

网络出版时间:2015-01-05 08:59

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2015.02.027

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150105.0859.027.html

猪 *Jiv* 基因的克隆表达与多克隆抗体制备

刘 伟,郭抗抗,林 鹭,盛 洁,赵 娣,赵紫印,张彦明

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】克隆猪 *Jiv* 蛋白核心区的 2 112 bp 的基因片段,构建其原核表达载体后进行蛋白的表达和纯化,制备抗猪 *Jiv* 蛋白的多克隆抗体。【方法】利用 RT-PCR 方法,从猪脾脏组织 RNA 中扩增得到猪 *Jiv* 基因,将其克隆到 pMD19-T 载体并测序,以此为基础构建原核表达载体 pET32a-*Jiv*,转化 *E. coli* Rosetta(DE3)感受态细胞中,利用 IPTG 诱导表达,获得大量包涵体形式的猪 *Jiv* 融合蛋白。通过镍离子螯合层析柱对表达的目的蛋白进行纯化,对纯化后的包涵体蛋白进行透析复性,以每只新西兰白兔 400 μ g 蛋白的初次免疫剂量和 500 μ g 蛋白的加强免疫剂量进行免疫,共免疫 5 次,采集血清,采用间接 ELISA 法检测抗体效价达到一定水平后,收集抗体,利用 Western blot 检测抗体特异性。【结果】克隆得到长度为 2 112 bp 的猪 *Jiv* 基因片段;构建的 pET32a-*Jiv* 在 *E. coli* Rosetta(DE3)感受态细胞中经诱导后高效表达,SDS-PAGE 结果显示,纯化得到分子质量约为 95 ku 的猪 *Jiv* 融合蛋白;测得的猪 *Jiv* 蛋白多克隆抗体效价达 1 : 6 400;Western blot 检测结果证实,所获得抗体能够有效地应用于猪 *Jiv* 蛋白抗原的检测。【结论】成功地克隆了猪 *Jiv* 基因,制备了抗猪 *Jiv* 蛋白的多克隆抗体。

【关键词】猪 *Jiv* 蛋白;原核表达;多克隆抗体;猪瘟病毒

【中图分类号】S852.65⁺1;Q785

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2015)02-0007-07

Cloning and expression of swine *Jiv* gene and preparation of its polyclonal antibody

LIU Wei, GUO Kang-kang, LIN Zhi, SHENG Jie, ZHAO Di,
ZHAO Zi-yin, ZHANG Yan-ming

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to clone the 2 112 bp *Jiv* gene from core area of swine *Jiv* protein, construct the prokaryotic expression vector for the expression and purification of fusion protein, and prepare polyclonal antibody against swine *Jiv* protein. 【Method】 The *Jiv* gene was amplified by RT-PCR from swine spleen tissues and cloned into pMD19-T vector to sequence. It also acted as template to construct prokaryotic expression vector pET32a-*Jiv* and the recombinant vector was transformed into *E. coli* Rosetta (DE3). Swine *Jiv* fusion proteins with the inclusion form were obtained inducing by IPTG and were purified by Ni²⁺ charged column. After purification, inclusion body was refolded through dialysis renaturation. 400 μ g protein was injected into each New Zealand white rabbit as the first immunization and 500 μ g protein as strengthening immunization was used for a total of five times. When titers of antibodies detected by indirect ELISA reached a certain level, the antibodies were collected and identified by Western blot. 【Result】 The fragment of swine *Jiv* gene with the length of 2 112 bp was successfully obtained. The construc-

【收稿日期】 2013-10-18

【基金项目】 西北农林科技大学基本科研业务费项目(QN2011109); 国家自然科学基金项目(31172339)

【作者简介】 刘 伟(1987—),男,陕西户县人,在读硕士,主要从事分子病原学研究。E-mail:liuwei2001@126.com

【通信作者】 张彦明(1956—),男,陕西南郑人,教授,博士生导师,主要从事分子病原学与病毒致病机理研究。
E-mail:zhangym@nwsuaf.edu.cn

ted pET32a-Jiv was highly expressed in *E. coli* Rosetta (DE3) after induction by IPTG. SDS-PAGE showed that the purified fusion protein was about 95 ku. The titer of antibodies was 1 : 6 400 and Western blot showed that the obtained antibodies could be used to detect swine Jiv protein effectively. 【Conclusion】 Swine *Jiv* gene was cloned and the polyclonal antibodies against swine Jiv protein were prepared.

