

硕士学位论文

几种非洲猪瘟蛋白的筛选表达及纯化

**SCREENING, EXPRESSION, AND PURIFICATION
OF SEVERAL AFRICAN SWINE FEVER VIRUS
PROTEINS**

袁婧馨

哈尔滨工业大学

2020年6月

国内图书分类号：Q71
国际图书分类号：577.21

学校代码：10213
密级：公开

工学硕士学位论文

几种非洲猪瘟蛋白的筛选表达及纯化

硕士研究生：袁婧馨

导 师：李明晖

申 请 学 位：工程硕士

学 科：生物工程

所 在 单 位：生命科学与技术学院

答 辩 日 期：2020年6月

授予学位单位：哈尔滨工业大学

Classified Index: Q71

U.D.C: 577.21

Dissertation for the Master Degree in Engineering

**SCREENING, EXPRESSION, AND PURIFICATION
OF SEVERAL AFRICAN SWINE FEVER VIRUS
PROTEINS**

Candidate :	Yuan JingXin
Supervisor :	Li MingHui
Academic Degree Applied for :	Master of Engineering
Speciality :	Biological Engineering
Affiliation :	School of Life Science and Technology
Date of Defence :	June, 2020
Degree-Conferring-Institution :	Harbin Institute of Technology

摘要

非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)感染猪科动物可以引起非洲猪瘟(African swine fever, ASF)。ASF 是一种急热高度接触性传染病。病程短, 发病死亡率高, 家猪感染十天内病死率接近 100%。我国辽宁省沈阳市于 2018 年 8 月发现首例非洲猪瘟病例。非洲猪瘟病毒在国内的蔓延对生猪养殖业、猪肉产品贸易及相关领域造成较为严重的经济冲击, 但目前尚无有效商品化疫苗问世。

ASFV 基因编码 150-200 种蛋白质, 其中约一半的 ASFV 蛋白功能尚不清楚, 蛋白结构的解析对研究蛋白功能, 作用结合位点, 以及相关疫苗药物的开发, 均有重要意义。目前大多数的 ASFV 蛋白的结构信息尚未可知, 截至 2020 年 5 月 PDB 数据库显示八种 ASFV 蛋白 (pB119L、A179L、A238L、NP419L、pA104R、pS273R、E165R、B646L) 的三十余种形态被解析, 其中半数以上的蛋白结构为近一年的研究结果。

本课题利用荧光检测分子筛 (FSEC) 技术对 ASFV 推测具有较为关键功能的蛋白 CP123L、X69R、EP152R、E199L、E66L、E183L、I329L、B475L、C84L、C217R、E248R、KR177R、MGF110-1L、B169L、O61R、EST-B 在哺乳动物表达体系下进行筛选表达, 发现表达水平良好的 CP123L、B475L、KR177R、E199L、E248R。

在优化 B475L、KR177R 蛋白的表达纯化后。能够获得高纯度的 MBP-B475L 融合蛋白、无标签 KR177R 蛋白和带有组氨酸标签的 KR177R 蛋白。对高纯度带有组氨酸标签的 KR177R 蛋白进行结晶筛选, 获得六边形晶体。对 KR177R 蛋白晶体的获得, 可以进一步利用 X-射线衍射法进行结构解析。对非洲猪瘟病毒 KR177R 结构蛋白结构的解析将对相关机理功能的探究、侵染靶点的确定、相关亚疫苗的开发均有积极的作用。对 B475L 蛋白的表达纯化优化, 及其他 ASFV 蛋白的筛选也为 ASFV 功能机制的研究提供一定的思路。

关键词: 非洲猪瘟病毒; 结构蛋白; 蛋白纯化; KR177R; B475L

Abstract

African swine fever is an acute, febrile, and highly contagious disease caused by African swine fever virus. The course of disease is short while the mortality rate is high. The mortality rate of domestic pigs is close to 100% within 10 days after infection. The first African swine fever case was discovered in Shenyang, Liaoning Province, China in August 2018. The countrywide spread of African swine fever virus in China has caused serious economic losses in pork product trade, hog breeding and related industries. However no effective vaccine has yet been commercially produced.

The genome of ASFV encodes 150-200 proteins. The function of about half of these proteins is still unknown. The analysis of protein structure is of great significance for the study of protein function, binding sites, and the development of related vaccine. However structural information is not available for most of ASFV proteins. As of May 2020, there are 30 entries in the PDB database of eight ASFV proteins (pB119L, A179L, A238L, NP419L, pA104R, pS273R, E165R, B646L), more than half of which were solved in the past year.

In this subject we used Fluorescent Size-Exclusion Chromatography (FSEC) technology to carry out screening of a set of ASFV protein (CP123L, X69R, EP152R, E199L, E66L, E183L, I329L, B475L, C84L, C217R, E248R, KR177R, MGF110-1L, B169L, O61R, EST-B) using mammalian expression system and found the expression of CP123L, B475L, KR177R, E199L, E248R was good.

After optimizing the expression and purification of B475L and KR177R proteins, we were able to obtain high purity proteins of MBP-B475L fusion protein, untagged protein KR177R, and histidine-tagged protein KR177R. Crystallization screening was done with histidine tagged KR177R protein and hexagonal crystals were found, which may lead to way to the structure determination of this protein. The crystal structure of KR177R protein can be further analyzed by X-ray diffraction. The analysis of the structural protein structure of African swine fever virus KR177R will have a positive effect on the exploration of related mechanism functions, the determination of infection targets, and the development of related sub-vaccines. The optimization of the expression and purification of B475L protein and the screening of other ASFV proteins also provide a basis for the study of the functional mechanism of ASFV.

Keywords: African swine fever virus, structural protein, protein purification, KR177R, B475L

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	II
第 1 章 绪 论.....	1
1.1 课题背景及研究的目的和意义.....	1
1.2 非洲猪瘟病毒.....	1
1.2.1 非洲猪瘟病毒的传播.....	1
1.2.2 非洲猪瘟病毒粒子及基因组结构.....	3
1.2.3 疫苗研究进展.....	4
1.2.4 药物及防控.....	5
1.3 非洲猪瘟病毒蛋白.....	6
1.3.1 ASFV 主要结构蛋白.....	6
1.3.2 ASFV 编码复制修饰转录相关蛋白.....	7
1.3.3 免疫逃逸相关蛋白.....	8
1.4 非洲猪瘟病毒蛋白的结构生物学研究.....	9
1.5 本文的主要研究内容.....	13
第 2 章 实验试剂与方法.....	15
2.1 实验材料.....	15
2.2 实验试剂.....	15
2.3 实验仪器.....	18
2.4 实验方法.....	19
2.4.1 目的片段的获得.....	19
2.4.2 克隆的构建.....	21
2.4.3 重组连接产物的转化.....	23
2.4.4 质粒的提取与验证.....	23
2.4.5 哺乳动物体系瞬时转染表达.....	25
2.4.6 蛋白收集及荧光检测分子筛筛选.....	26
2.4.7 细胞的传代冻存复苏.....	26
2.4.8 非洲猪瘟蛋白的表达优化.....	27
2.4.9 非洲猪瘟相关蛋白的纯化.....	28
2.4.10 非洲猪瘟蛋白的结晶及优化.....	31
第 3 章 ASFV 蛋白哺乳动物体系下的表达筛选.....	33

3.1 本章引论.....	33
3.2 结果与分析.....	33
3.2.1 ASFV 蛋白生物信息学分析结果.....	33
3.2.2 ASFV 蛋白克隆构建结果.....	35
3.2.3 ASFV 蛋白转染、小量表达、筛选结果.....	35
3.3 本章小结.....	38
第 4 章 ASFV 蛋白表达优化、纯化、结晶.....	39
4.1 本章引论.....	39
4.2 结果与分析.....	39
4.2.1 MBP-B475L 融合蛋白表达体系的优化结果.....	39
4.2.2 利用 MBP 标签对 KR177R 蛋白的表达与纯化结果.....	41
4.2.3 组氨酸标签 KR177R 蛋白的表达与纯化结果.....	43
4.2.4 KR177R 蛋白的结晶结果.....	45
4.3 本章小结.....	46
结 论.....	47
参考文献.....	48
哈尔滨工业大学学位论文原创性声明和使用权限.....	52
致 谢.....	53

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
ASF	African Swine Fever	非洲猪瘟
ASFV	African Swine Fever Virus	非洲猪瘟病毒
DNA	Deoxyribonucleoside acid	脱氧核糖核酸
OIE	Office International Des Epizooties	世界动物卫生组织
MGFs	Multigene families	多基因家族
ORFs	Open reading frame	开放阅读框
Cryo-EM	Cryo-electron microscopy	冷冻电镜
ADE	Antibody dependent enhancement	抗体依赖增强效应
DNAL	Deoxyribonucleoside acid ligase	脱氧核糖核酸连接酶
RFP	Red fluorescent protein	红色荧光蛋白
kDa	Kilo Dalton	千道尔顿
CD2	Lymphocyte function associated antigen	淋巴细胞功能相关抗原
TLR	Toll-like receptors	Toll 样受体
IRF	Interferon regulatory Factor	干扰素调节因子
CN	Calcineurin	钙调神经磷酸酶
NF-kB	Nuclear factor kappa beta	细胞核早期转录因子
MHC	Major histocompatibility complex	主要组织相容性复合体
dUTPase	dUTP pyrophosphatase	脱氧尿苷焦磷酸酶
IHF	Integration Host Factor	宿主整合因子
PAM	Porcine alveolar macrophage cell	猪肺泡巨噬细胞
FSEC	Fluorescent detection Size-Exclusion Chromatography	荧光检测分子筛
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳
HEK293F	Human embryonic kidney 293F cells	人胚肾 293F 细胞
DEME	Dulbeccos modified eagles medium	改良型 MEM 培养基
LB	Lyria Bertani	LB 培养基
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosede	异丙基硫代- β -D 半乳糖苷
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
Kan	Kanamycin	卡那霉素
His	Histidine	组氨酸
Cys	Cysteine	半胱氨酸
E.coil	Escherichia coil	大肠杆菌

第 1 章 绪 论

1.1 课题背景及研究的目的和意义

非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)感染猪科动物可以引起非洲猪瘟(African swine fever, ASF)。ASF 是一种急热高度接触性传染病。病程短, 发病死亡率高, 家猪感染十天内病死率接近 100%^[1]。

我国辽宁省沈阳市于 2018 年 8 月发现首例非洲猪瘟病例并及时进行了通报, 经比对为 II 型毒株, 随后全国大部分省份均有病例通报^[2]。非洲猪瘟病毒在国内的蔓延对生猪养殖业、猪肉产品贸易及相关领域造成较为严重的经济影响。中国是全球猪肉消费和生产占比最大的国家, 中国生猪数量在全球所占比重近半, 病毒的蔓延也将对全球养殖业造成极大的冲击。目前由于缺乏有效的商品化疫苗用于防疫, 一旦发现病例, 采取严格的隔离封锁和扑杀政策是目前最为有效的防控方式^[3]。开发有效的非洲猪瘟病毒疫苗对于疫情的防控至关重要。

