

沈熹涓, 姬晶晶, 金慧琴, 等. 猪流行性腹泻病毒解旋酶 Nsp13 表达纯化及其 RNA 解旋活性鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (1): 33-38.
SHEN X J, JI J J, JIN H Q, et al. Expression and purification of porcine epidemic diarrhea virus helicase Nsp13 and verification of its RNA unwinding activity [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (1): 33-38.

猪流行性腹泻病毒解旋酶 Nsp13 表达纯化及其 RNA 解旋活性鉴定

沈熹涓, 姬晶晶, 金慧琴, 李宇哲, 刘斐, 单衍可*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 旨在可溶性表达并纯化猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 解旋酶 Nsp13, 并验证表达纯化得到的 PEDV Nsp13 蛋白具有 RNA 解旋活性。将 pET28a (+) -PEDV Nsp13 重组质粒转化到大肠杆菌 *Transtetta* (DE3) 感受态细胞中, 利用终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG 在 18 °C 条件下诱导 16 h, 收集诱导后的菌体, 超声破碎并收集其上清液, 通过镍亲和和层析技术获得纯化后的 PEDV Nsp13; 设计 RNA 底物, 并建立体外解旋反应体系, 验证蛋白的 RNA 解旋活性, 并在相同时间内探究不同温度条件下 PEDV Nsp13 蛋白对 RNA 的解旋情况, 进一步验证其活性。结果表明, 在大肠杆菌系统中可溶性表达了 PEDV Nsp13 蛋白, 纯化后蛋白浓度可达 0.9 mg/mL; 通过体外解旋试验, 验证了 PEDV Nsp13 蛋白具有 ATP 依赖的 RNA 解旋酶活性, 并发现 PEDV Nsp13 蛋白的 RNA 解旋酶活性在一定范围内随解旋温度的升高而提高。本研究结果为进一步深入研究 PEDV Nsp13 的 RNA 解旋作用机制奠定了基础。

关键词: PEDV; Nsp13; 可溶性表达; 蛋白纯化; RNA 解旋活性

中图分类号: S852.23 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)01-0033-06

Expression and purification of porcine epidemic diarrhea virus helicase Nsp13 and verification of its RNA unwinding activity

SHEN Xijuan, JI Jingjing, JIN Huiqin, LI Yuzhe, LIU Fei, SHAN Yanke*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The aim of this study was to obtain soluble expressed and purified porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) helicase Nsp13, and the RNA unwinding activity of the purified PEDV Nsp13 was verified. The recombinant plasmid pET28a (+) -PEDV Nsp13 was transformed into *Transtetta* (DE3), and 0.5 mmol/L IPTG was used to induce the cells at 18 °C for 16 h. The induced bacteria were ultrasonically crushed and the supernatant was collected. The purified PEDV Nsp13 was obtained by nickel affinity chromatography. Next, we established an *in vitro* unwinding reaction system to verify the RNA unwinding activity of the protein, and its RNA unwinding activity was further verified by exploring the RNA unwinding activity of PEDV nsp13 under the condition of different temperatures. In summary, PEDV Nsp13 at a concentration of 0.9 mg/mL was solubly expressed and purified in the *E. coli* system, and it was verified that PEDV Nsp13 protein had ATP-dependent RNA helicase activity through *in vitro* unwinding assay. Besides, it was found that the RNA helicase unwinding activity of PEDV Nsp13 increased when the temperature rose within a certain range. This study laid the foundation for further study of the RNA unwinding mechanism of PEDV Nsp13.

Keywords: PEDV; Nsp13; soluble expression; protein purification; RNA unwinding activity

猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的一种急性、高流行性、高死亡率

传染病, 患病猪的主要症状为腹泻、呕吐和脱水, 任何年龄段猪均可感染^[1], 其中 1 周龄以内仔猪受影响最大, 其症状最为严重, 病死率最高^[2]。PED 于 1971 年在英国首次发现, 并在 1982 年被正式命名, 多个国家及我国南方省份均有 PED 大规模暴发的记录, 给国内外的养猪业带来了巨大损失和打击^[3-4]。

PEDV 是一种具有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 属冠状病毒科 α 冠状病毒属^[5], 基因组全长约为 28 kb, 编码 2 个开放阅读框 (ORF) 1a 和 1b, 能够

收稿日期: 2023-03-01; 修回日期: 2023-11-07

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (32000028); 中国博士后基金面上基金项目 (2020M681649); 江苏省博士后科研资助项目 (2020Z120)

第一作者: 沈熹涓, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 单衍可, 博士, 助理研究员, 主要从事单分子生物学技术及动物免疫方面的研究, E-mail: shanyk26@njau.edu.cn.