Key words: swine Jiv protein; prokaryotic expression; polyclonal antibody; classical swine fever virus

Jiv (J-domain protein interacting with viral protein) 蛋白最早发现与致细胞病变型 (Cytopathogenic, CP) 牛病毒性腹泻病毒 (Bovine viral diarrhea virus, BVDV) 存在相互作用。Mendez 等^[1] 发现, 自然情况下 BVDV NADL 株基因组中插入了一段编码 90 个氨基酸的 mRNA 外源序列, 在对这一序列进行人工缺失后引起 BVDV NADL 株由 CP 型转变为非致细胞病变型 (Non-cytopathogenic, NCP)。后经研究发现这一外源序列来自宿主细胞的热应激蛋白 HSP40 家族^[2], 所编码的蛋白可与 BVDV 非结构蛋白 NS2 相互作用, 促进 NS2-3 蛋白前体的裂解, 进而引起细胞产生病变 (Cytopathogenic effect, CPE)^[3]。猪瘟病毒 (Classical swine fever virus, CSFV) 作为与 BVDV 同属病毒, 在自然界中并未发现有 Jiv 序列插入的嵌合病毒株, 但是通过人工构建嵌合 CSFV Alfort-Jiv 株感染 SK-6 细胞后发现, 病毒 NS3 蛋白和 RNA 大量增加, 同时引起细胞病变 (CPE)^[4]。更为有趣的是, CSFV Alfort-Jiv 株可以引起猪体内产生高滴度的中和抗体, 并保护由 CSFV 引起的死亡, 这一结果与自然界存在的其他 CP 型 CSFV 可以引起猪的典型猪瘟临床症状正好相反^[5]。同时, 本实验室前期研究发现, 对猪脐静脉血管内皮细胞内 *Jiv90* 基因进行过表达, 接入 CSFV 后发现表达 *Jiv90* 基因的试验组细胞死亡率高于对照组^[6], 说明无论是通过 CSFV 基因组插入 *Jiv90* 序列还是单纯过表达细胞内的 *Jiv90* 基因都会对 CSFV 的复制产生影响。郭抗抗等^[7] 筛选到 1 株稳定表达靶向干扰细胞内 *Jiv* 基因序列 shRNA 的细胞株, 进行猪瘟接毒试验后, 发现 CSFV RNA 含量明显降低。由此可见, Jiv 蛋白可能对 CSFV 的复制和毒力有较大影响。目前, 此方面研究都集中在从基因水平来探讨 Jiv 和 *Jiv90* 与 CSFV 的相互作用上, 为了进一步揭示 Jiv 蛋白在抗猪瘟中的作用, 急需相应的检测猪 Jiv 蛋白或 *Jiv90* 蛋白的抗体来满足试验需求。

本研究对猪 *Jiv* 基因的核心区进行了克隆, 并构建其原核表达载体进行诱导表达, 利用镍金属离子螯合层析柱 (Ni-NTA His Resin 柱) 纯化表达蛋

白, 免疫新西兰白兔后, 制备了抗猪 Jiv 多克隆抗体, 为进一步鉴定 Jiv 蛋白功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织与试验动物 脾脏组织采自 3 日龄长白系 CSFV 阴性小猪, 采集后置 -80 ℃ 保存备用; 12 月龄雄性健康成年新西兰白兔 2 只, 购自陕西杨凌某兔场, 常规饲养。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、PrimeScript™ RT Kit、pMD19-T 载体, 购自 TaKaRa 公司; *Pfu* 高保真扩增酶, 购自 Fermentas 公司; 胶回收试剂盒、高纯质粒小量提取试剂盒, 购自北京百泰克生物公司; 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂、HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗、牛血清白蛋白, 购自 Sigma 公司; TMB 底物溶液, 购自北京天根生物公司; Ni-NTA His Resin 柱, 购自北京全式金生物公司; 蛋白 Marker, 购自北京鼎国昌盛生物公司; *E. coli* DH5 α 、Rosetta (DE3) 菌株、原核表达载体 pET-32a(+), 均由西北农林科技大学动物医学院畜禽疫病防治与畜产品安全实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 针对猪 *Jiv* 基因最大 ORF 序列用 Primer Premier 6.0 引物设计软件设计 2 对引物, 克隆用引物: 上游引物 JivF 5'-ATG-GCCCAGAAGCACCCC-3', 下游引物 JivR 5'-ACGTTGGAAGGGCCTCCTC-3'; 表达用引物: 上游引物 Jivf 5'-GAAGATCTCATGGCCCAGAAG-CACCC-3' (下划线为 *Bgl* II 酶切位点), 下游引物 Jivr 5'-CCCAAGCTTACGTTGGAAGGGCCTCC-3' (下划线为 *Hind* III 酶切位点)。引物由北京华大基因公司合成。

1.2.2 猪 *Jiv* 基因序列的扩增与原核载体的构建 用 Trizol 法从猪脾脏组织中提取 RNA, 按反转录试剂盒说明反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板, JivF 和 JivR 为上、下游引物, 利用 *Pfu* 高保真扩增酶进行 PCR 扩增, 同时设立阴性对照 (以 ddH₂O 代替 cDNA 模板)。PCR 扩增体系 25 μ L: 5 $\times$ *Pfu*

buffer with MgSO_4 2.5 μL , dNTPs (各 2 mmol/L) 2.5 μL , JivF (10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL , JivR (10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL , cDNA 1 μg , *Pfu* 高保真扩增酶 0.5 μL , ddH₂O 加至 25 μL 。反应条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。按胶回收试剂盒说明纯化 PCR 产物。对于纯化后 PCR 产物, 进行末端加 poly(A) 尾。反应体系 20 μL : 2 $\times$ *Taq* Mix 10 μL , PCR 产物 10 μL 。反应条件如下: 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 min。将加 poly(A) 尾后的产物与 pMD19-T 载体粘性连接, 构建 pMD19-T-Jiv 质粒, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 挑取菌落 PCR 结果为阳性的单克隆菌落进行扩大培养, 并提取阳性菌液质粒, 送北京华大基因公司测序。