本课题为哈尔滨工业大学生命中心李明晖课题组与哈尔滨兽医研究所国家非洲猪瘟专业实验室合作课题。合作实验室于 2019 年 3 月成功分离出我国第一株非洲猪瘟病毒^[4], 并获得了可靠的全基因组序列信息用于蛋白结构和功能的研究。

非洲猪瘟病毒的基因组约 170-193 kb, 结构相对庞大, 在病毒基因组编码的 150-200 种蛋白中只有少数功能已知^[5], 极少数非洲猪瘟病毒蛋白结构被解析。本课题对几种非洲猪瘟蛋白进行了筛选、表达和纯化, 并进行了初步结晶探究。深入研究非洲猪瘟病毒蛋白的结构, 对编码蛋白功能的研究、作用结合位点靶点的确定以及相关疫苗药物的开发, 均有重要的意义。

1.2 非洲猪瘟病毒

1.2.1 非洲猪瘟病毒的传播

非洲猪瘟的首次发现可以追溯至 1921 年的非洲肯尼亚, 同年蔓延至非洲东部和南部的七个国家, 随后在撒哈拉沙漠以南的大部分地区广泛传播, 1950

年传至西非；1957 年传至欧洲，首次在葡萄牙被发现，之后始终在葡萄牙和西班牙流行；1971 年由西欧传入古巴，随后南美洲的大部分国家陆续暴发疫情；2007 年传入高加索地区，2017 年传播至俄罗斯远东地区^[6]，2018 年从俄罗斯或欧洲地区传播至中国，2019 年蒙古、越南、缅甸、老挝、柬埔寨、朝鲜、菲律宾、东帝汶、韩国均有疫情发生^[7]。非洲猪瘟疫病毒的跨大陆传播及病毒分布如图 1-1 所示。

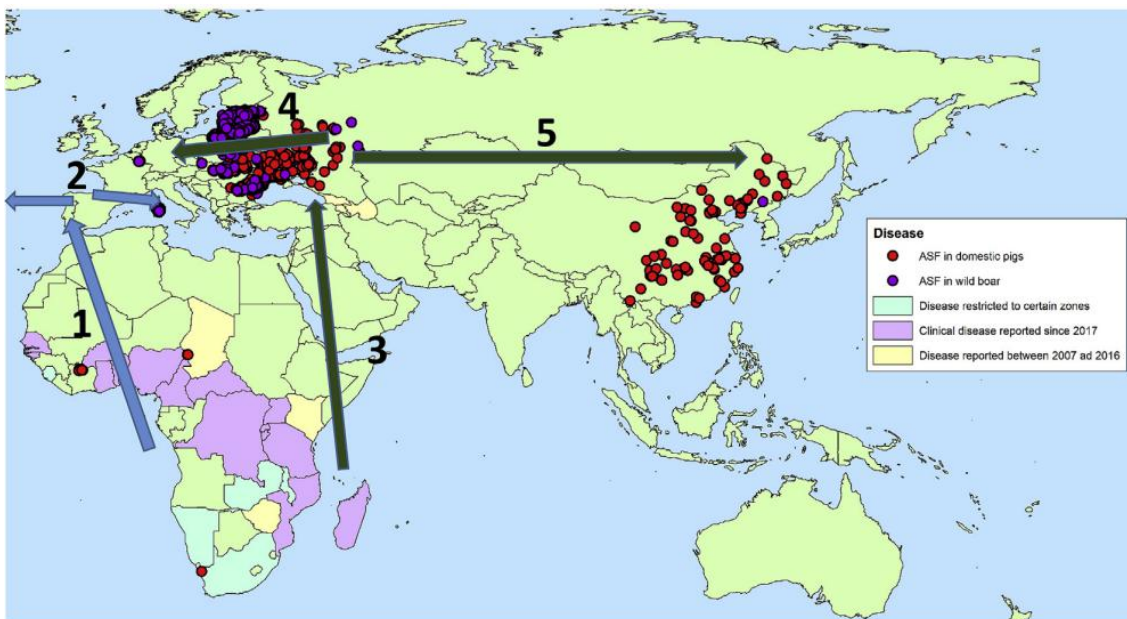


图 1-1 非洲猪瘟疫病毒的跨大陆传播及病毒分布^[7]

非洲猪瘟疫病毒作为大的双链 DNA 病毒，是非洲猪瘟疫病毒家族 (*Asfarviridae* family) 非洲病毒属 (*Asfivirus*) 的唯一成员^[8]，也是目前虫媒 DNA 病毒唯一被确定和发现的^[9]。ASFV 以猪科动物为主要感染宿主，包括家猪 (*Sus scrofa domestica*)、欧洲野猪 (*Sus scrofa ferus*)、疣猪 (*Potamochoerus porcus*)、巨型森林猪 (*Hylochoerus meinertzhageni*) 等^[10]。欧亚野猪与家猪均表现出高度易感性，且无显著年龄、性别差异^[11]。疣猪在感染 ASFV 后无临床表征，但能够传染家猪等其他猪科动物并造成其极高的病死率，是病毒的天然宿主，在 ASFV 进化和传播模型构建中发挥着重要的作用。

非洲猪瘟疫病毒的传播途径有三类，包括直接通过破损的伤口和口鼻接触传播，间接通过污染的运输设备、饲料、饮水、肉制品传播及生物媒介传播^[12]。商品贸易频繁高效和物联网的大背景下，人为因素导致 ASF 具有长距离甚至

跨大陆的传播能力。与其他国家间的传播相似，ASF 在国内的传播也呈现出长距离跳跃式扩散。ASFV 能够通过钝缘蜱属 (*Ornithodoros moubata*) 软蜱叮咬猪科动物进行传播。作为生物媒介，软蜱在感染后可以成为 ASFV 的储存宿主，病毒在其体内的存活时间最长可达数年之久，且可以传播给子代，这在 ASF 流行病学中具有重要意义^[13, 14]。

非洲猪瘟为世界动物卫生组织 OIE (Office international des épizooties) 规定的烈性传染病之一，发现疫情必须通报，对爆发非洲猪瘟的国家和地区实行一定的贸易限制，ASF 在我国为一级动物疫病。

OIE 官网 (https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/home) 发布非洲猪瘟病例及防控相关信息，以加强国际间合作。

1.2.2 非洲猪瘟病毒粒子及基因组结构

ASFV 作为一种大的双链 DNA 病毒，包括 125kb 的中心保守区域和两个多基因家族 (Multigene families, MGF) 构成的末端可变区域，其基因组全长在 170–193 kb 之间，含有 150–167 个开放阅读框 (Open reading frames, ORFs)，编码 150–200 种蛋白质^[15]非洲猪瘟病毒编码蛋白分布情况如图 1-3 所示。

根据 B646LJ 基因进行分型，可将 ASFV 分为 24 个基因型^[16]。不同基因型毒株的大小、毒力均有差别，按毒力分为强毒力毒株、中毒力毒株和弱毒力毒株。强毒株可引发急性感染，感染 4-9 天后病死率高达 100%。我国非洲猪瘟疫情的主要致病毒株经分离验证为 II 型毒株 (China/2018/AnhuiXCGQ)，经比对与 POL/2015/Polaskie 株高度相似^[17]。病毒的基因表达受到严格的时间空间调节，早期与后期间互相调控，早期基因表达提供必需的中间体及酶^[18]。

利用冷冻电镜 (cryo-EM) 对病毒粒子的最新结构解析显示 ASFV 病毒粒子直径约 260-300 nm，与之前的 200nm 有较大差异，推测可能是由于样品制备中的脱水导致^[19]。ASFV 病毒粒子具有二十面体结构，如图 1-2 所示，由内至外依次为内核、内核心壳、核衣膜、内膜、蛋白衣壳、囊膜。内核由类核 (Nucleoid) 组成，包含早期 mRNAs 合成所需的元件、基因组及核蛋白；内核心壳主要由 pp220、pp62 等多聚蛋白构成；内膜为单质膜包含 p54、p17、p12 等蛋白。衣壳的主要成分为约占病毒粒子总量三分之一的 p72 蛋白^[20]。由于

病毒外围的双层囊膜保护，ASFV 病毒粒子具有非常高的稳定性，自然状态下有很强的生存能力，在 pH 3.9-11.5 的条件下，病毒活力不受影响。-70℃冷藏条件下，脾脏组织内 2 年内，血液中 18 个月内，病毒的感染能力均不受影响。温度持续 70℃高温 30 分钟可将病毒完全杀死^[21]。病毒粒子表面囊膜对酚氯、乙醚等有机溶剂敏感，常规次氯酸盐、福尔马林等消毒剂均可使病毒灭活。

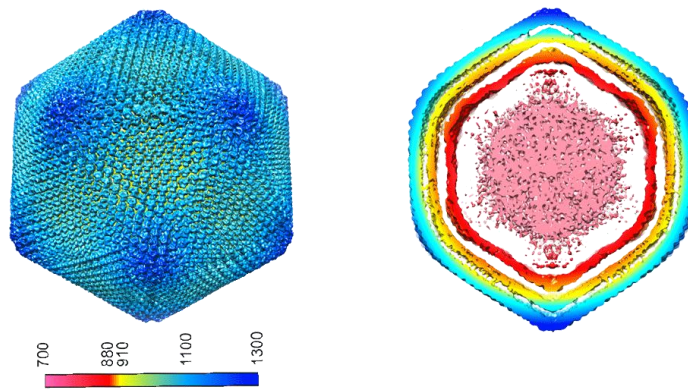


图 1-2 非洲猪瘟病毒颗粒结构^[19]

利用冷冻电镜对纯化的病毒颗粒进行结构解析，进一步解释了 ASFV 衣壳的组装模式。五邻体复合物与 p17、p49 和 M1249L 三种次要衣壳蛋白形成的复杂网络，可以维持和保证整个衣壳的稳定。p49 与膜结合介导五邻体复合物附着在内膜上并招募壳粒形成核心，继而启动组装。骨架蛋白 M1249L 附着在五邻体核心上，构建病毒骨架，确定颗粒尺寸，同时与 p17、五邻体核心一样，可以在内膜移动以完成更高阶的组装。在 p17 介导下壳粒、M1249L 和 p17 形成拉链结构，连接相邻的五邻体核心构建多面体框架。p72 在病毒表面形成同源三聚体，三聚体通过双果冻卷（double jelly-roll）的结构构成伪六聚体 p72 壳粒^[19]，其结构对基于抗原表位的免疫原设计，和 ASFV 疫苗的研发提供重要依据。

