

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

于瑞嵩^{1,2} 高位相¹ 李凤平^{1,3} 董世娟^{1,2} 李震^{1,2*}

(1. 上海市农业科学院畜牧兽医研究所 上海 201106)

(2. 上海农业遗传育种重点实验室 上海 201106)

(3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要:【背景】小反刍兽疫是由小反刍兽疫病毒(Peste des petits ruminants virus, PPRV)引起的一种急性、烈性、接触性传染病,严重威胁我国养羊业的发展。【目的】原核表达 PPRV H 蛋白,并制备其多克隆抗体。【方法】根据 GenBank 中 PPRV 西藏株 *h* 基因序列,对其进行密码子大肠杆菌偏爱性优化,采用两步 PCR 法全化学合成全长 *h* 基因。将测序验证正确的 *h* 基因克隆至原核表达载体 pET-28a、pET-30a、pET-32a,转化 *E. coli* BL21(DE3)并利用 IPTG 诱导 H 蛋白表达。以经 SDS-PAGE 割胶纯化的重组 H 蛋白免疫新西兰大白兔制备抗 PPRV H 蛋白多克隆抗体。【结果】重组 *E. coli* [pET-28a(-30a, -32a)-H]表达的重组 H 蛋白相对分子质量分别约为 70、68 和 86 kD;诱导 7 h 时 PPRV H 蛋白表达量最高,而且主要以包涵体形式表达;重组 *E. coli* (pET-30a-H)表达的 H 蛋白经 SDS-PAGE 割胶纯化后免疫新西兰大白兔制备的多抗血清能与表达的重组 H 蛋白发生特异性反应;ELISA 法检测抗体效价在 1:6 400–1:25 600 之间。【结论】原核表达了 PPRV H 蛋白,并制备了高效价的抗 H 蛋白多克隆抗体,为进一步研究 PPRV H 蛋白的功能及 H 蛋白的线性 B 细胞表位作图奠定了基础。

关键词: 小反刍兽疫病毒, H 蛋白, 原核表达, 多克隆抗体

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500101); National Natural Science Foundation of China (31402219, 315725199); Shanghai Key Project on Agricultural Development (2015-6-1-9)

*Corresponding author: Tel: 86-21-62206391; E-mail: zhenli60@163.com

Received: December 12, 2017; Accepted: May 04, 2018; Published online (www.cnki.net): June 13, 2018

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0500101); 国家自然科学基金(31402219, 315725199); 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字[2015]第 6-1-9 号)

*通信作者: Tel: 86-21-62206391; E-mail: zhenli60@163.com

收稿日期: 2017-12-12; 接受日期: 2018-05-04; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-06-13

Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of peste des petits ruminants virus H protein

YU Rui-Song^{1,2} GAO Wei-Xiang¹ LI Feng-Ping^{1,3} DONG Shi-Juan^{1,2} LI Zhen^{1,2*}

(1. Institute of Animal Husbandry & Veterinary Science, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

(2. Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China)

(3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: [Background] Peste des petits ruminants (PPR) is an acute, severe and contagious infectious disease caused by peste des petits ruminants virus (PPRV), which is endangering the sheep/goat-farming in Asian and African countries. [Objective] The objective of this study is to express PPRV H protein prokaryotically and to prepare its polyclonal antibodies. [Methods] According to the sequence of PPRV Tibet strain deposited in GenBank, *h* gene was optimized based on the codon usage bias of *E. coli* and synthesized by using two-step PCR. Then, the sequencing confirmed *h* gene was inserted into prokaryotic expression vectors pET-28a, pET-30a and pET-32a, respectively. The constructed recombinant plasmids pET-28a(-30a and -32a)-H were then transformed into *E. coli* BL21(DE3) for expression under the induction of IPTG. The expressed H protein from *E. coli* BL21(pET-30a-H) were purified by cutting out the aimed band from the SDS-PAGE gel. Polyclonal antibodies were prepared by immunizing New Zealand white rabbits with the purified H protein. [Results] The recombinant H protein expressed by *E. coli* (pET-28a (-30a, -32a)-H), with a relative molecular mass of about 70, 68 and 86 kD, respectively, mainly existed in a form of inclusion body, of which the expression level reached the maximum at 7 h after induction. The polyclonal antibodies prepared by immunizing the rabbits with the purified H protein from *E. coli* BL21(pET-30a-H) showed specific reactivity with expressed recombinant H protein. The titer values of the serum ranged between 1:6 400 to 1:25 600. [Conclusion] PPRV H protein was successfully expressed in prokaryotic cells, and high titer anti-H protein polyclonal antibodies were obtained, which laid a foundation for further research on the function of H protein, and the fine linear B cell epitope mapping of PPRV H protein.