分别被翻译成多聚蛋白 1a (pp1a) 和多聚蛋白 1b (pp1ab), 并被病毒蛋白酶加工成 16 个非结构蛋白, 共同参与基因组的转录^[6-7]。其中, PEDV Nsp13 是一种属于 1 超家族 (SF1) 的解旋酶, 高度保守, 能够以 NTP 依赖的方式以及 5'→3' 的极性解开双链 DNA 或 RNA, 是重要的抗病毒药物设计潜在靶点^[8]。

病毒的 RNA 解旋酶在其他病毒的研究中已被广泛证实能够在 RNA 合成过程中起到关键作用, 能够参与病毒的复制, 还能够刺激宿主细胞产生抗病毒效应^[9-11], 但 PEDV Nsp13 是否存在以上特点尚待研究。Ren 等^[8]研究证实了 PEDV Nsp13 的 5'→3' 双链 DNA 和 RNA 解旋极性, 且在体外对双链 DNA 的解旋能力高于双链 RNA。然而迄今为止, 针对 PEDV Nsp13 的可溶性表达纯化及其 RNA 解旋活性的研究仍然较少。

本文利用大肠杆菌系统对 PEDV Nsp13 进行可溶性表达, 并利用镍亲和层析技术对该蛋白进行纯化及其条件优化, 得到了 0.9 mg/mL PEDV Nsp13 蛋白, 验证了其具有 RNA 解旋活性, 并比较了相同时间内不同温度条件下的解旋效果, 为进一步深入研究 PEDV Nsp13 的 RNA 解旋作用机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 质粒与菌种

参考 GenBank 提供的 PEDV (JX188454.1) 中 Nsp13 基因序列, 委托通用生物 (安徽) 股份有限公司进行密码子优化、合成及构建。pET28a (+) 载体由本实验室保存。Trans5 α 与 Transetta (DE3) 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。

1.1.2 RNA 单链

参考 Ren 等^[8]与 Shu 等^[12]对 RNA 底物的设计, 并对 RNA 链中存在的能够造成自身互补序列及二硫键序列进行调整。RNA1 序列: 5'-(Cy5) CAUAC-AGUACAGGGAUCACCUCAGUUCGACUAUCGAGUAAUC-3', RNA2 序列: 5'-GAUUACUCGAUAGUCGAA-CU-GAGG-3', trap RNA 序列: 5'-CCUCAGUUCGAC-UAUCGAGUAAUC-3'。上述序列均由南京擎科生物科技有限公司合成。

1.1.3 主要试剂

蛋白 Marker (180 kDa) 与 ECL 化学发光显色液购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自上海源叶生物科技有限公司, BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐变性剂型)、5 \times 蛋白上样缓冲液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RNase 抑制剂、ATP 及脱脂奶粉购自上海碧云

天生物技术有限公司, 鼠抗 His 抗体购自 Proteintech 公司, HRP-羊抗鼠 IgG 购自苏州博奥龙科技有限公司, 硝酸纤维素 (NC) 膜购自 Cytiva 公司, 透析袋 (截留分子量 14 kDa) 购自上海翊圣生物科技有限公司, 二硫苏糖醇 (DTT) 购自北京索莱宝科技有限公司, DEPC 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司, NaCl 与 MgCl₂ 购自国药集团上海有限公司, Spectra™ 多色宽范围蛋白分子量标准购自 Thermo Fisher 公司。

1.1.4 主要仪器

NanoDrop One 超微量分光光度计、生物安全柜、低温摇床及恒温培养箱购自 Thermo Fisher 公司, 高速离心机与涡旋振荡仪购自 Eppendorf 公司, 垂直电泳仪购自 Bio-Rad 公司, 转印仪购自上海天能科技有限公司, 多功能成像仪与 Typhoon 多功能激光扫描仪购自 Cytiva 公司, 扫描仪购自 Epson 公司, 恒温摇床购自 Crystal 公司, 超声波细胞破碎仪购自南京先欧仪器制造有限公司, 多功能酶标仪购自 Tecan 公司, 恒温金属浴购自上海米欧仪表机械制造有限公司, 垂直电泳仪购自北京六一生物技术有限公司。

