

河南农业大学

专业硕士学位论文

题 目 猪 OASL 蛋白的表达和单克隆抗体的制备及
抗 PRRSV 效果的初探

学位申请人姓名 秦晓东

导 师 姓 名 吴亚楠 副教授

专业学位类别 兽医硕士

领 域 兽医

研 究 方 向 动物疫病防控与检疫

中国 郑州

2023 年 05 月

分类号

密级

河南农业大学专业硕士学位论文

论文题目：猪 OASL 蛋白的表达和单克隆抗体的制备及抗
PRRSV 效果的初探

英文题目：Expression of porcine OASL protein and preparation
of monoclonal antibody and preliminary study on anti-
PRRSV effect

学位申请人：秦晓东

导 师：吴亚楠 副教授

学 位 类 别：兽医硕士

领 域：兽医

研 究 方 向：动物疫病防控与检疫

论文提交

学位授予

日 期：

日 期：

目 录

文献综述.....	2
1 干扰素与干扰素刺激基因.....	2
1.1 干扰素简介.....	2
1.2 干扰素刺激基因简介.....	2
1.3 干扰素刺激基因抗病毒研究进展.....	3
2 OAS 家族蛋白研究进展.....	5
2.1 OAS 家族蛋白简介.....	5
2.2 OAS 家族抗病毒机制研究进展.....	5
2.3 OASL 介导的 RIG-I 信号增强的两个方面.....	7
3 PRRSV 研究进展.....	8
试验一 猪 OASL 基因序列分析与蛋白的表达纯化.....	10
1 引言.....	10
2 材料与方法.....	10
2.1 材料.....	10
2.2 方法.....	13
3 结果.....	18
3.1 序列分析.....	18
3.2 猪 OASL 基因合成及表达载体的构建.....	22
3.3 猪 OASL 蛋白原核表达条件的优化.....	22
3.4 猪 OASL 蛋白的大量表达.....	25
3.5 猪 OASL 蛋白的复性及纯化.....	25
4 讨论与结论.....	26
试验二 猪 OASL 单克隆抗体的制备.....	28
1 引言.....	28
2 材料与方法.....	28
2.1 材料.....	28
2.2 方法.....	29
3 结果.....	33
3.1 血清效价和反应性的测定.....	33
3.2 细胞融合及单抗腹水效价的测定.....	33
3.3 单克隆抗体的亚型测定结果分析.....	34
4 讨论与结论.....	35
试验三 猪 OASL 抗病毒效果的初探.....	36
1 引言.....	36

2 材料与方法.....	36
2.1 材料.....	36
2.2 方法.....	37
3 结果.....	41
3.1 猪 OASL 基因真核表达载体的构建	41
3.2 转染结果.....	41
3.3 RT-PCR 结果与病毒滴度	42
4 讨论与结论.....	43
全文总结.....	44
参考文献.....	45

摘要

干扰素（Interferon, IFN）在机体抗病毒过程中起着关键作用，OAS 是干扰素在机体被病毒感染时诱导产生的抗病毒蛋白，猪 OAS 蛋白家族有 OAS1、OAS2、OASL 三个成员，OASL 作为潜在的干扰素刺激基因（Interferon-stimulated gene, ISG），为了方便后续对天然免疫的研究，本试验构建了猪 OASL 原核表达和真核表达载体，表达纯化了猪 OASL 蛋白，制备了单克隆抗体，并验证了猪 OASL 在 Marc-145 细胞上对 PRRSV 的抑制作用，具体如下：

1. 猪 OASL 蛋白原核表达及纯化

试验通过把人工合成的猪 OASL 基因序列插入 pET-21a 表达载体，构建 pET-21a-OASL 重组质粒，经优化最佳诱导条件，确定最佳诱导条件为 37℃，220 r/min，8 h，异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）的终浓度为 0.5 mmol/L，SDS-PAGE 鉴定后为包涵体表达，经溶解、复性后使用亲和层析法（Ni 柱）纯化猪 OASL 蛋白。

2. 猪 OASL 单克隆抗体的制备

选取 6 周龄的雌性 BABL/c 小鼠，将纯化后的猪 OASL 蛋白采用腹腔注射的方式，每只小鼠的免疫蛋白为 50 μg，免疫 3 次，每次间隔 14 天。三次免疫后采集血液，ELISA 检测其抗体效价达到 1 : 125000。加强免疫三天后，取脾脏进行细胞融合，筛选得到阳性克隆细胞，经过 2 次亚克隆后，筛选到一株杂交瘤细胞，命名为 7D7E3。制备腹水的效价达到 1 : 500 000，经 Western blot 鉴定，单抗可与猪 OASL 蛋白发生特异性反应，而不与 P30 蛋白反应。间接免疫荧光试验结果显示单克隆抗体与真核表达蛋白有良好的反应性。结果表明，试验成功筛选出了 7D7E3 单克隆细胞株，能够稳定分泌抗猪 OASL 抗体，且特异性较高。

3. 猪 OASL 蛋白抗病毒效果的初探

为了验证猪 OASL 蛋白对猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）在 Marc-145 细胞上的复制有无抑制作用。将猪 OASL 基因克隆至真核表达载体 pCMV-3×Flag 上，构建 pCMV-3×Flag-OASL 重组表达质粒，经 Western blot 检测到了猪 OASL 基因在 Marc-145 细胞中过表达，同时过表达猪 OASL 的细胞接毒 48 h 后通过检测 PRRSV 拷贝数的变化以及 PRRSV 病毒的滴度两个方面证实过表达猪 OASL 对 PRRSV 在 Marc-145 细胞上的复制有抑制作用。

关键词：猪 OASL；蛋白表达；单克隆抗体；ELISA；转染

文献综述

1 干扰素与干扰素刺激基因

1.1 干扰素简介

在 20 世纪 50 年代早期,人们已经证实,在某些条件下,受病毒感染的细胞能够抵抗第 2 次病毒感染^[1]。因此,可以得出通过某种机制,病毒之间可以相互干扰。同样,已证明灭活流感病毒能够干扰活流感病毒^[2],但在当时这些还是一个谜。直到 1957 年,Isaacs 和 Lindenmann 创造了“干扰素”一词^[3],用来描述一种可能由细胞产生的物质,可以干扰流感病毒感染。干扰素后来被证明是一种小分子蛋白质,由细胞产生和分泌、由病毒刺激或者干扰素诱导剂刺激机体而产生的一种小分子糖蛋白,具有抗病毒、抗肿瘤、和免疫调节等多种作用^[4]。

淋巴细胞、巨噬细胞、体细胞均可产生干扰素^[5],有广谱抗病毒和抗细胞分裂和免疫调节活性的作用,但其作用机制并非直接杀死病毒,而是和细胞表面的干扰素受体结合,激活核酸内切酶,使病毒蛋白 mRNA 水解,阻断病毒 mRNA 转录,从而抑制病毒蛋白的合成^[6]发挥抗病毒作用。抗病毒蛋白主要有 2'-5'腺嘌呤核苷合成酶、蛋白激酶等^[7]。2'-5'腺嘌呤核苷合成酶可导致病毒的 mRNA 降解^[8],蛋白激酶可使病毒蛋白的翻译起始因子失活^[9],抑制了病毒的蛋白合成(当然,还有其它的抗病毒蛋白会介导不同机制的抗病毒作用^[10])。

干扰素合成后很快释放并扩散,既能阻断已经受感染细胞的感染,又能限制病毒继续在体内扩散,对大多数病毒均有一定抑制作用^[11-13]。干扰素被分为 3 个亚家族,Ⅰ型,Ⅱ型和Ⅲ型^[14],基于它们相互作用的同源受体和它们引发的后续免疫反应。它们在基因组结构和产生的细胞来源上也有所不同^[15]。在四足动物中,Ⅰ型和Ⅲ型 IFN 家族都包含多个成员^[16],而Ⅱ型 IFN 由单个基因编码^[17]。Ⅰ型干扰素,抗病毒作用强于免疫调节作用^[18];Ⅱ型干扰素,免疫调节作用强于抗病毒作用^[19]。

1.2 干扰素刺激基因简介

干扰素是通过激活下游数百个干扰素刺激基因(Interferon stimulated gene, ISG)继而发挥抗病毒、抗肿瘤和免疫调节的作用^[20-21]。干扰素分泌出细胞后会重新跟细胞表面的干扰素受体结合^[22],激活 JAK/STAT 下游信号通路^[23],然后通过 IRF9(Interferon-regulatory factor 9)引起目的基因的表达^[24],这些目的基因就是干扰素诱导基因(Interferon-inducible gene),又称为干扰素刺激基因(Interferon stimulates genes)^[25]。

干扰素(IFN)通过 JAK/STAT 通路将胞外信号传递至胞内后诱导 ISGs 转录^[26]。在没有 IFN 刺激的情况下,酪氨酸激酶(Janus kinases, JAKs)以无活性的状态围绕在 IFN 受

体周围^[27]，一旦 IFN 与其受体结合后，JAKs 被激活^[28]。被激活的 JAKs 促使转录因子 STAT（Signal transducer and activator of transcription）的酪氨酸发生磷酸化反应^[29]，被活化的 STAT 从 IFN 受体周围分离并进入细胞核调控 ISGs 的表达^[30]。例如 I 型和 III 型 IFN 的信号能够使 STAT1 与 STAT2 发生磷酸化形成异源二聚体^[31]，再与 IRF9 特异性结合后形成聚合物 ISGF3（Interferon-stimulated gene factor 3）^[32]。ISGF3 可以入核并且可以结合到 ISGs 的上游核苷酸序列干扰素刺激应答元件（Interferon-stimulated response elements, ISRE）上，继而诱导 ISGs 大量转录^[33]。而 IFN- γ 则是与细胞表面的受体特异性结合后，激活 JAKs 通路，引起 STAT1 发生磷酸化反应并且形成同源二聚体，进入细胞核后激活 GAS（Gamma-activated sequence）元件，继而诱导 ISGs 的表达^[34-36]。而 STAT2 还可以与 IRF9 形成复合物，直接入核并调控 ISGs 的转录^[37]。

1.3 干扰素刺激基因抗病毒研究进展

（1）主要针对病毒复制与转录阶段的 ISGs

2'-5'寡聚腺苷酸合成酶（2'-5'oligoadenylate synthetase, OAS）是干扰素作用于细胞后产生的一种重要的抗病毒蛋白^[38]。几十年来，国内外专家学者对 OAS 家族蛋白及其抗病毒机制开展了大量研究并取得了一定的成果，OAS 蛋白被 dsRNA 激活后，催化生成 2'-5'寡腺苷酸（2-5A），2-5A 可以激活核酸内切酶 RNase L^[39]，水解病毒 mRNA^[40]，阻断病毒 mRNA 转录^[41]，从而发挥抗病毒作用^[42]。

（2）针对病毒复制多个阶段的 ISGs

含有 3 部分基序（TRIM）的蛋白质家族成员的特征是 N 末端的修剪区域，包括 1 个环指结构域、1 个或 2 个锌结合基序（也称为 B 盒（B1 盒和 B2 盒））和盘绕线圈区域^[43]。TRIM 蛋白可以根据结构域的结构分为 I 到 XI 亚家族^[44]。人类有 70 多个 TRIM 家族成员^[45]。已有报道，许多癌基因和肿瘤抑制因子是由泛素-蛋白酶体系统通过改变泛素 E3 连接酶的稳定性来调节的^[46]。大多数 TRIM 家族成员，如 TRIM47，TRIM50，TRIM71，TRIM24 和 TRIM59，具有环指结构域，可被视为 E3 泛素连接酶^[47]，而一些没有环指结构域的 TRIM 家族成员，如 TRIM14，TRIM16，TRIM20 等不具有 E3 泛素连接酶活性^[48]。因此，一定数量的 TRIM 家族基因被认为与肿瘤的发生和发展有关^[49]。

ISG15 蛋白分子作为同泛素分子可以被共价结合到靶蛋白上，这种现象就是 ISG 化（ISGylation）现象^[50]。ISG15、UBE1L、UBCH8 和 HERC5 四类蛋白分子构成 ISG 化系统，共同完成 ISG 化过程。ISG15 及 ISG 化系统在机体抗病毒过程中具有十分重要的作用^[51-52]。目前对于 ISG15 蛋白的抗病毒作用和机制的研究已经有了很大的进展，研究报道在小鼠体内 ISG15 蛋白是 IFN- α/β 依赖性抗病毒免疫反应的效应因子^[53]。

IFITM 蛋白位于我们的细胞表面上，识别许多不同类型的病毒，阻断病毒和宿主膜之间的膜融合，在病毒穿过细胞的脂质双分子层之前就阻止其感染^[54-56]。目前，至少有 3 种

人类 IFITM 蛋白——IFITM1、IFITM2 和 IFITM3 具有抗病毒活性^[57]。这些活性限制了许多病毒在细胞中的感染，包括登革热病毒、埃博拉病毒、冠状病毒和西尼罗河病毒^[58]。

2 OAS 家族蛋白研究进展

2'-5'寡聚腺苷酸合成酶（Oligoadenyate synthetases, OAS）是机体内关键的抗病毒蛋白之一，参与调控机体的特异性免疫和非特异性免疫，在机体的抗病毒、信号传导等过程中起至关重要的作用^[59]。它是干扰素诱导产生的抗病毒蛋白之一，OAS 家族蛋白主要由 I 型和 III 型干扰素诱导产生。其中，目前已经发现的人源 OAS 基因家族成员有四个，分别是 hOAS1、hOAS2、hOAS3 和 hOASL^[60]；大部分鸟类（如鸡和鸭等）OAS 基因家族成员比较单一，只有 OASL 1 个基因；在平胸目鸟类中（如鸵鸟和白喉）除具有 OASL 基因外，还保留了下来 OAS1 基因^[61]。猪基因组中有 4 种 2'-5'寡聚腺苷酸合成酶（OAS）基因，包括 2 个 OAS 1 基因（OAS1a 和 OAS1b）、1 个 OAS2 基因和 1 个 OASL 基因，其中猪 OASL 是一种先天缺乏 C 端泛素样结构域的蛋白^[62]。

2.1 OAS 家族蛋白简介

人类 OAS1、OAS2 和 OAS3（hOAS）分别包含 1、2 和 3 个 OAS 结构域。它们分别只有 1 种具有活性的核苷酸基转移酶（NTase）活性，均能编码有活性的 2'-5'寡腺苷酸（2-5A）合成酶。hOASL 基因全长为 1545 bp，编码 514 个氨基酸，N 端是 1 个具有 350 个氨基酸的 OAS 结构域，C 端是由 1 个具有 164 个氨基酸的泛素样结构域组成^[63]。

小鼠 OASL（mOASL）共有两种基因，分别为 mOASL1 和 mOASL2。mOASL1 基因全长为 1536 bp，共编码 511 个氨基酸，具有两个泛素样结构域（UBL）。mOASL2 基因全长为 1422 bp，编码 508 个氨基酸，含有 1 个泛素样结构域（UBL）。小鼠 OASL 蛋白具有 OAS 结构域，但在 hOASL 和 mOASL1 中丢失了 NTase 活性，而 mOASL2 具有 NTase 活性^[64]。

猪 OASL 基因全长为 1047 bp，编码 349 个氨基酸，N 端含有 OAS 结构域，而在 C 端先天缺乏两个重复的泛素样结构域（UBL）^[65]，这明显区别于人、兔和鼠源 OASL 的氨基酸结构。另 1 个家族成员，细胞质 DNA 传感器环 GMP-AMP 合成酶（cGAS）具有结构相似的 NTase 结构域，但没有序列相似性。

2.2 OAS 家族抗病毒机制研究进展

2'-5'寡聚腺苷酸合成酶（Oligoadenyate synthetases, OAS）属于 ISGs 家族，其特征是能够合成 2'-5'寡聚腺苷酸，通过激活潜在的 RNase L 来诱导病毒 RNA 降解^[66-67]。然而，最近发现的具有相似结构，但没有序列相似的 cGAS 蛋白是 OAS 家族的另 1 个成员，显示了该家族蛋白质的潜在多样功能^[68]。人寡聚腺苷酸合成酶（Oligoadenylate synthetase-like, OASL）与 OAS 蛋白的 N 端 OAS 样结构域相似，但其活性位点发生特征性变化，因此缺乏 2'-5'低聚腺苷酸合成酶活性^[69-70]。

hOASL 在 C 端含有两个串联泛素样结构域（UBL），这在人 OAS 家族的任何其他成员

中都不存在。hOASL 通过干扰素调节因子 IRF-3 和 IFN 信号传导被病毒感染直接快速诱导, 并已被证明具有抗病毒活性, 这需要 UBL 结构域^[71-73]。许多流行病学研究也将人类 OASL 基因中的各种单核苷酸多样性(Single nucleotide polymorphism, SNP)与丙型肝炎和西尼罗河病毒感染易感性的改变联系起来^[74]。

据报道, 在海绵中存在具有酶活性的 OAS 蛋白^[75]。然而, 由于 IFN 系统仅限于顎状脊椎动物, 这一发现的意义及其在先天免疫中的贡献在很大程度上仍未得到重视。cGAS 的发现及其与 OAS 蛋白明显的结构相似性引起了人们对该蛋白家族的新的关注^[76]。现在很清楚, 这些蛋白质, 包括细菌二核苷酸环化酶 (DncV), 属于 1 个古老的核苷酸基转移酶超家族^[77], 并广泛存在于各种形式的生命。但并不是这个家族中的所有同源物都被预测具有酶活性^[78], 这表明这些蛋白质在进化过程中产生了不同的功能。然而, 正如缺乏酶活性的人 OASL 所证明的那样^[79], 酶活性的缺乏不是 OAS 蛋白参与先天免疫的决定性特征^[80]。正如下面所述的, OASL 似乎是从 OAS1 进化而来, 局限于脊椎动物, 在其他各种具有酶活性的脊椎动物物种中也有同源物^[81-83]。

与人类不同的是, 在小鼠中发现了两个 OASL 同源物: OASL1 和 OASL2, 分别与人类 OASL 具有 70%和 48%的氨基酸序列相同^[84-85]。尽管小鼠 OASL1 酶不活跃, 但小鼠 OASL2 在其活性位点上含有两个关键的 Asp 残基, 并表现出 OAS 酶活性。在鸡中也报道了类似的酶活性 OASL 正交物^[86-87]。小鼠 OASL1 最近被证明通过与 IRF7 的 5' -UTR 结合并抑制其翻译来抑制 IFN 的诱导。据报道, 靶向删除 OASL1 可增强 IFN 诱导, 减少体内病毒复制。此外, OASL1 慢性 LCMV 感染后, 小鼠表现出更好的病毒血症控制和更好的病毒特异性 CD8⁺ T 细胞分化^[88-91]。与 OASL1 相比, 人类 OASL 和小鼠 OASL2 不与 IRF7 5' -UTR 结合, 并且缺乏 IRF7 抑制活性。在小鼠中靶向删除 mOASL2 显示病毒复制增强^[92], 这表明 mOASL2 在功能上与人 OASL 相似。

