

DOI:10.13350/j.cjpb.220402

• 论著 •

# 小反刍兽疫病毒西藏株血凝素蛋白和融合蛋白兔多克隆抗体的制备与初步应用\*

王浩杰<sup>1</sup>, 毕津豪<sup>2</sup>, 冯娜<sup>2</sup>, 赵永坤<sup>2</sup>, 王玮琦<sup>2</sup>, 王铁成<sup>2</sup>, 李月涛<sup>1\*\*</sup>, 闫飞虎<sup>2\*\*</sup>, 杨松涛<sup>2</sup>, 夏成柱<sup>2</sup>

(1. 河南科技学院动物科技学院, 河南新乡 453003; 2. 中国农业科学院长春兽医研究所)

**【摘要】** **目的** 对小反刍兽疫病毒(Peste des petits ruminants Virus, PPRV)强毒株 China/Tibet/Geg/07-30 血凝素蛋白 H 和融合蛋白 F 的主要抗原表位区进行原核表达, 并制备兔抗 PPRV H 和 F 蛋白多克隆抗体。 **方法** 根据 GenBank 上公布的 PPRV China/Tibet/Geg/07-30 (GenBank FJ905304.1) 株 H 和 F 蛋白的基因序列构建重组质粒 pET30a(+)-H 和 PGEX-4T-1-F, 并将重组质粒转化至宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 感受态, IPTG 诱导表达目的蛋白, 经亲和层析纯化后与弗氏佐剂混合免疫新西兰大白兔, 收集血清, 制备多克隆抗体, 利用间接免疫荧光(IFA)方法和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测抗体与抗原的结合能力。 **结果** 分别对重组质粒进行酶切, pET30a(+)-H 切出约 1 653 bp 的 PPRV H 基因, PGEX-4T-1-F 切出约为 1 245 bp 的 PPRV F 基因, 与预期一致。经 IPTG 诱导后重组蛋白以包涵体的形式表达, Western blot 检测原核表达的两个目的蛋白均能与标签抗体发生反应, ELISA 检测原核蛋白抗原能与相应多克隆抗体相结合, 间接免疫荧光试验显示兔多克隆抗体能够识别表达 PPRV H 蛋白的重组狂犬病病毒(rSRV9-H)和表达 PPRV F 蛋白的重组狂犬病病毒(rSRV9-F)。 **结论** 利用原核表达系统成功表达出具有抗原性的 PPRV China/Tibet/Geg/07-30 株 F 和 H 蛋白, 并制备了高特异的兔多克隆抗体, 为建立针对 PPRV H、F 蛋白抗原的鉴定及亚单位疫苗的研究奠定了基础。

**【关键词】** 小反刍兽疫; 小反刍兽疫病毒; 血凝素蛋白; 融合蛋白; 多克隆抗体

**【中图分类号】** R373

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)04-0380-08

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Apr;17(4):380-387.]

## Preparation and preliminary application of rabbit polyclonal antibody against hemagglutinin protein and fusion protein of Tibet strain of Peste des ruminants virus

WANG Hao-jie<sup>1</sup>, BI Jin-hao<sup>2</sup>, FENG Na<sup>2</sup>, ZHAO Yong-kun<sup>2</sup>, WANG Wei-qi<sup>2</sup>, WANG Tie-cheng<sup>2</sup>, LI Yue-tao<sup>1</sup>, YAN Fei-hu<sup>2</sup>, YANG Song-tao<sup>2</sup>, XIA Xian-zhu<sup>2</sup> (1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, Henan, China; 2. Changchun Institute of Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Sciences) \*\*

**【Abstract】** **Objective** Expression of the main epitopes of hemagglutinin protein H and fusion protein F of Peste des petits ruminants Virus (PPRV) virulent strain China/Tibet/Geg/07-30 in prokaryotic, and preparation of rabbit anti-PPRV Polyclonal antibodies to H and F proteins. **Methods** According to the gene sequences of the H and F proteins of the PPRV China/Tibet/Geg/07-30 (GenBank FJ905304.1) strain published on GenBank, the recombinant plasmids pET30a(+)-H and PGEX-4T-1-F were constructed and recombined. Transform the recombinant plasmid into competent *E. coli* BL21 (DE3) cells. Affinity chromatography was used to purify the target protein, which was then combined with Freund's adjuvant and used to immunize New Zealand rabbits in order to collect serum for the preparation of polyclonal antibodies. To detect the binding ability of antibodies and antigens, use the indirect immunofluorescence (IFA) method and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Separate digestions were performed on the recombinant plasmids. Consistent with expectations, the pET30a(+)-H recombinant plasmid successfully digested the PPRV H gene of about 1 653 bp, and the PGEX-4T-1-F recombinant plasmid successfully digested the PPRV F gene of about 1 245 bp. After IPTG induction, the recombinant protein was produced as inclusion bodies. Western blot results show that the two target proteins expressed in prokaryotic cells can react with the tag antibody; the binding ability of prokaryotic protein antigen and polyclonal antibody is detected by ELISA method, and the results show that prokaryotic protein and polyclonal antibody have good binding ability; The results of immunofluorescence showed that the rabbit polyclonal antibody can rec-

\* **【基金项目】** 山东省家禽疫病诊断与免疫重点实验室开放课题基金项目(No. SDPDI201804)。

\*\* **【通讯作者】** 李月涛, E-mail: 33992074@qq.com; 闫飞虎, E-mail: yanfh1990@163.com

**【作者简介】** 王浩杰(1995-), 男, 河南鹤壁人, 在读硕士, 主要从事分子病毒学方面的研究。E-mail: hjwang2019@163.com

ognize the recombinant rabies virus which expressing PPRV H protein (rSRV9-H) and F protein (rSRV9-F). The above results show that the recombinant protein was successfully expressed in the prokaryotic expression system, and have good reactogenicity and immunogenicity. **Conclusion** The prokaryotic expression system was used to express PPRV China/Tibet/Geg/07-30 strain F and H proteins successfully, and to prepare rabbit polyclonal antibodies, which laid the foundation for the establishment of the identification of PPRV H and F protein antigens and the development of subunit vaccines.

