

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.01.01

H3N2 犬流感病毒 M1 蛋白的原核表达及鉴定

余晓颖^{1,2}, 田 园², 张国利², 吴广谋², 刘雨玲², 李泽鸿^{1*}, 岳玉环^{2*}

(1. 吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118; 2. 军事医学研究院军事兽医学研究所, 长春 130122)

[收稿日期] 2018-09-18 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 01-0001-08 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为制备犬流感病毒(H3N2)M1蛋白纯品,针对M1基因序列设计引物,用聚合酶链式反应(PCR)扩增目的基因片段,扩增产物克隆至表达载体 pET-SUMO 中并转化至宿主菌 BL21 (DE3),诱导表达目的蛋白,探索纯化工艺,制备目的蛋白,并用 Western blot 检测纯化的 M1 目的蛋白。通过 PCR 成功扩增出大小为 771 bp 的 M1 基因,成功构建 pET-SUMO-M1 表达载体,表达的融合蛋白相对分子量为 41 kD,主要以可溶形式表达,纯化后获得蛋白纯品,Western blot 检测显示用 M1 蛋白(28 kD)免疫小鼠制备的多抗能与制备的蛋白纯品发生特异性反应,从而证明蛋白纯品为 M1 目的蛋白。试验制备出的 M1 蛋白纯品可为进一步制备通用型抗犬流感病毒抗体提供纯品抗原。

[关键词] H3N2 犬流感病毒;M1 蛋白;原核表达;蛋白纯化

Prokaryotic Expression and Identification of H3N2 Canine Influenza Virus M1 Protein

YU Xiao-ying^{1,2}, TIAN Yuan², ZHANG Guo-li², WU Guang-mou²,
LIU Yu-ling², LI Ze-hong^{1*}, YUE Yu-huan^{2*}

(1. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Institute of Military Veterinary Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130122, China)

Corresponding authors: YUE Yu-huan, E-mail: yhyue2013@163.com; LI Ze-hong, E-mail: 554233128@qq.com

Abstract: The M1 gene of canine influenza virus (H3N2) was cloned and expressed in prokaryotic cells, then the purified M1 protein was prepared. Primers targeting the canine influenza virus (H3N2) M1 gene was designed, then the H3N2 M1 gene was amplified by PCR and cloned into the expression vector pET-SUMO. The recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). The target protein was induced to be expressed, and then the purification process was explored to prepare the protein of interest, and the purified M1 protein was detected by Western blot. The M1 gene of 771 bp was successfully amplified by PCR, and the pET-SUMO-M1 expression vector was successfully constructed. The expressed fusion protein has a relative molecular weight of 41 kD, which is mainly expressed in a soluble form and purified to obtain a pure protein product.

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0501002)

作者简介: 余晓颖, 硕士研究生, 从事生物技术应用与基因工程药物研究。

通讯作者: 岳玉环, E-mail: yhyue2013@163.com; 李泽鸿, E-mail: 554233128@qq.com

Western blot analysis showed that the polyclonal antibody prepared by immunizing mice with M1 protein (28 kD) reacted specifically with the purified protein prepared, which proved that the purified protein is the targeting M1 protein. The purified M1 protein obtained from this study provides a pure antigen for the further preparation of universal anti-canine influenza virus antibody.

Key words: H3N2 canine influenza virus; M1 protein; prokaryotic expression; protein purification