以质粒 pMD19-T-Jiv 为模板, Jivf 和 Jivr 为上、下游引物, 利用 *Pfu* 高保真扩增酶进行 PCR 扩增目的基因, 反应体系和程序同上, 将 PCR 产物和 pET-32a(+) 分别用 *Bgl* II、*Hind* III 进行双酶切, 酶切产物纯化回收后利用 T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜, 构建 pET32a-Jiv 载体。将连接产物转化 Rosetta(DE3) 感受态细胞。经菌落 PCR 初步鉴定后, 挑取阳性单克隆菌落摇菌培养后提取质粒, 进行 *Bgl* II/*Hind* III 双酶切鉴定及序列测定(测序由北京华大基因公司完成)。

1.2.3 猪 *Jiv* 蛋白序列分析 应用 DNA Star 软件(lasergene7.0)对克隆获得的猪 *Jiv* 基因序列进行分析, 预测分析其蛋白的疏水性、抗原指数和表面分布可能性。

1.2.4 猪 *Jiv* 融合蛋白的诱导表达及纯化、复性 将原核表达载体 pET32a-Jiv 转化 Rosetta(DE3) 感受态细胞进行培养, 待培养物 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 诱导表达 4 h。取诱导表达产物, 4 $^{\circ}\text{C}$ 超声(10 s/10 s, 10 min)破碎细胞后对表达产物进行 SDS-PAGE 分析, 并设立诱导的 pET-32a(+) 和未诱导的 pET32a-Jiv 为对照。待出现与预期分子质量大小相符的蛋白条带后, 对融合蛋白最佳表达条件进行摸索, 包括最佳 IPTG 诱导浓度(0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0 mmol/L)和最佳诱导时间(2, 4, 6, 8 和 10 h), 分别按照上述条件诱导融合蛋白的表达, 取诱导表达产物, 进行 SDS-PAGE 分析, 同时设立诱导的 pET-32a(+) 和未诱导的 pET32a-Jiv 为对照。

在最佳表达条件下对阳性菌液进行大体积诱导培养, 取诱导后的菌液, 室温下 5 000 r/min 离心 10

min, 收集上清液, 用 PBS 清洗重悬细菌沉淀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 超声(10 s/10 s, 30 min)破碎细胞后 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 收集包涵体沉淀。用 Buffer B (100 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L Tris-HCl, 8 mol/L 尿素) 室温下孵育溶解包涵体 1 h, 12 000 r/min 离心 30 min, 弃去沉淀, 取上清液准备过 Ni-NTA His Resin 柱。先用 Buffer B 对柱子进行预平衡, 加入 2 mL 上清液样品于柱中, 在室温下摇晃 30 min, 后用 4 倍柱体积的 Buffer C (100 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L 咪唑, 8 mol/L 尿素) 洗去杂蛋白, 再用 2 倍柱体积 Buffer E (100 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L 咪唑, 8 mol/L 尿素) 洗柱 4 次, 收集目的蛋白, 对纯化后的目的蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 同时设立诱导的 pET-32a(+)、未诱导的 pET32a-Jiv 和纯化前诱导的 pET32a-Jiv 作为对照。将收集的纯化后融合蛋白转入透析袋中, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下将透析袋分别放入不同浓度尿素(6, 4, 2 和 1 mol/L)的透析液 B (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 中进行由高到低梯度透析复性, 每个浓度透析 12 h, 并用磁力搅拌器搅拌。再分别用透析液 C (20 mmol/L Tris-HCl, 0.6 mmol/L L-精氨酸, 100 g/L 蔗糖, 2 mmol/L EDTA, 0.5 mol/L 尿素) 和透析液 D (20 mmol/L Tris-HCl, 25 mmol/L NaCl, 0.2 mol/L 尿素) 透析 12 h, 透析完成后用 PEG8000 浓缩蛋白, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 分装保存。

1.2.5 多克隆抗体的制备 用纯化后的猪 *Jiv* 融合蛋白免疫新西兰白兔, 初次免疫蛋白量为 400 μg /只, 同时加入等体积的弗氏完全佐剂, 完全乳化后分点注射于肩部皮下; 后续 4 次加强免疫量为 500 μg /只, 并混入等体积的弗氏不完全佐剂, 完全乳化后分点注射于背部皮下。每次免疫间隔 2 周。最后一次免疫后 1 周耳缘静脉采集血样, 利用间接 ELISA 法测定血清效价, 满足试验需求后处死动物, 采集多抗血清, 并在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 分装保存。

1.2.6 抗体效价的间接 ELISA 法测定 以纯化得到的猪 *Jiv* 融合蛋白样品作为抗原包被 ELISA 板, 每孔加入 100 μL 抗原(质量浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被。次日弃去孔内液体, 用 300 μL 洗涤液 (0.01 mol/L, pH 7.4 PBS, 0.05% Tween-20) 洗涤 5 次, 每次 3 min。每孔加入封闭缓冲液(体积分数 1.5% 牛血清白蛋白) 300 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h; 弃去封闭缓冲液, 用洗涤液洗涤 5 次, 加入不同稀释度的本试验制备的多克隆抗体血清(梯度稀释 1:200,