**【Key words】** Peste des petits ruminants; Peste des petits ruminants virus; F protein; H protein; Polyclonal antibody

小反刍兽疫(Peste des petits ruminants, PPR)俗称羊瘟,是由小反刍兽疫病毒(Peste des petits ruminants virus, PPRV)引起的一种急性烈性动物传染病,可在绵羊、山羊以及多种野生小型反刍类动物中高度传播并造成严重的急性感染<sup>[1]</sup>。PPR的发病率和病死率分别高达100%和90%<sup>[2-3]</sup>。该病于1942年在西非象牙海岸首次发现,2007年我国首次报告PPR,病死率为50.3%<sup>[4]</sup>。2013年新疆伊犁再次发生PPR疫情,病死率为16.42%<sup>[5]</sup>。2014年开始PPR在我国出现大面积爆发,持续波及新疆、内蒙、山东等20省市和地区<sup>[6]</sup>。近年来,PPR疫情在我国仍时有发生,在山羊、绵羊等家畜中的爆发对养羊业造成了巨大的经济损失。在野生偶蹄类动物中,该病的爆发造成较高病死率,严重威胁野生动物种群和生态系统的稳定性。2018年2月,青海高原地区海北州刚察县伊克乌兰乡瓦彦山地区发现19只野生岩羊因感染PPRV而死亡,另有7只岩羊因感染表现出体态虚弱、觅食困难、长卧不起、腹泻等症状<sup>[7]</sup>。2021年1-3月,西藏和青海同时报道野生岩羊发生PPR,累计造成92只野生岩羊死亡<sup>[8]</sup>。

PPRV是副粘病毒科,麻疹病毒属的成员之一<sup>[9]</sup>。目前该属总共有7个成员:小反刍兽疫病毒(Peste des petits ruminants virus, PPRV)、麻疹病毒(Measles virus, MeV)、牛瘟病毒(Rinderpest virus, RPV)、犬瘟热病毒(Canine distemper virus, CDV)、猫麻疹病毒(Feline morbillivirus, FmPV)、海豹瘟热病毒(Phocine distemper virus, PDV)和鲸麻疹病毒(Cetacean morbillivirus, CMV)<sup>[10]</sup>。PPRV病毒基因组为不分节段单股负链RNA病毒,基因组序列长度为15 948 bp,从3'端至5'端依次排列为N-P-M-F-H-L,分别编码6种结构蛋白和2种非结构蛋白,分别为核衣壳蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素蛋白(H)、大蛋白(L)和非结构蛋白(C和V)<sup>[11]</sup>。

PPRV含有H和F两种囊膜糖蛋白,均与病毒感染有关,介导病毒粒子与宿主细胞受体结合及病毒粒子与宿主细胞的膜融合<sup>[12]</sup>。病毒依靠H蛋白与宿主细胞受体结合,F蛋白介导病毒的融合从而使病毒的核酸释放到细胞质中,子代病毒通过出芽的方式从细

胞内释放出来,并在出芽过程中获得囊膜<sup>[13]</sup>。F蛋白属于I型糖蛋白,由546个氨基酸组成,分子质量约59 ku,其编码基因的开放阅读框(open reading frame, ORF)为1 640 bp。F蛋白以纤突的形式展示在病毒粒子囊膜的表面,且比较保守,是目前PPRV不同毒株谱系分类的重要依据,其保守性也是麻疹病毒属各病毒成员之间产生交叉保护作用的重要原因<sup>[14]</sup>。F蛋白诱导细胞产生细胞溶血素,与H蛋白共同启动病毒感染细胞,诱发机体产生保护性免疫应答<sup>[15]</sup>,因此F蛋白是研究PPRV免疫应答机制的重要靶标蛋白之一<sup>[16]</sup>。H蛋白也是病毒表面纤突的主要成分,且该蛋白极不保守,属于II型糖蛋白,由609个氨基酸组成,分子质量约68 ku,其编码基因ORF为1 830 bp<sup>[15]</sup>。H糖蛋白负责与宿主细胞受体结合。H蛋白通过与相关受体结合导致构象改变,最终促进F蛋白产生膜融合反应完成病毒入侵细胞的过程<sup>[17]</sup>。H蛋白是麻疹病毒属重要的抗原决定蛋白,诱导体液保护性免疫应答反应,刺激机体产生中和抗体,参与体液免疫反应<sup>[18]</sup>。虽然F蛋白和H蛋白都是保护性宿主免疫反应的有效诱导剂,但H蛋白比F蛋白免疫原性更强<sup>[19]</sup>,是PPRV疫苗研发的首选靶标蛋白。

本研究拟分别构建表达PPRV西藏株H蛋白的重组表达载体pET-30a(+)-H和表达F蛋白的PGEX-4T-1-F,转化大肠埃希菌后诱导表达PPRV H和F重组蛋白,经亲和层析纯化、透析和浓缩后免疫新西兰大白兔,制备兔抗PPRV H蛋白和PPRV F蛋白多克隆抗体,为建立针对PPRV H蛋白ELISA抗原检测方法和鉴定表达H蛋白和F蛋白的重组狂犬病毒奠定基础,也为PPRV新型亚单位疫苗的研制提供参考。

## 材料与方法

### 1 材料

**1.1 载体、菌株、病毒、细胞** 原核表达载体PGEX-4T-1和pET30a(+),*E. coli* BL21(DE3)感受态,*E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞表达小反刍兽疫病毒F和H蛋白的重组病毒rSRV9-F和rSRV9-H,仓鼠肾细胞(BSR细胞),均由中国农业科学院长春兽医研究所动物病毒学与特种动物疫病学实验室制备和保存;

PPRV 强毒株 China/Tibet/Geg/07-30 (GenBank FJ905304.1) 血凝素蛋白 H 和融合蛋白 F 基因由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