1.2 PEDV Nsp13 重组表达质粒的鉴定

将 pET28a (+) -PEDV Nsp13 重组质粒转入大肠杆菌 Trans5 α 感受态细胞中, 转化液涂布于卡那霉素抗性的 LB 固体平板上, 37 °C 恒温培养箱培养过夜, 挑取单克隆菌落接种到卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中, 37 °C 摇床培养, 将菌液送至通用生物 (安徽) 股份有限公司测序, 其测序结果与 GenBank 中 PEDV (JX188454.1) 的 Nsp13 序列进行比对。

1.3 PEDV Nsp13 蛋白的可溶性表达

将 pET28a (+) -PEDV Nsp13 重组质粒转入大肠杆菌 Transetta (DE3) 感受态细胞中, 随后将重组菌 Transetta (DE3) /pET28a (+) -PEDV Nsp13 接种于卡那霉素抗性的 LB 液体培养基, 37 °C 200 r/min 振荡培养过夜。次日, 以 1:100 比例转接至 200 mL 卡那霉素抗性 LB 液体培养基中, 37 °C 200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 值达到 0.6~0.8 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 18 °C 诱导 16 h。8 000 r/min 离心 15 min 收集菌体, 用 20 mL 的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液重悬菌体后, 进行超声破碎 (350 W, 工作 3 s, 间歇 6 s), 至菌液澄清。8 000 r/min 离心 15 min, 分别收集上清液与沉淀, 取一半上清液经 0.45 μ m 滤膜过滤。以上样品进行 10% SDS-PAGE 分析蛋白表达情况。

1.4 PEDV Nsp13 蛋白纯化及条件优化

依次使用 ddH₂O 和 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液清洗镍亲和层析柱, 将大量表达的 PEDV Nsp13 蛋白所在上清液自由流穿层析柱。用含 0、10、20、50、

100 mmol/L 咪唑的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液依次洗脱杂蛋白, 再依次用 200、300、500 mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗脱目的蛋白, 并采用 10% SDS-PAGE 分析其纯化效果。

在上述条件未能得到较好纯化效果的前提下, 对镍亲和层析纯化上样速度进行优化。清洗层析柱后, 将上清液流穿层析柱的速度由自由流穿降至 1 min/mL, 再用含 0、10、20、50、100 mmol/L 咪唑的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液依次洗脱杂蛋白, 最后, 依次用 200、300、500 mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗脱目的蛋白, 采用 10% SDS-PAGE 分析其纯化效果。

1.5 蛋白样品的透析

剪取适当长度的透析袋(截留分子量为 14 kDa), 煮沸冷却后加入纯化的目的蛋白, 将透析袋置于 500 mL 不含咪唑的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中, 置于磁力搅拌器上, 4 °C 下低速旋转透析过夜。

1.6 蛋白浓度测定

将纯化透析后的蛋白样品, 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 在 562 nm 波长下进行可见光吸收光谱测定, 根据各浓度标准品吸光度绘制标准曲线, 计算蛋白样品浓度。

1.7 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定

将诱导后 Transetta (DE3) /pET28a (+) 和纯化透析后的蛋白样品经 10% SDS-PAGE 分离, 经考马斯亮蓝染色及脱色后进行成像。将上述样品经 10% SDS-PAGE 分离并转印至 NC 膜, 随后用 5% 脱脂奶于 37 °C 封闭 1 h; PBST 洗涤 5 次, 鼠源 His 抗体 (1:20 000 稀释) 4 °C 孵育过夜; PBST 洗涤 5 次, HRP-羊抗鼠 IgG (1:10 000 稀释) 室温孵育 1 h; PBST 洗涤 5 次, 最后, 使用 ECL 化学发光显色液进行显色, 使用多功能成像仪成像, 从而验证 PEDV Nsp13 的正确表达和纯化。

1.8 RNA 底物的设计与制备

设计 1 对单链 RNA 序列 (RNA1/RNA2), 构建体外 RNA 退火体系: 10 mmol/L Tris, 20 mmol/L NaCl, pH=7.5。RNA1 与 RNA2 在此体系中经金属浴 95 °C 孵育 5 min 后冷却至室温, RNA1 部分序列可以和 RNA2 全部序列退火为双链, 形成具有 5'-overhang 结构的双链 RNA, Cy5 为荧光分子。

