

DOI:10.13350/j.cjpb.240901

• 论著 •

狂犬病毒 L 蛋白加帽酶功能域的表达、纯化 及多克隆抗体的制备与鉴定^{*}

张桃苹¹, 陈露¹, 徐瑞贤¹, 贾亭¹, 石文刚¹, 何淑桢¹, 胡腾¹, 王永博², 宋玉竹¹, 韩芹芹¹, 夏雪山¹, 张金阳^{1*}

(1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南省分子医学研究中心, 云南昆明 650500;

2. 昆明理工大学附属云南省第一人民医院临床检验科)

【摘要】 目的 克隆狂犬病毒(RABV)L蛋白的加帽酶功能域基因, 构建原核表达载体, 制备了多克隆抗体, 为病毒诊断和抗病毒药物研发提供了有效工具。 **方法** 利用基因工程技术, 扩增 L 蛋白加帽酶功能域的基因序列, 与双酶切的 pET-32a 载体连接, 获得 pET-32a-RABV-L 重组表达质粒。经过测序确认无碱基突变, 将含 pET-32a-RABV-L 重组表达质粒的菌液扩大培养后, IPTG 诱导表达重组蛋白。通过 Ni-NTA 亲和层析填料进行纯化, 改变不同咪唑洗脱浓度, 摸索出适合的洗脱条件。将纯化的蛋白与弗氏佐剂混合免疫小鼠, 获得的小鼠多克隆抗体进行间接 ELISA 检测、Western blot 检测、IFA 检测。 **结果** 成功构建 pET-32a-RABV-L 原核表达质粒。RABV-L 重组蛋白在大肠埃希菌中成功表达, 大小约 40 ku, 且与 His-tag 的单克隆抗体发生特异性反应。免疫小鼠 64 d 后, 采取的小鼠血清制备多克隆抗体, 其工作效价达到 25 600, 在 Western blot 检测和 IFA 检测中显示能特异性识别天然病毒 L 蛋白。 **结论** 成功表达、纯化 RABV-L 蛋白加帽酶功能域的重组蛋白, 并成功获得特异性识别天然表位的多克隆抗体。

【关键词】 狂犬病毒(RABV); L 蛋白; 重组表达; 多克隆抗体

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2024)09-0993-06

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Sep.; 19(9):993-998.]

Expression, purification, preparation and identification of polyclonal antibodies for the capping enzyme domain of rabies virus L protein

ZHANG Taoping¹, CHEN Lu¹, XU Ruixian¹, JIA Ting¹, SHI Wengang¹, HE Shuzhen¹, HU Teng¹, WANG Yongbo², SONG Yuzhu¹, HAN Qinqin¹, XIA Xueshan¹, ZHANG Jinyang¹ (1. Molecular Medicine Research Centre of Yunnan Province, Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 2. Department of Clinical Laboratory, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming University of Science and Technology)^{***}

【Abstract】 Objective Cloning of the capping enzyme domain gene of the rabies virus (RABV) L protein, construction of a prokaryotic expression vector, and preparation of polyclonal antibodies have provided effective tools for virus diagnosis and antiviral drug development. **Methods** The gene sequence of the capping enzyme domain of the L protein was amplified using genetic engineering techniques, ligated with the double-enzyme digested pET-32a vector, resulting in the pET-32a-RABV-L recombinant expression plasmid. After the confirmation of the absence of base mutations by sequencing, the pET-32a-RABV-L recombinant expression bacteria was cultured on a large scale and induced with IPTG to express the recombinant protein. Purification was performed using Ni-NTA affinity chromatography resin, with different imidazole elution concentrations explored to determine suitable elution conditions. The purified protein was mixed with Freund's adjuvant for immunization of mice. The resulting mouse polyclonal antibodies were subjected to indirect ELISA, Western blot, and IFA analyses. **Results** The pET-32a-RABV-L prokaryotic expression plasmid was successfully constructed. The RABV-L recombinant protein was successfully expressed in *Escherichia coli*, with a size of approximately 40 ku, and showed specific reactivity with monoclonal antibodies against the His-tag. After 64 days of immunization of mice, polyclonal antibodies were prepared from mouse sera, with a working titer reaching 25 600, demonstrating specific recognition of the natural viral L protein in Western blot and IFA analyses. **Conclusion** The

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81860625); 云南省基础研究计划重点项目(No. 202401AS070101); 昆明理工大学“双一流”科技专项课题(No. 202302AG050003-2); 云南省“兴滇英才支持计划”青年人才专项项目(No. XDYC-QNRC-2022-0368)。

** **【通讯作者】** 张金阳, E-mail: jyzhang@kust.edu.cn

【作者简介】 张桃苹(1999-), 女, 云南曲靖人, 在读硕士研究生。研究方向: 分子病毒学, E-mail: 2044642494@qq.com
张桃苹和陈露为共同第一作者。

experiment successfully expressed and purified the recombinant protein containing the capping enzyme domain of RABV L protein, and successfully obtained polyclonal antibodies capable of specifically recognizing natural epitopes.

