa and the expressed protein mainly existed in the inclusion body. Western blot analysis proved the recombinant protein has good reactive ability against PPV positive serum. The pGEX-NS1-HN1 inclusion body was dissolved with 8mol/L urea. Then the expressed protein was renatured by dilution method and the systems of GSH and GSSG. ELISA detection proved the renaturation protein has good biological activity.

**Keywords**: PPV; Gene NS1; Prokaryotic expression; Denaturation; Renaturation

Foundation item: The 10<sup>th</sup> Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China in Food Safety Significant Attack (2001BA804A30-11)

\* Corresponding author. Tel: 86-371-63558878; E-mail: baoancui@henan.edu.cn

Other author: TIAN Yong-jun

Received: 15 March 2006/Accepted: 21 June 2006/Revised: 5 July 2006 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>