猪基因组中有 4 种 2'-5'寡聚腺苷酸合成酶 (OAS) 基因, 包括 2 个 OAS 1 基因 (OAS1a 和 OAS1b)、1 个 OAS2 基因和 1 个猪 OASL 基因^[93], 其中猪 OASL 是 1 种先天缺乏 C 端泛素样结构域 (UBL) 的蛋白^[94]。

有研究表明在猪感染病毒后中, OAS 发挥了重要的作用, 其抗病毒途径有两种, 1 种是当机体受到病毒的入侵后, 释放干扰素使得 OAS 蛋白水平迅速升高, OAS 受到双链 RNA 刺激后活化生成 2'-5'寡聚腺苷酸, 从而会激活具备降解病毒和细胞内的 RNA 的核糖核酸酶 (RNase L), 进而发挥抗病毒作用^[95], 这是 OAS 发挥作用的 1 个途径, 即 RNaseL 依赖型抗病毒途径, 另 1 种是不依赖于 RNaseL 的抗病毒途径, 有学者发现猪 OASL 蛋白并不依赖其活化 RNase L 通路来拮抗猪瘟病毒, 而是通过 MDA5 介导的 IFN- β 信号通路, 进而发挥抗猪瘟病毒 (Hogcholera virus, Swine fever virus, CSFV) 作用^[96]。猪 OASL 可作为抗猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrheavirus, PEDV) 的 ISG 分子, 并且是通过维甲酸诱导基因 1 (Recombinant Retinoic Acid Inducible Gene 1, RIG-1) 介导的 I 型干

扰素途径发挥抗病毒作用，而非经典的 OAS/RNase L 途径^[97]，有助于进一步阐明宿主先天免疫对抗 PEDV 感染机制。

2.3 OASL 介导的 RIG-I 信号增强的两个方面

天然免疫是机体对抗病原微生物感染的第一道防线，在机体清除病原的免疫反应中起着十分关键的作用。病原入侵机体后，机体的天然免疫细胞通过其模式识别受体（PRRs，pattern recognition receptors）识别病原体保守的组分——病原相关分子模式（PAMPs，pathogen-associated molecular patterns），启动一系列免疫级联反应，产生 I 型干扰素（IFN），促炎因子和其它的下游效应蛋白以帮助机体清除病原体感染^[98]。

病毒核酸是病毒感染宿主细胞后被识别的主要病原相关分子模式（pathogen-associated molecular patterns，PAMP）。胞外的病毒 RNA 被表达于细胞膜和胞内体膜的 TLR3（Toll-like receptor 3）识别，胞内的病毒 RNA 则被 RIG-I 探测，RIG-I 在大多数细胞类型中低表达，而在病毒感染后被大量表达，从许多生物化学和结构研究中，RIG-I 激活的模型已经提出，其中 RIG-I 在没有 RNA 的情况下采用稳定的自抑制构象^[99]。在通过 C 端结构域（CTD）与病毒 RNA 结合后，解旋酶结构域改变构象，从而使 RIG-I 能够水解 ATP 并进一步与 RNA 相互作用。N 端（Caspase 激活和招募域）然后与 K63-linked polyubiquitin（pUb）结合，将 RIG-I 转换为活跃的有能力状态，随后由 CARD 介导的 MAVS 聚合和信号传递。在较长的 RNA 的情况下，RIG-I 的寡聚发生没有 pUb^[100]。尽管对于较大的 dsRNA，RIG-I 激活对 pUb 的严格要求一直是一个争论的话题，在大多数情况下，RIG-I 激活由两步机制强烈调控，需要同时结合两个配体 RNA 和 pUb。这种机制允许 RIG-I 传感器避免抗病毒先天免疫和 IFN 诱导的异常激活^[101]。

泛素连接酶 TRIM25 可合成 K63-linked 的多泛素短链，或 RIG-I 的 K63-linked 多泛素化。在 OASL 存在的情况下，RIG-I 可以在 TRIM25 缺失的情况下被病毒 RNA 激活^[102]。这项研究和其他 OASL-RIG-I 相互作用的研究能够提出以下 OASL 增强 RIG-I 活性的模型。在最初的病毒感染和通过 IFN 信号在被感染细胞和周围细胞中诱导 OASL 后，OASL 与 RIG-I 结合并模拟 pUb^[103]。这使得 RIG-I 的激活更加敏感，只需要一种配体—病毒 RNA，并导致增强的 IFN 诱导^[104]。现在就断定这是 OASL 发挥作用的唯一机制还为时过早，有必要进行进一步调查，以确定其活动的其他可能机制。例如，OASL 的表达抑制了 HEK293 细胞中 HSV-1 的复制。由于已知 HEK293 细胞在 cGAs-STING 介导的 DNA 传感器信号传导中存在缺陷，这种抗病毒活性归因于 RIG-I 通过 RNA pol III 激活^[105]。然而，目前尚不清楚 OASL 如何影响通过 cGAS 途径感知的细胞中的 HSV-1 复制。

OASL 有可能克服先天免疫逃避。根据对流感病毒的研究结果，尽管 NS1 靶向 TRIM25，RIG-I 可以在 OASL 存在时被激活^[106]。其次，与 RIG-I 的表达导致 IFN 诱导而导致毒性不同，OASL 的表达本身不会激活 IFN 诱导^[107]。这使得基于 RIG-I 的 RNA 检测

系统对病毒 RNA 更加敏感,在病毒感染相对低于阈值水平的情况下,它可以被激活^[108]。因此,传递 OASL 蛋白或异位表达 OASL 不太可能产生重大毒副作用^[109],并可能成为对抗病毒感染的一种新模式。同时天然免疫是机体抵御病毒感染的第一道防线,其中干扰素(IFN)和干扰素刺激基因(ISGs)在机体抗病毒防御过程中发挥着重要作用。据报道寡聚腺苷酸合成酶(OAS)蛋白在机体的抗病毒防御过程中发挥着至关重要的作用。OAS 蛋白通过介导细胞内信号转导从而发挥抗病毒作用,其对多种 RNA 病毒和部分 DNA 病毒有抑制作用^[110]。

3 PRRSV 研究进展

猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)俗称“蓝耳病”是一种引起仔猪呼吸道感染、死亡、母猪出现繁殖障碍等临床表现并严重影响经济效益的疾病。该病是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)引起的,PRRSV 是一种有囊膜的正链 RNA 病毒,属于动脉炎病毒科,PRRS 病毒粒子是一个直径 50-60 纳米的大致球形或椭圆形颗粒,外观相对光滑。病毒基因组 RNA 由核衣壳蛋白包裹。围绕核衣壳,表面糖蛋白(GPs)和膜蛋白被插入脂质双分子层包膜,形成病毒粒子。PRRSV 基因组 RNA 是正链的,长度约为 15 kb,包含 9 个已知的开放阅读框(ORF),每个 ORF 区与其相邻的 ORF 区部分重叠^[111]。

猪是 PRRSV 唯一已知的天然宿主,此外,该病毒对单核细胞系的倾向非常有限。完全分化的猪肺泡巨噬细胞(PAM)是 PRRSV 感染的主要细胞靶点^[112]。此外,据报道树突状细胞能够支持 PRRSV 的复制^[113]。在测试的众多细胞系中,只有猴胚肾细胞系 MA-104 及其衍生物,如 Marc-145,在体外完全允许 PRRSV 复制^[114]。PRRSV 通过网格蛋白介导的内吞作用侵入宿主细胞。PRRSV 介导的病毒进入的受体已被广泛研究,目前 CD163 已被确定为介导病毒内化和分解的主要受体。

PRRSV 感染按病程可分为 3 个不同阶段:急性感染、持续和消失,各阶段在免疫学、病毒学和临床疾病方面都是特有的。第一阶段为急性感染,其间肺为优先感染部位。PRRSV 主要复制于肺和上呼吸道的巨噬细胞和树突状细胞,感染后 6-12 小时引起病毒血症。尽管存在循环抗体,但血清中的病毒仍可持续数周。在持续感染的第二阶段,病毒复制能力减弱,血液和肺部已经检测不到病毒,猪不再显示出明显的临床疾病症状。在此时期,病毒复制主要限于包括扁桃体和淋巴结的淋巴器官,但不包含脾脏^[115]。通过在区域淋巴结内持续复制病毒,病毒通过口鼻分泌物和精液有效地传播到未被感染的猪。随后病毒复制能力逐渐衰减,直至病毒在机体内灭绝。病毒的最后阶段是在宿主体内消失,感染后的复制可以维持 250 天^[116]。PRRSV 的复制并没有建立稳定的平衡状态,而是随着时间的推移逐渐降低,淋巴器官是病毒灭绝前病毒复制的最终场所^[117]。

当 PRRSV 作为呼吸道感染因子或猪呼吸道疾病综合征(PRDC)的辅助因子时,可能会引起更复杂的疾病。在 PRDC 的临床实例中,PRRSV 是经常能被分离出的病毒^[118]。试

验上观察到肺炎支原体和 PRRSV 合并感染的猪肺部肺炎更严重，持续时间更久。PRRSV 在猪圆环病毒相关疾病（PCVAD）中也起主要作用，猪同时感染 PRRSV 和 PCV-2 会引起比单独感染单独一种病原体更严重的临床症状和肺部病变^[119]。PRRSV 与其他猪病原体相互作用，包括猪呼吸道冠状病毒、猪流感病毒和副猪嗜血杆菌，通过改变宿主对单一病原体感染的典型反应^[120]。这些结果解释了混合病原体引起的猪呼吸道疾病的复杂性。由于 PRRSV 可以抑制宿主的免疫系统，这使得继发性/机会性病原体的感染建立成为可能，并导致更严重的慢性疾病。

先天免疫系统是宿主抵御病毒侵入的第一道防线。物理屏障，如皮肤和粘膜，抗菌肽，pH 值，化学屏障如脂质和酶，免疫细胞如单核细胞，巨噬细胞，嗜酸性细胞，嗜中性细胞和自然破坏细胞。在任何病毒感染后，充分激活宿主固有免疫系统对于防止病毒复制和侵入粘膜组织是重要的，启动强适应性免疫反应以对抗细胞内病原体是重要的^[121]。

PRRSV 感染引起的先天性和适应性免疫反应差，这与免疫调节和不完全病毒清除有关，大多数猪依赖于它们的日龄和免疫状态，保育猪比成年动物更容易感染 PRRSV^[122]。由于他们的先天免疫系统不发达，对抗病毒免疫逃避策略的反应有限。粘膜部位活性化的先天免疫反应在诱导肠道和呼吸道感染的保护性粘膜免疫中起重要作用^[123]。然而，许多猪病毒调节宿主的先天免疫，进而调节适应性免疫，引起慢性持续性感染。事实上，PRRSV 调节免疫状态有利于继发性微生物感染和 PRDC，导致严重的发病率^[124]。

针对 PRRS 的特点，可采取以下几个方面的综合防控措施：猪场或规模猪场应严格执行消毒制度，限制参观场地，必要的入场人员应更换衣服、鞋子，用具应消毒。一般疗效好的猪瘟病毒可用于疾病消毒，如过氧乙酸、多种有机酸等。

种猪实行“全入全出”制度，每批前后，猪场必须严格清洁消毒。哺乳猪早期断奶，母系隔离繁殖，不同年龄猪群隔离，不同地域圈养。在这种情况下，可以减少病毒从老猪传播给仔猪的机会，有助于消除猪的持续性感染；采用 ELISA 和 RT-PCR 检测血清中 PRRSV 抗体和抗原。建立全种猪群监测体系，清除感染猪，防止 PRRSV 传播。

试验一 猪 OASL 基因序列分析与蛋白的表达纯化

1 引言

非洲猪瘟、蓝耳病、猪流行性腹泻等疾病是我国养猪业面临的重大威胁，疾病的爆发会导致大量生猪病死，猪价大幅上涨，在我国这个猪肉消费大国，猪肉价格稳定对居民消费有着很重要的意义^[123]。所以对于猪疾病的预防和抗病毒药物的选择就显得至关重要，文献报道猪 OASL 是一种干扰素诱导的抗病毒蛋白，在此基础上研究猪 OASL 蛋白是如何活化的，研究其抗病毒的调控机制，并以此为靶点设计出药物，治疗病毒侵入机体所导致的疾病。本试验将构建 pET-21a-OASL 重组质粒，利用大肠杆菌原核表达系统，摸索最佳诱导条件，表达猪 OASL 蛋白。并对其进行了纯化和鉴定，又利用生物信息学软件计算了猪 OASL 蛋白等电点，相对分子质量，以及进化树分析亲缘关系和结构的预测，为后续制备猪 OASL 单克隆抗体提供生物材料。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 载体、菌株及样品来源

pET21a 载体由实验室保存，大肠杆菌 DH5 α ，BL21（DE3）感受态细胞购自北京擎科生物科技有限公司。

2.1.2 相关耗材

Hind III 限制性内切酶购自美国 NEB 生物公司，*Eco*R I 限制性内切酶购自美国 NEB 生物公司，Exrase II 同源重组酶购自美国 NEB 生物公司，卡那霉素购自美国 Sigma 生物公司，Ni-NTA Agarose 购自德国 QIAGEN 公司，SDS-PAGE Gel Kit 预制胶试剂盒购自上海雅酶生物科技有限公司，His 标签抗体购自 Abways 公司，ECL 发光显色液购自博奥龙生物技术有限公司。

2.1.3 相关仪器设备

表 1 相关仪器设备

Table 1 Relevant instruments and equipment	
仪器名称	品牌
高速离心机	Eppendorf (德国)
恒温金属浴	博日 (杭州)
紫外光度计	赛默飞 (美国)
电热干燥箱	鸿都 (上海)
细菌恒温培养箱	上海精宏试验设备有限公司
电子天平	梅特勒托利多 (瑞士)
磁力搅拌器	DLAB (北京)
电泳仪、电泳槽	伯乐 (美国)
凝胶成像系统	BIORAD GelDoc USA
超声波细胞破碎机	SONICS (美国)
pH 仪	梅特勒-托利多 (瑞士)
超净工作台	北京东联哈尔
多功能酶标仪	Perkin Elmer (美国)
4℃、-20℃、-80℃冰箱	海尔、普和希
台式离心机	Eppendorf (德国)
涡旋混匀器	莫纳
恒温震荡培养箱	上海知楚仪器有限公司

2.1.4 主要试剂的配置

(1) 10×PBS: 2.4 g KH_2PO_4 , 80 g NaCl, 14.4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2 g KCl, 800 mL 的去离子水中充分溶解, 调节 pH 至 7.2, 定容至 1 L; 使用时稀释至 1×PBS。

(2) 5%脱脂奶: 称取 2.5 g 的脱脂奶粉, 溶于 50 mL 的 1×TBST buffer 中, 4℃储存备用。

(3) Amp (氨苄青霉素): 称取 2 g 的氨苄青霉素粉末, 在 20 mL 的去离子水中充分溶解, 在超净台内, 用 0.22 μm 独立包装的微孔滤膜过滤除菌, 避免污染, 分装每管 1mL, 母液浓度 100mg/mL, -20℃储存备用。

(4) 1 mol/L IPTG: 称取 2.383 g 的 IPTG 置于 50 mL 的离心管中, 加入 8 mL 的高压灭菌水充分溶解, 定容至 10 mL, 在超净台内, 用 0.22 μm 独立包装的微孔滤膜过滤除菌, 分装成每管 1mL 后置于-20℃储存备用。

(5) 10×SDS-PAGE 电泳缓冲液: 称取 144 g 的甘氨酸, 30 g 的 Tris, 10 g 的 SDS, 溶于 800 mL 的去离子水中, 待溶解完全后, 定容至 1 L, 室温储存。

(6) 快速转膜液: 称取 14.4 g 的甘氨酸, 3.03 g 的 Tris, 取 200 mL 的甲醇, 800 mL 的去离子水, 于 1 L 的锥形瓶中溶解混匀, 室温储存, 使用前预冷。

(7) LB 液体培养基: 称取 10 g NaCl, 5 g 酵母粉, 10 g 蛋白胨, 加去离子水溶解然后定容至 1L, 高压冷却至室温后使用。

(8) LB 固体培养基: 称取 10 g NaCl, 10 g 蛋白胨, 5 g 酵母粉, 加入 15 g 琼脂粉, 加

去离子水溶解然后定容至 1 L，高压冷却至未凝固状态，在超净台中加入相应抗性，倒入细菌培养皿中冷却至凝固，放入 4℃ 冰箱备用。

(8) 透析液：配置 1.5 L 透析液需要下列试剂：

称取 4.38 g 的 NaCl，终浓度 50 mmol/L；0.285 g 的 EDTA，终浓度为 0.5 mmol/L；9.015 g 的 Tris，终浓度为 50 mmol/L；75 mL 的甘油，为总体积的 5%；2.61 g 的精氨酸，为总体积的 1%，根据需要透析的样品加入相应浓度的尿素或者盐酸胍。

(9) Washing Buffer, Resuspension Buffer, Dissolution Buffer

母液的配置：0.5 mol/L EDTA：取 200 mL 烧杯，称取 19.0 085 g EDTA 粉末，加入 50 mL 去离子水溶解，然后定容至 100 mL。

1 mol/L Tris PH=8.0：取 200 mL 烧杯，称取 24.228 g Tris，加入 100 mL 去离子水溶解，然后定容至 200 mL。

8 mol/L 盐酸胍：取 500 mL 烧杯称取 286.59 g 盐酸胍，加入 300 mL 去离子水溶解，然后定容至 375 mL。

5 mol/L NACL：取 200 mL 烧杯称取 29.22 g NACL，加入 80 mL 去离子水溶解，然后定容至 100 mL。

Washing Buffer:

取 1 L 烧杯，加入 Triton 100 5 mL，加入 1 mol/L Tris PH=8.0 母液 50 mL，5 mol/L NACL 母液 60 mL，0.5 mol/L EDTA 母液 20 mL，然后定容至 1 L，室温保存，使用前冰上预冷。

Resuspension Buffer:

取 1 L 烧杯，加入 1 mol/L Tris PH=8.0 母液 50 mL，5 mol/L NACL 母液 20 mL，0.5 mol/L EDTA 母液 20 mL，然后定容至 1 L，室温保存，使用前冰上预冷。

Dissolution Buffer:

取 1 L 烧杯，加入 8 mol/L 盐酸胍母液 375 mL，1 mol/L Tris PH=8.0 母液 25 mL，5 mol/L NACL 母液 10 mL，0.5 mol/L EDTA 母液 10 mL，然后定容至 500 mL，室温保存，使用前冰上预冷。

(10) 蛋白纯化试剂：

洗脱液 I：称取 1.5601 g 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，0.1576 g 的 Tris-HCl，0.13616 g 的咪唑于 500 mL 的烧杯中，先加入 80 mL 的去离子水溶解充分，1 mol/L NaOH 调节 pH 至 8.0 后，定容至 100 mL。

洗脱液 II：称取 1.5601 g 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，0.1576 g 的 Tris-HCl，1.702 g 的 250 mmol/L 咪唑于 500 mL 的烧杯中，先加入 80 mL 的去离子水溶解充分，NaOH 调节 pH 至 8.0 后，定容至 100 mL。