**1.2 主要试剂和仪器** 抗 Gst 标签鼠单克隆抗体 (Anti GST-Tag Mouse Monoclonal Antibody) 和质粒快速提取试剂盒购自康为世纪公司; 限制性内切酶 BamH I、Xho I、Hind III 和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自美国 Thermo 公司; T4DNA 连接酶购自美国 NEB 公司; AMV Reverse Transcriptase 和 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System 购自美国 Promega 公司; 异丙基 2-β-D 硫代半乳糖苷 (IPTG), 卡那霉素, 氨苄青霉素, TMB 显色液, 脱脂奶粉和牛血清白蛋白购自北京索莱宝科技有限公司; His 标签鼠单克隆抗体和 Gst 标签蛋白纯化试剂盒购自上海碧云天生物有限公司; PrimerSTAR Max DNA Polymerase 购自大连宝生物技术公司产品; Trans8K DNA Marker、Trans2K DNA Marker 和 His 标签镍离子蛋白纯化柱 (ProteinIso® Ni-NTA Resin) 购自北京全式金公司; FITC 标记羊抗兔 IgG 和 HRP 标记羊抗兔 IgG 购自美国 Bioworld 公司。Costar96 孔板购自美国 Corning Incorporated 公司; MultiSkan 酶标仪, 分光光度计和高速离心机购自美国 Thermo 公司; 恒温摇床购自北京东联哈尔仪器制造有限公司; 超声波细胞破碎仪购自宁波新芝生物科技股份有限公司; 核酸电泳仪和蛋白电泳仪购自美国 Bioworld 公司; 曝光仪购自上海天能科技有限公司。

**1.3 实验动物** 雌性新西兰大白兔 (体重 4~5 kg) 购自辽宁长生生物技术股份有限公司。

## 2 方法

**2.1 引物设计与合成** 参考 PPRV 强毒株 China/Tibet/Geg/07-30 (GenBank FJ905304.1) 基因序列, 利用 Primer Premier 6.0 软件设计扩增 H 蛋白胞外区编码基因引物, 预期扩增产物 1 653 bp。PPRV HF: 5'-ATAGGATCCAGGCTTCACCGAGCCACCGTT-3' (下划线部分为 BamHI 酶切位点); PPRV HR: 5'-CCGAAGCTTGACTGGATTACATGTTACCTC-3' (下划线部分为 HindIII 酶切位点)。参考 F 基因全序列, 利用 Primer Premier 6.0 软件设计引物, 并分别在引物的 5' 端添加 BamHI 和 XhoI 酶切位点。PPRVFF: 5'-CGCGGATCCGCACTCCATCAGTCA TTG-3' (下划线部分为 BamHI 酶切位点); PPRV FR: 5'-CCGCTCGAGAGTGATCTCACGTACGAC-3' (下划线部分为 XhoI 酶切位点)。引物由长春库美生物公司合成。

**2.2 目的基因的 PCR 扩增及重组表达质粒的构建** 分别以 H 基因和 F 基因为模板, 以相应引物进行

PCR 扩增。PCR 反应体系: DNA 模板 2 μL, 上、下游引物各 1 μL, Takara PrimerSTAR Max DNA Polymerase 25 μL, 用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 50 μL。PCR 反应条件: 98 °C 1 min; 98 °C 10 s, 60 °C 5 s, 72 °C 10 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后回收纯化。使用 BamH I 和 Hind III 酶切原核表达载体 pET30a(+) 和回收的 H 基因。酶切体系 (50 μL): 质粒/载体 2 μg, 10×FastDigest 缓冲液 5 μL, 限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 各 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补至 50 μL。使用 BamH I 和 Xho I 酶切原核表达载体 PGEX-4T-1 和回收的 F 基因, 酶切体系 (50 μL): 质粒/载体 2 μg, 10×FastDigest 缓冲液 5 μL, 限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 各 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补至 50 μL。将酶切体系置于 37 °C 水浴 1 h, 然后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收线性化的载体与目的片段, 使用 T4DNA 连接酶 16 °C 过夜孵育连接, 连接产物转化 DH5α 感受态细胞, 提取质粒进行酶切鉴定, 并送长春库美生物公司测序, 鉴定正确的重组质粒分别命名为 PGEX-4T-1-F 和 pET-30a(+)-H。

**2.3 重组质粒的转化及菌液 PCR 鉴定** 分别将鉴定正确的重组质粒 pET-30a(+)-H、PGEX-4T-1-F 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 表达菌。挑取单菌落, 37 °C 培养 12 h, 进行 PCR 鉴定, 鉴定正确后保存菌液。PCR 反应体系: 菌液 2 μL, 上、下游引物各 1 μL, Takara PrimerSTAR Max DNA Polymerase 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μL。PCR 反应条件: 98 °C 1 min; 98 °C 10 s, 60 °C 5 s, 72 °C 10 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。

**2.4 重组蛋白的诱导表达** 将鉴定正确的菌液按照 1:100 的比例分别接种于卡那霉素抗性 (pET-30a(+)-H) 和氨苄青霉素抗性 (PGEX-4T-1-F) 的液体 LB 培养基, 在 37 °C、200 r/min 的条件下培养 3 h 至菌液 A<sub>600</sub> 值为 0.4~0.6 时, 加入 0.4 mmol/L IPTG 作为诱导剂进行诱导表达。处理样品, 重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后电转移 (湿转膜法) 1 h 至 NC 膜。用封闭液 5% 脱脂乳室温封闭 2 h, 弃封闭液, PBST 洗涤膜, 3 次/5 min; 分别加入 1:5000 倍稀释的 Gst 标签鼠单克隆抗体或 1:5000 倍稀释的 His 标签鼠单克隆抗体作为一抗, 4 °C 孵育过夜, PBST 洗涤, 3 次/5 min; 加入 1:2000 倍稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗, 室温孵育 1 h, PBST 洗涤膜, 3 次/5 min; 加曝光液后在曝光仪下进行曝光, 分析重组 H、F 蛋白的反应原性。

**2.5 重组蛋白的可溶性分析** 分别将 4 mL 阳性菌在 37 °C、200 r/min 的条件下培养 3 h 至菌液 A<sub>600</sub> 值为 0.4~0.6 时, 加入 0.4 mmol/L IPTG 诱导表达 4 h。4 °C、8 000 r/min 离心 5 min, 分别保留菌液上清

和沉淀。沉淀用 PBS 重悬,置于冰浴环境中超声波破碎直至溶液澄清。将诱导后重组菌液上清和菌体裂解液液分别进行 SDS-PAGE 分析,判断重组蛋白在表达菌中的表达形式。