1.2.3 疫苗研究进展

疫苗的开发策略基本上可以分为以下几大类：传统灭活病毒疫苗、减毒活

ASFV 疫苗、基于哺乳动物表达质粒的 DNA 疫苗、重组腺病毒载体疫苗、重组蛋白亚基疫苗及以上各种的组合^[24]。

ASFV 传统灭活疫苗无法对机体提供有效保护^[22]，利用最新的二乙酰亚胺佐剂灭活疫苗也无法诱导机体产生保护性免疫反应，甚至产生抗体依赖的增强效应（antibody dependent enhancement, ADE）^[23]。ASFV 可以通过缺失 TK 基因或缺失免疫逃逸相关 NL 基因降低毒株毒力，基因缺失减毒毒株的安全性研究上显示出不同的结果，其中缺失 A276R 和 DP71L 的毒株降低了免疫保护能力^[24]缺失 NP71L 对不同毒株致弱效果差别较大。多基因缺失在不同方面和程度影响免疫原性。在毒力致弱保障安全性的同时，能够诱导保护性免疫反应十分重要^[25]。重组减毒疫苗的开发依赖于在猪原代巨噬细胞中随机发生的同源重组事件，导致从野生型 ASFV 病毒中纯化重组病毒有较大的难度。研究显示 CRISPR/Cas9 系统显著提高了重组 ASFVs 的开发效率，敲除 8-DR 基因，并用红色荧光蛋白（RFP）取代能够使病毒对猪红细胞的吸附能力丧失，从而阻止了结构的形成^[26]。

针对 ASFV 的亚单位疫苗、DNA 疫苗、重组腺病毒载体疫苗及相关组合疫苗均有不同程度的研究进展，但均仍需大量临床试验及审核评估。ASFV 疫苗研制的突破依赖于对 ASFV 进一步结构、功能、与宿主互作相关的研究。尤其病毒表面蛋白对于更好理解病毒侵染宿主细胞机制，提供靶点均有积极的作用。

1.2.4 药物及防控

在获得有效 ASFV 疫苗前，高效的诊断试剂与药物对于减少疫情的扩散十分重要。发现疫情后需迅速诊断、隔离、屠宰并正确处理受感染区域的所有动物^[27-29]。随后，必须对特定区域内的养猪场进行监视，以确保维护有效的安全区。

ASFV 具有许多复制所需的病毒特异性酶，包括 RNA 和 DNA 聚合酶，这些理论上是抗病毒药物开发的良好特异性靶标。几种化合物已显示抑制细胞培养中的 ASFV 复制^[30]，但尚未在猪中进行测试。目前针对 ASFV 可能有效的抗病毒药物包括：氧化芪三酚、非他汀类降血脂药物^[31]、异抗坏血酸钠^[32]、线粒体分裂抑制剂^[33]、丝氨酸硫醇蛋白酶抑制剂^[34]和吡啶酮酸类抗菌药^[35]等。

1.3 非洲猪瘟病毒蛋白

1.3.1 ASFV 主要结构蛋白

在非洲猪瘟病毒编码的 150–200 种蛋白质中，蛋白质组学分析鉴定出的 68 种蛋白质占 ASFV 基因组编码能力的 39%，这其中大部分是病毒的结构蛋白^[36]。ASFV 囊膜蛋白主要包括 CD2v、p54 (E183L)、p12 (O61R)、p17 (D117L)、p22 (KR177R)、EP248R、EP199L 和 PEP402R，其中 pE248R 和 pE199L 可能与病毒的入侵有关^[9]。两种多聚蛋白 p220 (CP2474L) 和 p62 (CP530R) 约占病毒蛋白总量的 32%，对 ASFV 的结构组装、亚细胞定位均有重要的作用。pp220 是病毒内核组成的必要蛋白之一，且为 pp62 蛋白加工的前体蛋白^[37]，pp62 与非洲猪瘟病毒晚期 DNA 复制相关，为晚期表达蛋白。两种多聚核蛋白体相互调控作用，为构成核壳样结构域的主要成分^[38]。

CD2v 蛋白与 T 细胞表面黏附因子 CD2 高度相似，是 ASFV 的重要保护性抗原。p54 是 ASFV 早期表达蛋白，位于内质网连接的内膜前体，在 ASFV 识别、侵染过程中发挥重要作用^[39]，能够诱导细胞凋亡。且 p54 作为理想的 ASFV 亚单位疫苗抗原，具有免疫原性，能够刺激特定免疫细胞引起免疫应答，并产生相对应的抗体^[40]。p12 是在 ASFV 成熟晚期的囊膜蛋白，能够使得易感细胞表面的特异性受体与病毒颗粒结合吸附。p17 同样为晚期表达蛋白，与 p54 功能相似，均是位于内质网连接的内膜前体，当晚期表达受到抑制时，pp220 和 pp62 的加工被阻断，导致病毒核壳样结构域无法形成，核芯缺陷^[40]。

衣壳蛋白主要包括 p72 (B646L) 和 p49 (pB438L)。p72 是 ASFV 晚期表达蛋白，在 ASFV 结构组成蛋白种所占比重较大，对 ASFV 表面结构的形成十分重要^[41]。p72 蛋白结构保守度高，且具有较高的免疫原性，同样是理想的 ASFV 亚单位疫苗抗原。P49 位于病毒二十面体的端点附近，但预测结果显示无疏水区，推测可能是通过与内膜脂质或蛋白相互作用从而表现为完整的膜蛋白，缺乏 p49 会导致二十面体对称性消失。

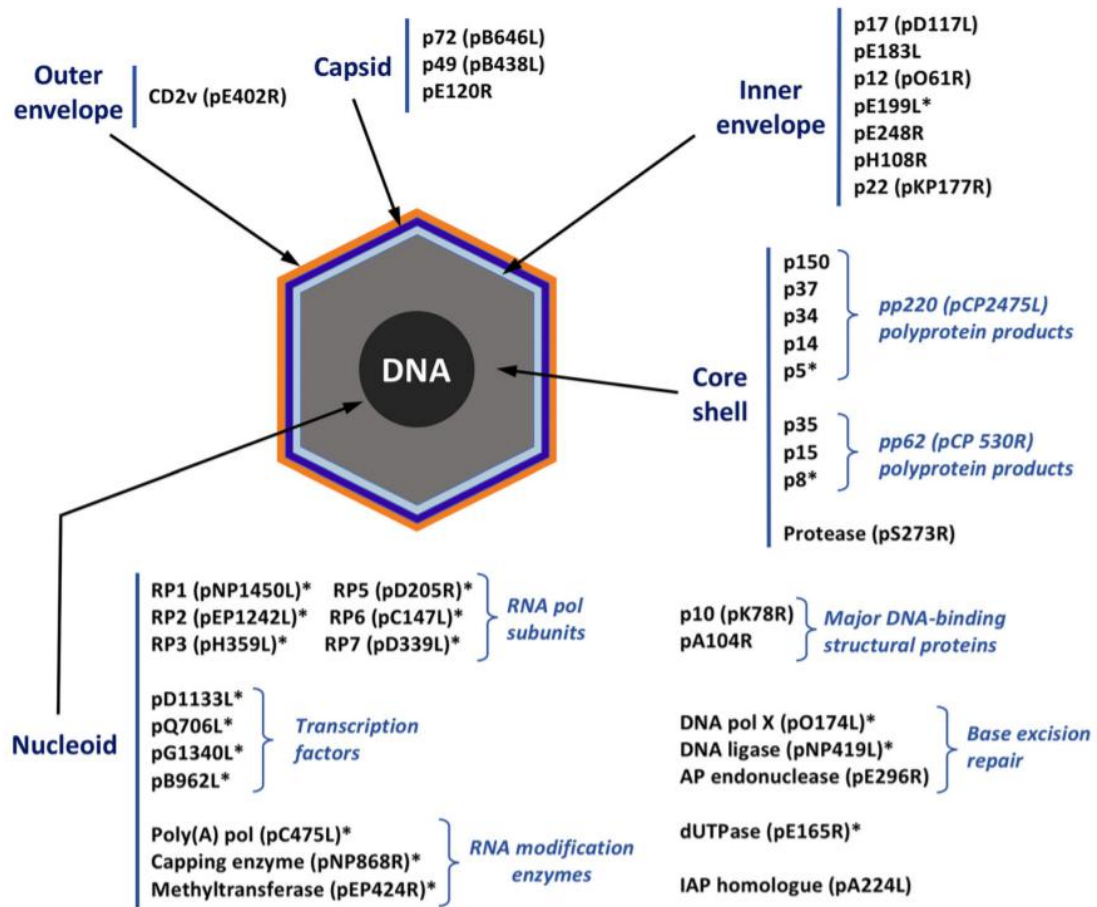


图 1-3 非洲猪瘟病毒编码蛋白分布示意图^[36]

1.3.2 ASFV 编码复制修饰转录相关蛋白

除占比 24%的 ASFV 基因组编码的结构蛋白外，19%的 ASFV 基因组用来编码 mRNA 转录因子和修饰酶^[36]，特殊的转录机制使 ASFV 能够独立于宿主细胞进行转录，依赖性相对较低，保证严格的时控调节，使得基因准确表达。

ASFV 基因组编码与 mRNA 合成相关的 RNA 聚合酶亚基主要包括 D339L、NP1450L (RP1)、EP1242L (RP2)、H359L (RP3)、D205R (RP5)和 C147L (RP6)。ASFV 基因组编码的 mRNA 修饰酶包括加帽酶 pNP868R、甲基转移酶 pEP424R 和多腺苷二磷酸核糖聚合酶 pC475L 等^[42]。还有转录因子 pG1340L

和解旋酶 pD1133L。此外 pB962L 和 pQ706L 预测发现含有解旋酶结构域，这意味着可能在病毒转录的起始和终止种发挥^[43]。

ASFV 病毒含有对多种 DNA 损伤切除修复系统，包括 DNA 连接酶 pNP419L、聚合酶 pO174L 和核酸内切酶 pE296R、dUTP 酶 pE165R，共同作用，修复巨噬细胞在强氧化环境中造成的 DNA 损伤，以确保 ASFV 基因组复制的准确和病毒基因组完整性^[44-45]。pE165R 可以在低 dUTP 浓度下减少碱基错配几率。DNA II 型拓扑异构酶 p1192R、DNA 聚合酶 pG1207R 和引物酶 pC962R 均与 ASFV DNA 复制有关^[43]。

