

董宁宁, 张琦, 谈晓梅, 等. 猫杯状病毒 NS2 蛋白的截短表达及多克隆抗体的制备与应用 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (2): 78-83.

DONG N N, ZHANG Q, TAN X M, et al. Truncation of NS2 protein of feline calicivirus and preparation and application of polyclonal antibody [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (2): 78-83.

猫杯状病毒 NS2 蛋白的截短表达及多克隆抗体的制备与应用

董宁宁^{1,2}, 张琦¹, 谈晓梅², 李娜², 朱雯琪¹, 刘光清², 孟春春^{1,2*}

(1. 新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052;

2. 中国农业科学院上海兽医研究所伴侣动物生物安全风险预警与防控技术团队, 上海 200241)

摘要: 旨在鉴定并深入研究 NS2 蛋白在猫杯状病毒 (FCV) 感染中的作用。根据 FCV SH2014 株的基因序列, 利用生物信息学技术对 NS2 蛋白进行了分析, 将其在 110 aa 处截短为 2 个基因片段 (NS2-N 和 NS2-C), 将 2 个 NS2-N 相连接。筛选出成功表达的重组蛋白, 使用弗氏佐剂乳化后免疫新西兰大白兔。通过 Western blot 和间接免疫荧光试验 (IFA) 验证多克隆抗体的特异性识别能力。结果: 成功构建了 pET-32a-NS2-N 和 pET-32a-NS2-N-N 重组质粒, 并在上清液和包涵体中稳定表达了预期大小的重组蛋白。制备的多克隆抗体能特异性识别多个病毒株的 NS2 蛋白。结论: 成功制备免疫抗 NS2 蛋白的多克隆抗体, 为深入研究 FCV NS2 蛋白的结构和功能提供了试验材料, 为进一步阐明该病毒的致病机制奠定基础。

关键词: 猫杯状病毒; NS2 蛋白截短; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)02-0078-06

Truncation of NS2 protein of feline calicivirus and preparation and application of polyclonal antibody

DONG Ningning^{1,2}, ZHANG Qi¹, TAN Xiaomei², LI Na², ZHU Wenqi¹, LIU Guangqing², MENG Chunchun^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2. Companion Animal Biosafety Risk Warning and Control Technology Team, Shanghai Veterinary Research Institute, CAAS, Shanghai 200241, China)

Abstract: In order to identify and further study the role of NS2 protein in feline calicivirus infection, a truncated recombinant protein of NS2 protein was constructed in this study and polyclonal antibodies were prepared. According to the gene sequence of feline calicivirus SH2014 strain, the NS2 protein was analyzed using bioinformatics technology, and the protein was truncated into two gene fragments (NS2-N and NS2-C) at 110 aa, and the two NS2-N phase connection. The successfully expressed recombinant protein was screened, emulsified with Freund's adjuvant and then immunized into New Zealand white rabbits. The specific recognition ability of polyclones was verified by Western blotting and indirect immunofluorescence assay (IFA). The results showed that the pET-32a-NS2-N and pET-32a-NS2-N-N recombinant plasmids were successfully constructed, and the recombinant protein of the expected size was stably expressed in the supernatant and inclusion bodies. The results of Western blotting and IFA showed that the prepared polyclonal antibodies specifically recognized the NS2 proteins of multiple virus strains. In this study, rabbit anti-NS2 protein polyclonal antibodies were successfully prepared, which provided experimental materials for in-depth study of the structure and function of feline calicivirus NS2 protein and laid a foundation for further elucidation of the pathogenic mechanism of the virus.