1 : 400,1 : 800,1 : 1 600,1 : 3 200,1 : 6 400,1 : 12 800,1 : 25 600),同时设立空白对照(用 PBS 代替多克隆抗体血清)和每个稀释度的阴性血清对照(未进行猪 Jiv 融合蛋白免疫的兔血清),37 ℃ 孵育 1 h;弃去孔内液体,加入洗涤液反复洗涤 5 次,每次 3 min;每孔加入 100 μL HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(1 : 5 000 稀释),37 ℃ 孵育 1 h;弃去液体,用洗涤液洗涤 5 次后,加入 100 μL TMB 底物溶液作用 30 min,再加入 100 μL 终止液(2 mmol/L H₂SO₄),用酶标仪(用空白对照调零)测定各孔 OD₄₅₀,以免疫血清样品 OD₄₅₀ ≥ 2 倍阴性对照血清 OD₄₅₀ 时的最大稀释度作为该抗体的效价检测。

1.2.7 抗体特异性的 Western blot 分析 将猪脾脏组织裂解上清液、纯化的猪 Jiv 融合蛋白用于 SDS-PAGE 电泳,同时以牛血清白蛋白作为阴性对照。电泳后,将蛋白电转到硝酸纤维膜上,多克隆抗

体以 1 : 500 稀释,进行 Western blot 检测。

2 结果与分析

2.1 猪 Jiv 基因的克隆及原核表达载体的构建

从猪脾脏组织中提取总 RNA 后反转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板 PCR 扩增到 1 条 2 000 bp 左右的片段(图 1)。将 Jiv 基因连接到 pMD19-T 载体,转化 *E. coli* DH5α,对菌落 PCR 鉴定结果阳性的单菌落扩大培养,提取阳性菌液质粒,测序后发现,本试验克隆的 Jiv 与 NCBI 中已有猪源 Jiv 序列(登录号:NM_001185066.1)一致,长度为 2 112 bp。pET32a-Jiv 原核表达载体经双酶切鉴定,获得了 5 900 和 2 112 bp 的片段(图 2);测序分析发现,本试验克隆的 Jiv 核苷酸序列与已报道的猪 Jiv 序列 100% 相符,说明原核表达载体 pET32a-Jiv 构建成功。

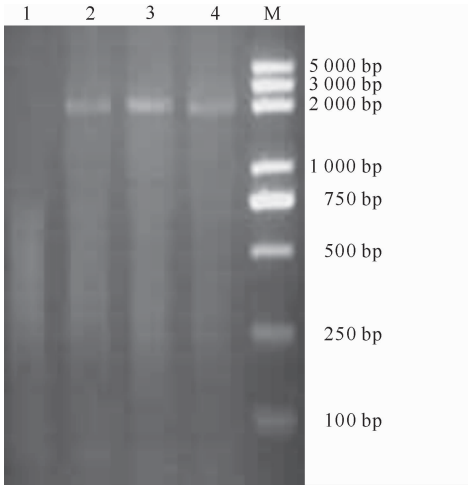


图 1 猪 Jiv 基因的 PCR 扩增结果

M. DNA 标准 DL2000;1. 阴性对照;2~4. PCR 扩增产物

Fig. 1 Amplification of swine Jiv gene by PCR

M. DNA Marker DL2000;1. Negative control;

2—4. PCR products

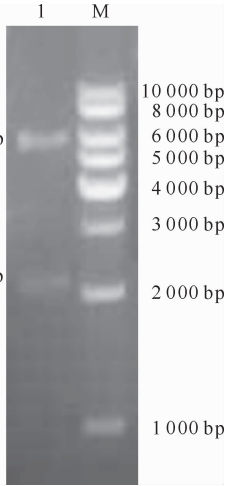


图 2 pET32a-Jiv 载体的双酶切鉴定

M. DNA 标准 DL10000;1. pET32a-Jiv

*Bgl*Ⅱ/*Hind*Ⅲ 双酶切产物

Fig. 2 Identification of pET32a-Jiv by double digestion

M. DNA Marker DL10000;1. pET32a-Jiv

digested using *Bgl*Ⅱ/*Hind*Ⅲ

2.2 猪 Jiv 蛋白序列分析

利用 DNA Star 软件对获得的猪 Jiv 蛋白进行序列分析,发现在 241~386 段具有较高的疏水性,同时此段也具有较低的抗原指数,可能预示此处为一段跨膜区域。Jiv 蛋白的 N 端和 C 端有较高的亲水性、抗原指数和表面分布可能性(图 3)。综合分析预测结果,Jiv 蛋白的 N 端和 C 端都有可能是 B 细胞识别位点,因此 Jiv 蛋白可以作为潜在抗原引起免疫动物产生免疫反应。