2.2 方法

2.2.1 猪 OASL 基因引物的合成

根据猪 OASL 基因序列（GenBank 登录号：NM_001031790.1）使用 Primer 5.0 设计了上下游引物 OASL-F，OASL-R（见表 2），引物由上海生物工程有限公司合成。

表 2 引物设计

Table 2 Primer design		
引物名称	引物序列	酶切位点
OASL-F	ATGGAAGTGTCTTATACCCCGGC	<i>Hind</i> III
OASL-R	TTAATCGCAGCCTTTCGCGC	<i>EcoR</i> I

2.2.2 重组原核表达质粒的构建

2.2.2.1 猪 OASL 目的基因的扩增与回收

以实验室保存 OASL-pET21a-DH5 α （未带 His Tag 标签）菌液为模板，利用合成的引物扩增猪 OASL 目的基因。PCR 反应条件如表所示。反应完成后加入 DNA Loading Buffer，使用 1%的琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物，回收 1 000 bp 左右的目的片段。

表 3 PCR 扩增程序

Table 3 PCR Amplification Procedure		
温度	时间	循环
95℃	5 min	35
95℃	15 s	
62℃	15 s	
72℃	30 s	
72℃	5 min	

2.2.2.2 表达载体的双酶切

用 *Hind* III，*EcoR* I 对 pET21a（带有 His Tag 标签）载体进行双酶切，酶切体系如图所示。酶切完成后，加入 DNA Loading Buffer，使用 1%的琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物，回收 5 000 bp 左右的目的片段。

表 4 双酶切体系

Table 4 Double enzyme digestion system	
试剂	用量（ μ L）
<i>Hind</i> III	1
<i>EcoR</i> I	1
pET21a	1
Cutsmart Buffer	3
ddH ₂ O	Up to 30

2.2.2.3 酶切产物的胶回收

（1）在紫外光灯下用手术刀切下含目的基因条带的的胶块，装入 EP 管进行称重并记录数据。

(2) 加入三倍于凝胶重量的 Gel Solubilization Buffer 溶液，在水浴锅中 55℃融胶 10 min。轻轻的上下倒置，至胶块彻底融化完全。待胶融化后冷却至室温。

(3) 把凝胶溶液加入到离心柱中，室温下静置 1 min，12 000 r/min，离心 1 min。离心完成后弃流出液。

(4) 加入 650 μL 的 Washing Buffer，12 000 r/min，离心 1 min，而后弃流出液。

(5) 12 000 r/min 离心机中空离 2 分钟，以完全消除残留的 Washing Buffer。

(6) 将离心柱放入新 EP 管中，开盖静置 2 min，使离心柱中残留的乙醇挥发干净。

(7) 在柱子中心放入 30 μL 事先在 65℃水浴预热过的 Elution Buffer，后在室温静置 5 分钟。

(8) 离心 1 分钟离心机转速设置为 12 000 r/min，用来洗脱 DNA，将洗脱后的 DNA 测浓度后放置在-20℃下保存。

2.2.2.4 目的片段和表达载体的连接及转化

使用同源重组的方法对目的片段和表达载体进行连接，连接体系如表 5。

最适克隆载体使用量 (0.02×克隆载体碱基对数) ng=5 443×0.02=108.86 ng

最适插入片段使用量 (0.04×插入片段碱基对数) ng=1 047×0.04=41.88 ng

表 5 同源重组连接体系

Table 5 Homologous recombination connection system	
试剂	用量 (μL)
线性化载体	2μL
插入片段	4μL
5×CE II Buffer	2μL
Exrase II	1μL
ddH ₂ O	up to 20μL

用枪轻轻吹打混匀，37℃，30 min，然后冰浴 5 min。

然后将转化连接产物转化至 DH5α，转化完成后挑菌用猪 OASL 的特定引物对菌液进行 PCR 鉴定，体系和程序同上 2.2.2。鉴定正确后，将菌液送去公司测序，测序结果正确的代表载体构建成功，可用于后续试验。

2.2.3 猪 OASL 蛋白的小量表达

对鉴定成功的 OASL-pET21a 质粒转化进大肠杆菌感受态细胞 BL21 (DE3) 中。

(1) 转化完成后用枪头挑取单个菌落打入 1mL 带有 Amp 抗性的液体 LB 培养基中，放置到摇床中，37℃，220 r/min，8 h。

(2) 取 50 μL 菌液至 5 mL 带有 Amp 抗性的培养基中，放置到摇床中，37℃，220 r/min，2 h。使用分光光度计测量培养 2 h 的菌液的 OD₆₀₀ 值，在 OD₆₀₀ 为 0.5 左右时取出，然后吸出 1 mL 菌液至另一新摇菌管中，为未诱导的阴性对照，剩余 4 mL 菌液中加入 4 μL IPTG (终浓度为 1 mmol/L)。

(3) 将两管菌液放入摇床中 37℃, 180 r/min, 诱导 5 h。

(4) 将两管菌液取出后各抽取 500 μ L 于高压过的 1.5 mL EP 管中, 放入离心机中 12 000 r/min, 2 min, 弃上清, 加入 20 μ L 1×PBS 重悬沉淀, 然后加入 5 μ L 5×SDS Loading Buffer, 振荡混匀后, 在金属浴上以 95℃加热 10 min。

(5) 将煮过的样品以 12 000 r/min, 离心 1 min, 取上清进行 SDS-PAGE 鉴定蛋白表达情况, 同时将 pET21a 空载体菌液和 DE3 菌液作为对照进行分析。

(6) 使用 12.5%的 SDS-PAGE 凝胶, 程序为 80 V, 10 min 跑到分离胶, 然后 120 V, 1 h, 溴酚蓝跑到凝胶底部结束, 蛋白上样顺序为: 诱导, 空菌, 空载, 未诱导。

(7) 染色脱色观察结果: 将目的泳道的凝胶切下, 然后放到含有染色液的盒子中在通风厨内进行染色 1h, 然后回收染色液, 倒入脱色液在通风厨内进行脱色, 4h 后观察结果, 拍照分析。

2.2.4 猪 OASL 表达条件的优化

2.2.4.1 不同诱导温度表达

取过夜培养的菌液按 1 : 100 分别接种于六管 6 mL 含 1‰的氨苄抗生素的 LB 培养基中, 于 37℃, 220 r/min 震荡培养至 OD₆₀₀ 值为 0.5。1-5 号管加入 6 μ L 0.5 mmol/L 诱导剂, 6 号管中不添加诱导剂作为对照, 12 h, 180 r/min 震荡培养, 培养温度 1-5 号管分别为 16℃、20℃、25℃、30℃、37℃, 6 号管为对照 37℃。

2.2.4.2 诱导剂浓度的优化

细菌培养方法同 2.2.4.1 所述, 取过夜培养的菌液 60 μ L 分别接种于五管 6 mL 含 1‰的氨苄抗生素的 LB 培养基中, 于 37℃, 220 r/min 震荡培养 1 h 至 OD₆₀₀ 值 0.5 时 1-4 号管加入诱导剂, 浓度分别为 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L、2 mmol/L。5 号管未加诱导剂。诱导温度为上次试验结果最佳温度 37℃, 转速为 180 r/min 诱导 12 h。

2.2.4.3 诱导转速的优化

细菌培养方法同 2.2.4.1 所述, 取过夜培养的菌液 60 μ L 分别接种于五管 6 mL 含 1‰的氨苄抗生素的 LB 培养基中, 于 37℃, 220 r/min 震荡培养 1 h 至 OD₆₀₀ 值 0.5 时 1-4 号管加入诱导剂, 浓度为上次试验结果显示最佳浓度 0.5 mmol/L, 5 号管未加诱导剂, 温度为 37℃, 培养 12 h, 1-4 号管诱导转速分别为 120 r/min、160 r/min、180 r/min、220 r/min, 5 号对照管为 220 r/min。

2.2.4.4 诱导时间的优化

细菌培养方法同 2.2.4.1 所述, 取过夜培养的菌液 60 μ L 分别接种于五管 6 mL 含 1‰的氨苄抗生素的 LB 培养基中, 于 37℃, 220 r/min 震荡培养 1 h 至 OD₆₀₀ 值 0.5 时, 1-4 号管加入诱导剂浓度为 0.5 mmol/L, 5 号管未加诱导剂, 诱导温度为 37℃, 诱导转速为上次试验结果显示最佳转速 220 r/min, 1-4 号管诱导时间分别为 4 h、6 h、8 h、12 h, 5 号管为 12 h 对照。

2.2.5 猪 OASL 蛋白大量诱导表达

(1) 准备已高压 200 mL 摇菌瓶一个，高压灭菌 LB 培养基 50 mL，pET21a-OASL DE3 甘油菌 100 μ L，氨苄抗生素 50 μ L。

(2) 提前一夜在摇菌瓶中加 50 mL LB，50 μ L 氨苄抗生素摇匀，再加入甘油菌 100 μ L，置于摇床中，条件为 37 $^{\circ}$ C，220 r/min，10 h。

(3) 提前配置 2 L 的 LB 在大摇菌瓶中，高温高压灭菌，以待使用。将活化好的菌液按 1 : 100 的比例加入摇菌瓶中，置于 37 $^{\circ}$ C，220 r/min，摇至 OD₆₀₀ 0.6。

(4) 按 1 : 2 000 比例加入浓度为 1mol/L 的 IPTG，37 $^{\circ}$ C，180 r/min，5h。

2.2.6 富集菌液

(1) 将诱导完成的菌液，用 6 个 50 mL 无菌离心管在高速离心机以 10 500 r/min，4 $^{\circ}$ C，5 min 进行富集。菌液过多弃上清反复富集。

(2) 富集完成后弃上清，每管加入 5 mL PBS 震荡洗涤，将 6 管沉淀集中到 1 个管中震荡，然后 12 000 r/min，4 $^{\circ}$ C，5 min 离心，弃上清。加入 40 mL PBS，震荡悬浮，准备破碎。

(3) 超声破碎仪功率 300 千瓦，工作 6 s 停 6 s，工作温度 4 $^{\circ}$ C，工作时间 30 min。将样品放在装满冰的烧杯中破碎。

(4) 破碎完毕，以 12 000 r/min，10 min，4 $^{\circ}$ C 离心，将上清置于新的 50 mL 离心管中，置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

(5) 将沉淀用 washing buffer 20 mL，加 200 μ L DTT 震荡，然后以 12 000 r/min，10 min，4 $^{\circ}$ C 离心，弃上清，重复两次，刮去周围颜色较深的杂菌沉淀。

(6) 加入 20 mL Resuspension Buffer 加 200 μ L DTT 重悬，然后 12 000 r/min，10 min，4 $^{\circ}$ C 离心，上清留样跑胶。

(7) 将沉淀称重，每 30 mg 加入 1 mL Dissolution Buffer，4 $^{\circ}$ C 摇床过夜，然后以 4 $^{\circ}$ C，12 000 r/min，进行离心 10 min，将上清装到新的离心管中，于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

(8) 将 Dissolution Buffer 溶解的包涵体，离心取上清，25 mL 上清，准备透析。配置 500 mL 透析液，tris 50 mM/L，0.5 mM/L EDTA，50 mM/L NaCl，10% 的甘油，1% 的精氨酸，4 mol/L 盐酸胍。

(9) 将样品置于规格为 10 kDa 的透析袋中，将透析袋放入配置好的透析液中，放置在磁力搅拌器上置于 4 $^{\circ}$ C，200 r/min，透析 12 h。

(10) 将透析液中的浓度换为 2mol/L 盐酸胍，其他物质浓度不变，将磁力搅拌器设置为 200 r/min，4 $^{\circ}$ C，透析 12 h。

(11) 将透析液换为不加盐酸胍的物质 (1 $\times$ PBS)，其他物质浓度不变，将磁力搅拌器设置为 200 r/min，4 $^{\circ}$ C，透析 12 h。

(12) 将透析袋中透析完成的蛋白，转移至 50 mL 离心管中，以 12 000 r/min，4 $^{\circ}$ C，10 min，离心取上清，将上清加入 10 kDa 大小的浓缩管中，以 3 000 r/min，4 $^{\circ}$ C 的条件放置在

水平离心机离心 10 min。将蛋白浓缩至 5 mL，准备纯化。

2.2.7 蛋白的纯化

(1) 平衡柱子：将 6 mL 20%乙醇加入柱子中进行孵育，然后加入 3 mL Ni-NTA Agarose 静置 10 min，弃去上清，使用 10 倍柱体积的 PBS 平衡柱子。

(2) 蛋白与 Ni-Speharose 6 Fast Flow 的结合：将复性后收集的样品离心后加入平衡好的柱子，在水平摇床于室温 20 r/min 条件下孵育 30 min，使猪 OASL 蛋白与 Ni-Speharose 6 Fast Flow 充分结合。

(3) 洗脱猪 OASL 蛋白：对孵育后的蛋白进行洗脱，首先收集流穿液至新的离心管中，然后分别使用含 60 mmol/L、100 mmol/L 的咪唑洗脱液洗脱杂质，收集洗脱液，至 $A_{280} < 0.01$ ，使用含 200 mmol/L 咪唑的洗脱液洗脱目的蛋白，得到纯度较高的猪 OASL 蛋白，待 $A_{280} < 0.01$ 时，停止目的蛋白收集。然后使用含有 500 mmol/L 的咪唑洗脱液洗去柱子上的所有蛋白，然后用 20%的乙醇孵育柱子，将其置于 4℃ 保存，对收集的样品测定蛋白浓度，经 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析鉴定后分装，-80℃ 保存备用。

2.2.8 SDS-PAGE 鉴定蛋白纯化结果

(1) 将不同梯度洗脱的蛋白分别抽取 80 μ L，然后分别加入 20 μ L 5×SDS Loading Buffer，放入金属浴，95℃ 加热 10 min，进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。

(2) 转膜：将 PVDF 膜提前 5 min 使用甲醇进行孵育，待电泳结束后，使用半干转将蛋白转至 PVDF 膜上，25 mA，转膜 25 min。

(3) 封闭：转膜结束后，使用 5%脱脂奶，在水平摇床于室温 20 r/min 条件下封闭 1 h。

(4) 一抗孵育：封闭结束后，在水平摇床于室温 100 r/min 条件下 TBST 10 min/次，共洗 3 次，加入 His 标签抗体 (1 : 3 000) 在水平摇床于室温 20 r/min 条件下孵育 1 h。

(5) 二抗孵育：一抗孵育结束后，在水平摇床于室温 100 r/min 条件下 TBST 10 min/次，共洗 3 次，之后加入羊抗鼠 (HRP) 二抗 (1 : 3 000)，在水平摇床于室温 20 r/min 条件下孵育 1 h。

(6) 显色：二抗孵育结束后，在水平摇床于室温 100 r/min 条件下 TBST 10 min/次，共洗 3 次，使用 ECL 显色液进行显色，判断蛋白表达情况。

3 结果

3.1 序列分析

3.1.1 猪 OASL 氨基酸序列

通过 GenBank 数据库下载得到猪 OASL 基因序列 (NM_001031790.1)。通过在线网站 Expaty 中的 Translate (<https://web.expasy.org/translate/>) 对基因序列分析得到猪 OASL 蛋白的氨基酸序列, 其基因全长为 1047 个碱基, 编码氨基酸数约为 348 个, 为 MELFYTPAS KLDTFVAKCLHPHKECKEEVLEAVRTVKKFLWQQCFPGKNVQVLEVGSFGNGTVLRDST EVELVAFLCCFRSFRATEDLDNMLDQLSKTLCSCQGLLAFDLKDVLVEEVFRAIAFTIWT KNLEGPITFTIMPAYRDLVPHGGPSAEVYVDLIEARKPPGNFSPSFAKLQRSFVKHRPAKLK SLLRLVKHWYLKYVKARCPIARLPPLYALELLTIYAWEVGTKAHERFHLDRLGLVTVMCLL QEYQSLCIYWTNYYKFQNPPIEDFVREQLKKERPIILDPADPTYNVAYGYRWDIVSQRARQ CLKQCCCHNNKSPVPPWYIKPSHYTACFRVSAKGCD, 预测蛋白质分子质量 37.2 kDa, 等电点为 8.75。

3.1.2 猪 OASL 基因遗传进化特征分析

使用 MEGA X 软件最大邻接法 (Neighbor-Joining method) 将猪 OASL 基因与 NCBI 登录的其他参考 OASL 基因核苷酸序列同源性比对分析 (图 1)。猪 OASL 基因序列与褐家鼠、白颊长臂猿、人类、西部低地大猩猩、红原鸡、马、澳洲野狗、狢猴、黄牛、天鹅的核苷酸相似性分别为 64.0%、58.1%、73.3%、63.0%、72.5%、37.7%、55.5%、52.9%、56.6%、69.3%。由系统进化树可知猪 OASL 基因与西部低地大猩猩、白颊长臂猿、人类、狢猴、马、澳洲野狗、褐家鼠和黄牛的 OASL 基因在同一支上, 与黄牛的亲缘关系最近、与褐家鼠、澳洲野狗、马、狢猴、人类、西部低地大猩猩、白颊长臂猿的 OASL 基因的亲缘关系依次减弱, 与天鹅和红原鸡的 OASL 基因亲缘关系最远 (图 2)。

Percent Identity													Divergence	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
1		64.0	58.1	73.3	63.0	72.5	37.7	55.5	52.9	56.6	69.3	1		Sus
2	56.1		68.4	77.1	73.9	67.4	57.4	72.0	63.4	68.5	66.9	2		Rattus
3	52.1	31.6		80.3	89.1	61.6	47.2	71.5	75.8	66.6	61.0	3		Nomascus
4	49.0	28.4	6.1		87.8	74.3	53.7	71.0	74.9	70.5	74.7	4		Homo
5	49.9	31.4	5.6	4.2		66.0	53.2	75.3	81.5	70.0	65.2	5		Gorilla
6	80.4	69.5	70.7	69.6	68.0		40.8	57.2	56.0	58.4	82.2	6		Gallus
7	50.6	35.3	20.0	18.7	19.8	69.0		56.5	41.2	54.4	40.2	7		Equus
8	50.7	37.4	28.7	26.1	28.8	72.0	23.8		65.5	70.6	56.4	8		Canis
9	52.1	31.3	13.8	11.8	12.0	69.5	20.4	31.1		61.7	55.3	9		Callithrix
10	49.7	44.7	36.3	33.8	36.3	77.9	31.9	37.9	37.6		57.4	10		Bos
11	81.1	69.7	71.6	71.4	70.6	30.2	70.7	73.5	72.0	79.9		11		Anser
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			

