

## 研究报告

## 大肠杆菌表达 SLA-3 蛋白与口蹄疫病毒多肽的复性研究

杨杰<sup>1</sup> 韩勇<sup>1</sup> 高花<sup>1</sup> 许崇波<sup>1</sup> 刘军<sup>2\*</sup> 高凤山<sup>1\*</sup>

(1. 大连大学生命科学与技术学院 辽宁 大连 116622)

(2. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 北京 100050)

**摘要:**【目的】研究大约克猪 SLA-3 (SLA-3-YDY)蛋白在体外与口蹄疫病毒多肽的复性。【方法】设计 SLA-3-YDY 胞外区引物, PCR 扩增目的基因, 并将此片段克隆至 pMD19-T Simple Vector 上, 双酶切筛选出阳性克隆并测序, 测序正确的片段连接至表达载体 pET-21a(+)上, 转化大肠杆菌感受态 BL21 细胞中, IPTG 诱导, SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达。超声破碎菌体, 提取包涵体蛋白, 通过稀释复性法将重链 SLA-3-YDY、轻链  $s\beta_2m$  和口蹄疫病毒多肽 Hu52 按摩尔比 1:1:1 加入复性液, 经分子筛层析纯化并检测复合物是否复性。【结果】PCR 扩增获得 SLA-3-YDY 目的基因, 经测序阳性克隆序列与原序列一致。经酶切鉴定, 证明目的基因与 pET-21a(+)载体成功连接, 经 IPTG 诱导表达、SDS-PAGE 检测, 显示目的基因表达, 大小约 33 kD, SDS-PAGE 检测包涵体蛋白, 证明包涵体蛋白大小与菌体蛋白大小一致。分子筛及 SDS-PAGE 检测发现, 通过稀释复性法实现了重链、轻链和多肽的复性, 并得到蛋白复合物 SLA-3-Hu52- $s\beta_2m$  (45 kD)。【结论】构建了大约克猪 SLA-3 原核表达载体, 获得目的蛋白, 实现了口蹄疫病毒多肽 Hu52 与 SLA-3 重链及轻链的复性, 为今后进一步研究 SLA-3 的结构和功能奠定基础。

**关键词:** 大约克猪, SLA-3, 原核表达载体, 构建, 纯化

Expression of SLA-3 in *Escherichia coli* and refolding the protein with peptides derived from foot-and-mouth disease virusYANG Jie<sup>1</sup> HAN Yong<sup>1</sup> GAO Hua<sup>1</sup> XU Chong-Bo<sup>1</sup> LIU Jun<sup>2\*</sup> GAO Feng-Shan<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

(2. National Institute for Viral Disease Control and Prevention of Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

**Abstract:** [Objective] To study the refolding between SLA-3-YDY protein derived from Yorkshire swine and peptides derived from foot-and-mouth disease virus *in vitro*. [Methods] A pair of primers

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31172304); Liaoning Education Bureau Key Laboratory Project (No. LZ2015003)

\*Corresponding authors: E-mail: LIU Jun: clevia@126.com; GAO Feng-Shan: gfsh0626@126.com

Received: February 25, 2016; Accepted: March 29, 2016; Published online (www.cnki.net): June 08, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31172304); 辽宁省教育厅重点实验室项目(No. LZ2015003)

\*通讯作者: E-mail: 刘军: clevia@126.com; 高凤山: gfsh0626@126.com

收稿日期: 2016-02-25; 接受日期: 2016-03-29; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-06-08

was designed to amplify the extracellular domain of SLA-3-YDY and then the PCR product was cloned into pMD19-T Simple Vector. After cleaved by *Nde* I and *Xho* I, the positive clones were selected to be sequenced. Analyzed by biological soft, the cloned product with correct sequences was selected to be inserted into pET-21a(+) and transformed into BL21. After induction with IPTG, the interest of protein was detected by SDS-PAGE. The bacteria were broken ultrasonically, then inclusion body from the bacteria was isolated. The heavy chain of SLA-3-YDY, light chain  $\beta_2m$  and the epitope-peptides Hu52 from foot-and-mouth disease virus (FMDV), were refolded at a ratio of 1:1:1 in diluted refolding buffer followed by purification in molecular sieve of superdex 200 to detect whether the complex was refolded. **[Results]** The PCR result shows that the SLA-3-YDY gene was amplified successfully. After sequencing and analysis, the sequence of the positive clone of SLA-3-YDY was consistent with the primary sequence. By cleavage, the interest of gene was proved to be successfully inserted into pET-21a(+) Vector. After induction with IPTG and SDS-PAGE detection, the interest of gene was expressed and the molecular weight was about 33 kD. The isolated inclusion body was also detected by SDS-PAGE, and it was shown that the molecular weight of the inclusion body was consistent with the interest of protein. By refolding in a dilution system, the heavy chains of SLA-3, peptides and light chain succeed to be refolded *in vitro*. Then, by using the molecular sieve column to separate and purify the refolded proteins and detection by SDS-PAGE, it was shown that the complex protein of SLA-3-Hu52- $\beta_2m$  were obtained (45 kD) finally. **[Conclusion]** The prokaryotic expressing vector of SLA-3 derived from Yorkshire swine was constructed successfully in this research, and the interest of protein was obtained so as to the SLA-3-Hu52- $\beta_2m$  complex was refolded finally, which will lay a base to study the structure and function of the SLA-3-YDY in future.