犬流感病毒(Canine influenza virus, CIV)属于正黏病毒科甲型流感病毒属,是一类新近发现能感染犬的流感病毒。CIV 在犬间传播迅速,能引起患犬咳嗽、流涕和发热等呼吸系统疾病^[1]。甲型流感病毒又根据 HA 分为 17 种亚型,NA 分为 9 种亚型,能组成 153 个血清型甲型流感病毒。流感病毒基因组约为 13 kb,含有 8 个基因节段,分别编码血凝素 HA,神经氨酸酶 NA, M1 基质蛋白, M2 离子通道蛋白, NP 核蛋白, NS 非结构蛋白及 RNA 聚合酶复合体(PB1 蛋白、PB2 蛋白、PA 蛋白)^[2]。近十年来流感病毒感染犬类病例的相关报道迅速增多,这些病毒不仅威胁到了犬的健康,同样也给公共安全带来了威胁。2004 年,美国佛罗里达某赛犬场的赛犬出现体温升高、咳嗽、喷嚏为主的症状,最后因出血性肺炎死亡;2005 年,美国加利福尼亚该病卷土重来,在加利福尼亚等 11 个州迅速蔓延,导致 20 个赛犬场大量赛犬发病,同时引起佛罗里达州的许多宠物犬感染;经鉴别证实该病原为亚型 H3N8 流感病毒,具有马流感病毒特征,并发生了变异。研究人员认为,该病最初的流行是犬与马的密切接触导致了病毒的传入和感染,并把该病称之为“犬流感”^[3]。2006 年,在中国南方出现了另一类犬流感,犬对 H3N2 亚型流感病毒的感染^[4]。2007 年,韩国报道了 A 型 H3N2 亚型流感病毒引起的犬呼吸道疾病。研究发现该病毒可以在犬之间进行直接传播,同时也表明 H3N2 亚型犬流感病毒已经进入到韩国和我国的犬群中^[5]。

M1 和 M2 蛋白是基质蛋白,是一种非糖基化蛋白,是由甲、乙型流感病毒的 7RNA 节段、丙型流感病毒的 6RNA 节段编码^[6]。非糖基化蛋白存在于囊膜蛋白的内侧,也称为内膜蛋白,是病毒粒子的主要蛋白。M1 由 252 个氨基酸残基组成,分子量约 28 kD,它是病毒的主要结构蛋白,占流感病毒

蛋白总量的 40%。M1 蛋白在病毒感染细胞的后期才被合成,能与病毒核糖核蛋白体(vRNPs)相互作用,抑制病毒 mRNA 的转录,并协助 vRNPs 从细胞核转运到细胞浆^[7]。M1 蛋白与流感病毒复制有关,能与 HA 及 NA 蛋白相互作用,并参与病毒子粒的装配及释放^[8]。

M1 蛋白在流感病毒中高度保守,是病毒粒子中最丰富和最保守的蛋白质,每个病毒粒子的分子数量至少是 HA 蛋白的两倍,基于保守抗原制备的抗体可以为多种亚型流感提供广谱保护^[9],为此本研究拟制备 H3N2 型犬流感病毒 M1 蛋白纯品,为进一步制备通用型抗犬流感病毒抗体提供纯品抗原。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒基因、质粒和菌种 H3N2 犬流感病毒全基因组 cDNA 由军事医学研究院军事兽医研究所生物技术应用与基因工程药物实验室保存; pET-SUMO 质粒、大肠杆菌 One Shot[®] Mach1[™]-T1R 感受态细胞和 *E. coli* BL21 (DE3) 购于美国英杰生命技术有限公司。

1.1.2 主要试剂 引物由长春库美生物公司合成; Ex TaqDNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购于宝生物工程(大连)有限公司;质粒提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、BCA 蛋白浓度试剂盒、HRP 标记的抗 His 标签的鼠的单克隆抗体和 HRP 标记的羊抗属 IgG 均购于北京康为世纪生物科技有限公司;卡纳霉素及氨苄西林购于宝泰克生物技术有限公司;甘氨酸、丙烯酰胺、诱导剂 IPTG 及 SDS 购于 Sigma 公司;CuSO₄ 化学试剂为国产分析纯购于北京化工厂;SP-Sephrose Fast Flow 层析填料和 Chelating Sephrose Fast Flow 层析填料购于美国 GE Healthcare。

1.1.3 实验动物 昆明鼠,6 周龄,平均体重 21 g,

雄性,购于长春生物制品研究所有限责任公司。

2 方法

2.1 引物设计与合成 根据 GenBank 中 H3N2 犬流感病毒 M1 基因序列(JX414245.1)设计引物。上游引物 P1:5'-ATGAGTCTTCTAACCGAGGTC-3'; 下游引物 P2:5'-CCGGAATTCTTATCACTTAAATC-GCTGCATCTGCACT-3'(下划线部分为 *EcoR* I 酶切位点)。引物由长春库美生物公司合成。

2.2 M1 基因的扩增 以 H3N2 型犬流感病毒全基因组 cDNA 为模板,PCR 扩增 M1 基因序列。预期扩增产物长 771 bp。PCR 扩增产物经 1.3% 琼脂糖凝胶电泳、紫外凝胶成像系统下观察。切下特异性的片段,用 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段。

