

方天, 李乔斌, 冯孝傲, 等. 禽腺病毒 4 型 Penton 和 Fiber1 蛋白原核表达及多克隆抗体的制备 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (3): 54-61.

FANG T, LI Q B, FENG X A, et al. Prokaryotic expression of FAdV-4 Penton and Fiber1 protein and preparation of their polyclonal antibodies [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (3): 54-61.

## 禽腺病毒 4 型 Penton 和 Fiber1 蛋白原核表达及多克隆抗体的制备

方天<sup>1</sup>, 李乔斌<sup>1</sup>, 冯孝傲<sup>1</sup>, 朱二鹏<sup>1,2</sup>, 陈常秀<sup>3\*</sup>, 程振涛<sup>1,2\*</sup>

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵州 贵阳 550025;

2. 贵州省动物疫病与兽医公共卫生重点实验室, 贵州 贵阳 550025;

3. 贵州省动物疾病预防控制中心, 贵州 贵阳 550008)

**摘要:** 为开展禽腺病毒 4 型 (FAdV-4) 五邻体蛋白 (Penton) 和纤丝蛋白 (Fiber1) 多克隆抗体的制备及评价, 研究通过对 *Penton* 和 *Fiber1* 基因优势抗原表位基因片段进行生物信息学分析, 设计特异性引物 PCR 扩增获得 *Penton* 和 *Fiber1* 优势抗原表位基因片段, 将其克隆至原核表达载体 pCold I, 转入表达宿主菌 BL21 (DE3) 进行异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达, 将纯化、鉴定后的目的蛋白免疫 BALB/c 小鼠制备多克隆抗体, 对抗体进行 Western blot 鉴定及间接 ELISA 抗体效价测定。结果可见, FAdV-4 *Penton* 基因序列共编码 525 个氨基酸, *Fiber1* 基因序列共编码 432 个氨基酸, 其优势抗原表位点分别有 7、6 个区域, 且均集中于 N 端; 成功构建 pCold I -P 和 pCold I -F1 重组原核表达质粒, 其诱导表达的重组蛋白 Penton 和 Fiber1 均与 His 标签单抗发生特异性反应, 动物免疫获得的 Penton、Fiber1 多克隆抗体均能与目的蛋白反应形成特异性条带, 且 Penton 多克隆抗体效价高于 Fiber1 多克隆抗体。综上, 研究获得的纯化重组蛋白 Penton 较 Fiber1 蛋白表达量更高, 免疫后血清抗体效价更高, 更具有制备多克隆抗体的优势。

**关键词:** 禽腺病毒 4 型; Penton 蛋白; Fiber1 蛋白; 生物信息学分析; 多克隆抗体

中图分类号: S855.5 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)03-0054-08

## Prokaryotic expression of FAdV-4 Penton and Fiber1 protein and preparation of their polyclonal antibodies

FANG Tian<sup>1</sup>, LI Qiaobin<sup>1</sup>, FENG Xia'ao<sup>1</sup>, ZHU Erpeng<sup>1,2</sup>, CHEN Changxiu<sup>3\*</sup>, CHENG Zhentao<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Animal Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Guizhou Province Key Laboratory of Animal Disease and Veterinary Public Health, Guiyang 550025, China;

3. Guizhou Center for Animal Disease Control and Prevention, Guiyang 550008, China)

**Abstract:** In order to prepare and evaluate the polyclonal antibodies against fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4) Penton and Fiber1 protein, the dominant epitope gene fragments of the *Penton* and *Fiber1* genes were screened by bioinformatics analysis and were obtained by specific PCR amplification, and then they were cloned into the pCold I vector. Polyclonal antibodies were prepared by immunization of purified proteins of interest in BALB/c mice, and indirect ELISA and Western blot were used to detect the titers of the antibodies. The results showed that the FAdV-4 *Penton* gene sequence encoded a total of 525 amino acids, the *Fiber1* gene sequence encoded a total of 432 amino acids, and they had 7 and 6 dominant antigen epitopes, respectively, which were located at the N-terminal. The recombinant prokaryotic expression plasmids pCold I -P and pCold I -F1 were successfully constructed, and the expressed recombinant protein Penton and the Fiber1 protein specifically reacted with the anti-His monoclonal antibodies. Both Penton- and Fiber1-generated polyclonal antibodies reacted with the protein of interest to form specific bands, and the penton polyclonal antibodies had a higher titer than the Fiber1 polyclonal antibodies did. Taken together, the purified recombinant protein Penton obtained in this study had higher expression than the Fiber1 protein, exhibited stronger antibody binding ability, presented higher serum antibody titer after immunization, and possessed more advantages in preparing polyclonal antibodies.

**Keywords:** FAdV-4; Penton protein; Fiber1 protein; bioinformatics analysis; polyclonal antibody

收稿日期: 2023-03-07; 修回日期: 2023-11-28

基金项目: 贵州省科技计划项目 (黔科合基础 [2020] 1Y409 号); 贵州省科技支撑计划项目 (黔科合支撑 [2021] 一般 161); 贵州省优秀青年科技人才项目 (黔科合平台人才 [2021] 5646)

第一作者: 方天, 男, 硕士研究生

\* 通信作者: 程振涛, 教授, 研究方向: 主要从事动物病原病理学研究, E-mail: chengzhentao@sohu.com.