**Keywords:** Yorkshire swine, SLA-3, Prokaryotic expressing vector, Construction, Purification

主要组织相容性复合体(Major histocompatibility complex, MHC)是由一组紧密连锁的基因群构成, 编码主要组织相容性抗原, 主要分布于脊椎动物染色体的某一特定区域, 在启动机体免疫应答中发挥重要作用<sup>[1-2]</sup>。猪的MHC也称猪白细胞抗原(Swine leukocyte antigen, SLA), 位于猪的第7号染色体上, 分为SLA-I、SLA-II、SLA-III, 其中SLA-I在内源性抗原肽的递呈中起重要作用, 分为重链和轻链。重链分子含3个功能基因, 分别为SLA-1、SLA-2、SLA-3; 轻链分子只含有1个等位基因 $\beta_2m$ ; 二者通过非共价键结合, 在机体内递呈内源性多肽<sup>[3-8]</sup>。夏春课题组报道了SLA-1\*1502结合猪蓝耳病病毒表位多肽(TMPPGFELY)的复合物结构, 为SLA-I类分子递呈病毒抗原肽的研究提供了结构基础<sup>[9]</sup>。同年, 该课题组又报道了SLA-1\*0401结合猪源甲型流感H1N1抗原肽(NSDTVGWSW)及埃博拉抗原肽(ATAAATEAY)的复合物结构<sup>[10]</sup>, 结果显示SLA-1\*0401第156位的

精氨酸在抗原肽结合中起关键作用, 两种抗原肽以相似的构象结合SLA-1\*0401, 不同之处在于二者使用不同的水分子来稳定它们的结合; 通过对比发现, SLA-1\*0401与HLA-A\*0101以不同的构象递呈相似的抗原肽, 证明了多肽表位的跨种间递呈。本课题组也对荷包猪SLA-1及SLA-2基因的分子学特性进行研究, 并通过三维建模对荷包猪SLA-2的三维结构进行了分析<sup>[11-12]</sup>。2006年, 本课题组也报道了利用体外构建具有开放抗原多肽结合槽的猪SLA-I复合体以结合和筛选口蹄疫病毒9肽的研究<sup>[1]</sup>, 表明重组的SLA-2-(G4S)<sub>3</sub>- $\beta_2m$ 蛋白复合物可用于鉴别九肽, 即候选T细胞表位。目前, 对SLA-3与多肽结合的研究未见报道。本课题在前期研究的基础上, 拟选用大约克猪SLA-3基因进行体外原核表达, 并与口蹄疫病毒多肽进行体外复性, 以检测SLA-3的多肽结合功能, 并为今后研究大约克猪SLA-3的晶体结构解析奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种、载体、质粒:** SLA-3-YDY/pMD19-T、表达载体 pET-21a(+)及 *Escherichia coli* Top10、*Escherichia coli* BL21(DE3)菌株及 sβ<sub>2</sub>m 的 pET-21a 表达菌由大连大学生命科学与技术学院分子免疫学实验室保存, pMD19-T Simple Vector 购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** ExTaq 酶、Nde I、Xho I、T4 DNA Ligase 购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司; 胰蛋白胨、酵母提取物、NaCl、IPTG、氨苄青霉素、DNA 胶回收试剂盒、SanPrep 柱式质粒小量提取试剂盒购自上海生工有限公司; L-Arg-HCL、还原性谷胱甘肽(GSH)、氧化性谷胱甘肽(GSSG)购自 Amresco; Tris 购自 GIBCO-BRL 公司。

PCR 仪、凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司; JY92-II 超声波细胞破碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Biofuge 台式冷冻高速离心机、低温高速离心机, 德国 Heraeus 公司 Thermo 子公司; AKTA Purifier 蛋白纯化仪、Superdex 200 pg HiLoad 16/600 预装柱, 美国 GE Healthcare 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 引物设计:** 以 SLA-3-YDY 为模板设计扩增胞外区基因引物, pSLA-3F: 5'-GGGAATTCCATATGGGCCCCGATTCTCTGAGATATTTC-3' (下划线代表 Nde I 酶切位点); pSLA-3R: 5'-AGTCTCGAGTTAAGGGTCCCATCTCAGGGTGAGG-3' (下划线代表 Xho I 酶切位点)。