1.3.3 免疫逃逸相关蛋白

ASFV 编码多种免疫逃逸蛋白，约有 3% 的 ASFV 基因组用来编码免疫逃逸宿主防疫相关蛋白。为了更充分的利用宿主细胞避免被清除，ASFV 通过多通路抑制宿主细胞过激免疫应答系统和病毒清除系统，具体包括：抑制细胞凋亡、抑制干扰素产生、调控核酸转录、调节细胞凋亡、抑制蛋白质的合成，为病毒在宿主细胞内的扩增创造有利环境。调控细胞凋亡相关蛋白包括 p54、A179L、A224L 和 EP153R 等；细胞因子的转录相关蛋白包括 DP71L 和 A238L 蛋白；多基因家族 MGF360、MGF505/530、DP96R 和 I329L 蛋白等抑制干扰素信号通路^[44]。

ASFV 两端可变区编码几个多基因家族蛋白，包括 MGF360、MGF505/530、MGF100、MGF110 和 MGF300 等，其中 MGF360 和 MGF505/530 参与调控降低宿主干扰素 (Interferons, IFN) 的表达、调控前炎性细胞活素表达，决定 ASFV 细胞嗜性，与 ASFV 在巨噬细胞内的复制转录密切相关，是 ASFV 的毒株毒力的决定因素^[45-46]。

I329L 蛋白是晚期表达蛋白，与 TLR 家族蛋白高度同源。与 TLR3 介导的固有免疫激活具有拮抗效应，抑制 NF- κ B 和 IRF3 信号通路，进而阻断下游转录因子的转录。A238L 蛋白为早期表达蛋白，通过占据钙调神经磷酸酶 (Calcineurin, CN) 与丝氨酸/苏氨酸底物结合位点，竞争性抑制结合。与 I329L 蛋白相似，同样可以抑制 NF- κ B 通路及转录^[47]。pEP153R 在病毒感染早期和晚期均有表达，也被称作 C 型凝集素蛋白，作为多功能蛋白降低细胞 MHC-1 的表达及细胞凋亡。

1.4 非洲猪瘟病毒蛋白的结构生物学研究

目前仍有大多数 ASFV 基因编码的蛋白功能尚不清楚，只有极少数蛋白的结构被解析出来，截至 2020 年 5 月 PDB 数据库显示八种蛋白 pB119L、A179L、A238L、NP419L、pA104R、pS273R、E165R、B646L (p72) 的三十余种形态结构被解析，其中半数以上的蛋白结构为近一年的研究结果。蛋白结构的解析对研究蛋白功能，作用结合位点，以及相关疫苗药物的开发，均有重要意义。

ASFV pB119L 的结构中发现其交替二聚模式并不是所有病毒巯基氧化酶的特征，这个发现显示了大的双链 DNA 病毒的潜力，它们比宿主有更快的突变率和结合宿主基因的趋势，开辟了新的蛋白质折叠和自组装模式^[48]。

ASFV E165R 基因编码 ASFV dUTPase 的形成，通过对 dUTPase-dUMP-Mg²⁺复合物结构的解析，揭示了与经典同型三聚体 dUTPase 不同的非经典折叠模式，其活性位点由两个亚基组成，如图 1-4 所示。轴通道内的非保守残基在 ASFV dUTPase 同型三聚体稳定性中起着至关重要的作用。对 ASFV dUTPase 独特结构特征的发现可用于设计潜在的特异性抑制剂^[49]。

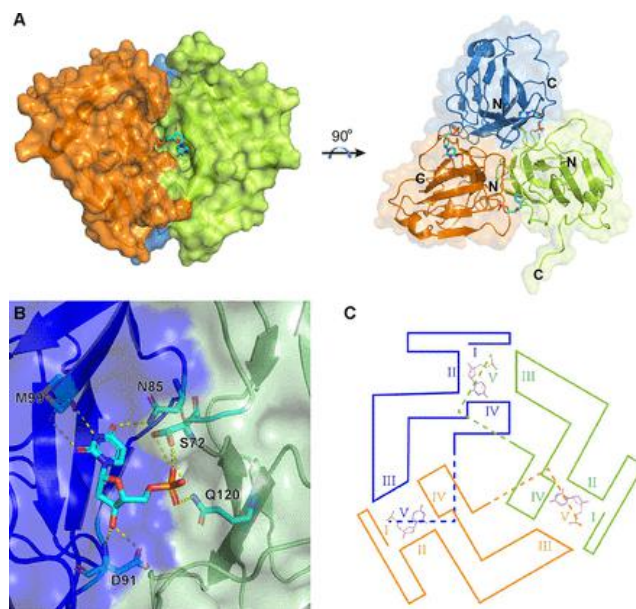


图 1-4 非洲猪瘟病毒 dUTPase-dUMP-Mg²⁺复合物晶体结构^[49]

pA104R 与细菌 HU / IHF 家族成员高度同源，对于病毒的复制至关重要。pA104R 的 apo 态晶体结构揭示了细菌热不稳定类核蛋白/整合宿主因子 (HUs / IHFs) 中保守结构，pA104R-DNA 复合物结构揭示了 pA104R 具有与其细菌同源物不同的 DNA 结合模式，突显了 pA104R-DNA 相互作用在 ASFV 复制周期中的重要性，并为 ASFV 化疗提供了抑制剂^[50]。

ASFV NP419L 基因编码 ASFV 连接酶的形成。复旦大学生命科学学院遗传工程国家重点实验室在 2017 年发表的文章中解析了 DNA 聚合酶底物复合物的晶体结构；这些结构显示了位于 ASFV DNA 聚合酶手指区域的独特 5'-p 结合区。ASFV 连接酶是迄今为止发现的最小的 DNA 连接酶之一^[51]。该课题组 2019 年的研究中，用 X-射线晶体学方法解析了连接酶与各类 DNA 复合物的晶体结构，揭示了 ASFV DNA 连接酶结合和催化底物连接的分子机制，为 ASFV DNA 修复途径药物设计提供结构基础^[52]ASFV DNA 连接酶复合物结构如图 1-5 所示。

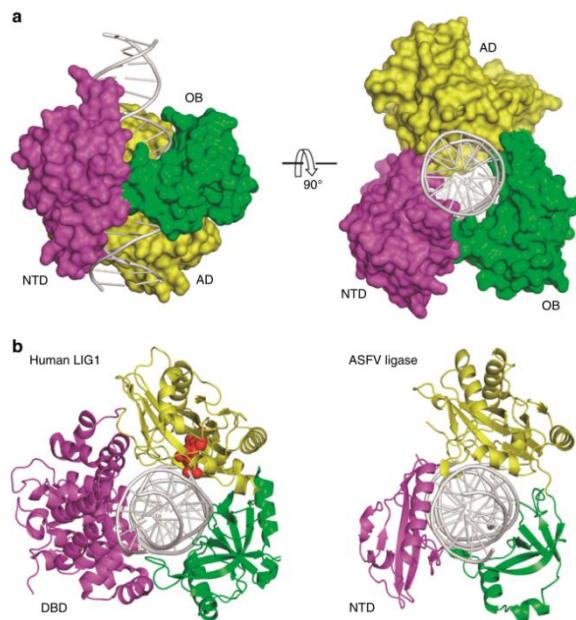


图 1-5 非洲猪瘟病毒 DNA 连接酶与不同类型 DNA 复合物的结构^[52]

A238L 通过占据关键的底物识别位点竞争性抑制 CN。A238L-CN 复合物的结构揭示了 CN 如何识别 A238L 中底物基序残基。根据此研究能够建模与 CN 结合的肽底物，从而预测与底物的相互作用，并为基于结构的新型 CN 抑制剂开发奠定了基础^[53]。

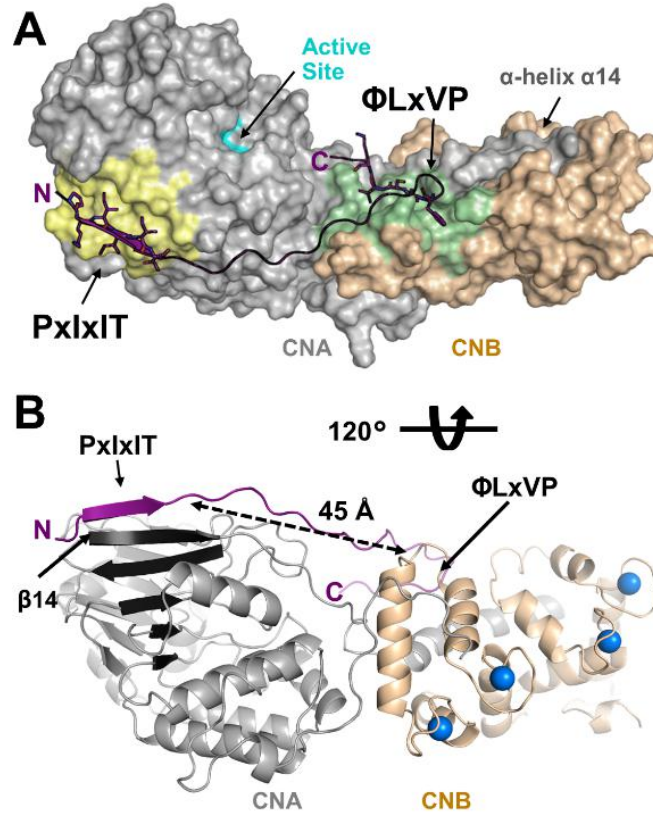


图 1-6 非洲猪瘟病毒 CN-A238L 复合物的晶体结构^[53]

pS273R 是一种特定的 SUMO-1 半胱氨酸蛋白酶，催化 pp220 和 pp62 蛋白前体的成熟。ASFV pS273R 蛋白酶的晶体结构显示其具有两个结构域的结构，如图 1-6 所示。这与 SUMO 蛋白酶家族的其他成员区分开，而 ASFV 中独有的“臂结构域”在维持 ASFV pS273R 的水解酶活性中起重要作用。对靶向底物结合口袋的拟肽化合物发挥了显著的抑制作用，可用于抗 ASFV 药物的开发^[54]。

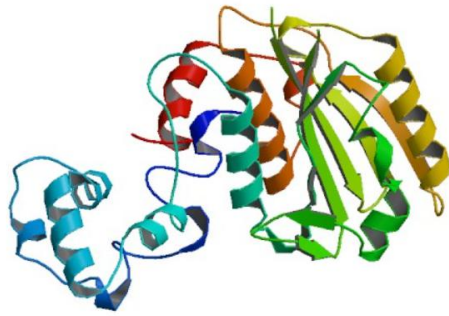


图 1-7 非洲猪瘟病毒 pS273R 的晶体结构^[54]