禽腺病毒 (fowl adenovirus, FAdV) 属于腺病毒科、禽腺病毒属<sup>[1]</sup>。根据群特异性抗原特征将禽腺病毒分为 I、II、III 群和 12 个血清型, 又根据系统进化树、基因组分为 A~E 5 个基因型<sup>[2]</sup>。安卡拉病毒属于 I 群禽腺病毒血清 4 型 (fowl adenovirus serotype 4, FAdV-4), 基因型为 C 型, 感染鸡后其特征性病变为心包积液 - 肝炎综合征 (Hydropericardium hepatitis syndrome, HHS)<sup>[3]</sup>, 病理变化是黄色心包积液、肿胀, 肝脏坏死、有点状出血, 其对家禽业造成了巨大经济损失<sup>[4-5]</sup>。HHS 最初于 1987 年报道在巴基斯坦卡拉奇发生, 在 1 年内迅速传播到巴基斯坦其他地区, 随后在南美洲和亚洲暴发, 包括伊拉克、日本、智利、韩国和中国<sup>[6]</sup>。该病多发于 3~5 周龄的肉鸡, 死亡率在 30%~70% 之间, 最高可达 80%, 且死亡率随着鸡日龄的增大而降低, 成年蛋鸡死亡率一般不超过 10%, 发病鸡群产蛋率下降 10%~30%<sup>[7]</sup>。开展对 HHS 的诊断、预防和治疗研究是防控本病的必要手段, 基于 FAdV-4 病毒结构蛋白的诊断方法、新型疫苗开发、抗体类分子制剂等研究多建立于目的蛋白的分子特征分析、蛋白表达与纯化、抗体制备的基础上, 是防控 HHS 的技术关键。五邻体蛋白 (Penton) 和纤丝蛋白 (Fiber1) 是 FAdV-4 主要结构蛋白之一, Penton 对病毒粒子在细胞中的装配和维持病毒粒子的结构和病毒侵入细胞方面发挥作用, 在不同血清型间较为保守<sup>[8]</sup>; Fiber1 能够直接与宿主细胞受体结合, 可介导病毒内化, 在病毒感染细胞时绑定细胞, 影响病毒的致病性, Fiber1 蛋白与 Penton base 相连伸出<sup>[9]</sup>。目前对 FAdV-4 主要结构蛋白的研究较多, 但并无针对相关蛋白的成熟商品化疫苗推出, 对 FAdV-4 主要结构蛋白的致病机理、免疫效果的探索仍是当下研究的主题。

本试验基于 FAdV-4 结构蛋白 Penton 和 Fiber1 分子特征分析, 选择 N 端优势抗原表位基因片段进行原核表达, 获取纯化蛋白并制备其多克隆抗体, 最后对多克隆抗体效价、重组蛋白的免疫原性和反应原性作出评价, 可为 FAdV-4 结构蛋白生物学功能研究、诊断试剂盒研发以及临床药物治疗提供数据参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 动物、菌种、载体和质粒

6~8 周龄 BALB/c 小鼠购自贵州医科大学实验动物中心; pCold I 载体、DH5 $\alpha$  感受态细胞、BL21 (DE3) 感受态细胞均购自上海碧云天生物技术有限

公司; pMD19-T-Penton 克隆载体、pMD19-T-Fiber1 克隆载体由贵州大学预防兽医学实验室保存。

#### 1.1.2 主要试剂

酵母粉、胰蛋白胨购自 OXOID 公司; 2 $\times$  Taq PCR Master Mix、T4 连接酶、Hind III、BamH I、pMD-19T 载体购自宝生物工程 (大连) 有限公司; E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid kit 质粒提取试剂盒购自 Omega BIO-TEK 公司; 蛋白纯化试剂盒、山羊抗小鼠 IgG HRP、His 小鼠单抗、聚丙烯酰胺凝胶试剂盒、5 $\times$  SDS 蛋白上样缓冲液均购于上海碧云天生物技术有限公司; 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自 Sigma 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 Penton 和 Fiber1 蛋白生物信息学分析

应用在线软件 ProtParam 分析 FAdV-4 Penton、Fiber1 蛋白的基本理化性质; 应用在线软件 DETAIBIO 分析 FAdV-4 Penton、Fiber1 蛋白信号肽和跨膜区; 应用 DNASTar 软件包 Protean 分析 Penton、Fiber1 蛋白 B 细胞抗原表位的亲水性、柔韧性、表面可及性和抗原指数; 应用软件 SOPMA 与 SWISSMODEL 分析 FAdV-4 Penton、Fiber1 蛋白二级结构与三级结构。

#### 1.2.2 FAdV-4 Penton 和 Fiber1 基因表达载体构建

##### 1.2.2.1 引物设计

根据 GenBank 数据库中已发表的 FAdV 基因序列 (登录号: GU188428), 应用 Primer Premier 5.0 软件设计合成两对引物, 分别扩增 Penton 和 Fiber1, 命名为 pCold I -P 和 pCold I -F1, 引物序列见表 1, 预期扩增片段大小分别为 717 bp 和 366 bp, 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

##### 1.2.2.2 目的基因扩增、克隆与阳性重组质粒筛选

使用质粒 DNA 提取试剂盒从保存的菌液中提取 pMD19-T-Penton 克隆载体、pMD19-T-Fiber1 克隆载体质粒 DNA, 以各自的质粒 DNA 为模板, 按以下反应扩增: 预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 45 s, 61 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。扩增结束后 PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。使用胶回收试剂盒切胶回收目的基因, 将回收产物与 pCold I 空载体分别应用对应的内切酶 37 $^{\circ}$ C 酶切过夜, 回收酶切过的目的片段并与 pCold I 使用 T4 连接酶 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接产物转化入 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 后置于 LB 固体培养基培养 16 h, 挑取单个菌落接种含 Amp 的 LB 液体培养基中过夜培养, 提取质粒并进行 PCR 与双酶切鉴定, 将阳性质粒送至上海生工生物工程股份有限公司测序。