【Keywords】 Rabies virus (RABV); L protein; recombinant expression; polyclonal antibody

狂犬病是一种由狂犬病毒(RABV)感染温血动物后出现急性致死脑脊髓炎为特征的神经系统疾病。目前诊断狂犬病毒的方法按照不同的水平可分为RABV cDNA、RABV RNA、RABV各蛋白和检测RABV病毒粒子,临床检测中往往根据患者状态、临床条件、样本获取与保存难度综合多种检测方法对患者进行疾病定性、毒株分析等^[1-4]。迄今为止,针对狂犬病最有效的方式是暴露前预防的疫苗以及注射免疫球蛋白,但是免疫球蛋白来自人血清或马血清,制作成本高^[5]。单克隆抗体治疗常作为治疗药物,中和患者体内RABV,使RABV的增殖能力减弱,从而达到治疗狂犬病的效果,已有2款单克隆抗体药物在亚洲获批上市^[6]。

RABV是一种单股负链不分节段的RNA病毒,全长基因组约为12 kb,从3'端到5'端编码5个结构蛋白,即糖蛋白(G)、核蛋白(N)、磷蛋白(P)、转录酶大蛋白(L)以及基质蛋白(M)^[7-9]。转录酶大蛋白(L)其分子质量为244 ku,在病毒的mRNA转录过程中起着催化功能^[10]。L蛋白在与辅酶因子P的相互作用下,形成病毒核糖核蛋白复合物^[11];L蛋白与N蛋白结合影响基因组RNA的合成^[11-12];L蛋白与M蛋白的相互作用调控病毒进入宿主细胞的过程^[12-15]。在RABV的整个生命过程中,L蛋白在与宿主细胞的分子相互作用中扮演重要角色。因此开发针对RABV-L蛋白的单克隆抗体在诊断和治疗狂犬病上,有着重要意义。

RABV-L蛋白是具有多功能酶活性蛋白,其中包括RNA聚合酶、加帽酶以及甲基化酶。本实验室的前期工作中已经成功构建甲基化酶的原核表达系统^[16],本研究选取L蛋白加帽酶结构进行研究,通过构建L蛋白加帽酶结构的原核表达系统,纯化该蛋白片段,该蛋白多克隆抗体可异性识别病毒感染的细胞,为单克隆抗体的研制与L蛋白与宿主蛋白相互作用机制提供理论基础。

材料与方法

1 材料

Rosetta菌株和pET-32a载体、RABV-1N1单克隆抗体^[17]、His tag单克隆抗体^[18]由本实验室保存或制备。RABV HEP-Flury病毒株在小鼠神经母细胞瘤N2a细胞中扩繁。T4 DNA连接酶、pMD19-T克隆载体、Taq DNA聚合酶、限制性内切酶(*EcoR* I和*Xho* I)、PCR产物纯化试剂盒购自日本TaKaRa公

司;蛋白高分子质量预染Marker购于翌圣公司;质粒小提试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京庄盟公司;镍柱购于武汉汇研公司;Trizol购于天根生物科技有限公司;弗氏完全佐剂及不完全佐剂购自美国Sigma公司。SDS-PAGE电泳仪和核酸电泳仪购于北京六一公司。

2 方法

2.1 基因片段的克隆及原核表达 载体的构建 N2a细胞培养 HEP-Flury病毒48 h后,用Trizol裂解细胞提取病毒RNA逆转录获取cDNA。根据NCBI中RABV HEP-Flury毒株L蛋白的基因序列,选择L蛋白的加帽结构功能域片段(8687-9391)设计引物并添加保护碱基:F: 5'-GGAATTCTGCTCTTCAGAGAGGGC-3'(*EcoR* I);R: 5'-CCGCTCGAGTATATCCTCAATGGGCC-3'(*Xho* I)。

以cDNA为模板进行PCR扩增,通过1%的琼脂糖凝胶电泳进行验证后进行胶回收,产物与pMD-19T克隆性载体进行连接,通过化学法转化至DH5 α 感受态细胞中表达。菌液涂布于Amp抗性筛选平板过夜培养,挑取单菌落进行PCR阳性产物测序分析。测序结果比对正确后,pET-32a表达载体与目的基因通过T4连接酶进行连接,连接产物转化至Rosetta感受态细胞中表达。

2.2 RABV-L重组蛋白的表达 将含有pET-32a-RABV-L表达载体的工程菌进行放大培养,待菌液的A₆₀₀为0.8时在超净台中加入终浓度为0.1 mmol/L的IPTG,并置于25℃,100 r/min的恒温摇床里进行诱导。诱导12 h后离心收集菌液与之前收集的未诱导菌液进行12% SDS-PAGE电泳分析,确定目的蛋白的正确表达。将诱导后菌液超声破碎进行可溶性分析,确定目的蛋白以包涵体形式存在,收集沉淀用尿素进行处理,之后通过Ni-NTA亲和层析填料进行纯化^[19]。采用含不同浓度咪唑的洗脱液进行洗脱,收集流出液进行A₂₈₀的测定。