2.3 重组表达质粒的构建 将回收的 M1 基因片段连接至 pET-SUMO 质粒上,连接产物转化至大肠杆菌 One Shot[®] Mach1[™]-T1R 感受态细胞,摇菌鉴定,用质粒小提试剂盒提取重组质粒,然后进行 PCR 鉴定,正确的阳性质粒命名为 pET-SUMO-M1,并送长春库美生物公司测序。利用 DNAssist 软件分析测序结果。

2.4 目的蛋白诱导表达及可溶性分析 将测序正确的 pET-SUMO-M1 质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3)中,以 IPTG 为诱导剂在 37 °C 条件下进行诱导表达,另设立不加入 IPTG 作为对照,离心收集菌液,裂解液裂解,超声处理,分离上清及沉淀,用 15% SDS-PAGE 凝胶电泳分析目的蛋白的表达情况。

2.5 表达产物的初步纯化 菌体超声后用 10% 硫酸铵沉淀和 45% 硫酸铵沉淀进行粗纯。之后用 SP-Sepharose Fast Flow 阳离子交换层析柱进行初步纯化。再用 Western blot 鉴定初步纯化的蛋白产物。

2.6 目的蛋白的精纯 采用 (Cu²⁺)-Chelating Sepharose Fast Flow 层析柱对 SP-Sepharose Fast Flow 阳离子交换层析柱初步纯化的样品进一步的纯化,然后用 SUMO 蛋白酶酶切纯化产品,用 SUMO 蛋白酶酶切金属螯和层析纯化后的目的蛋白,酶切条件为 30 °C 6 h。将融合蛋白中的 SUMO 蛋白与 M1 蛋白分开,再通过 (Cu²⁺)-Chelating Sepharose Fast Flow 层析柱去掉溶液中的 SUMO 蛋白成分。最后

通过透析法以及蛋白浓缩法提高蛋白的浓度,并使目的蛋白处在 1×PBS (pH7.2) 缓冲液中保存。利用薄层扫描法分析纯化后蛋白的纯度以及使用 BCA 蛋白浓度试剂盒测得蛋白的浓度。

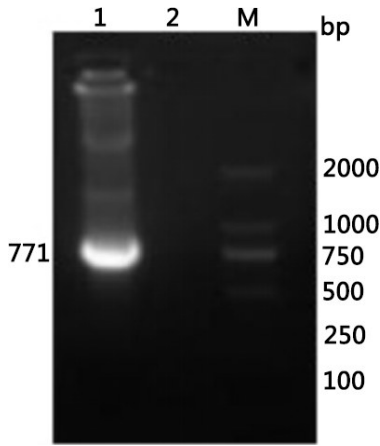
2.7 M1 蛋白多抗的制备 因本实验中纯化出的目的蛋白始终为 4 条带,为验证这 4 条带是否均为目的蛋白,特制备鼠抗 M1 蛋白多抗对其进行检验。用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离目的蛋白,将准确的相对分子质量为 28 kD 的 M1 蛋白凝胶条带取出,免疫小鼠,制备多抗。将 M1 蛋白纯品与氢氧化铝佐剂按 9 : 1 混合,经皮下注射昆明鼠,50 μg/只,首次免疫前通过尾部采血分离血清,间隔两周免疫 1 次,共免疫 3 次,并在免疫后第 14、21、28 和 42 天尾部采血分离血清。根据间接 ELISA 法测抗体效价,以高于对照组平均值的两倍以上最终稀释倍数为检测样品的效价。

2.8 目的蛋白的鉴定 取目的蛋白进行 12% SDS-PAGE 电泳分离,利用半干转移法将目的蛋白和蛋白 Marker 转移到 PVDF 膜上;然后将 PVDF 膜浸泡在含 3% Milk 的 PBS 缓冲液中,在 4 °C 条件下封闭 10 h,用 PBS 洗涤 3 次;一抗用 M1 蛋白 (28 kD) 免疫小鼠制备的抗体 (1 : 1000 稀释),37 °C 孵育 2 h,用 PBST 洗涤 3 次,二抗用 HRP 标记的羊抗鼠抗体 (1 : 3000 稀释) 孵育,37 °C 孵育 2 h,用 TBST 洗涤 3 次,最后用 DAB 进行显色并分析。