表 1 引物信息

引物名称	引物序列 (5'-3')	长度/bp	内切酶
pCold I -P	F: CGCGGATCCTCGACCTATCCGGCGATGGT	717	<i>Bam</i> H I
pCold I -P	R: CCCAAGCTTGTGTGAACCCCTTGTACACGTACGTGC		<i>Hind</i> III
pCold I -F1	F: CCCAAGCTTATGTCTGGCCCTAATCGCCT	336	<i>Hind</i> III
pCold I -F1	R: TGCTCTAGAGGCCAAAGTATCGTCATCGATGAGCAG		<i>Xba</i> I

注: 下划线标注为酶切位点序列

### 1.2.3 Penton 和 Fiber1 重组蛋白的原核表达

#### 1.2.3.1 蛋白表达形式验证

将测序鉴定成功的阳性重组质粒转入 BL21 (DE3) 感受态细胞培养过夜, 扩大培养后加入 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L, 37 °C 振荡培养 4 h, 诱导表达目的蛋白, 取菌液离心后将 PBS 洗涤冻融后的沉淀超声波裂解, 分别收集上清液和沉淀, 上清液需要咪唑洗脱液进行洗脱, 沉淀则需要咪唑脲素 (50 mmol/L) 洗脱, 取适量样品用 12% SDS-PAGE 分析其蛋白表达形式。

#### 1.2.3.2 Penton 和 Fiber1 重组蛋白纯化

采用结合 His-tag 标签的蛋白纯化试剂盒纯化后进行 SDS-PAGE 分析与 Western blot 鉴定, 将细菌裂解液、上样穿流液、洗涤液、洗脱液制样后进行 SDS-PAGE 分析。

SDS-PAGE 参考步骤如下: 组装制胶模具并参照 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒说明书配置浓缩胶, 待浓缩胶凝固后配置分离胶并转移在玻璃夹层内, 将裂解的蛋白混合蛋白上样缓冲液后在沸水中放置 10 min 后, 每泳道 20  $\mu$ L 上样量于孔中, 将 SDS-PAGE 缓冲液倒入电泳槽中, 在样品进入分离胶之前 80 V 恒压, 之后 100 V 恒压直跑到凝胶底部。从胶板中取出凝胶, 置于染色容器内, 加入考马斯亮蓝染色液, 染色 30 min。倒掉染色液后并用去离子水清洗后, 并加入 100 mL 脱色液脱色至背景清晰。

Western blot 参考步骤如下: 经 SDS-PAGE 后按照胶块大小裁剪 PVDF 膜, 安装好转印夹后放入垂直电泳槽中, 加入适量转膜缓冲液 100 mA 恒流转印 3 h, 结束后取出 PVDF 膜使用 5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜, 加入适当比例稀释的 His 小鼠单抗 37 °C 摇床孵育 1 h, 加入 HRP 标记山羊抗鼠 IgG HRP 酶标二抗 37 °C 摇床孵育 1 h, 中间使用 TBST 洗涤, 最后用 DAB 底物显色溶液对 PVDF 膜显色, 红外扫描仪扫描 PVDF 膜观察结果。

#### 1.2.4 Penton、Fiber1 蛋白多克隆抗体制备

##### 1.2.4.1 动物免疫与血清收集

采用 BCA 蛋白定量试剂盒对纯化后的蛋白进行蛋白浓度测定, 按免疫剂量为 200  $\mu$ g/只免疫小鼠。

将制备的重组蛋白与弗氏佐剂等体积混匀, 采用皮下注射免疫。第 1 次免疫 14 d 后进行第 2 次免疫, 7 d 后进行第 3 次免疫; 3 次免疫后对小鼠进行眼球采血, 离心后收集血清。

##### 1.2.4.2 多克隆抗体 Western blot 鉴定与 ELISA 抗体效价测定

将纯化重组蛋白 Penton、Fiber1 分别进行 SDS-PAGE, 分别使用制备的 Penton 和 Fiber1 多克隆抗体进行 Western blot 分析, 在印迹试验中将一抗换成 Penton、Fiber1 多克隆抗体, HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 作为二抗, 试验步骤同 1.2.3.2。

应用 ELISA 方法对血清抗体进行效价测定, 将酶标板放入酶标仪里面, 在  $OD_{450}$  进行读数, 根据吸光值来判断多克隆抗体的效价。ELISA 试剂盒具体操作步骤如下: 将纯化好的蛋白用包被液来稀释成 10  $\mu$ g/mL, 在酶标板上每孔加入 100  $\mu$ L, 4 °C 孵育过夜。倒掉酶标孔中的液体, 然后使用洗涤液 (1 $\times$  PBST) 洗涤 5 次, 每次 3 min, 最后 1 次在吸水纸上拍干。加入封闭液每孔 200  $\mu$ L, 37 °C 孵育 2 h。再次洗涤, 加入稀释好的待测血清 100  $\mu$ L, 转移到 37 °C 恒温培养箱 1 h。继续洗涤后加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (1 : 1 000 倍稀释) 每孔 100  $\mu$ L, 37 °C 孵育 1 h。再洗涤, 最后加入显色液 A 和显色液 B 各 50  $\mu$ L, 混匀, 避光显色 10 min, 最后加 50  $\mu$ L 终止液终止反应。结果判定: 以  $P/N$  值 (阳性孔  $OD$  值/阴性孔  $OD$  值) 大于或等于 2.1 为阳性;  $P/N$  值小于 2.1, 但大于或等于 1.5 为可疑;  $P/N$  值小于 1.5 为阴性。