Keywords: feline calicivirus; truncated NS2 protein; prokaryotic expression; polyclonal antibody

猫杯状病毒 (feline calicivirus, FCV) 是引起猫上呼吸道疾病主要病原之一, 可感染家养猫和多种野

生猫科动物^[1]。全基因组有 3 个开放阅读框 (open reading frames, ORFs), ORF1 (20~5 311 nt) 编码非结构蛋白, 最终被病毒蛋白酶 (3C 样半胱氨酸蛋白酶) 切割成 7 个非结构蛋白, 包括非结构蛋白 1 (NS1)、非结构蛋白 2 (NS2)、膜核苷三磷酸酶 (NS3)、非结构蛋白 4 (NS4)、非结构蛋白 5 (NS5)、非结构蛋白 6/7 (NS6/7)^[2-3]。

ORF1 多蛋白在第一个 ATG 开始翻译, 先形成了

收稿日期: 2024-03-08; 修回日期: 2024-12-09

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1800100); 国家自然科学基金面上项目 (32272982); 上海市自然科学基金项目 (23ZR1477100)

第一作者: 董宁宁, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 孟春春, 研究员, 主要从事猫病毒性传染病、鸡新城疫及小反刍兽疫病毒的基础性研究, E-mail: mengcc@shvri.ac.cn。

一个融合蛋白即 NS1/2, 该蛋白将在 E46/A47 位点和 E331/D332 位点被切割, 形成 NS2 蛋白, 分子质量为 32 kDa, 因此命名为 p32, 全长 855 bp^[4]。NS2 在 FCV 复制中的作用尚未确定, 然而, NS2 在病毒基因组中的位置表明其是一个小核糖核酸 2B 类似物^[5]。研究显示, 在肠道病毒 71 型感染的情况下, 病毒的非结构蛋白 2B 可以在转染后 6 h 增加细胞质 Ca²⁺, 同时诱导细胞凋亡, 表明 2B 蛋白具有病毒孔蛋白的活性^[6]。此前对诺如病毒的 NS2 同源物 (p48) 的研究已经证明了高尔基分解的功能, 而 FCV NS2 则没有这种功能^[7]。

FCV RNA 基因组复制所需要的成分都与膜相关, 膜中包含成熟的 ORF1 编码的非结构蛋白, 即 NS2、NS3、NS4。初步研究表明 NS2 是一种完整的膜蛋白, 功能可能是形成复制复合体的“核心”, 锚定了许多其他成分。在 NS2 的 229~247 aa 残基处包含疏水跨膜螺旋, 帮助这三种非结构蛋白共定位于内质网, 导致内质网膜的形态学改变^[8-9]。本研究对 NS2 蛋白质进行生物信息学分析, 预测其抗原表位、结构域主要集中在 6~86 aa。由于全长蛋白无法表达, 因此在 110 aa 处截短成 2 个基因片段, 分别为 NS2-N 和 NS2-C, 进行截短蛋白的原核表达和多克隆抗体的制备, 为 NS2 蛋白的生物学功能研究提供生物学材料并奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

FCV (SH2014、FX5、GZ-VSD、F9) 由本实验室分离并保存; 猫肾细胞 (CRFK) 由本实验室保存; pET-32a (+) 载体由本实验室保存; 大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3) 感受态细胞均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 2 月龄新西兰雌性大白兔购自上海杰思捷实验动物有限公司。

TRIzol RNA 裂解液购自 Invitrogen 公司; 反转录酶、高保真聚合酶、一步克隆连接酶、胶回收试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 质粒提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; IPTG 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; His 标签蛋白纯化试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自默克生命科学有限公司; EMEM 细胞培养液和胎牛血清购自 Gibco 公司; β -actin 抗体 (81115-1-RR) 购自 Proteintech 公司; 碳酸纤维素膜 (NC 膜) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.2 引物设计与合成

根据 FCV-SH2014 株 NS2 基因序列, 设计扩增 NS2 基因和截短片段的特异性引物, 引物包含 pET-32a (+) 质粒同源臂, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列信息

引物名称	引物序列 (5'→3')	长度/bp
NS2-F	gccatggctgatatcggatccATGGCGTGCCCGAGCTGC	858
NS2-R	tgggtgctcgcagtcggccgcTTCGCTGCGAAAGCCGGT	
NS2-N-F	gccatggctgatatcggatccATGGCGTGCCCGAGCTGC	330
NS2-N-R	tgggtgctcgcagtcggccgcGCTCTGATGCAGCGGAATGG	
NS2-C-F	gccatggctgatatcggatccCATCAGATGGCGCGCCTG	528
NS2-C-R	tgggtgctcgcagtcggccgcTTCGCTGCGAAAGCCGGT	
linker-NS2-N-F	ggtggtggtgatctggtggtggtgatctATGGCGTGCCCGAGCTGCGC	690
NS2-N-linker-R	agatccaccaccacagatccaccaccaccGGTCTGATGCAGCGGAATGG	