2.3 重组RABV-L蛋白多克隆抗体的制备 以6~8周的雌性小鼠为实验对象。第1次免疫取30 μ g纯化后得到的RABV-L重组蛋白与PBS稀释至200 μ L后加入等量的弗氏完全佐剂进行2 h的震荡,再用注射器进行反复吹打充分乳化后对小鼠进行皮下多点注射。14 d后将弗氏完全佐剂替换为弗氏不完全佐剂,进行2次免疫^[20]。免疫方案如下:初次免疫为30 μ g抗原与弗氏完全佐剂混合;14、28 d后为30 μ g抗原与

弗氏不完全佐剂混合;第 42、57、64 d 采用 80 μg 抗原与弗氏不完全佐剂混合。

2.4 ELISA 检测多克隆抗体的效价 用 5% 的脱脂奶将纯化后的重组 L 蛋白稀释至 10 μg/mL,保持 100 μL/孔,4 ℃ 包被过夜。24 h 弃掉包被液,用 PBST 洗涤 3 次;5% 脱脂奶 37 ℃ 封闭 2 h,200 μL/孔,PBST 洗 3 次,至孔内没有洗液残留;加入 5% 脱脂奶倍比稀释(1:100~1:204 800)的多抗血清,100 μL/孔,37 ℃ 孵育 2 h,PBST 洗 5 次;加入用 5% 脱脂奶按 1:10 000 稀释的 HRP 标记山羊抗鼠的 IgG,100 μL/孔,37 ℃ 孵育 1 h,PBST 洗 3 次;每孔加入 100 μL TMB 显色液避光反应 20 min;50 μL/孔的 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,测 A₄₅₀ 值,分析数据,采用 GraphPad prism8 进行数据绘图。

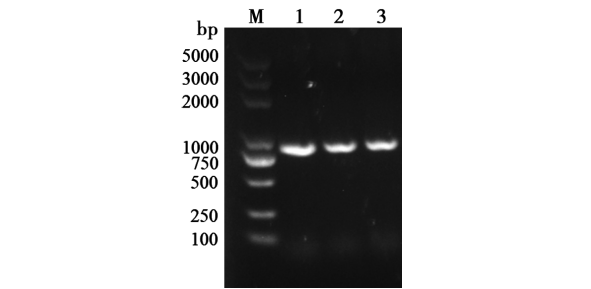
2.5 Western blot 检测 多克隆抗体的特异性 RABV 病毒感染 N2a 细胞并培养 48 h 后,6 孔板中每孔细胞使用 1 mL 的 RIPA 强裂解液裂解细胞,冰上裂解 30 min。控制细胞裂解液蛋白总量一致为 20 μg,置于金属浴 95 ℃ 进行蛋白变性。在 SDS-PAGE 中通过恒压分离总蛋白。取出胶,375 mA 恒流条件下转膜 55 min。结束后,37 ℃、60 r/min 将膜用脱脂奶封闭 2 h。加入多克隆抗体、1N1(1:1000)与 β-actin(1:1000)于 37 ℃、60 r/min 孵育 2 h。弃掉一抗稀释液,将膜用 PBST 洗涤 5 次,每次 5 min。加入 1:8 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 孵育 1 h。弃去二抗,将膜用 PBST 洗涤 5 次,每次 5 min,加入显影液观察结果。

2.6 IFA 检测 多克隆抗体的特异性使用 10% 的血清培养基稀释 N2a 细胞于 96 孔板中,过夜培养后,细胞贴壁。RABV 病毒感染 N2a 细胞,培养 48 h 后去除原培养基。将预冷的固定液(甲醛:丙酮=1:1)加入 96 孔板中,置于-20 ℃ 20 min,固定好细胞后,去除固定液,风干细胞孔。5% 脱脂奶封闭细胞,每孔 200 μL,37 ℃,2 h。将多克隆抗体按比例稀释,稀释后的抗体溶液作为一抗孵育细胞。使用 PBST 清洗孔板。加入 1:1500 稀释的荧光二抗,每孔 50 μL,37 ℃ 避光孵育 1 h。再次洗涤孔板 5 遍并加入 100 μL PBS 保持细胞湿润,于倒置荧光显微镜下观察荧光,并将细胞荧光图片保存。

结 果

1 PCR 扩增 L 蛋白基因

从感染 Flury 病毒的 N2a 细胞中提取病毒 RNA,逆转录获取 cDNA 后,按照 PCR 流程扩增出 RABV-L 中加帽酶功能域的编码 DNA 序列。扩增的目的 L 基因片段约为 700 bp,与目的序列大小一致(图 1)。



M DNA marker1~3L 蛋白基因扩增片段
图 1 狂犬病毒 HEP-Flury 毒株 L 蛋白基因扩增
M DNA marker1-3L protein gene amplified fragments
Fig. 1 L protein gene amplification of RABV HEP-Flury strain