**2.6 重组菌的扩大培养及重组蛋白的纯化** 分别将 1L 重组菌在 37 °C、200 r/min 的条件下培养 3 h 至菌液  $A_{600}$  值为 0.4~0.6 时,加入 0.4 mmol/L IPTG 作为诱导剂诱导表达 4 h,取菌液 4 °C、8 000 r/min 离心 15 min,弃去上清液,收集菌体沉淀。每克菌体中加入 10 mL 平衡液充分重悬,冰浴条件下超声波破碎至溶液澄清,4 °C、12 000 r/min 离心,收集上清液,PGEX-4T-1-F 阳性菌用 Gst 标签纯化柱进行纯化,pET-30a (+)-H 阳性菌用 His 标签纯化柱进行纯化:将收集的上清液与柱子内树脂在 4 °C 条件下放置于翻转摇床结合过夜,2 700 r/min 离心 2 min,收集液体为流川液;用 5 倍于树脂体积的洗涤液清洗柱子 2 次,收集液体为洗涤液;之后用 4 倍于树脂体积的洗脱液将结合目的蛋白的树脂重悬,4 °C、2 700 r/min 离心 2 min 洗脱树脂中的结合蛋白,收集的液体为洗脱液。将洗脱液装入预制的透析袋中,4 °C 透析过夜,用 PEG6000 将重组蛋白进行浓缩,收集的蛋白分别命名为 His-H 和 Gst-F。分别收集两种重组蛋白的流川液、洗涤液和洗脱液通过 SDS-PAGE 分析目的蛋白的纯化情况。

**2.7 多克隆抗体的制备** 分别将重组 H、F 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂混合后进行乳化,以 500  $\mu$ g/只剂量,采取皮下多点注射方式免疫新西兰兔。之后每隔 1 周将重组蛋白与等体积的弗氏不完全佐剂混合后乳化进行加强免疫,总计免疫 5 次。在每次免疫后间隔 1 周进行耳缘静脉采血,分离血清,分装,-20 °C 保存。免疫流程见图 1。

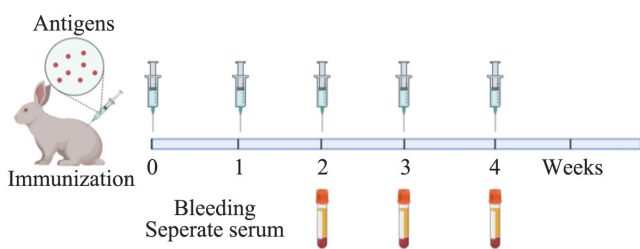


图 1 兔免疫流程

Fig. 1 Rabbit immunization process

**2.8 多克隆抗体的效价及特异性测定** 利用 ELISA 方法分别检测制备的兔血清中抗 Gst-F 与 His-H IgG 抗体效价。原核表达纯化的 Gst-F 或 His-H 包被浓度为 5  $\mu$ g/mL,免疫后 21 d 和 28 d 的兔血清作 1280-163840 倍的连续倍比稀释,每种待检血清设置 2 组重复,以阴性兔血清设置 2 组阴性对照。HRP 标记羊抗

兔 IgG 稀释度为 1 : 20000,显色液为 TMB,终止液液为 0.5 mol/L  $H_2SO_4$ ,于酶标仪 450 nm 波长处读取吸光度(A)值,用 GraphPad Prism8 软件进行数据分析。

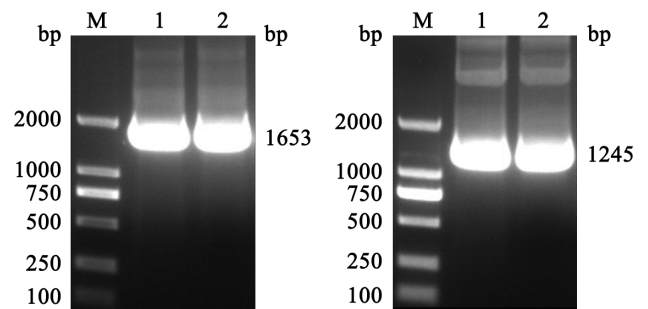
通过间接免疫荧光和 Western blot 检测多克隆抗体的结合能力。将重组病毒 rSRV9-H 和 rSRV9-F 分别接种在细胞密度约为 80%单层 BSR 细胞板中,37 °C 温箱培养 72 h 后用预冷 80%丙酮室温固定 30 min,弃去固定液,PBST 洗 3 次/5 min,加入用 1% BSA 稀释的抗 PPRV H 或 F 蛋白的兔血清和阴性兔血清作为一抗(1 : 100 倍稀释),37 °C 孵育 1 h,PBST 洗 3 次,5 min/次;避光加入 1% BSA 稀释 FITC 标记羊抗兔 IgG(1 : 200 倍稀释),37 °C 孵育 1 h,同法洗涤后置于荧光显微镜下观察。

取纯化的重组病毒 rSRV9-H 和 rSRV9-F 各 50  $\mu$ g,以 100 倍 1% BSA 稀释的兔源多克隆抗体血清一抗,HRP 标记羊抗兔 IgG 为二抗进行 Western blot 分析,检验多克隆抗体的结合能力。

## 结果

### 1 目的基因的 PCR 扩增

PCR 扩增 PPRV H、F 基因,扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分析,扩增出 1 653 bp 的 H 基因片段和 1 245 bp 的 F 基因片段(图 2),与预期相符。



M DNA 标志物(DL2000) A 1-2 PPRV H 基因 PCR 产物 B 1-2 PPRV F 基因 PCR 产物

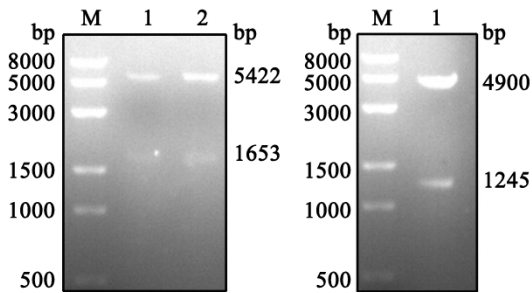
图 2 PPRV H、F 基因 PCR 扩增产物 1%琼脂糖凝胶电泳分析  
M DNA marker(DL8000) A 1-2 PCR products of PPRV H gene B 1-2 PCR products of PPRV F gene