**1.2.2 SLA-3-YDY 基因亚克隆:** 以 SLA-3-YDY-pMD19-T 质粒为模板, pSLA-3F/pSLA-3R 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL)为: H<sub>2</sub>O 37.5 μL, 10×ExTaq buffer 5 μL; dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL, pSLA-3F (25 μmol/L) 1 μL, pSLA-3R (25 μmol/L) 1 μL, SLA-3-YDY 全基因组质粒 1 μL, ExTaq 酶(5 U/μL) 0.5 μL。PCR 反应条件为: 94 °C

5 min; 94 °C 45 s, 65 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, DNA 胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

**1.2.3 SLA-3-YDY 基因克隆:** 将回收后的目的基因 16 °C 连接到 pMD19-T Simple Vector 上, 并转化 Top10 感受态宿主菌, 经含 Amp (100 mg/L)抗性的 LB 培养基<sup>[13]</sup> 37 °C 培养过夜后, 挑取单克隆于含 Amp 抗性的 LB 液体培养基中 37 °C、200 r/min 振荡培养, 13 000 r/min 离心 1 min 收集菌体, 碱裂解法提取质粒, Xho I 和 Nde I 双酶切筛选得到阳性克隆, 并送至上海生工有限公司测序。

**1.2.4 SLA-3-YDY 表达载体构建:** 经测序正确的阳性重组菌再提取质粒, 经 Nde I 和 Xho I 双酶切后, 回收插入的目的基因片段, 16 °C 连接至 pET-21a(+)表达载体上, 并转化 BL21 感受态宿主菌, 经含 Amp 抗性的 LB 培养基 37 °C 培养过夜后, 挑取单克隆于含 Amp 抗性的液体培养基 37 °C、200 r/min 振荡培养, 13 000 r/min 离心 1 min 收集菌体, 碱裂解法提取质粒, 将 Nde I 和 Xho I 双酶切鉴定为阳性的重组质粒送上海生工有限公司测序。阳性重组质粒命名为 pET-21a/SLA-3-YDY。重组表达载体的构建如图 1 所示。

**1.2.5 目的基因的诱导表达及检测:** 将鉴定为阳性的重组菌 100 μL 加入含有 Amp (100 mg/L)抗性的 5 mL LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养, 当 OD 值达到 0.4–0.6 时加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 继续培养 5 h, 取 1 mL 菌液, 13 000 r/min 离心 1 min 收集菌体, 加上样缓冲液变性, 沸水煮 3–5 min 后 12%的 SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达<sup>[14]</sup>。

**1.2.6 SLA-3-YDY 及 sβ<sub>2</sub>m 包涵体提取:** 按 1.2.5 中方法接菌 1 L, 37 °C 进行诱导表达, 然后 4 °C 条件下 6 000 r/min 离心 20 min 收集菌体, PBS 重悬, 冰浴超声破碎, 350 W, 超声 6 s, 间隔 12 s, 99 次(超声条件可根据需要自行调整), 12 000 r/min 离

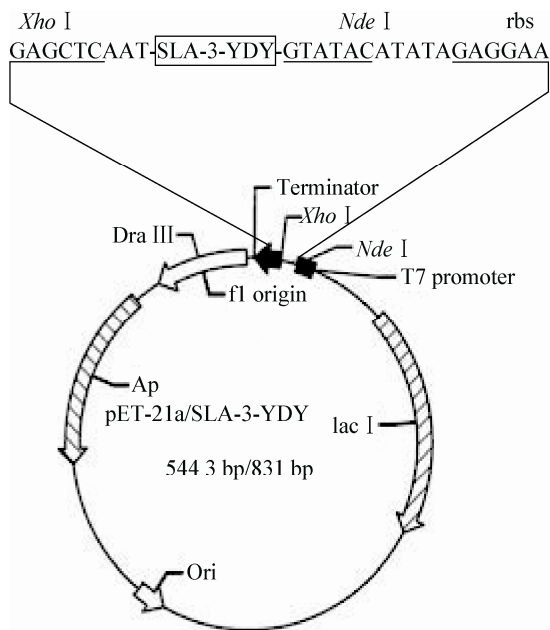


图1 大约克猪 SLA-3 原核表达载体的构建

Figure 1 Construction of the prokaryotic expressing vector of SLA-3 derived from Yorkshire swines

注: *Nde* I 和 *Xho* I 为限制性酶切位点; 插入片段为 SLA-3-YDY; 自带终止密码子 TAA, 插入片段 831 bp, 载体大小为 5443 bp.

Note: *Nde* I and *Xho* I are restriction enzyme sites; The inserted fragment is SLA-3-YDY with the stop codon TAA and the inserted fragment length is 831 bp, while the size of vector is 5443 bp.