2 pET-32a-RABV-L 重组质粒鉴定

将扩增后的 RABV-L 片段与载体 pMD-19T 连接后转入 Rosetta 感受态细胞进行表达,挑取阳性单克隆进行测序,测序结果(图 2)与 NCBI 数据库中 RABV-L 序列结果进行比对,碱基未发生突变。RABV-L 重组蛋白的原核表达原理如图 3,选择酶切位点 *EcoR* I 和 *Xho* I,将构建的 pMD-19T-RABV-L 克隆载体与 pET-32a 表达载体进行双酶切。酶切结果如图 4,酶切后的 pET-32a 表达载体大小为 5 000 bp 以上。pMD-19T-RABV-L 质粒酶切后,RABV-L 目的大小为 700 bp 左右,与预期结果一致。成功构建 pET-32a-RABV-L 重组质粒,转化后在 Amp 抗性的固体培养基上培养过夜,24 h 挑取阳性单克隆进行菌液 PCR 鉴定,鉴定结果如图 5,阳性条带在 700 bp 左右,与预期结果一致。

Rabies virus strain Flury-HEP, complete genome
Sequence ID: [GU565704.1](#) Length: 11925 Number of Matches: 1

Range 1: 8687 to 9391 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1303 bits(705)	0.0	705/705(100%)	0/705(0%)	Plus/Plus
Query 59		TGCTCTTCAGAGAGGGGAGATCTACTTAGGGAGATCTCTGGGGAAGGAAGTGGTGGGC		118
Sbjct 8687		TGCTCTTCAGAGAGGGGAGATCTACTTAGGGAGATCTCTGGGGAAGGAAGTGGTGGGC		8746
Query 119		ACGACAGTTCTCACCCTTCGAGATGTTGGGGCTGCTCCAAAATCCTCTATTTCTGTC		178
Sbjct 8747		ACGACAGTTCTCACCCTTCGAGATGTTGGGGCTGCTCCAAAATCCTCTATTTCTGTC		8806
Query 179		ACTTGTGGAGCAACAGGGGAGGCAACCTAGAGTTCTGTACAGTACTCCCTCCTC		238
Sbjct 8807		ACTTGTGGAGCAACAGGGGAGGCAACCTAGAGTTCTGTACAGTACTCCCTCCTC		8866
Query 239		GATCAGTCAATTTTTCACGAGGTCCCTTAAGGGATACCTGGGGCTGTCACCTCCATG		298
Sbjct 8867		GATCAGTCAATTTTTCACGAGGTCCCTTAAGGGATACCTGGGGCTGTCACCTCCATG		8926
Query 299		TCAAACCCAGCTATTCATGATGGGAAAGTCAATATGTTCTATGTGGTGAAGAGGGCT		358
Sbjct 8927		TCAAACCCAGCTATTCATGATGGGAAAGTCAATATGTTCTATGTGGTGAAGAGGGCT		8986
Query 359		ATATCGTTAAAGAAATCTATAAAGTGGTTCAATAGAAATCCAAATTTGGCTCAAACT		418
Sbjct 8987		ATATCGTTAAAGAAATCTATAAAGTGGTTCAATAGAAATCCAAATTTGGCTCAAACT		9046
Query 419		CTAATTAGAAACATCATGCTCTGACAGAGGCGCTGATTCTCTCTAGAGAGGCTCCTGTT		478
Sbjct 9047		CTAATTAGAAACATCATGCTCTGACAGAGGCGCTGATTCTCTCTAGAGAGGCTCCTGTT		9106
Query 479		TTCAAACGACAGGGGTGACGCTTGCATAGGTTCAAGTCTGCCAGATACAGCGAAGGAGG		538
Sbjct 9107		TTCAAACGACAGGGGTGACGCTTGCATAGGTTCAAGTCTGCCAGATACAGCGAAGGAGG		9166
Query 539		TATTCCTCTGTTGGTCTTAACCTTCTCTCATATCTCTGTCAAGTACAGACATATGCT		598
Sbjct 9167		TATTCCTCTGTTGGTCTTAACCTTCTCTCATATCTCTGTCAAGTACAGACATATGCT		9226
Query 599		GATTTGACCCAGAGCGGGAAGAACTATGATTTCAATGTTTCAAGCATTGATGCTTTATGCG		658
Sbjct 9227		GATTTGACCCAGAGCGGGAAGAACTATGATTTCAATGTTTCAAGCATTGATGCTTTATGCG		9286
Query 659		CAAAATGAGACATCAGAGCTGGTACAGAGACACAAGACTGAGAGACTCCACGTTTTCAC		718
Sbjct 9287		CAAAATGAGACATCAGAGCTGGTACAGAGACACAAGACTGAGAGACTCCACGTTTTCAC		9346
Query 719		TGGCACCTTCGATGCAACAGATGTGTAGGCGCCATTGAGGATATA 763		
Sbjct 9347		TGGCACCTTCGATGCAACAGATGTGTAGGCGCCATTGAGGATATA 9391		

