



张书斌, 张艺馨, 李英奇, 等. 牛病毒性腹泻病毒非结构蛋白 N^{pro} 原核表达及多克隆抗体制备[J]. 江西农业大学学报, 2026, 48(1): 186–195.

ZHANG S B, ZHANG Y X, LI Y Q, et al. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of nonstructural protein N^{pro} of bovine viral diarrhea virus[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2026, 48(1): 186–195.

牛病毒性腹泻病毒非结构蛋白 N^{pro} 原核表达及多克隆抗体制备

张书斌¹, 张艺馨¹, 李英奇¹, 洪菊霜¹, Uyangaa Temuujin², 周建华^{1*}

(1. 西北民族大学 生物医学研究中心, 甘肃 兰州 730030; 2. School of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences, Ulaanbaatar 17024, Mongolia)

摘要:【目的】牛病毒性腹泻病毒(BVDV)可严重损害牛群的繁殖性能、呼吸系统、消化功能及泌乳能力。该病毒编码的非结构蛋白 N^{pro} 具有高度保守性及蛋白酶水解活性, 在介导免疫逃逸中发挥关键作用。本研究旨在原核表达 BVDV 非结构蛋白 N^{pro} 及多克隆抗体, 为深入研究 N^{pro} 蛋白功能提供物质基础。【方法】通过 NCBI 网站查找 BVDV N^{pro} 基因序列, 利用相关生物信息学在线软件分析 N^{pro} 蛋白的理化性质, 包括分子量、等电点(pI)、不稳定指数、脂肪族指数及平均亲水性等参数。设计同源重组引物并扩增目的基因 N^{pro}, 克隆至 pET-28a(+) 载体上, 构建重组质粒 pET-28a(+)-N^{pro}。将测序正确的 pET-28a(+)-N^{pro} 质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3) 表达感受态细胞, 经诱导表达、镍柱纯化后的 N^{pro} 蛋白免疫小鼠进行多克隆抗体制备。采用 Western blot 鉴定多克隆抗体的反应原性。【结果】(1) 信息学分析结果表明, N^{pro} 蛋白有 504 个氨基酸, 为胞外亲水性蛋白; N^{pro} 蛋白无信号肽及跨膜结构域, 二级结构主要由 β -折叠和无规卷曲构成。(2) 成功构建原核表达质粒 pET-28a(+)-N^{pro}, 经双酶切鉴定及基因测序验证正确后, 在大肠杆菌中诱导表达得到分子量约为 18 ku 重组蛋白 N^{pro}。(3) 将纯化获取的重组蛋白 N^{pro} 免疫小鼠制备多克隆抗体, 经酶联免疫吸附试验(ELISA)和蛋白质印迹法(Western blot)检测显示, 所得到的多克隆抗体效价达 1:409 600, 具有良好的特异性、反应原性与免疫原性。【结论】本研究成功在大肠杆菌中高效表达并纯化出具有良好免疫原性的 BVDV N^{pro} 重组蛋白, 所制备的高效价特异性多克隆抗体为深入研究该蛋白的生物学功能提供了有效工具。

关键词: 牛病毒性腹泻病毒; N^{pro} 蛋白; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: S852.65⁺2 文献标志码: A

文章编号: 1000-2286(2026)01-0186-10

CSTR: 32399.14.aauj.2026017

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of nonstructural protein N^{pro} of bovine viral diarrhea virus

ZHANG Shubin¹, ZHANG Yixin¹, LI Yingqi¹, HONG Jushuang¹,
Uyangaa Temuujin², ZHOU Jianhua^{1*}

收稿日期: 2025-10-04 修回日期: 2025-11-24 接受日期: 2025-11-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(32360874)和甘肃省自然科学基金项目(23JRRA715)

Project supported by the Natural Science Foundation of China(32360874) and the Natural Science Foundation of Gansu Province(23JRRA715)

作者简介: 张书斌, 硕士生, orcid.org/0009-0005-5351-9097, 2862333485@qq.com; *通信作者: 周建华, 副教授, 博士, 主要病原微生物研究, orcid.org/0000-0002-0640-3746, zhoujianhuazjh@163.com。

©《江西农业大学学报》编辑部, 开放获取 CC BY-NC-ND 协议

(1. Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China; 2. Department of Infectious Disease and Microbiology, School of Urology Medicine, Mongolian University of Life Sciences, Ulaanbaatar 17024, Mongolia)

Abstract: [Objective] Bovine viral diarrhea virus (BVDV) can seriously damage the reproductive performance, respiratory system, digestive function and lactation ability of cattle. The non-structural protein N^{pro} encoded by the virus is highly conserved and has proteolytic activity, which plays a key role in mediating immune escape. This study was to express BVDV non-structural protein N^{pro} in prokaryotic cells and prepare polyclonal antibodies, which provided a material basis for further study of the function of N^{pro} protein. [Method] The N^{pro} gene sequence of BVDV was searched on NCBI website. The physicochemical properties of N^{pro} protein were analyzed with online bioinformatics software, including molecular weight, isoelectric point (pI), instability index, aliphatic index and average hydrophilicity. The homologous recombination primers were designed and the target gene N^{pro} was amplified and cloned into the pET-28a(+) vector to construct the recombinant plasmid pET-28a(+)-N^{pro}. The correctly sequenced pET-28a(+)-N^{pro} plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) expression competent cells, and the N^{pro} protein after induced expression and nickel column purification was used to immunize mice for polyclonal antibody preparation. The reactogenicity of polyclonal antibody was identified by Western blot. [Result] (1) The results of bioinformatics analysis showed that N^{pro} protein had 504 amino acids, which was an extracellular hydrophilic protein. N^{pro} protein had no signal peptide and transmembrane domain, and its secondary structure was mainly composed of β -sheet and random coil. (2) The prokaryotic expression plasmid pET-28a(+)-N^{pro} was successfully constructed. After double enzyme digestion and gene sequencing, the recombinant protein N^{pro} with a molecular weight of about 18 ku was expressed in *E. coli*. (3) The purified recombinant protein N^{pro} was used to immunize mice to prepare polyclonal antibodies. The results of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot showed that the titer of the polyclonal antibody was 1:409 600, which had good specificity, reactivity and immunogenicity. [Conclusion] In this study, BVDV N^{pro} recombinant protein with good immunogenicity is successfully expressed and purified in *E. coli*. The prepared high-titer specific polyclonal antibody provides an effective tool for further study of the biological function of the protein.

