

霍 军,宋予震,董 青.猪流行性腹泻病毒流行毒株 *COE* 基因的原核表达及免疫原性分析[J].江苏农业科学,2014,42(9):34-36.

猪流行性腹泻病毒流行毒株 *COE* 基因的原核表达及免疫原性分析

霍 军,宋予震,董 青

(河南牧业经济学院动物医学系,河南郑州 450046)

摘要:应用 RT-PCR 方法从 PEDV 流行毒株中扩增 *COE* 基因,并将其克隆至原核表达载体 pET-32a,构建 pET-32a-*COE* 重组质粒。将重组质粒转化至宿主菌 BL21(DE3)中,加入 IPTG 进行诱导表达。SDS-PAGE 分析结果显示,该重组蛋白获得了表达,主要以包涵体形式存在,分子量约为 35.5 ku;Western-blot 分析结果显示,所表达的重组蛋白能与抗 PEDV 小鼠血清反应。应用纯化的重组蛋白加入弗氏佐剂免疫 6 周龄 BALB/C 小鼠并采集血清,ELISA 检测抗体效价达 1:3 200 以上,说明所表达的蛋白具有良好的免疫原性。

关键词:猪流行性腹泻病毒;*COE* 基因;原核表达;免疫原性;诊断抗原;PED 基因工程疫苗

中图分类号: S858.285.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0034-02

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)由猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起,临床上以猪的急性肠炎、呕吐、腹泻、脱水以及哺乳仔猪的高死亡率特征^[1]。由于 PEDV 感染所引起的疾病与猪传染性胃肠炎在临床上难以区分,因此,对于 PED 的鉴别诊断往往需要借助实验室手段。

S 蛋白是冠状病毒囊膜上的糖蛋白,负责病毒的吸附、融合和侵入宿主细胞,也是诱导宿主体液免疫反应的免疫原性蛋白。目前研制的冠状病毒基因工程疫苗所选取的抗原基因主要集中在 S 基因上^[2-4]。Chang 等报道,猪流行性腹泻病毒 S 基因存在中和抗原表位(*COE*),BtI/87 株的 *COE* 基因为 S 基因序列的 1 495~1 914 bp^[5];而韩国 PEDV 株的 *COE* 基因为 S 基因序列的 1 504~1 923 bp^[6]。本试验结合上述文献,成功扩增了 PEDV 流行毒株 CH/HNZZ/13 株 S 基因的 1 474~1 950 bp 处(包括 *COE* 基因),将其连接至 pET-32a 原核表达质粒进行表达,进而探讨将原核表达的重组 *COE* 蛋白作为诊断抗原的可行性;并为 PED 基因工程疫苗的研制提供参考。

1 材料与方法

1.1 PEDV 阳性样本

2013 年采集于河南省郑州郊区某猪场 PEDV 阳性粪便样本,命名为 CH/HNZZ/13 株。

1.2 主要试剂

rTaq DNA 聚合酶、dNTP、pMD18-T 载体、鼠源反转录酶(M-MLV)、RNA 酶抑制剂(Rnase Inhibitor)、T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 均购自大连宝生物工程公司;Bradford 蛋白质定量试剂盒购自 TIANGEN 公司;TR-

Izon Regent、Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒、DAB 显色试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司。

1.3 PCR 引物的设计

参考 PEDV CV777 株全基因序列(GenBank: AF 353511)设计 1 对特异性引物,上游引物为 CGGATCCCTTCTGAGT-CACGAACAG,加入酶切位点 *Bam*H I;下游引物为 CCTC-GAGGGTACACACATCCAGAGTCAT,加入酶切位点 *Xho* I。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 样本处理及 RNA 的提取

将粪便样本用 PBS(0.01 mol/L, pH 值 7.2)进行 10 倍稀释并研磨,8 000 r/min 离心 10 min 取上清备用,参照说明书使用 TRIzol Regent 提取 RNA。

1.5 反转录与 PEDV S 基因片段的扩增

20 μ L 反转录体系:RNA 模板 10 μ L, 5 \times buffer 4 μ L, dNTP(10 mmol/L)1 μ L,下游引物 1 μ L(20 pmol/ μ L), RNase 抑制剂(40 U/ μ L)0.5 μ L,反转录酶 M-MLV(200 U/ μ L)0.5 μ L,补加灭菌双蒸水至 20 μ L;反应条件为:42 $^{\circ}$ C 1 h, 95 $^{\circ}$ C 5 min。50 μ L PCR 扩增体系:10 \times buffer 5 μ L, MgCl₂(25 mmol/ μ L)5 μ L,反转录产物(cDNA)5 μ L, dNTP(10 mmol/L)1 μ L, rTaq DNA 聚合酶(5U/ μ L)0.5 μ L,上、下游引物(20 pmol/ μ L)各 1 μ L,补加灭菌双蒸水至 50 μ L。反应循环参数:95 $^{\circ}$ C 5 min;然后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环;循环结束后再 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物使用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,回收目的片段连接至 pMD18-T 载体,阳性重组质粒命名为 pMD18-T-*COE*。