心 20 min 收集沉淀, Washing buffer (0.5% Triton-100、pH 8.0 50 mmol/L Tris、100 mmol/L NaCl、10 mmol/L EDTA、1 mmol/L DTT)洗涤 2 次, Resuspending buffer (pH 8.0 50 mmol/L Tris、100 mmol/L NaCl、10 mmol/L EDTA、1 mmol/L DTT)洗涤 1 次, 最后 Dissolution buffer (6 mol/L Gua-HCl 或 8 mol/L Urea、10%甘油、pH 8.0 50 mmol/L Tris、100 mmol/L NaCl、10 mmol/L EDTA、10 mmol/L DTT)溶解包涵体, 并进行 SDS-PAGE 检测。

**1.2.7 重链 SLA-3-YDY、轻链  $s\beta_2m$  及其口蹄疫病毒表位多肽的体外结合:** 重链 SLA-3-YDY、轻链  $\beta_2m$  与口蹄疫病毒表位肽(Hu52: LMQTPAHTL)在体外结合试验(全部过程 4 °C 条件下进行)。口蹄疫多肽 Hu52 来源于 O 型口蹄疫病毒 HQ116229-FMDV-O-HuBHK99 的 VP1 抗原 52–60 氨基酸, 通

过 NetMHCpan 2.8 Server (<http://genome.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>)设计, 由上海强耀生物科技有限公司合成。

配制 Refolding buffer 500 mL (pH 8.0 100 mmol/L Tris、400 mmol/L L-ArgHCl、2 mmol/L EDTA、5 mmol/L GSH、0.5 mmol/L GSSG、0.5 mmol/L PMSF), 缓慢搅拌至完全溶解。

用 5 mL 注射器将溶解后的轻链包涵体逐滴加入到 Refolding buffer 中, 慢慢搅拌 8–10 h, 然后加入多肽, 8–10 h 后加入重链包涵体(分 3 次加, 每次间隔 8–10 h), 保证重链与轻链及多肽的摩尔比为 1:1:1。

复性后, 用浓缩杯浓缩样品换液(换为适合此蛋白的缓冲液, 一般为分子筛缓冲液), 然后转至浓缩管, 若复性体系小可直接用浓缩管浓缩换液(复性液在换液后可能会出现大量沉淀, 可低温离心去沉淀后继续浓缩)。待浓缩至适合的上样体积(约 1 mL), 准备样品进行分子筛纯化。

**1.2.8 分子筛及 SDS-PAGE 鉴定多肽结合:** 将浓缩好的蛋白样品 4 °C、13 000 r/min 离心 10 min 去沉淀, 更换新的 EP 管, 继续离心 10 min, 直至管底没有沉淀, 将蛋白样品以 1 mL/min 的流速通过层析柱(保证无气泡进入蛋白纯化系统), 按  $OD_{280} > 25$  mAU 的标准进行样品收集, 每管 1.8 mL, 取峰处的蛋白样品制备进行 SDS-PAGE (12%)鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增结果

PCR 扩增后, 扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 在 850 bp 左右出现条带, 与 SLA-3-YDY 胞外区计算值大小 851 bp 相符, 见图 2。

### 2.2 亚克隆质粒酶切鉴定

SLA-3-YDY 基因片段胶回收后与 pMD19-T Simple Vector 载体连接, 转化感受态细胞 *Escherichia coli* Top10 中, 提取质粒, 经 *Nde* I 和 *Xho* I 限制性内切酶酶切, 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测, 筛选得到阳性克隆, 见图 3。

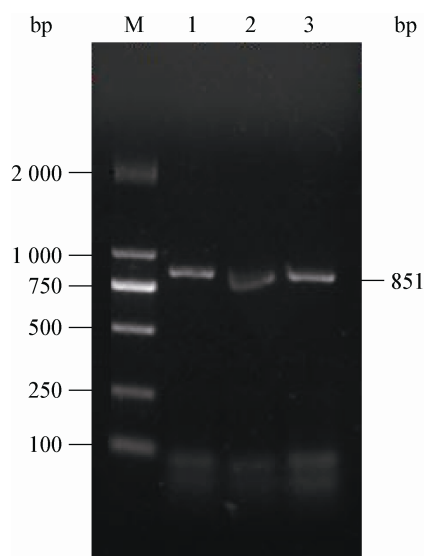


图2 PCR 扩增大约克猪 SLA-3 基因

Figure 2 Amplification by PCR of SLA-3 from Yorkshire swine

注：M：DL2000 分子量标准；1-3：PCR 扩增 SLA-3-YDY，扩增长度为 851 bp。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1-3: Amplification of SLA-3-YDY with 851 bp by PCR.

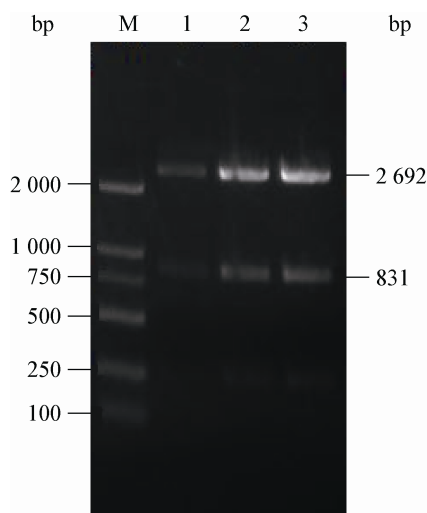


图3 重组质粒双酶切鉴定

Figure 3 Identification of the recombinant plasmids by using *Nde* I and *Xho* I

注：M：DL2000 分子量标准；1-3：双酶切鉴定重组质粒，插入片段大小为 831 bp，载体大小为 2 692 bp。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1-3: Using *Nde* I and *Xho* I to cleave and identify the recombinant vector. The inserted fragment is 831 bp and the vector is 2 692 bp.