Keywords: Peste des petits ruminants virus, H protein, Prokaryotic expression, Polyclonal antibodies

小反刍兽疫(Peste des petits ruminant, PPR)是由小反刍兽疫病毒(Peste des petits ruminant virus, PPRV)引起的家养或野生小反刍动物的一种急性、烈性传染病^[1]。PPR 主要临床症状包括发热、坏死性口炎、结膜炎、肺炎和腹泻脱水直至死亡;在没有接触过 PPRV 的地区, PPR 的发病率可高达 100%, 严重暴发时死亡率可达 100%^[2]。PPR 严重影响小反刍动物及其相关产品的国际贸易, 对包括我国在内的发展中国家的养羊业造成了巨大的经济损失^[3]。自 2007 年我国首次在西藏阿里地区暴发了 PPR 疫情并迅速得到有效控制之后, 2013 年底到 2014 年, PPR 再次在我国呈现暴发流行, 给养羊业造成了巨大经济损失。2015 年以来, 虽然

我国 PPR 疫情逐渐减少, 但小反刍兽疫疫情并没有消失。2017 年, 我国仍有 3 个省报道了小反刍兽疫疫情, 发病羊 546 只, 死亡 257 只, 扑杀 910 只。这些迹象表明, 虽然小反刍兽疫疫情在我国得到有效控制, 但其防控形式依然严峻。

PPRV 是有囊膜的负链 RNA 病毒, 其约 16 kb 的基因组从 3'→5'依次分布着 *-n-p/c/v-m-f-h-l* 6 个基因, 分别编码 6 个结构蛋白(N、P、M、F、H、L)和 2 个非结构蛋白(C、V 蛋白)^[4]。PPRV H 蛋白构成病毒粒子表面的纤突, 是病毒刺激机体产生中和抗体的主要抗原成分, 也是引起宿主细胞发生病变的主要蛋白质^[4]。因此, PPRV H 蛋白在其致病和刺激宿主免疫中发挥重要作用, 也是小反刍兽疫

鉴别诊断的可靠标记^[5]。本研究用 *E. coli* 表达了密码子优化的 PPRV H 蛋白, 并制备了其多克隆抗体, 为进一步研究 H 蛋白的功能, 建立相应免疫学检测方法及 PPRV H 蛋白的线性 B 细胞表位作图奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) TOP 10 和 BL21(DE3)购自天根生化科技(北京)有限公司; 克隆载体 pMD18-T 购自上海皓嘉科技发展有限公司; 克隆载体 pJET1.2/blunt 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 原核表达载体 pET-28a(-30a, -32a)为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

限制性内切酶、DNA 聚合酶、DNA 连接酶, 上海皓嘉科技发展有限公司; 弗式完全佐剂、弗氏不完全佐剂, 上海前生生物科技有限公司; 质粒提取试剂盒, DNA 胶回收试剂盒, Axygen 生物技术(杭州)有限公司; 常用生化试剂, 生物工程(上海)股份有限公司。

恒温培养箱、恒温培养摇床, 上海一恒科学仪器有限公司; 超声波细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技有限公司; 高速冷冻离心机, 希格玛实验室离心机公司; PCR 扩增仪、凝胶成像系统, 伯乐公司。

E. coli 的培养采用 LB 培养基。

1.2 方法

1.2.1 PPRV h 基因的全化学合成

将 GenBank 中 PPRV 西藏株 H 蛋白质的序列(AEH25644)提交 DNABank 网站(<http://helixweb.nih.gov/dnabank>)进行密码子偏爱性优化, 选择 *E. coli* 为表达宿主, 设定 PCR 退火温度为 55 °C, 并在基因的两端分别添加 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点。将系统输出的 64 条 DNA 序列送生工生物工程(上海)股份有限公司合成。通过两步 PCR 的方法合成。h 基因全长, 将其克隆至 pJET1.2/blunt

克隆载体得到 pJET-H。

1.2.2 PPRV H 蛋白原核表达载体的构建

以 *Bam*H I 和 *Hind* III 将测序验证正确的 PPRV h 基因片段从 pJET-H 切下, 将其插入至 pET-32a 得到 pET-32a-H。

