

韩凯凯,严若峰,刘青涛,等. 鸭坦布苏病毒甲基转移酶的真核表达及鉴定[J]. 江苏农业科学,2021,49(15):147-150.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.15.027

# 鸭坦布苏病毒甲基转移酶的真核表达及鉴定

韩凯凯<sup>1,2,3</sup>, 严若峰<sup>1</sup>, 刘青涛<sup>1,2,3</sup>, 刘宇卓<sup>2</sup>, 李 银<sup>1,2,3</sup>, 赵冬敏<sup>1,2,3</sup>, 黄欣梅<sup>1,2,3</sup>, 杨 婧<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095; 2. 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏南京 210014;

3. 江苏大学生命科学学院, 江苏镇江 212013)

**摘要:**甲基转移酶(methyltransferase, MTase)是鸭坦布苏病毒(duck Tembusu virus, DTMUV)非结构蛋白 5 的重要功能基因,在病毒复制及致病过程中发挥重要作用。为了对鸭坦布苏病毒甲基转移酶进行真核表达,并对其生物学功能进行鉴定,以 GenBank 中收录的 DTMUV JS804 株基因序列为模板,设计针对 MTase 的特异性引物,提取 TMUV RNA,反转录得到 cDNA,以其为模板进行扩增,得到 MTase 的基因片段,然后亚克隆至 pCMV-Flag 真核表达载体中,构建重组质粒 pCMV-Flag-MTase,提取去除内毒素的重组质粒,并转染至 BHK-21 细胞,通过间接免疫荧光观察和 Western Blot 鉴定该蛋白的表达。结果显示,质粒 pCMV-Flag-MTase 经双酶切鉴定证明构建正确,通过间接免疫荧光与 Western Blot 检测,重组质粒在 BHK-21 细胞内正常表达,表达的蛋白与天然坦布苏病毒 MTase 具有相同的反应原性。

**关键词:**鸭坦布苏病毒;甲基转移酶;真核表达

**中图分类号:**S852.65<sup>+</sup>7

**文献标志码:**A

**文章编号:**1002-1302(2021)15-0147-03

坦布苏病毒属于黄病毒科黄病毒属蚊媒病毒类的恩塔亚病毒群,是一种具有包膜的单股正链 RNA 病毒,通过节肢动物的叮咬进行传播而导致宿主发病,主要引起 20 日龄以内的雏鸭出现严重的神经症状,死淘率增高及产蛋鸭的产蛋大幅下降<sup>[1]</sup>。坦布苏病毒基因组是单股正链 RNA,含有一个大型开放阅读框,可编码 7 种非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5)和 3 种结构蛋白(C、PM 和 E)<sup>[2]</sup>。NS5 在这几种蛋白中分子量是最大的,大约 100 ku,整个 NS5 蛋白具有 2 个功能域,分别是 N 端的甲基转移酶结构域和 C 端的 RNA 依赖的聚合酶结构域。NS5 蛋白甲基转移酶功能基团同时具有 N-7 和 2'-O 这 2 种甲基化功能,可以催化病毒遗传物质 RNA 的 5' 端形成一型的 RNA 帽子<sup>[3]</sup>,这一帽子结构对病毒具有重要作用,可以防止病毒遗传物质被宿主细胞内的核酸外切酶降解,辅助病毒完成免疫逃逸。

目前,在黄病毒属其他病毒,如登革病毒、西尼罗河病毒、黄热病毒、寨卡病毒上均有甲基转移酶的相关报导<sup>[4-5]</sup>,但在鸭坦布苏病毒上却鲜有研究。

本研究构建了鸭坦布苏病毒甲基转移酶基因的真核表达系统,并在哺乳动物细胞中高效表达 MTase 重组蛋白,旨在为进一步研究其功能、研发坦布苏病毒病的诊断、治疗方法奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒、细胞和载体

坦布苏病毒分离株(JS804)、BHK-21 细胞株、真核表达载体 pCMV-Flag,均由笔者所在实验室保存。*E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,购于 TaKaRa 公司。

### 1.2 主要试剂

限制性内切酶、Ex Taq DNA 聚合酶、pMD19-T 载体、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、蛋白质相对分子质量标准等,购自宝生物工程(大连)有限公司;体液病毒 RNA 提取试剂盒、质粒小量提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒,购自 Axygen 生物科技有限公司;脂质体转染试剂 lipofectamine 3000,购自 Invitrogen 公司;FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG,购于碧云天公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG,购于中杉金桥公司;DMEM 细胞培养基、胎牛血清,购自 Gibco 公司。