注: 序列中小写字母为同源臂, 斜体字母 linker 为融合蛋白柔性连接体。

1.3 目的基因扩增及重组质粒构建

将 FCV 接种于 CRFK 细胞, 提取 RNA, 反转录获得 cDNA, 并以此为模板通过 PCR 扩增获得 NS2 基因。pET-32a (+) 载体在 BamH I 和 Not I 位点经双酶切, 回收目的基因 DNA 片段和线性化载体, 然后使用同源重组酶进行连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞并涂板, 37 °C 培养 16 h 后, 挑取单菌落并进行菌液 PCR, 选取阳性菌落送往生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序, 测序成功

的菌液转接后提取重组质粒, 进行双酶切鉴定, 于 -20 °C 保存备用。

1.4 NS2 重组蛋白的诱导表达

将重组表达质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑取单菌落接种于 1 mL 氨苄抗性 LB 培养基, 8 h 后将菌液按 1:100 接种至新鲜 400 mL LB 培养基中, 37 °C, 200 r/min 培养至 OD_{600nm} 值为 0.8, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37 °C 诱导表达 15 h, 4 °C, 10 000 r/min 离心 15 min, 弃去上清

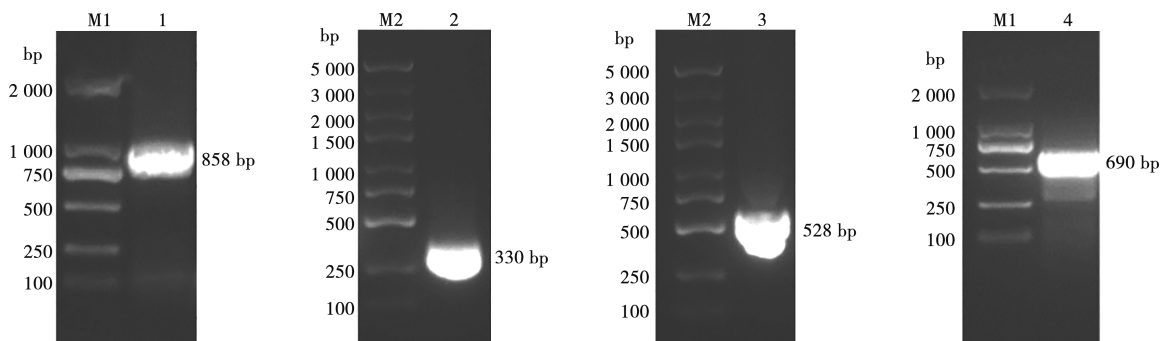
液, 加入 100 mL PBS 重悬沉淀。4 ℃, 10 000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀并加入 400 mL PBS 重悬超声破碎, 4 ℃, 10 000 r/min 离心 15 min, 分别收集上清液和沉淀, SDS-PAGE 分析蛋白表达形式。根据试验结果, 为了提高蛋白表达量, 对 IPTG 的浓度、诱导时间、诱导温度和 $OD_{600\text{nm}}$ 值进行优化。用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量, 纯化后的蛋白命名为 FCV-NS2-N 和 FCV-NS2-N-N 截短重组蛋白。

1.5 多克隆抗体制备

对包涵体进行尿素梯度溶解和蛋白纯化试剂盒纯化, 以纯化后的重组蛋白为抗原对 2 月龄新西兰雌性大白兔进行背部皮下免疫注射。首次免疫, 重组蛋白 NS2-N 与等比例的弗氏完全佐剂充分混合乳化, 共计注射 1 mg 蛋白。每间隔 14 d 进行第 2、3 和 4 次免疫, 抗原为重组蛋白 NS2-N-N, 佐剂为弗氏不完全佐剂, 方法、剂量与首次免疫相同。第 4 次免疫后 5 d 采集血液, 分离血清, 即为多克隆抗体, 于 -20 ℃ 保存备用。