图 2 RABV-L 目的基因与扩增后的基因测序结果比对
Fig. 2 Comparison of theRABV-L target gene with the sequencing results of the amplified gene

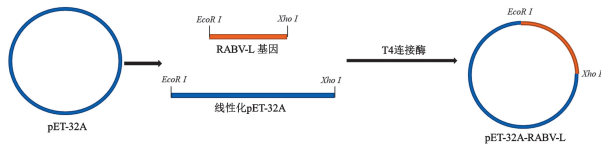
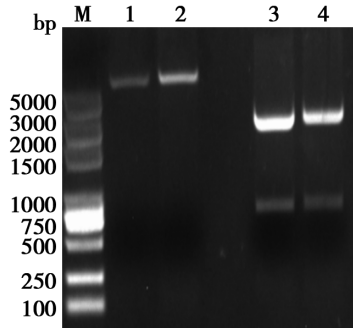


图 3 pET-32a-RABV-L 重组质粒构建原理示意图
Fig. 3 Schematic diagram of the construction principle of the prokaryotic expression vector of pET-32a-RABV-L

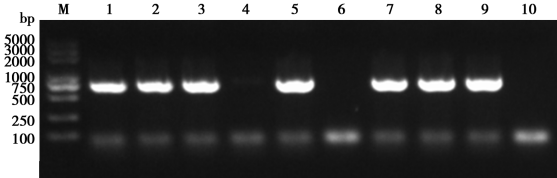


M DNA marker 1,2 pET-32a 载体酶切 3,4 pMD-19T-RABV-L 克隆载体酶切

图 4 克隆载体酶切

M DNA marker 1,2 pET-32a vector digest 3,4 pMD-19T-RABV-L cloning vector digest

Fig. 4 Cloning vector digestion



M 阴性对照 1~10 pET-32a-RABV-L 重组表达载体

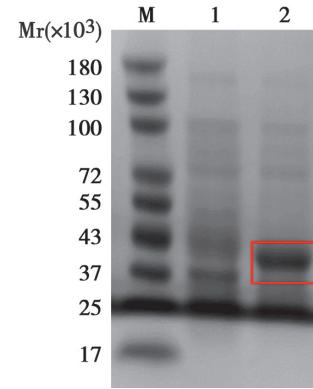
图 5 pET-32a-RABV-L 菌液 PCR 鉴定

M Negative control 1-10 pET-32a-RABV-L recombinant expression vector

Fig. 5 pET-32a-RABV-L bacterial PCR identification

3 重组 L 蛋白的表达与纯化

重组表达质粒 pET-32a-RABV-L 成功转入大肠埃希菌 Rosetta(DE3)后,经过扩大培养与 IPTG 诱导后,对于诱导前后的菌液进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。重组表达工程菌在 IPTG 诱导下,表达目的蛋白大小与预期相符,大小为 40 ku(图 6)。在 Western blot 实验中,诱导表达出来的重组 L 蛋白与鼠源抗 His-tag 单克隆抗体发生反应,在约 40ku 处出现了 1 条特异性的蛋白条带,未进行诱导的菌体无蛋白条带(图 7),与 SDS-PAGE 的分析结果一致,含有 His 标签的重组 L 蛋白正确表达。经可溶性分析,表明得到的 pET-32a-RABV-L 蛋白主要以包涵体形式存在,将包涵体通过尿素处理并用含不同浓度的咪唑洗脱收集目的蛋白(图 8A)。在 pET-32a-RABV-L 的纯化洗脱中,250 mmol/L 咪唑得到的重组蛋白含量最高,且蛋白条带较为单一(图 8B)。

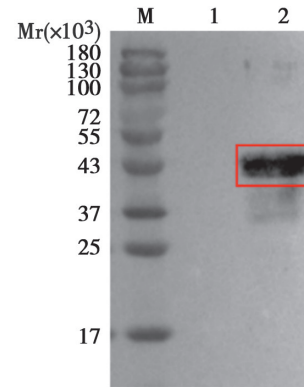


M 180 ku 蛋白 marker 1 未诱导菌体蛋白 2 添加 IPTG 进行诱导后的菌体蛋白

图 6 SDS-PAGE 鉴定 RABV-L 重组蛋白的表达

M 180 ku protein marker 1 Uninduced bacterial protein 2 Bacterial protein after induction by adding IPTG