Keywords: bovine viral diarrhea virus; N^{pro} protein; prokaryotic expression; polyclonal antibody

【研究意义】牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)隶属于黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(*Pestivirus*),是引发牛群多种临床症状、造成重大经济损失的重要病原体^[1-4]。BVDV感染引发的典型症状包括腹泻、白细胞减少、免疫抑制,且常伴随持续性感染、产奶量下降及繁殖障碍^[5-6]。【前人研究进展】BVDV为单股正链RNA病毒,根据其遗传多样性及抗原差异,目前BVDV被划分为三大基因型,即BVDV-1、BVDV-2及BVDV-3(又称HoBi-like病毒)^[7-9]。基于已发表的BVDV序列分析,BVDV-1分离株占报道总量的88.2%,远高于BVDV-2(11.8%);在BVDV-1亚型中,BVDV-1b流行度最高,其次为BVDV-1a和BVDV-1c^[10]。近年来我国西北地区的流行病学调查显示,BVDV-1c亚型在腹泻病牛中的检出率已达15.3%,且该亚型与持续性感染的关联性更强,致病力不容忽视^[11]。BVDV基因组长度约为12.3~12.5 kb,由1个开放阅读框(ORF)及两端的5'非翻译区(5'UTR)和3'非翻译区(3'UTR)组成。ORF编码的多聚蛋白可裂解为12种蛋白,依次为N^{pro}-C-Erns>-E1-E2-p7-NS2/NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B^[11-12]。根据BVDV在细胞培养中是否诱导细胞病变效应(cytopathic effect, CPE),可将其分为细胞病变型(cytopathic, CP)和非细胞病变型(non-cytopathic, NCP)2种生物型^[14]。N^{pro}是BVDV ORF编码的首个蛋白,由约160个氨基酸组成,具有亲水性及高度保守的蛋白酶活性^[15]。作为一种半胱氨酸蛋白酶,N^{pro}可催化自身从病毒合成的多聚蛋白上切割脱离,切割位点位于自身C末端的Cys168与下游衣壳蛋白(C)N端的Ser169之间,这种自催化切割对于形成具有完整N端的成熟衣壳蛋白至关重要。切割完成后,N^{pro}的蛋白酶活性即失活,不再作用于其他多聚蛋白底物^[16-17]。然而,现有研究仍存在明显局限:一是N^{pro}的

功能研究多集中于BVDV-1a、1b亚型,针对BVDV-1c亚型 N^{pro} 的理化特性、三维结构及功能特异性尚未开展系统解析^[11];二是 N^{pro} 蛋白水解的分子机制(如关键催化位点的构象依赖作用)、与IRF3等宿主蛋白互作的结构基础仍不明确^[18];三是前人尝试的 N^{pro} 原核表达多以包涵体形式存在,导致蛋白天然构象丢失,难以用于后续功能研究和抗体制备^[15];四是目前缺乏针对BVDV-1c亚型 N^{pro} 的高特异性抗体工具,限制了对该亚型感染的精准检测与致病机制研究。

【本研究切入点】针对BVDV-1c亚型临床流行态势凸显但 N^{pro} 研究滞后、传统表达多为包涵体且特异性工具缺失的核心缺口,本研究以该亚型 N^{pro} 蛋白为核心靶点,紧扣“结构解析-可溶性表达优化-高特异性抗体制备”的技术主线,重点突破现有研究中 N^{pro} 三维结构与功能域关联不明、天然构象可溶性表达困难、亚型特异性抗体工具匮乏的关键瓶颈,为系统阐明其蛋白水解的构象依赖机制及免疫抑制的分子路径提供兼具结构参考价值与应用潜力的试验支撑。【拟解决的关键问题】本研究拟针对BVDV-1c N^{pro} 蛋白进行预测其理化性质与三维结构;构建重组载体进行 N^{pro} 蛋白原核表达和镍柱亲和层析纯化;评估其免疫原性并制备多克隆抗体。本研究结果可为后续 N^{pro} 单克隆抗体制备、蛋白相互作用机制研究和抗BVDV药物研发靶点的潜力研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株、菌株、质粒及细胞

BVDV-1c(21NM-44,GenBank:ON411191.1)毒株、*E. coli* DH5 α 和BL21(DE3)感受态细胞、pET-28a(+)质粒、pCMV-C-Flag- N^{pro} 质粒、pCMV-C-Flag空载体、CHO细胞、MDBK细胞均由西北民族大学生物医学研究中心病原微生物学实验室提供。

1.1.2 试剂

PrimeSTAR[®] MaxDNA聚合酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司;SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒与质粒小提试剂盒分别购自生工生物工程(上海)股份有限公司和天根生化科技(北京)有限公司;限制性内切酶*Bam*H I和*Xho* I购自赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific)公司;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自上海桥星贸易有限公司;Ni-NTA亲和层析柱购自南京金斯瑞生物科技有限公司;鼠源Anti-His标签单克隆抗体及HRP标记的山羊抗小鼠IgG均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 N^{pro} 蛋白理化性质

采用ExPasy平台中的ProtParam工具,根据 N^{pro} 蛋白的氨基酸序列对其理化性质进行预测分析,分析数据包括分子量、等电点(pI)、不稳定指数、脂肪族指数及平均亲水性等参数。

1.2.2 N^{pro} 蛋白三维结构

利用AlphaFold在线平台对 N^{pro} 蛋白进行三维结构预测,并将预测获得的结构模型以PDB格式下载。随后,使用PyMOL分子可视化软件对下载的PDB文件进行结构分析与编辑。

1.2.3 设计引物

同源组引物设计通过在NCBI上查找并下载BVDV-1c(21NM-44,GenBank:ON411191.1) N^{pro} 基因序列,采用snapgene软件模拟构建重组原核表达载体的质粒图谱,并设计同源重组引物,引物序列信息如下:F:CAGCAAATGGGTTCGCGGATCCATGGAGTTGATTTCAAATGAACCTTT,R:GTGGTGCTGGTGCTGCTCGAGTCAGCAGCTTGTAACCCACAGA,下划线为限制性酶切位点序列信息(*Bam*H I/*Xho* I)。引物序列交由北京擎科生物科技公司合成。

