

• 生物技术与方法 •

呼吸道合胞病毒 NS1 蛋白鼠单克隆抗体的制备

陈娇^{1,2}, 王亚娟^{1,2,3}, 陈志华^{1,2}, 茹毅^{1,2}, 郑海学^{1,2,3*}, 裴晶晶^{1,2*}

- 1 中国农业科学院兰州兽医研究所兰州大学动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃兰州 730000
- 2 甘肃省病原生物学基础学科研究中心, 甘肃兰州 730046
- 3 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃兰州 730050

陈娇, 王亚娟, 陈志华, 茹毅, 郑海学, 裴晶晶. 呼吸道合胞病毒 NS1 蛋白鼠单克隆抗体的制备[J]. 生物工程学报, 2024, 40(5): 1536-1547.

CHEN Jiao, WANG Yajuan, CHEN Zhihua, RU Yi, ZHENG Haixue, PEI Jingjing. Preparation of a mouse monoclonal antibody against the NS1 protein of respiratory syncytial virus[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(5): 1536-1547.

摘要: 本研究旨在制备抗呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)非结构蛋白 1 (nonstructural protein 1, NS1)单克隆抗体, 以分析在转染和感染过程中 NS1 蛋白的表达和分布情况, 并评估其在免疫沉淀反应中的应用价值。将NS1基因片段构建至原核表达质粒, 经大肠杆菌表达、亲和层析纯化后得到 NS1 蛋白, 将纯化的蛋白免疫小鼠后, 通过间接酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)技术筛选能稳定分泌 NS1 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 并将该单抗用于间接免疫荧光(indirect immunofluorescence assay, IFA)与免疫印迹(Western blotting)检测, 分析 RSV NS1 在过表达细胞和病毒感染细胞中的表达与分布情况, 评估该单抗在免疫沉淀反应中的应用价值。结果发现, RSV NS1 蛋白在大肠杆菌中成功表达及纯化, 免疫小鼠后, 获得了一株特异性强、反应性好的 RSV NS1 单抗, 其亚型为 IgG1, 且抗体效价可达 1:15 360 000; 使用该单抗鉴定出 RSV NS1 蛋白在转染和感染细胞中正常表达, IFA 结果表明, NS1 主要分布在细胞质与细胞核; 并验证该单抗在免疫沉淀反应中作为捕获抗体能够特异性结合细胞中表达的 NS1 蛋白。本研究经原核表达系统成功获得 RSV NS1 蛋白, 成功制备出抗 RSV NS1 单抗, 该抗体能特异性识别 NS1 蛋白, 可被应用于免疫沉淀方法, 为 NS1 蛋白的功能研究奠定了基础。

关键词: 呼吸道合胞病毒; NS1 蛋白; 原核表达; 单克隆抗体; 免疫沉淀

资助项目: 甘肃省科技重大专项计划(22ZD6NA001)

This work was supported by the Science and Technology Major Project of Gansu Province (22ZD6NA001).

*Corresponding authors. E-mail: ZHENG Haixue, zhenghaixue@caas.cn; PEI Jingjing, jpei@caas.cn

Received: 2023-10-24; Accepted: 2024-01-08; Published online: 2024-03-11

Preparation of a mouse monoclonal antibody against the NS1 protein of respiratory syncytial virus

CHEN Jiao^{1,2}, WANG Yajuan^{1,2,3}, CHEN Zhihua^{1,2}, RU Yi^{1,2}, ZHENG Haixue^{1,2,3*}, PEI Jingjing^{1,2*}

1 State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730000, Gansu, China

2 Gansu Province Research Center for Basic Disciplines of Pathogen Biology, Lanzhou 730046, Gansu, China

3 School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, Gansu, China

Abstract: The aim of this study was to prepare a mouse monoclonal antibody against the nonstructural protein 1 (NS1) of respiratory syncytial virus (RSV) to analyze its expression and distribution during transfection and infection. Additionally, we aimed to evaluate the antibody's application in immunoprecipitation assay. Firstly, the NS1 gene fragment was cloned into a prokaryotic plasmid and expressed in *Escherichia coli*. The resulting NS1 protein was then purified by affinity chromatography, and used to immunize the BALB/c mice. Subsequently, hybridoma cells capable of stably secreting the NS1 monoclonal antibody were selected using indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). This monoclonal antibody was employed in both indirect immunofluorescence assay (IFA) and Western blotting to analyze the expression and distribution of RSV NS1 in overexpressed and infected cells. Finally, the reliability of this monoclonal antibody was evaluated through the immunoprecipitation assay. The results showed that the RSV NS1 protein was successfully expressed and purified. Following immunization of mice with this protein, we obtained a highly specific RSV NS1 monoclonal antibody, which belonged to the IgG1 subtype with an antibody titer of 1:15 360 000. Using this monoclonal antibody, the RSV NS1 protein was identified in both transfected and infected cells. The IFA results revealed predominant distribution of NS1 in the cytoplasm and nucleus. Moreover, we confirmed that this monoclonal antibody could effectively bind specifically to NS1 protein in cell lysates, making it suitable as a capture antibody in immunoprecipitation assay. In conclusion, our study successfully achieved production of the RSV NS1 protein through a prokaryotic expression system and prepared a specific monoclonal antibody against NS1. This antibody demonstrates the ability to specifically identify the NS1 protein and can be used in the immunoprecipitation assay, thereby laying a foundation for the functional studies of the NS1 protein.