图 1 OASL 基因核苷酸同源性比较

Figure 1 Comparison of nucleotide homology of OASL gene

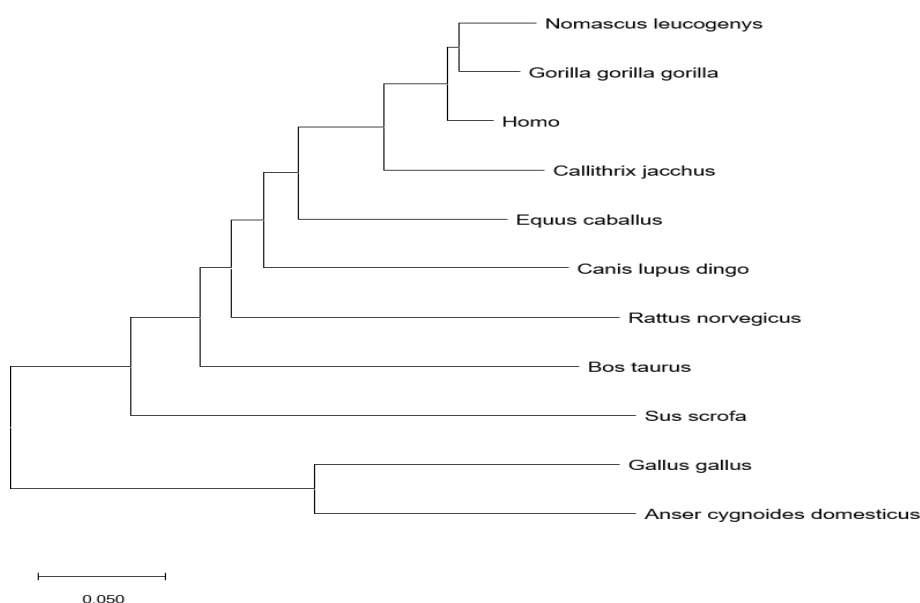


图 2 OASL 基因核苷酸序列进化树

Figure 2 Nucleotide sequence evolutionary tree of the porcine OASL gene

3.1.3 猪 OASL 蛋白质亲水性预测

使用在线软件 EXPASY 中的 ProtScale (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscal e.pl>) 来分析猪 OASL 蛋白的亲水特性, 结果(图 3)所示, 显示该蛋白亲水性分值较高的 aa 区域为 73-78、103、123、224、246-248。其中亲水性在第 247 位 aa 处达到最大值 2.576; 亲水性分值较低的区域为 23-25、83-87、167、183、188、235-23、64-266、280-282、312、324, 其中在第 281 位 aa 处为最小值-2.789。

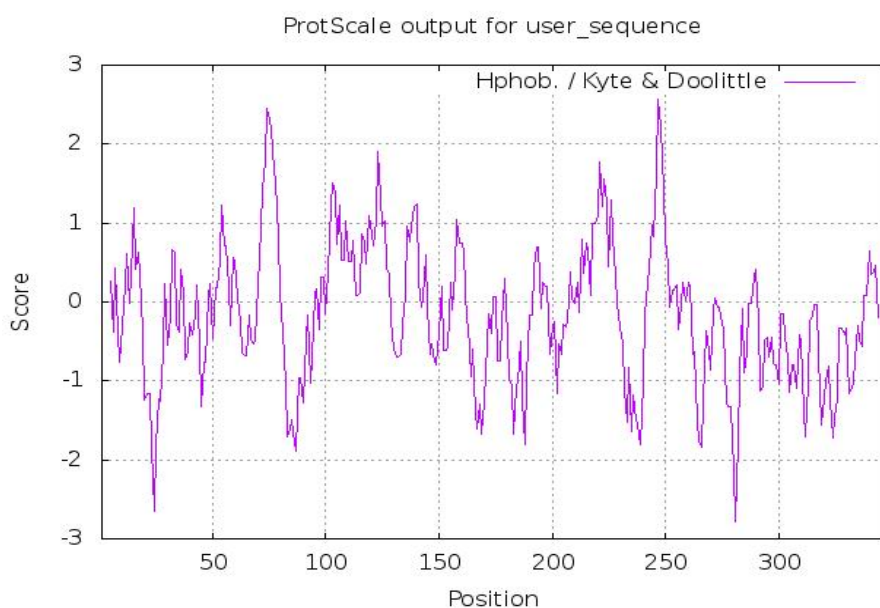


图 3 猪 OASL 蛋白亲水性预测

Figure 3 Prediction of hydrophilicity of porcine OASL proteins

3.1.4 猪 OASL 蛋白二级结构和三级结构的预测分析

使用 RHONE-ALPES 生物信息学分析网站进行 SOPMA 二级结构预测 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 结果如图 4 所示, 该蛋白有 159 个 aa 构成 α 螺旋, 占该蛋白氨基酸总数的 45.69%, 6 个 aa 构成 β -转角, 占氨基酸总数的 1.72%, 44 个 aa 构成延伸链, 占氨基酸总数的 12.64%, 139 个 aa 构成无规则卷曲, 占氨基酸总数的 39.94%。为了预测构建猪 OASL 蛋白的三级结构模型, 使用在线软件 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 输入氨基酸序列进行预测, 结果如图 5 所示, 猪 OASL 蛋白的三级结构模型以 α 螺旋为主。

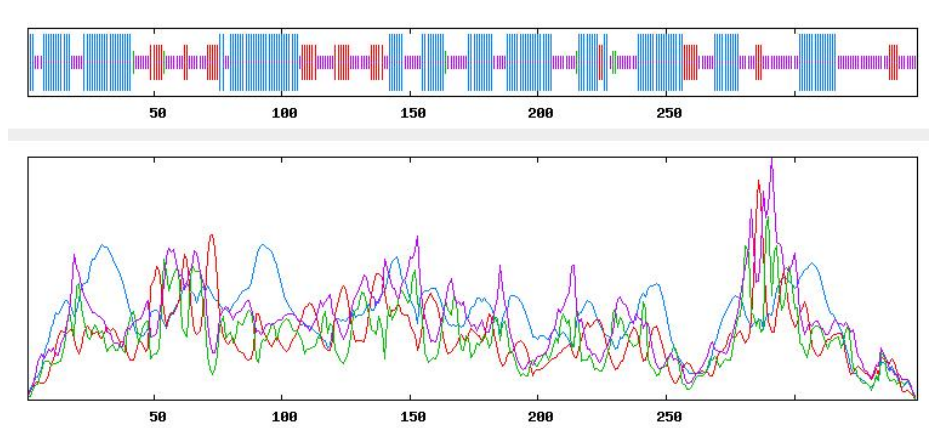


图 4 猪 OASL 蛋白二级结构的预测

蓝色线: α 螺旋; 红色线: 延伸链; 紫色线: 无规则卷曲; 绿色线: β 转角

Figure 4 Predicted blue line of secondary structure of porcine OASL protein: α spiral: red line: extension chain;

Purple line: irreguLar curl; Green line: β corner

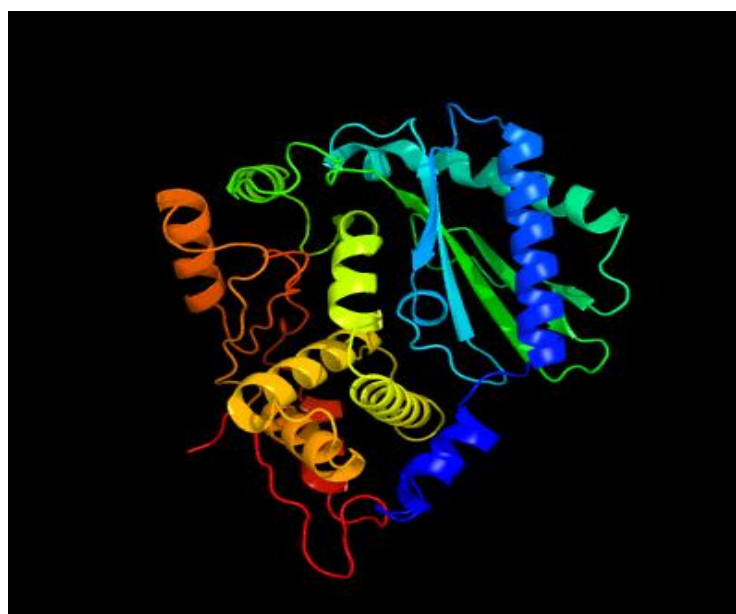


图 5 猪 OASL 蛋白三级结构的预测

Figure 5 Prediction of tertiary structure of porcine OASL protein

3.2 猪 OASL 基因合成及表达载体的构建

使用引物 OASL-F (ATGGAAGTGTGTTTATACCCCGGC), OASL-R (TTAATCGCAGCCTTTCGCGC) 对合成的猪 OASL 目的基因进行扩增, 经 1% 的核酸凝胶电泳分析, 检测到了目的条带, 结果如图 6 所示, 在 1000-2000 bp 之间出现明显条带, 大小与目的基因片段大小一致。将猪 OASL 重组质粒转化到 DH5 α 感受态细胞中, 挑取单菌落进行 PCR 鉴定, 经凝胶电泳分析, 得到了 1000 bp 左右的目的条带, 选取阳性菌液送至上海生工生物工程技术有限公司进行测序。将测序结果与合成的基因序列比对, 相似性为 100%。证明成功构建了 pET21a-OASL 重组质粒。

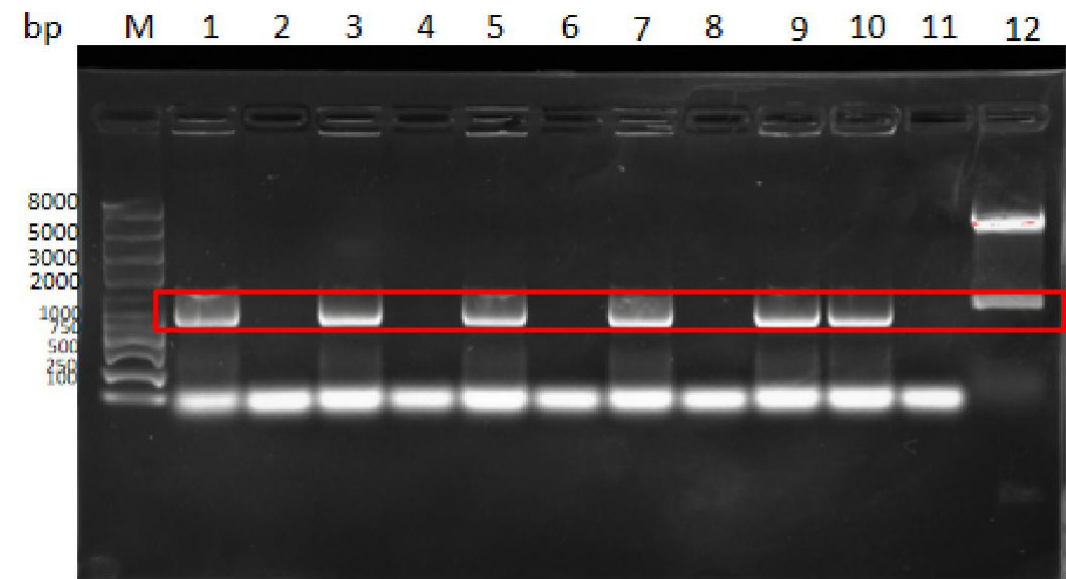


图 6 猪 OASL 重组质粒的菌液 PCR 及双酶切鉴定

M: Trans2K Plus II DNA marker ; 1-10: 挑菌 PCR 鉴定 ; 11: 阴性对照 ; 12: 双酶切鉴定

Fig. 6 PCR and bienzyme digestion identification of porcine OASL recombinant expression plasmids

M: Trans2K Plus II DNA marker; 1-10: PICK PCR identification; 11: negative control; 12: bienzyme digestion identification

3.3 猪 OASL 蛋白原核表达条件的优化

3.3.1 最佳诱导温度

采用不同诱导温度 (16℃、20℃、25℃、30℃、37℃) 进行诱导表达, 结果如图 7 所示。SDS 电泳凝胶结果表明: 诱导温度为 37℃ 的蛋白表达量最大, 所以最佳诱导温度为 37℃。

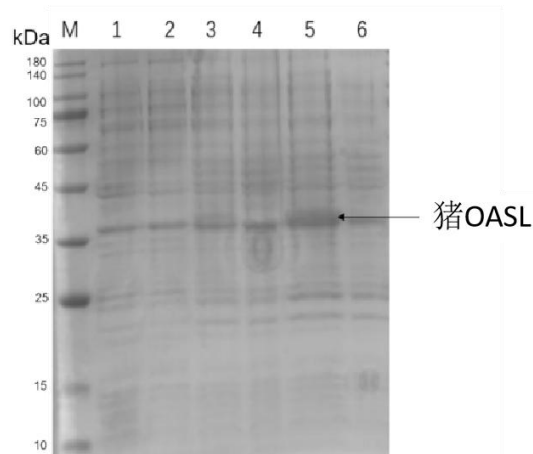


图 7 诱导温度对蛋白表达的影响

M: 蛋白质分子量标准; 1-5: 诱导温度依次为 16°C、20°C、25°C、30°C、37°C 的菌液沉淀; 6: 未加诱导剂的菌液沉淀, 37°C

Figure 7 Effect of induction temperature on protein expression

M: protein molecular weight standard; 1-5: Precipitation of bacterial liquid with induction temperature of 16°C, 20°C, 25°C, 30°C and 37°C; 6: Precipitate of bacterial solution without inducer, 37°C

3.3.2 最佳诱导剂浓度

采用不同诱导剂浓度 (0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L、2 mmol/L) 37°C 进行诱导表达, SDS 凝胶电泳结果表明诱导剂浓度为 0.5 mmol/L 时蛋白表达量最大, 如图 8 所示, 所以最佳诱导剂浓度为 0.5 mmol/L。

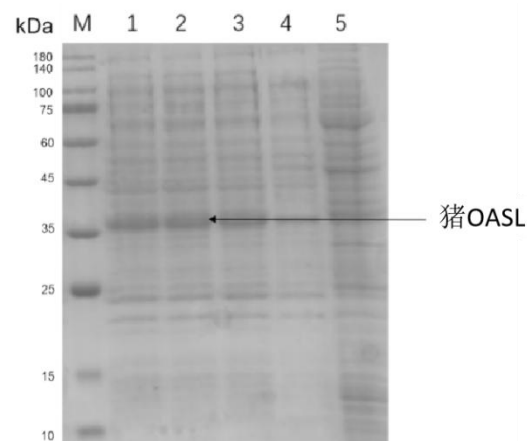


图 8 诱导剂浓度对蛋白表达的影响

M: 蛋白质分子量标准; 1-4: 诱导浓度依次为 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L、2 mmol/L 的菌液沉淀; 5: 未加诱导剂的菌液沉淀

Fig. 8 Effect of inducer concentration on protein expression

M: protein molecular weight standard; 1-4: The induction concentration was 0.1 mmol/L, 0.5 mmol/L, 1 mmol/L and 2 mmol/L Precipitation of bacterial fluid; 5: Precipitation of bacterial solution without inducer

3.3.3 最佳诱导转速

采用不同诱导转速（120 r/min、160 r/min、180 r/min、220 r/min），37℃，诱导剂浓度为 0.5 mmol/L 进行诱导表达，SDS 凝胶电泳结果显示诱导转速为 220 r 时蛋白表达量最大。如图 9 所示。

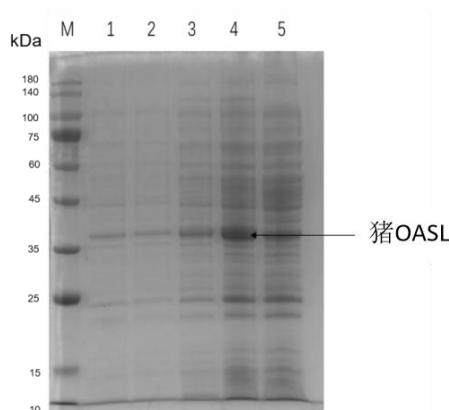


图 9 诱导转速对蛋白表达的影响

M: 蛋白质分子量标准; 1-4: 诱导转速依次为 120 r/min、160 r/min、180 r/min、220 r/min; 5: 未诱导, 220 r/min

Fig. 9 Effect of induced rotational speed on protein expression

M: protein molecular weight standard; 1-4: The induction speed is 120 r/min, 160 r/min, 180 r/min, 220 r/min; 5: Uninduced, 220 r/min

3.3.4 最佳诱导时间

采用不同诱导时间（4 h、6 h、8 h、12 h）37℃，220 r/min 诱导剂浓度为 0.5 mmol/L 进行诱导表达，SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示诱导时间为 8 h 时蛋白表达量最大。（图 10）

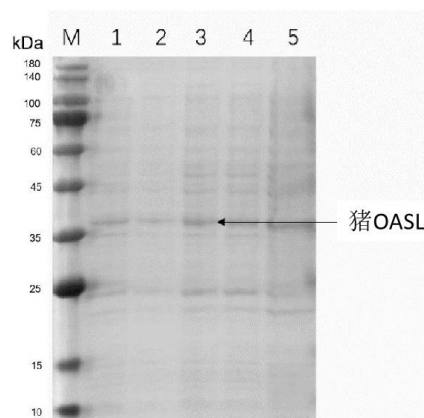


图 10 诱导时间对蛋白表达的影响

M: 蛋白质分子量标准; 1-4: 诱导时间依次为 4 h、6 h、8 h、12 h; 5: 未加诱导剂的菌液沉淀, 12 h

Fig. 10 Effect of induction time on protein expression

M: protein molecular weight standard; 1-4: The induction time was 4 h, 6 h, 8 h, 12 h; 5: Precipitation of bacteria without inducer, 12 h

3.4 猪 OASL 蛋白的大量表达

使用小体系对诱导表达条件进行优化，利用最优条件 37℃，220 r/min，8h，诱导剂 IPTG 浓度为 0.5mmol/L 进行大量表达，经 SDS-PAGE 检测，发现在 35-45 kDa 之间有一明显条带，且空菌、空载和未诱导中没有条带，确认猪 OASL 蛋白可以表达（图 11 左）。将菌液进行富集之后，进行超声破碎，将上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测，发现蛋白在破碎后的菌液里主要以沉淀形式存在，表明猪 OASL 蛋白主要以包涵体形式表达（图 11 右）。

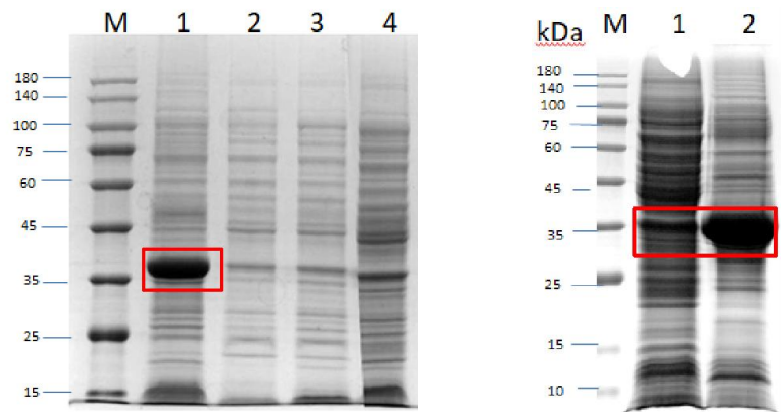


图 11 SDS-PAGE 鉴定猪 OASL 蛋白表达

左 M: 蛋白质分子质量标准; 1: 诱导后 pET-21a-OASL 菌液; 2: 诱导后 pET-21a 菌液; 3: 诱导后的 DE3 菌液; 4: 未诱导 pET-21a-OASL 菌液