Fig. 2 The results for PCR amplification of H and F gene of PPRV

### 2 重组表达质粒的构建及酶切鉴定

分别以酶切目的基因片段与载体酶切片段连接,连接产物转化入 DH5 $\alpha$  感受态细胞,提取质粒,pET-30a(+)-H 经 BamH I 和 Hind III 酶切得到 5 422 bp 的线性化 pET-30a(+)-H 载体片段和 1 653 bp 的 H 基因片段,与预期相符(图 3A)。PGEX-4T-1-F 重组质粒经 Xho I 和 BamH I 酶切得到 4 900 bp 的线性化 PGEX-4T-1 载体片段和 1 245 bp 的 F 基因片段,与预

期相符(图 3B)。酶切鉴定正确的质粒送公司测序,结果表明原核表达重组质粒 PGEX-4T-1-F 和 pET-30a(+)-H 构建成功。



M DNA 标志物(DL8000) A 1-2 BamH I 和 Hind III 酶切重组质粒 pET-30a(+)-H B 1 BamH I 和 Xho I 酶切重组质粒 PGEX-4T-1-F

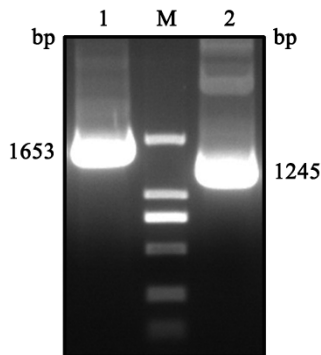
图 3 重组表达质粒 pET-30a(+)-H 和 PGEX-4T-1-F 双酶切鉴定

M DNA marker(DL8000) A 1-2 Recombinant plasmid pET-30a(+)-H digested with BamH I 和 Hind III B1 Recombinant plasmid PGEX-4T-1-F digested with BamH I 和 Xho I

Fig. 3 Double digestion identification of recombinant plasmid of pET-30a(+)-H and PGEX-4T-1-F

### 3 重组质粒的转化及菌落 PCR 鉴定

pET-30a(+)-H 菌落 PCR 得到 1 653 bp 片段, PGEX-4T-1-F 菌落 PCR 得到 1 245 bp 片段(图 4),与预期相符。



M DNA 标志物(DL2000) 1 pET-30a(+)-H 菌落 PCR 鉴定 2 PGEX-4T-1-F 菌落 PCR 鉴定

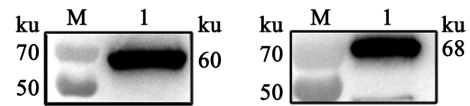
图 4 pET-30a(+)-H 和 PGEX-4T-1-F 菌落 PCR 鉴定

M DNA marker(DL2000) 1 PCR identification of pET-30a(+)-H colony 2 PCR identification of PGEX-4T-1-F colony

Fig. 4 PCR The results of individual bacterial colonies PCR

### 4 重组蛋白的诱导表达及反应原性鉴定

两重组菌均于 37 °C 经 IPTG 诱导表达 4 h 后超声破碎,取上清进行柱纯化,纯化蛋白进行 Western blot,结果如图 5。重组蛋白能被 His 标签鼠单克隆抗体和 Gst 标签鼠单克隆抗体识别,表明两个重组蛋白均具有反应原性。



M 蛋白分子质量标准 A1 重组蛋白 His-H 与 His 标签鼠单克隆抗体反应条带 B1 重组蛋白 Gst-F 与 Gst 标签鼠单克隆抗体反应条带

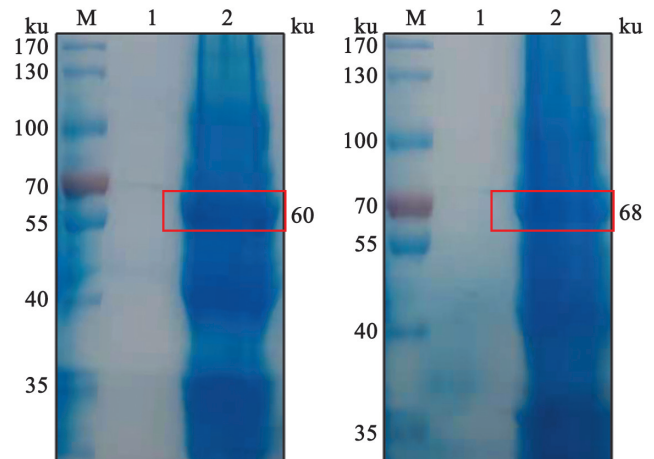
图 5 纯化 His-H 和 Gst-F 的 Western blot 分析

M Protein molecular weight marker A1 Recombinant protein His-H reaction band (Anti His-Tag Mouse Monoclonal Antibody as primary antibody) B1 Recombinant protein Gst-F reaction band (Anti GST-Tag Mouse Monoclonal Antibody as primary antibody)

Fig. 5 Western blot identification of recombinant protein His-H and Gst-F

### 5 重组蛋白的可溶性分析

SDS-PAGE 电泳显示,重组菌液上清中无目的蛋白条带,重组菌液沉淀中目的蛋白条带较为明显。目的蛋白 His-H 分子质量为 60 ku(图 6A),目的蛋白 Gst-F 分子质量为 68 ku(图 6B)。



M 蛋白分子质量标准 A1、B1 IPTG 诱导后重组菌液上清 A2、B2 IPTG 诱导后重组菌裂解沉淀

图 6 重组蛋白 His-H 和 Gst-F 的可溶性分析

M Protein molecular weight marker A1、B1 Recombinant bacterial supernatant after IPTG induction A2、B2 Recombinant bacteria precipitation after IPTG induction

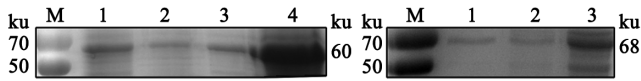
Fig. 6 Solubility analysis of recombinant protein His-H and Gst-F