1.6 pET-32a-*COE* 重组质粒的构建及表达

使用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 对 pET-32a 空质粒和 pMD18-T-*COE* 进行双酶切,回收目的片段,并使用 T4 DNA 连接酶进行连接。将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞中,对重组质粒进行双酶切鉴定和 PCR 鉴定,阳性重组质粒命名为 pET-32a-*COE*。将阳性重组质粒转化至宿主菌 BL21(DE3)中,在菌液 $D_{600\text{nm}}$ 值为 0.6~0.8 时加入终浓度为 1 mmol/mL 的 IPTG(Isopropylthio- β -D-galactoside), 37 $^{\circ}$ C

收稿日期:2013-12-03

基金项目:2013 年度河南省科技计划(编号:132102110147)。

作者简介:霍 军(1962—),男,河南信阳人,副教授,研究方向为动物解剖生理。Tel:(0371)65765528;E-mail:huojun@tom.com。

条件下进行诱导表达。取诱导后的菌液 1 mL 于 10 000 r/min 离心 5 min 收集沉淀,加入细菌裂解液将其混匀后使用超声波破碎菌体,破碎完全后 10 000 r/min 离心 5 min 后,分别取上清和沉淀加入适量的 2 × SDS 凝胶上样缓冲液后沸水煮 5 min,然后再 8 000 r/min 离心 5 min 后取上清进行 SDS - PAGE 电泳分析,检测目的蛋白的表达形式。

1.7 目的蛋白纯化、定量及 Western - blot 分析

使用 Ni - Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒纯化目的蛋白,使用 Bradford 蛋白质定量试剂盒对目的蛋白进行定量分析。然后将纯化的目的蛋白经 SDS - PAGE 电泳后转印到 PVDF 膜上,与抗 PEDV 小鼠阳性血清反应,再加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 进行作用,最后使用 DAB 进行显色观察。

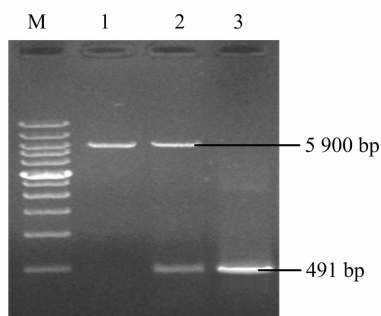
1.8 目的蛋白的动物免疫试验及 ELISA 检测

取 6 周龄左右昆明鼠 20 只,分成 2 组,每组 10 只。试验组小鼠第一次免疫 50 μg 的重组蛋白加等量的弗氏完全佐剂;2 周后进行二免,每只小鼠免疫 50 μg 的重组蛋白加等量的弗氏不完全佐剂;2 周后三免,方法与二免相同。对照组在 3 次免疫时均注射 0.1 mL 生理盐水。三免后 2 周小鼠眼球采血进行 ELISA 检测,使用的 ELISA 方法为本实验室建立的基于 PEDV 全病毒包被的抗体检测 ELISA。

2 结果与分析

2.1 pET - 32a - COE 重组质粒构建

通过 RT - PCR 方法扩增 PEDV COE 基因,连接至 pET - 32a 原核表达质粒。对重组质粒进行双酶切鉴定和 PCR 鉴定,结果双酶切鉴定时在 5 900 bp 和 491 bp 左右有 2 条带,PCR 鉴定时在 491 bp 有 1 条特异性条带(图 1),表明重组 pET - 32a - COE 质粒构建成功。



M—DNA Marker (500~12000); 1—pET-32a空质粒对照;
2—pET-32a-COE 重组质粒双酶切鉴定(*Bam*H I/*Xho* I);
3—pET-32a-COE 重组质粒PCR鉴定