为了构建 pET-28a-H 和 pET-30a-H, 重新设计引物扩增 PPRV h 基因, 并在上下游引物的 5' 端分别添加 *Nde* I 和 *Xho* I 识别位点(FF: 5'-**CATATG**ATGAGCGCGCAACGGGAACGTATAAACGCCT-3'; FR: 5'-**CTCGAG**CACCGGGTTACAGGTCACCTCAATGC-3') 以 pJET-H 为模板 PCR 扩增 h 基因。PCR 反应体系: 10×*ExTaq* buffer 5 μL, dNTP mixture 4 μL, DNA 模板 1 μL, 引物 FF 和 FR 各 1 μL, *ExTaq* 酶 1 μL, ddH₂O 补足 50 μL; PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 98 °C 15 s, 55 °C 30s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。将 PCR 产物克隆至 pMD18-T。以 *Nde* I 和 *Xho* I 将 h 基因片段从 pMD18-H 切下, 克隆至 pET-28a 和 pET-30a 得到 pET-28a-H 和 pET-30a-H。

1.2.3 PPRV H 蛋白的原核表达

将 pET-28a-H、pET-30a-H 和 pET-30a-H 分别转化至 *E. coli* BL21, 挑取单克隆, 转接至 LB 培养基(含氨苄 100 μg/mL 或卡纳霉素 50 μg/mL)中, 37 °C、220 r/min 培养过夜。次日, 以 1:100 接种量各转接 9 支 LB 试管, 37 °C、220 r/min 培养至 OD₅₅₀ 约为 0.5, 分别向 8 支试管中加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 37 °C 诱导 PPRV H 蛋白的表达, 分别于诱导的 0、3、4、5、6、7、8、9 h 取出一管; 另一支试管作为未诱导对照培养 9 h。各取 2 mL 菌液 4 °C、12 000 r/min 离心 1 min 收集菌体, 以备 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 PPRV H 蛋白的纯化和 Western blot 检测

将 *E. coli* BL21(pET-30a-H) 37 °C 诱导培养 7 h, 4 °C、12 000 r/min 离心 1 min 收集菌体。以 PBS (10 mL/g 菌体)重悬, 冰上超声破碎 20 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min 收集包涵体。包涵体以 PBS 悬浮后加入等体积的 2×上样缓冲液, 上

样进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后以 0.25 mol/L 的 KCl 染色 10 min,使用手术刀片将目的蛋白条带切下,切成 2 mm 的碎片后装入透析袋,60 V 电泳洗脱 120 min,反向电泳 15 min,回收纯化的 PPRV H 蛋白。

进行 Western blot 检测时,SDS-PAGE 结束后将蛋白以 12 V 恒压半干转移 30 min 至 PVDF 膜上,转印膜以 10%的脱脂奶粉封闭 5 h,加入一抗(抗 His 单抗或兔抗 PPRV H 血清,1:4 000)4 °C 孵育过夜,以 TBST 洗涤 3 次,加入二抗(IgG-HRP,1:20 000)室温孵育 1 h,以 TBST 洗涤 4 次,ELC 显色。

1.2.5 抗 PPRV H 蛋白血清的制备

将纯化的 PPRV H 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂混合,以 0.5 mg/只的剂量经颈背部多点注射免疫 3 只新西兰大白兔,同时以 PBS 免疫 1 只大白兔作为对照。此后,每隔 14 d 加强免疫 1 次,共免疫 4 次。分别于第一次免疫后的第 7、21、35、42、49、63 天耳部静脉取血,间接 ELISA 检测抗体水平,第 63 天颈动脉采血并收集血清。

1.2.6 ELISA 法检测血清的效价

(1) 免疫后兔血清抗体水平检测。以纯化的 PPRV H 蛋白(1 µg/mL)包被酶标板,4 °C 过夜。以 PBST 洗板 3 次,加入 5%的脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h;PBST 洗涤 3 次。加入 1:400 倍稀释后的血清(不同时间点采集的兔血清),37 °C 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次;加入 1:500 倍稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG,37 °C 孵育 45 min, PBST 洗涤 3 次;加入 TMB 底物显色液,暗处显色 15 min,加入 1 mol/L 的硫酸终止液,酶标仪读取 OD_{450} 值。

(2) 抗体滴度检测。除了一抗采用倍比稀释的免疫后 63 d 采集兔血清外,其它操作同上。

2 结果与分析

2.1 PPRV h 基因的密码子优化、全化学合成及原核表达载体的构建

对 PPRV h 基因的密码子偏爱性分析表明,

h 基因中存在约 10%大肠杆菌稀有密码子。因此,首先对其进行密码子同义优化,优化前后 PPRV h 基因的核苷酸序列一致性为 72.6%,氨基酸序列的一致性为 100% (图 1)。然后,采用两步 PCR 方法全化学合成了密码子优化后全长 h 基因,并将其分别插入到 pET-28a、pET-30a 和 pET-32a 的多克隆位点,得到 PPRV h 基因的重组表达质粒。