### 6 纯化重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

纯化的目的蛋白 His-H 经 SDS-PAGE 分析,为单一 60 ku 蛋白条带(图 7A)。纯化的目的蛋白 Gst-F 经 SDS-PAGE 分析,为单一 68 ku (Gst 标签蛋白 23 ku)蛋白条带(图 7B)。蛋白纯度符合预期。

### 7 血清抗体效价

以原核蛋白为抗原,采用 ELISA 检测多克隆抗体效价,结果如图 8。His-H 多克隆抗体和 Gst-F 多克隆抗体效价均随着免疫次数的增加而升高,28 d 时的多克隆抗体血清效价高于 21 d 时的多克隆抗体血清效价。



M 蛋白分子质量标准 A(His-H) 1,2 洗脱液 3 洗涤液 4 流川液 B(Gst-F) 1 洗脱液 2 洗涤液 3 流川液

图 7 纯化重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

M Protein molecular weight marker A(His-H) 1,2 Eluent 3 Washing liquid 4 Filtrate B(Gst-F) 1 Eluent 2 Washing liquid 3 Filtrate

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of purified recombinant protein

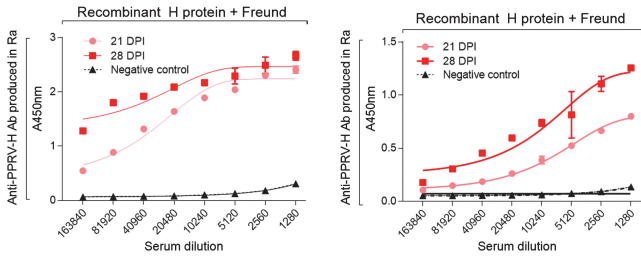
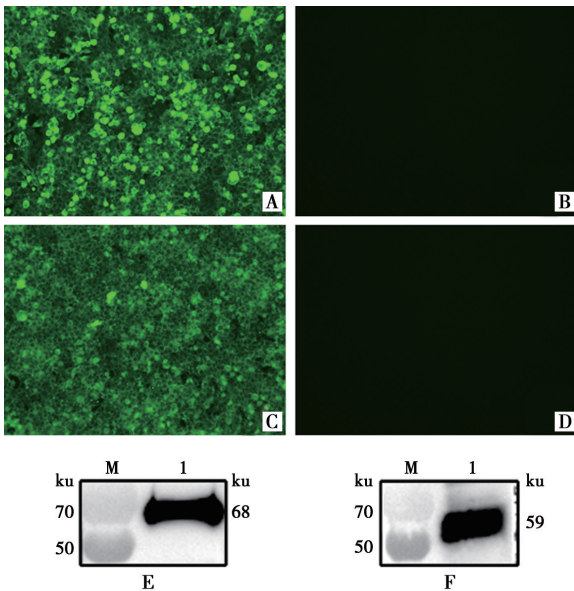


图 8 ELISA 检测兔血清抗体效价(A) His-H 和 Gst-F 兔血清抗体效价(B)

Fig. 8 Results of ELISA test for rabbit anti-His-H or anti-Gst-F polyclonal antibody

## 8 抗体结合能力检测

将 rSRV9-F 重组毒以  $MOI=0.1$  接种 BSR 细胞,72 h 后进行细胞固定,以制备的兔多克隆抗体为一抗进行间接免疫荧光染色,结果显示兔多克隆抗体能与 rSRV9-F 发生特异性结合(图 9A),而不与未感染病毒细胞发生反应(图 9B)。



A rSRV9-H 感染 BSR 细胞 B 正常 BSR 细胞 C rSRV9-F 感染 BSR 细胞 D 正常 BSR 细胞 E rSRV9-H Western blot 分析 F rSRV9-F Western blot 分析

图 9 间接免疫荧光法和 Western blot 检测重组狂犬病病毒 rSRV9-H 和 rSRV9-F(200×)

A BSR cells infected with rSRV9-H B Normal BSR cells C BSR cells infected with rSRV9-F D Normal BSR cells

Fig. 9 Identification of recombinant virus rSRV9-H and rSRV9-F by indirect immunofluorescence analysis

将 rSRV9-H 重组毒以  $MOI=0.1$  接种 BSR 细胞,72 h 后进行细胞固定,以制备的兔多克隆抗体为一抗进行间接免疫荧光染色,结果显示兔多克隆抗体能与 rSRV9-H 重组毒发生特异性结合(图 9C),而不与未感染病毒细胞发生反应(图 9D)。

分别以 2 种兔多克隆抗体作为一抗进行 rSRV9-H、rSRV9-F 重组病毒的 Western blot 分析,结果表明制备的兔多克隆抗体能识别相应的重组病毒 rSRV9-H(图 9E)和 rSRV9-F(图 9F)。

## 讨论

PPRV 引起绵羊和山羊的严重传染病,在发展中国家广泛传播,对畜牧业造成巨大损失<sup>[20]</sup>。此外,该传染病在藏羚羊、岩羊等偶蹄类野生动物中的频繁爆发,不仅增加了珍稀野生动物的保护难度,而且对物种多样性也造成了潜在威胁<sup>[21]</sup>,全球性消灭 PPR 的目标任重而道远。目前对于本病的防控主要依靠疫苗免疫,虽然 PPR 减毒活疫苗已取得可喜进展并在田间得到大规模推广使用,但 PPRV 的减毒活疫苗(Nigeria75/1 株减毒活疫苗和 Sungri/96 株减毒活疫苗)存在病毒生长滴度较低,生产成相对较高,热稳定性差,且无法区分自然感染和疫苗免疫等缺点<sup>[22]</sup>。随着 DNA 重组技术的出现,人们正在努力开发有效的 PPR 疫苗,以区分自然感染的动物和疫苗接种的动物,使用新型疫苗(DNA、病毒载体和 VLP 疫苗)或通过反向遗传学改进的减毒活疫苗,有助于区分自然感染的动物和疫苗接种的动物<sup>[23]</sup>。联合国粮食及农业组织(FAO)和世界动物卫生组织(OIE)宣布在成功消灭牛瘟病毒的基础上于 2030 年全球消灭 PPR<sup>[24]</sup>。