1.2.4 目的基因获取

N^{pro} 目的基因扩增用实验室保存的BVDV 1C毒株接种MDBK细胞,收获病毒液后,提取其总RNA并进行反转录,所获cDNA用作PCR模板。反应体系:上下引物各1 μ L,2 $\times$ PrimeSTAR[®] Max DNA聚合酶25 μ L,ddH₂O补足到50 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 5 s,35次循环。将PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,切取与目标片段大小相符的单一清晰条带,进行DNA回收并纯化,所得产物经全波长酶标仪测定浓度及纯度后,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.2.5 pET-28a(+)-N^{pro}重组质粒构建

将纯化后的PCR产物与经*Bam*H I/*Xho* I双酶切线性化处理pET-28a(+)载体进行同源重组法连接,连接条件为37℃ 30 min。原核表达载体pET-28a(+)线性化处理的反应体系:*Bam*H I/*Xho* I各1 μL, pET-28a(+)载体(450 ng/μL)2 μL,10×Fast Digest green Buffer 2 μL,ddH₂O补足到20 μL;反应条件为37℃反应30 min。连接产物转化至*E. coli* DH5α感受态细胞(Tiagen #CB101),冰浴30 min,42℃热激60 s,冰浴2 min,加入800 μL无抗LB培养基,37℃、200 r/min复性1 h。5 000 r/min离心5 min,弃去部分上清液保留200 μL菌液进行重悬,将菌液均匀涂布于硫酸卡那霉素(kanamycin sulfate, K⁺)抗性固体平板上,37℃温箱倒置培养12~16 h。随机挑取单克隆菌落接种于5 mL LB(K⁺)培养基,37℃、220 r/min培养12 h,使用质粒小提试剂盒提取重组质粒。重组质粒经*Bam*H I/*Xho* I双酶切鉴定,出现与预期大小相符条带后,将阳性质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司以pET-28a(+)载体通用引物(T7/T7-TER)进行双向测序鉴定^[17]。

1.2.6 N^{pro}蛋白原核表达

将测序正确的重组原核表达质粒pET-28a(+)-N^{pro}以热激法转化至*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,涂布于抗性(K⁺)平板,37℃温箱倒置培养12 h。挑取单克隆接种至5 mL抗性(K⁺)LB培养基,37℃、220 r/min培养12 h。将菌液以1:100接种比例转接至10 mL抗性(K⁺)LB培养基中,37℃摇菌1~2 h至OD₆₀₀≈0.8。加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度0.1 mmol/L后,37℃、220 r/min诱导表达4 h。收集菌液,4℃、5 000 r/min离心10 min,弃去上清;菌体沉淀使用1×PBS溶液重悬并洗涤2~3次,低温冰浴使用细胞超声破碎仪进行超声破碎(功率180 W,工作3 s、间歇3 s,总时长5 min)。细菌破碎裂解液于4℃、5 000 r/min离心10 min,分别收集上清和沉淀并蛋白制样(100℃煮样10 min),立即进行SDS-PAGE分析和Western blot试验,以评估目标蛋白的表达情况及可溶性表达水平。

1.2.7 N^{pro}蛋白表达条件优化

本研究对重组N^{pro}蛋白的原核表达条件进行了系统优化,旨在提高其在可溶性上清组分中的表达水平。分别对诱导时间、诱导温度及IPTG浓度3个关键参数进行考察:诱导时间设置4,6,8,10,12 h共5个梯度;诱导温度设置16,25,37℃3个梯度;IPTG浓度设置0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mmol/L共5个梯度,以筛选各参数下的最佳表达条件。

1.2.8 N^{pro}蛋白纯化

用蛋白表达的最优条件扩大培养,诱导后收集菌液,于4℃、5 000 r/min离心10 min,弃去上清;菌体沉淀用1×PBS溶液重悬并洗涤2~3次后,冰浴超声破碎(功率270 W,工作3 s、间歇3 s,总时长30 min)。经超声破碎的蛋白裂解液于4℃、5 000 r/min离心10 min,收集上清,加入经裂解平衡缓冲液LE Buffer(pH=7.4)平衡后的镍柱中,以0.5 mL/min的流速流出,收集流穿液并蛋白制样。再依次使用50,100,250,350,500 mmol/L咪唑洗脱缓冲液(pH=7.4)洗涤柱子5次,每次10 mL,控制流速在1 mL/min,并收集洗脱液并蛋白制样,将收集的不同蛋白样进行SDS-PAGE分析。

1.2.9 N^{pro}多克隆抗体制备

将纯化后的N^{pro}蛋白与等体积完全弗氏佐剂(complete Freund's Adjuvant, CFA)充分乳化,最终质量浓度为100 μg/mL;以50 μg/只的剂量于BALB/c小鼠背侧皮下多点注射进行初次免疫;第14天和第28天分别用等量重组N^{pro}蛋白与不完全弗氏佐剂(Freund incomplete adjuvant, IFA)等体积乳化后进行加强免疫。末次免疫后第7天,经眼眶后静脉丛采集全血,室温静置30 min后4℃、3 000 r/min离心10 min分离血清以获取多克隆抗体,分装于-80℃保存备用。

1.2.10 多克隆抗体效价检测

采用间接ELISA测定小鼠抗N^{pro}蛋白多克隆抗体效价水平。用1×包被液将重组N^{pro}蛋白抗原质量浓度稀释至2 μg/mL,加入至96孔板中(100 μL/孔),4℃包被过夜;TBS-T洗涤3次,使用5%脱脂奶粉于37℃封闭2 h;将采集到的阴性小鼠血清和制备的多克隆抗体按照1:200、1:400、1:800依次2倍倍比稀释,37℃孵育2 h;TBS-T洗板5次后加HRP标记的羊抗鼠IgG(1:8 000),37℃避光孵育1 h;再经TBS-T洗涤3次后,加入TMB底物显色10 min,2 mol/L稀硫酸终止反应,于450 nm处读取吸光度(OD₄₅₀)。以阴性血清OD₄₅₀为基准,计算阳性血清与阴性血清吸光度比值(P/N)。判定标准:P/N≤1.5为阴性,1.5<P/N<

2.1 为可疑, $P/N \geq 2.1$ 为阳性; 以 $P/N \geq 2.1$ 时最高血清稀释倍数定义为抗体效价水平。同时, 采用 Western blot 试验对 N^{pro} 蛋白免疫原性进行验证: 将纯化蛋白经 12% SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 以制备的多克隆抗体 (1:5 000) 为一抗, HRP-羊抗鼠 IgG (1:8 000) 为二抗, TMB 显色并拍照记录试验数据。