为避免解开的双链 RNA (RNA1/RNA2) 自动退火为双链, 本研究设计 1 段 trap RNA 序列, 该序列与 RNA2 序列反向互补, 可与荧光标记的 RNA1 竞争结合 RNA2 序列。

1.9 PEDV Nsp13 解旋活性鉴定

构建体外解旋反应体系 (10 μ L): 30 mmol/L

Tris (pH=7.5), 0.1 mg/mL BSA, 1% 甘油, 3 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L DTT, 4 U/ μ L RNase 抑制剂, 4 nmol/L dsRNA, 8 nmol/L trap RNA, 3 mmol/L ATP, 60 nmol/L PEDV Nsp13。将上述液体混合后置于 16 °C 反应 10 min, 与等体积的 2 \times 终止缓冲液 (50 mmol/L EDTA·Na₂·2H₂O、1% SDS、10% 甘油) 混合后置于冰上, 经 10% 非变性 PAGE 电泳 3 h 后, 用 Typhoon 多功能激光扫描仪成像分析。

1.10 温度对解旋活性的影响

根据 1.9 节构建体外解螺旋反应体系, 将上述液体混合后分别置于 16、25 和 37 °C 反应 10 min, 与等体积的 2 \times 终止缓冲液混合后置于冰上, 经 10% 非变性 PAGE 分析 3 h 后, 用 Typhoon 多功能激光扫描仪成像分析, 并利用 Image J 软件对解旋幅度进行定量分析, 利用 GraphPad 软件绘图。

2 结果

2.1 PEDV Nsp13 可溶性表达效果

经生物公司测序, 测序结果与 GenBank 中 PEDV (JX188454.1) 的 Nsp13 序列进行比对, 其氨基酸序列完全一致, 表明重组质粒 pET28a (+)-PEDV Nsp13 构建成功。

通过 10% SDS-PAGE 验证蛋白表达情况, 结果显示, 含 pET28a (+)-PEDV Nsp13 重组质粒的大肠杆菌 Transetta (DE3) 通过 IPTG 诱导在 70 kDa 处有明显条带, 大小与目的蛋白基本一致, 且上清液中目的条带较为明显, 而未经诱导的重组菌液在此处无明显条带 (图 1)。表明在该诱导表达条件下, PEDV Nsp13 成功表达且可溶性表达效果较好。

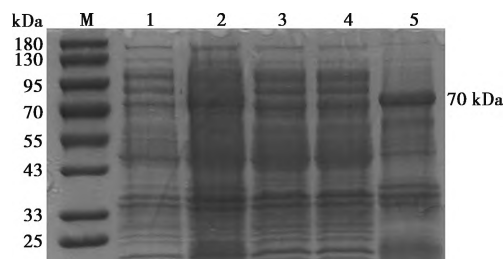


图 1 pET28a (+)-PEDV Nsp13 重组质粒的表达
M. 蛋白标准品; 1. 诱导前 Transetta (DE3) 菌体; 2. 诱导后 Transetta (DE3) 菌体; 3. 诱导后 Transetta (DE3) 上清液 (过滤前); 4. 诱导后 Transetta (DE3) 上清液 (过滤后); 5. 诱导后 Transetta (DE3) 沉淀。

图 1 pET28a (+)-PEDV Nsp13 重组质粒的表达

2.2 PEDV Nsp13 镍亲和层析纯化及条件优化

对上清液中大量表达的 PEDV Nsp13 蛋白进行镍亲和层析纯化。10% SDS-PAGE 结果显示, 经纯化

后目的蛋白条带过浅，目的蛋白浓度过低（图 2），纯化仍需进一步优化。

10% SDS-PAGE 结果显示，上样速度优化至 1 min/mL，纯化后在 70 kDa 附近有明显单一条带，且

杂带较少（图 3）。这一方案延长了目的蛋白 His 标签与镍亲和层析柱的结合时间，有效增强了目的蛋白 His 标签与镍离子的结合效果，从而在洗脱液中得到浓度更高的目的蛋白。