### 1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 中登录的坦布苏病毒 JS804 株(GenBank 登录号 JF895923) NS5 基因序列,设计 PCR 扩增引物,其中上游引物为 MTase-F:5'-CAGGGACCTCGAGATGGGAGGGGGAAGT-3',划线部分

收稿日期:2020-12-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:31502101);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(20)3093]。

作者简介:韩凯凯(1983—),男,河南新乡人,博士,副研究员,主要从事水禽疫病防控相关研究。E-mail:hankk0917@126.com。

为引入的 *Xho* I 酶切位点。下游引物为 MTase - R: 5' - CCAAGTCTTCCGCGGATTGCTCTTGTCAT - 3', 划线部分为引入的 *Sac* II 酶切位点。以上引物由南京金斯瑞生物有限公司合成, 预期扩增片段大小为 900 bp。

#### 1.4 DTMUV MTase 基因的扩增

按照 Axygen 公司体液病毒 RNA 提取试剂盒要求提取 DTMUV JS804 株的总 RNA, 并按照反转录试剂盒操作说明书, 合成反转录产物 cDNA。以 cDNA 为模板, MTase - F 和 MTase - R 为引物进行 PCR 扩增。扩增体系 (25.0  $\mu$ L 体系): 其中双蒸水 15.0  $\mu$ L, 10  $\times$  Ex PCR Buffer 2.5  $\mu$ L, 25 mmol/L  $MgCl_2$  1.5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP 2.0  $\mu$ L, 上、下游引物 (25.0 pmol/ $\mu$ L) 各 1.0  $\mu$ L, cDNA 产物 1.5  $\mu$ L, Ex Taq (5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L。PCR 反应程序: 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 56  $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 30 次循环; 72  $^{\circ}$ C 总延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 鉴定正确后按照琼脂糖 DNA 凝胶回收试剂盒操作说明进行产物回收纯化。回收的片段按照 pMD19 - T 载体说明书进行连接, 构建重组克隆质粒, 并转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 经 LB 固体培养基 37  $^{\circ}$ C 倒置过夜培养后, 挑取单菌落振荡培养 3 h, 并对菌液进行 PCR 鉴定。鉴定正确的菌液取 500  $\mu$ L 送至南京生工生物科技有限公司进一步测序, 鉴定正确后按照质粒提取试剂盒操作说明提取质粒。

#### 1.5 重组质粒 pCMV - Flag - MTase 的构建

用 *Xho* I、*Sac* II 对重组克隆质粒及 pCMV - Flag 载体双酶切, 电泳切胶回收, 将 2 种酶切后回收的片段按照适宜比例与  $T_4$  DNA 连接酶 16  $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 涂布于卡那霉素的平板, 37  $^{\circ}$ C 倒置过夜培养, 挑取单菌落进行菌液 PCR 鉴定, 鉴定正确的菌液扩大培养后提取质粒, 用 *Xho* I、*Sac* II 进行双酶切鉴定, 酶切鉴定正确的克隆送至南京擎科生物科技有限公司测序, 鉴定正确的重组质粒命名为 pCMV - Flag - MTase。

#### 1.6 BHK - 21 细胞的转染

按照质粒小量提取试剂盒要求提取 pCMV - Flag - MTase, 分光光度计测定其浓度。取处于对数生长期的 BHK - 21 细胞, 接种 24 孔细胞培养板, 细胞铺至细胞板约 90% 时进行转染。按照 lipofectamine 3000 转染试剂操作说明书制备 DNA - 脂质体混合物, 其中转染的 DNA 用量为 2.5  $\mu$ g。混匀后室温孵育 20 min, 将 DNA - 脂质体混合物均匀

铺到细胞中。

#### 1.7 间接免疫荧光鉴定

取质粒 pCMV - Flag - MTase 转染 24 h 后的 BHK - 21 细胞, PBS 洗涤 3 次, 采用 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min; PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 采用 0.5% triton X - 100 对细胞透化处理 10 min; PBS 洗涤 3 次, 5 min/次, 加入 1% BSA, 室温封闭 30 min; PBS 洗涤 3 次, 5 min/次, 然后加入事先制备的坦布苏病毒阳性小鼠血清 (1 : 1 000), 室温孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 5 min/次, 最后加入 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG (1 : 400), 室温孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 5 min/次, 倒置荧光显微镜下观察, 照相记录。