1.2.11 多克隆抗体鉴定

将编码 N^{pro} 蛋白的重组质粒 pCMV-C-Flag- N^{pro} 及空载体对照 pCMV-C-Flag 分别转染 CHO 细胞。转染 24 h 后, 收集细胞并进行细胞裂解液 (RIPA) 裂解。取 CHO 细胞裂解物上清进行蛋白制样并 SDS-PAGE 电泳, 转移至 PVDF 膜。使用本研究制备的鼠抗 N^{pro} 多克隆抗体作为一抗 (1:5 000), 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗 (1:8 000) 进行 Western blot 检测。

2 结 果

2.1 N^{pro} 蛋白理化性质和三维结构预测

利用 ExPASy 平台集成的 ProtParam 在线工具, 基于 BVDV-1c 亚型 N^{pro} 蛋白的氨基酸序列 (GenBank: ON411191.1), 对其核心理化性质进行系统计算分析, 结果显示: 该蛋白由 168 个氨基酸残基组成, 分子量为 19 030.85 u, 等电点 (pI) 为 9.25, 属于碱性蛋白; 不稳定指数为 47.54 (大于 40 的临界值), 提示其在体外环境中具有不稳定性; 脂肪族指数为 78.15, 表明蛋白内部疏水性氨基酸残基分布相对均匀, 具备一定的热稳定性; 平均亲水性 (GRAVY 值) 为 -0.556 (<0), 证实其为典型的亲水性蛋白。上述理化性质数据为后续重组蛋白的诱导表达条件优化、分离纯化策略设计及后续功能学实验提供了关键理论依据。

采用 AlphaFold 在线平台对 N^{pro} 蛋白三级结构进行预测, 并借助 PyMOL 软件进行可视化分析与结构解析。二级结构组成分析结果显示, 该蛋白以 β -折叠 (占比约 32.1%) 和无规卷曲 (占比约 57.7%) 为主, 仅含少量 α -螺旋 (占比约 10.2%), 这种结构特征与 ProtParam 预测的亲水性结果相符, 也为其蛋白酶活性位点的构象维持及与宿主蛋白的相互作用提供了结构基础 (图 1)。



图 1 通过 AlphaFold 预测的 N^{pro} 蛋白三维结构模型

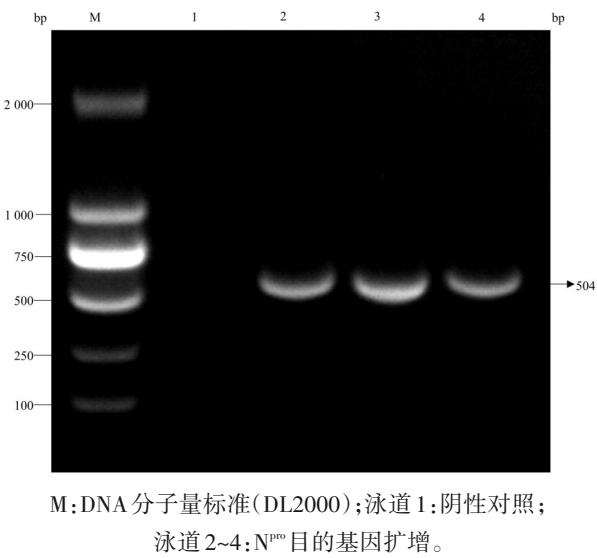
Fig.1 Three-dimensional structure model of N^{pro} protein predicted by AlphaFold

2.2 目的基因扩增

对 PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶进行核酸电泳检测, 电泳条件设定为电压 130 V、时间 30 min。电泳结果显示, 扩增产物在约 504 bp 处出现单一目的条带, 其大小与预期相符。

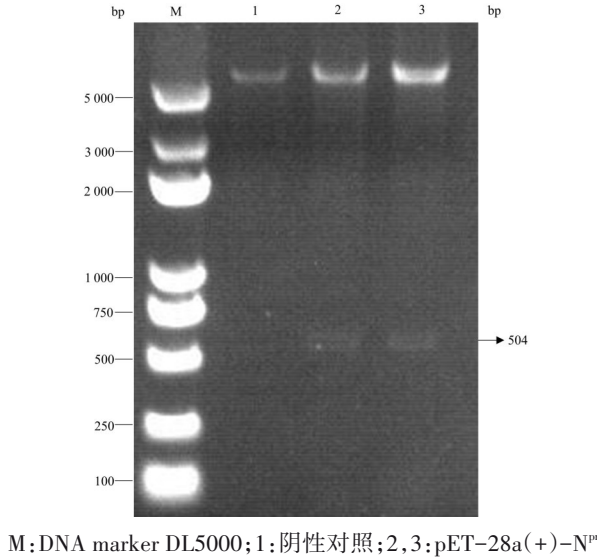
2.3 重组质粒 pET-28a(+)- N^{pro} 鉴定

对重组质粒进行 BamH I 与 Xho I 双酶切处理, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳检测分析。与空载体对照相比, 重组质粒酶切后在约 504 bp 处可见一条单一目的条带, 其大小与理论预期一致, 表明 N^{pro} 基因已成功插入载体多克隆位点 (图 3)。对重组质粒进一步开展测序鉴定, 结果证实插入的 N^{pro} 基因序列与目的基因序列完全匹配, 且未发生移码突变。



M: DNA molecular weight standard (DL2000);swimming lane
1: negative control (without template); swim lane 2-4:
PCR products of N^{pro} gene amplified in different batches.
The target band with a size of 504 bp was indicated.