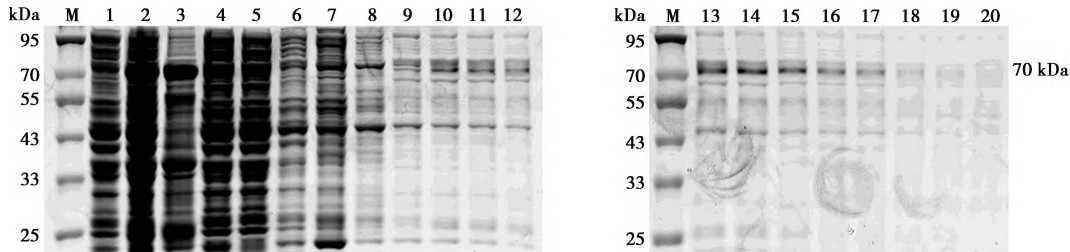


图 2 PEDV Nsp13 镍亲和层析纯化结果（上清液自由流穿）
M. 蛋白标准品；1. 诱导前 Transetta (DE3) 菌体；2. 诱导后 Transetta (DE3) 菌体；3. 诱导后 Transetta (DE3) 沉淀；4. 诱导后 Transetta (DE3) 上清液；5. 蛋白上样流穿液；6~9. 咪唑洗脱液浓度分别为 0、10、20 和 50 mmol/L；10~13. 咪唑洗脱液浓度均为 100 mmol/L；14~16. 咪唑洗脱液浓度均为 200 mmol/L；17~19. 咪唑洗脱液浓度均为 300 mmol/L；20. 咪唑洗脱液浓度为 500 mmol/L。

图 2 PEDV Nsp13 镍亲和层析纯化结果（上清液自由流穿）

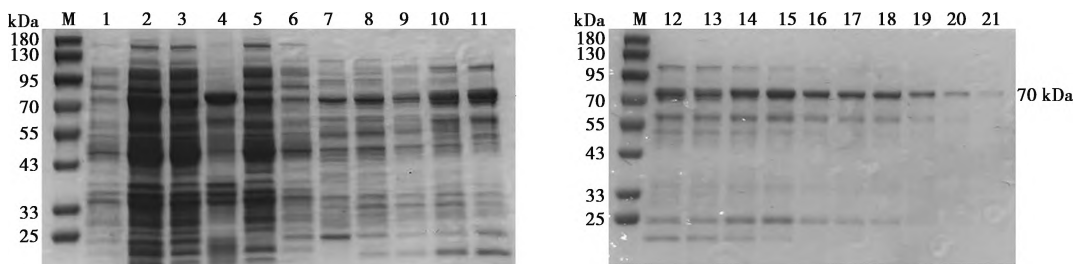


图 3 PEDV Nsp13 镍亲和层析纯化结果（上清液流速为 1 mL/min）
M. 蛋白标准品；1. 诱导前 Transetta (DE3) 菌体；2. 诱导后 Transetta (DE3) 菌体；3. 诱导后 Transetta (DE3) 上清液；4. 诱导后 Transetta (DE3) 沉淀；5. 蛋白上样流穿液；6~8. 咪唑洗脱液浓度分别为 0、10 和 20 mmol/L；9~10. 咪唑洗脱液浓度均为 50 mmol/L；11~12. 咪唑洗脱液浓度均为 100 mmol/L；13~16. 咪唑洗脱液浓度均为 200 mmol/L；17~20. 咪唑洗脱液浓度均为 300 mmol/L；21. 咪唑洗脱液浓度为 500 mmol/L。

图 3 PEDV Nsp13 镍亲和层析纯化结果（上清液流速为 1 mL/min）

2.3 PEDV Nsp13 纯化鉴定及浓度测定

将纯化得到的 PEDV Nsp13 蛋白进行透析，从而去除绝大部分的咪唑，以避免咪唑残留对后续解旋试验的影响。将透析后得到的蛋白样品，利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行浓度测定，测定纯化后的 PEDV Nsp13 蛋白浓度为 0.9 mg/mL。对透析后收集到的蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定，结果显示，在 70 kDa 附近有一明显的特异性条带（图 4），表明通过前期试验，准确得到了可溶性表达的 PEDV Nsp13 蛋白。