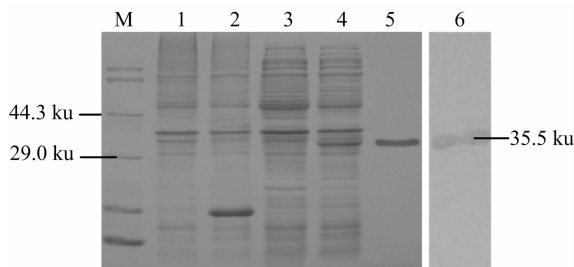
图1 重组质粒的酶切鉴定和PCR鉴定

2.2 融合蛋白的诱导和纯化

对含有重组质粒的 *E. coli* BL21 进行诱导表达,经 SDS - PAGE 电泳分析,重组表达质粒在 *E. coli* BL21 中以包涵体蛋白的形式表达,其相对分子质量约为 35.5 ku,与预测大小相符。使用 Ni - Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒纯化目的蛋白,SDS - PAGE 显示纯化后蛋白在 35.5 ku 处有单一条带(图 2),说明回收纯化效果较好;将重组蛋白进行复性,然后使用 Bradford 蛋白质定量试剂盒对重组蛋白进行定量,蛋白浓度为 0.21 mg/mL。

2.3 表达产物的 Western - blot 分析

以纯化的重组蛋白为抗原,以抗 PEDV 小鼠阳性血清为一抗进行 Western - blot 检测,结果在 35.5 ku 处出现 1 条清晰的反应条带,说明重组蛋白在大肠杆菌中得到了正确表达并具有生物学活性(图 2)。



M—低分子量蛋白Marker; 1—未经诱导的含pET32-a空质粒BL21菌; 2—经IPTG诱导的含pET32-a空质粒BL21菌; 3—未经诱导的含pET32-a-COE重组质粒BL21菌; 4—经IPTG诱导含pET32-a-COE重组质粒BL21菌; 5—经镍柱纯化的重组COE蛋白; 6—纯化的重组蛋白Western-blot分析

图2 目的蛋白的表达、纯化及 Western-Blot 分析

2.4 重组蛋白的免疫原性分析

采用基于 PEDV 全病毒包被的抗体检测 ELISA 方法检测重组蛋白免疫小鼠后的血清抗体产生情况。ELISA 检测结果表明,在重组蛋白中加入弗氏佐剂免疫小鼠,在三免后 2 周试验组小鼠的血清中 ELISA 抗体效价可达 1 : 3200,而对照组未检测到 PED 抗体。

3 讨论

本试验成功构建 pET32 - a - COE 重组质粒并进行诱导表达,结果显示目的蛋白主要以包涵体形式存在。虽然以包涵体形式表达的蛋白有一定缺点,主要是对包涵体的处理要先变性溶解后再进行复性,才能得到溶解的具有活性的蛋白,且复性后蛋白活性容易降低;但它也有很大的优点,能够避免细胞内蛋白质水解酶的作用,而且有利于目的蛋白的富集和分离纯化,适合大规模商品化生产。本研究使用的 pET - 32a 原核表达载体本身带有 His 标签,可以在变性条件下用 Ni - Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒进行目的蛋白的纯化,然后再经复性处理获得具有活性的目的蛋白。将纯化的蛋白进行 SDS - PAGE 分析后显示在 35.5 ku 处出现单一条带,未见杂带,说明对目的蛋白纯化效果良好。Western - blot 分析结果显示,所表达的重组蛋白能与抗 PEDV 全病毒小鼠阳性血清反应,表明所表达的重组蛋白具有良好的反应原性,可以作为诊断抗原用于 PEDV 抗体的检测。另外,将纯化的重组蛋白加入弗氏佐剂后免疫小鼠,可诱使小鼠机体产生高水平的 PED 抗体,说明所表达的蛋白具有良好的免疫原性。

目前,由 PEDV 感染所引起的腹泻疫情在我国仍然十分严重,因此,急需建立可靠的 PEDV 抗体检测方法用于 PED 流行病学的监测以及猪群免疫 PED 疫苗后抗体水平的检测。本试验表达的针对 PEDV COE 基因主要抗原区的重组蛋白表达量高、反应原性好,为 PEDV 抗体检测试剂盒的研发提供了参考。另外,由于所表达的蛋白具有良好的免疫原性,也为将该蛋白作为 PED 基因工程疫苗候选抗原的研究提供依据。

王志强,俞红贤,荆海霞,等. 牦牛 *SLC25A6* 基因的 CDS 序列及其表达蛋白生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):36-39.