右 M: 蛋白分子质量标准 1: 诱导表达上清 2: 诱导表达沉淀

Fig. 11 SDS-PAGE identification of porcine OASL protein expression

Left M: protein molecular quality standard; 1: pET-21a-OASL after induction; 2: pET-21a after induction; 3: DE3 bacteria after induction; 4: Uninduced pET-21a-OASL bacteria solution

Right M: Protein molecular quality standard 1: Induced expression supernatant 2: Induced expression precipitation

3.5 猪 OASL 蛋白的复性及纯化

将沉淀用 6 mol/L 盐酸胍进行溶解变性，采用梯度透析的方法进行复性后，用 Ni 柱进行纯化，先用 60 mmol/L，100 mmol/L 的咪唑进行洗杂，然后用 200 mmol/L 的咪唑洗脱目的蛋白，经 SDS-PAGE 检测，如图 12 所示用 200 mmol/L 咪唑洗脱目的蛋白在 35~45 kDa 之间得到一条单一的条带，结合测序结果可以确认成功表达并纯化猪 OASL 蛋白。

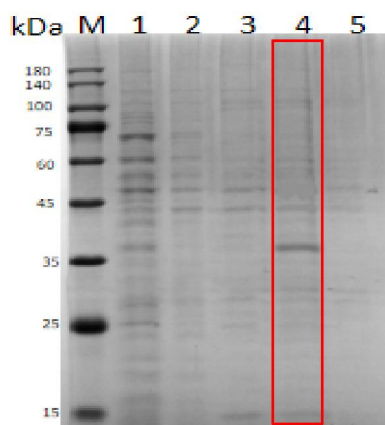


图 12 SDS-PAGE 鉴定猪 OASL 蛋白 Ni 柱纯化

M: 蛋白质分子质量标准; 1: 流穿液; 2: 60mM 咪唑洗脱液;
3: 100mM 咪唑洗脱液; 4: 200mM 咪唑洗脱目的蛋白
5: 500mM 咪唑洗脱液

Fig. 12 SDS-PAGE identification of porcine OASL protein Ni column purification

M: protein molecular quality standard; 1: Flow penetration solution ;2: 60mM imidazole eluate; 3: 100mM imidazole eluate ; 4: 200mM imidazole elution protein of interest; 5: 500mM imidazole eluent

4 讨论与结论

本试验利用生物信息学软件计算了猪 OASL 蛋白等电点, 相对分子质量, 以及进化树分析亲缘关系和结构的预测, 并设计合成猪 OASL 基因序列, 根据分析对其进行了优化, 并设计引物, 使用同源重组方法成功构建了带有 His-tag 标签的重组原核表达质粒 pET-21a-OASL, 同源重组酶的重组能力强于 T4 DNA 连接酶的连接能力, 只需要一步即可重组连接成功, 大大节省了连接的时间, 提高了连接效率^[124]。

蛋白表达系统使用大肠杆菌表达系统, 在表达的过程, 表达菌对温度、时间、以及 IPTG 的浓度都有较高的要求, 通过反复摸索表达条件, 猪 OASL 在 37℃ 培养条件下, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 220 r/min 振荡培养 8h, 表达量最大, 最终以包涵体蛋白的形式表达, 包涵体形成是因为表达量过高, 合成速度太快, 没有足够的时间进行正确的折叠, 二硫键不能正确的配对, 导致形成错误的折叠, 形成蛋白质的聚集体, 无法达到足够的溶解度, 最终经过条件摸索采用盐酸胍溶解变性, 然后梯度透析复性恢复到正常的折叠结构。文献报道中有采用共表达分子伴侣的方式增加蛋白的可溶性, 但分子伴侣不适合选用 pET 系列构建, 因为 T7 系统会表达竞争目的蛋白资源, 影响目的蛋白表达。所以在

选择上需提前考虑。

由于在其 N 端添加了 His-Tag 标签，使其可以与 Ni^{2+} 发生螯合作用，且 His-Tag 非常小对蛋白的下游应用无影响，方便使用亲和层析的方法进行纯化，其免疫原性也相对较低，有利于进行后续的单抗试验。

本试验利用设计合成猪 OASL 基因序列，构建了有 His-tag 的重组原核表达质粒 pET-21a-OASL，对原核表达菌进行诱导表达，最终以包涵体蛋白的形式表达，利用 6 mol/L 盐酸胍进行溶解变性，利用梯度透析方法复性，获得了猪 OASL 蛋白，使用镍柱纯化了猪 OASL 蛋白。

试验二 猪 OASL 单克隆抗体的制备

1 引言

天然免疫一直以来都是科学家们的研究热点，干扰素是一种天然的人体蛋白，可以通过多种方式激活人体免疫系统，对多种肿瘤的生长具有良好的抑制作用^[125]。猪 OASL 是一种干扰素刺激基因，是干扰素诱导产生的一种抗病毒蛋白，针对病毒复制与转录阶段，已有研究报道人 OASL 的抗病毒功能，但在猪上对很多病毒的抗病毒机制尚不明了，本章节通过制备猪 OASL 蛋白的单克隆抗体，方便研究病毒入侵时，猪的 OASL 蛋白分泌情况，所以本章通过细胞融合技术将小鼠脾脏细胞与 SP2/0 细胞进行融合，经间接 ELISA 筛选获得能够稳定分泌抗猪 OASL 的单克隆抗体，并通过 Western Blot 和 IFA 鉴定其反应性，为猪 OASL 的鉴定，未来诊断和预防猪病提供的重要生物材料。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 样品来源与实验动物

SP2/0 细胞、HEK293T 细胞均由本实验室保存，BABL/c 小鼠购自郑州大学实验动物中心。

细胞培养皿相关耗材购自无锡耐思生物科技有限公司，0.45 μm 细胞滤网购自 Merck Millipore 公司，融合剂 PEG1500 购自 Roche，RPMI Medium 1640 培养基购自北京索莱宝科技有限公司，Protein Iso Protein G Resin 购自北京全式金生物技术有限公司，Fluoroshield with DAPI 购自索莱宝，Clone Easy 购自 MDTEK，小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒购自 Proteintech 公司。

2.1.2 主要试剂配制

(1) HAT: 将 50 $\times$ HAT 冻干粉在超净台内打开溶于一瓶 500 mL 的 RPMI 1640 培养基中，缠好封口膜 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

(2) HT: 将 50 $\times$ HT 冻干粉在超净台内打开溶于一瓶 500 mL 的 RPMI 1640 培养基中，缠好封口膜 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用

(3) GNK 培养基: 称取 0.01 g 的酚红，0.4 g 的 KCl，3.56 g 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，8.0 g 的 NaCl，0.78 g 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，2 g 的葡萄糖在 800 mL 的超纯水中充分溶解，调节 pH 至 7.2，定容至 1 L，高压灭菌，缠好封口膜 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

(4) 1 mol/L EDTA: 称取 0.2338 g 的 EDTA，加入 600 mL 去离子水中充分溶解，调节 pH 至 8.0，定容至 800 mL。

(5) 2% NaHCO_3 的 EDTA: 取 400 mL 的 1 mol/L EDTA，加入 20 g 的 NaHCO_3 ，充分溶解，调节 pH 至 8.0。

(6) 过饱和硫酸铵：称取 400 g 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，加入 500 mL 的超纯水，在 50-80℃ 的条件下充分溶解，溶解完全后趁热过滤，待冷却后，使用氨水调节 pH 至 7.4（配置好的过饱和硫酸铵应有晶体析出）。

(7) 甘氨酸：称取 0.751 g 的甘氨酸，溶于 60 mL 的超纯水中，充分溶解后使用浓盐酸调节 pH 至 2.5，定容至 100 mL，室温保存。

(8) 1 mol/L 的 Tris-HCl：称取 12.114 g 的 Tris 充分溶于 90 mL 的超纯水，调节 pH 值为 8.0，定容至 100 mL，室温保存备用。

2.1.3 相关仪器设备

表 6 相关仪器设备

Table 6 Relevant instruments and equipment

仪器名称	品牌
二氧化碳培养箱	Thermo
电热恒温水浴锅	上海精宏
倒置显微镜	Motic
荧光显微镜	MODEL
电动移液器	Eppendorf
自动细胞计数仪	RWD
液氮罐	Thermo
1300 系列 II 级 A2 型生物安全柜	Thermo

2.2 方法

2.2.1 动物免疫

免疫小鼠，将纯化后的蛋白，按照图中的免疫程序进行免疫。

表 7 猪 OASL 蛋白免疫小鼠的程序

Table 7 Procedure for immunizing mice with porcine OASL protein

免疫时间/天	免疫剂量/ μg	佐剂	免疫方法
第 0 天	50	弗氏完全佐剂	腹腔注射
第 14 天	50	弗氏不完全佐剂	腹腔注射
第 28 天	50	弗氏不完全佐剂	腹腔注射
第 35 天	80	无	腹腔注射

3 次免疫后对小鼠进行尾静脉采血，用 Western Blot 和 ELISA 鉴定血清内抗体表达情况。

(1) 使用纯化后的猪 OASL 蛋白 20 μL ，加入 5 μL 的 5×SDS-Loading Buffer，振荡混匀后，在金属浴上 95℃ 加热 10min。

(2) 加热完用离心机以 12 000r/min 离心 1min。用 12.5% 的预制胶进行 SDS-PAGE 鉴定，加样顺序为蛋白 Maker、猪 OASL 蛋白、对照孔 p30 蛋白。

(3) 转膜: 将 PVDF 膜提前 5 min 使用甲醇进行孵育, 待电泳结束后, 将蛋白转至 PVDF 膜上, 25 mA, 转膜 25 min。

(4) 封闭: 转膜结束后, 使用 5% 脱脂奶, 室温封闭 1 h。

(5) 一抗孵育: 封闭结束后, TBST 10 min/次, 共洗 3 次, 加入小鼠血清 (1 : 500) 孵育 1 h。

(6) 二抗孵育: 一抗孵育结束后, TBST 10 min/次, 共洗 3 次, 之后加入羊抗鼠二抗 (1 : 3 000), 室温孵育 1 h。

(7) 显色: 二抗孵育结束后, TBST 10 min/次, 共洗 3 次, 使用 ECL 显色液进行显色, 判断蛋白表达情况。

2.2.2 细胞融合

选取血清效价高的小鼠 1 进行融合

(1) 融合前对小鼠进行眼球采血, 脱颈致死浸泡于 75% 酒精中 5 min, 然后带入细胞间超净台内。

(2) 将小鼠皮肤酒精沥干, 固定小鼠四肢, 用剪刀剪开左腹部皮肤, 取出脾脏, 置于尼龙网小烧杯上。

(3) 剔除干净多余的脂肪组织, 用玻璃活塞在尼龙网上研磨, 制备单细胞悬液, 用 GNK 冲洗滤网, 同时准备提前培养好的 SP2/0 单细胞悬液。

(4) 将脾细胞悬液吸入 50 mL 离心管, 1 200 r/min, 室温离心 10 min。

(5) 轻弹管底使细胞松散, 加入 20 mL 的 GNK 悬浮细胞将两种细胞混合后 (一个小鼠脾脏使用 6 瓶 T25 SP2/0 细胞) 1 200 r/min, 室温离心 10 min。

(6) 轻弹管底使细胞松散, 置于 37℃ 水浴, 取 1 mL 提前预热的 PEG1500, 以 1 mL/min 的速度逐滴加入细胞中, 作用时间为 90s。

(7) 逐滴加入 15 mL 预热的 GNK 培养基, 前 30 s 加 1 mL, 接着 30 s 加 3 mL, 然后加 11 mL。边加边摇晃, 然后 37℃ 水浴 5 min, 期间摇晃两次再加入 25 mL GNK 培养基, 以彻底终止融合过程。

(8) 将融合好的细胞以 1 000 r/min, 室温, 10 min, 弃上清, 换成 HAT 筛选培养基。

(9) 铺 96 孔板 10 块, 250 μ L/孔, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养。

(10) 四天后半量换 HAT 培养基。

(11) 七天后半量换 HT 培养基。每天观察, 标记融合的细胞。

2.2.3 阳性细胞的筛选

(1) 抗原包被: 提前将猪 OASL 蛋白用 PBS 稀释到每毫升 10 μ g, 混匀用排枪加入 ELISA 板中, 每孔 100 μ L, 4℃ 过夜。

(2) 洗涤: 次日倾去凹槽内的液体, 用 TBST 在洗板机洗三次, 每次 200 μ L。

(3) 封闭: 配置 5% 的脱脂牛奶, 每孔加 100 μ L, 室温放置 100 μ L。

- (4) 洗涤：倾去封闭液，用 TBST 在洗板机洗三次。
- (5) 加入一抗：在超净台内，将细胞上清抽取 50 μL 加入到已包被的板子上，每个样品平行做两次。阴性血清为阴性对照，加盖 37℃ 恒温箱孵育 1 h。
- (6) 洗涤：用洗板机洗 3 次。
- (7) 加酶标抗抗体：羊抗鼠 IgG-HRP，用封闭液 1 : 3 000 稀释，100 μL 每孔，加盖 37℃ 恒温箱孵育 1 h。
- (8) 洗涤：用洗板机洗 5 次。
- (9) 显色：加新鲜配置的 ELISA 双组分显色液 100 μL 每孔，室温避光放置 10 min，显示蓝色。
- (10) 终止反应：加 50 μL /孔 2 mol/L 的硫酸，观察颜色变黄，用酶标仪测定 450 nm 处各孔的吸光值。

2.2.4 亚克隆

- (1) 将 ELISA 鉴定阳性的细胞扩大培养至 6 孔板中。
- (2) 待细胞长满时，进行细胞收集，离心后加入新培养基重悬细胞，进行细胞计数。
- (3) 按计数结果将细胞稀释到每毫升 10 个细胞然后抽取 10 mL 铺 96 孔板。
- (4) 待 7 天左右，细胞状态良好，抽取 50 μL 细胞上清进行 ELISA 鉴定。如此重复两次亚克隆结束。

2.2.5 腹水的制备

- (1) 将亚克隆后筛选出来的单克隆细胞株扩大培养至 T75 细胞瓶中，准备制备腹水。
- (2) 在注射细胞前一周，选取 8-10 周龄的 BALB/c 雌鼠，每只注射 0.5 mL 的液体石蜡。
- (3) 注射当天，将细胞重悬计数，选取 1×10^6 个细胞，500 r/min，10 min，室温离心后，用 500 μL PBS 重悬，然后对小鼠进行腹腔注射。
- (4) 注射一周后观察小鼠腹部有水波样隆起，开始收集腹水，直至小鼠死亡，停止收集。
- (5) 腹水收集后 10 000 r/min，离心 2 min，取上清至新的离心管中，放入 -80℃ 冰箱保存。

2.2.6 腹水纯化

(1) 透析袋的处理

将透析袋按腹水的体积裁剪成所需要的长度，将透析袋放入有 2% NaHCO_3 的 EDTA 中煮沸 10 min，冷却后，将透析袋放入超纯水中冲洗干净，然后将透析袋放进含有 1 mol/L 的 EDTA 的水中煮沸 10 min，冷却后，将透析袋放入超纯水中冲洗干净，将其浸泡在 30% 的乙醇中，放置在 4℃ 冰箱保存。

(2) 腹水的粗提

从 -80℃ 冰箱取出腹水，待融化后，4℃ 条件下 12 000 r/min 离心 15 min，取 1 mL 上清于 5 mL 烧杯中，加入 1 mL PBS，将烧杯置于磁力搅拌器上，逐滴加入 2 mL 过饱和硫酸铵，4℃ 过夜搅拌。次日，4℃ 12 000 r/min 离心 10 min，弃去上清，使用 1 mL 的 PBS 重

悬，将重悬液置于透析袋中，于 PBS 中 4℃透析过夜，除去饱和硫酸铵。

(3) 腹水的精提

吸取 1 mL Protein G resin 膏剂至新的柱子，待完全沉淀弃去储存液，加入 PBS，平衡 Protein G resin，利用紫外分光光度计测流出液，至 $A_{280\text{ nm}} < 0.01$ ，否则继续平衡柱子，将透析过的样品进行离心，收集上清加入柱子中，摇床孵育 5 min，控制流速为 1 mL/min，反复上样 5 次，使抗体与 Protein G resin 充分结合，收集流出液，使用 PBS 洗脱未结合蛋白至流出液的 $A_{280} < 0.01$ ，收集流出液，用洗脱液 B 洗脱目的 IgG，收集洗脱液，并及时测定 IgG 的 A_{280} 值，当 $A_{280} < 0.3$ 时，停止收集洗脱液，将柱子清洗干净后，加入 5 mL 20%酒精，将柱子与 4℃保存。

将收集到得洗脱液放置冰上，立即加入 Tris-HCl，防止降解，调节 pH 至 7.4，PBS 透析收集到的 IgG 样品，4℃透析过夜，次日更换 PBS，最后收集抗体，测定浓度，-80℃分装保存。

2.2.7 单克隆抗体效价测定

ELISA 实验步骤同 2.2.3。

2.2.8 亚型测定

使用单克隆抗体亚型检测试剂盒操作说明书

- (1) 从室温平衡 20min 后的铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回 4℃。
- (2) 设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 50μL。
- (3) 样本孔中加入待测样本 50μL，空白孔不加。
- (4) 除空白孔外，标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体 100μL，用封板膜封住反应孔，37℃水浴锅或恒温箱温育 60min。
- (5) 用洗板机洗板 3 次，每孔 200μL。
- (6) 每孔加入底物 A、B 各 50μL，室温避光孵育 15min。
- (7) 每孔加入终止液 50μL，15min 内，在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。

2.2.9 Western blot 鉴定单克隆抗体的特异性

实验步骤同 2.2.1。

2.2.10 IFA 鉴定单克隆抗体的特异性

- (1) 固定细胞：在室温条件下用 4℃预冷的 4% PFA 对细胞进行固定，500 μL/孔，4℃固定过夜，PBS 洗涤 3 次。
- (2) 通透细胞膜：使用 0.1%的 TritonX-100 通透细胞膜，500 μL/孔，室温孵育 10 min，PBS 洗涤 3 次。
- (3) 封闭：取出细胞爬片，室温条件下使用含 1%BSA 进行封闭，150 μL/片，1 h 后用 PBS 洗涤 3 次。
- (4) 孵育一抗：将小鼠 MAb 7D7E3 按 1 : 500 稀释后 100 μL/片，37℃孵育 1 h，PBS 洗

涤 3 次。

(5) 孵育二抗：用 1%BSA 将 CyTM3 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) 按 1 : 500 稀释，37℃条件下，避光孵育，100 μL/片，1 h 后 PBS 洗 3 次。