## 2 结果

### 2.1 目的蛋白的生物信息学分析

应用生物分析软件分析 FAdV-4 Penton、Fiber1 蛋白的基本理化性质, 信号肽, 跨膜区, B 细胞抗原表位的亲水性、柔韧性、表面可及性、抗原指数 (图 1), 二级结构及三级结构。由表 2 可知, FAdV-4 Penton 基因完整开放阅读框为 1 578 bp, 共编码 525 个氨基酸, 理论等电点 (pI) 为 5.03, 总平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.300, 推测该蛋白为酸性亲水

蛋白 (pI < 7, 判定酸性; pI > 7, 判定碱性) (GRAVY 负值的绝对值越大, 亲水性越高), 不稳定系数 (II) 为 46.30 (II > 40, 不稳定; II < 40, 稳定) 推测该蛋白为不稳定蛋白。FAdV-4 *Fiber1* 基因完整开放阅读框为 1 299 bp, 编码 432 个氨基酸, pI 为 4.77, GRAVY 为 -0.120, 推测该蛋白为酸性亲水蛋白; II 为 35.89, 推测该蛋白为稳定蛋白。软件分析结果显示, Penton 和 Fiber1 蛋白均无跨膜区, 进行原核表达时不用考虑将跨膜区去除; 均无信号肽, 不能分泌到胞外。

FAdV-4 Penton 蛋白二级结构中  $\alpha$ -螺旋占比 15.4%,  $\beta$ -转角占比 7.43%, 无规则卷曲和延长链占比 77.17%, 无  $\beta$ -折叠; 在 5~23、65~76、163~171、216~227、366~375、452~462、486~490 肽段共有 7 个 B 细胞表位, 且该连续线性表位均位于肽段的无规卷曲和延长链处, 很可能是 FAdV-4 Penton 的优势抗原表位区域。由图 1B 可知, FAdV-4 *Fiber1* 蛋白二级结构中  $\alpha$ -螺旋占比 6.48%,  $\beta$ -转角占比 6.25%, 无规则卷曲和延长链占比 87.27%, 无  $\beta$ -折叠; 在 15~24、32~49、223~230、302~309、327~332、352~358 肽段共有 6 个 B 细胞表位, 且该连续

线性表位同样位于肽段的无规卷曲和延长链处, 很可能是 FAdV-4 *Fiber1* 的优势抗原表位区域。FAdV-4 Penton 和 *Fiber1* 蛋白都是以无规则卷曲和延长链为主,  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -转角为辅。无规则卷曲和转角散在存在, 提高了目的蛋白充分与周围的极性环境相接触, 为抗原表位的形成提供了有利条件。

表 2 蛋白理化性质分析结果

项目	Penton	Fiber1
开放阅读框/bp	1 578	1 299
氨基酸数目	525	432
蛋白分子式	C <sub>2547</sub> H <sub>3955</sub> N <sub>677</sub> O <sub>794</sub> S <sub>20</sub>	C <sub>2001</sub> H <sub>3133</sub> N <sub>531</sub> O <sub>637</sub> S <sub>7</sub>
pI	5.03	4.77
相对分子质量 (MW)	57 405.68	45 045.48
正电荷氨基酸残基 (Arg+Lys)	39	24
负电荷氨基酸残基 (Asp+Glu)	49	33
II	46.30	35.89
脂肪系数 (AI)	79.28	83.03
GRAVY	-0.300	-0.120

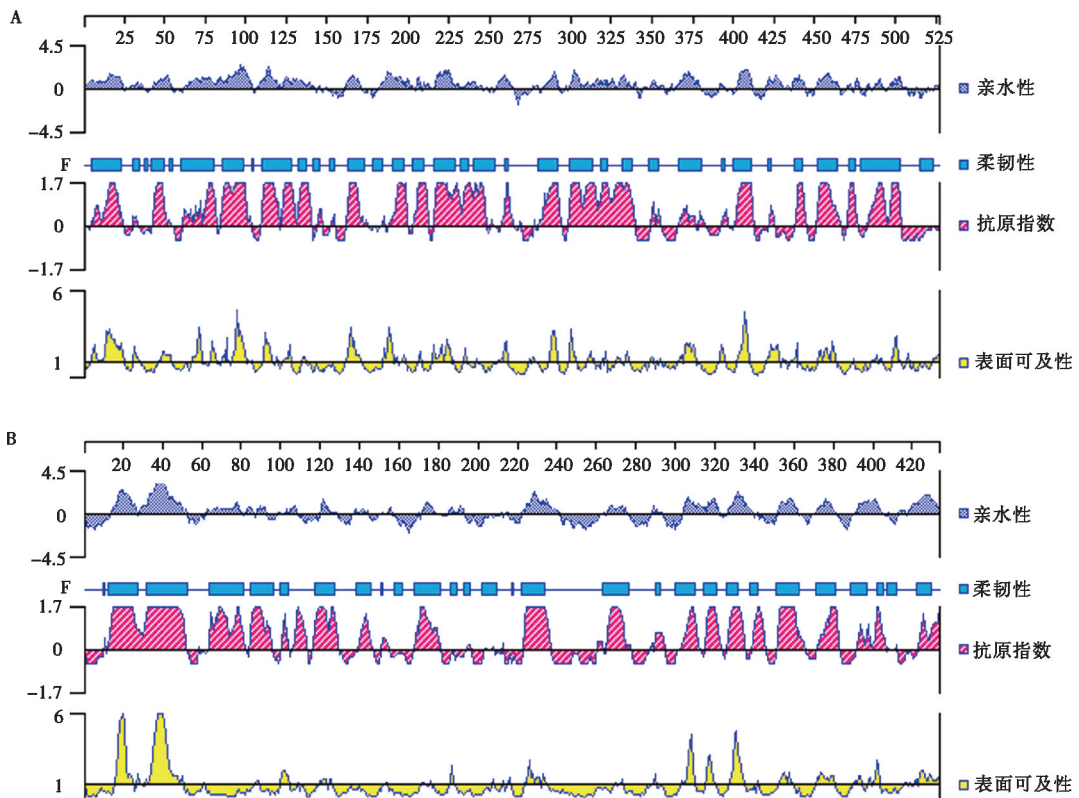
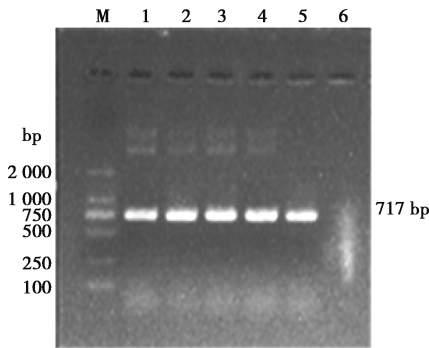