Fig. 6 SDS-PAGE to identify the expression of RABV-L recombinant protein



M 180ku 蛋白 marker 1 未诱导菌体蛋白 2 添加 IPTG 进行诱导后的菌体蛋白

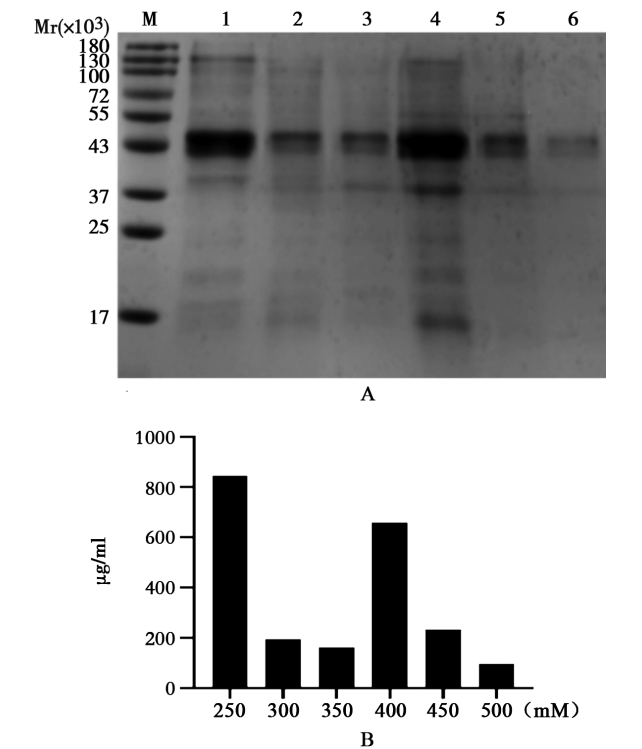
图 7 Western blot 鉴定 RABV-L 重组蛋白的表达

M 180ku protein marker 1 Uninduced bacterial protein 2 Bacterial protein after induction by adding IPTG

Fig. 7 Identification of the expression of RABV-L recombinant protein by Western blot

4 多克隆抗体的效价和特异性检测

ELISA 检测小鼠血清中抗体效价,结果显示蛋白与弗氏佐剂混合物能够诱导小鼠产生的抗体效价达 1:25 600(图 9),表明重组 L 蛋白具有免疫原性。Western blot 鉴定所制备的多克隆抗体结果显示在 242 ku 处出现特异性条带,大小与 L 蛋白一致,并且阳性对照 RABV-N 单克隆抗体能检测 55 ku 蛋白,与 RABV-N 蛋白的大小一致,细胞内的 β -actin 表达正常,说明免疫了 RABV-L 重组蛋白的小鼠血清对于感染 CVS 病毒的细胞有特异性反应(图 10)。使用间接免疫荧光检测多克隆抗体的特异性,结果如图 11 所示,实验组有荧光但较为分散,对照组无荧光,且阳性对照组 RABV-1N1 单克隆抗体组有荧光,且细胞荧光集中。

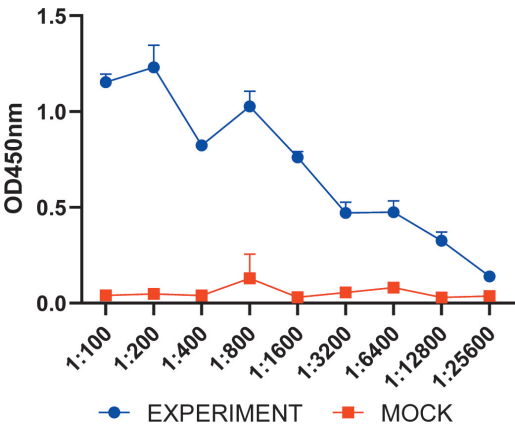


A SDS-PAGE 鉴定不同咪唑洗脱浓度的蛋白纯化效果 M 180 ku 蛋白 marker 1~6 分别为 250、300、350、400、450、500 mmol/L 咪唑洗脱液 B 紫外检测不同咪唑洗脱浓度的蛋白含量

图 8 鉴定不同咪唑洗脱浓度下的纯化蛋白

A SDS-PAGE identification of protein purification at different imidazole elution concentrations M 180 ku protein marker 1-6 250, 300, 350, 400, 450, 500 mmol/L imidazole eluent, respectively B UV detection of protein content in different imidazole elution concentrations

Fig. 8 Identification of purified protein at different imidazole eluting concentrations



注：蓝色为实验组，红色为对照组。

图 9 间接 ELISA 检测小鼠多抗血清效价

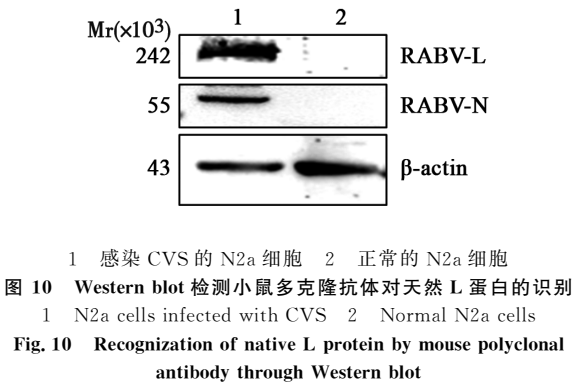
Note: Experimental group in blue; control group in red.

Fig. 9 Indirect ELISA for mouse polyclonal antibody potency in serum.