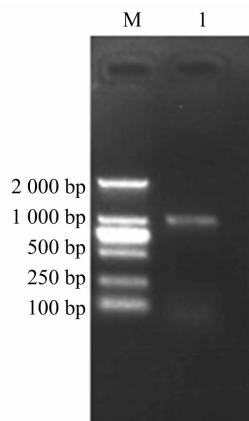
#### 1.8 Western Blot 鉴定

pCMV - Flag 及 pCMV - Flag - MTase 分别转染 BHK - 21 细胞, 48 h 后收集细胞, 提取细胞总蛋白, 测定蛋白浓度后经 Western Blot 检测该蛋白的表达情况。先进行 SDS - PAGE 电泳, 再经转膜、封闭, 然后以抗坦布苏病毒阳性小鼠血清为一抗, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗进行反应, ECL 显影观察结果。

## 2 结果与分析

#### 2.1 鸭坦布苏病毒 MTase 基因的 PCR 扩增

由图 1 可知, 以含有鸭坦布苏病毒 JS804 株全长基因的 cDNA 为模板, 采用所设计的特异性引物扩增 MTase 基因全长, 结果扩增的片段大小约为 900 bp, 与预期片段大小相符。



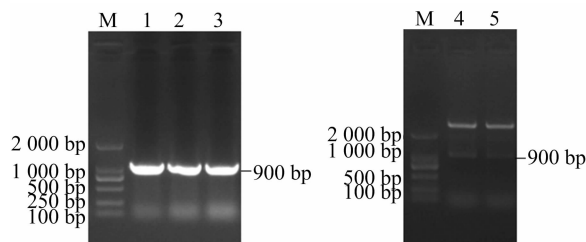
M—DL2000 分子质量标准; 1—*Mtase* 扩增片段

图1 鸭坦布苏病毒 *Mtase* 基因 PCR 扩增结果

#### 2.2 重组质粒 pCMV - Flag - MTase 的 PCR 和双酶切鉴定

由图 2 可知, 菌液 PCR 结果显示, 挑取的单克隆均为阳性, 可扩增得到与 MTase 大小一致的 DNA

片段。利用 *Xho*I、*Sac*II 对重组质粒 pCMV - Flag - MTase 进行双酶切,结果显示出现 2 条特异性的条带,一条大小约为 4 300 bp,为 pCMV - Flag 载体条带,另一条大小为 900 bp,与 MTase 大小一致。测序结果显示,MTase 基因序列与 GenBank 发布的序列同源性达 99%。结果表明真核质粒 pCMV - Flag - MTase 构建成功。

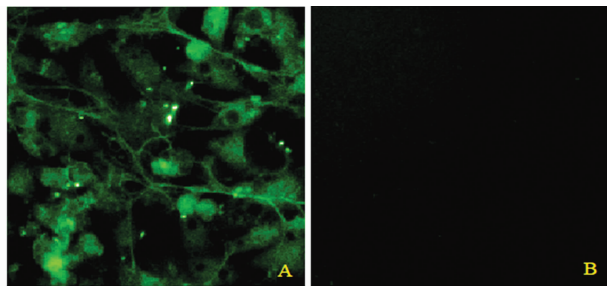


M—DNA 分子质量标准; 1~3—DTMUV MTase 基因的 PCR 产物; 4~5—pCMV-Flag-MTase 双酶切产物

图2 重组质粒 pCMV-Flag-MTase 鉴定结果

### 2.3 重组质粒 pCMV - Flag - MTase 的转染效果

采用脂质体转染试剂 lipofectamine 3000 介导 pCMV - Flag - MTase 转染至 BHK - 21 细胞,24 h 固定间接免疫荧光检测表达情况。通过倒置荧光显微镜观察,由图 3 可知,正常未转染细胞无绿色荧光,而重组质粒转染细胞能观测到绿色荧光,荧光多数位于细胞质中,表明重组质粒 pCMV - Flag - MTase 能成功转染至 BHK - 21 细胞中,其转染效率未受外源插入蛋白的影响。



A—pCMV-Flag-MTase 重组真核质粒; B—正常 BHK-21 空白对照

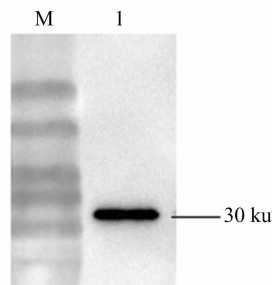
图3 重组质粒 pCMV-Flag-MTase 在 BHK-21 细胞中的表达情况(400×)