## 2.3 SLA-3-YDY 表达载体构建及鉴定

*Nde* I、*Xho* I 双酶切阳性克隆质粒，回收 SLA-3-YDY 基因片段，连接至 pET-21a 载体，转化感受态细胞 *Escherichia coli* BL21，提取质粒并进行双酶切检测，1.0%琼脂糖凝胶显示插入片段大小约 830 bp，与计算值 831 bp 大小一致，见图 4。

## 2.4 SLA-3-YDY 基因的诱导表达

重组菌经 IPTG 诱导表达目的基因后，12% SDS-PAGE 检测，结果发现在 33 kD 左右出现一条表达带，与目的蛋白理论值 33 kD 相符合，如图 5 所示。

## 2.5 SLA-3-YDY 包涵体提取

SDS-PAGE 检测包涵体蛋白，结果显示包涵体蛋白约 33 kD，与目的蛋白大小一致，且在提取过程中除去了部分杂蛋白，目的蛋白得到纯化；提取得到较纯的  $s\beta_2m$  包涵体蛋白，蛋白大小约 12 kD，如图 6、7 所示。

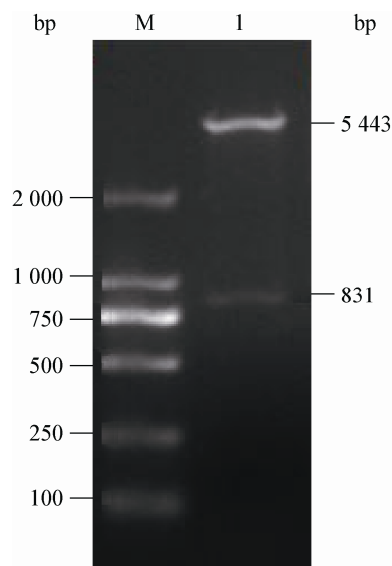


图4 重组质粒 pET-21a/SLA-3-YDY 双酶切鉴定

Figure 4 Identification of the recombinant plasmids pET-21a/SLA-3-YDY by using *Nde* I and *Xho* I

注：M：DL2000 分子量标准；1：双酶切鉴定重组质粒，插入片段大小为 831 bp，载体大小为 5 443 bp。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1: Using *Nde* I and *Xho* I to cleave and identify the recombinant vector. The inserted fragment is 831 bp and the vector is 5 443 bp.

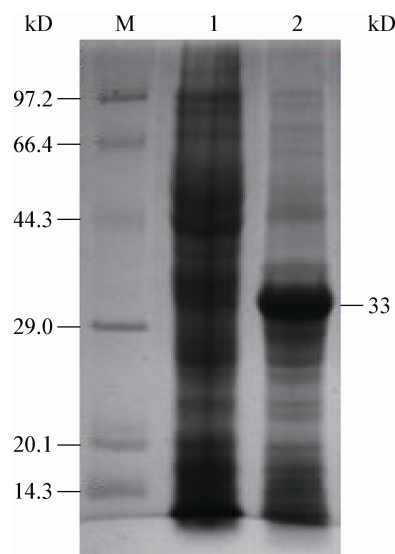


图 5 SDS-PAGE 检测 SLA-3-YDY 表达  
Figure 5 Detection of the expression of the SLA-3-YDY proteins with SDS-PAGE  
注：M：低分子量标准蛋白 Marker；1：目的基因在 BL21 中未诱导表达；2：目的基因在 BL21 中经 IPTG 诱导 5 h 表达。  
Note: M: The low protein molecular weight marker; 1: Expression of SLA-3-YDY in uninduced BL21; 2: Expression of SLA-3-YDY in induced BL21 for 5 hours.

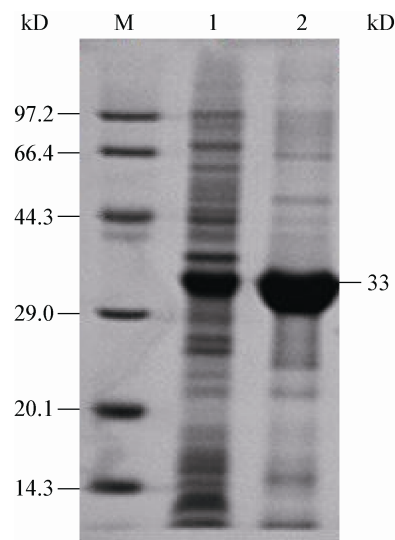


图 6 SDS-PAGE 检测 pET-21a/SLA-3-YDY  
Figure 6 Detection of the inclusion body of the SLA-3-YDY with SDS-PAGE  
注：M：低分子量标准蛋白 Marker；1：目的基因在 BL21 中经 IPTG 诱导表达；2：pET-21a/SLA-3-YDY 包涵体。  
Note: M: The low protein molecular weight marker; 1: Expression of SLA-3-YDY in induced BL21; 2: Inclusion body of the SLA-3-YDY.