(6) 染色和封片：加入 Fluoroshield with DAPI 15 μL/片，室温避光 30 min 晾干，使用倒置荧光显微拍照。

3 结果

3.1 血清效价和反应性的测定

取纯化过的猪 OASL 蛋白，采用腹腔注射的方法，对三只小鼠进行免疫，免疫三次后，采集小鼠血清测定与猪 OASL 蛋白反应性和血清效价。ELISA 检测结果显示鼠 1 和鼠 2 的血清效价达到了 1 : 125 000~1 : 625 000 (见图 14 左)；由于鼠 1 的 P/N 值大于鼠 2，遂决定对鼠 1 进行 Western Blot 检测，结果显示稀释过的鼠 1 血清做一抗检测纯化过的猪 OASL 蛋白，在 35 kDa 左右有一明显条带，对照无条带 (见图 14 右)，表明鼠 1 血清中表达的抗体能与受检蛋白良好的结合，遂决定对鼠 1 进行脾细胞融合。

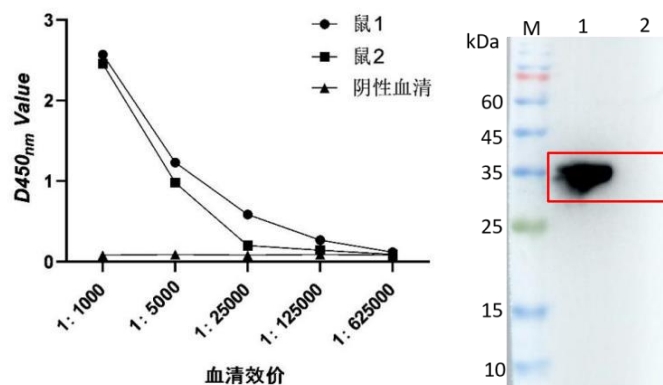


图 14 左：小鼠血清效价的检测；右：鼠 1 血清与猪 OASL 蛋白反应性检测

Figure 14 Left: Detection of serum titer in mice; Right: Murine 1 serum and porcine OASL protein reactivity

assayig

3.2 细胞融合及单抗腹水效价的测定

根据 ELISA 筛选结果，选取阳性孔进行亚克隆，经过两次亚克隆筛选到一株杂交瘤细胞株，命名为 7D7E3。为测定单抗腹水效价，包被猪 OASL 蛋白，一抗为腹水，二抗为羊抗鼠 (HRP) IgG，进行 ELISA 鉴定，结果如图 15 所示，以 P/N 值 ≥ 2.1 为阳性判断标准，7D7E3 在 1 : 500 000 时 P/N 值为 2.92，可以确定 7D7E3 单抗腹水的效价为 1 : 500 000，阴性血清平均值为 0.087。

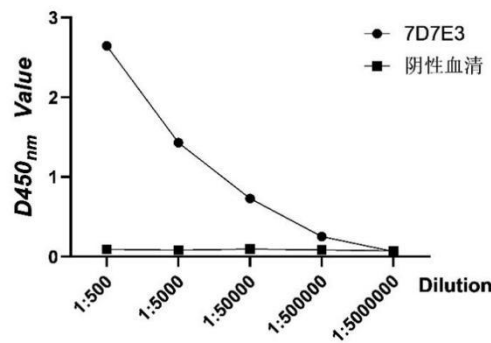


图 15 7D7E3 单克隆抗体腹水效价的测定

Figure 15 Determination of ascites titer of 7D7E3 monoclonal antibody

3.3 单克隆抗体的亚型测定结果分析

使用单克隆抗体亚型检测试剂盒测定 7D7E3 单克隆抗体亚型，结果显示单抗 7D7E3 重链为 IgG2b，轻链为 Lambda。（如图 16）

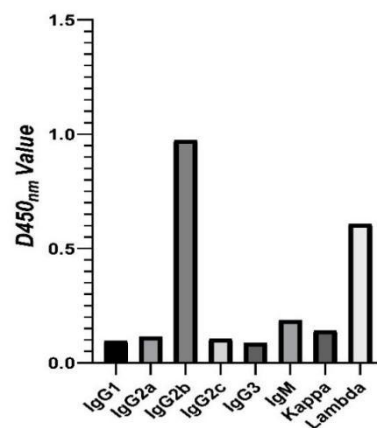


图 16 单克隆抗体亚型测定

Figure.16 Monoclonal Antibody Subtype Determination

3.4 单抗与猪 OASL 蛋白特异性与反应性的鉴定

为进一步验证所得到的单克隆抗体与猪 OASL 的特异性反应，本研究用单克隆抗体 7D7E3 做一抗，对猪 OASL 蛋白和非洲猪瘟病毒 P30 蛋白进行 Western blot 验证，结果如图 17 所示。结果表明，在第一泳道 35~45 kDa 处有清晰的蛋白印迹，第二泳道 P30 蛋白没有反应。表明制备的 Mab 7D7E3 可与猪 OASL 蛋白特异性结合。间接免疫荧光（IFA）检测单抗对真核表达的猪 OASL 蛋白的反应性，使用单克隆抗体 7D7E3 作为一抗孵育转染质粒的 HEK293T 细胞后，细胞呈现特异性红色荧光（图 18）。表明 7D7E3 单克隆抗体可特异性识别原核表达的猪 OASL 蛋白和 HEK293T 细胞真核表达的猪 OASL 蛋白，具有良好的免疫原性。

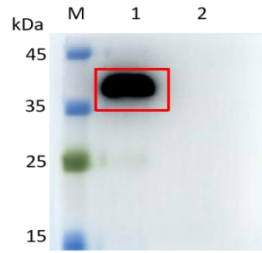


图 17 单克隆抗体的特异性鉴定

M: 蛋白质分子质量标准 1: 纯化的猪 OASL 蛋白 2: P30 蛋白

Figure 17 Identification of monoclonal antibody specificity

M: Protein Molecular Mass Standard 1: Purified porcine OASL protein 2: P30 protein

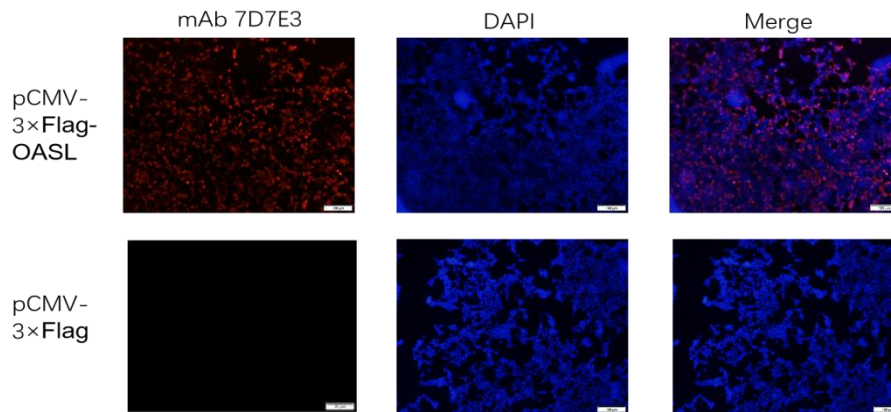


图 18 间接免疫荧光检测猪 OASL 蛋白在细胞中的表达

Fig. 18 Indirect immunofluorescence detection of porcine OASL protein expression in cells

4 讨论与结论

本章采用化学融合法制备猪 OASL 单克隆抗体，具有纯度高，灵敏度高，特异性强，交叉反应少，制备成本低等优点，可以检测猪在被不同病毒感染后猪 OASL 蛋白的表达情况，在人医上匹兹堡大学癌症研究所的研究人员通过研究发现，增强细胞中 OASL 蛋白的含量就可以增强机体的感知以及抑制病毒感染的能力，OASL 可以增强人类机体细胞检测病毒 RNA 的能力，从而激活机体免疫系统来感知病毒并且抑制病毒的复制^[75]。在猪上是否有同样的情况我们尚不可知，但是通过猪 OASL 检测猪被不同病毒感染后的表达量，是否可以推断出具有相同的情况，为治疗猪的病毒病提供新的方案，通过提升猪自身天然免疫力，增强其感知和抗病毒能力。

本章节使用纯化后的原核表达的猪 OASL 蛋白免疫 BALB/c 小鼠，经过细胞融合，及两次亚克隆筛选后获得一株特异性强、灵敏性高的杂交瘤细胞 7D7E3，经 ELISA 鉴定腹水效价高达 1 : 500 000，经单克隆亚型试剂盒检测 7D7E3 的重链为 IgG2b，轻链为 Lambda。用 Western Blot 和 IFA 对获得的单克隆抗体特异性进行鉴定，蛋白条带和免疫荧光均表明 7D7E3 具有良好的免疫原性和反应活性。

试验三 猪 OASL 抗病毒效果的初探

1 引言

PRRSV 是影响我国养猪业最重要的猪病原体之一，它的爆发会造成巨大的经济损失。由于 RNA 病毒的自然特征导致无法完全控制 PRRSV 感染，它们经历了快速进化，并呈现为遗传和抗原异质性群体^[118]。第一批抗 PRRS 病毒的疫苗于 20 世纪 90 年代开发并投放市场，尽管疫苗能够减轻临床症状、降低经济损失，但接种疫苗的猪仍会感染^[126]。该病毒遗传和抗原的多样性、对保护力相关知识的匮乏、对异源保护性不明所以、并且该病毒在猪密集区广泛传播，寻求其他的抗病毒疗法成为了关键，天然免疫是抵抗病毒的第一道防线，猪 OASL 蛋白是干扰素诱导的抗病毒蛋白，本试验将初步研究猪 OASL 表达在 PRRSV 易感的 Marc-145 细胞上，继而研究猪 OASL 对 PRRSV 复制的影响。为解决 PRRS 对养猪业的危害提供解决办法。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 载体、菌株及样品来源

大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞（1 mL）采购自北京擎科生物有限公司，PRRSV GD-HD 毒株、Marc-145 细胞为本实验室保存。

2.1.2 试剂耗材

TRIzol（100 mL）购自赛默飞世尔科技公司，PEI 转染试剂、qPCR SYBR Green Master Mix 酶（100 μ L）购自上海翌圣生物科技股份有限公司，高糖 DMEM 培养基（500 mL）、胰酶（100 mL）购自北京索莱宝科技有限公司，胎牛血清（50 mL）购自 Gibco 公司，HRP 标记的 G@M-IgG（100 μ L）、HRP 标记的 G@R-IgG（100 μ L）、GAPDH（100 μ L）购自艾比玛特医药科技上海有限公司，Kemix 反转录试剂盒购自郑州芯之翼生物科技有限公司，

2.1.3 主要试剂的配置

（1）10 $\times$ PBS：2.4 g KH₂PO₄，80 g NaCl，14.4 g Na₂HPO₄·12H₂O，2 g KCl，800 mL 的去离子水中充分溶解，调节 pH 至 7.2，定容至 1 L；使用时稀释至 1 $\times$ PBS。

（2）5%脱脂奶：称取 2.5 g 的脱脂奶粉，溶于 50 mL 的 1 $\times$ TBST buffer 中，4 $^{\circ}$ C 储存备用。

（3）10 $\times$ 电泳液：称取 144 g 的甘氨酸，30 g 的 Tris，10 g 的 SDS，溶于 800 mL 的去离子水中，待溶解完全后，定容至 1 L，室温储存。

（4）快速转膜液：称取 14.4 g 的甘氨酸，3.03 g 的 Tris，取 200 mL 的甲醇，800 mL 的去离子水，于 1L 的锥形瓶中溶解混匀，室温储存，使用前预冷。

（5）配置 PEI 储存液（1 mg/mL）：水或其他相当级别的生物用水中，在磁子搅拌器上搅

拌均匀。待 PEI 40000 完全溶解（通常不到 5 min）。用盐酸（12 mol/L）或氢氧化钠（1 mol/L）溶液调节 pH 为 6.80 - 6.90。将溶液转入量筒内，并加水定容到 1 L。用一次性 0.22 μm PES 真空过滤器过滤除菌，即得到 1 mg/mL 的储存液。根据需要分装并储存在 4 $^{\circ}\text{C}$ ，3 个月稳定。

2.2 方法

2.2.1 猪 OASL 基因引物的合成

根据猪 OASL 基因序列（GenBank 登录号：NM_001031790.1）使用 Primer 5.0 设计了上下游引物，此外 PRRSV N 蛋白荧光定量引物，和 GAPDH 内参荧光定量引物，如表 9 所示，上述引物均由北京擎科生物有限公司合成。

表 9 引物序列

Table 9 Primer sequences	
引物名称	引物序列（5'-3'）
OASL	F: CCAAGCTTATGGAAGTGTATACCCGCGCA
	R: CCGGAATTCTTAATCGCAGCCTTCGCGCTCACA
PRRSV N 蛋白	F: TCAGCTGTGCCAAATGCTGG
	R: AAATGGGGCTTCTCCGGGTTTT
GAPDH	F: ACTCACTCTACCTTTGATGCT
	R: TGTTGCTGTAGCCAAATTCA

2.2.2 pCMV-3 $\times$ Flag-10-OASL 载体的构建

2.2.2.1 猪 OASL 目的基因的扩增与回收

以 OASL-pET21a-DH5 α 菌为模板，利用合成的引物进行菌液 PCR。PCR 反应条件如表所示。反应完成后加入 DNA Loading Buffer，使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物，回收 1000bp 左右的目的片段。

表 10 PCR 扩增程序

Table 10 PCR Amplification Procedure		
温度	时间	循环
95 $^{\circ}\text{C}$	5 min	35
95 $^{\circ}\text{C}$	15 s	
65 $^{\circ}\text{C}$	15 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	5 min	

2.2.2.2 表达载体的双酶切以及酶切产物的回收

用 *Hind* III 和 *Kpn* I 对 pCMV-3 $\times$ Flag-10 载体进行双酶切，酶切体系如图所示。酶切完成后，加入 DNA Loading Buffer，使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物，回收 5000bp 左右的目的片段。

表 11 双酶切体系

Table 11 Double enzyme digestion system

试剂	用量 (μl)
<i>Hind</i> III	1
<i>Kpn</i> I	1
pCMV-3×FLAG-10	1
Cutsmart Buffer	3
ddH ₂ O	Up to 20

胶回收步骤按照回收试剂盒操作：

参考试验— 2.2.2.3。

2.2.2.3 目的片段和表达载体的连接及转化

(1) 连接

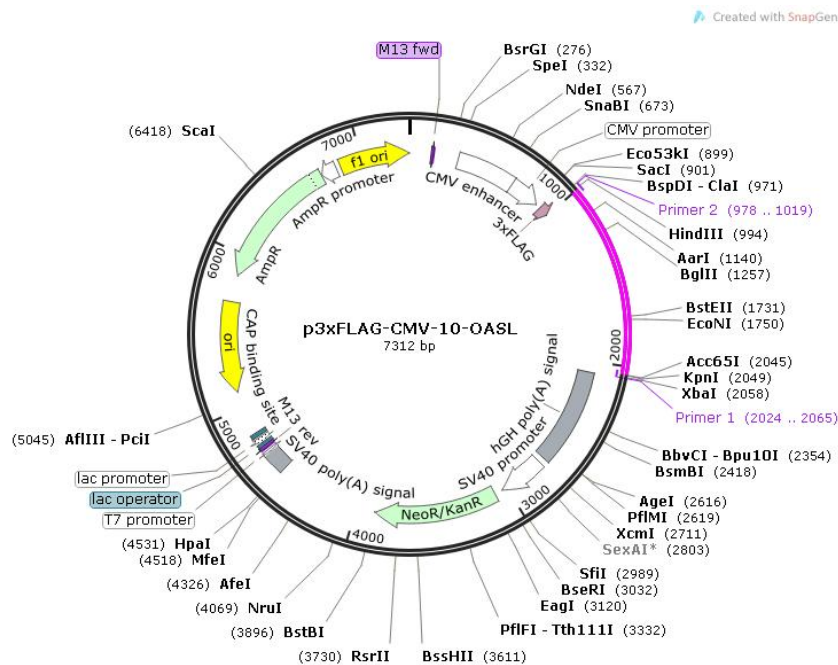


图 19 目的基因与载体连接图

Figure 19 Linkage diagram of target gene and vector

使用同源重组的方法对目的片段和表达载体进行连接，连接体系如下

最适克隆载体使用量 (0.02×克隆载体碱基对数) ng=6 310×0.02=126.2ng

最适插入片段使用量 (0.04×插入片段碱基对数) ng=1 047×0.04=41.88ng

混匀，37℃，30min，冰浴 5min。

表 12 同源重组连接体系

Table 12 Homologous recombination connection system

试剂	用量
线性化载体	8 μ L
插入片段	4 μ L
5 $\times$ CE II Buffer	2 μ L
Exrase II	1 μ L
ddH ₂ O	up to 20 μ L

在超净工作台中挑取单菌落于 3 mL 的含 Amp 的 LB 的摇菌管中，37℃，220 r/min 培养 12-16 h。用猪 OASL 的特定引物对菌液进行 PCR 鉴定，体系和程序同 2.2.2.1。对鉴定正确的菌液送去公司测序，测序结果比对正确的代表载体构建成功，可用于后续试验。

2.2.3 转染

- (1) 转染 Marc-145 细胞，铺板后细胞密度长至 8 到 9 成即可转染。
- (2) 转染时要用无血清 DMEM，分为转染组和对照组。
- (3) 转染组：A (DMEM 200 μ L，质粒 8ug) B (PEI 24ug，DMEM 200 μ L)
- (4) 对照组：A (DMEM 200 μ L，空载 8ug) B (PEI 24ug，DMEM 200 μ L)
- (5) A 与 B 各混合后静置 5min
- (6) A 和 B 混合在一起 30 分钟
- (7) 加入到 T25 细胞瓶中。
- (8) 48 小时后收样。

2.2.4 Western Blot 鉴定猪 OASL 过表达

试验步骤同试验二 2.2.1

2.2.5 TCID₅₀ 的测定

(1) 准备细胞

将培养状态良好的 Marc-145 细胞用胰酶消化，并进行计数，根据计数结果用含有 10%FBS 的高糖 DMEM 培养基稀释到 1×10^5 /mL，控制总量为 10 mL 左右，然后用排枪将细胞悬液加入到 96 孔板中，每孔 150 μ L，每孔的细胞数大约为 1 500 个，于 5% CO₂，37℃培养 24h，使细胞长成单层。

(2) 稀释待测病毒液

取 10 个高压灭菌的 1.5 mL EP 管，按 1~10 进行编号，并依次摆放在 EP 管架上，依次向每个管中加入 900 μ L 无血清 DMEM 培养基，然后将接毒的待测样品加入到 1 号管内 100 μ L，用涡旋仪震荡混匀后，吸出 100 μ L 加入到 2 号管中，充分混匀，如此重复依次将待测样品倍比稀释到第 10 管，切记每次都须涡旋振荡充分混匀。

(3) 细胞洗涤

将已经长成单层状态良好的 Marc-145 细胞取出，在超净台中迅速翻转 96 孔板，将培养基倒置废液缸中，然后往 96 孔板加入高压过的 PBS 缓冲液，每孔 150 μL ，轻轻摇动细胞板，垂直反转弃去 PBS，如此重复两次洗涤细胞。