讨论

狂犬病毒中转录 L 大蛋白能够调节病毒的复制和转录,并参与到免疫逃逸、细胞凋亡和炎症反应等病毒感染的关键步骤中。最近的研究表明,APOBEC3G 可以抑制 HIV 等病毒的复制^[21],RABV-L 蛋白可能

与 APOBEC3G 相互作用,从而降低 APOBEC3G 的抗病毒活性。L 蛋白促进了 APOBEC3G 的泛素化降解,降低了在其细胞内的稳定性,从而进一步入侵细胞^[22-25]。L 蛋白与宿主细胞中的蛋白酶体 Mdm2 相互作用。其中蛋白酶体 Mdm2 是负向调节因子,主要抑制 P53 的功能和促进 P53 的降解。L 蛋白与蛋白酶体 Mdm2 结合后,可能抑制蛋白酶体 Mdm2 的功能^[26-28]。



1 感染 CVS 的 N2a 细胞 2 正常的 N2a 细胞

图 10 Western blot 检测小鼠多克隆抗体对天然 L 蛋白的识别

1 N2a cells infected with CVS 2 Normal N2a cells

Fig. 10 Recognition of native L protein by mouse polyclonal antibody through Western blot

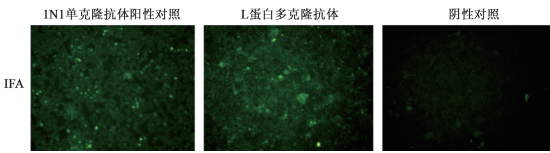


图 11 间接免疫荧光检测小鼠多克隆抗体的特异性

Fig. 11 Specificity of the mouse polyclonal antibody detected by indirect immunofluorescence

L 蛋白由于其分子质量大,表达量少,目前尚无 L 蛋白的商业化抗体。L 蛋白的 PRNTase 基序 A 至 E 中的一些保守氨基酸残基(G1112、T1170、W1201、H1241、R1242、F1285 和 Q1286)是加帽结构形成所必需的,且 PRNTase 结构域反应涉及 pRNA 向 GDP 转移的共价催化,是新的开发抗病毒药物的靶点^[12]。因此选取 L 蛋白加帽酶结构进行研究,表达并纯化了一种重组形式的 L 蛋白片段。

本研究采用大肠埃希菌系统表达 L 蛋白,能够高产量的稳定表达目的蛋白。扩增 RABV-L 中 8687-9391 氨基酸序列区域的 DNA 序列,并连接到 pET-32a 表达载体,其 L 蛋白具有高度保守性,氨基酸突变对 L 蛋白的功能影响较大,因此研究中必须保证氨基酸的一致性。在本研究蛋白纯化时发现 RABV-L 重组蛋白片段表达在包涵体中,添加 IPTG 进行诱导后,蛋白表达量增多。然而咪唑浓度影响洗脱效率,摸索咪唑亲和和洗脱的浓度时,发现咪唑浓度为 250 mmol/L 和 400 mmol/L 时洗脱效率较高,并且咪唑浓度为 250 mmol/L 时洗脱蛋白含量最高,因此本研究中采用咪唑浓度为 250 mmol/L 洗脱目的蛋白。RABV-L 重组蛋白带有 His 标签,Western blot 鉴定时,RABV-

L蛋白与 His tag 单克隆抗体出现特异性单一条带,说明成功表达纯化 RABV-L 重组蛋白。小鼠免疫过程中,ELISA 测定多克隆效价为 1 : 25 600,但在 Western blot 中使用多克隆抗体鉴定感染 RABV 的 N2a 细胞,未出现单一条带。考虑到 L 蛋白全长分子质量为 244 ku,且在感染病毒细胞中表达量较少,本研究中摸索更换转膜条件,使用 375 mA 恒流转膜 55 min 效果最佳,在 NC 膜中出现 240 ku 左右的特异性单一条带,条带大小与 L 蛋白一致。

综上,本研究成功扩增获得 RABV L 蛋白加帽结构的 DNA 序列,并连接到 pET-32a 载体上。连接产物转入大肠埃希菌中,成功构建 pET-32a-RABV-L 重组质粒,进一步成功纯化获得 RABV-L 重组蛋白。RABV-L 重组蛋白免疫小鼠后收取血清,经 Western blot 和 IFA 鉴定成功获得 RABV-L 蛋白多克隆抗体。