3 结果与分析

3.1 M1 基因的扩增 以 H3N2 犬流感病毒全基因组 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,扩增产物经 1.3% 琼脂糖凝胶电泳分析,条带大小为 771 bp,与预期结果相符 (图 1)。

3.2 重组表达质粒 pET-SUMO-M1 的构建及 PCR 鉴定 通过 1.3% 琼脂糖凝胶电泳分析结果显示,被插入的片段大小为 771 bp,大小与预期相符 (图 2)。重组质粒 pET-SUMO-M1 测序结果用 DNAssist 软件分析显示,其插入外源序列与 GenBank 中 H3N2 犬流感病毒 M1 基因序列一致,M1 目的基因片段以正确的方向插入到 pET-SUMO 质粒中,重组表达质粒构建成功。

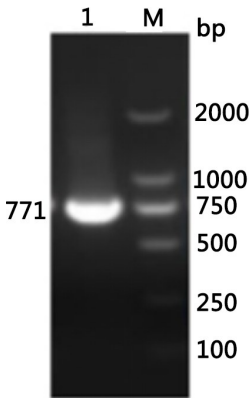


M: DL2000 DNA Marker; 1: M1 基因 PCR 产物; 2: 阴性对照

M: DL2000 DNA Marker; 1: M1 gene PCR product; 2: Negative control

图 1 犬流感病毒 M1 蛋白基因扩增结果

Fig 1 Canine influenza virus M1 protein gene amplification results



M: DL2000 DNA Marker; 1: PET-SUMO-M1 重组质粒 PCR 产物

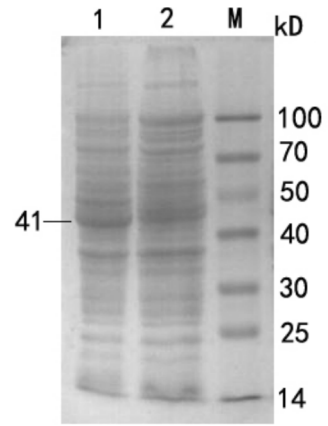
M: DL2000 DNA Marker;

1: PET-SUMO-M1 recombinant plasmid PCR product

图 2 PET-SUMO-M1 重组质粒 PCR 鉴定结果

Fig 2 PCR identification results of PET-SUMO-M1 recombinant plasmid

3.3 目的蛋白诱导表达及可溶性分析 表达的融合蛋白 SUMO-M1 经 15% SDS-PAGE 分析, 可清晰看到融合蛋白大量表达, 相对分子质量为 41 kD (图 3)。工程菌超声处理后, 上清液和沉淀经 15% SDS-PAGE 分析, 表达的融合蛋白主要在上清液中, 因此融合蛋白以可溶形式表达 (图 4), 薄层扫描显示表达量占菌体总蛋白的 25.6%。



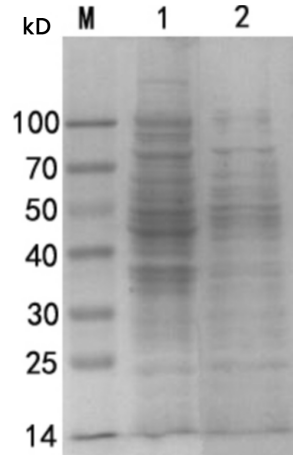
M: 蛋白质 Marker; 1: 诱导的工程菌; 2: 未诱导的工程菌

M: Protein Marker; 1: Induced engineering bacteria;

2: Uninduced engineering bacteria

图 3 工程菌诱导表达结果 SDS-PAGE 分析

Fig 3 SDS-PAGE analysis of induced expression of engineering bacteria



M: 蛋白质 Marker; 1: 超声后上清液; 2: 超声后沉淀

M: Protein Marker; 1: Supernatant after ultrasonic treatment;