### 2.4 DTMUV MTase 在 BHK - 21 细胞中的表达

由图 4 可知,经 Western Blot 检验,重组 DTMUV MTase 蛋白与坦布苏病毒阳性小鼠血清能发生特异性结合,条带分子量大小约 30 ku,表明重组 DTMUV MTase 蛋白具有免疫反应活性。

## 3 讨论

鸭坦布苏病毒作为黄病毒科、黄病毒属、恩塔



M—蛋白质分子质量标准; 1—pCMV-Flag-MTase 目的蛋白

图4 DTMUV MTase 蛋白表达检测

亚病毒群的重要成员,自 2010 年 4 月以来,该病迅速传播到我国绝大部分养鸭地区,不仅给养鸭业带来了很大经济损失,而且极大地影响和制约了我国养鸭业乃至畜牧业的稳定健康发展<sup>[2]</sup>。因此,除了快速研制针对性的疫苗外,深入探索坦布苏病毒致病性、病毒蛋白质的结构功能及快速简便的临床检测方法,也成为现阶段防控坦布苏病毒病发生的重要手段。

NS5 蛋白是坦布苏病毒基因组编码最大的蛋白质,蛋白质分子量可达 100 ku,是黄病毒中最为保守的蛋白。而坦布苏病毒 NS5 蛋白的 N 端前 900 bp 为甲基转移酶活性的主要活性区,同时具有 N - 7 和 2' - O 这 2 种甲基转移酶活性且对 RNA 序列有依赖性,参与病毒基因组 RNA 复制。有研究发现,当 MTase 的甲基化位点发生突变时,其病毒复制的能力将显著降低<sup>[6]</sup>。同时,MTase 蛋白对宿主抗病毒反应也有拮抗作用,西尼罗病毒 MTase 蛋白的 2' - O 甲基化功能区可以下调一种干扰素诱导产生蛋白的表达,进而使病毒逃避宿主的天然免疫反应,具体作用机制和生物学反应过程迄今尚不明确<sup>[7]</sup>。鉴于此,MTase 作为 DTMUV 的主要蛋白酶,与其他非结构蛋白共同作为病毒基因组复制和转录的载体,负责蛋白翻译后的切割、修饰等重要过程,在 DTMUV 病毒粒子成熟和复制过程中承担重要角色。又由于 MTase 在黄病毒属病毒中具有高度保守的氨基酸序列<sup>[7]</sup>,因此可以作为研究抗坦布苏病毒相关药物和疫苗的关键靶标。目前,关于坦布苏病毒 MTase 蛋白相关研究较少,本研究通过克隆 DTMUV MTase 蛋白编码基因,并成功克隆至 pCMV - Flag 真核表达载体,通过间接免疫荧光和 Western Blot 试验检测,发现 MTase 蛋白表达成功。本研究获得的重组坦布苏病毒 MTase 蛋白可作为包被抗原,建立 ELISA 方法来检测血清中的抗体水平,亦可以用来筛选具备诊断功能/中和活性的单

逯云召,于燕光,马超,等.不同生物饵料对口虾蛄幼体发育的影响[J].江苏农业科学,2021,49(15):150-154.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.15.028

# 不同生物饵料对口虾蛄幼体发育的影响

逯云召<sup>1</sup>,于燕光<sup>1</sup>,马超<sup>1</sup>,贾磊<sup>1</sup>,薄其康<sup>1</sup>,孙晓旺<sup>2</sup>,陈春秀<sup>1</sup>

(1.天津市水产研究所,天津 300221;2.天津市农村社会事业发展服务中心,天津 300384)

**摘要:**为研究不同生物饵料对口虾蛄幼体发育的影响,将口虾蛄幼体期分为 11 期( $Z_1 \sim Z_{11}$ ),其中  $Z_1$ 、 $Z_2$  不摄食, $Z_3$  以后开口摄食。根据试验设计,将苗种投喂分为 3 个阶段,第一阶段为  $Z_3 \sim Z_6$ ,第二阶段  $Z_7 \sim Z_8$ ,第三阶段  $Z_9 \sim Z_{11}$ 。在各阶段分别投喂小球藻、轮虫、卤虫无节幼体、卤虫和桡足类以筛选适宜饵料并在此基础上开展第一饵料养殖试验。结果表明,在口虾蛄幼体发育过程中,单一饵料无法满足口虾蛄幼体发育需求。随着幼体发育,需要及时更换、添加新的饵料,从规格、营养上满足幼体摄食需求,保证幼体的能量供应,促进发育。本研究中,各阶段分别投喂不同饵料, $Z_3 \sim Z_6$  投喂卤虫无节幼体, $Z_7 \sim Z_8$  投喂卤虫无节幼体 + 桡足类, $Z_9 \sim Z_{11}$  投喂卤虫均是可行的。