综上，通过在大肠杆菌系统中的可溶性表达及纯化条件的优化，得到了较高纯度的 PEDV Nsp13 蛋白，浓度为 0.9 mg/mL。

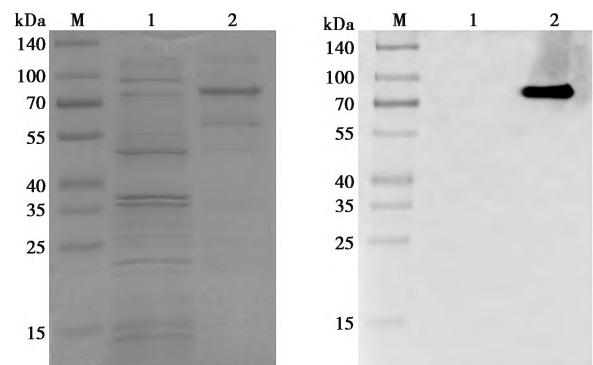
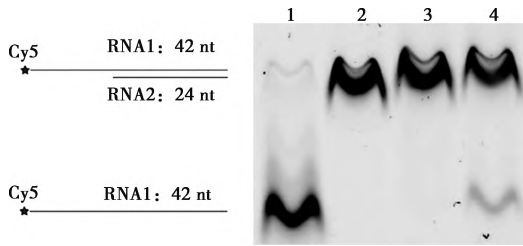


图 4 PEDV Nsp13 蛋白 SDS-PAGE (A) 和 Western blot 鉴定 (B)（各泳道蛋白上样量 8.56 μg）
M. 蛋白标准品；1. 诱导后 Transetta (DE3) /pET28a (+)；2. 纯化后的 PEDV Nsp13。

图 4 PEDV Nsp13 蛋白 SDS-PAGE (A) 和 Western blot 鉴定 (B)（各泳道蛋白上样量 8.56 μg）

2.4 PEDV Nsp13 RNA 解旋活性的鉴定

对表达纯化并透析后的 PEDV Nsp13 蛋白进行解旋活性鉴定。经 95 °C 处理后的双链 RNA 会变性为单链 RNA，只有 ATP 或只有 PEDV Nsp13 的体系不能产生单链条带。结果显示，同时具有 ATP 和 PEDV Nsp13 的体系在 16 °C 孵育 10 min 的条件下能够产生单链条带（图 5），表明本研究可溶性表达纯化得到的 PEDV Nsp13 具有 ATP 依赖的 RNA 解旋活性。

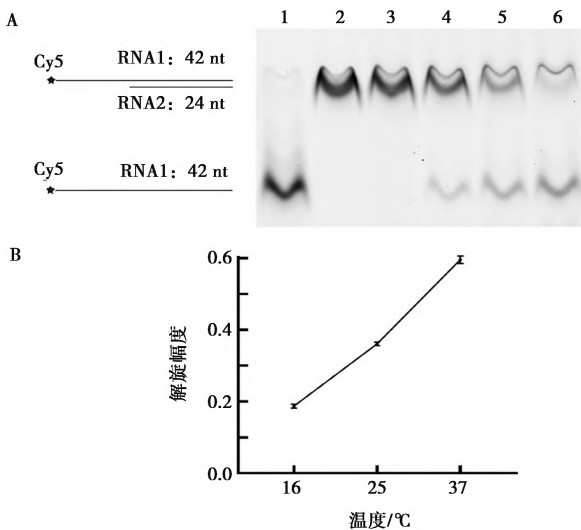


1. 95 °C 处理对照；2. 有 ATP 无 PEDV Nsp13 对照；3. 有 PEDV Nsp13 无 ATP 对照；4. 有 ATP 有 PEDV Nsp13；黑色线段表示 RNA 链；五角星代表 Cy5。

图 5 PEDV RNA 解旋活性验证

2.5 温度对 RNA 解旋效果的影响

本研究设计了不同温度条件下对 PEDV Nsp13 解旋效果的探究。使用 Image J 软件分别对解旋幅度进行分析，结果显示，在相同时间条件下，一定范围内的温度升高能够提升 PEDV Nsp13 的解旋幅度（图 6）。



A. 非变性 PAGE 结果，其中泳道 1 为 95 °C 处理对照，2 为有 ATP 无 PEDV Nsp13 对照，3 为有 PEDV Nsp13 无 ATP 对照，4 为有 ATP 有 PEDV Nsp13 (16 °C)，5 为有 ATP 有 PEDV Nsp13 (25 °C)，6 为有 ATP 有 PEDV Nsp13 (37 °C)，黑色线段表示 RNA 链，五角星代表 Cy5；B. 解旋幅度趋势图。