2.3 猪 Jiv 融合蛋白的诱导表达及其可溶性分析

结果显示,经 IPTG 诱导后,菌体表达出现大量分子质量为 95 ku 的产物,主要以包涵体的形式存在(图 4)。

2.4 猪 Jiv 融合蛋白诱导表达条件的优化

利用不同浓度 IPTG 诱导融合蛋白的表达,结果显示,当 IPTG 终浓度超过 0.5 mmol/L 时,重组蛋白表达增长缓慢,考虑到 IPTG 存在一定的细胞毒性,所以选取 0.5 mmol/L 为最佳诱导剂终浓度

(图 5);对含有 pET32a-Jiv 的 Rosetta(DE3) 菌株进行不同时间的诱导表达,结果显示,当连续诱导后 6 h 后,重组蛋白表达量基本稳定(图 6),因此确定最佳诱导时间为 6 h。

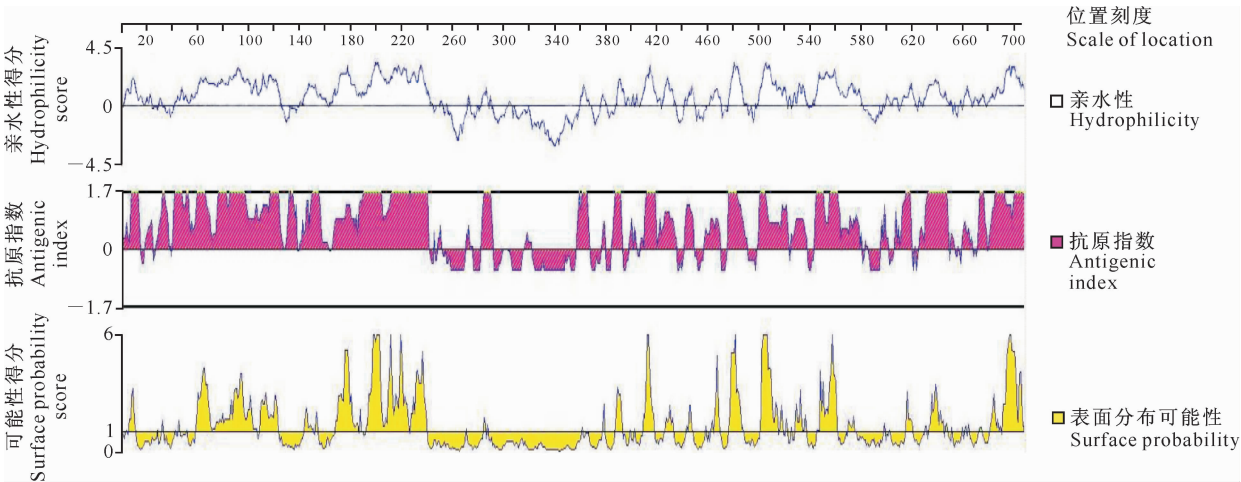


图 3 猪 Jiv 蛋白序列的亲水性、抗原指数和表面分布可能性分析
Fig. 3 Analysis of hydrophilicity, antigenic index and surface probability of swine Jiv protein

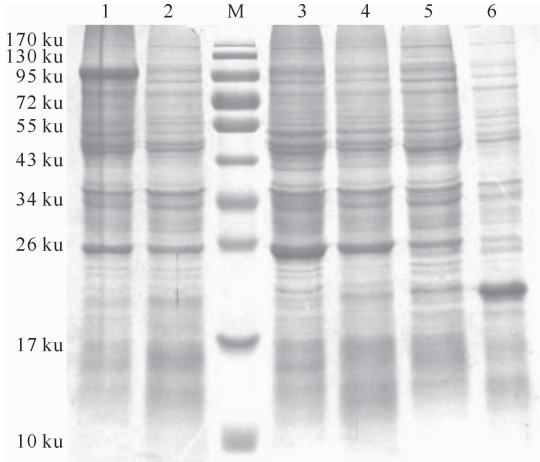


图 4 pET32a-Jiv 诱导表达产物的 SDS-PAGE 电泳结果
M. 蛋白质分子质量标准;1. IPTG 诱导含 pET32a-Jiv 质粒菌裂解后沉淀;2. IPTG 诱导含 pET32a-Jiv 质粒菌裂解后上清液;3. 未诱导含 pET32a-Jiv 质粒菌裂解后沉淀;4. 未诱导含 pET32a-Jiv 质粒菌裂解后上清液;5. 诱导含 pET-32a(+)质粒菌裂解后沉淀;6. 诱导含 pET-32a(+)质粒菌裂解后上清液

Fig. 4 Analysis of induced products of pET32a-Jiv by SDS-PAGE

M. Protein Marker;1. Insoluble lysates from IPTG induced cells containing pET32a-Jiv;2. Soluble lysates from IPTG induced cells containing pET32a-Jiv;3. Insoluble lysates from uninduced cells containing pET32a-Jiv;4. Soluble lysates from uninduced cells containing pET32a-Jiv;5. Insoluble lysates from induced cells containing pET-32a(+);6. Soluble lysates from induced cells containing pET-32a(+)