2: Post-ultrasonic precipitation

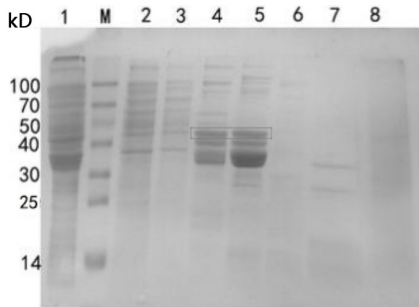
图 4 工程菌超声破碎后 SDS-PAGE 分析

Fig 4 SDS-PAGE analysis of engineering bacteria after ultrasonication

3.4 重组融合蛋白的纯化和 Western blot 分析 诱导后的工程菌超声处理, 上清通过硫酸铵沉淀法粗纯, 重组融合蛋白主要在 45% 硫酸铵沉淀中, 经 SP-Sepharose Fast Flow 阳离子交换层析柱, 线性洗脱收集蛋白峰经 15% SDS-PAGE 分析, 重组融合蛋白主要在 21%B~100%B 洗脱样品中, 蛋白的相对

分子质量为 41 kD,大小与预期相符(图 5),但纯化出的重组融合蛋白 41 kD 条带下面紧连着 3 条大小不同的条带,由于重组融合蛋白 N 端带有 6×His 标签,用 Western blot 分析鉴定显示,纯化的重组融合蛋白能够被抗 His 标签的鼠的单克隆抗体识别(图 6),表明重组融合蛋白获得正确表达,具有良好的免疫原性,且四条条带均可发生免疫反应。

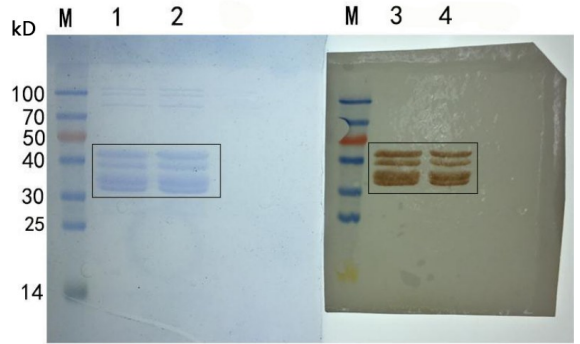
3.5 目的蛋白的纯化 取 SP 阳离子交换层析柱纯化出的重组融合蛋白,经 (Cu²⁺) - Chelating Sepharose Fast Flow 层析柱第二步精纯除杂蛋白,15% SDS-PAGE 分析显示,重组融合蛋白在洗脱液 B(40 mmol/LPB、0.3 mol/L NaCl、150 mmol/L 咪唑, pH6.6)中(图 7)。重组融合蛋白经 SUMO 蛋白酶酶切后,通过第三步 (Cu²⁺) - Chelating Sepharose Fast Flow 层析柱纯化,使目的蛋白和 SUMO 蛋白进行分离,经 12% SDS-PAGE 分析(图 8),目的蛋白都在流穿液中,成功达到分离目的,获取高纯度的目的蛋白,蛋白纯度为 94.6%,最终获取的目的蛋白浓度为 0.541 mg/mL。



1:45% 硫酸铵沉淀;M:蛋白 Marker;2:流穿;
3:流穿;4:21%B~74%B 洗脱峰;
5:75%B~100%B 洗脱峰;6: 0.5mol/L NaCl 洗脱峰;
7:2mol/L NaCl 洗脱峰;8:0.5 mol/L NaOH 洗脱峰

图 5 SP 阳离子交换层析柱纯化结果

Fig 5 SP cation exchange chromatography column purification results

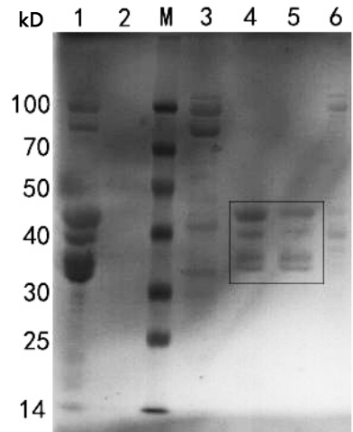


M:蛋白 Marker;1:SP 21%B~74%B 洗脱样品;
2:SP 75%B~100%B 洗脱样品;
3:SP 21%B~74%B 洗脱样品免疫印迹;
4:SP 75%B~100%B 洗脱样品免疫印迹

M:Protein Marker;1:SP 21%B~74%B elution sample;
2:SP 75%B~100%B elution sample;
3:SP 21%B~74%B elution sample western blot;
4:SP 75%B~100%B elution sample western blot