2.2 PPRV H 蛋白的原核表达及 Western blot 检测

SDS-PAGE 分析显示,携带 pET-28a-H、pET-30a-H 和 pET-32a-H 的重组 *E. coli* BL21 诱导后分别出现了 70、68、86 kD 的目标蛋白条带,表明 3 株重组 *E. coli* 都可以有效表达 PPRV H 蛋白(图 2A-C)。而且,在诱导的 1-7 h 内,随着诱导时间的增加,PPRV H 蛋白表达量增加。诱导时间继续增加,目标蛋白表达量基本维持不变(图 2A-C)。

为了分析 PPRV H 蛋白是可溶性表达还是形成包涵体,我们将诱导后的菌体超声波破碎后离心,分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。如图 2D(a)、2E(a)所示,表达的 PPRV H 蛋白在大肠杆菌细胞内形成不可溶性包涵体,破碎上清中几乎无目标蛋白出现。以抗重组 H 蛋白带有 His 标签的单克隆抗体和 PPRV 免疫羊血清通过 Western blot 分析表达的重组 PPRV H 蛋白,结果表明携带 3 种重组质粒的重组 *E. coli* BL21 表达的 H 蛋白都可以与抗 His 标签单抗和羊抗 PPRV 阳性血清反应[图 2D(b)、2E(b)],这也说明表达的重组 H 蛋白可以被羊阳性血清识别(图 2E)。

虽然携带 3 个重组载体的重组 *E. coli* 的 H 蛋白表达量没有明显差异,但包涵体提取结果显示,由重组 *E. coli* (pET-28a-H)和 *E. coli* (pET-30a-H)制备的 H 蛋白纯度高于由重组 *E. coli* (pET-32a-H)得到的蛋白[图 2D(a)、2E(a)];因此选择携带 pET-30a-H 的重组 *E. coli* BL21 诱导 7 h 的菌体纯化制备 PPRV H 重组蛋白,并免疫新西兰大白兔制备抗 PPRV H 蛋白多抗血清。