Keywords: respiratory syncytial virus; NS1 protein; prokaryotic expression; monoclonal antibody; immunoprecipitation

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是引起婴幼儿、免疫功能低下者和老年人下呼吸道急性感染的主要原因。据统计,每年约有6.6–19.9万5岁以下儿童因感染RSV而死亡,

其中发展中国家的死亡人数最多^[1]。2015年,约有320万婴儿因感染RSV住院,约有50万老年人因RSV相关的急性呼吸道感染入院^[2]。

RSV是一种非节段性单股负链RNA病毒,

属于单分子负链 RNA 病毒目, 肺病毒科, 正肺病毒属, 直径约为 150 nm, 基因组为 15.2 kb, 含有 10 个基因, 编码 11 个开放阅读框(open reading frames, ORFs), 顺序为 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'^[1,3]。与同科其他种属比, NS1 和 NS2 是 RSV 特异的非结构蛋白(nonstructural protein, NS), 在病毒免疫逃逸中起关键作用, 主要通过抑制 I 型干扰素(interferon, IFN)信号通路来抑制宿主抗病毒反应, 促进 RSV 感染^[4]。NS1 和 NS2 还能抑制树突状细胞的成熟, 进而促进 Th2 极化和 Th17 淋巴细胞的增殖^[5-7]。NS 蛋白在 RSV 病例中也可作为一种有效的临床指标, 来评估感染程度。

NS1 基因全长 417 bp, 编码 139 个氨基酸残基, 蛋白大小为 15.6 kDa。NS1 蛋白的晶体结构在 2017 年被解析, 该蛋白由 3 个 α 螺旋和 7 个 β 折叠组成^[8], 其中第 3 个 α 螺旋从蛋白质的核心延伸出来, 这表明它具有一定的构象灵活性, 具有寡聚和聚集的潜力^[9], 且该 α 螺旋包含的几个疏水残基有可能参与蛋白质-蛋白质相互作用^[8]。研究表明, 在 RSV 感染早期, 基质蛋白 M 部分定位于细胞核^[10-11], 而 NS1 蛋白的结构又与 M 蛋白相似, 研究进一步证实, NS1 蛋白可定位于细胞核, 但目前缺乏 NS1 标准的核定位序列, 且 C 端 α 螺旋的突变不影响 NS1 的核定位^[12], 但 NS1 C 端 α 螺旋突变体会失去抑制 IFN- β 介导的抗病毒反应, 也失去了对树突状细胞成熟的拮抗功能^[8], 这表明这种独特的螺旋结构对于 NS1 介导的 IFN 拮抗和免疫反应的调节至关重要。与感染野生型(wild type, WT) RSV 相比, 突变 NS1 C 端 α 螺旋的重组毒株在 A549 细胞中的病毒复制率降低, 导致基因表达发生显著变化^[8,13-14]。目前的研究结果证实, NS1 在细胞质和细胞核中均有分布^[12,15], NS1 进入细胞核后, 通过与中介体互作, 结合宿主免疫基因的启

动子和增强子, 调控宿主免疫基因的转录, 从而拮抗宿主抗病毒免疫反应^[12], 但这种抑制的确切分子机制尚未明确。因此, 进一步研究非结构蛋白 NS1 与宿主因子的相互作用将有助于系统性了解 RSV 感染及其免疫逃逸的分子机制。

由于目前尚无商品化抗 RSV NS1 单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb), 限制了对 NS1 蛋白功能和调控机制的深入研究。本研究成功制备了 NS1 mAb, 同时将该单抗用于间接免疫荧光(indirect immunofluorescence assay, IFA) 和 Western blotting 检测, 分析 RSV NS1 在过表达细胞和病毒感染细胞中的表达与分布情况, 并评估了 NS1 单抗在免疫沉淀反应中的应用价值, 为进一步研究 RSV 感染过程中非结构蛋白 NS1 与宿主蛋白互作机制提供有利的工具。

1 材料与方法

1.1 基因、菌株、质粒、病毒和实验动物

RSV NS1 基因的序列由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*) DH5 α 和 BL21(DE3)感受态细胞购于 TaKaRa 公司, 质粒 pCAGGS-HA、pCAGGS-Flag、pCAGGS-HA-NS1、293T 细胞、A549 细胞和 RSV A2 毒株由本实验室保存, 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠购于中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心。动物实验遵循小鼠福利和伦理道德守则, 并获得中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物伦理委员会批准(批准号: LVRIAEC-2023-059)。

1.2 主要试剂

限制性核酸内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、*Not* I 和 *Nhe* I 购于 TaKaRa 公司; HA 标签鼠单克隆抗体、Flag 标签鼠单克隆抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗鼠 IgG 抗体、弗氏不完全佐剂、弗氏完全佐剂、胎

牛血清、Flag beads 和 Flag peptide 均购于 Sigma 公司; HisTrap FF 镍亲和层析柱和 protein G 纯化柱购于 Cytiva 公司; 小泛素蛋白修饰分子 (small ubiquitin-related modifier, SUMO) 蛋白酶购于索莱宝科技有限公司 (北京); ECL 显色试剂盒购于 Merck 公司; protein A+G Agarose 购于碧云天生物技术有限公司 (上海)。

1.3 NS1 基因原核表达质粒的构建和鉴定

参考 NCBI 公布的 RSV 基因 (mutant human respiratory syncytial virus strain long, 登录号: KF713490.1), 对 NS1 全基因进行密码子优化, 表达序列两端引入酶切位点 *Bam*H I 和 *Xho* I, 由苏州金唯智生物科技有限公司进行基因序列合成, 并构建至原核表达载体 pET-28a-HisSUMO, 并将构建的重组质粒命名为 pET-28a-HisSUMO-NS1, 将该质粒转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 提取质粒后进行 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 并由擎科生物科技有限公司 (西安) 进行测序验证。

1.4 NS1 基因真核表达质粒的构建和鉴定

利用 *Not* I 和 *Nhe* I 限制性核酸内切酶对 pCAGGS-Flag 载体和 pCAGGS-HA-NS1 质粒进行双酶切, 酶切后的产物分别进行胶回收, 通过 T4 DNA 连接酶将 NS1 片段连接至 pCAGGS-Flag 质粒, 构建真核表达质粒 pCAGGS-Flag-NS1, 对获得的重组质粒进行 PCR 及双酶切鉴定, 并送往公司进行测序鉴定。

1.5 NS1 蛋白的原核表达和纯化

1.5.1 NS1 蛋白的诱导表达

将重组质粒 pET-28a-HisSUMO-NS1 转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 挑取阳性单克隆菌落接种于 5 mL 含卡那霉素 (100 μ g/mL) 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 过夜培养, 保存甘油菌, 菌液以 1:50 的比例接种于 100 mL 含卡那霉素的 LB 液体培养基, 培养至 *OD*₆₀₀ 为 0.6 左右时, 加入 100 μ L 浓度为 1 mol/L 的 IPTG,