图 1 Penton (A) 和 Fiber1 (B) 蛋白 B 细胞表位分析

## 2.2 Penton、Fiber1 基因表达载体构建

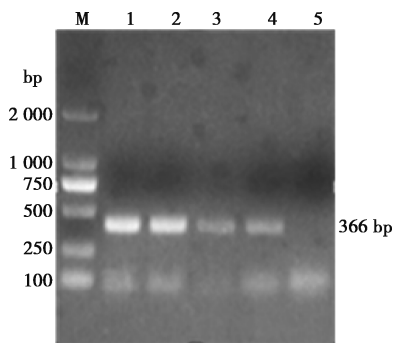
### 2.2.1 目的基因 PCR 扩增

以 pMD19-T-Penton 克隆载体、pMD19-T-Fiber1 克隆载体为模板，扩增 Penton、Fiber1 基因目的片段。由图 2 和图 3 可见，PCR 能扩增出与预期目的基因大小相符的特异性目的片段条带。



M. DL2000 分子质量标准；1~5. 质粒 pMD19-T-Penton；6. 阴性对照。

### 图 2 FADV-4 Penton 基因扩增



M. DL2000 分子质量标准；1~4. 质粒 pMD19-T-Fiber1；5. 阴性对照。

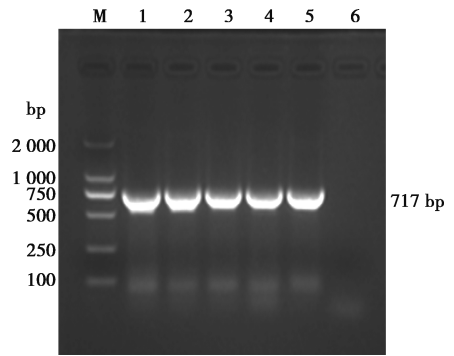
### 图 3 FADV-4 Fiber1 基因扩增

### 2.2.2 阳性重组质粒 PCR 鉴定

将重组质粒 pCold I -P 和 pCold I -F1 使用所设引物与反应条件进行 PCR 扩增。由图 4 和图 5 可见，能扩增出与预期目的基因大小相符的片段。

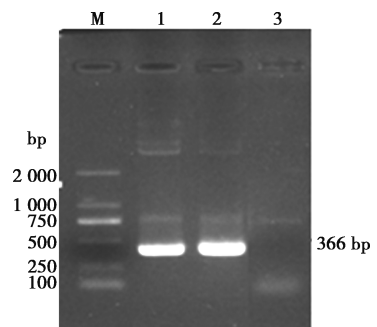
### 2.2.3 重组质粒双酶切鉴定

分别对 pCold I -P 和 pCold I -F1 重组质粒使用两组限制性内切酶 (*Bam*H I 与 *Hind* III、*Hind* III 与 *Xba* I) 进行酶切鉴定。由图 6 和图 7 所示，均出现双酶切条带，重组质粒 pCold I -P、pCold I -F1 目的条带分别 717 bp、366 bp。阳性重组质粒经测序验证，与预期相符，说明重组原核表达质粒构建成功。



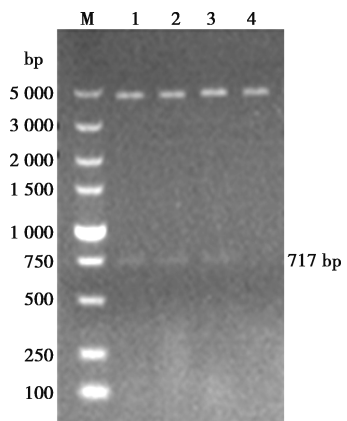
M. DL2000 分子质量标准；1. 阳性对照；2~5. 重组质粒 pCold I -P；6. 阴性对照。