图 6 不同温度下 PEDV Nsp13 RNA 解旋效果比较

3 讨论

3.1 PEDV Nsp13 可溶性表达与纯化分析

本文利用大肠杆菌表达系统对 PEDV Nsp13 进行可溶性表达。大肠杆菌表达系统具有周期短、成本低、操作简便、表达量高等优点，是蛋白表达最常用的方法之一^[13-14]。重组蛋白在大肠杆菌中表达时经常发生蛋白聚集，形成不可溶的、无活性的包涵体^[15]，在纯化过程中需要变性才能溶解，溶解后又需复性才能恢复蛋白质结构^[16]，因此包涵体蛋白通常不具备蛋白质的天然结构和完整的生物功能。而 PEDV Nsp13 蛋白作为一种解旋酶，在上清液中的可溶性表达能够使其在表达过程中避免形成错误的空间三维结构，从而避免了对解旋酶活性的影响。

镍亲和层析技术作为一种常用的蛋白纯化技术，其原理是填料中镍离子与目的蛋白中的 His 标签存在特异性相互作用，当二者结合后，再利用咪唑与目的蛋白中的 His 标签竞争镍离子，从而使目的蛋白被洗脱。而在实际操作中，由于杂蛋白与填料中的镍离子存在一定的非特异性结合，其结合效果往往低于目的蛋白 His 标签与镍离子的特异性结合，因此常采用咪唑梯度洗脱的方式，使目的蛋白与杂蛋白在不同浓度的咪唑中被洗脱，从而实现目的蛋白与杂蛋白的分离。本研究在镍亲和层析纯化环节，首先将目的蛋白所在上清液在重力作用下自由流穿镍亲和层析柱，并从低浓度到高浓度进行咪唑浓度梯度洗脱，最终在洗脱液中得到的目的蛋白条带较浅；通过对上清液流速的优化，最终在流速 1 mL/min 的方案下，在洗脱液中得到了更大浓度的目的蛋白。该上样流速既能够避免目的蛋白与镍离子结合时间过短，造成目的蛋白的损失，也能够避免结合时间过长，造成杂蛋白非特异性结合效果增强，纯化后蛋白样品中杂蛋白浓度过大。

本研究通过大肠杆菌表达系统和镍亲和层析技术，经过 10% SDS-PAGE、Western blot 及浓度测定，验证了该可溶性表达纯化方案能够得到 0.9 mg/mL 较高纯度 PEDV Nsp13 蛋白，以便开展后续试验。

3.2 PEDV Nsp13 解旋活性分析

本研究中设计了 1 组单链 RNA 底物，使用 Cy5 荧光分子标记其中 1 条 RNA 单链，退火后能够形成 5'-overhang 结构，通过 10% 非变性 PAGE 分离单链 RNA 与双链 RNA，并利用 Typhoon 多功能激光扫描仪采集信号并成像。由于荧光标记单链 RNA 与退火形成的带有荧光标记的双链 RNA 的相对分子质量不同，在相同时间内具有不同的迁移距离，可以直观展现单双链 RNA 的位置，并结合数据分析，能够计算

其退火或解旋的幅度。由于在试验过程中存在双链 RNA 解旋后重新自动退火的情况,对试验数据造成较大影响,因此本研究设计了 1 条无荧光标记的 trap RNA,能够竞争结合无荧光标记的 RNA2^[17],且不影响荧光单链的成像结果。

利用本研究可溶性表达纯化的 PEDV Nsp13 蛋白,结合 1 组 RNA 底物的设计及 1 套体外解旋反应体系的建立,发现 PEDV Nsp13 蛋白能够解旋本研究设计并退火的 5'-overhang RNA 底物,验证了本研究表达纯化的 PEDV Nsp13 蛋白具有 RNA 解旋活性,并且验证了 PEDV Nsp13 的 5'→3'的 RNA 解旋极性,与 Ren 等^[8]研究结果一致。