PPRV F 蛋白和 H 蛋白抗体是进一步研究 F 蛋白和 H 蛋白生物学功能和 PPRV 疫苗研制的基础。目前尚无商品化的抗 PPRV F 蛋白和 H 蛋白单克隆抗体或多克隆抗体,因此本研究选择 PPRV 的 F 和 H 蛋白基因构建原核表达质粒,表达和纯化 F 和 H 蛋白,并制备抗 PPRV F 蛋白或 H 蛋白多克隆抗体。与哺乳动物或昆虫细胞表达系统相比,利用大肠埃希菌表达重组蛋白具有操作便捷、表达量高、易于大规模培养、蛋白纯化技术成熟等优点,虽然在蛋白后期的加工与修饰不如真核表达系统,但是原核表达系统表达的重组蛋白可保留目的蛋白的大部分 T 细胞表位和 B 细胞表位,以确保目的蛋白较好的免疫原性。此外,如利用细胞培养的 PPRV 作为免疫原,PPRV 在敏感细胞系上生长滴度较低,且 PPRV 病毒的培养操作须在高等级生物安全实验室条件下进行,并由专业技术人员完成病毒的培养,显著提高了免疫原制备的成本。本研究利用原核系统制备重组蛋白作为抗原不仅可以

降低成本,还可以很大程度上降低操作难度。选取 China/Tibet/Geg/07-30 强毒株的基因序列设计原核表达基因,以期制备效果更好的多克隆抗体。本研究前期曾经用 pET-30a(+ )表达完整 F 蛋白,但表达量过低,不能达到纯化的要求<sup>[6]</sup>。作为一种跨膜糖蛋白,F 蛋白和 H 蛋白需要进行翻译后加工和修饰,当真核基因在原核表达系统中表达时,表达受到信号肽的影响,所以在设计引物时去掉了 F 和 H 蛋白的信号肽区、跨膜区及胞质区,并通过不同的原核表达载体尝试对 F 蛋白和 H 蛋白进行表达。PGEX-4T-1 载体适合用于 F 蛋白的表达,该载体具有标签较大,免疫时可以增强机体对抗原的特异性免疫应答。而 pET-30a(+ )载体适合用于 H 蛋白的表达,该载体 N 端的 His-tag 与细菌的转录翻译机制兼容,不仅有利于目的蛋白的高效表达,且对目的蛋白本身特性几乎没有影响,不会形成二聚体。采用固定化金属离子亲和层析纯化 His-tag 融合蛋白,使得纯化操作更加简便快捷。His-tag 的免疫原性相对较低,可将纯化的蛋白直接注射入动物体内进行免疫。

本研究表达的 2 种重组蛋白均以包涵体的形式存在,可能是大肠埃希菌繁殖速度快、表外源蛋白的量高,外源蛋白无法及时折叠导致形成包涵体。其次,重组蛋白在宿主菌内表达的过程中缺乏某些蛋白质折叠的辅助因子,无法形成正确的次级键等原因造成的。大肠埃希菌中表达的外源蛋白主要在细胞质中进行,而细胞质的环境是还原性的,不利于二硫键的氧化配对。包涵体虽然影响了蛋白的可溶性,但包涵体表达可以避免蛋白酶对外源蛋白的降解,可以提高目的蛋白的表达量。包涵体表达的蛋白质没有活性,细胞破碎和纯化过程无需考虑蛋白质的失活问题。某些外源蛋白质对细胞有毒性或者致死,大量表达时会导致细胞死亡,最终的细胞数量和产物相当,而包涵体形式的蛋白质由于丧失了生物活性从而可以高效大量地表达<sup>[25]</sup>。本研究通过对包涵体的洗涤、变性和梯度透析复性来获得可溶性的重组蛋白。与哺乳动物或昆虫细胞培养系统相比,在原核表达系统中生产重组抗原更简单、经济。

Wang 等<sup>[12]</sup>构建了去除 F 基因信号肽区和跨膜区序列的 pET30a/Nigeria75/1 F 原核表达载体,表达了 PPRV 疫苗株 Nigeria75/1 F 重组蛋白,并以 F 重组蛋白制备免疫原免疫家兔,获得了高滴度抗 PPRV F 蛋白的兔多克隆抗体。于瑞嵩等<sup>[26]</sup>对 PPRV 西藏株 H 基因进行了基于大肠埃希菌稀有密码子的密码子同义优化,表达了 PPRV 西藏株 H 蛋白,以此免疫新西兰大白兔,制备了抗 PPRV H 蛋白的兔多克隆抗体。证明原核表达系统可成功表达出 PPRV H 和 F

蛋白,以原核表达蛋白作为抗原进行多克隆抗体的制备,成功制备高特异的多克隆抗体。本实验前期制备了鼠源多克隆抗体,但是利用小鼠制备多克隆抗体的量相对较少。利用山羊或绵羊制备多克隆抗体虽然可以收集较多血清,但是羊的免疫需要较大的饲养空间,免疫剂量大,操作繁琐,加大了血清收集的难度。本研究利用家兔进行多克隆抗体的制备,家兔相对于小鼠和羊,易于免疫、便于饲养,收集的免疫血清的量可以满足需求。

本研究利用不同的原核表达载体分别表达 PPRV F 蛋白和 H 蛋白,重组蛋白 His-H 可被抗 His 标签单克隆抗体识别,重组蛋白 Gst-F 可被抗 Gst 标签单克隆抗体识别。将两种重组蛋白作为免疫原分别免疫家兔,制备了高活性的兔多克隆抗体(ELISA 效价高于 1 : 163840),具有一定的实验室应用价值。

本研究利用大肠埃希菌表达系统成功表达了具有抗原性的 PPRV 的 H 和 F 蛋白,并制备了相应的高活性兔多克隆抗体,为建立针对 PPRV H、F 蛋白抗原的鉴定及亚单位疫苗的研制奠定了基础。