### 图 4 重组质粒 pCold I -P 的 PCR 鉴定



M. DL2000 分子质量标准；1. 阳性对照；2. 重组质粒 pCold I -F1；3. 阴性对照。

### 图 5 重组质粒 pCold I -F1 的 PCR 鉴定



M. DL5000 分子质量标准；1~3. 重组质粒；4. 空载体对照。

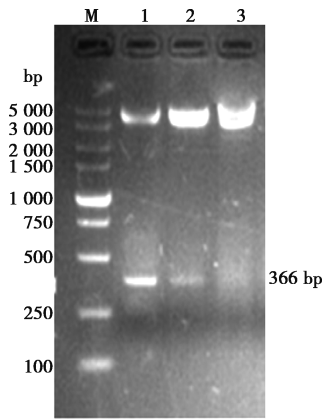
### 图 6 重组质粒 pCold I -P 双酶切鉴定

## 2.3 Penton 和 Fiber1 重组蛋白的原核表达

### 2.3.1 重组蛋白表达形式验证

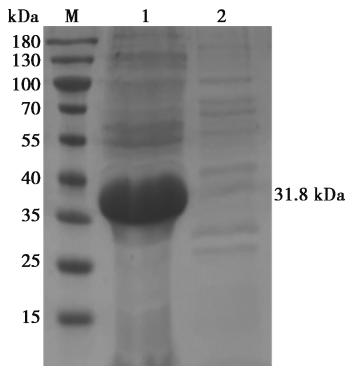
将离心收集的蛋白样品取 20 μL 使用 SDS-PAGE 分析其蛋白表达形式。由图 8 和图 9 可见，重组菌 pCold I -P 和 pCold I -F1 在沉淀中表达，表明

Penton 蛋白和 Fiber1 蛋白主要为包涵体表达。



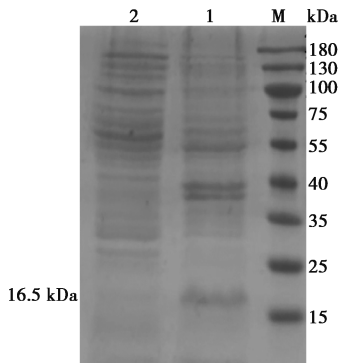
M. DL5000 分子质量标准；1~2. 重组质粒；3. 空载体对照。

图 7 重组质粒 pCold I -F1 双酶切鉴定



M. 180 kDa 预染蛋白；1. pCold I -P 诱导沉淀；2. pCold I -P 诱导上清液。

图 8 重组菌 pCold I -P 表达形式分析



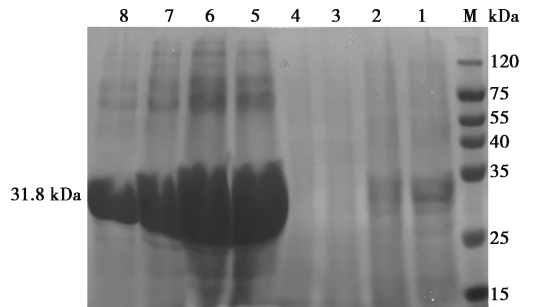
M. 180 kDa 预染蛋白；1. pCold I -F1 诱导沉淀；2. pCold I -F1 诱导上清液。

图 9 重组菌 pCold I -F1 表达形式分析

### 2.3.2 重组蛋白纯化与鉴定

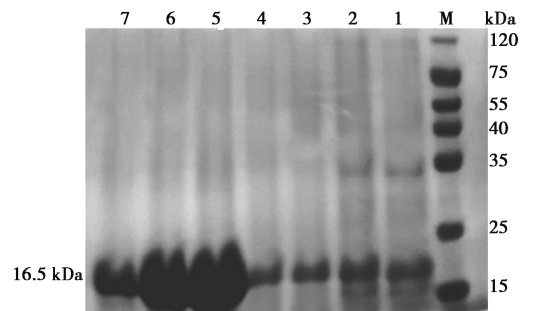
将纯化后的目的蛋白使用 SDS-PAGE 和 Western blot 检测。由图 10 和图 11 可见，重组蛋白 Penton、

Fiber1 纯化后电泳分别出现 31.8 kDa、16.5 kDa 的蛋白条带，无杂蛋白条带，说明均已成功纯化。由图 12 和图 13 可知，Western blot 印迹目的条带分别为 31.8 kDa、16.5 kDa，与预期相符，说明所纯化得到的蛋白为带有 His 标签的目的蛋白。



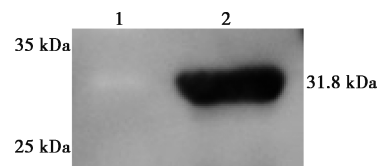
M. 120 kDa 预染蛋白；1. 上样穿液；2~3. 洗涤液（0.2 mmol/L 咪唑脲素）；4~8. 洗脱液（50 mmol/L 咪唑脲素）

图 10 重组蛋白 Penton 沉淀纯化 SDS-PAGE



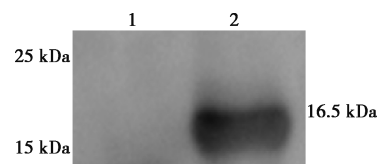
M. 120 kDa 彩色预染蛋白；1. 上样穿液；2~3. 洗涤液（0.2 mmol/L 咪唑脲素）；4~7. 洗脱液（50 mmol/L 咪唑脲素）。

图 11 重组蛋白 Fiber1 沉淀纯化 SDS-PAGE



1. 阴性对照；2. 带 His 标签的重组蛋白 Penton。

图 12 Penton 纯化蛋白 Western blot 分析（His 单抗为一抗）



1. 阴性对照；2. 带 His 标签的重组蛋白 Fiber1。

图 13 Fiber1 纯化蛋白 Western blot 分析（His 单抗为一抗）

## 2.4 Penton、Fiber1 蛋白多克隆抗体效价测定及 Western blot 鉴定

### 2.4.1 重组蛋白浓度测定

采用 BCA 蛋白定量试剂盒对纯化后的蛋白进行浓度测定,用酶标仪测定  $OD_{630}$  处的吸光值,根据测定样品的吸光值推算出重组蛋白 Penton 和 Fiber1 蛋白浓度分别为  $3.371 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  和  $1.235 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