图 2 N^{pro} 基因 PCR 扩增
Fig.2 PCR amplification of N^{pro} gene

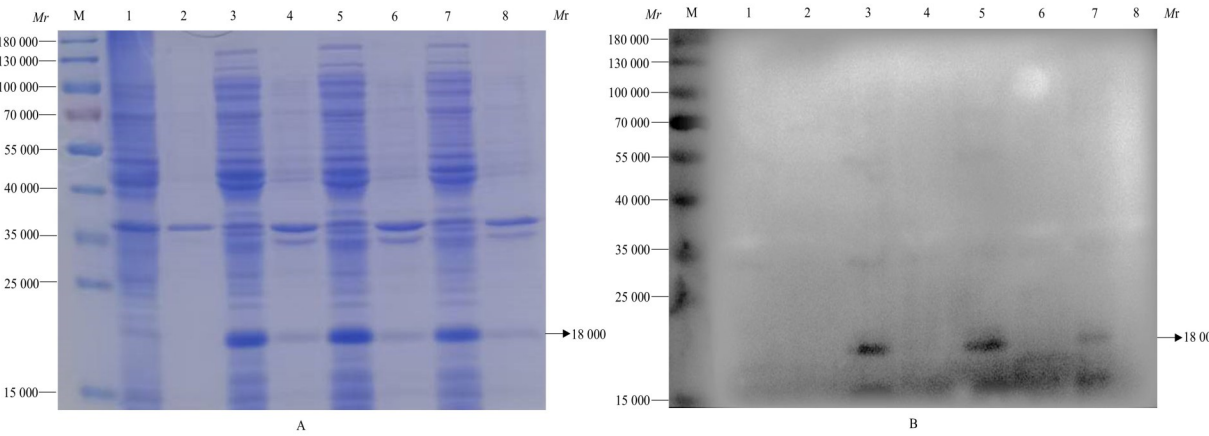


M: DNA marker DL5000; 1: Negative control; 2: N^{pro} gene PCR
amplification product; 3: pET-28a(+)-N^{pro} recombinant
plasmid digested by *Bam*HI / *Xho*I.

图 3 pET-28a(+)-N^{pro} 重组质粒鉴定
Fig.3 Identification of pET-28a(+)-N^{pro} recombinant plasmid

2.4 N^{pro} 蛋白表达及条件优化

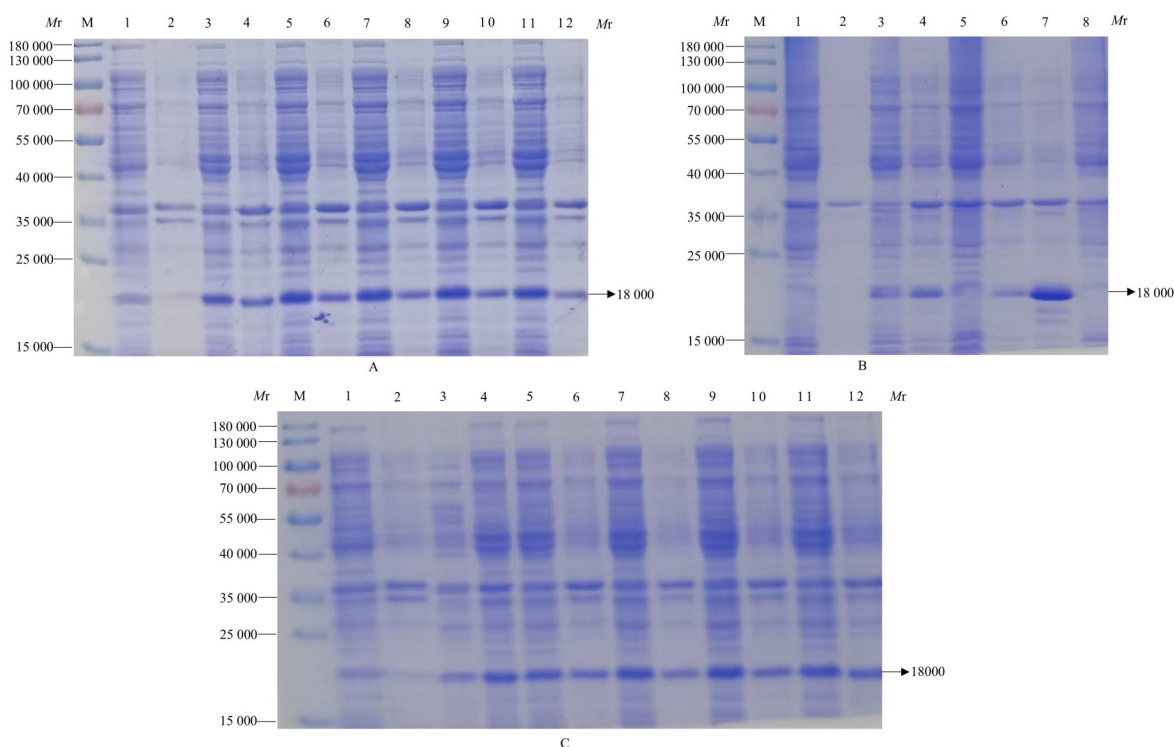
随机挑选 3 个独立单克隆菌株进行培养,通过 Western blot 检测分析显示:3 株菌株的培养上清样品中均能检测到带有 His 标签的重组 N^{pro} 蛋白表达;进一步观察可见,目的蛋白条带的相对分子质量约为 18 ku,与预期大小相符(图 4)。基于上述检测结果,最终选取蛋白表达量最高的菌株,用于后续重组 N^{pro} 蛋白表达条件的优化实验。



M: 蛋白分子量标准;1:未诱导上清;2:未诱导沉淀;3、5、7:诱导后重组 N^{pro} 蛋白上清样品;4、6、8:诱导后重组 N^{pro} 蛋白沉淀样品。
M: Protein molecular weight standard; 1: No induced supernatant; 2: No induced precipitation; 3, 5, 7: Supernatant samples of recombinant N^{pro} protein after induction; 4, 6, 8: Recombinant N^{pro} protein precipitation samples after induction.