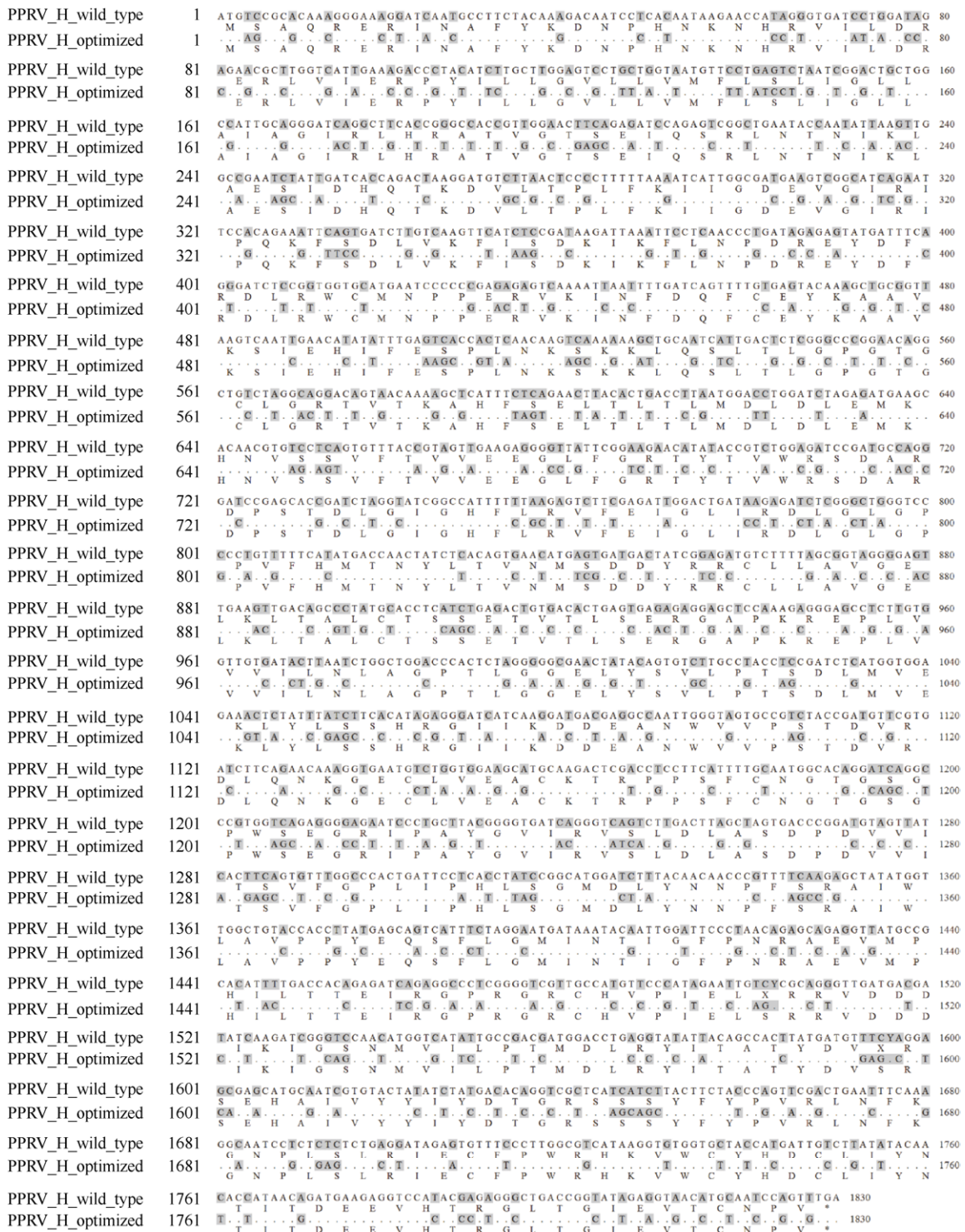


图 1 PPRV h 基因密码优化前后的序列比对

Figure 1 Sequence alignment of the wild type PPRV h gene with its codon optimized counterpart

注: 差异核苷酸位点以灰色阴影标出; 优化后 h 基因中相同的位点以“.”代替; 每个氨基酸的单字母缩写位于其密码子下方。

Note: Differential nucleotides were shaded with grey; The identical nucleotide in the sequence of the optimized h gene was substituted with a “.”; Below the triplet code of each amino acid marked its corresponding name with one letter abbreviation.

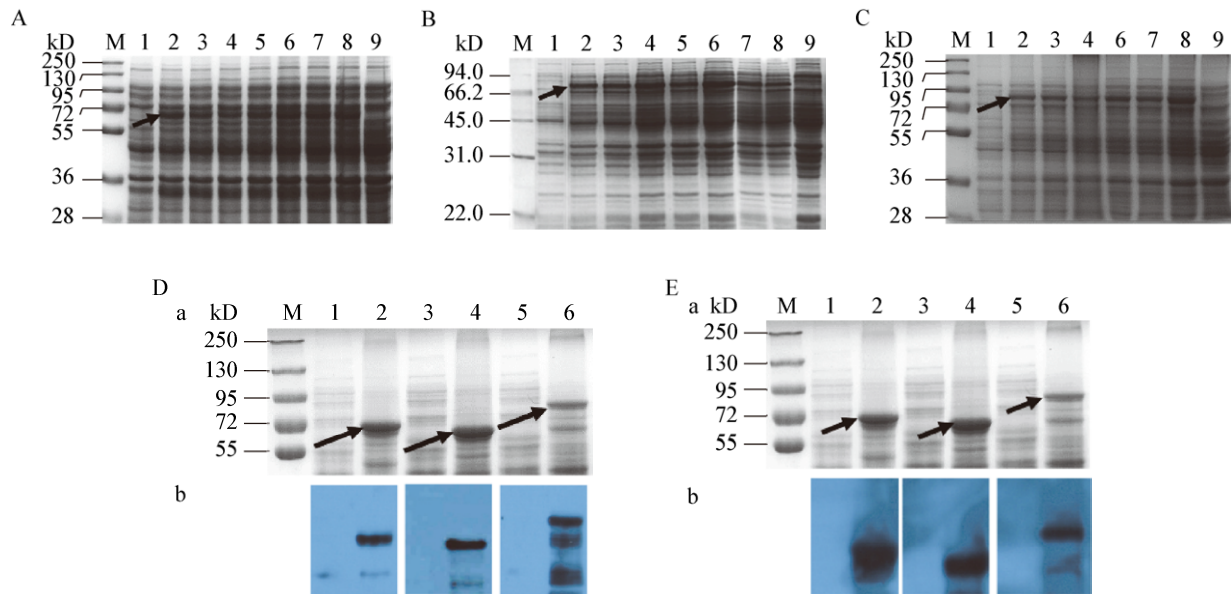


图 2 不同诱导时间对 PPRV H 蛋白表达的影响(A、B、C)和 Western blot 验证(D、E)

Figure 2 The expression time courses of PPRV H protein (A, B, C) and confirmation with Western blot (D, E)