2.5 猪 Jiv 融合蛋白的纯化

使用 Ni-NTA His Resin 柱纯化目的蛋白,在

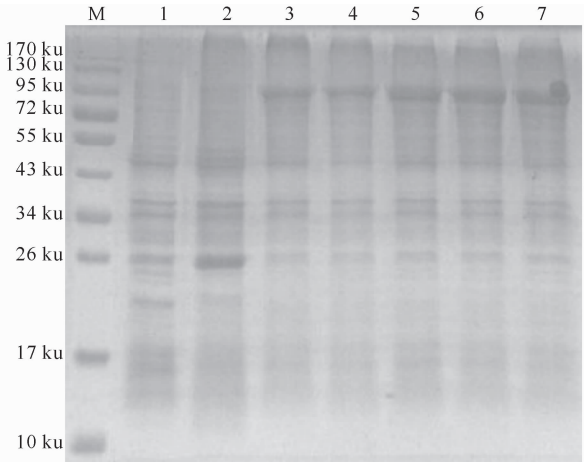


图 5 不同浓度 IPTG 对猪 Jiv 融合蛋白诱导表达的影响
M. 蛋白质分子质量标准;1. 诱导的 pET-32a(+);2. 未诱导的 pET32a-Jiv;3~7. 分别用终浓度 0.1,0.3,0.5,0.8 和 1.0 mmol/L IPTG 诱导 pET32a-Jiv

Fig. 5 Effects of IPTG concentration on expression of Jiv fusion protein

M. Protein Marker;1. Induced cells containing pET-32a(+);2. Uninduced cells containing pET32a-Jiv;3~7. Cells containing pET32a-Jiv induced with 0.1,0.3,0.5,0.8 and 1.0 mmol/L IPTG, respectively

95 ku 处出现一条带,其大小与理论值相符(Jiv 蛋白分子质量为 78 ku,His 标签蛋白分子质量为 17

ku),同时样品蛋白所含杂带较少,说明最终纯化到的目的蛋白纯度较高(图 7),可以作为抗原免疫动物。

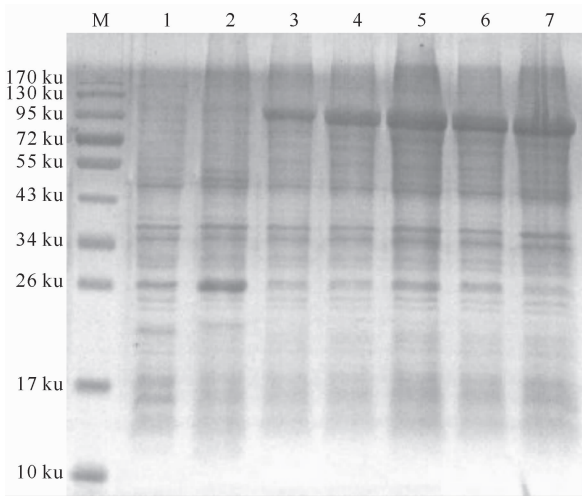


图 6 诱导时间对猪 Jiv 融合蛋白诱导表达的影响

M. 蛋白质分子质量标准;1. 诱导的 pET-32a(+);
2. 未诱导的 pET32a-Jiv;
3~7. 分别诱导 2,4,6,8,10 h 的 pET32a-Jiv

Fig. 6 Effects of induction time on expression of Jiv fusion protein

M. Protein Marker;1. Induced cells containing pET-32a(+);2. Uninduced cells containing pET32a-Jiv;
3—7. Cells containing pET32a-Jiv induced for 2,4,6,8 and 10 h, respectively

2. 6 抗猪 Jiv 蛋白多克隆抗体血清的效价

用间接 ELISA 法测定抗体效价,结果显示,抗猪 Jiv 蛋白多克隆抗体血清的效价较高,达 1 : 6 400(图 8)。

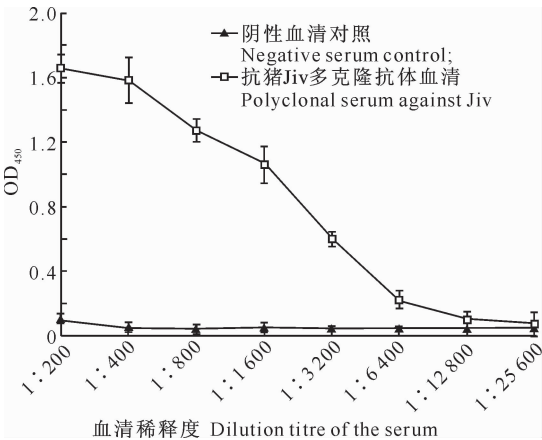


图 8 抗猪 Jiv 蛋白多克隆抗体血清的效价
Fig. 8 Titers of polyclonal antibody against swine Jiv protein