图 4 pET-28a(+)-N^{pro} 蛋白表达(A)和 western blot 鉴定(B)
Fig.4 Expression of pET-28a(+)-N^{pro} protein(A)and identification by western blot(B)

基于上述筛选的高表达菌株,进一步对重组 N^{pro} 蛋白的表达条件开展系统优化。结果显示:当诱导条件设定为 16 ℃、0.3 mmol/L IPTG、诱导时长 12 h 时(图 5),该重组蛋白在培养上清中的可溶性表达水平达到最高。



(A)不同诱导时间下重组 N^{pro} 蛋白的表达分析。M:蛋白分子量标准;1:未诱导全菌上清;2:未诱导全菌沉淀;3、5、7、9、11:分别为诱导4 h、6 h、8 h、10 h、12 h后的上清样品;4、6、8、10、12:分别为诱导4 h、6 h、8 h、10 h、12 h后的沉淀样品。(B)不同诱导温度下重组 N^{pro} 蛋白的表达分析。M:蛋白分子量标准;1:未诱导全菌上清;2:未诱导全菌沉淀;3、5、7:分别为37℃、25℃、16℃诱导后的上清样品;4、6、8:分别为37、25、16℃诱导后的沉淀样品。(C)不同IPTG浓度下重组 N^{pro} 蛋白的表达分析。M:蛋白分子量标准;1:未诱导全菌上清;2:未诱导全菌沉淀;3、5、7、9、11:分别为0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.3 mmol/L、0.4 mmol/L、0.5 mmol/L IPTG诱导后的上清样品;4、6、8、10、12:分别为相应浓度IPTG诱导后的沉淀样品。

(A) Expression analysis of recombinant N^{pro} protein at different induction time. M: protein molecular weight standard; 1: the whole cell supernatant was not induced; 2: not induced whole cell precipitation; 3, 5, 7, 9, 11: The supernatant samples were induced for 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, respectively. 4, 6, 8, 10, 12: The precipitation samples were induced for 4 h, 6 h, 8 h, 10 h and 12 h, respectively. (B) Expression analysis of recombinant N^{pro} protein at different induction temperatures. M: protein molecular weight standard; 1: the whole cell supernatant was not induced; 2: not induced whole cell precipitation; 3, 5, 7: supernatant samples induced at 37, 25, 16℃, respectively; 4, 6, 8: The precipitation samples were induced at 37, 25, 16℃, respectively. (C) Expression analysis of recombinant N^{pro} protein under different IPTG concentrations. M: protein molecular weight standard; 1: the whole cell supernatant was not induced; 2: not induced whole cell precipitation; 3, 5, 7, 9, 11: 0.1 mmol/L, 0.2 mmol/L, 0.3 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.5 mmol/L IPTG induced supernatant samples; 4, 6, 8, 10, 12: The precipitate samples were induced by IPTG at the corresponding concentration.

图5 pET-28a(+)- N^{pro} 重组蛋白表达条件优化

Fig.5 Optimization of expression conditions for recombinant pET-28a(+)- N^{pro} protein

2.5 N^{pro} 蛋白纯化

基于上述优化的表达条件获得重组 N^{pro} 蛋白后,对其进行镍柱亲和层析纯化;纯化产物经SDS-PAGE分析显示,在相对分子质量约18 ku位置出现单一目的蛋白条带,该条带大小与重组 N^{pro} 蛋白的预期分子量完全一致。

2.6 多克隆抗体效价检测及鉴定

对纯化后的重组 N^{pro} 蛋白免疫小鼠制备的多克隆抗体进行ELISA效价检测,结果显示:当抗血清稀释度为1:409,600时,鼠抗 N^{pro} 蛋白多克隆抗体的450 nm吸光值(OD_{450})为0.47,且阳性/阴性比值(P/N)大于2.1(图8)。依据ELISA抗体效价判定标准(P/N $\leq$ 1.5为阴性,1.5<P/N<2.1为可疑,P/N $\geq$ 2.1为阳性),据此确定该多克隆抗体效价为1:409,600,表明所制备的鼠抗 N^{pro} 蛋白多克隆抗体具有较高效价。

将编码 N^{pro} 蛋白的重组质粒pCMV-C-Flag- N^{pro} 及空载体对照pCMV-C-Flag分别转染CHO细胞,利用多克隆抗体作为一抗,通过Western blot试验对真核表达蛋白进行鉴定。结果表明,在相对分子质量约为18 ku处可见蛋白目的条带,与重组 N^{pro} 蛋白的预期大小相符。

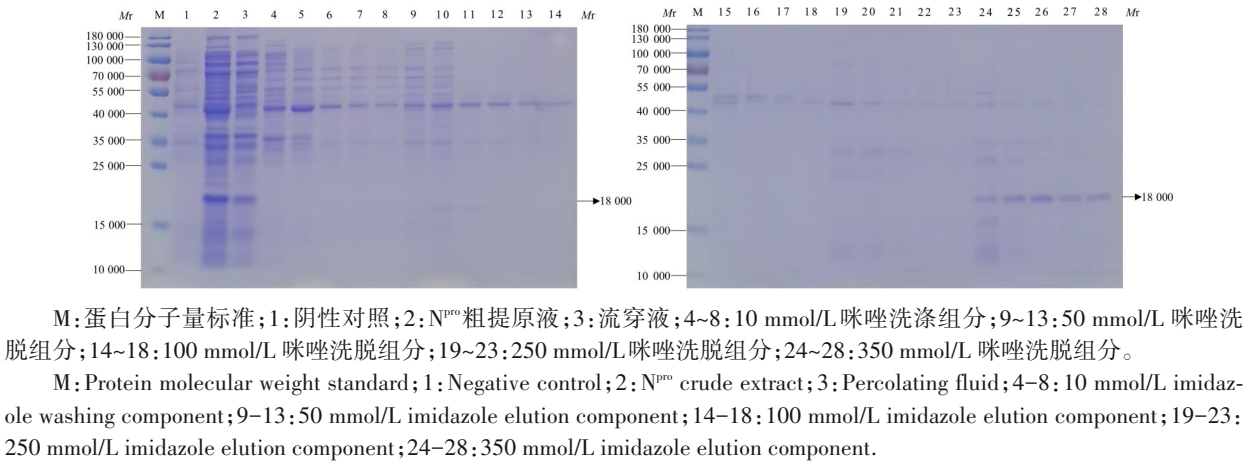


图 7 N^{pro} 蛋白纯化产物 SDS-PAGE 分析
Fig.7 SDS-PAGE analysis of purified N^{pro} protein.

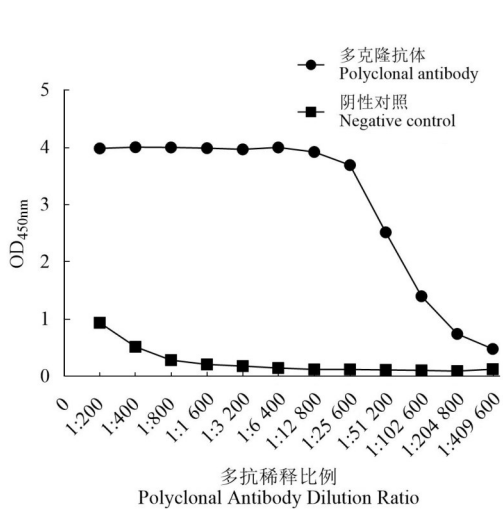


图 8 间接 ELISA 法测定鼠抗 N^{pro} 多克隆抗体效价
Fig.8 ELISA analysis showing a high titer of mouse anti-N^{pro} polyclonal antibodies.