(4) 病毒接种

将稀释好的病毒液按稀释度高低依次从左往右加入到 96 孔板中，每列稀释度一样，100 μL /孔，加样结束，将 96 孔板置于 5% CO_2 ，37 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 1 h。吸附结束，将 96 孔板从培养箱中取出，在超净台中迅速翻转 96 孔板，将培养基倒置废液缸中，弃去病毒液，加入含有 3%FBS 的 DMEM 培养基，175 μL /孔，盖好盖子，标记接毒时间，于 5% CO_2 ，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱。

(5) 观测记录

培养 5~7 天，每天在倒置显微镜下进行观察细胞病变（Marc-145 病变细胞空泡化、圆缩、先灶状脱落，再大片脱落，最后整个细胞裂解、破碎）。

(6) 计算方法

Reed-Muench 法：观察 CPE，找出能引起半数细胞瓶或管感染的病毒稀释倍数，按计算出该病毒液的 TCID_{50} 。

2.2.6 RT-PCR 检测 PRRS 病毒的拷贝数

2.2.6.1 Trizol 法提取病毒总 RNA

(1) 接毒 48 小时之后，用 DEPC 水处理过的 2 mL 离心管，收病变细胞，4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，1 000 r/min，10 min 离心，弃上清。

(2) 200 μL Trizol 重悬细胞，静置五分钟。

(3) 加 50 μL 氯仿，涡旋混匀，4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，12 000 r/min，5 min 离心。

(4) 充分吸取上清到 EP 管中。

(5) 加等体积的异丙醇，上下颠倒混匀，静置 5 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，14 000 r/min，10 min 离心。

(6) 弃上清，每管 500 μL 酒精，4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，14 000 r/min，5 min 离心。

(7) 充分吸取酒精，超净台吹干。

(8) 60 μL DEPC 水洗脱测浓度。

2.2.6.2 cDNA

Kemix 反转录试剂盒

模板 RNA 1 μg ，dsDNase 1 μL ，KElris5X RT All-in-One Mix 4 μL ，RNase-free water 补至 20 μL 。

37 $^{\circ}\text{C}$ 2 min，去除基因组 DNA 污染；55 $^{\circ}\text{C}$ ，15 min；85 $^{\circ}\text{C}$ ，5 min；终止反应。

qPCR SYBR Green I 保存或使用避免避免强光直射。

2.2.6.3 RT-PCR

模板 cDNA 5 μL ，qPCR SYBR Green Master MIX 10 μL ，引物上下游引物各 0.4 μL ，无菌超纯水 4.2 μL 。体系 20 μL 。

cDNA：稀释 5 倍。体系配置在超净台内。内参引物 GAPDH 和 ORF7 引物一样加样。

2.2.6.4 数据统计学分析

本研究使用 SPASS 软件对所有试验数据进行非配对双尾 t 检验或方差分析。其中，*， $P < 0.05$ ；**， $P < 0.01$ 。

3 结果

3.1 猪 OASL 基因真核表达载体的构建

为了构建 pCMV-3 $\times$ Flag-OASL 真核表达载体，使用同源重组方法进行连接，将重组质粒转化到 DH5 α 感受态细胞中，挑取单菌落进行 PCR 鉴定，经核酸凝胶电泳分析，得到 1000 bp 左右的目的条带，随后抽取阳性菌液送至上海生物工程有限公司进行测序。将测序结果与合成的基因序列比对，两个序列相似性为 100%，证明成功构建了重组质粒（图 20）。

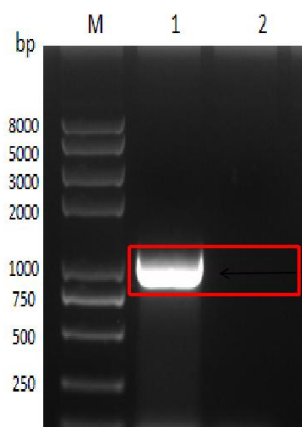


图 20 猪 OASL 基因 PCR 扩增结果

M: Trans2K Plus II DNA marker 1: 挑菌 PCR 鉴定 2: 阴性对照

Figure 20 PCR amplification results of porcine OASL gene

M: Trans2K Plus II DNA marker 1: PCR identification of pick bacteria 2: negative control

3.2 转染结果

为了确认猪 OASL 能够进行真核表达，本研究将猪 OASL 真核质粒转染之后的细胞进行 Western blot 鉴定，一抗为 7D7E3 单克隆抗体，二抗为 HRP 标记的羊抗鼠二抗，在 35 kDa~45 kDa 区间内得到目的条带，与预计结果一致。说明质粒在 Marc-145 细胞中得到了有效的表达。（图 21）

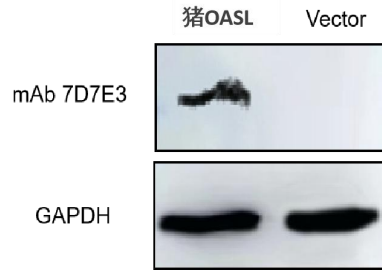


图 21 猪 OASL 基因在 Marc-145 细胞中表达

M: 蛋白质分子质量标准 1: 猪 OASL 2: 空载体对照

Figure 21 The porcine OASL gene is expressed in Marc-145 cells

M: Protein Molecular Mass Standard 1: porcine OASL 2: Control

3.3 RT-PCR 结果与病毒滴度

为了确认猪 OASL 蛋白对 PRRSV 在 Marc-145 细胞上的复制有无抑制作用, 本研究对转染猪 OASL 的 Marc-145 细胞进行 MOI=0.1 的 PRRSV GD-HD 毒株接种, 感染后 48h, 然后通过 qRT-PCR 检测病毒基因组拷贝数以及 PRRSV 滴度两个方面来研究过表达猪 OASL 对 PRRSV 复制的影响, 试验结果表明, 与对照组相比, 过表达猪 OASL 降低了病毒基因组拷贝数 (图 22 左)、PRRSV 病毒滴度 (图 22 右), 总的来说, 试验结果证实过表达猪 OASL 显著降低了 PRRSV 的滴度以及病毒基因组的拷贝数。

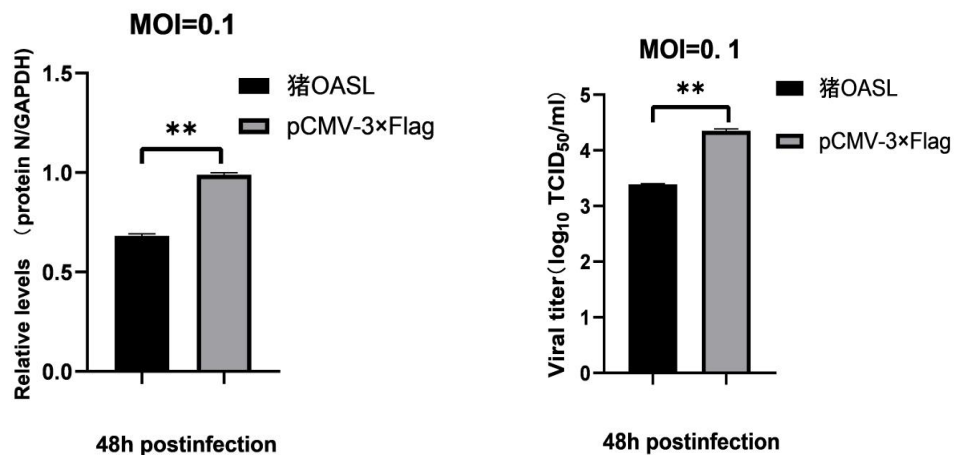


图 22 过表达猪 OASL 抑制 PRRSV 的复制

左图: PRRSV 感染 48h 后, RT-PCR 检测 PRRSV 的基因拷贝数; 右图: 感染 48 小时后, 检测 PRRSV 的病毒滴度

Figure 22 Overexpression of porcine OASL inhibits PRRSV replication

Left: After PRRSV infection 48 h, RT-PCR detects the gene copy number of PRRSV; Right: Viral titers of PRRSV are detected 48 hours after infection

4 讨论与结论

本试验验证了猪 OASL 蛋白对 PRRSV 在 Marc-145 细胞上的复制有抑制作用，通过构建真核表达载体，优化转染条件使其在 Marc-145 细胞中成功表达，但因为没有构建稳定表达的细胞系，瞬时转染的表达量比较低，在接种 PRRSV 后，通 RT-PCR 测定病毒拷贝数和对 PRRSV 滴度的测定，均表明猪 OASL 对 PRRSV 有抑制作用，为猪抗 PRRSV 提供了新的解决思路，猪 OASL 可能为潜在的抗 PRRSV 的 ISG。本试验节成功构建了 pCMV-3×Flag-OASL 真核表达载体，鉴定了其能在 marc-145 细胞中能够过表达，接种 PRRSV GD-HD 毒株 48h 之后，通过检测 PRRSV 拷贝数的变化以及 PRRSV 病毒的滴度两个方面证实过表达猪 OASL 对 PRRSV 在 Marc-145 细胞上的复制有抑制作用。

全文总结

1. 成功构建了原核表达质粒 pET-21a-OASL 并对其诱导表达，获得了猪 OASL 蛋白，使用镍柱进行蛋白纯化。

2. 使用纯化后的猪 OASL 蛋白免疫 BABL/c 小鼠，经过细胞融合，及三次亚克隆筛选后获得一株特异性强、灵敏性高的杂交瘤细胞 7D7E3，采用 Western Blot 和 IFA 对获得的单克隆抗体特异性进行鉴定，7D7E3 具有良好的免疫原性和反应原性。

3. 成功构建了 pCMV-3×Flag-OASL 真核表达载体，检测到了猪 OASL 基因在 Marc-145 细胞中过表达，同时过表达猪 OASL 的细胞接毒 48h 后通过检测 PRRSV 拷贝数的变化以及 PRRSV 病毒的滴度两个方面证实过表达猪 OASL 对 PRRSV 在 Marc-145 细胞上的复制有抑制作用。

参考文献

- [1] 王晓丽, 王永明, 朱万光, 李士成. 干扰素研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(12):60-63.
- [2] 黄秋香, 张现臣. 流感病毒及其疫苗研究进展[C]. 第五次全国免疫诊断暨疫苗学术研讨会论文汇编. 2011.
- [3] Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon[J]. Journal of Interferon Research, 1987, 7(5):429-438.
- [4] Lee, C. H. Regulation of the germinal center gene program by interferon (IFN) regulatory factor 8/IFN consensus sequence-binding protein[J]. Journal of Experimental Medicine, 2006, 203(1):63-72..
- [5] Terheyden P, Kampgen E, Becker J C. CD40-ligated dendritic cells effectively expand melanoma-specific CD8⁺ ctls and CD4⁺ ifn-gamma-producing T cells from tumor-infiltrating lymphocytes1[J]. 2022, 164(12):6633-6639.
- [6] Torres B A, Johnson H M. Arginine vasopressin (AVP) replacement of helper cell requirement in IFN-gamma production. Evidence for a novel AVP receptor on mouse lymphocytes. [J]. Journal of Immunology, 1988, 140(7):2179-83.
- [7] Murgatroyd C A, Alexandria H N, Alexandria F, et al. Effects of chronic social stress and maternal intranasal oxytocin and vasopressin on offspring interferon- γ and behavior[J]. Frontiers in Endocrinology, 2016, 7:155.
- [8] 王寅彪, 冯继伟, 宋杰,等. 2'-5'寡聚腺苷酸合成酶的抗病毒作用及机制研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2021, 38(5):3.
- [9] 赵小侠. 2'-5'三聚腺嘌呤核苷酸生物学活性的研究[J]. 中国医学科学院学报, 1982(006):000.
- [10] 徐飞. 腺嘌呤核苷酸活化蛋白激酶与哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号转导通路的相互作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(20):3.
- [11] Shnyreva M, Weaver W M, Blanchette M, et al. Evolutionarily conserved sequence elements that positively regulate IFN- γ expression in T cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 2004年101卷34期(34):12622-7页.
- [12] Shankaran, Vijay, Ikeda, et al. IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour Immunogenicity[J]. The Journal of Immunology: Official Journal of the American Association of Immunologists, 2018, 201(3):827-831.
- [13] Gao Y, Yang J, Cai Y, et al. IFN - γ - mediated inhibition of lung cancer correlates with PD - L1 expression and is regulated by PI3K - AKT signaling[J]. International Journal of

- Cancer, 2018, 143(4).
- [14] Mattei F, Schiavoni G, Belardelli F, et al. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation[J]. Journal of immunology, 2001年167卷3期(3):1179-87页.
- [15] Kononova, T.E.Urazova, O.I.Novitskii, et al. Subpopulation structure of IFN gamma-producing T lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis[J]. Bulletin of experimental biology and medicine, 2018, 165(3).
- [16] 孙弘宇, 栾元金, 宋丹丹, 等. 兔干扰素研究进展[J]. 中国草食动物科学, 2022(001):042.
- [17] Califano, D, Furuya, et al. IFN-gamma increases susceptibility to influenza A infection through suppression of group II innate lymphoid cells[J]. Mucosal Immunology, 2018, 11(1):209-219.
- [18] ACD Brachène, RSD Santos, L Marroqui, et al. IFN- α induces a preferential long-lasting expression of MHC class I in human pancreatic beta cells[J]. Diabetologia: Clinical and Experimental Diabetes and Metabolism Organ of the European Association for the Study of Diabetes (EASD), 2018, 82(7):2329-2336.
- [19] Cruz-Rivera P, Kanchwala M, Liang H, et al. The IFN Response in Bats Displays Distinctive IFN-Stimulated Gene Expression Kinetics with Atypical RNASEL Induction[J]. The Journal of Immunology, 2018 Jan 1;200(1):209-217.
- [20] Jiawen, Qian, Chen, et al. The IFN- γ /PD-L1 axis between T cells and tumor microenvironment: hints for glioma anti-PD-1/PD-L1 therapy. [J]. Journal of Neuroinflammation, 2018, 5(9):767-777.
- [21] 练韵文, 郑杏容, 吴和维, 等. 干扰素刺激基因抗HBV感染的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(1):7.
- [22] Günther Claudia. Rapid response of cutaneous lupus erythematosus to treatment with the type I interferon receptor antagonist anifrolumab[J]. British Journal of Dermatology, 2023.
- [23] Jaya Bhushan, Joshua B. Radke, et al. ISG15 Connects Autophagy and IFN- γ -Dependent Control of Toxoplasma gondii Infection in Human Cells[J]. MBio, 2020, 11(5).
- [24] Thomas, Saito. Special Issue IFN-Independent ISG Expression and its Role in Antiviral Cell-Intrinsic Innate Immunity[J]. Viruses, 2019, 11(11):981.
- [25] Swaim C D, Canadeo L A, Monte K J, et al. Modulation of extracellular ISG15 signaling by pathogens and viral effector proteins[J]. Cell Reports, 2020, 31(11):107772.
- [26] Koike A, Tsujinaka K, Fujimori K. Statins attenuate antiviral IFN and ISG expression via inhibition of IRF3 and JAK/STAT signaling in poly(I:C) - treated hyperlipidemic mice and macrophages[J]. FEBS Journal, 2021, 288(14).

- [27] Gao A H, Hu Y R, Zhu W P. IFN-gamma inhibits ovarian cancer progression via SOCS1/JAK/STAT signaling pathway[J]. Clinical & translational oncology, 2022(1):24.
- [28] Liu, JiananYang, LiLiu, et al. CNOT2 facilitates dengue virus infection via negatively modulating IFN-Independent Non-Canonical JAK/STAT pathway[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 515(3).
- [29] Tomoya K, Atsushi K, Toko M, et al. Bicarbonate enhances the inflammatory response by activating JAK/STAT signaling in LPS+IFN- γ -stimulated macrophages[J]. Journal of Biochemistry, 2020(6):6.
- [30] Zhan R Z, Rao L, Chen Z, et al. Loss of sarcomeric proteins via upregulation of JAK/STAT signaling underlies interferon- γ -induced contractile deficit in engineered human myocardium[J]. Acta Biomaterialia, 2021, 126(2).
- [31] Delen E, Doanlar O, Delen Z, et al. The role of JAK-STAT signaling activation in hypertrophied ligamentum flavum[J]. World Neurosurgery, 2020, 137.
- [32] Kitagawa Y, Yamaguchi M, Kohno M, et al. Respirivirus C protein inhibits activation of type I interferon receptor - associated kinases to block JAK - STAT signaling[J]. FEBS Letters, 2020, 594.
- [33] 施开创, 尹彦文, 陆文俊, 等. 猪流行性腹泻病毒nsP1蛋白对IFN- β 激活的JAK/STAT信号通路的影响[J]. 中国兽医科学, 2021, 33(8):10.
- [34] Mariani M K, Dasmeh P, Fortin A, et al. The combination of IFN β and TNF induces an antiviral and immunoregulatory program via non-canonical pathways involving STAT2 and IRF9[J]. Cells, 2019, 8(8).
- [35] Kim D Y, Lim S G, Suk K, et al. Mitochondrial dysfunction regulates the JAK/STAT pathway by LKB1-mediated AMPK activation in an ER stress-independent manner[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2019, 98(8).
- [36] Zhu H, Tian R, Xie Q, et al. TRIM28 Promotes HBV Replication by Inhibition of the Activation of JAK/STAT Signaling Pathway by IFN- α [J]. Hunan Daxue Xuebao/Journal of Hunan University Natural Sciences, 2018, 45(12):124-130.
- [37] Ibrahim H, Askar B, Barrow P, et al. Dysregulation of JAK/STAT genes by vasoactive intestinal peptide (VIP) in Salmonella-infected monocytes may inhibit its therapeutic potential in human sepsis - ScienceDirect[J]. Cytokine, 2018, 105:49-56.
- [38] Hartmann L, Siegmund B, Weidinger C, et al. DOP86 An IFN-STAT1-MLKL axis drives programmed necrosis of Paneth cells in Crohn's ileitis[J]. Journal of Crohns & Colitis, 2020(Supplement-1):Supplement-1.
- [39] Macquillan G C, Mamotte C, Reed W D, et al. Upregulation of endogenous intrahepatic