16 $^{\circ}$ C 诱导表达 14 h, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 菌体沉淀用平衡缓冲溶液 (50 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 重悬, 并进行超声破碎, 8 000 r/min 离心 15 min, 分别收集上清液和沉淀, 其中沉淀用 8 mol/L 尿素重悬溶解, 制备样品后经 SDS-PAGE 电泳鉴定观察 NS1 蛋白的表达情况。

1.5.2 NS1 蛋白的纯化

将保存的甘油菌按照 1.5.1 的步骤方法进行大量诱导表达, 离心收集菌体, 超声破碎后离心收集菌体上清液。将镍柱连接至 AKTA pure 150 纯化仪, 收集的上清液 0.45 μ m 过滤后应用亲和层析技术进行纯化, 依次用线性梯度的咪唑缓冲液进行洗杂和洗脱, 分别收集洗杂液和洗脱液。纯化后的融合蛋白使用 SUMO 蛋白酶室温酶切 3 h, 采用亲和层析技术进一步纯化, 去除 His-SUMO 蛋白标签, 经 SDS-PAGE 检测蛋白的纯化情况。

1.6 单克隆抗体的制备

1.6.1 纯化蛋白免疫小鼠

为制备 RSV NS1 蛋白的单克隆抗体, 将纯化后的 NS1 蛋白与佐剂以 1:1 的比例乳化后制备成疫苗, 免疫 6 只 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 第 1 次免疫用弗氏完全佐剂乳化, 第 2 次至第 4 次免疫用弗氏不完全佐剂乳化, 分别于第 0、14、28、36 天各免疫一次, 每次免疫蛋白量为 50 μ g/只。

1.6.2 单克隆抗体的筛选

第 4 次免疫后 14 d, 采集全血, 分离血清。采用间接 ELISA 方法检测小鼠血清的抗体效价, 取抗体最高的小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞融合试验。融合后, 采用间接 ELISA 方法, 以杂交瘤细胞上清为一抗, HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体为二抗, 筛选与 RSV NS1 反应的阳性杂交瘤细胞株, 将阳性杂交瘤细胞株 3 次克隆纯化后传代扩大, 收集细胞, 注射小鼠制备腹水。最终使用 Protein G 亲和层析柱纯化单克隆抗体, 并使用小鼠单抗分型试剂盒对单抗进行亚型鉴定,

以备用于后续基础性研究。

1.7 单克隆抗体的鉴定

1.7.1 RSV NS1 抗体效价的 ELISA 检测

以纯化的 RSV NS1 蛋白(1 ng/ μ L)为包被抗原,2%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)为封闭液,纯化后的 NS1 单克隆抗体(1:7 500 开始 2 倍梯度稀释)作为一抗,并将 SP2/0 制备的小鼠腹水作为阴性对照,HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (1:10 000 稀释)作为二抗,采用间接 ELISA 方法检测 NS1 单克隆抗体的效价。(实验样品孔 OD 值-空白对照 OD 值)/(阴性对照 OD 值-空白对照 OD 值) \geq 2.1 时判为阳性,即以 S/N \geq 2.1,阳性孔的最大稀释度作为该抗体的效价。

1.7.2 RSV NS1 单抗的免疫荧光检测

将 A549 细胞以 1×10^5 /孔的密度接种于共聚焦皿中,使用真核表达质粒 pCAGGS-HA-NS1 和空载质粒 pCAGGS-HA 分别转染细胞 24 h。使用 RSV MOI=1 的病毒量吸附 A549 细胞 2 h,并用未感染的细胞作为阴性对照,吸附 2 h 后再培养 48 h。用 PBS 洗涤细胞 2 次,4%多聚甲醛常温固定细胞 30 min,0.2% TritonX-100 室温通透 10 min,含 2% BSA 的 blocking buffer 室温封闭 1 h;用 RSV NS1 单克隆抗体(1:500 稀释)4 $^{\circ}$ C 过夜孵育;再用羊抗鼠 488 绿色荧光二抗(1:500 稀释)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;PBS 洗涤 4 次,最后用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (1:2 000 稀释)室温染核 5 min, PBS 洗涤 4 次,于共聚焦显微镜下观察拍照。

1.7.3 RSV NS1 单抗的 Western blotting 检测

将真核表达质粒 pCAGGS-HA-NS1 和空载质粒 pCAGGS-HA 分别转染 293T 细胞,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后收集 293T 细胞;以 RSV MOI=1 的病毒量感染 A549 细胞,37 $^{\circ}$ C 培养 72 h 后收集 A549 细胞,并用未感染的细胞作为阴性对照;收集并处理细胞样品,用 12%蛋白胶进行

SDS-PAGE,转印至聚偏氟乙烯(poly vinylidene fluoride, PVDF)膜,以 NS1 单克隆抗体(1:2 000 稀释)为一抗,HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体(1:5 000 稀释)为二抗进行 Western blotting 检测。

1.8 免疫沉淀试验

将 293T 细胞以 1×10^6 个/孔接种于六孔板,实验组转染真核表达质粒 pCAGGS-Flag-NS1,对照组转染空载质粒 pCAGGS-Flag,24 h 后收集细胞,裂解离心,收集上清蛋白样品用于免疫沉淀。详细操作按照碧云天公司的 protein A+G Agarose 的说明书进行。收集并处理样品,用 12%蛋白胶进行 SDS-PAGE,转印至 PVDF 膜,以 Flag 标签抗体或 NS1 单抗为一抗,HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体(1:5 000 稀释)为二抗进行 Western blotting 检测。

2 结果与分析

2.1 NS1 基因的原核表达质粒和真核表达质粒的构建及鉴定

重组质粒 pET28a-HisSUMO-NS1 经 *Bam*HI 和 *Xho* I 双酶切,酶切产物经 1.5%琼脂糖核酸电泳,得到大小为 5 633 bp 和 417 bp 两条特异性条带(图 1A),与预期结果相符合。测序结果表明原核表达质粒 pET28a-HisSUMO-NS1 构建成功。