ASFV 衣壳蛋白 p72 的高分辨率结构揭示了 ASFV 可能的组装模式，在不借助辅助蛋白 B602L 的情况下，p72 蛋白无法进行正确折叠。冷冻电镜结构显示三个 p72 分子形成了稳定的三聚体形式如图 1-5 所示，通过双果冻卷(double jelly-roll)结构形成了一个伪六聚体锚定在病毒的内膜上。推测此前针对 ASFV p72 蛋白靶点设计的亚单位疫苗研究出现瓶颈的原因可能是由于未获得正确折叠的 p72 蛋白。正确构象的 p72 蛋白结构的解析对于 ASFV 亚单位疫苗及靶向病毒衣壳组装药物的开发均有积极的作用^[55]。

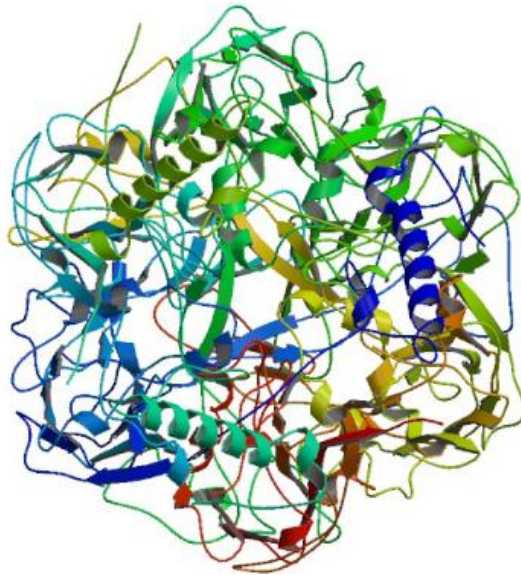


图 1-8 非洲猪瘟病毒衣壳蛋白 p72 三聚体冷冻电镜结构^[55]

1.5 本文的主要研究内容

非洲猪瘟病毒的基因组约 170-193 kb，结构相对庞大，在病毒基因组编码的 150-200 种蛋白中只有少数功能已知，极少数非洲猪瘟病毒蛋白结构被解析。本课题对几种非洲猪瘟蛋白进行了筛选、表达和纯化并进行了初步结晶筛选。深入研究非洲猪瘟病毒蛋白的结构，对编码蛋白功能的研究、作用结合位点靶点的确定以及相关疫苗药物的开发，均有重要的意义。

本课题的研究内容是在哺乳动物细胞表达体系中，根据蛋白特性及所处的环境的生物信息学预测选择是否带有信号肽的表达载体，并通过 PCR、酶切、连接、转化的方式构建克隆。利用 MBP 标签稳定和下游 ASFV 蛋白的表达。采用 FSEC（荧光检测分子筛）进行 ASFV 蛋白表达的检测，继而可以在小量表达的情况下完成对 ASFV 蛋白的表达筛选。

对于在筛选中表达情况良好的 ASFV 蛋白，进行表达纯化的优化和结晶尝试。分别在哺乳动物细胞表达体系、昆虫细胞表达体系及原核表达体系中进行 ASFV 蛋白的表达，完成表达体系的优化。尝试构建不同标签的表达载体，利用不同的纯化方法进行纯化，得到能够稳定表达且构象稳定的蛋白，完成纯化方式的优化。并对能够稳定表达、构象稳定的蛋白进行结晶初筛。

1.6 本文的技术路线

本文的技术路线如下图 1-9 所示。

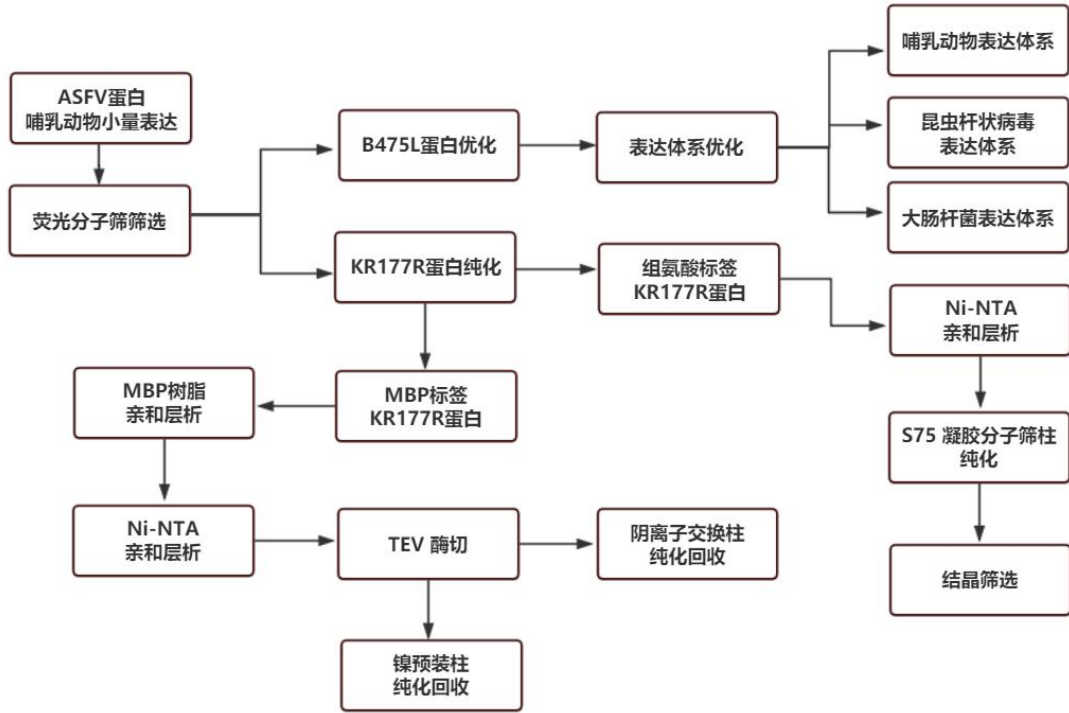


图 1-9 本文技术路线图

第 2 章 实验试剂与方法

2.1 实验材料

实验所用到的表达载体，哺乳动物表达载体：pCMHG、pCMHG-S6；昆虫表达载体：pFB19、pFB19-S6、pFastbac；原核表达载体：pET26b、pET26b-S6、pRSF。实验采用的感受态细胞：DH5 α （Thermo Fisher）、Rosetta2、DH10bac。实验用于表达目的蛋白的哺乳动物细胞：293F，用于表达目的蛋白的昆虫细胞：Sf9。

2.2 实验试剂

实验所需的商品试剂及生产公司、常用试剂储存浓度及所需溶液配方如表 2-1、表 2-2 和表 2-3 所示。

表 2-1 所需试剂及生产厂商

试剂名称	生产公司
丁酸钠	Alphabio
Transfection Medium	Thermo Scientific
Cellfectin Reagent	Thermo Scientific
HEK293 培养基	Thermo Scientific
昆虫细胞培养基	Thermo Scientific
溶菌酶	Alphabio
DNA 酶	Alphabio
Phusion 高保真 DNA 聚合酶	Thermo Scientific
四种脱氧核苷酸复合物（dNTPs）	Alphabio
Phusion 高保真缓冲液	Thermo Scientific
FastDigest 限制性快速内切酶	Thermo Scientific
二甲基亚砷（DMSO）	Thermo Scientific
PCR 引物	吉林库美生物科技有限公司
琼脂糖	Amresco
琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	Thermo Scientific
质粒小量提取试剂盒	BIOMIGA
无内毒素质粒小量提取试剂盒	BIOMIGA
质粒大量提取试剂盒	BIOMIGA

表 2-1 (续表)

试剂名称	生产公司
无内毒素质粒大量提取试剂盒	天根生化科技有限公司
感受态细胞制备试剂盒	Sangon Biotech
T4 连接酶	Thermo Scientific
T4 连接缓冲液	Thermo Scientific
碱性磷酸酶 FASTAP	Thermo Scientific
闪电克隆试剂盒	北京博奥龙免疫技术有限公司
Generuler 1KB plus DNA ladder	Thermo Scientific
6×loading buffer	康为世纪
MBP 树脂	GenScript
Ni-NTA 树脂	GenScript
无血清细胞冻存液	新赛美生物科技有限公司
PEG3350	阿拉丁试剂有限公司
盐酸	天津科密欧化学试剂有限公司
异丙基硫代半乳糖苷	阿拉丁试剂有限公司
HR2-144 Index 结晶试剂盒	Hamton Research
JCSG-plus MD1-37 结晶试剂盒	Hamton Research

表 2-2 常用储存试剂浓度

Table 2-2 Common storage reagent concentration

试剂	储存浓度
卡那霉素 (Kan)	50 mg/mL
羧苄青霉素 (Carb)	50 mg/mL
氯霉素 (Chl)	34 mg/mL (溶于无水乙醇)
链霉素 (Str)	50 mg/mL
丙烯酰胺	30%
过硫酸铵 (Ap)	10%
十二烷基磺酸钠 (SDS)	10%
异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)	1 mol/L
苯甲基磺酰氟 (PMSF)	100 mmol/L (溶于无水乙醇)
Tris-HCl pH 7.8	1 mol/L
咪唑 (imidazole) pH 7.8	1 mol/L
氯化钠 (NaCl)	100 mmol/L (DEPC 水配置)
丁酸钠 (Sodium butyrate)	2 mol/L (DEPC 水配置)
乙醇	70% (DEPC 水配置)
氯化镁 (MgCl ₂)	1 mol/L (DEPC 水配置)
PEG3350	50% (DEPC 水配置)

表 2-2 (续表)

试剂	储存浓度
PEG4000	50% (DEPC 水配置)
氯化钙 (CaCl ₂)	1 mol/L (DEPC 水配置)
氯化锌 (ZnCl ₂)	1 mol/L (DEPC 水配置)
硫酸镁 (MgSO ₄)	1 mol/L (DEPC 水配置)