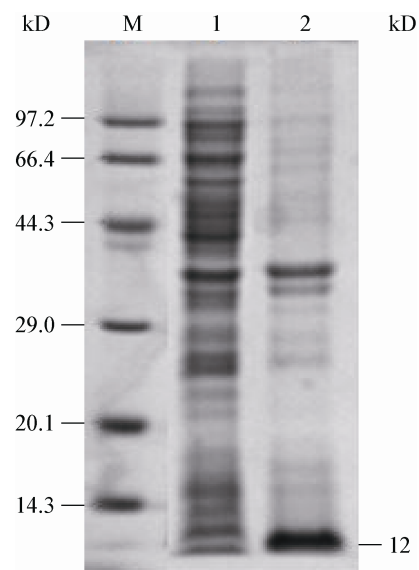


图 7 SDS-PAGE 检测 pET-21a/sβ<sub>2</sub>m 包涵体  
Figure 7 Detection of the inclusion body of the sβ<sub>2</sub>m by SDS-PAGE  
注：M：低分子量标准蛋白 Marker；1：目的基因在 BL21 中经 IPTG 诱导表达；2：pET-21a/sβ<sub>2</sub>m 包涵体。  
Note: M: The low protein molecular weight marker; 1: Expression of sβ<sub>2</sub>m in induced BL21; 2: Inclusion body of the sβ<sub>2</sub>m.

## 2.6 重链 SLA-3-YDY、sβ<sub>2</sub>m 及口蹄疫病毒表位多肽的体外结合及鉴定

将大约克猪重链 SLA-3、口蹄疫病毒表位多肽 Hu52、轻链 sβ<sub>2</sub>m 进行体外稀释复性，通过分子筛及 SDS-PAGE 鉴定其是否复性，分子筛与 SDS-PAGE 结果如图 8 所示。试验中通过分子筛凝胶层析柱 Hiload10/600 Superdex 200 pg 纯化的蛋白复性样品中包含了 SLA-3 重链、口蹄疫病毒表位多肽 Hu52 及轻链 sβ<sub>2</sub>m，复合物大小约 45 kD，出峰位置约在 75–90 mL 之间，不同蛋白出峰位置有所差异，但蛋白复性情况只有一种，即重链与轻链摩尔比为 1:1 (SDS-PAGE 图中重链与轻链浓度比为 3:1)，实验结果与之相符，如图 8 所示；而不复性的蛋白质情况如下：只有重链聚合、重链轻链摩尔比例不为 1:1 或只有轻链。

## 3 讨论

大约克猪原产地位于英国的约克郡及其邻近的地区，适宜各地集约化、规模化猪场饲养，育



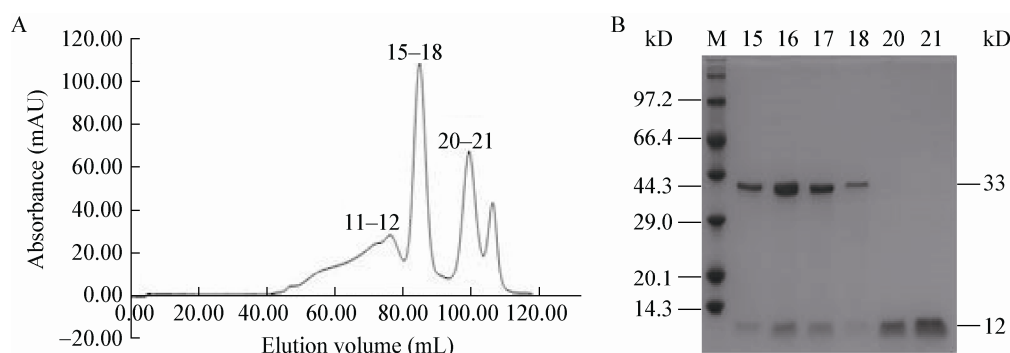


图 8 SLA-3-Hu52-s $\beta_2$ m 分子筛和 SDS-PAGE 检测图(复性)

Figure 8 Detection of SLA-3-Hu52-s $\beta_2$ m by molecular sieve and SDS-PAGE (refolding)

注：A：分子筛图片；B：SDS-PAGE 图片。

Note: A: Molecular sieve; B: SDS-PAGE.