对重组真核质粒 pCAGGS-Flag-NS1 进行 *Not* I 和 *Nhe* I 双酶切鉴定,核酸电泳结果显示(图 1B),可见为 4 782 bp 和 417 bp 两条特异性条带。MegAlign 软件分析测序结果,与目的基因 NS1 的同源性达到 100%,表明成功构建出真核重组质粒 pCAGGS-Flag-NS1。

2.2 NS1 蛋白的纯化及鉴定

在诱导后菌体的上清(泳道 4)中有一条大小约为 33.6 kDa 的条带,与预期大小一致,而未诱导菌体的上清液(泳道 2)无此条带出现(图 2A),说明该重组蛋白在该原核表达系统为可溶性表达。

使用镍亲和层析柱对融合表达的 NS1 蛋白进行纯化, 纯化后的样品经 SDS-PAGE 鉴定, 大约在 33.6 kDa 处观察到一条特异性蛋白条带(图 2B), 与表达鉴定结果相符, 加入 SUMO 蛋白酶室温酶切 3 h, 并用镍亲和层析柱去除 His-SUMO 融合标签, SDS-PAGE 鉴定结果显示(图 2B), 泳道 8 中可见一条较纯的特异性条带, 与 NS1 蛋白理论值的大小一致, 说明成功切除 His-SUMO 标签蛋白。

2.3 NS1 单克隆抗体的鉴定与纯化

纯化的 NS1 蛋白免疫小鼠后, 利用间接 ELISA 筛选阳性克隆, 通过连续克隆纯化, 获得一株稳定分泌 NS1 mAb 的细胞株 1B1 4D4, 制备腹水, 纯化后得到单克隆抗体, SDS-PAGE 鉴定图中可以看到较为单一的重链与轻链(图 3A)。Western blotting 鉴定结果表明筛选的单抗 1B1 4D4 能与本研究纯化所得的 NS1 蛋白反应原性良好(图 3B), 亚型鉴定该单抗为 IgG1 亚型。

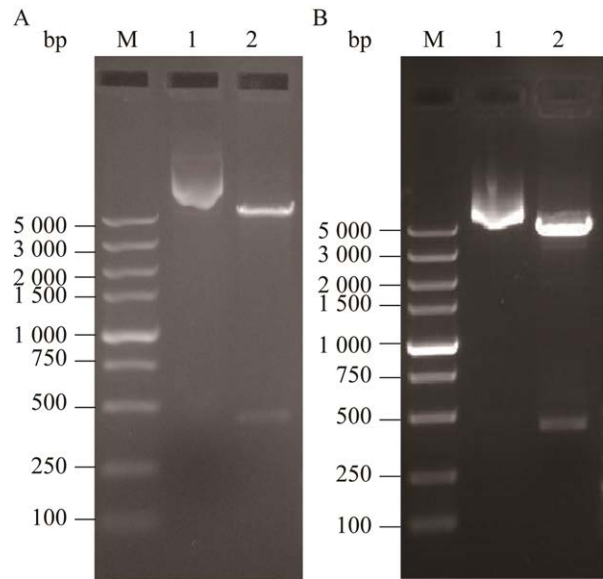


图 1 重组质粒 pET28a-HisSUMO-NS1 (A) 和 pCAGGS-Flag-NS1 (B) 的双酶切鉴定

Figure 1 Identification of recombinant plasmid pET28a-HisSUMO-NS1 (A) and pCAGGS-Flag-NS1 (B) by double enzyme digestion. M: DNA marker DL5000; 1: Recombinant plasmid; 2: Double enzyme digestion products of recombinant plasmid.

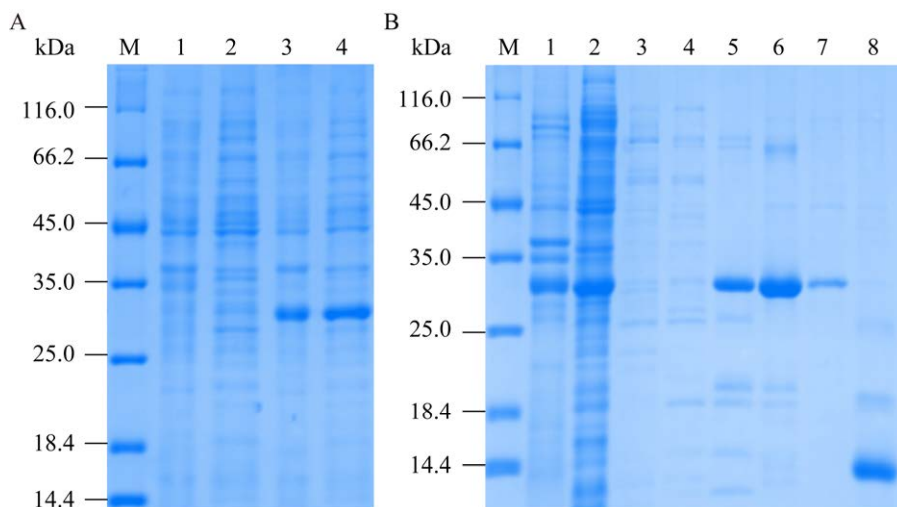


图 2 RSV NS1 蛋白的原核表达与纯化鉴定

Figure 2 Prokaryotic expression and purification of RSV NS1 protein. A: SDS-PAGE analysis of recombinant protein NS1. M: Protein molecular weight marker; 1: Precipitates of recombinant strain pET28a-HisSUMO-NS1 without induction; 2: Supernatant of recombinant strain pET28a-HisSUMO-NS1 without induction; 3: Precipitates of recombinant strain pET28a-HisSUMO-NS1 after induction; 4: Supernatant of recombinant strain pET28a-HisSUMO-NS1 after induction. B: SDS-PAGE identification of purified NS1 protein. M: Protein molecular weight marker; 1: Precipitation of induced protein after cell disruption with sonication; 2: Supernatant of induced protein after sonication; 3-4: Rinsing solution; 5-7: Eluent solution; 8: NS1 protein after removing His-SUMO tag.