图 6 Western blot 结果

Fig 6 Western blot results



1:SP 纯化后样品;2:流穿;M:蛋白 Marker;
3:50 mmol/L 咪唑洗脱峰;4:150 mmol/L 咪唑洗脱峰;
5:150 mmol/L 咪唑洗脱峰;6:0.1 mol/L NaOH 洗脱峰

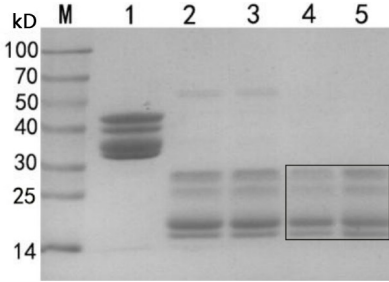
1:SP purified sample;2:Flow through liquid;M:Protein Marker;
3:50 mmol/L imidazole elution peak;4:150 mmol/L imidazole elution peak;
5:150 mmol/L imidazole elution peak;6:0.1 mol/L NaOH elution peak

图 7 (Cu²⁺) 金属螯合层析柱纯化结果

Fig 7 (Cu²⁺) metal chelate chromatography column purification results

3.6 M1 蛋白多抗的制备 经聚丙烯酰胺凝胶电泳,成功分离出 M1 蛋白(28 kD)纯品(图 9),通过 BCA 方法测得制备的蛋白浓度为 0.254 mg/mL。M1 蛋白(28 kD)纯品免疫昆明小鼠,第 0、14、21、

28 和 42 天尾部采血分离血清。根据间接 ELISA 法测抗体效价显示,小鼠抗体效价在免疫一周后持续增长,在免疫第 42 天抗体平均效价达到 5^7 左右,且达到最高(图 10)。

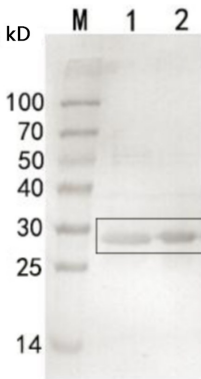


M: 蛋白 Marker; 1: 纯化的重组融合蛋白; 2-3: SUMO 蛋白酶切后产物; 4-5: 蛋白纯品

M: Protein Marker; 1: Purified recombinant fusion protein; 2-3: SUMO protease cut product; 4-5: Pure protein

图 8 纯化后的目的蛋白

Fig 8 Purified target protein



M: 蛋白 Marker; 1-2: 聚丙烯酰胺凝胶块中电洗脱 M1 蛋白纯品
M: Protein Marker; 1-2: Pure M1 protein prepared by electroelution in polyacrylamide gel block

图 9 纯化的 M1 蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig 9 SDS-PAGE analysis of purified M1 protein

3.7 纯化的目的蛋白的 Western blot 分析 M1 目的蛋白的相对分子质量为 28 kD, 最终纯化的目的蛋白除了 28 kD 的预期条带外, M1 蛋白条带下面还有 3 条条带。将目的蛋白进行转膜, 一抗用 M1 蛋白(28 kD)免疫小鼠制备的抗体, 二抗用 HRP 标记的羊抗鼠抗体, Western blot 结果显示, 4 条条带都显色(图 11), 均能被用 M1 蛋白(28 kD)免疫小鼠制备的抗体所识别, 从而证明 28 kD 蛋白条带下

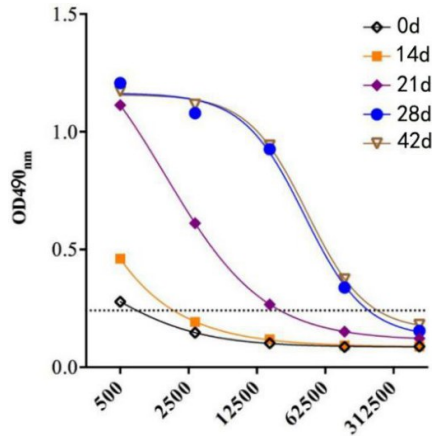
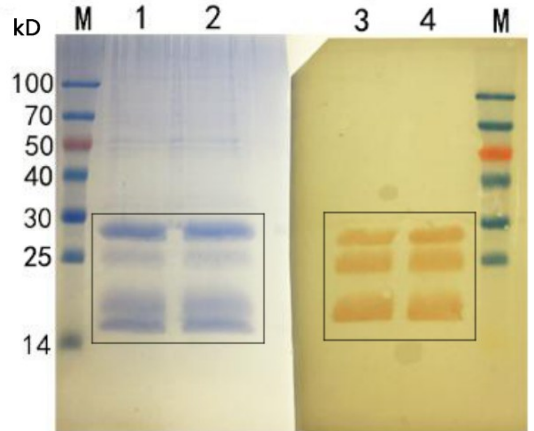