此外,本研究还对 PEDV Nsp13 蛋白与双链 RNA 底物解旋在 16、25 和 37 °C 温度下解旋情况进行了探究。结果表明,在 10 min 反应时间内, PEDV Nsp13 的 RNA 解旋活性随温度的升高而升高,进一步验证了本研究表达纯化得到的 PEDV Nsp13 的 RNA 解旋活性。由于 PEDV Nsp13 是一种解旋酶,而酶类通常在其最适温度下具有最佳的酶活性,因此可以推测, PEDV 解旋酶 Nsp13 在 RNA 解旋过程中的反应温度越接近其最适温度,相同时间内的解旋幅度越大。从微观角度考虑,温度的升高使得反应物分子热运动加快,提高了单位时间的有效碰撞次数,并且能够增加反应物中活化分子数,使得解旋进程加快,从另一个角度解释了在相同时间内解旋幅度提高的原因。

4 结论

本研究利用大肠杆菌表达系统可溶性表达并纯化得到了浓度为 0.9 mg/mL 的较高纯度 PEDV Nsp13 蛋白,并通过 1 组 RNA 底物的设计以及 1 套体外解旋反应体系的建立,验证了表达纯化得到的 PEDV Nsp13 蛋白的 RNA 解旋酶活性,在此基础上,通过对相同时间内 16、25 和 37 °C 温度条件下 RNA 解旋效果的比较,发现 PEDV Nsp13 蛋白 RNA 解旋酶活性在一定范围内随解旋温度的升高而提高。

参考文献:

[1] SONG D, MOON H, KANG B. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines [J]. Clin Exp Vaccine Res, 2015, 4 (2): 166-176.

[2] 陈芳洲. 猪流行性腹泻病毒的感染和分子特征及下一代测序技术在挖掘新病原的应用研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.

[3] STEVENSON G W, HOANG H, SCHWARTZ K J, et al. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences [J]. J Vet Diagn Invest, 2013, 25 (5): 649-654.

[4] LUO Y, ZHANG J, DENG X, et al. Complete genome sequence of a highly prevalent isolate of porcine epidemic diarrhea virus in South China [J]. J Virol, 2012, 86 (17): 9551.

[5] CAVANAGH D. Nidovirales: a new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae* [J]. Arch Virol, 1997, 142 (3): 629-633.

[6] KOCHERHANS R, BRIDGEN A, ACKERMANN M, et al. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence [J]. Virus Genes, 2001, 23 (2): 137-144.

[7] VLASOVA A N, MARTHALER D, WANG Q, et al. Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014 [J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20 (10): 1620-1628.

[8] REN J, DING Z, FANG P, et al. ATPase and helicase activities of porcine epidemic diarrhea virus nsp13 [J]. Vet Microbiol, 2021, 257: 109074.

[9] FRICK D N. The hepatitis C virus NS3 protein: a model RNA helicase and potential drug target [J]. Curr Issues Mol Biol, 2007, 9 (1): 1-20.

[10] WILKINS C, GALE M Jr. Recognition of viruses by cytoplasmic sensors [J]. Curr Opin Immunol, 2010, 22 (1): 41-47.

[11] KWONG A D, RAO B G, JEANG K T. Viral and cellular RNA helicases as antiviral targets [J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4 (10): 845-853.

[12] SHU T, HUANG M, WU D, et al. SARS-Coronavirus-2 Nsp13 possesses NTPase and RNA helicase activities that can be inhibited by bismuth salts [J]. Virologica Sinica, 2020, 35: 321-329.

[13] HAYAT S M G, FARAHANI N, GOLICHENARI B, et al. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): what we need to know [J]. Curr Pharm Des, 2018, 24 (6): 718-725.

[14] 肖航, 王换换, 王凯, 等. 猪血管紧张素转化酶 2 重组蛋白诱导表达和纯化条件的优化 [J]. 南京农业大学学报, 2019, 42 (2): 316-321.

[15] 高云鹏, 赵雨, 王思明, 等. 人参 Cu/Zn SOD 原核可溶性表达条件的优化 [J]. 长春中医药大学学报, 2018, 34 (4): 669-672.

[16] 杨杰, 韩勇, 高花, 等. 大肠杆菌表达 SLA-3 蛋白与口蹄疫病毒多肽的复性研究 [J]. 微生物学通报, 2017, 44 (2): 394-401.

[17] PUTNAM A, JANKOWSKY E. Analysis of duplex unwinding by RNA helicases using stopped-flow fluorescence spectroscopy [J]. Methods Enzymol, 2012, 511: 1-27.