牦牛 *SLC25A6* 基因的 CDS 序列及其表达蛋白生物信息学分析

王志强,俞红贤,荆海霞,张勤文,魏青,梁林,牛亮

(青海大学,青海西宁 810016)

摘要:通过 RT-PCR 技术克隆牦牛 *SLC25A6* 基因的 cDNA 序列,并利用 DNAMAN、MAGA 6、SWISS-MODEL、ExPASy 等生物信息学软件系统对其进行分析。结果表明,扩增出的牦牛 *SLC25A6* 基因的编码区长 897 bp,编码 298 个氨基酸;与普通牛、绵羊和人的相应基因核苷酸序列进行比对,序列一致性分别为 99.33%、98.22%、91.86%;其编码蛋白分子量为 32.821 ku,含多个修饰位点。

关键词:牦牛;线粒体;*SLC25A6* 基因;ANT3 蛋白;生物信息学

中图分类号: Q753 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0036-04

线粒体作为机体能量供应站,通过对组织氧的利用为细胞的能量代谢提供不可或缺的能量货币——三磷酸腺苷(ATP)。因此,长期生活在氧气相对缺乏的高原环境中的牦牛对氧气及能量的充分利用显得尤为重要。而在能量代谢过程中,溶质载体家族 25(solute carrier family 25, SLC25)发挥着重要作用。SLC25 是一类能够将大量分子通过线粒体膜进行转运的蛋白^[1]。除 *SLC25A17* 外,其余 *SLC25s* 均位于线粒体内膜,因此被认为是线粒体载体^[2]。线粒体载体家族中的腺嘌呤核苷酸转运蛋白 3(ADP/ATP translocase 3)别称 ANT3,由 *SLC25A6* 基因编码,是线粒体内膜上重要的载体蛋白,能够促进 ATP 与二磷酸腺苷(ADP)之间的交换。ANT 在为细胞的生命活动提供能量的同时,也为线粒体基质内氧化磷酸化反应提供底物,促使胞质耗能与线粒体产能这一反应链有序进行^[3]。有研究显示,ANT3 是白细胞介素-4

(IL-4)和干扰素- γ (IFN- γ)反向调节的新靶点,与细胞凋亡有密切关系;IL-4 或 IFN- γ 单独作用于 T 细胞时能够上调 ANT3 及其基因水平的表达,当 IL-4 与 IFN- γ 共同作用时能够下调 ANT3 的表达水平。相反,ANT 的其他亚型不受 IL-4 或 IFN- γ 影响;另外,地塞米松诱导细胞凋亡时产生的 IL-4 和 IFN- γ 细胞因子通过调节 ANT3 表达水平而影响调节性 T 细胞的存活率^[4-5]。ANT3 的瞬间过量表达会导致培养细胞的凋亡,但该凋亡现象能够被米醇酸菌或环孢菌素 A 所抑制^[6]。目前,对高原牦牛腺苷酸转运体的研究几近空白,因此本试验通过对牦牛腺苷酸转运体基因及其表达蛋白进行研究,以期揭示高原牦牛线粒体的低氧适应机制,并为高原医学提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 动物来源及样品处理

于海拔 4 km 左右的青海省大通种牛场选取健康成年牦牛,颈动脉放血致死,迅速取脑组织皮层样本,将其置于液氮中低温保存,用于提取总 RNA。

1.2 方法

1.2.1 设计并合成引物 通过美国国家生物技术信息中心(national center for biotechnology information, NCBI)查询普通牛 *SLC25A6* 基因的 mRNA 序列(NM_174660.2),并根据其序列利用 DNAMAN、Primer 5 设计特异性引物;共设计 2 对引

1128-1132。

[4]董丽娜,高山,许崇波,等. 表达猪流行性腹泻病毒 COE 基因的重组乳酸菌的构建与鉴定[J]. 畜牧兽医学报,2008,39(12):1743-1747.

[5]Chang S H, Bae J L, Kang T J, et al. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus[J]. Mol Cells,2002,14(2):295-299.

[6]Kang T J, Seo J E, Kim D H, et al. Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants Protein[J]. Expression and Purification,2005,41(2):378-383.

收稿日期:2014-03-19

基金项目:国家自然科学基金(编号:31260588);青海省自然科学基金(编号:2011-Z-901)。

作者简介:王志强(1988—),男,河南焦作人,硕士研究生,主要从事高原家畜形态学结构特点与高原环境的关系研究。E-mail:wzqqu@163.com。

通信作者:荆海霞,博士,副教授,主要从事高原家畜形态学结构特点与高原环境的关系研究。E-mail:jinghaixia@163.com。

参考文献:

- [1]Debouck P, Pensaert M. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777 [J]. Am J Vet Res, 1980, 41(2):219-223.
- [2]Liu R Y, Wu L Z, Huang B J, et al. Adenoviral expression of a truncated S1 subunit of SARS-CoV spike protein results in specific humoral immune responses against SARS-CoV in rats [J]. Virus Res, 2005, 112(1/2):24-31.
- [3]韦显凯,侯继波,姜平. 表达猪流行性腹泻病毒 S 基因片段重组腺病毒的构建与免疫特性[J]. 中国兽医学报,2008,28(10):