表 2-3 常用溶液配制组分

溶液	成分
LB 液体培养基	5 g/L Yeast Extract, 10 g/L NaCl, 10 g/L Trptone
LB 固体培养基	5 g/L Yeast Extract, 10 g/L NaCl, 10 g/L Trptone, 15 g/L 琼脂
SOC 液体培养基	5 g/L Yeast Extract, 20 g/L Trptone, 10 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl ₂ , 10 mmol/L MgSO ₄ , 20 mmol/L glucose
琼脂糖凝胶	0.9%琼脂糖 (1×TAE)
膜蛋白缓冲液	50 mmol/L Tris-HCL (pH 7.8) , 500 mmol/L NaCl, 5%甘油, 0.5 mmol/L DTT, 1% CHS, 0.1% LMNG
50×TAE 缓冲液	2 mmol/L Tris, 2 mol/L 乙酸, 50 mmol/L EDTA
还原性缓冲液	50 mmol/L Tris-HCL (pH 7.8) , 500 mmol/L NaCl, 5%甘油, 1 mmol/L DTT
非还原性缓冲液	50 mmol/L Tris-HCL (pH 7.8) , 500 mmol/L NaCl, 5%甘油
还原性镍树脂缓冲液	50 mmol/L Tris-HCL (pH 7.8) , 500 mmol/L NaCl, 5%甘油, 20 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L DTT
非还原性镍树脂缓冲液	50 mmol/L Tris-HCL (pH 7.8) , 500 mmol/L NaCl, 5%甘油, 20 mmol/L 咪唑
还原性镍树脂洗脱液	50 mmol/L Tris-HCL (pH 7.8) , 500 mmol/L NaCl, 5%甘油, 500 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L DTT
非还原性镍树脂洗脱液	50 mmol/L Tris-HCL (pH 7.8) , 500 mmol/L NaCl, 5%甘油, 500 mmol/L 咪唑
还原性麦芽糖洗脱液	50 mmol/L Tris-HCL (pH 7.8) , 500 mmol/L NaCl, 5%甘油, 20 mmol/L 麦芽糖, 1 mmol/L DTT
非还原性麦芽糖洗脱液	50 mmol/L Tris-HCL (pH 7.8) , 500 mmol/L NaCl, 5%甘油, 20 mmol/L 麦芽糖
50×TAE 缓冲液	2 M Tris, 2 M 乙酸, 50 mmol/L EDTA
SDS 缓冲液	0.25 mol/L Tris base, 1% SDS, 1.92 mol/L 甘氨酸
阴离子交换柱 Buffer A	20 mmol/L Tris-HCL (pH 8) , 5%甘油

表 2-3 (续表)

溶液	成分
阴离子交换柱 Buffer B	20 mmol/L Tris-HCL (pH 88) , 1 M NaCl, 5%甘油
镍预装柱 Buffer A	50 mmol/L Tris-HCL (pH 7.8) , 500 mmol/L NaCl, 5%甘油, 20 mmol/L 咪唑
镍预装柱 Buffer B	50 mmol/L Tris-HCL (pH 7.8) , 500 mmol/L NaCl, 5%甘油, 500 mmol/L 咪唑
结晶分子筛缓冲液	10 mmol/L HEPS , 150mM NaCl, 1%甘油
考马斯亮蓝染色液	0.1% 考马斯亮蓝 R-250, 25% 乙醇, 10% 冰醋酸
LB 固体培养基	5 g/L Yeast Extract, 10 g/L NaCl, 10 g/L Trptone, 15 g/L 琼脂
SOC 液体培养基	5 g/L Yeast Extract, 20 g/L Trptone, 10 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl ₂ , 10 mmol/L MgSO ₄ , 20 mmol/L glucose

2.3 实验仪器

实验中所采用的仪器见表 2-4

表 2-4 实验所需仪器设备及其生产厂家

仪器型号/名称	生产厂家
JY92-IIDN 型超声波细胞粉碎机	宁波新芝生物科技股份有限公司
UV-1800 紫外分光光度计	天力科技有限公司
MINIC-1001 迷你金属浴	杭州米欧仪器有限公司
DK-80 电热恒温水槽	上海精宏实验设备有限公司
VM-80 垂直旋转混合仪	杭州米欧仪器有限公司
MDF-25V278W 医用低温保存箱	安徽中科都菱商用电器股份有限公司
ZK-26/100 真空泵	杭州米欧仪器有限公司
JA31002 电子天平	上海舜宇恒平科学仪器有限公司
ME104/02 电子天平	梅特勒-托利多仪器有限公司
SP-25 磁力搅拌器	杭州米欧仪器有限公司
N60 TOUCH 超微量分光光度计	天力科技有限公司
梯度 PCR 仪	T100 Thermal Cycler
冷冻高速离心机	Thermo Fisher
DH5000B 电热恒温培养箱	天津市泰斯特仪器有限公司
HZQ-C 空气浴振荡器	哈尔滨市东联电子技术开发有限公司
JY92-IIDN 型超声波细胞粉碎机	宁波新芝生物科技股份有限公司
DY89-II 电动玻璃匀浆机	宁波新芝生物科技股份有限公司
TS-2 脱色摇床	厦门市其林贝尔仪器制造有限公司

表 2-4 (续表)

仪器型号/名称	生产厂家
迷你金属浴	杭州米欧仪器有限公司
超速离心机	Beckman
全自动蛋白质结晶工作站	ART
洁净工作台	北京东联哈尔仪器制造有限公司
TSE600V 低温保存箱	赛默飞世尔科技有限公司
ZQZY-AS8 振荡培养箱	上海知楚仪器有限公司
LDZH-150L 立式高压蒸汽灭菌器	上海申安医疗器械厂
AKTA purifier 层析仪	GE Healthcare
分子筛柱 (Superdex200 Increase 5/150G)	GE Healthcare
分子筛柱 (Superdex200 Increase 10/300G)	GE Healthcare
分子筛柱 (Superdex75 10/300G)	GE Healthcare
阴离子交换柱 (HiTrap Q HP 1mL)	GE Healthcare
镍预装柱 (HisTrap 5mL)	GE Healthcare
大容量离心机 (6L)	Thermo
大容量离心机 (16L)	Thermo
高速离心机	Thermo

2.4 实验方法

2.4.1 目的片段的获得

ASFV 的部分膜蛋白包括许多不规则和低复杂度的序列区域, 这些因素对于蛋白结晶都是不利的, 且根据跨膜区预测部分 ASFV 蛋白为单次跨膜, 膜蛋白主要功能部位为膜外水溶性片段, 因此对膜蛋白膜外区域的结构研究, 对 ASFV 侵染识别检测的相关研究可能具有十分重要的意义。

本实验通过聚合酶链式反应 (PCR) 获得 ASFV 水溶性片段所用到的引物序列如表 2-5, 所采用的反应体系如表 2-6, 所采用的设定参数如表 2-7。本实验通过从原载体双酶切获得 ASFV 全长基因。

2.4.1.1 引物设计

利用常用引物序列设计软件 Primer Premier5 对 ASFV 基因片段 CP123L、X69R、EP152R、E199L、E66L、E183L、I329L、B475L、C84L、C217R、E248R、KR177R、MGF110-1L、B169L、O61R、EST-B 进行序列分析, 确定是否含有 *Bam*HI、*Xho*I 酶切位点及特殊结构。并对跨膜区预测结果单次跨膜, 且膜外水溶性部分可能与 ASFV 侵染识别检测相关的 E248R、KR177R、I329L、

MGF110-1L 的去跨膜区水溶性片段进行引物设计，并添加与载体重叠区域，以便闪电克隆连接效率。引物由吉林库美生物有限公司合成，浓度 10 mmol/L，-20℃储藏。

表 2-5 引物序列

名称	序号	序列
E248R	E248R-NT-BF	CTTCCAAGGTGGTGGAGGATCCACG ACCAACATTATCAGCAATTCC
	E248R-NT-XR	AGAAGATATCGTTCAGACCGCTCGAGTC AGTTTTTAAAAACAGCCGAAATTGCGTC
KR177R	KR177R-NT-BF	CTTCCAAGGTGGTGGAGGATCCCAACAAC CACCGAAAAAGGTCTG
	KR177R-NT-XR	AGAAGATATCGTTCAGACCGCTCGAGTCA TTATGCATGTTTATGATTTCTAGGT
I329L	I329L-NT-BF	CTTCCAAGGTGGTGGAGGATCCGGTAG GATTAAACCACAGGTCACC
	I329L-NT-XR	AGAAGATATCGTTCAGACCGCTCGAGTCAA CGTTCGGTATTTTTCTTAGCTATCAATTG
MGF110-1L	MGF110-1L-NT-BF	CTTCCAAGGTGGTGGAGGATCCGAGCTAGA GCTCCTGGATCTAACA
	MGF110-1L-NT-XR	AGAAGATATCGTTCAGACCGCTCGAGT CACTATGGGGGAATCATCTTAAAAACCTTA
E199L	E199L-NT-BF	CTTCCAAGGTGGTGGAGGATCCTCTT GCATGCCAGTTTCCACG
	E199L-NT-XR	AGAAGATATCGTTCAGACCGCTCGAGTC ACGTATTTATAACGCTGTTGCAGTTG

2.4.1.2 PCR 反应获得目的片段

聚合酶链式反应（PCR）是对目的片段进行大量拷贝的常用方法。其原理是模拟体内基因复制环境，寡核苷酸引物序列与目的片段两端的核苷酸互补，聚合酶链式反应一般需要进行：变性、退火、延伸三步反应。50 μL 反应体系如表 2-6，所采用的设定参数如表 2-7。

表 2-6 PCR 反应体系

试剂	模板	正向引物	反向引物	PFU	PFU buffer	dNTPs	DMSO	ddH ₂ O
体积	1 μL	4 μL	4 μL	0.5 μL	10 μL	2.5 μL	1.5 μL	26.5 μL

表 2-7 PCR 设定参数

反应阶段	预变性	变性	退火	延伸	延伸	保温
反应温度	98°C	98°C	60°C	72°C	72°C	4°C
反应时间	1 min	20 s	30 s	1 min	2 min	60 min
循环数	-		35		-	-

2.4.1.3 琼脂糖凝胶电泳

①制备琼脂糖凝胶：向锥形瓶中加入 200 mL 1×TAE 溶液，加入电子天平称取的 1.8 g 琼脂糖。微波炉加热 5 分钟至琼脂糖完全融化相均匀，晃动锥形瓶，待温度降至 45°C 左右时加入 17 μ L 荧光染料，混匀后倒入胶槽，插好胶梳，待胶液完全凝固后取用；

②向 DNA 中加入 6×DNA Loading，均匀混合后加入到琼脂糖凝胶孔中，设置电泳仪参数，电压 160 V，时间 20 分钟；

③取出琼脂糖凝胶，在紫外的照射下与 DNA Maker 大小比对确定是否为所需 DNA 条带，切割带有目的条带的琼脂糖凝胶块。

2.4.1.4 琼脂糖凝胶回收

①准备一个干净的 1.5 mL 离心管，称量并记录其重量。将切好的目的片段核酸凝胶放在准备好的 1.5 mL 的小离心管中，再次称量，记录差值；

②按比例每 100 mg 琼脂糖加入 100 μ L Binding Buffer，金属浴 55°C 加热，每间隔 1-2 分钟取出震荡，至琼脂糖完全溶解；

③将溶液转移到 DNA 制备管中（放置在 2 mL 离心管中），13 000 x g 离心 1 分钟，倒掉过滤后的液体；

④将制备管放回 2 mL 离心管中，加入 100 μ L Binding Buffer，13 000 x g 离心 1 分钟，倒掉过滤液体；

⑤加入 700 μ L Wash Buffer，13 000 x g 离心 1 分钟，倒掉滤液；

⑥空管 13 000 x g 离心 1 分钟，液体挥发；

⑦制备管放在新的 1.5 mL 离心管，在制备膜中央加入 20 μ L Elution Buffer，静置 1 分钟，13 000 x g 离心 1 分钟，得到目的 DNA，微量紫外分光光度计测浓度并标注备用。