1.6 多克隆抗体的 Western blot 鉴定

用感染复数 (MOI) 为 0.5 的 FCV (SH2014、FX5、GZ-VSD、F9) 感染 CRFK 细胞, 分别在 6、12、18 和 24 h 收样, 进行 SDS-PAGE 分析, 将蛋白质转印至 NC 膜。转印结束进行 5% 脱脂乳 (TBST 稀释) 37 ℃ 封闭 2 h; TBST 洗涤 3 次, 10 min/次, 以 5% 脱脂乳按 1:800 稀释多克隆抗体并作为一抗, β -actin 作为内参, 按 1:50 000 稀释, 室温震荡孵育 2 h, 45 r/min; 以 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (H+L) 作为二抗, 室温震荡孵育 1 h, 45 r/min; TBST 洗涤后, 利用 ECL 发光成像系统显色。



M1. Trans2K DNA Marker; M2. GN5K DNA Marker; 1. NS2 基因 PCR 产物; 2. NS2-N 基因 PCR 产物; 3. NS2-C 基因 PCR 产物; 4. NS2-N-N 基因 PCR 产物。

图 2 目的基因 PCR 产物检测

2.2 重组基因表达质粒鉴定

测序结果显示, 克隆至 pET-32a (+) 载体的基因序列与原始毒株序列一致, 表明原核表达质粒构建

1.7 间接免疫荧光试验 (IFA) 鉴定

病毒感染 CRFK 细胞, 16 h 后用 4% 多聚甲醛室温固定 25 min, PBST 洗 3 次, 5 min/次; 加入 -20 ℃ 预冷的甲醇, -20 ℃ 透化 10 min, PBS 洗 3 次, 6 min/次; 用 5% 脱脂乳 (PBS 配制, 加入 0.3% TrionX-100) 封闭 2 h, PBS 洗 3 次, 6 min/次; 加入 5% 脱脂乳 (PBS 配制) 稀释的 NS2 多克隆抗体 (1:100), 室温孵育 2 h, PBS 和 PBST 交替各洗涤 2 次, 8 min/次; 用 5% 脱脂乳稀释 Alexa Fluor 488 标记的羊抗兔 IgG 为二抗 (1:1 000), 室温避光孵育 1.5 h, PBS 和 PBST 交替各洗涤 2 次, 8 min/次, 全程避光; 置于荧光显微镜下观察。