**关键词:**口虾蛄;幼体发育;生物饵料

**中图分类号:** S968.22 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)15-0150-05

口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)俗称皮皮虾、螳螂虾、濞尿虾,广泛分布于我国各海区,是重要的海洋经济甲壳类,其肉蛋白含量高,氨基酸含量丰富、口味鲜美,深受广大消费者喜爱<sup>[1]</sup>。由于海洋污染及过度捕捞等原因,造成海洋渔业资源逐渐枯竭,其捕获量逐年降低,市场价格不断攀升,因此开展口虾蛄全人工繁育,对这一优质品种进行开发利用保护势在必行。

国内外学者经过多年试验,在口虾蛄的基础生物学、亲本培育、人工繁育等方面均取得一定成果。日本学者 Hamano 对虾蛄产卵孵化、幼苗发育、生长变态等方面进行了详细的研究,为口虾蛄全人工繁育及养殖奠定了基础<sup>[2-4]</sup>。菅腾在室内人工模拟条件下,对口虾蛄行为特征进行观察研究,发现在自然光条件下,口虾蛄有明显昼夜节律,并对其洞穴选择、游动、领域和清洁行为做了详细描述<sup>[5]</sup>。王波对口虾蛄幼苗基本生物学特征进行研究,具体描述了亲本习性、繁殖特征、幼苗发育分期的主要特征<sup>[6-7]</sup>。刘海映对口虾蛄人工繁育做了多年研究,观察描述了口虾蛄受精卵胚胎发育,度量了幼体早期发育的形态特征,比较幼体各发育期消化酶活性,分析各阶段饵料食性,指出口虾蛄幼体发育过程中其食性存在明显由偏植食性向肉食性转换,口虾蛄仔虾表现出纯肉食性<sup>[8-11]</sup>。张年国对口虾蛄

收稿日期:2020-11-02

资助项目:天津市水产局青年科技创新项目(编号:J2018-01);天津市水产研究所创新团队项目;国家海水鱼产业技术体系天津综合试验站(编号:CARS-47-Z01);天津市农业发展服务中心青年科技创新项目(编号:zxkj202117)。

作者简介:逯云召(1985—),男,河北石家庄人,硕士,工程师,主要从事海水经济品种增养殖研究。E-mail:luyunzhao702@126.com。

通信作者:马超,硕士,工程师,主要从事海水经济品种增养殖研究。E-mail:bhsmachao@163.com。

克隆抗体,此外,还为研究坦布苏病毒的感染致病机制提供了基础。

## 参考文献:

- [1]吴双,姜勇,徐建生,等.鸭坦布苏病毒、鸭肠炎病毒和番鸭细小病毒 TaqMan 三重实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与临床应用[J].江苏农业学报,2020,36(3):626-633.
- [2]杨志远,段会娟,王小蕾,等.4株鸭坦布苏病毒的毒力、E基因序列和抗原差异性[J].中国农业科学,2019,52(23):4406-4414.
- [3]Egloff M P, Benarroch D, Selisko B, et al. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase

NS5: crystal structure and functional characterization[J]. The EMBO Journal, 2002, 21(11): 2757-2768.

- [4]Geiss B J, Thompson A A, Andrews A J, et al. Analysis of flavivirus NS5 methyltransferase cap binding[J]. Journal of Molecular Biology, 2009, 385(5): 1643-1654.
- [5]Zhou H, Wang F, Wang H, et al. The conformational changes of Zika virus methyltransferase upon converting SAM to SAH[J]. Oncotarget, 2017, 8(9): 14830-14834.
- [6]周希珍,赵慧,高岚,等.虫媒黄病毒 NS5 蛋白的生物学功能研究进展[J].军事医学,2012,36(1):70-72.
- [7]Dong H, Zhang B, Shi P Y. Flavivirus methyltransferase: a novel antiviral target[J]. Antiviral Research, 2008, 80(1): 1-10.