成至今已有一百多年的历史<sup>[15]</sup>，是世界上分布最广的优良猪种，也是我国引进的几大瘦肉型品种之一。目前，该品系猪已在国内大量饲养，研究该品系猪 SLA-3 的结构和功能对今后针对性地制定疾病预防策略及进行种间遗传育种的研究提供指导意义。

为了研究该品系猪 SLA-3 的结构和功能，需要对该品系猪 SLA-3 进行表达载体的构建和体外表达研究。为了获得大量的 SLA-3 蛋白，选择比较成熟的 pET 系列原核表达载体。其中 pET-21a(+) 是应用最成熟的用于蛋白结构研究的载体。因为该载体多克隆位点两端的酶切位点 *Nde* I 和 *Xho* I 将 5'端标签序列 His 包括进去，因此构建的重组蛋白将不带有任意标签序列，这样就保证了蛋白的天然结构<sup>[16]</sup>。本研究采用了这两个酶切位点，通过酶切鉴定，证明目的片段成功插入表达载体，插入片段大小为 831 bp (去掉酶切位点相关序列)。另据文献<sup>[17]</sup>报道，pET-21a(+)系列表达载体主要以包涵体表达，这样可以获得大量的表达蛋白。通过 SDS-PAGE 检测(图 5 和 6)，结果显示 SLA-3-YDY 在菌体中呈现优势表达，而且提取到包涵体蛋白。在包涵体蛋白的提取过程中，蛋白获得了一定程度的纯化，从而在一定程度上避免了携带 His 标签带来的纯化步骤，可以节约时间和材料。

为了研究 SLA-3-YDY 的功能，需要进一步对其进行体外复性研究。SLA-3、SLA-1 和 SLA-2 一同构成猪 SLA-I 类分子的 3 个功能基因，其中 SLA-3 与 SLA-1 的基因特征比较相似，但多态性不如 SLA-1 和 SLA-2 丰富<sup>[18]</sup>。据已有的研究报道<sup>[19-20]</sup>，SLA-1 和 SLA-2 主要起多肽结合和抗原递呈功能，因此推测 SLA-3 也能够与多肽结合。为此，课题组设计了 O 型口蹄疫病毒流行毒株 HQ116229-FMDV-O-HuBHK99 VP1 蛋白 Hu52 多肽，通过与重链 SLA-3-YDY 和轻链 s $\beta_2$ m 稀释复性，获得了 SLA-3-Hu52-s $\beta_2$ m 复合物蛋白，证明 SLA-3-YDY 具有结合多肽的功能，也说明稀释复性可以使变性的包涵体蛋白恢复蛋白的正确折叠，这与研究报道一致<sup>[21-22]</sup>。在分离纯化 SLA-3-Hu52-s $\beta_2$ m 的过程中，采用了分子筛 Superdex 200，从结果(图 8)发现，SLA-3-Hu52-s $\beta_2$ m 复合物蛋白纯度在 90%以上，复合物出峰位置在 85 mL。进一步通过 SDS-PAGE 检测，显示该峰处蛋白为已经正确折叠的复合物蛋白，从而实现了 SLA-3-Hu52-s $\beta_2$ m 复合物蛋白分离纯化，且蛋白纯度适合进行下一步的晶体结构研究。通过本研究可以发现，在重链、轻链和多肽复性过程中，起关键作用的是多肽，本次实验所设计的 O 型口蹄疫病毒多肽 Hu52 来源于口蹄疫病毒结构蛋白 VP1，该结构蛋白为口蹄疫病毒的保护性抗原肽段，推测 Hu52 具有一定的刺