2.4.2 克隆的构建

闪电克隆试剂盒（Lightening Cloning Kit）相较传统限制性酶切-连接体系，操作更简易，所需试剂更少，PCR 获得的目的基因片段无需酶切处理。线性载

体和 DNA 插入片段被切割，形成的单链粘端退火，进而共价结合。双酶切线性化载体的反应体系如表 2-8，载体如图 2-1。

将酶切体系置于 37°C 水浴锅中，酶切 15-20 分钟。在酶切体系中加入 DNA Loading，均匀混合后加入到琼脂糖凝胶孔中，设置电泳仪参数，电压 160 V，时间 20 分钟；在紫外切胶仪下切割目的载体片段，并回收，详细步骤见上文。

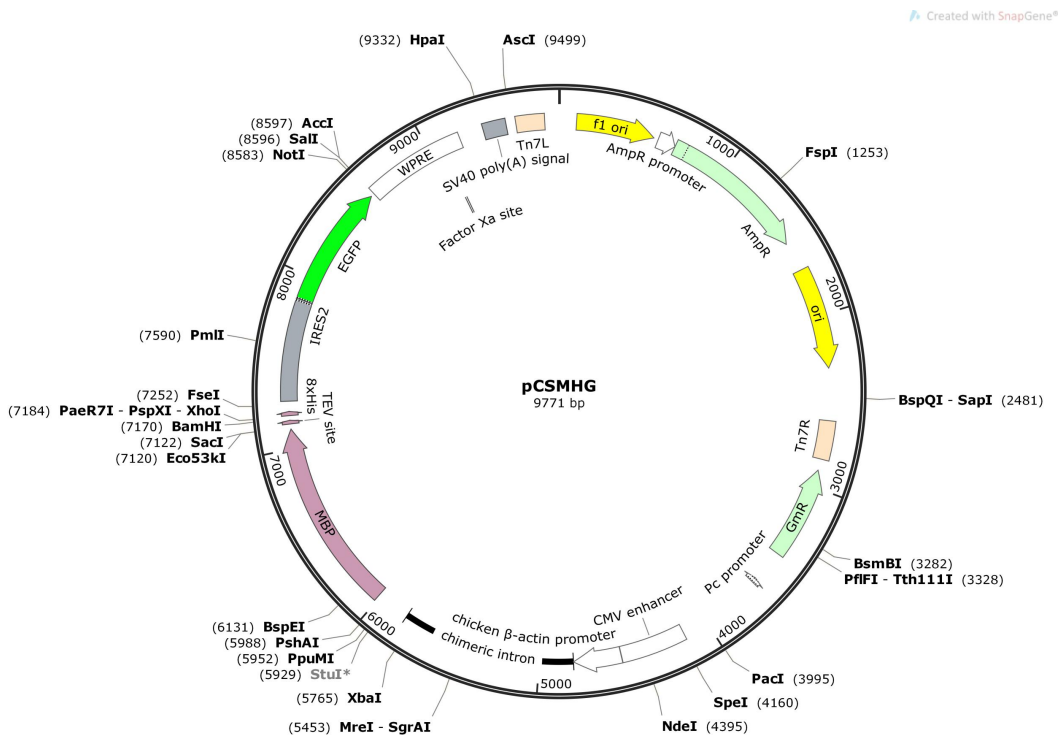


图 2-1 用于筛选的哺乳动物表达载体 PCMHG 示意图

表 2-8 双酶切反应体系

试剂	载体	10×FD buffer	<i>BamHI</i>	<i>XhoI</i>	DdH ₂ O
体积	5 μL	3 μL	1 μL	1 μL	20 μL

对于 PCR 获得的 ASFV 水溶性片段采用闪电克隆方式进行连接。将线性化载体片段与目的基因片段混合，为保证连接效率，载体与目的基因摩尔比为 2:1，混合液中加入等体积的闪电克隆试剂，50°C 金属浴放置 20 分钟完成后 -20°C 保存。

对于双酶切获得的 ASFV 全查片段采用 T4 连接酶进行连接。将线性化载体片段与目的基因片段混合，为保证连接效率，载体与目的基因摩尔比为 1:3，

混合液中按比例加入 T4 连接酶和缓冲液，16°C 金属浴放置 20 分钟或 4°C 酶切过夜。完成后 -20°C 保存。

2.4.3 重组连接产物的转化

- ①冰上溶解 10 μL DH5 α 感受态细胞；
- ②加入 1 μL 冰预冷的连接反应液。用移液枪轻轻吹打，或手指轻拨管壁混匀，无需振荡；
- ③冰上静置 30 分钟；
- ④42°C 水浴锅中热激 45 秒；
- ⑤冰上放置 3 分钟；
- ⑥加入 500 μL 的 SOC 培养液（不含抗生素）；
- ⑦37°C 摇床中振荡（250 r/min）培养 50 分钟；
- ⑧取 100 μL 菌液玻璃珠法涂在含抗生素的平板上；
- ⑨37°C 培养箱倒置培养过夜。

2.4.4 质粒的提取与验证

2.4.4.1 质粒小提

- ①挑选单个菌落接种于 5 mL 含相应抗生素的 LB 培养液中，37°C、250 r/min 培养 12 小时；将菌液以 4000 r/min 离心 10 分钟，倒掉上清；
- ②加 250 μL Buffer A1（加 RNase A）充分悬浮；
- ③加 350 μL Buffer B1，温和并充分地上下翻转 5-10 次，混合均匀，静置 2-5 分钟，至溶液粘稠而澄清；
- ④加 250 μL Buffer N3，立即翻转 5 次，用手用力晃 3-5 次，混匀，会有白色沉淀，13 000 $\times g$ 离心 10 分钟；
- ⑤将 DNA 柱插入到 2.0 ml collection Tube 收管中，转移上清至 DNA 柱中，室温下 13 000 $\times g$ 离心 1 分钟，倒掉废液；
- ⑥向 DNA 柱中加 500 μL Buffer KB 室温 13 000 $\times g$ 离心 1 分钟；
- ⑦向 DNA 柱中加 600 μL DNA Wash Buffer 室温 13 000 $\times g$ 离心 1 分钟，重复此步骤；
- ⑧13 000 $\times g$ 室温下，开盖离心 5 分钟；
- ⑨将 DNA 柱转至 1.5 mL 的离心管中，向 DNA 柱中加入 60 μL 的 Endofree Elution buffer，室温放置 1 分钟，13 000 $\times g$ 离心 1 分钟。

2.4.4.2 无内毒素质粒小提

①挑选单个菌落接种于 5 mL 含相应抗生素的 LB 培养液中, 37 °C、250 r/min 培养 12 小时;将菌液以 4000 r/min 离心 10 分钟, 倒掉上清;

②加 450 μ L Buffer A1 (加 RNase A) 充分悬浮;

③加 450 μ L Buffer B1, 温和并充分地上下翻转 5-10 次, 混合均匀, 静置 2-5 分钟, 至溶液粘稠而澄清;

④加 100 μ L Buffer N3, 立即翻转 5 次, 用手用力晃 3-5 次, 混匀, 会有白色沉淀, 13 000 \times g 离心 10 分钟;

⑤转至新的 2ml 管中, 加入 0.1 倍体积的 EndoClean Buffer (100 μ L) 混匀后冰浴 10 分钟, 摇匀;恢复室温, 13 000 \times g 离心 10 分钟, 溶液分为两层, 上层水相含质粒, 下层红色有机相含内毒素;

⑥转至新的 2.0 mL 管中, 加 450 μ L Buffer N3 及 400 μ L 的 100% ethonal, 用手用力甩 3 次混匀;

⑦将 DNA 柱插入到 2.0 mL collection Tube 收集管中, 转移 700 μ L 溶液至 DNA 柱中, 室温下 13 000 \times g 离心 20 秒, 倒掉废液, 重复此步骤;

⑧向 DNA 柱中加 500 μ L Buffer KB 室温 13 000 \times g 离心 1 分钟;

⑨向 DNA 柱中加 600 μ L DNA Wash Buffer 室温 13 000 \times g 离心 1 分钟, 重复此步骤;

⑩13 000 \times g 室温下, 开盖离心 2 分钟, 将 DNA 柱转至 1.5 mL 的离心管中, 向 DNA 柱中加入 60 μ L 的 Endofree Elution buffer, 室温放置 1 分钟, 13 000 \times g 离心 1 分钟。

2.4.4.3 无内毒素质粒大量提取

①挑选单个菌落接种于 5 mL 含相应抗生素的 LB 培养液中, 5 小时后接种至 100 mL 含相应抗生素的培养液种, 37 °C、250 r/min 培养 12 小时;将菌液以 4000 r/min 离心 10 分钟, 倒掉上清;

②加 8 mL Buffer P1 (加 RNase A) 充分悬浮;

③加 8 mL Buffer P2, 温和并充分地上下翻转 5-10 次, 混合均匀, 静置 5 分钟;

④加 8 mL Buffer P4, 立即翻转 6-8 次, 用手用力晃 3-5 次, 混匀, 会有白色沉淀, 室温静置 10 分钟, 8 000 \times g 离心 10 分钟, 将溶液转移至 CS1 过滤器中, 滤液收集在干净的 50 mL 离心管种。

⑤加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇, 混匀后转移至吸附柱中 8 000 \times g 离心 2 分钟, 倒掉收集管中的废液并二次过柱;

⑥加入 10 mL Buffer PL 8000 x g 离心 2 分钟,倒掉收集管中的废液并重复;

⑦加入 3 mL 无水乙醇 8000 x g 离心 2 分钟,倒掉收集管中的废液,空离 5 分钟去除残留液体;

⑧将吸附柱转至新的 50 mL 的离心管中,向吸附柱中加入 1-2 的 Endofree Elution buffer,室温放置 5 分钟,8000 x g 离心 2 分钟,将全部液体转移至 2 mL 离心管中。

2.4.4.4 重组质粒双酶切验证

重组质粒双酶切验证的反应体系如表 2-9。将酶切体系置于 37°C 水浴锅中,酶切 15-20 分钟。在酶切体系中加入 6×DNA Loading,均匀混合后加入到琼脂糖凝胶孔中,设置电泳仪参数,电压 160 V,时间 20 分钟;在紫外切胶仪下与 Marker 对照观察目的片段大小。

表 2-9 双酶切验证反应体系

试剂	载体	10×FD buffer	<i>Bam</i> HI	<i>Xho</i> I	DdH ₂ O
体积	2 μL	3 μL	1 μL	1 μL	23 μL