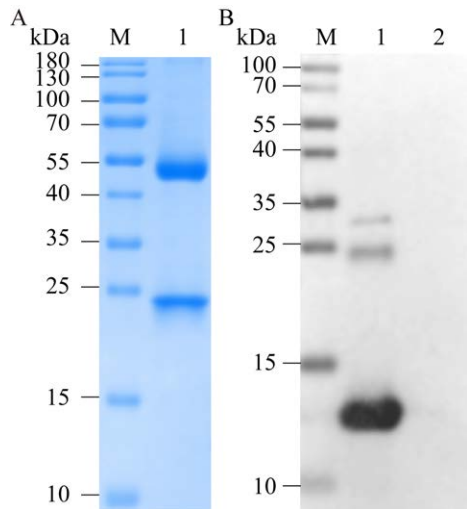


图3 RSV NS1 抗体纯化后的 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定

Figure 3 SDS-PAGE and Western blotting identification of purified RSV NS1 antibody. A: SDS-PAGE identification of purified RSV NS1 antibody; M: Protein molecular weight marker; 1: Purified RSV NS1 antibody. B: Western blotting identification of purified RSV NS1 antibody binding to prokaryotic expressed NS1 protein; M: Protein molecular weight marker; 1: RSV NS1 protein; 2: RSV NS2 protein.

2.4 NS1 单克隆抗体的效价检测

以 NS1 蛋白作为包被抗原, 纯化的 NS1 mAb (1:7 500 开始 2 倍梯度稀释) 作为一抗, 并将 SP2/0 制备的小鼠腹水作为阴性对照, 采用间接 ELISA 检测 NS1 mAb 效价, 结果表明, 该单抗效价可达 1:15 360 000 (图 4)。

2.5 NS1 单克隆抗体的特异性和反应性鉴定

2.5.1 过表达细胞中 NS1 蛋白的表达与亚细胞定位分析

共聚焦结果表明, 该单抗与 A549 细胞内 RSV NS1 过表达产物结合良好, 特异性强, 而空载体 pCAGGS-HA 转染对照组无荧光呈现, 在 pCAGGS-HA-NS1 转染的细胞中, NS1 蛋白主要分布于细胞质中, 少量定位于细胞核(图 5A)。Western blotting 结果显示, NS1 单抗 1B1 4D4 对真核质粒 pCAGGS-HA-NS1 转染的 293T 细胞来源

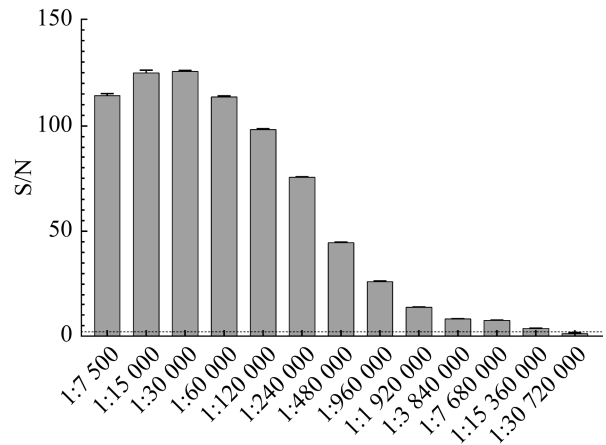


图4 纯化后 RSV NS1 单抗效价的检测

Figure 4 The titer test of purification RSV NS1 monoclonal antibody. Dotted line indicates S/N=2.1.

的蛋白样品有一条清晰的特异性反应带(图 5B), 且空载体转染的 293T 细胞在相同位置无此条带, 与 HA 单抗作为一抗的检测结果相符(图 5C), 说明该单抗可以特异性结合 NS1 蛋白。综合以上结果, 证实获得的 RSV NS1 蛋白的单克隆抗体与真核表达的 NS1 蛋白同样具有良好的反应性。

2.5.2 RSV 感染细胞中 NS1 蛋白的表达与亚细胞定位分析

进一步使用单抗 1B1 4D4 对 RSV 感染 48 h 以及未感染的 A549 细胞进行共聚焦检测, 结果显示, 单抗 1B1 4D4 与 RSV 感染的 A549 细胞来源的蛋白样品有良好的特异性反应, 且在未感染的 A549 细胞中无特异性结合(图 6A)。研究发现, NS1 蛋白在 RSV 感染细胞中主要分布于细胞质中, 少量定位于细胞核。Western blotting 结果显示, NS1 单抗 1B1 4D4 对感染的 A549 细胞来源的蛋白样品检测到一条清晰的特异性反应带(图 6B), 而未感染的 A549 细胞在相同位置无此条带。

2.5.3 NS1 单抗在免疫沉淀方法中的应用

将单抗 1B1 4D4 用于免疫沉淀实验, 用 Protein A+G Agarose 结合 NS1 mAb, 以 NS1 单抗或 Flag 标签单抗作为一抗, 与转染空载质粒的 293T 细胞相比(泳道 1), 过表达 NS1 的 293T 细胞(泳道 2)得到一条明显的特异性条带(图 7A 和图 7B)。