注：A、B、C：转化 pET-28a-H、pET-30a-H、pET-32a-H 的重组 *E. coli*；1：重组 *E. coli* 诱导前；2-8：诱导 3-9 h 的菌体；9：未诱导的菌体对照。D、E：利用抗 His 标签抗体、PPRV 阳性血清 Western blot 分析表达的重组 PPRV H 蛋白(a: SDS-PAGE 分析；b: Western blot 结果)；1、3、5：诱导后 *E. coli* (pET-28a-H)、*E. coli* (pET-30a-H)、*E. coli* (pET-32a-H) 超声破碎离心上清；2、4、6：诱导后 *E. coli* (pET-28a-H)、*E. coli* (pET-30a-H)、*E. coli* (pET-32a-H) 超声破碎离心沉淀。箭头指向 PPRV H 蛋白的位置；M：蛋白质分子量标准。

Note: A, B, C: Recombinant *E. coli* transformed with pET-28a-H, pET-30a-H, pET-32a-H, respectively; 1: Precipitate of cultured recombinant *E. coli* before induction; 2-8: Precipitate of recombinant *E. coli* induced 3-9 h, respectively; 9: Precipitate of un-induced recombinant *E. coli*. D, E: Western blot analysis of recombinant PPRV H protein using anti-his monoclonal antibody and goat anti-PPRV serum as primary antibody (a: SDS-PAGE analysis; b: Western blot analysis); 1, 3, 5: Centrifugal supernatant of recombinant *E. coli* (pET-28a-H), *E. coli* (pET-30a-H), *E. coli* (pET-32a-H), respectively, broken by ultrasonication; 2, 4, 6: Precipitate of recombinant *E. coli* (pET-28a-H), *E. coli* (pET-30a-H), *E. coli* (pET-32a-H), respectively, broken by ultrasonication; Arrow points to the position of PPRV H protein; M: Protein marker.

2.3 PPRV H 包涵体蛋白的割胶纯化和 Western blot 检测

为了得到高纯度的重组 PPRV H 蛋白，采用 SDS-PAGE 割胶纯化、电泳洗脱的方法收集包涵体蛋白，SDS-PAGE 和以抗 His 标签单抗为一抗的 Western blot 分析显示得到了条带单一的重组 PPRV H 蛋白(图 3)。

2.4 抗 PPRV H 蛋白多克隆抗体的效价及特异性测定

以纯化的 PPRV H 蛋白为包被抗原，间接 ELISA 检测免疫后不同时间点采集的兔血清效价，结果表明抗 PPRV H 蛋白抗体在首次免疫 7 d 后即

产生并迅速增加，至 35 d 后缓慢增加(图 4)。第 4 次免疫后获得的多克隆抗体的滴度，1 号兔子最高，达到 1:25 600；2 号兔子的抗体滴度为 1:12 800；3 号兔子抗体滴度稍低，为 1:6 400，表明获得的多抗血清具有很好的敏感性(图 5)。

利用免疫获得的新西兰大白兔血清作为一抗，通过 Western blot 验证得到的抗血清与由重组 *E. coli* (pET-28a-H)、*E. coli* (pET-30a-H)、*E. coli* (pET-32a-H) 得到的 PPRV H 蛋白的特异性识别能力，结果表明获得兔抗血清均能与 3 株重组 *E. coli* 表达 PPRV H 蛋白的发生特异性反应(图 6)，表明多克隆抗体均具有较好的特异性。

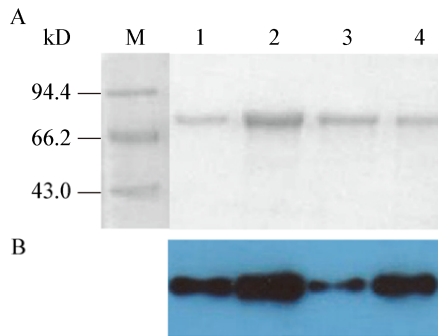


图3 SDS-PAGE (A)和 Western blot (B)分析纯化的重组 PPRV H 蛋白

Figure 3 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of purified PPRV H protein

注: M: 蛋白质分子量标准; 1-4: 4次 SDS-PAGE 割胶纯化的 PPRV H 蛋白。

Note: M: Protein marker; 1-4: Four times purified PPRV H protein by cutting out the aimed protein from SDS-PAGE gel.