图 10 不同时期抗 M1 蛋白(28 kD)的抗体滴度

Fig 10 Antibody titers against M1 protein (28 kD) at different times



M: 蛋白 Marker; 1-2: 制备出的目的蛋白纯品; 3-4: 制备出的目的蛋白纯品免疫印迹

M: Protein Marker; 1-2: Pure protein of interest; 3-4: Pure target protein western blot

图 11 Western blot 结果

Fig 11 Western blot results

面的 3 条条带和 M1 目的蛋白性质一样, 都为 M1 目的蛋白, 也由此得出, M1 目的蛋白在表达的过程中发生蛋白降解, 从而出现 4 条条带。

4 讨论与结论

H3N2 犬流感病毒是一类新近发现能感染犬的甲型流感病毒。犬流感病毒在犬间传播迅速, 能引起患犬咳嗽、流涕和发热等呼吸系统疾病。当今社会犬作为一种伴侣动物, 在现代人类生活中具有特殊的地位。由于犬和人及野生动物的亲密接触, 给

流感病毒的种间传播提供了更多的机会。因此,犬携带流感病毒给人类健康、犬养殖业、宠物犬造成了巨大的威胁。目前,流感病毒的变异速度非常快,常规流感疫苗几乎每年都要进行调整,以适应病毒的抗原漂移和抗原转化,给疫苗的生产制备造成诸多不便。世界卫生组织(WHO)依据当年全世界范围流感病毒变化情况来预测并推荐下一年流感疫苗生产所用组分,预测准确度将会直接影响疫苗的保护效率,若预测失败将会造成流感爆发流行的潜在威胁^[9]。美国农业部已批准一种 H3N8 的犬流感疫苗上市使用,用于犬流感的免疫预防,可有效降低犬群的整体发病率、病程和引起的肺部损伤,但尚不能提供 100% 的保护,韩国也已经研制出 H3N2 的犬流感疫苗,但还未被批准上市,两种疫苗均为灭活疫苗。现在使用的治疗犬流感病毒的抗病毒药物有达菲、金刚乙胺和金刚烷胺,并且缺少患犬流感病犬的临床治疗报道,所以患病犬的用药剂量需参考人的用药剂量进行治疗,因此,通用型犬流感抗体药物的研究迫在眉睫^[10]。M1 蛋白在流感病毒中高度保守,是病毒粒子中最丰富和最保守的蛋白质,每个病毒粒子的分子数量至少是 HA 蛋白的两倍,基于保守抗原制备的抗体可以为多种流感亚型提供广谱保护。

在现有的表达蛋白系统中,原核表达是通过构建原核重组表达质粒,转化至大肠杆菌中,经 IPTG 诱导表达的蛋白表达系统,是最成熟、最稳定的,具有容易进行实验操作、时间短、成本低和获取的目的蛋白表达量高等优点。而真核表达系统,是通过构建真核重组表达质粒,转染至细胞中,通过细胞的胞内表达或者分泌表达目的蛋白,真核表达系统的加工、修饰体系更完善,目的蛋白能够形成正确的空间结构,但表达量低,时间周期长以及成本高。真核表达系统是表达生物活性蛋白及疫苗的理想选择,而原核表达系统可以提供足够的人工抗原用于诊断或不需要翻译后修饰的蛋白的结构分析^[11]。鉴于实验目的是制备用于筛选抗体的具有免疫原性纯品抗原,因此本实验选择了原核表达系统来表达 CIV M1 蛋白,并取得了满意的结果。