### 2.4.2 多克隆抗体 Western blot 鉴定

以重组蛋白 Penton 和 Fiber1 作为抗原进行 Western blot 鉴定。由图 14 和图 15 所见,重组蛋白 Penton 制备的多克隆抗体能够特异性识别 31.8 kDa 条带,重组蛋白 Fiber1 制备的多克隆抗体能够特异性识别 16.5 kDa 条带,与预期结果相符。

### 2.4.3 多克隆抗体效价测定

应用 ELISA 方法对小鼠血清抗体进行效价测定,结果如表 3、表 4 所示,Penton 多克隆抗体的效价在 1:3 200 以上,而 Fiber1 多克隆抗体的效价在 1:1 600 倍稀释时为阳性,稀释至 1:3 200 时  $P/N$  值为可疑,重组蛋白 Penton 的血清抗体效价大于 Fiber1。说明重组蛋白 Penton 较 Fiber1 具有更高的免疫原性。

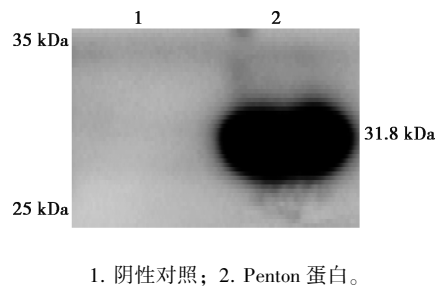


图 14 Penton 多克隆抗体 Western blot 鉴定结果

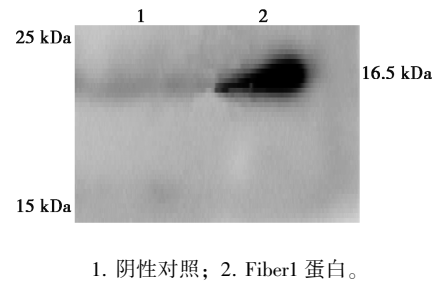


图 15 Fiber1 多克隆抗体 Western blot 鉴定

表 3 重组蛋白 Penton 多克隆抗体效价检测

稀释比例	OD 值			阴性对照	P/N
	第 1 次检测	第 2 次检测	两次均值		
1:100	2.135	2.142	2.138	0.159	13.4
1:200	1.799	1.791	1.795	0.137	13.1
1:400	1.543	1.691	1.617	0.181	8.9
1:800	1.233	1.355	1.294	0.167	7.7
1:1 600	0.789	0.967	0.878	0.125	7.0
1:3 200	0.678	0.712	0.695	0.124	5.6

表 4 重组蛋白 Fiber1 多克隆抗体效价检测

稀释比例	OD 值			阴性对照	P/N
	第 1 次检测	第 2 次检测	两次均值		
1:100	1.811	1.919	1.865	0.182	10.2
1:200	1.566	1.458	1.512	0.262	5.8
1:400	0.986	0.988	0.987	0.259	3.8
1:800	0.539	0.639	0.589	0.175	3.4
1:1 600	0.424	0.438	0.431	0.133	3.2
1:3 200	0.222	0.312	0.267	0.144	1.9

## 3 讨论

基因序列的生物信息学分析有助于了解编码蛋白的结构与成分,为目的蛋白的体外表达、应用等奠定基础。通过生物信息学分析,明确蛋白理化性质、抗原表位,可为亚单位疫苗、抗体制备提供有效的数据基础<sup>[10]</sup>。本研究使用生物信息学分析预测出 Penton 蛋白的亲水性能力大于 Fiber1 蛋白,更有利于将其以可溶性蛋白形式表达。有研究分析了 FAdV-4 主要结构蛋白的二级结构、三级结构,并预测了各蛋白潜在的 B 细胞、CTL 细胞、Th 细胞抗原表位<sup>[11]</sup>。因蛋白结构与氨基酸组成不同,FAdV-4 Penton 蛋白优势抗原表位点区域分布较为均匀,含有 FAdV-4 的主要抗原表位和中和抗体的识别表位,该蛋白免疫鸡后可

诱导有效的免疫保护,证实该蛋白可用于亚单位疫苗的研制及单克隆抗体的制备<sup>[12]</sup>。研究发现,Penton 抗体可以阻断病毒体从酸性的核内质进入细胞浆,从而使病毒感染性失活,因此 Penton 蛋白的高效表达对诊断试剂、抗病毒药物及疫苗的制备研究等都具有重要意义<sup>[13]</sup>。Fiber1 在氨基酸 N 端拥有最高的抗原性、柔韧性、亲水性和表面可及性,相关研究将携带 Fiber1、Fiber2 突变基因的腺病毒质粒转染鸡 LMH 细胞,Fiber1 突变的重组病毒无法拯救,而 Fiber2 组则成功拯救,证实 Fiber1 对介导病毒吸附至关重要,而该区域可能是病毒粒子与细胞膜上受体结合的位点<sup>[14]</sup>。本研究通过原核表达载体 pCold I 实现 FAdV-4 Penton、Fiber1 重组蛋白大量表达,可为后续动物免疫提供优势抗原,但表达的 Penton、Fiber1 重组蛋

白均为包涵体表达,与杨华、罗思思等<sup>[15-16]</sup>试验结果一致。有研究将 Penton 基因全序列克隆至 pCold-SUMO 表达载体中,成功高效表达出可溶性 Penton 蛋白,关于 Penton、Fiber1 重组蛋白亲水性对比需进一步验证。