1.8 NS2 蛋白同源性比对及序列分析

对 18 株国内外 FCV 毒株 NS2 氨基酸序列进行同源性比对分析, 并构建系统发育树, 同时比对分析 NS2-N 氨基酸保守性。

2 结果与分析

2.1 FCV NS2 基因扩增

FCV NS2 基因截短表达示意如图 1。经特异性引物 PCR 扩增出目的片段, 电泳结果显示, PCR 产物与预期大小相符 (图 2)。

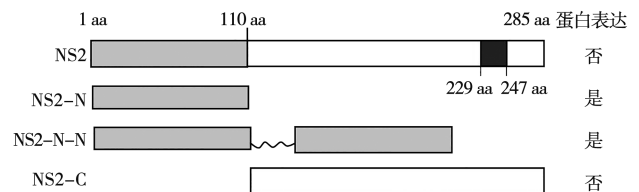


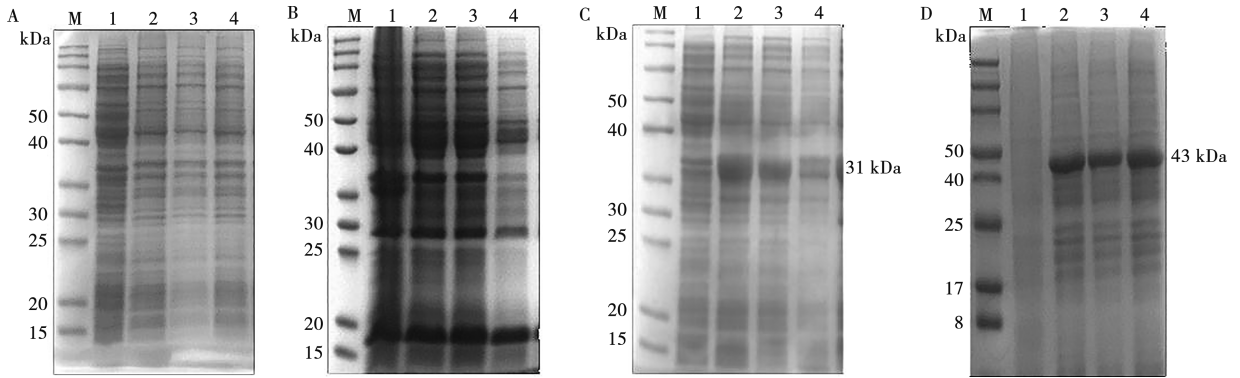
图 1 FCV NS2 基因截短表达

成功。重组质粒双酶切产物电泳结果显示 (图略), 出现大小分别为 5 900、858、528、330 和 690 bp 的条带, 分别与预期大小一致。

2.3 重组蛋白诱导表达与条件优化

将测序正确的重组质粒分别转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 和 Rosetta (DE3) 感受态细胞, IPTG 诱导表达后, 取部分菌液作全菌对照, 其他菌液经超声离心后分离出上清液和沉淀, 并进行 12.5% SDS-PAGE 分析, 考马斯亮蓝染色后显示, 在 32 kDa 附近出现与 NS2-N 预期大小一致的条带, 为上清液表达; 在

45 kDa 附近出现与 NS2-N-N 预期大小一致条带, 为沉淀表达 (图 3)。重组蛋白诱导表达条件优化, 结果表明, pET-32a-N 的最佳诱导条件为 Rosetta (DE3) 感受态细胞中加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 °C 诱导 10 h; pET-32a-N-N 的最佳诱导条件为 Rosetta (DE3) 感受态细胞中加 IPTG 至终浓度为 2 mmol/L, 30 °C 诱导 14 h。



M. 蛋白分子质量标准; 1. pET-32a 菌液诱导后样品; 2. 诱导菌液全菌样品; 3. 诱导菌液超声破碎后上清液; 4. 诱导菌液超声破碎后沉淀。
A. pET-32a-NS2 蛋白; B. pET-32a-NS2-C 蛋白; C. pET-32a-NS2-N 蛋白; D. pET-32a-NS2-N-N 蛋白。

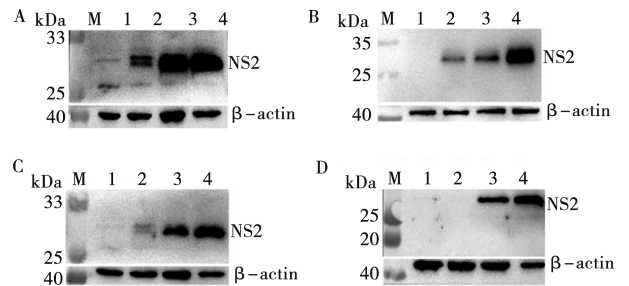
图 3 重组蛋白诱导表达的 SDS-PAGE 分析

2.4 多克隆抗体 Western blot 鉴定

FCV-SH2014、FCV-FX5、FCV-GZ-VSD 和 FCV-F9 感染 CRFK 细胞后不同时间点收样, Western blot 检测结果表明, 制备的多克隆抗体能识别病毒 NS2 蛋白, 具有良好的反应原性 (图 4)。

2.5 多克隆抗体 IFA 鉴定

制备的多克隆抗体血清经 1 : 100 稀释后作为一抗进行 IFA 检测。感染 FCV-SH2014 的 CRFK 细胞内出现特异性绿色荧光信号, 未感染病毒的阴性对照无特异性荧光信号 (图 5), 表明制备的多克隆抗体能够识别 FCV-SH2014。