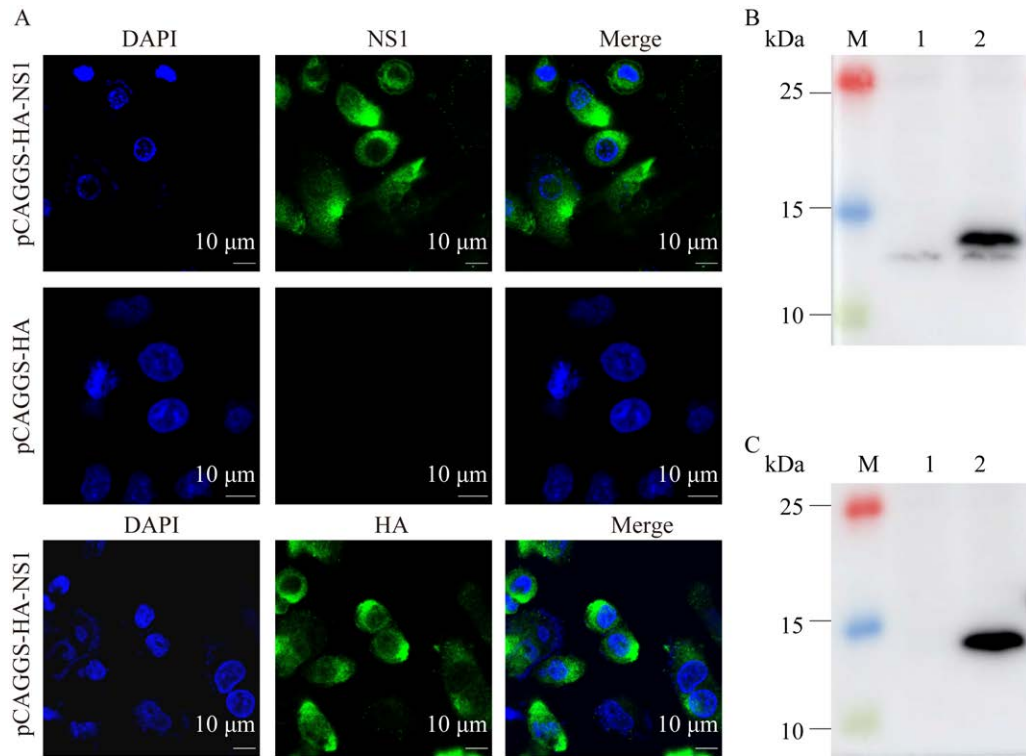


图 5 NS1 蛋白在转染细胞中的表达与亚细胞定位

Figure 5 Expression and subcellular localization of NS1 protein in transfection cells. A: Confocal detection results of NS1 monoclonal antibody 1B1 4D4 binding to eukaryotic expressed NS1 protein. Scale bar: 10 μm . B and C: Western blotting identification of eukaryotic expressed protein NS1 (B: Anti-NS1 monoclonal antibody used as the primary antibody. C: Anti-HA mouse monoclonal antibody used as the primary antibody. M: Protein molecular weight marker; 1: 293T cell lysate transfected with pCAGGS-HA empty plasmid; 2: 293T cell lysate transfected with pCAGGS-HA-NS1 plasmid).

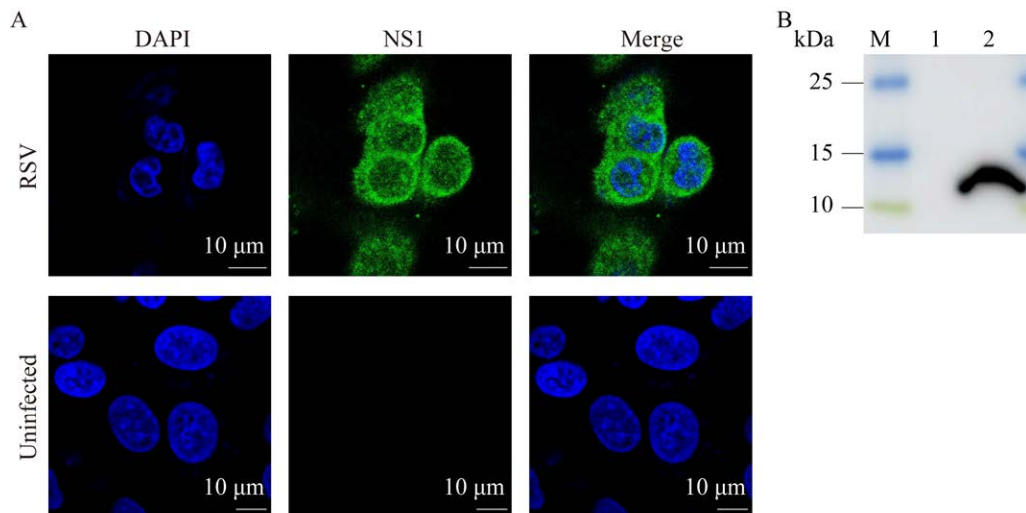


图 6 RSV NS1 蛋白在病毒感染细胞中的表达与亚细胞定位

Figure 6 Expression and subcellular localization of NS1 protein in RSV-infected cells. A: Confocal detection using NS1 mAb for RSV infection. Scale bar: 10 μm . B: NS1 mAb for Western blotting identification of RSV infection. M: Protein molecular weight marker; 1: RSV-uninfected A549 cell lysate; 2: RSV-infected A549 cell lysate.

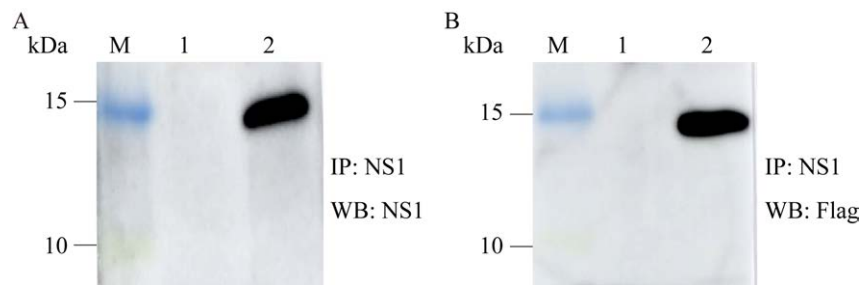


图7 NS1单抗在免疫沉淀方法中的应用

Figure 7 Application of NS1 mAb in immunoprecipitation assay. A: The immunoprecipitation (IP) antibody is a NS1 mAb, and the primary antibody used in Western blotting detection is a NS1 mAb. B: The immunoprecipitation antibody is a NS1 mAb, and the primary antibody used in Western blotting (WB) detection is a Flag mouse monoclonal antibody. M: Protein molecular weight marker; 1: 293T cells transfected with pCAGGS-Flag empty plasmid; 2: 293T cells transfected with pCAGGS-Flag-NS1 plasmid.