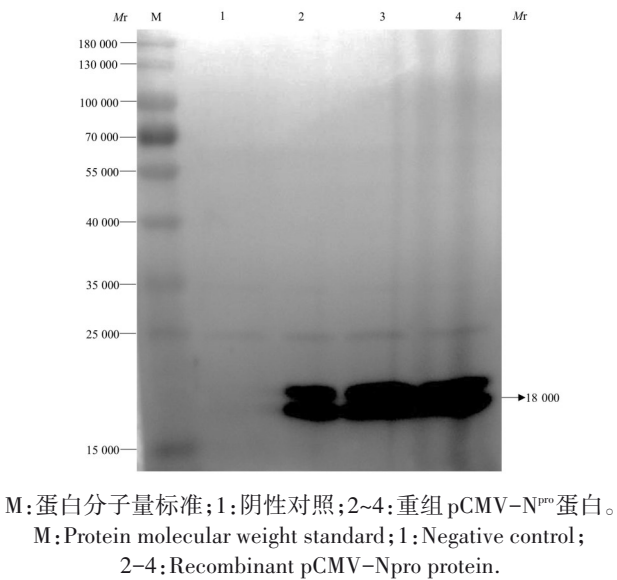


图 9 真核表达重组 N^{pro} 蛋白反应原性的 Western blot 鉴定
Fig.9 Western blot analysis of the immunoreactivity of recombinant N^{pro} protein expressed in eukaryotic cells

3 讨论与结论

牛病毒性腹泻病毒(BVDV)是严重危害畜牧业的重要病原体,可引发繁殖障碍、免疫抑制及黏膜病等临床表现,造成重大的经济损失^[20]。该病毒可在新生犊牛中建立持续性感染(PI),导致持续性病毒排放,从而在牛群中广泛传播^[21]。鉴于BVDV的传播特性及其造成的严重危害,准确且早期的感染检测对于有效防控该病至关重要,是预防疫情暴发和阻断病毒传播链的关键环节^[22]。N^{pro}蛋白作为BVDV感染周期中首个表达的功能蛋白,不仅通过其自切割活性在病毒复制早期发挥关键作用,更被证实可通过靶向降解干扰素调节因子3(IRF3)抑制宿主的I型干扰素应答,是病毒实现免疫逃逸的重要分子^[23-25]。因此,获取高纯度的N^{pro}蛋白及其特异性抗体,对揭示其生物学机制和开发新型诊断方法具有重要意义。本研究成功实现了BVDV N^{pro}蛋白的可溶性表达与纯化,并制备出具有良好特异性的鼠源多克隆抗体,为相关研究提供了关键工具。

本研究成功获得可溶性N^{pro}重组蛋白是一项重要研究突破。与先前研究报道该蛋白易形成包涵体不同,通过表达条件优化,使重组蛋白主要存在于上清中,这极大简化了纯化流程,并更好地保持了蛋白的天然构象。这一成果为后续研究其天然状态下的生物学功能奠定了坚实基础。特别值得关注的是,在蛋白纯化与鉴定过程中发现,重组N^{pro}在非变性条件下能保持良好的抗原性,而在Western blot变性条

件下其免疫反应性显著降低,这一现象与李等^[26]的报道相符,进一步证实了N^{pro}蛋白的抗原表位具有显著的构象依赖性特征。

基于可溶性N^{pro}蛋白,笔者成功制备了鼠源多克隆抗体。Western blot分析显示,该抗体能够特异性识别真核细胞中表达的N^{pro}蛋白,且在Western blot中表现良好,证明其具有较高的亲和力与特异性,本研究中N^{pro}蛋白可能在真核细胞中发生了部分降解或翻译后修饰,导致在Western Blot中出现2条带。尤其是因为N^{pro}是一种具有自切割活性的蛋白酶,其自身结构可能在不同条件下表现出不同的稳定性或修饰状态。这一成果的价值在于:第一,为开发基于N^{pro}的BVDV检测方法(如ELISA、免疫层析试纸条等)提供了核心试剂;第二,为研究N^{pro}在病毒感染过程中的细胞内分布与动态变化提供了可靠工具;第三,为后续筛选具有中和活性的单克隆抗体奠定了基础。

从生物学功能角度看,本研究获得的工具将有力推动对N^{pro}蛋白的深入探索。已有研究表明,尽管N^{pro}缺乏经典的核定位信号,但可在细胞核内检测到,提示其可能通过非经典途径入核并执行未知功能。试验制备的特异性抗体将有助于阐明N^{pro}的核质穿梭机制及其在核内的生物学意义。同时,鉴于N^{pro}通过降解IRF3抑制干扰素产生的关键功能^[18],本研究提供的可溶性蛋白为建立体外互作研究体系、精确解析其与IRF3的结合域点提供了可能。

综上所述,本研究不仅成功获得了具有天然构象的BVDV N^{pro}重组蛋白及其特异性多克隆抗体,更重要的是为深入探索该蛋白的生物学功能及开发新型诊断方法提供了关键研究工具。基于本研究结果,后续工作将重点聚焦三方面:一是利用现有工具深入解析N^{pro}的免疫抑制机制;二是开发基于N^{pro}的BVDV血清学检测方法;三是筛选具有病毒抑制潜力的单克隆抗体,为BVDV的综合防控提供新策略。

参考文献 References:

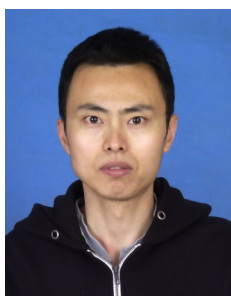
- [1] RICHTER V, LEBL K, BAUMGARTNER W, et al. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection[J]. The veterinary journal, 2017, 220: 80-87.
- [2] LARGHI M. Comparative study in the control of bovine viral diarrhea[J]. Animal health research reviews, 2018, 19(2): 125-133.
- [3] SCHARNBÖCK B, ROCH F F, RICHTER V, et al. A meta-analysis of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevalences in the global cattle population[J]. Scientific reports, 2018, 8(1): 14420.
- [4] NEWCOMER B W. 75 years of bovine viral diarrhea virus: current status and future applications of the use of directed antivirals[J]. Antiviral research, 2021, 196: 105205.
- [5] BACHOFEN C, BRAUN U, HILBE M, et al. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups[J]. Veterinary microbiology, 2010, 141(3): 258-267.
- [6] BACHOFEN C, VOGT H R, STALDER H, et al. Persistent infections after natural transmission of bovine viral diarrhoea virus from cattle to goats and among goats[J]. Veterinary research, 2013, 44(1): 32.
- [7] BAUERMANN F V, RIDPATH J F. HoBi-like viruses: the typical "atypical bovine pestivirus"[J]. Animal health research reviews, 2015, 16(1): 64-69.
- [8] AL-KUBATI A A G, HUSSEN J, KANDEEL M, et al. Recent advances on the bovine viral diarrhea virus molecular pathogenesis, immune response, and vaccines development[J]. Frontiers in veterinary science, 2021, 8: 665128.
- [9] TIAN B, CAI D J, LI W Q, et al. Identification and genotyping of a new subtype of bovine viral diarrhea virus 1 isolated from cattle with diarrhea[J]. Archives of virology, 2021, 166(4): 1259-1262.
- [10] YEŞİLBAĞ K, ALPAY G, BECHER P. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhea virus[J]. Viruses, 2017, 9(6): 128.
- [11] DENG M L, CHEN N, GUIDARINI C, et al. Prevalence and genetic diversity of bovine viral diarrhea virus in dairy herds of China[J]. Veterinary microbiology, 2020, 242: 108565.
- [12] COLLETT M S, LARSON R, BELZER S K, et al. Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus[J]. Virology, 1988, 165(1): 200-208.
- [13] SHAPOURI M R S A, MAHMOODI P, NAJAFABADI M G, et al. A novel competitive ELISA for detection of antibodies against bovine viral diarrhea virus infection[J]. Veterinary research forum, 2022, 13(3): 403-407.
- [14] TAUTZ N, THIEL H J, DUBOVI E J, et al. Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an in-

- ternal deletion[J].Journal of virology,1994,68(5):3289-3297.
- [15] 常秋燕,郭富城,冶眩青,等.牛病毒性腹泻病毒N^{pro}蛋白的原核表达及裂解效率[J].江苏农业学报,2019,35(5):1161-1166.
- CHANG Q Y, GUO F C, YE X Q, et al. Prokaryotic expression and splitting decomposition rate of N^{pro} protein of bovine viral diarrhea virus[J]. Jiangsu journal of agricultural sciences, 2019, 35(5): 1161-1166.
- [16] STARK R, MEYERS G, RÜMENAPF T, et al. Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus[J]. Journal of virology, 1993, 67(12): 7088-7095.
- [17] WISKERCHEN M, BELZER S K, COLLETT M S. Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity[J]. Journal of virology, 1991, 65(8): 4508-4514.
- [18] HILTON L, MOGANERADJ K, ZHANG G, et al. The N^{pro} product of bovine viral diarrhea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation[J]. Journal of virology, 2006, 80(23): 11723-11732.
- [19] 安乐乐,刘倩芸,蓝秋菊,等. 鸽腺病毒 I 型 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及遗传进化分析[J]. 江西农业大学学报, 2025, 47(1): 167-177.
- AN L L, LIU Q Y, LAN Q J, et al. Establishment of TaqMan probe real-time fluorescence quantitative PCR detection method and genetic evolution analysis of pigeon adenovirus type I[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2025, 47(1): 167-177.
- [20] MA L N, ZHANG J, CHEN H T, et al. An overview on ELISA techniques for FMD[J]. Virology journal, 2011, 8: 419.
- [21] KHODAKARAM-TAFTI A, FARJANIKISH G H. Persistent bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in cattle herds[J]. Iranian journal of veterinary research, 2017, 18(3): 154-163.
- [22] TSUBOI T, OSAWA T, KIMURA K, et al. Experimental infection of early pregnant cows with bovine viral diarrhea virus: transmission of virus to the reproductive tract and conceptus[J]. Research in veterinary science, 2011, 90(1): 174-178.
- [23] HUAN C C, XU Y, ZHANG W, et al. Research progress on the antiviral activity of glycyrrhizin and its derivatives in liquorice[J]. Frontiers in pharmacology, 2021, 12: 680674.
- [24] MOISY D, AVILOV S V, JACOB Y, et al. HMGB1 protein binds to influenza virus nucleoprotein and promotes viral replication[J]. Journal of virology, 2012, 86(17): 9122-9133.
- [25] YU R, YANG D, LEI S H, et al. HMGB1 promotes hepatitis C virus replication by interaction with stem-loop 4 in the viral 5' untranslated region[J]. Journal of virology, 2015, 90(5): 2332-2344.
- [26] 李慧昕,王君伟.牛病毒性腹泻病毒P²⁰及P¹⁴蛋白基因的表达及其产物的抗原性分析[J].中国兽医科学,2006,36(10):795-799.
- LI H X, WANG J W, Expression of P²⁰ and P¹⁴ protein genes of bovine viral diarrhea virus and antigenicity analysis of the expressed proteins[J]. Veterinary science in Chinese, 2006, 36(10): 795-799.

(责任编辑:刘俊峰)



第一作者简介:张书斌,硕士研究生。本科和硕士期间主修专业均为生物工程,在校期间获得校级一等学业奖学金,目前所学领域为分子微生物。长期坚持文献检索,关注国际前沿研究动态;爱好实验方案优化与技术创新,提升研究效率;喜欢学术交流与研讨,拓展科研思路,保持良好的身心状态以支撑科研工作。



通信作者简介:周建华,博士,副教授,硕士生导师。主要研究方向为病原生物学与基因工程。先后主持国家自然科学基金(2项)、甘肃省自然科学基金(1项)、优秀青年团队培育项目(1项)、引进人才科研项目(1项)、校企横向合作项目(1项),以第一作者或通讯作者发表学术论文10篇,以第一发明人获批发明专利1项,以主编出版译著1部。深耕分子病毒学领域,秉持病原、宿主、环境研究范式与“研以致用、教研相长”核心理念,以项目驱动育人,实现科研创新、学科发展与人才培养的协同统一,为动物病毒病防控提供支撑。