1. 6 h; 2. 12 h; 3. 18 h; 4. 24 h。
A. FCV-SH2014 感染; B. FCV-FX5 感染; C. FCV-GZ-VSD 感染; D. FCV-F9 感染。

图 4 Western blot 检测多克隆抗体对 FCV 感染细胞中 NS2 表达的识别

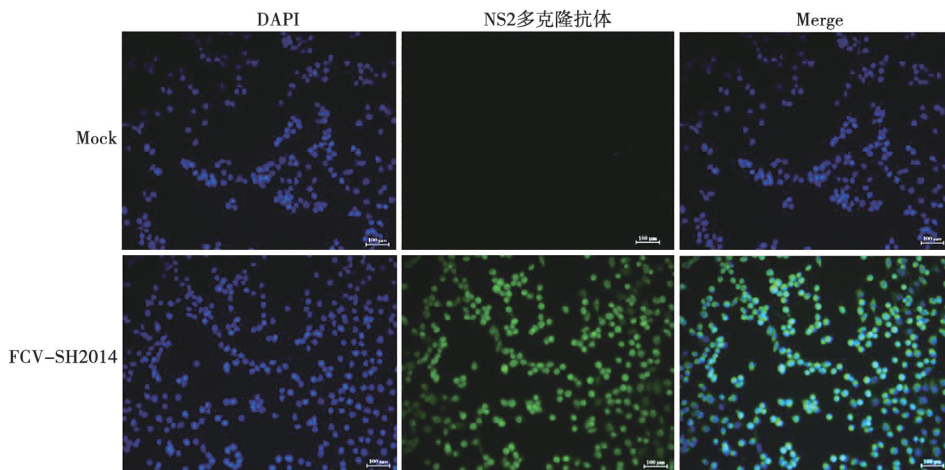


图 5 多克隆抗体的 IFA 鉴定 (标尺 = 100 μm)

兰病毒观察到 NS2 蛋白具有低聚能力,在非还原条件下分离蛋白质并通过蛋白质印迹分析后,在来自转染细胞的裂解物中检测到 NS2-NS2 二聚体^[17-18]。诸如病毒和杜兰病毒 NS1/2 蛋白的 NS2 部分具有病毒孔蛋白活性,并非免疫细胞和上皮细胞之间基础 Ca²⁺ 信号的差异^[18-19],而且低聚功能是必不可少的,因此 FCV 的 NS2 蛋白可能具有病毒孔蛋白的活性。研究发现 NS2、NS3 和 NS4 蛋白引起内质网 (ER) 产生膜囊泡。因此,复制复合体形成的起始步骤可能发生在 ER 上,但随着该结构的成熟,分泌途径的其他成分也可能参与其中,而 NS2 作为复制复合体的中心,其潜在功能更具有研究意义^[8, 20]。

为了进一步探究 NS2 蛋白在 FCV 增殖过程中发挥的作用,本研究在 NS2 蛋白全长无法表达的情况下,将 NS2 蛋白截短为 2 个片段,构建 pET-32a-NS2-N 原核表达重组质粒,经多次诱导表达条件摸索,NS2-N (1~110 aa) 蛋白成功在上清液中表达。为确保多克隆抗体制备成功,将 2 个 NS2-N 通过柔性 linker 相连接,命名为 NS2-N-N,并构建 pET-32a-NS2-N-N 原核表达重组质粒,经诱导条件优化,NS2-N-N 蛋白为包涵体表达。通过初次免疫使用 NS2-N 重组蛋白,其后使用 NS2-N-N 蛋白进行免疫,成功获得了多克隆抗体,Western blot 及 IFA 结果显示其特异性良好。对 18 个 FCV 毒株的 NS2 进行比对,所选毒株 FCV-SH2014、FCV-FX5、FCV-GZ-VSD 和 FCV-F9 分散在各支,且各毒株 NS2 较为保守,表明以 FCV-SH2014 的 NS2 基因序列为基础表达蛋白所制备的多克隆抗体有广泛应用的价值,为研究 FCV NS2 蛋白功能、FCV 检测及致病机制的研究提供了可靠的基础材料。