激 T 细胞免疫应答的功能。要验证 Hu52 的功能, 需要做进一步的细胞免疫实验和动物实验。

本研究构建了大约克猪 SLA-3 原核表达载体, 实现了大肠杆菌表达 SLA-3-YDY, 获得了包涵体蛋白, 实现了 SLA-3-YDY 与口蹄疫多肽 Hu52 及轻链  $\beta_2m$  的复性, 为进一步研究 SLA-3-YDY 的晶体结构及抗原递呈功能等奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Gao FS, Fang QM, Li YG, et al. Reconstruction of a swine SLA-I protein complex and determination of binding nonameric peptides derived from the foot-and-mouth disease virus[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2006, 113(3/4): 328-338
- [2] Li QW, Song DL, Guo RY. The origin and evolution on major histocompatibility complex[J]. Journal of Liaoning Normal University (Natural Science Edition), 2011, 34(2): 216-219 (in Chinese)  
李庆伟, 宋德利, 郭仁勇. 主要组织相容性复合体(MHC)的起源与进化概述[J]. 辽宁师范大学学报: 自然科学版, 2011, 34(2): 216-219
- [3] Vaiman M, Renard C, Lafage P, et al. Evidence for a histocompatibility system in swine (SL-Å)[J]. Transplantation, 1970, 10(2): 155-164
- [4] Ando A, Kawata H, Shigenari A, et al. Genetic polymorphism of the swine major histocompatibility complex (SLA) class I genes, SLA-I, -2, -3[J]. Immunogenetics, 2003, 55(9): 583-593
- [5] Chardon P, Renard C, Gaillard CR, et al. The porcine major histocompatibility complex and related paralogous regions: a review[J]. Genetics Selection Evolution, 2000, 32(2): 109-128
- [6] Oleksiewicz MB, Kristensen B, Ladekjær-Mikkelsen AS, et al. Development of a rapid *in vitro* protein refolding assay which discriminates between peptide-bound and peptide-free forms of recombinant porcine major histocompatibility class I complex (SLA-I)[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2002, 86(1/2): 55-77
- [7] Feng L, Zhao D, Gao FS. Research advances in swine major histocompatibility complex[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2012, 24(7): 686-690 (in Chinese)  
冯磊, 赵德, 高凤山. 猪主要组织相容性复合体研究进展[J]. 生命科学, 2012, 24(7): 686-690
- [8] Valten FW, Renard C, Rogel-Gaillard C, et al. Spatial arrangement of pig MHC class I sequences[J]. Immunogenetics, 1999, 49(11/12): 919-930
- [9] Pan X, Qi J, Zhang N, et al. Complex assembly, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the swine major histocompatibility complex molecule SLA-I\*1502[J]. Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications, 2011, 67(5): 568-571
- [10] Zhang NZ, Qi JX, Feng SJ, et al. Crystal structure of swine major histocompatibility complex class I SLA-I\*0401 and identification of 2009 pandemic swine-origin influenza A H1N1 virus cytotoxic T lymphocyte epitope peptides[J]. Journal of Virology, 2011, 85(22): 11709-11724
- [11] Gao FS, Xu CB, Zhang XH, et al. Analysing molecular characteristics of the SLA-I gene from Chinese HeBao pigs[J]. Journal of Genetics, 2012, 91(2): 219-221
- [12] Gao FS, Bai J, Gong XJ, et al. Analyzing the genetic characteristics and function of the swine leukocyte antigen 2 gene in a Chinese inbred of pigs[J]. Microbiology and Immunology, 2012, 56(3): 208-215
- [13] Yan TT, Gou DZ, Dong SP, et al. Research on constructing and expressing the recombinant Prokaryotic expressing vector of SLA-1 derived from three local breeds of swine[J]. Biotechnology, 2014, 24(1): 16-19 (in Chinese)  
严婷婷, 苟东洲, 董宋鹏, 等. 地方三品系猪 SLA-1 原核表达载体构建及表达研究[J]. 生物技术, 2014, 24(1): 16-19
- [14] Gao FS, Xia C, Zhang Q, et al. Analyzing secondary structure of  $\beta_2$  microglobulin in *Escherichia coli* with circular dichroism spectrum[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(12): 1596-1600 (in Chinese)  
高凤山, 夏春, 张强, 等. 大肠杆菌表达的重组猪  $\beta_2$  微球蛋白二级结构的圆二色谱分析[J]. 微生物学报, 2009, 49(12): 1596-1600
- [15] Liu J. Yorkshire pig I breeding achievements appraisal[J]. Hubei Agricultural Sciences, 1980(7): 32-33 (in Chinese)  
刘净. 大约克猪 I 系选育成果简评[J]. 湖北农业科学, 1980(7): 32-33
- [16] Zhang XC, Feng L, Zhang X, et al. Research on construction and expression of the heavy chain of SLA-2 conjugated with BSP in HeBao Pig[J]. Biotechnology, 2012, 22(5): 17-20 (in Chinese)  
张香春, 冯磊, 张鑫, 等. 荷包猪 SLA-2 重链基因偶合底物肽及表达研究[J]. 生物技术, 2012, 22(5): 17-20
- [17] Karray A, Amara S, Carrière F, et al. Renaturation and one step purification of the chicken GIIA secreted phospholipase A2 from inclusion bodies[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 67: 85-90
- [18] Gao CX, Jiang Q, Guo DC, et al. Characterization of swine leukocyte antigen (SLA) polymorphism by sequence-based and PCR-SSP methods in Chinese Bama miniature pigs[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 45(1): 87-96
- [19] Pedersen LE, Harndahl M, Nielsen M, et al. Identification of peptides from foot-and-mouth disease virus structural proteins bound by class I swine leukocyte antigen (SLA) alleles, SLA-1\*0401 and SLA-2\*0401[J]. Animal Genetics, 2013, 44(3): 251-258
- [20] Pedersen LE, Harndahl M, Rasmussen M, et al. Porcine major histocompatibility complex (MHC) class I molecules and analysis of their peptide-binding specificities[J]. Immunogenetics, 2011, 63(12): 821-834
- [21] Silver ML, Parker KC, Wiley DC. Reconstitution by MHC-restricted peptides of HLA-A2 heavy chain with  $\beta_2$ -microglobulin, *in vitro*[J]. Nature, 1991, 350(6319): 619-622
- [22] Garboczi DN, Hung DT, Wiley DC. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(8): 3429-3433