结果表明,制得的NS1单克隆抗体1B1 4D4可以用于免疫沉淀实验。

3 讨论与结论

NS1和NS2是RSV的非结构蛋白,虽然不参与成熟病毒粒子的包装,但却是转录最丰富的病毒基因^[16]。通过延缓细胞凋亡和抑制适应性免疫反应,NS蛋白在病毒复制和调节宿主先天免疫中发挥着关键作用。研究表明,NS1和NS2靶向IFN信号通路中的不同分子,在RSV感染过程中协同有效地抑制IFN的产生,从而促进感染,但其拮抗IFN抗病毒反应的调控机制尚未完全确定。与WT RSV感染细胞相比,缺失NS1或NS2,以及同时缺失这两个基因(NS1/NS2),重组毒株诱导的IFN- β mRNA水平显著增加,表明NS1和NS2均抑制IFN信号传导;但NS1缺失株或NS1/NS2缺失株感染诱导的IFN- β 水平平均比NS2缺失株高,预示NS1作为IFN拮抗剂可能比NS2更有效^[17-20]。NS1可能通过在细胞质和细胞核不同空间来抑制宿主天然免疫反应。对于分布在细胞质中的NS1蛋白,通过与线粒体信号蛋白(mitochondrial antiviral-signaling

protein, MAVS)互作,阻断维甲酸诱导基因I(retinoic acid inducible gene I, RIG-I)与MAVS相互作用,从而抑制下游信号的活化和IFN的产生^[21];NS1可靶向于干扰素调节因子(interferon regulatory factor 3, IRF-3),并干扰IRF3与其共激活子CBP的结合,从而阻止IRF3易位进入细胞核和IFN- β 启动子的激活^[22];有研究证明RSV NS1通过促进蛋白酶体降解来降低STAT2水平;此外,RSV NS1还可以促进蛋白酶体依赖的2'-5'寡聚腺苷酸合成酶样蛋白的降解,进一步证实NS1可以抑制细胞抗病毒蛋白来逃避细胞抗病毒先天免疫反应^[22-25]。RSV在细胞质中进行复制,其非结构蛋白除了在细胞质中发挥作用,NS1还定位于细胞核,并发挥调控宿主基因转录的功能。NS1已被证明部分定位于转染的293T和A549细胞的细胞核中^[12,15,18,26-27],这也与本研究的结果一致。NS1同时也定位于病毒感染的原代人气管支气管上皮细胞的细胞核,染色质免疫沉淀结果表明NS1通过与细胞核内的中介体互作,结合在宿主免疫基因转录调节原件上(特别是启动子和增强子),从而抑制干扰素刺激基因的转录^[12],但具体的蛋白互作区域和位点尚

未研究清楚,且 NS1 出入细胞核的分子机制也未得到解析,因此进一步研究 NS1 与核宿主因子的相互作用将有助于更好地了解 RSV 如何调节宿主基因特别是抗病毒免疫基因的转录。

NS 蛋白除了在拮抗宿主天然免疫应答方面表现突出,在病毒复制方面的研究表明,NS 蛋白还会抑制肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)诱导的细胞凋亡,从而促进 RSV 生长^[28]。RSV NS1 也可能通过抑制 miR-24 表达来限制细胞凋亡,从而诱导转录因子 KLF6 的表达以促进转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)介导的细胞周期停滞,进而促进 RSV 复制^[29]。也有研究表明 NS1 蛋白对适应性免疫反应具有独立于 IFN 拮抗剂活性的作用^[6]。进一步探究 NS1 蛋白的功能对于认识病毒复制过程和寻找新的药物靶点均具有重要意义,但目前尚无商品化抗 RSV NS1 单抗,限制了对 NS1 蛋白的功能和调控机制的深入研究。

本研究经原核表达系统成功获得 RSV 非结构蛋白 NS1,成功制备出抗 RSV NS1 单克隆抗体 1B1 4D4,并应用该单抗对转染及 RSV 感染细胞中的 NS1 蛋白表达与细胞定位进行了初步研究。结果表明,该单抗特异性强、反应性好,能很好地识别 NS1 蛋白;同时验证了该单抗可被应用于免疫沉淀方法,为研究 RSV 感染过程中非结构蛋白 NS1 与宿主蛋白互作机制提供有利的工具。此外,可以应用该单抗建立 ELISA 方法,为鉴别诊断和区分疫苗免疫人群和自然感染人群奠定基础。

REFERENCES

- [1] van ROYEN T, ROSSEY I, SEDEYN K, SCHEPENS B, SAELENS X. How RSV proteins join forces to overcome the host innate immune response[J]. *Viruses*, 2022, 14(2): 419.
- [2] SHI T, DENOUEL A, TIETJEN AK, CAMPBELL I, MORAN E, LI X, CAMPBELL H, DEMONT C, NYAWANDA BO, CHU HY, STOSZEK SK, KRISHNAN A, OPENSHAW P, FALSEY AR, NAIR H. Global disease burden estimates of respiratory syncytial virus-associated acute respiratory infection in older adults in 2015: a systematic review and meta-analysis[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2020, 222(supplement 7): S577-S583.
- [3] GALLOUX M, RISSO-BALLESTER J, RICHARD CA, FIX J, RAMEIX-WELTI MA, ELÉOUËT JF. Minimal elements required for the formation of respiratory syncytial virus cytoplasmic inclusion bodies *in vivo* and *in vitro*[J]. *mBio*, 2020, 11(5): e01202-e01220.
- [4] SEDEYN K, SCHEPENS B, SAELENS X. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins 1 and 2: exceptional disrupters of innate immune responses[J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(10): e1007984.
- [5] BECKER Y. Respiratory syncytial virus (RSV) evades the human adaptive immune system by skewing the Th1/Th2 cytokine balance toward increased levels of Th2 cytokines and IgE, markers of allergy—a review[J]. *Virus Genes*, 2006, 33(2): 235-252.
- [6] MUNIR S, HILLYER P, LE NOUËN C, BUCHHOLZ UJ, RABIN RL, COLLINS PL, BUKREYEV A. Respiratory syncytial virus interferon antagonist NS1 protein suppresses and skews the human T lymphocyte response[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(4): e1001336.
- [7] MUNIR S, LE NOUËN C, LUONGO C, BUCHHOLZ UJ, COLLINS PL, BUKREYEV A. Nonstructural proteins 1 and 2 of respiratory syncytial virus suppress maturation of human dendritic cells[J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(17): 8780-8796.
- [8] CHATTERJEE S, LUTHRA P, ESAULOVA E, AGAPOV E, YEN BC, BOREK DM, EDWARDS MR, MITTAL A, JORDAN DS, RAMANAN P, MOORE ML, PAPPU RV, HOLTZMAN MJ, ARTYOMOV MN, BASLER CF, AMARASINGHE GK, LEUNG DW. Structural basis for human respiratory syncytial virus NS1-mediated modulation of host responses[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17101.
- [9] CONCI J, ALVAREZ-PAGGI D, de OLIVEIRA GAP, PAGANI TD, ESPERANTE SA, BORKOSKY SS, ARAN M, ALONSO LG, MOHANA-BORGES R, de PRAT-GAY G. Conformational isomerization involving