多克隆抗体在病原的检测和疾病治疗上具有重要价值<sup>[17]</sup>。以 FAdV-4 全病毒灭活抗原为诊断抗原存在易散毒、制备繁琐、成本高等缺点,而使用原核表达系统表达出的人工抗原易于纯化与标准化,成本低且无散毒风险<sup>[18]</sup>。研究 FAdV-4 衣壳蛋白多克隆抗体可为后续 FAdV-4 检测方法的开发及其相关致病机制的研究奠定物质基础<sup>[19]</sup>。本研究应用 ELISA 方法对制备的鼠源 Penton、Fiber1 多克隆抗体进行了效价测定,Penton 多克隆抗体在 1:3 200 倍稀释时仍有很高的免疫原性,而 Fiber1 多克隆抗体效价仅为 1:1 600,说明重组蛋白 Penton 比 Fiber1 具有更高的免疫原性,可作为制备亚单位疫苗的优势抗原。

综上所述,本研究对 Penton 和 Fiber1 基因优势抗原片段序列进行扩增并克隆至 pCold I 表达载体,成功在大肠杆菌中获得了高效表达,通过免疫小鼠后测定其血清抗体效价,证实 Penton 重组蛋白具有良好的免疫原性,为后续亚单位疫苗或单克隆抗体研发奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] SHAO H, LU Y, WANG W, et al. Two novel monoclonal antibodies against fiber-1 protein of FAdV-4 and their application in detection of FAdV-4/10 [J]. *Bmc Vet Res*, 2019, 15 (1): 232.
- [2] WANG W, LIU Q, LI T, et al. Fiber-1, not fiber-2, directly mediates the infection of the pathogenic serotype 4 fowl adenovirus via its shaft and knob domains [J]. *J Virol*, 2020, 94 (17): e920-e954.
- [3] MENG K, YUAN X, YU J, et al. Identification, pathogenicity of novel fowl adenovirus serotype 4 SDJN0105 in Shandong, China and immunoprotective evaluation of the newly developed inactivated oil-emulsion FAdV-4 vaccine [J]. *Viruses*, 2019, 11 (7): 627.
- [4] YU G, LIN Y, DOU Y, et al. Prevalence of fowl adenovirus serotype 4 and co-infection by immunosuppressive viruses in fowl with hydropericardium hepatitis syndrome in Shandong province, China [J]. *Viruses*, 2019, 11 (6): 517.
- [5] SHAH M S, ASHRAF A, KHAN M I, et al. Molecular cloning, expression and characterization of 100K gene of fowl adenovirus-4 for prevention and control of hydropericardium syndrome [J]. *Biologicals*, 2016, 44 (1): 19-23.
- [6] QING P, JING W, YULONG G, et al. Development and application of a novel ELISA for detecting antibodies against group I fowl adenoviruses [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2020, 104 (2): 853-859.
- [7] 祝常椿,钱焱,满成连,等. 2株鸡源血清4型禽腺病毒的分离鉴定及致病性研究 [J]. *中国预防兽医学报*, 2020, 42 (12): 1282-1286.
- [8] 侯力丹,陈晓春,薛麒,等. I群禽腺病毒 penton 蛋白单克隆抗体的制备和鉴定 [J]. *中国兽医学报*, 2022, 42 (1): 41-46.
- [9] PING W, JIANJUN Z, WEIKANG W, et al. A novel monoclonal antibody efficiently blocks the infection of serotype 4 fowl adenovirus by targeting fiber-2 [J]. *Vet Res*, 2018, 49 (1): 29.
- [10] 何玲,张云丹,李乔斌,等. 安卡拉病毒贵州流行株 penton 基因分子特性分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47 (6): 1892-1901.
- [11] 张丙燕,王君娜,张宇名,等. 血清4型I群禽腺病毒四个主要结构蛋白的生物信息学分析 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2020, 601 (13): 1-6.
- [12] 秦亚平,刘亮亮,刘胜旺,等. 鸡腺病毒血清4型和11型Penton蛋白的表达及交叉反应性评价 [J]. *中国兽医科学*, 2022, 52 (6): 704-711.
- [13] 高辉,张梦荷,冯茹,等. I群禽腺病毒4型Penton基因的克隆及原核表达 [J]. *动物医学进展*, 2018, 39 (5): 1-5.
- [14] ZOU X, RONG Y, GUO X, et al. Fiber1, but not fiber2, is the essential fiber gene for fowl adenovirus 4 (FAdV-4) [J]. *J Gen Virol*, 2021, 102 (3): 1099.
- [15] 杨华,刘晓民,于志丹,等. 减蛋综合征病毒五邻体基因的原核表达及其表达蛋白的部分活性分析 [J]. *中国兽医科学*, 2010, 40 (7): 688-691.
- [16] 罗思思,谢芝勋,邓显文,等. I群禽腺病毒五邻体基因的克隆及原核表达 [J]. *广东农业科学*, 2011, 38 (7): 154-157.
- [17] 宋桃花,高岩,陈柯,等. 新型冠状病毒N蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2021, 16 (12): 1373-1376.
- [18] 粟元文,王怀禹,魏玲. 鸭源血清4型I亚群禽腺病毒Hexon蛋白的原核表达与初步应用 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2019, 573 (9): 77-80.
- [19] 曹洁,刘萌,陈雨晴,等. 禽腺病毒血清4型纤突蛋白1 (Fiber1) 多克隆抗体的制备 [J]. *畜牧与兽医*, 2020, 52 (10): 91-96.