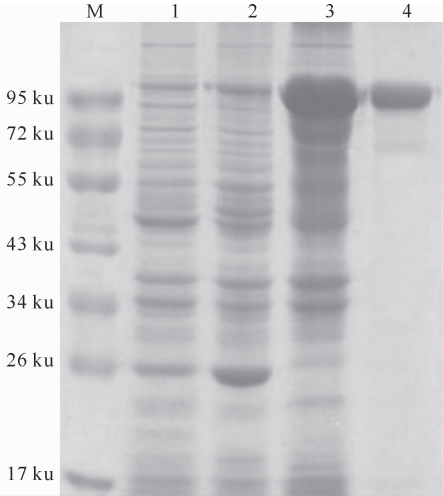


图 7 纯化猪 Jiv 融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

M. 蛋白质分子质量标准;1. 诱导的 pET-32a(+);
2. 未诱导的 pET32a-Jiv;3. 纯化前诱导的 pET32a-Jiv;
4. 纯化的猪 Jiv 融合蛋白

Fig. 7 Analysis of purified swine Jiv fusion protein by SDS-PAGE

M. Protein Marker;1. Induced cells containing pET-32a(+);
2. Uninduced cells containing pET32a-Jiv;
3. Induced cells containing pET32a-Jiv;
4. Purified His-Jiv fusion protein

2. 7 抗猪 Jiv 蛋白抗体特异性的检测

用 Western blot 检验抗猪 Jiv 蛋白多克隆抗体的特异性,结果显示,自制的多克隆抗体与 Jiv 融合蛋白和组织中的猪 Jiv 蛋白发生反应均产生分子质量正确的蛋白条带,与非特异性蛋白未发生反应(图 9),说明抗体有良好特异性。

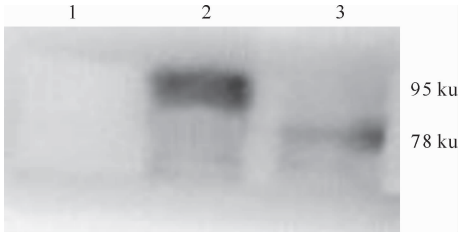


图 9 抗猪 Jiv 蛋白多克隆抗体的 Western blot 分析结果

1. 阴性对照;2. 猪 Jiv 融合蛋白;3. 脾脏组织裂解上清液

Fig. 9 Western blot analysis of polyclonal antibody against swine Jiv protein

1. Negative control;2. His-Jiv fusion protein;
3. Supernatant of spleen tissue lysate

3 讨 论

Jiv 蛋白作为宿主细胞分子伴侣蛋白 HSP40 家族的一个成员,其与病毒的相互作用不断被人们所关注。*Jiv* 蛋白可以促进瘟病毒属 (*Pestivirus*) 成员 BVDV 非结构蛋白 NS2-3 前体蛋白的切割,进而促进病毒复制,最终影响 BVDV 的表型^[3],其也参与黄病毒属 (*Flavivirus*) 成员黄热病病毒 (Yellow fever virus, YFV) 的病毒复制复合体的形成^[8],大量表达 *Jiv* 蛋白后可减少由 YFV 引起的细胞死亡^[9]。而这些病毒都与人类生命健康和动物健康息息相关^[10-11]。

目前研究发现,在 *Jiv* 蛋白与 CSFV 相互作用过程中,已经可以确定 *Jiv*90 区段与 CSFV NS2 蛋白发生结合,促使 NS2 发挥蛋白酶作用切割 NS2-3 蛋白前体^[4],释放出的 NS3 蛋白进一步发挥其蛋白酶作用并产生放大效应,引起与病毒复制相关非结构蛋白 NS4A、NS5A、NS5B 在病毒感染细胞初期大量累积^[12-13],为病毒的快速复制创造条件^[14],类似的机制在 *Jiv* 蛋白与 BVDV 相互作用过程中也有报道^[3,15]。在 CSFV 基因组中插入 *Jiv*90 后构建的嵌合 Alfort-*Jiv* 毒株并未引起被感染宿主的大量死亡,反而引起机体产生中和 CSFV 的高滴度抗体,有效地保护了宿主,其对应的 NCP 型 CSFV Alfort-p447 株感染宿主后则产生了典型猪瘟临床症状^[4]。CP 型 CSFV vA187-1 毒株也可引起被感染细胞产生 CPE 效应,其基因序列中没有 *Jiv* 序列的插入,其病毒 RNA 复制、非结构蛋白 NS3 的表达动力学以及引起的猪瘟临床症状并未与相对应的 NCP 型 CSFV vA187-1 株有明显差异^[16-17]。说明 CSFV Alfort-*Jiv* 毒株与宿主相互作用过程中存在其特殊性,提示这种特殊性可能是由于 *Jiv* 序列的插入引起的,因此笔者推断,*Jiv* 插入引起的 CP 型 CSFV 与宿主之间存在更为复杂的作用网络,可能参与了宿主的免疫调节反应。

谭学超等^[18]发现,*Jiv* 基因在猪体不同组织脏器中存在不同表达分布,在猪瘟病毒靶组织(如脾脏)中,*Jiv* 基因表达量显著高于非靶组织。因此,本研究在提取 *Jiv* RNA 时,选取其表达量高的猪脾脏组织作为材料,经过 RT-PCR 后获得浓度较高的 *Jiv* DNA。为了深入研究 *Jiv* 蛋白与 CSFV 的相互作用,以及可能参与到的宿主免疫调节功能,本试验构建了 pET32a-*Jiv* 原核表达载体,纯化了猪 *Jiv* 融合蛋白并制备相应的特异性抗体,为后续蛋白功能

研究提供了基础材料。

[参考文献]