#### 【参考文献】

- [1] Parida S, Muniraju M, Mahapatra M, et al. Peste des petits ruminants [J]. *Vet Microbiol*, 2015, 181(1-2): 90-106.
- [2] Zahur AB, Ullah A, Hussain M, et al. Sero-epidemiology of peste des petits ruminants (PPR) in Pakistan [J]. *Prev Vet Med*, 2011, 102(1): 87-92.
- [3] Balamurugan V, Saravanan P, Sen A, et al. Prevalence of peste des petits ruminants among sheep and goats in India [J]. *J Vet Sci*, 2012, 13(3): 279-285.
- [4] Wang Z, Bao J, Wu X, et al. Peste des petits ruminants virus in Tibet, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(2): 299-301.
- [5] Chard L S, Bailey DS, Dash P, et al. Full genome sequences of two virulent strains of peste-des-petits ruminants virus, the Cote d'Ivoire 1989 and Nigeria 1976 strains [J]. *Virus Res*, 2008, 136(1-2): 192-197.
- [6] 闫飞虎. PPRV 病毒样颗粒的构建、制备及免疫原性研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2016.
- [7] 应兰, 杨毅青, 李林, 等. 青海高原首例岩羊小反刍兽疫诊断与控制 [J]. *畜牧与兽医*, 2019, 51(12): 112-117.
- [8] 宋焕堂, 江萍, 丁剑, 等. 新疆小反刍兽疫流行现状及防控措施 [J]. *现代畜牧兽医*, 2021(6): 84-87.
- [9] Gibbs EP, Taylor WP, Lawman MJ, et al. Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus *Morbillivirus* [J]. *Intervirology*, 1979, 11(5): 268-274.
- [10] Woo PC, Lau SK, Wong BH, et al. Feline morbillivirus, a previously undescribed paramyxovirus associated with tubulointerstitial nephritis in domestic cats [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(14): 5435-5440.
- [11] Shaila MS, Shamaki D, Forsyth MA, et al. Geographic distribution and epidemiology of peste des petits ruminants viruses [J]. *Virus Research*, 1996, 43(2): 149-153.

- [12] Wang Q, Dou Y, Yang X, et al. Prokaryotic expression of f protein from PPRV and characterization of its polyclonal antibody [J]. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 2013, 32(1): 26-31.
- [13] 翟军军. 小反刍兽疫病毒全长 cDNA 的构建及 DNA 疫苗的免疫学研究[D]. 中国农业科学院, 2012.
- [14] Dhar P, Sreenivasa BP, Barrett T, et al. Recent epidemiology of peste des petits ruminants virus (PPRV) [J]. *Vet Microbiol*, 2002, 88(2): 153-159.
- [15] Seth S, Shaila MS. The fusion protein of Peste des petits ruminants virus mediates biological fusion in the absence of hemagglutinin-neuraminidase protein [J]. *Virology*, 2001, 289(1): 86-94.
- [16] Diallo A, Minet C, Le Goff C, et al. The threat of peste des petits ruminants: progress in vaccine development for disease control [J]. *Vaccine*, 2007, 25(30): 5591-5597.
- [17] 陈伟业, 曲林茂, 胡森, 等. 表达小反刍兽疫 H 蛋白的重组山羊痘病毒疫苗[J]. *生物工程学报*, 2009, 25(4): 496-502.
- [18] 杨勃. 小反刍兽疫病毒诱导宿主细胞持续自噬的分子机制研究[D]. 西北农林科技大学, 2019.
- [19] Yan F, Li E, Li L, et al. Virus-like particles derived from a virulent strain of pest des petits ruminants virus elicit a more vigorous immune response in mice and small ruminants than those from a vaccine strain [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11(609): 1-14.
- [20] Liu FX, Wu XD, Liu WH, et al. Current perspectives on conventional and novel vaccines against peste des petits ruminants [J]. *Veter Res Commun*, 2014, 38(4): 307-322.
- [21] Zhao H, Njeumi F, Parida S, et al. Progress towards eradication of peste des petits ruminants through vaccination [J]. *Viruses*, 2021, 13(1): 59.
- [22] Jia XX, Wang H, Liu Y, et al. Development of vaccines for prevention of peste-des-petits-ruminants virus infection [J]. *Microb Pathog*, 2020(142): 104045.
- [23] Kamel M, El-Sayed A. Toward peste des petits virus (PPRV) eradication: Diagnostic approaches, novel vaccines, and control strategies [J]. *Virus Res*, 2019(274): 197774.
- [24] G D W, Adama D, Giovanni C. Peste des petits ruminants in Africa: a review of currently available molecular epidemiological data, 2020 [J]. *Arch Virol*, 2020, 165(10): 2147-2163.
- [25] 肖敏, 包世俊, 邢小勇, 等. 小反刍兽疫病毒甘肃株 F 基因的克隆、原核表达及多克隆抗体的制备[J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25(3): 477-484.
- [26] 于瑞嵩, 高位相, 李凤平, 等. 西藏株小反刍兽疫病毒 H 蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(10): 2183-2190.

【收稿日期】 2022-01-15 【修回日期】 2022-03-30

(上接 379 页)

- [12] Klinkert MQ, Theilmannl, Pfaff E, et al. Pre-S1 antigens and antibodies early in the course of acute hepatitis B virus infection [J]. *J Virol*, 1986, 58(2): 522-525.
- [13] 梁文娟, 张荣光, 段广才, 等. 基于 CRISPR/Cas 的大肠埃希菌分子标志物的监测研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2016, 37(8): 1080-1086.
- [14] Barrera A, Guerra B, Notvall L, et al. Mapping of the hepatitis B virus pre-S1 domain involved in receptor recognition [J]. *J Virol*, 2005, 79(15): 9786-9798.
- [15] Sun Y, Qi Y, Peng B, et al. NTCP-Reconstituted In Vitro HBV Infection System [J]. *Method Mol Biol (Clifton, NJ)*, 2017, 1540: 1-14.
- [16] Yan H, Liu Y, Sui J, et al. NTCP opens the door for hepatitis B virus infection [J]. *Antiviral Res*, 2015(121): 24-30.
- [17] Pontisso P, Petit MA, Bankowski MJ, et al. Human liver plasma membranes contain receptors for the hepatitis B virus pre-S1 region and, via polymerized human serum albumin, for the pre-S2 region [J]. *J Virol*, 1989, 63(5): 1981-1988.
- [18] Persing DH, Varmus HE, Ganem D. Inhibition of secretion of hepatitis B surface antigen by a related presurface polypeptide [J]. *Science*, 1986(234): 1388.

【收稿日期】 2021-11-19 【修回日期】 2022-02-09