此研究中,成功构建了 M1 基因的原核重组表达质粒 pET-SUMO-M1, pET-SUMO 表达质粒能够促进 M1 目的蛋白的可溶性表达,且质粒带有 6×His 标签,使表达的 M1 目的蛋白易于用金属螯合层析柱纯化。重组融合蛋白预期大小为 41 kD,但我们纯化出的重组融合蛋白 41 kD 条带下面始终紧连着 3 条大小不同的条带,初步鉴定用 HRP 标记的抗 His 标签的鼠的单克隆抗体经 Western blot 分析显示,四条蛋白都显色,说明重组融合蛋白表达成功且四条带可能都是重组融合蛋白。纯化的重组融合蛋白经 SUMO 蛋白酶酶切后,成功将目的蛋白 M1 和融合蛋白分离,纯化出的 M1 目的蛋白 28 kD 条带下面同样紧连着 3 条大小不同的条带,为了进一步确定这 3 条带是否均为目的蛋白,我们采用自制抗 M1 多抗来进行鉴定分析,用预期大小为 28 kD 的 M1 目的蛋白免疫小鼠制备的抗体为一抗,去孵育 M1 目的蛋白 28 kD 条带及下面紧连着 3 条大小不同的条带,经 Western blot 分析,四条带都显色,再次鉴定证明,3 条大小不同的条带都能和预期大小为 28 kD 的 M1 目的蛋白免疫小鼠制备的抗体发生免疫反应,也证明 28 kD 蛋白条带及下面的 3 条大小不同条带的蛋白性质一样,都为 M1 目的蛋白,也由此得出, M1 目的蛋白在表达的过程中发生蛋白降解,从而出现 4 条目的条带。抗原 M1 目的蛋白的成功制备,为下一步制备通用型抗犬流感病毒抗体奠定了基础。

参考文献:

- [1] Zhu H, Hughes J, Murcia P R. Origins and evolutionary dynamics of H3N2 canine influenza virus[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(10):5406-5407.
- [2] Smith B L, Chen G, Wilke C O, *et al.* Avian influenza virus PB1 gene in H3N2 viruses evolved in humans to reduce interferon inhibition by skewing codon usage toward interferon-altered tRNA pools[J]. *Mbio*, 2018, 9(4):1-2.
- [3] Li G, Wang R, Zhang C, *et al.* Genetic and evolutionary analysis of emerging H3N2 canine influenza virus[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2018, 7(1):73.
- [4] Yan L, Zhao Y, Zeng X, *et al.* Genetic and pathobiologic charac-

- terization of H3N2 canine influenza viruses isolated in the Jiangsu province of China in 2009 - 2010[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 158(3/4):247-249.
- [5] Jirjis F F, Deshpande M S, Tubbs A L, *et al.* Transmission of canine influenza virus (H3N8) among susceptible dogs [J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 144(3):303-306.
- [6] 侯天龙, 包旦奇, 李泽君, 等. 流感病毒 M1 蛋白与 M2 蛋白相互作用以及其在病毒出芽中的作用[J]. *中国动物传染病学报*, 2016(6):1-5.
- Hou T L, Bao D Q, Li Z J *et al.* Interaction between M1 and M2 proteins of influenza virus and its role in virus budding [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2016(6):1-5.
- [7] Bui M, Wills E G, Helenius A, *et al.* Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins [J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(4):1781-1786.
- [8] 谭伟, 谢芝勋. 甲型流感病毒 M1、M2 和 M42 蛋白研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2015(2):80-83.
- Tan W, Xie Z X. Presson proteins M1, M2 and M42 encoded by M gene of influenza a virus M gene [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2015(2):80-83.
- [9] 王文娟. 基于 NP 和 M1 蛋白的通用型甲型流感疫苗的研究 [D]. *安徽医科大学*, 2013:11-12.
- Wang W J. The development of a universal influenza a vaccine based on NP and M1 protein of influenza a virus [D]. *Anhui Medical University*, 2013:11-12.
- [10] 于志君, 张醒海, 张坤, 等. 犬流感研究新进展 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2015(8):768.
- Yu Z J, Zhang X H, Zhang K, *et al.* Advances in the study of canine influenza [J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2015(8):768.
- [11] 范翠英, 冯利兴, 樊金玲, 等. 重组蛋白表达系统的研究进展 [J]. *生物技术*, 2012, 22(2):76-80.
- Fan C Y, Feng L X, Fang J L, *et al.* Progress in research on recombinant protein expression system [J]. *Biotechnology*, 2012, 22(2):76-80.

(编辑:李文平)