【参考文献】

- [1] Challhua R, Akashi L, Zuniga J, et al. Portable reduced graphene oxide biosensor for detection of rabies virus in bats using nasopharyngeal swab samples [J]. Biosens Bioelectron, 2023, 232:115291.
- [2] Wang Y, Xu W, Guo H. Evaluation of a universal nested reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of lyssaviruses [J]. J Vis Exp, 2019, (147):e59428.
- [3] Tian Q, Wang Y, Guo X. Rescue of a wild-type rabies virus from cloned cDNA and assessment of the proliferative capacity of recombinant viruses [J]. Virus Genes, 2017, 53(4):573-583.
- [4] Nolden T, Pfaff F, Finke S. Reverse genetics in high throughput: rapid generation of complete negative strand RNA virus cDNA clones and recombinant viruses thereof [J]. Sci Rep, 2016, 6: 23887.
- [5] Ding Y, Zhang T, Zhang J. Development of a novel multi-epitope oral DNA vaccine for rabies based on a food-borne microbial vector [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 255:128085.
- [6] Zorzan M, Castellan M, De Benedictis P. Antiviral mechanisms of two broad-spectrum monoclonal antibodies for rabies prophylaxis and therapy [J]. Front Immunol, 2023, 14:1186063.
- [7] Embregts CWE, Begeman L, GeurtsvanKessel CH. Street RABV induces the cholinergic anti-inflammatory pathway in human monocyte-derived macrophages by binding to nAChR alpha7 [J]. Front Immunol, 2021, 12:622516.
- [8] Kali S, Jallet C, Tordo N. Broad spectrum compounds targeting early stages of rabies virus (RABV) infection [J]. Antiviral Res, 2021, 188:105016.
- [9] Xu J, Gao J, Zhang M. Dynein- and kinesin- mediated intracellular transport on microtubules facilitates RABV infection [J]. Vet Microbiol, 2021, 262:109241.
- [10] Bauer A, Nolden T, Finke S. A Dynein Light chain 1 binding motif in rabies virus polymerase L protein plays a role in microtubule reorganization and viral primary transcription [J]. J Virol, 2015, 89(18):9591-9600.
- [11] Smirnov A. Research progress in RNA-binding proteins [J]. Int J Mol Sci, 2022, 24(1):58.
- [12] Ogino M, Ito N, Ogino T. The Rabies Virus L protein catalyzes mRNA capping with GDP polyribonucleotidyltransferase activity [J]. Viruses, 2016, 8(5):144.
- [13] Santos Katz IS, Dias MH, Iwai LK. Large protein as a potential target for use in rabies diagnostics [J]. Acta Virol, 2017, 61(3):280-288.
- [14] Ogino T, Green TJ. Transcriptional control and mRNA capping by the GDP polyribonucleotidyltransferase domain of the rabies virus large protein [J]. Viruses, 2019, 11(6):54.
- [15] Zhao W, Su J, Zhao N. Development of Monoclonal antibodies for detection of conserved and variable epitopes of large protein of rabies virus [J]. Viruses, 2021, 13(2):220.
- [16] Zhang J, Jin Z, Jiang Y. Prokaryotic expression, purification, and polyclonal antibody production of a truncated recombinant Rabies virus L protein [J]. Iran J Biotechnol, 2015, 13(2):18-24.
- [17] Liu G, Chen C, Zhang J. Function of host protein staufen1 in rabies virus replication [J]. Viruses, 2021, 13(8):1426.
- [18] He S, Xu R, Zhang J. Development of alkaline phosphatase-scFv and its use for one-step enzyme-linked immunosorbent assay for His-tagged protein detection [J]. Open Life Sci, 2022, 17(1): 1505-1514.
- [19] 黎强; 丁伟; 贾亨. 狂犬病毒 M 蛋白多克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 昆明理工大学学报(自然科学版), 2022, (47):90-96.
- [20] 石文刚, 徐瑞贤, 张桃苹, 等. 乙型肝炎病毒 DNA 疫苗 pHL-sec-LHBs 的构建及小鼠免疫效果检测 [J]. 中国病原生物学杂志, 2023, 18(4):373-376, 384.
- [21] Richards CM, Li M, Harris RS. Reassessing APOBEC3G inhibition by HIV-1 Vif-Derived peptides [J]. J Mol Biol, 2017, 429(1):88-96.
- [22] Li M, Shandilya SM, Carpenter MA, et al. First-in-class small molecule inhibitors of the single-strand DNA cytosine deaminase APOBEC3G [J]. ACS Chem Biol, 2012, 7(3):506-517.
- [23] Raja R, Wang C, Banerjee AC. Host AKT-mediated phosphorylation of HIV-1 accessory protein Vif potentiates infectivity via enhanced degradation of the restriction factor APOBEC3G [J]. J Biol Chem, 2022, 298(4):101805.
- [24] Libre C, Seissler T, Paillart JC. A conserved uORF regulates APOBEC3G translation and is targeted by HIV-1 Vif protein to repress the antiviral factor [J]. Biomedicines, 2021, 10(1):13.
- [25] Ali A, Kumar V, Banerjee AC. STUB1/CHIP promotes ubiquitination and degradation of HIV-1 Vif to restore the cellular level of APOBEC3G protein [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 574:27-32.
- [26] Sciort R. MDM2 Amplified Sarcomas: a literature review [J]. Diagnostics (Basel), 2021, 11(3):496.
- [27] Döbelstein M, Levine A J. Mdm2: open questions [J]. Cancer Sci, 2020, 111(7):2203-2211.
- [28] Park WJ, You SH, Kim GJ. Over-expression of recombinant proteins with N-terminal His-tag via subcellular uneven distribution in *Escherichia coli* [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2015, 47(8):661.

【收稿日期】 2024-03-08 【修回日期】 2024-05-26