参考文献:

- [1] RADFORD A D, COYNE K P, DAWSON S, et al. Feline calicivirus [J]. *Vet Res*, 2007, 38 (2): 319-335.
- [2] LEE J H, CHUNG M S, KIM K H. Structure and function of caliciviral RNA polymerases [J]. *Viruses*, 2017, 9 (11): 329.
- [3] WU H, ZU S, SUN X, et al. N-Terminal domain of feline calicivirus (FCV) proteinase-polymerase contributes to the inhibition of host cell transcription [J]. *Viruses*, 2016, 8 (7): 199.
- [4] SOSNOVTSEV S V, GARFIELD M, GREEN K Y. Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome [J]. *J Virol*, 2002, 76 (14): 7060-7072.
- [5] SUANPAN K, SRIMANOTE P, TONGTAWA P, et al. Transcriptome of human neuroblastoma SH-SY5Y cells in response to 2B protein of enterovirus-A71 [J]. *Sci Rep*, 2022, 12: 1765.
- [6] LI Z, ZOU Z, JIANG Z, et al. Biological function and application of picornaviral 2B protein a new target for antiviral drug development [J]. *Viruses*, 2019, 11 (6): 510.
- [7] ROBINSON B A, VAN WINKLE J A, MCCUNE B T, et al. Caspase-mediated cleavage of murine norovirus NS12 potentiates apoptosis and is required for persistent infection of intestinal epithelial cells [J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15 (7): e1007940.
- [8] BAILEY D, KAISER W J, HOLLINSHEAD M, et al. Feline calicivirus p32, p39 and p30 proteins localize to the endoplasmic reticulum to initiate replication complex formation [J]. *J Gen Virol*, 2010, 91 (3): 739-749.
- [9] OU Q, MOUILLET J F, YAN X, et al. The DEAD box protein DP103 is a regulator of steroidogenic factor-1 [J]. *Mol Endocrinol*, 2001, 15 (1): 69-79.
- [10] 程杰. 猫/兔杯状病毒变异株反向遗传操作平台的建立与应用 [D]. 兰州: 兰州大学, 2022.
- [11] OKA T, TAKAGI H, TOHYA Y. Development of a novel single step reverse genetics system for feline calicivirus [J]. *J Virol Methods*, 2014, 207: 178-181.
- [12] 王颖. 猫杯状病毒 2280 株感染致细胞凋亡的分子机制研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2023.
- [13] SOSNOVTSEV S V, GREEN K Y. Feline calicivirus as a model for the study of calicivirus replication [J]. *Perspect Med Virol*, 2003 (3): 467-488.
- [14] SMERTINA E, HALL R N, URAKOVA N, et al. Calicivirus non-structural proteins: potential functions in replication and host cell manipulation [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 712710.
- [15] MAHAR J E, JENCKEL M, HUANG N, et al. Frequent intergenotypic recombination between the non-structural and structural genes is a major driver of epidemiological fitness in caliciviruses [J]. *Virus Evol*, 2021, 7 (2): veab080.
- [16] NICE T J, STRONG D W, MCCUNE B T, et al. A single-amino-acid change in murine norovirus NS1/2 is sufficient for colonic tropism and persistence [J]. *J Virol*, 2013, 87 (1): 327-334.
- [17] KAISER W J, CHAUDHRY Y, SOSNOVTSEV S V, et al. Analysis of protein-protein interactions in the feline calicivirus replication complex [J]. *J Gen Virol*, 2006, 87 (2): 363-368.
- [18] STRTAK A C, PERRY J L, SHARP M N, et al. Recovirus NS1-2 has viroporin activity that induces aberrant cellular calcium signaling to facilitate virus replication [J]. *mSphere*, 2019, 4 (5): e00506-19.
- [19] VIG M, KINET J P. Calcium signaling in immune cells [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10 (1): 21-27.
- [20] PENAFLORES TELLEZ Y, TRUJILLO USCANGA A, ESCOBAR ALMAZAN J A, et al. Immune response modulation by caliciviruses [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2334.