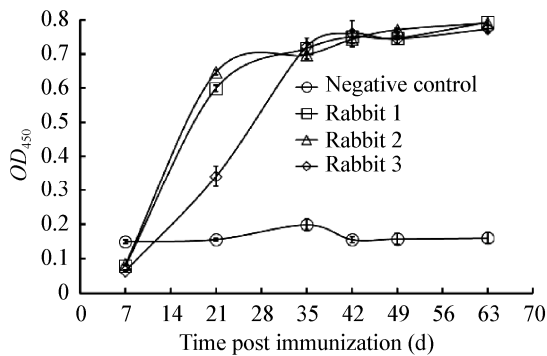


图4 不同免疫时间的血清抗体水平

Figure 4 Time course of serum antibody level

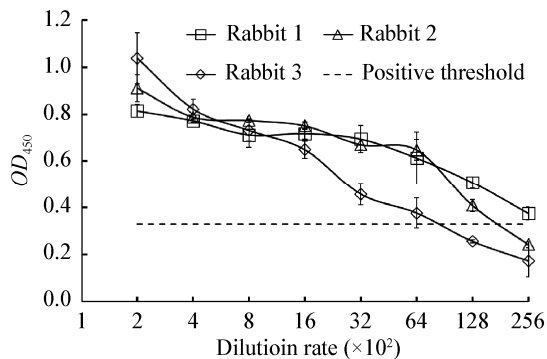


图5 血清抗体滴度的检测

Figure 5 Determination of the titers of the anti-sera

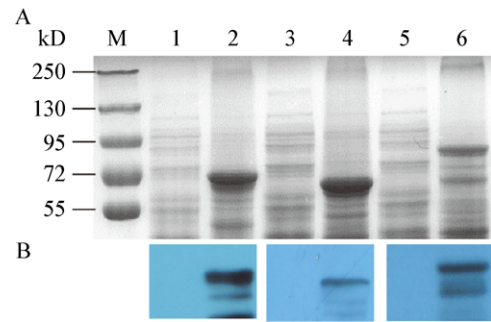


图6 多克隆抗体的 Western blot 鉴定

Figure 6 Western blot confirmation of the reactivity of the anti-sera with PPRV H protein

注: A: SDS-PAGE 分析; B: Western blot 结果; M: 蛋白质分子量标准; 1、3、5: 分别为诱导后 *E. coli* (pET-28a-H)、*E. coli* (pET-30a-H)、*E. coli* (pET-32a-H) 超声破碎离心上清; 2、4、6: 分别为诱导后 *E. coli* (pET-28a-H)、*E. coli* (pET-30a-H)、*E. coli* (pET-32a-H) 超声破碎离心沉淀。

Note: A: SDS-PAGE analysis; B: Western blot result; M: Protein Marker; 1, 3, 5: Centrifugal supernatant of recombinant *E. coli* (pET-28a-H), *E. coli* (pET-30a-H), *E. coli* (pET-32a-H), respectively, broken by ultrasonication; 2, 4, 6: Precipitate of recombinant *E. coli* (pET-28a-H), *E. coli* (pET-30a-H), *E. coli* (pET-32a-H), respectively, broken by ultrasonication.

3 讨论与结论

H 蛋白是 PPRV 的一个重要糖蛋白, 构成病毒粒子表面的纤突, 在 PPRV 感染过程中负责与宿主细胞的受体结合, 能够诱导机体产生体液和细胞保护性免疫, 因此 PPRV H 蛋白的研究具有重要的意义, 受到了国内外研究者的广泛关注^[6-9]。为深入研究 H 蛋白的抗原表位构成及相关特性, 我们克隆并原核表达了密码子优化的西藏株 PPRV 的 *h* 基因, 表达产物可以与抗 His 标签单克隆抗体和抗 PPRV 阳性羊血清反应, 表明所表达的 PPRV H 蛋白具有良好的反应活性。以 SDS-PAGE 割胶纯化的 PPRV H 蛋白免疫新西兰大白兔得到了抗 H 蛋白多抗兔血清。

有报道称 PPRV H 蛋白全长表达量较低^[10], 我采用两种策略来提高 PPRV H 蛋白原核表达的成功率。首先, 为了减少 PPRV *h* 基因中约 10% 的大肠杆菌稀有密码子对其原核表达的影响, 对 *h* 基因

的全部密码子进行了大肠杆菌偏爱性优化。其次, 选用 3 个带有不同标签序列的 pET (-28a、-30a 和-32a) 载体来表达 PPRV H 蛋白, 且全部将 *h* 基因插入到载体多克隆位点而保留所有的标签序列。我们选用的 3 个表达载体都成功表达了 PPRV H 蛋白, 表明 *h* 基因密码子的优化和与标签序列融合表达成功克服了其他研究者报道的 PPRV H 蛋白全长序列原核表达时表达量低或不能表达的问题^[10]。我们近期开展猪流行腹泻病毒 S 蛋白的原核表达研究也表明, 载体中自带的标签序列对病毒结构蛋白的原核表达成功至关重要。