- interferon stimulated genes during chronic hepatitis C virus infection. [J]. *Journal of Medical Virology*, 2010, 70(2):219-227.
- [40] Xu X Q, Liu Y, Zhang B, et al. IL-22 suppresses HSV-2 replication in human cervical epithelial cells[J]. *Cytokine*, 2019, 123:154776.
- [41] Ke H, Han M, Kim J, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp1-beta protein interacts with nucleoporin 62 (Nup62) to promote viral replication and immune evasion[J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(14).
- [42] Marcellini A, Swieboda D, A Guedán, et al. Glucocorticoids impair type I IFN signalling and enhance rhinovirus replication[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2020:173839.
- [43] Zhou X, Tian L, Wang J, et al. EV713C protease cleaves host anti-viral factor OAS3 and enhances virus replication[J]. *中国病毒学:英文版*, 2022, 37(3):9.
- [44] 刘文文, 吕林, 朱慧欣, 等. HEK-293T细胞敲除TRIM25基因促进脑心肌炎病毒复制的研究[J]. *畜牧与兽医*, 2022(006):054.
- [45] Tan G, Xiao Q, Song H, et al. Type I IFN augments IL-27-dependent TRIM25 expression to inhibit HBV replication[J]. *中国免疫学杂志:英文版*, 2018(3).
- [46] Cao Y, Rui Z, Wei Z, et al. IL-27, a cytokine, and IFN- λ 1, a type III IFN, are coordinated to regulate virus replication through type I IFN.[J]. *Journal of Immunology*, 2014, 192(2):691-703.
- [47] Hoffpauir C T, Bell S L, West K O, et al. TRIM14 Is a Key Regulator of the Type I IFN Response during Mycobacterium tuberculosis Infection[J]. *The Journal of Immunology*, 2020, 205(1):1901511.
- [48] Wu S F, Xia L, Shi X D, et al. RIG-I regulates myeloid differentiation by promoting TRIM25-mediated ISGylation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, 117(25):201918596.
- [49] Yu Y, Huang X, Liu J, et al. Fish TRIM32 functions as a critical antiviral molecule against iridovirus and nodavirus[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 60:33-43.
- [50] Sanyal S. Type I interferon imposes a TSG101/ISG15 checkpoint at the golgi for glycoprotein trafficking during influenza virus infection[J]. *Cell Host & Microbe*, 2013, 14(5):510-521.
- [51] A Napolitano, AG der Veen van, M Bunyan. Cysteine-Reactive free ISG15 generates IL-1 β -producing CD8 α^+ dendritic cells at the site of infection[J]. *Journal of Immunology Author Choice*, 2018, 201(2):604-614.
- [52] Ghosh A, Shao L, Sampath P, et al. Oligoadenylate-synthetase-family protein OASL inhibits activity of the DNA sensor cGAS during DNA virus infection to limit interferon production -

- sciencedirect[J]. Immunity, 2019, 7(7):196.
- [53] 刘涛, 周磊, 肖晶晶, 等. 泛素/ISG15结合酶E2L6在胰腺癌中的作用及其临床价值分析[J]. 中国普通外科杂志, 2022, 31(3):10.
- [54] Signe E, Just J, Heide S M, et al. Characterization of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase ubiquitin-like family.[J]. Nucleic Acids Research(12):3166.
- [55] Zhao C, Zheng S, Zhu D, et al. Identification of a novel porcine OASL variant exhibiting antiviral activity[J]. Virus Research, 2018, 244:199-207.
- [56] Jesper, B, Andersen, et al. Interaction between the 2'-5' oligoadenylate synthetase-like protein p59 OASL and the transcriptional repressor methyl CpG-binding protein 1[J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 271(3):628-636.
- [57] Signe E, Just J, Heide S M, et al. Characterization of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase ubiquitin-like family. [J]. Nucleic Acids Research(12):3166.
- [58] Eskildsen S, Hartmann R, Kjeldgaard N O, et al. Gene structure of the murine 2'-5'-oligoadenylate synthetase family[J]. Cellular and molecular life sciences: CMLS, 2002(7):59.
- [59] Vasou A, Nightingale K, Cetkovska V, et al. A co-opted ISG15-USP18 binding mechanism normally reserved for deISGylation. controls type I IFN signalling. [J]. Cold Spring Harbor Laboratory, 2021, 11(4):617-628.
- [60] Holthaus D, Vasou A, Bamford C, et al. Direct antiviral activity of interferon stimulated genes is responsible for resistance to paramyxoviruses in ISG15-deficient cells[J]. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2020, 205(1):261-271.
- [61] Hu J, Xu X, Wang S, et al. Ctenopharyngodon idellus DDX41 initiates IFN I and ISG15 expression in response to GCRV infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 106.
- [62] Ashley C L, Abendroth A, Mcsharry B P, et al. Interferon-Independent Innate Responses to Cytomegalovirus[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10:2751.
- [63] El-Asmi F, Mcmanus F P, Brantis-De-Carvalho C E, et al. Cross-talk between SUMOylation and ISG-ylation in response to interferon[J]. Cytokine, 2020, 129:155025.
- [64] G Martina, BH Rauch, N Shinichi, et al. Immune system-mediated atherosclerosis caused by deficiency of long noncoding RNA MALAT1 in ApoE mice[J]. Cardiovascular Research, 2018(2):2.
- [65] Tsuji, RyoheiYamamoto, NorioYamada, et al. Induction of anti-viral genes mediated by humoral factors upon stimulation with Lactococcus lactis strain plasma results in repression of dengue virus replication in vitro[J]. Antiviral Research, 2018, 160.
- [66] Zheng B, Zhou X, Tian L, et al. IFN- β 1b induces OAS3 to inhibit EV71 via IFN- β 1b/JAK/STAT1 pathway[J]. 中国病毒学:英文版, 2022, 37(5):9.

- [67] Amlot P L, Kemeny D M, Zachary C, et al. Oral allergy syndrome (OAS): symptoms of IgE - mediated hypersensitivity to foods[J]. Clin Allergy, 2010, 17(1):33-42.
- [68] Ling Z, Jha B, Wu A, et al. Antagonism of the Interferon-Induced OAS-RNase L Pathway by Murine Coronavirus ns2 Protein Is Required for Virus Replication and Liver Pathology[J]. Cell host & microbe, 2012, 11(6):607-616.
- [69] 陈伟卓, 高向东, 徐晨, 等. 2'-5'寡聚腺苷酸合成酶(OAS)及其临床意义的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2013(36):6.
- [70] 杨超, 陈舜, 汪铭书, 等. OAS蛋白结构与抗病毒机制关系的研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(8):4.
- [71] 王宪庆. 2'-5'寡聚腺苷酸合成酶(OAS)的活化及抗病毒作用研究进展[J]. 中国医药导报, 2009, 006(008):122-123.
- [72] Rong E, Wang X, Chen H, et al. Molecular mechanisms for the adaptive switching between the OAS/RNase L and OASL/RIG-I pathways in birds and mammals[J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9:1398-.
- [73] Barkauskas A E. A generalization of menage and lommel polynomials. [J]. Journal of Molecular Biology, 2003, 326(5):1449-1461.
- [74] Ke-Ran B I, Han K K, Yin L I, et al. Cloning and bioinformatics analysis of cherry valley duck oligoadenylate synthase-like gene(OASL)[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2017:43-51.
- [75] IM Söes, Henrik G H, Lykke A L, et al. Structural and functional analysis reveals that human OASL binds dsRNA to enhance RIG-I signaling[J]. Nucleic Acids Research, 2015(10):5236-48.
- [76] Wiens M, Kuusksalu A, Kelve M, et al. Origin of the interferon-inducible (2'-5')oligoadenylate synthetases: Cloning of the (2'-5')oligoadenylate synthetase from the marine sponge Geodia cydonium[J]. Febs Letters, 1999, 462(1-2):12.
- [77] 彭欢, 陈达香, 陈瑜, 等. 寡腺苷酸合成酶家族蛋白调控抗病毒天然免疫应答的研究进展[J]. 病毒学报, 2018, 34(1):8.
- [78] Hornung, Veit, Hartmann, et al. OAS proteins and cGAS: unifying concepts in sensing and responding to cytosolic nucleic acids[J]. Nature Reviews Immunology, 2014, 14(8):521-8.
- [79] Lohfener J, Steinke N, Kay-Fedorov P, et al. The Activation Mechanism of 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase Gives New Insights Into OAS/cGAS Triggers of Innate Immunity[J]. Structure, 2015, 23(5):851-862.
- [80] Banerjee S, Gusho E, Gaughan C, et al. OAS-RNase L innate immune pathway mediates the cytotoxicity of a DNA-demethylating drug[J]. Proceedings of the National Academy of

- Sciences, 2019, 18(5):619-630.
- [81] Gushe E, Jha B K, Rong Z, et al. 108 : Preventing activation of the IFN inducible OAS-RNaseL pathway by A-kinase anchoring protein 7 (AKAP7)[J]. Cytokine, 2013, 63(3):268-268.
- [82] Xu Z, Gong L, Peng P, et al. Porcine enteric alphacoronavirus Inhibits IFN- α , IFN- β , OAS, Mx1, and PKR mRNA Expression in Infected Peyer's Patches in vivo[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2020, 7:449.
- [83] Rong E, Wang X, Chen H, et al. Molecular mechanisms for the adaptive switching between the OAS/RNase L and OASL/RIG-I pathways in birds and mammals[J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9:1398.
- [84] Chai Y, Huang H L, Hu D J, et al. IL-29 and IFN- α regulate the expression of mxa, 2', 5'-OAS and PKR genes in association with the activation of Raf-MEK-ERK and PI3K-AKT signal pathways in HepG2. 2. 15 cells[J]. Molecular biology reports, 2011(1):38.
- [85] Dhar J, Cuevas R A, Goswami R, et al. 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase-Like Protein Inhibits Respiratory Syncytial Virus Replication and Is Targeted by the Viral Nonstructural Protein 1[J]. Journal of Virology, 2015:10115-9.
- [86] Zhu J, Zhang Y, Ghosh A, et al. Antiviral activity of human OASL protein is mediated by enhancing signaling of the RIG-I RNA sensor[J]. Immunity, 2014, 40(6).
- [87] Ghosh A, Shao L, Sampath P, et al. Oligoadenylate-synthetase-family protein OASL inhibits activity of the DNA sensor cGAS during DNA virus infection to limit interferon production - sciencedirect[J]. Immunity, 2019, 7(7):196.
- [88] Elkhateeb E. The Role of mouse 2-5 oligoadenylate synthetase -1 family[J]. Journal of Virology, 2015, 62(9):3175.
- [89] Kang J S, Hwang Y S, Kim L K, et al. OASL1 traps viral RNAs in stress granules to promote antiviral responses[J]. Molecules & Cells, 2018, 41(3):214-223.
- [90] Lee M S, Kim B, Oh G T, et al. OASL1 inhibits translation of the type I interferon-regulating transcription factor IRF7. [J]. Nature Immunology, 2013, 14(8):346-355.
- [91] Lee M S, Park C H, Jeong Y H, et al. Negative regulation of type I IFN expression by OASL1 permits chronic viral infection and CD8⁺ T-cell exhaustion[J]. PLOS Pathogens, 9, 7(2013-7-18), 2013, 9(7):e1003478-e1003478.
- [92] Koul A, Deo S, Booy E P, et al. Substrate specificity of 2'-5'-Oligoadenylate Synthetases (OAS) family members for viral RNA. 2016, 98(2).
- [93] Etienne S L, Lin R J, Mint K S, et al. High Anti-Dengue Virus Activity of the OAS Gene Family Is Associated With Increased Severity of Dengue.[J]. Journal of Infectious Diseases,

- 2015(12):2011-20.
- [94] Fagone P, Nunnari G, Lazzara F, et al. Induction of OAS gene family in HIV monocyte infected patients with high and low viral load[J]. *Antiviral Research*, 2016, 131:66-73.
 - [95] 朱丹. 猪源OAS抗日本脑炎病毒感染的活性研究[D]. 南京农业大学, 2014.
 - [96] 郑胜. 猪源OAS蛋白抗JEV的特性研究[D]. 南京农业大学, 2016.
 - [97] Mutso M, Liu X, Merits A, et al. Analysis of Functional Virus-generated PAMP RNAs Using IFN α / β ELISA Assay[J]. *Bio-Protocol*, 2019, 9:3282.
 - [98] 徐继超. 治疗猪病毒性疾病中干扰素的应用分析[J]. *今日畜牧兽医*, 2018, 34(3):1.
 - [99] O'Neill L, Bowie A G. The Powerstroke and Camshaft of the RIG-I Antiviral RNA Detection Machine[J]. *Elsevier*, 2011(2).
 - [100] Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by RIG-I[J]. *Cell Host & Microbe*, 2013, 5(5):439-449.
 - [101] Zeng W, Sun L, Jiang X, et al. Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity[J]. *Cell*, 2010, 141(2):315-330.
 - [102] Wang X X, Chang L U, Rong E G, et al. Identification of novel genes associated with duck OASL in response to influenza A virus[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2019, 18(7):1451-1459.
 - [103] IM Søes, Henrik G H, Lykke A L, et al. Structural and functional analysis reveals that human OASL binds dsRNA to enhance RIG-I signaling[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015(10):5236-48.
 - [104] Zhu J, Zhang Y, Ghosh A, et al. Antiviral activity of human OASL protein is mediated by enhancing signaling of the RIG-I RNA sensor[J]. *Immunity*, 2014, 40(6).
 - [105] Chiu Y H, Macmillan J B, Chen Z [J]. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. [J]. *Cell*, 2009, 138(3):576-591.
 - [106] Xiao-Xue W, Chang L U, En-Guang R, et al. Identification of novel genes associated with duck OASL in response to influenza A virus[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2019,50(3)
 - [107] Ichikawa K, Motoe Y, Ezaki R, et al. Knock-in of the duck retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) into theMxgene in DF-1cells enables both stable and immune response-dependent RIG-I expression. [J]. *Biochemistry and biophysics reports*, 2021, 27:101084.
 - [108] 荣恩光. 鸟类和哺乳类OASL基因抑制A型流感病毒增殖的分子机制研究[D]. 中国农业大学, 2018.
 - [109] IM Søes, Henrik G H, Lykke A L, et al. Structural and functional analysis reveals that human OASL binds dsRNA to enhance RIG-I signaling[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015(10):5236-48.

- [110] Gl A, Aa B, Vc A, et al. 2'-5'-Oligoadenylate synthetase-like protein inhibits intracellular *M. tuberculosis* replication and promotes proinflammatory cytokine secretion[J]. *Molecular Immunology*, 2020, 118:73-78.
- [111] 桑传兰, 丁伯良, 多海刚, 等. 猪繁殖呼吸综合征病毒感染的仔猪体内病毒抗原分布研究[C], 中南地区实验动物科技交流会. 中国实验动物学会, 2004.
- [112] 樊振华, 孟帆, 吴忻, 等. 山西种猪场CSFV, PRRSV, PRV, PCV2免疫与感染情况调研[J]. *中国兽医杂志*, 2021, 57(8):70-73, 77.
- [113] 冯娜. HP-PRRSV感染猪后补体系统应答研究[D]. 华中农业大学, 2016.
- [114] 石远菊. 猪呼吸道类和繁殖障碍类病毒性疫病多重PCR方法的建立及应用[D]. 贵州大学, 2019.
- [115] 张艳, 史同瑞, 刘雪松, 等. 浅谈PCV2, PRRSV和肺炎支原体间的相互作用[J]. *江西畜牧兽医杂志*, 2022(001):000.
- [116] E, L, Thacker, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia.[J]. *Journal of clinical microbiology*, 1999, 60(5)
- [117] Liao X, Fan X, Qu F. Research progress of porcine reproductive and respiratory syndrome[J]. *Insight Veterinary Medicine*, 2018, 1(1):5.
- [118] 李公美. 猪繁殖与呼吸综合征病毒致病机制及防治研究进展[J]. *中国兽药杂志*, 2008, 42(10):40-44.
- [119] 黄园媛, 李能章, 彭远义. 猪繁殖与呼吸综合征病毒的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(11):3.
- [120] 陈泽芳, 赵爱莉. 猪蓝耳病的研究进展[J]. *畜禽业*, 2017(3):4.
- [121] 樊宏超, 姚睿智, 邓清华, 等. miRNA调控PRRSV增殖的研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(1):4.
- [122] 李公美, 钱爱东, 高云航, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒基因组结构及检测技术研究进展[J]. *中国兽药杂志*, 2008, 42(9):40-45.
- [123] 邹永基. 猪病防治存在问题 and 对策[J]. *农牧与食品机械*, 2019, 000(008):P23-24.
- [124] 原志伟, 朱国强. 大肠杆菌同源重组工程研究进展[J]. *中国家禽*, 2007, 15(No.306):41-46.
- [125] 罗明典. 干扰素(IFN)研究在我国的发展[J]. *生物工程进展*, 1990(02):65-67.
- [126] Mariela Scotti, Cinta Prieto, Martínez-Lobo, et al. Efficacy of two commercial PRRSV european modified live vaccines in pregnant sows [J]. *Animal husbandry abroad (pigs and poultry)*, 2007(02):36-40.

EXPRESSION OF PORCINE OASL PROTEIN AND PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODY AND PRELIMINARY STUDY ON ANTI-PRRSV EFFECT

Supervisor: A.P. Wu Yanan

Master Candidate: Qin Xiaodong

Abstract

Interferon (IFN) plays a key role in the body's antiviral process, OAS is an antiviral protein induced by interferon when the body is infected by the virus, porcine OAS protein family has OAS1, OAS2, OASL three members, OASL as a potential interferon-stimulated gene (ISG), in order to facilitate subsequent research on natural immunity, In this experiment, porcine OASL prokaryotic expression and eukaryotic expression vectors were constructed, porcine OASL protein was expressed and purified, monoclonal antibodies were prepared, and the inhibitory effect of porcine OASL on PRRSV on Marc-145 cells was verified, as follows:

1. Prokaryotic expression and purification of porcine OASL protein

The experiment was conducted by inserting the synthetic porcine OASL gene sequence into the pET-21a expression vector to construct the pET-21a-OASL recombinant plasmid. The optimal induction conditions were determined to be 37°C, 220 r/min, 8 h. The final concentration of isopropyl- β -d-galactoside (IPTG) was 0.5 mmol/L, and was identified as inclusion body by SDS-PAGE. Porcine OASL protein was purified by affinity chromatography (Ni column) after dissolution and renaturation.

2. Preparation of monoclonal antibody to porcine OASL

A 6-week-old female BABL/c mouse was selected and the purified porcine OASL protein was injected intraperitoneally. The immune protein of each mouse was 50 μ g and immunized three times, each time at an interval of 14 days. After three times of immunization, the blood was collected and the titer reached 1:125000 by ELISA. Three days after immunization enhancement, spleen cells were fused and screened to obtain positive clone cells. After two subclones, a hybridoma cell strain was screened and named 7D7E3. The titer of ascites preparation reached 1:500,000. Western blot indicated that monoclonal antibody could react specifically with porcine OASL protein, but not with P30 protein. Indirect immunofluorescence assay showed that the monoclonal antibody had good reactivity with eukaryotic expression protein. The results showed that 7D7E3 monoclonal cell line was successfully screened and could secrete anti-porcine OASL antibody stably with high specificity.

3. Application of antiviral effect of porcine OSAL protein

To verify the inhibitory effect of porcine OASL protein on replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Marc-145 cells. Porcine OASL gene was cloned into the eukaryotic expression vector pCMV-3 $\times$ Flag, and the recombinant expression plasmid pCMV-

3×flag-OASL was constructed. Western blot detected the overexpression of porcine OASL gene in Marc-145 cells. At the same time, the overexpression of porcine OASL inhibited PRRSV replication in Marc-145 cells by detecting the change of PRRSV copy number and the titer of PRRSV virus 48h after exposure.

Key words: Porcine OASL; Protein expression; Monoclonal antibody; ELISA; transfection