- [1] Mendez E, Ruggli N, Collett M S, et al. Infectious bovine viral diarrhea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: A cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity [J]. J Virol, 1998, 72(6): 4737-4745.
- [2] Hughes A L. Evolutionary origin of the *Jiv*90 gene of pestivirus [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2004, 4(4): 329-333.
- [3] Rinck G, Birghan C, Harada T, et al. A cellular J-domain protein modulates polyprotein processing and cytopathogenicity of a pestivirus [J]. J Virol, 2001, 75(19): 9470-9482.
- [4] Gallei A, Blome S, Gilgenbach S, et al. Cytopathogenicity of classical swine fever virus correlates with attenuation in the natural host [J]. J Virol, 2008, 82(19): 9717-9729.
- [5] Kosmidou A, Büttner M, Meyers G. Isolation and characterization of cytopathogenic classical swine fever virus (CSFV) [J]. Archives of Virology, 1998, 143(7): 1295-1309.
- [6] 刘 伟, 杨幼聪, 李宇立, 等. 分子伴侣 *Jiv*90 基因的克隆及其在猪脐静脉血管内皮细胞中的表达 [J]. 动物医学进展, 2010, 31(6): 26-30.
Liu W, Yang Y C, Li Y L, et al. Cloning of molecular chaperone *Jiv*90 gene and its expression in SUVEC line [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2010, 31(6): 26-30. (in Chinese)
- [7] 郭抗抗, 雷安民, 宁蓬勃, 等. 转录靶向猪 *Jiv* 基因 shRNA 细胞株的建立及抗猪瘟病毒转基因猪的构建 [J]. 中国农业科学, 2013, 46(1): 170-178.
Guo K K, Lei A M, Ning P B, et al. Establishment of cell lines transcribing shRNA targeted to *Jiv* gene and construction of CSFV resistant transgenic Piglet [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(1): 170-178. (in Chinese)
- [8] Yi Z, Yuan Z, Rice C M, et al. Flavivirus replication complex assembly revealed by DNAJC14 functional mapping [J]. J Virol, 2012, 86(21): 11815-11832.
- [9] Yi Z, Sperzel L, Nürnberger C, et al. Identification and characterization of the host protein DNAJC14 as a broadly active flavivirus replication modulator [J]. PLoS Pathog, 2011, 7(1): e1001255.
- [10] Monath T P. Yellow fever and dengue-the interactions of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease [J]. Seminars in Virology, 1994, 5(2): 133-145.
- [11] Gunn G, Saatkamp, Humphry R, et al. Assessing economic and social pressure for the control of bovine viral diarrhoea virus [J]. Preventive Veterinary Medicine, 2005, 72(1): 149-162.
- [12] Xiao M, Zhang C Y, Pan Z S, et al. Classical swine fever virus NS5B-GFP fusion protein possesses an RNA-dependent RNA polymerase activity [J]. Archives of Virology, 2002, 147(9): 1779-1787.
- [13] Moulin H R, Seuberlich T, Bauhofer O, et al. Nonstructural proteins NS2-3 and NS4A of classical swine fever virus: Essential features for infectious particle formation [J]. Virology, 2007, 365(2): 376-389.

(下转第 22 页)

sis of orf virus from the sheep herd outbreak in northeast China [J]. BMC Vet Res,2012,8:229.

[12] Mondal B,Bera A K,Hosamani M,et al. Detection of Orf virus from an outbreak in goats and its genetic relation with other parapoxviruses [J]. Vet Res Commun,2006,30(5):531-539.

[13] Wise L M,Savory L J,Dryden N H,et al. Major amino acid

sequence variants of viral vascular endothelial growth factor are functionally equivalent during Orf virus infection of sheep skin [J]. Virus Res,2007,128(1/2):115-125.

[14] Suet B T,Mc Caughan C A,Handel T M,et al. Analysis of an orf virus chemokine-binding protein:Shifting ligand specificities among a family of poxvirus viroceptors [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2003,100:15137-15142.

(上接第 13 页)

[14] Lamp B,Riedel C,Roman-Sosa G,et al. Biosynthesis of classical swine fever virus nonstructural proteins [J]. J Virol,2011,85(7):3607-3620.

[15] Lackner T,Müller A,König M,et al. Persistence of bovine viral diarrhoea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease [J]. J Virol,2005,79(15):9746-9755.

[16] Mittelholzer C,Moser C,Tratschin J D,et al. Generation of cytopathogenic subgenomic RNA of classical swine fever virus in persistently infected porcine cell lines [J]. Virus Res,1997,51(2):125-137.

[17] Mittelholzer C,Moser C,Tratschin J D,et al. Analysis of clas-

sical swine fever virus replication kinetics allows differentiation of highly virulent from avirulent strains [J]. Vet Microbiol,2000,74(4):293-308.

[18] 谭学超,郭抗抗,宁蓬勃,等. 检测猪分子伴侣 *Jiv* 基因的 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报,2013,35(11):894-898.

Tan X C,Guo K K,Ning P B,et al. Development of SYBR Green I fluorogenic quantitative RT-PCR assay for detection of porcine molecular chaperone *Jiv* [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine,2013,35(11):894-898. (in Chinese)