- conserved proline residues modulates oligomerization of the NS1 interferon response inhibitor from the syncytial respiratory virus[J]. *Biochemistry*, 2019, 58(26): 2883-2892.
- [10] GHILDYAL R, HO A, DIAS M, SOEGIYONO L, BARDIN PG, TRAN KC, TENG MN, JANS DA. The respiratory syncytial virus matrix protein possesses a Crml-mediated nuclear export mechanism[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(11): 5353-5362.
- [11] LI HM, GHILDYAL R, HU MJ, TRAN KC, STARRS LM, MILLS J, TENG MN, JANS DA. Respiratory syncytial virus matrix protein-chromatin association is key to transcriptional inhibition in infected cells[J]. *Cells*, 2021, 10(10): 2786.
- [12] PEI JJ, BERI NR, ZOU AJ, HUBEL P, DORANDO HK, BERGANT V, ANDREWS RD, PAN JH, ANDREWS JM, SHEEHAN KCF, PICHLMAIR A, AMARASINGHE GK, BRODY SL, PAYTON JE, LEUNG DW. Nuclear-localized human respiratory syncytial virus NS1 protein modulates host gene transcription[J]. *Cell Reports*, 2021, 37(2): 109803.
- [13] DAVEKA, NORRIS EL, BUKREYEV AA, HEADLAM MJ, BUCHHOLZ UJ, SINGH T, COLLINS PL, GORMAN JJ. A comprehensive proteomic view of responses of A549 type II alveolar epithelial cells to human respiratory syncytial virus infection[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2014, 13(12): 3250-3269.
- [14] MARTÍNEZ I, LOMBARDÍA L, GARCÍA-BARRENO B, DOMÍNGUEZ O, MELERO JA. Distinct gene subsets are induced at different time points after human respiratory syncytial virus infection of A549 cells[J]. *Journal of General Virology*, 2007, 88(2): 570-581.
- [15] SWEDAN S, ANDREWS J, MAJUMDAR T, MUSIYENKO A, BARIK S. Multiple functional domains and complexes of the two nonstructural proteins of human respiratory syncytial virus contribute to interferon suppression and cellular location[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(19): 10090-10100.
- [16] FAN PP, LIU Z, ZHENG M, CHEN M, XU YS, ZHAO DC. Respiratory syncytial virus nonstructural protein 1 breaks immune tolerance in mice by downregulating Tregs through TSLP-OX40/OX40L-mTOR axis[J]. *Molecular Immunology*, 2021, 138: 20-30.
- [17] TENG MN, COLLINS PL. Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles[J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(7): 5707-5716.
- [18] SPANN KM, TRAN KC, CHI B, RABIN RL, COLLINS PL. Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected] [J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(8): 4363-4369.
- [19] SPANN KM, TRAN KC, COLLINS PL. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(9): 5353-5362.
- [20] TENG MN, WHITEHEAD SS, BERMINGHAM A, ST CLAIRE M, ELKINS WR, MURPHY BR, COLLINS PL. Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees[J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(19): 9317-9321.
- [21] BAN JS, LEE NR, LEE NJ, LEE JK, QUAN FS, INN KS. Human respiratory syncytial virus NS1 targets TRIM25 to suppress RIG-I ubiquitination and subsequent RIG-I-mediated antiviral signaling[J]. *Viruses*, 2018, 10(12): 716.
- [22] REN JP, LIU TS, PANG L, LI K, GAROFALO RP, CASOLA A, BAO XY. A novel mechanism for the inhibition of interferon regulatory factor-3-dependent gene expression by human respiratory syncytial virus NS1 protein[J]. *The Journal of General Virology*, 2011, 92(Pt 9): 2153-2159.
- [23] DHAR J, CUEVAS RA, GOSWAMI R, ZHU JZ, SARKAR SN, BARIK S. 2'-5'-oligoadenylate synthetase-like protein inhibits respiratory syncytial virus replication and is targeted by the viral nonstructural protein 1[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(19): 10115-10119.
- [24] SWEDAN S, MUSIYENKO A, BARIK S. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins decrease levels of multiple members of the cellular interferon pathways[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(19): 9682-9693.

- [25] ELLIOTT J, LYNCH OT, SUESSMUTH Y, QIAN P, BOYD CR, BURROWS JF, BUICK R, STEVENSON NJ, TOUZELET O, GADINA M, POWER UF, JOHNSTON JA. Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by using the Elongin-Cullin E3 ligase[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(7): 3428-3436.
- [26] WU WN, TRAN KC, TENG MN, HEESOM KJ, MATTHEWS DA, BARR JN, HISCOX JA. The interactome of the human respiratory syncytial virus NS1 protein highlights multiple effects on host cell biology[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(15): 7777-7789.
- [27] MUNDAY DC, EMMOTT E, SURTEES R, LARDEAU CH, WU WN, DOVE BK, BARR JN, HISCOX JA. Quantitative proteomic analysis of A549 cells infected with human respiratory syncytial virus[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2010, 9(11): 2438-2459.
- [28] BITKO V, SHULYAYEVA O, MAZUMDER B, MUSIYENKO A, RAMASWAMY M, LOOK DC, BARIK S. Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(4): 1786-1795.
- [29] BAKRE A, WU WN, HISCOX J, SPANN K, TENG MN, TRIPP RA. Human respiratory syncytial virus non-structural protein NS1 modifies miR-24 expression *via* transforming growth factor-B[J]. *The Journal of General Virology*, 2015, 96(11): 3179-3191.

(本文责编 郝丽芳)