免疫所用重组蛋白纯度是影响多克隆抗体质量的重要因素之一。虽然不能与真核系统一样可使所表达蛋白糖基化, 原核表达系统具有其独特的优势, 如表达量相对较高, 通过提取包涵体重组蛋白并 SDS-PAGE 割胶回收可以得到高纯度的目的蛋白等。本研究中, 我们提取包涵体直接进行 SDS-PAGE, 以氯化钾染色确定目标条带位置后切胶回收 H 蛋白, 具有操作简单方便的优势。获得抗 PPRV H 多抗血清的 Western blot 结果显示, 得到了高特异性的多抗血清。作者后续开展的线性 B 细胞表位作图的研究结果也表明, 利用此策略获得多抗血清可以满足表位筛选和最小表位基序鉴定实验的需要^[8,11]。

本研究利用大肠杆菌表达了 PPRV H 蛋白并免疫新西兰大白兔制备了抗 H 蛋白多抗血清, 得到的抗 PPRV H 多抗可以特异性识别 H 蛋白。PPRV H 蛋白的表达和多克隆抗体的制备为建立针对 PPRV H 蛋白的 ELISA 抗体检测方法及研制新型亚单位疫苗奠定了基础。同时, 这也将为本课题组正在开展的 PPRV 主要结构蛋白线性 B 细胞表位作图提供了血清抗体。

REFERENCES

- [1] Baazizi R, Mahapatra M, Clarke BD, et al. Peste des petits ruminants (PPR): a neglected tropical disease in Maghreb region of North Africa and its threat to Europe[J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175461
- [2] Adombi CM, Waqas A, Dundon WG, et al. Peste des petits ruminants in Benin: persistence of a single virus genotype in the country for over 42 years[J]. *Transbound and Emerging Diseases*, 2017, 64(4): 1037-1044
- [3] Baron MD, Diop B, Njeumi F, et al. Future research to underpin successful peste des petits ruminants virus (PPRV) eradication[J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98(11): 2635-2644
- [4] Ye XF, Ci C. Peste des petits ruminants and its comprehensive prevention and control measures[J]. *Zhong Guo Xu Mu Shou Yi Wen Zhai*, 2015, 31(2): 89 (in Chinese)
叶雪芬, 次成. 小反刍动物兽疫及其综合防控措施[J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2015, 31(2): 89
- [5] Baron MD. The molecular biology of peste des petits ruminants virus[A]/Munir M. *Peste des Petits Ruminants Virus[M]*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015: 11-38
- [6] Tao H, Sun J, Li JB, et al. Prokaryotic expression and immunoreactivity identification of peste des petits ruminants virus haemagglutinin protein[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2014(11): 6-9 (in Chinese)
陶虹, 孙洁, 李健波, 等. 小反刍兽疫病毒 H 蛋白的原核表达和免疫学活性鉴定[J]. *动物医学进展*, 2014(11): 6-9
- [7] Gao HF, Xin AG, Gao L, et al. Expression of *H* gene of peste des petits ruminants virus in Baculovirus[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2012, 20(1): 43-46 (in Chinese)
高华峰, 信爱国, 高林, 等. 小反刍兽疫病毒 H 基因在杆状病毒中的表达[J]. *中国动物传染病学报*, 2012, 20(1): 43-46
- [8] Yu RS, Zhu R, Gao WX, et al. Fine mapping and conservation analysis of linear B-cell epitopes of peste des petits ruminants virus hemagglutinin protein[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 208: 110-117
- [9] Herbert R, Baron J, Batten C, et al. Recombinant adenovirus expressing the haemagglutinin of Peste des petits ruminants virus (PPRV) protects goats against challenge with pathogenic virus; a DIVA vaccine for PPR[J]. *Veterinary Research*, 2014, 45(1): 24
- [10] Tian XL, Zhao YG, Song HH, et al. Prokaryotic expression of PPRV H protein antigen epitopes[J]. *Chinese Journal of Animal Health Inspection*, 2009, 26(3): 28-30 (in Chinese)
田晓灵, 赵永刚, 宋厚辉, 等. 小反刍兽疫 H 蛋白主要抗原表位的原核表达[J]. *中国动物检疫*, 2009, 26(3): 28-30
- [11] Yu RS, Fan XM, Xu WX, et al. Fine mapping and conservation analysis of linear B-cell epitopes of peste des petits ruminants virus nucleoprotein[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 175(1): 132-138