2.4.5 哺乳动物体系瞬时转染表达

本实验采取聚乙烯亚胺(PEI)介导的瞬时转染,此方法具有较低的细胞毒性和较高的转染效率,具体步骤如下:

①铺细胞:在细胞状态良好处于对数生长期(2×10^6 个/mL)时铺板最佳,吸取 4×10^6 个细胞,16 mL 培养基放入培养皿中,37°C 二氧化碳培养箱静置 5 小时,使细胞贴壁;

②准备 8 μg 目的 DNA、800 μL NaCl 和 32 μL PEI 混合孵育 20 分钟,取出在 37°C 温浴好的培养液 7.2 mL 加入。将原有的培养液缓慢吸出,沿平皿内侧倒入充分混合的培养基,放入 37°C 培养箱中;

③5 小时后,更换培养皿中的培养液,加入新鲜的 24 mL 培养液和 1% 的抗生素;

④24 小时后加入终浓度为 5 mmol/L 的丁酸钠;

⑤12 小时后荧光显微镜下观察转染效率,并回收细胞。

2.4.6 蛋白收集及荧光检测分子筛筛选

2.4.6.1 膜蛋白收集

- ①将转染效率良好的细胞收集于离心管中，4°C，2000 r/min 离心 3 分钟；
- ②空离一次，尽可能吸掉细胞上的培养液；
- ③用 600 μL 蛋白纯化缓冲液重悬细胞，回收至 1.5 mL 离心管中，加入 15 μL 蛋白酶抑制剂；
- ④25% 功率超声破碎细胞 1 分钟，开 1 秒停 0.5 秒，为防止过热导致蛋白降解，超声破碎细胞全程需置于冰上；
- ⑤超声后，每管加入 60 μL 去垢剂（10%LMNG、1%CMS）混匀，放在 4°C 冷室孵育 1 小时
- ⑥4°C环境下 13 000 $\times g$ 离心 10 分钟，取上清。

2.4.6.2 胞外表达蛋白收集

- ①将转染效率良好的 HEK293F 细胞收集于离心管中，4°C，2000 r/min 离心 3 分钟；
- ②取上清二次离心，除去细胞；
- ③浓缩管中浓缩至 1 mL；
- ④4°C环境下 13 000 $\times g$ 离心 10 分钟，取上清。

2.4.6.3 荧光检测分子筛筛选

取 60 μL 蛋白加入 1 μL NF5K 蛋白(终浓度为 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)13 000 $\times g$ 离心 10 分钟，取上清作为样品，置于冰上。设置流速 0.3 mL/min，柱前压 3 MPa，平衡 Superdex200 Increase 5/150GL 分子筛柱，待基线平衡后上样。

2.4.7 细胞的传代冻存复苏

2.4.7.1 悬浮培养细胞的传代

无菌操作吸取 10 μL 细胞于血球计数板上，显微镜下计数细胞个数及状态，当细胞状态良好，浓度在 2×10^6 个/mL 左右时，可以进行传代。按细胞与培养基比例 1: 3 混合，放入 37°C 摇床中培养，注意全程无菌操作。

2.4.7.2 细胞的冻存

将 DMSO、血清、无血清培养基以 1:2:7 比例混合，配置冻存液备用。将细胞转移至离心管中，2000 r/min 离心 5 分钟，离心后弃上清，将细胞用冻存液重悬，注入冻存管；在冻存盒内降温后置于液氮中保存。

2.4.7.3 细胞的复苏

取冻存于液氮罐中的细胞，37℃震荡水浴解冻;立即离心（2000 r/min，10 分钟），倾去上清液；与温浴好的培养基混合加入摇瓶中，使细胞充分重悬，放入 37℃摇床中培养。

2.4.8 非洲猪瘟蛋白的表达优化

2.4.8.1 哺乳动物表达体系

将细胞培养至状态良好的对数生长期（ 2×10^6 个/mL）；准备 DNA、与 PEI 分别与培养基混合孵育 20 分钟，按 1: 2 混合后再次孵育 20 分钟，缓慢加入摇瓶，放入 37℃摇床中培养；5 小时后，按照 100: 1 加入抗生素;24 小时后加入终浓度为 5 mmol/L 的丁酸钠诱导表达;12 小时后荧光显微镜下观察转染效率，并回收细胞。

2.4.8.2 昆虫表达体系

将目的基因连接到经过改造的 pFB19 载体上（如图 2-2 所示）。将构造好的 pFB19 载体转化到 DH10bac 细胞中，SOC 培养基 37℃震荡培养 4 小时后玻璃珠法涂布于 Bac10 平板上。37℃培养 48 小时后挑取白斑于 5 mL 含抗生素的培养基中培养过夜。

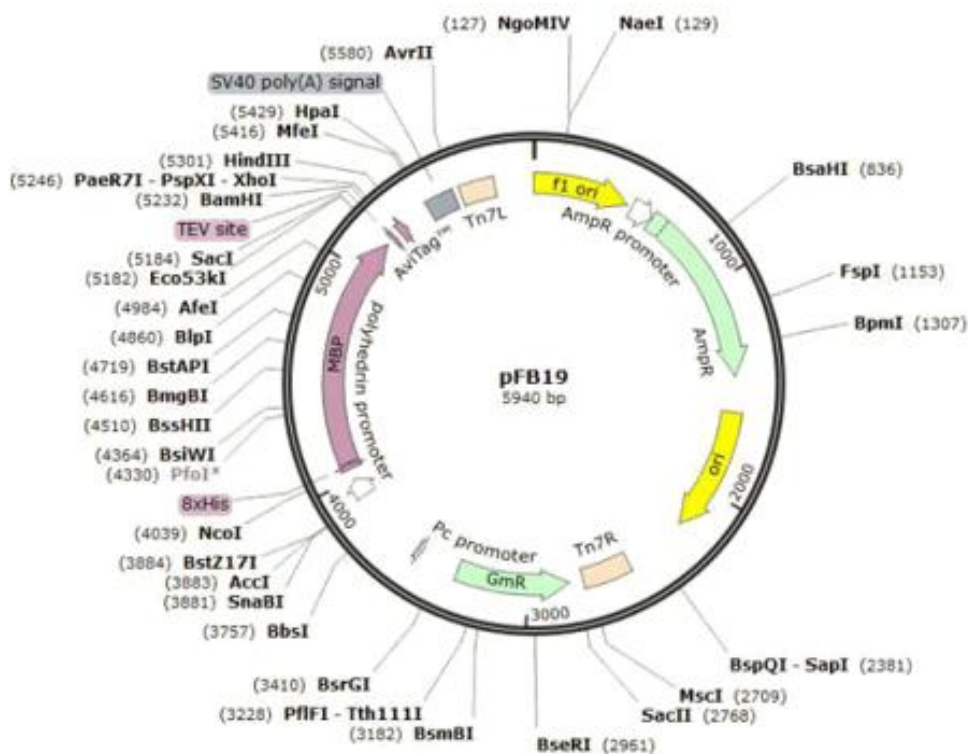


图 2-2 无信号肽胞内蛋白昆虫细胞表达载体 pFB19 示意图

按照质粒小提前序步骤提取质粒，离心去除蛋白絮状沉淀后，在上清中加入等体积的异丙醇，冰上放置 10 分钟。13 000 x g 离心 15 分钟沉淀 DNA，弃上清，吸除剩余液体；加 70%乙醇浸泡 5 分钟，13 000 x g 离心 1 分钟，吸去乙醇，留少量至细胞间内操作。无菌环境下吸干液体，开盖挥发，加 50 μ L lution Buffer 溶解半透明 DNA，轻轻振荡，稀释至终浓度为 1 μ g/ μ L。

在 Sf9 细胞状态良好处于对数生长期 (2×10^6 个/mL) 时铺细胞，每个六孔板中约 5×10^5 个，稀释至 2 mL。27 $^{\circ}$ C 培养箱中静置培养 2 小时，使细胞贴壁。2 μ g DNA 与 8 μ L Cellfectin Reagent 分别与 100 μ L Transfection Medium 混合，静置 5 分钟，混合后继续静置 20 分钟。将六孔板中的 2 mL 培养基吸出，加入 800 μ L Transfection Medium，将 DNA 缓慢加入。27 $^{\circ}$ C 培养箱中静置培养 5 小时后，吸出原有培养基，加入 3 mL 含 5% FBS 的培养基。

铝箔纸遮光培养 27 $^{\circ}$ C 培养箱中静置培养 3-4 天，显微镜下观察转染效率。吸取上清，2000 r/min 离心 5 分钟去除细胞，留上清病毒。80000 x g 超速离心 90 分钟，去上清取沉淀，pH 6.2 的 PBS 溶解后，0.22 μ m 滤膜过滤，获得一代虫病毒并置于 4 $^{\circ}$ C 保存。按照 200: 1 比例加入病毒进行扩增，同样方法收集获得二代昆虫病毒。用收获的病毒侵染宿主细胞，诱导表达。

2.4.8.3 原核表达体系

将目的基因连接到 pET-26b 载体如图 2-3 所示上，将其转化到 Rosetta2 中，挑取单菌落至 10 mL LB 培养基中（含抗生素）培养五个小时左右，将其转入 800 mL LB 培养基中（含抗生素），摇至 OD 值在 0.6-0.7 之间，降温至 20 $^{\circ}$ C，加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达，20 $^{\circ}$ C 培养过夜。

2.4.9 非洲猪瘟相关蛋白的纯化

可溶蛋白的分离纯化过程主要包含以下几个步骤：细胞的大量培养、诱导表达、收集、破碎、离心、亲和色谱纯化（MBP 树脂、Ni-NTA）、离子交换色谱纯化（阳离子交换柱、阴离子交换柱）和凝胶过滤色谱纯化（分子筛柱）过程。

2.4.9.1 TEV 蛋白的表达纯化

将 His 标签 TEV 载体转化到 Rosetta2 中，挑取单菌落至 10 mL LB 培养基中（含抗生素）培养五个小时左右，将其转入 800 mL LB 培养基中（含抗生素），摇至 OD 值在 0.6-0.7 之间，降温至 20 $^{\circ}$ C，加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达，20 $^{\circ}$ C 培养过夜。4000 r/min 离心 20 分钟；弃掉上清菌液，每 800 mL 菌液加入 25 mL 的非还原性蛋白纯化缓冲液，加入现配的 DNase 和溶菌酶，400

μ l 蛋白酶抑制剂（100 mmol/L PMSF），加入终浓度为 20 mmol/L 的咪唑；匀浆机把菌块打散；超声破碎大肠杆菌细胞，为防止温度过高全程置于冰上，功率 50%，开 1 秒停 0.5 秒，每 2 分钟降温避免蛋白变性，至菌液微澄清；高速离心机 20000 r/min 离心 20 分钟，弃沉淀碎片；上清与镍树脂结合，4℃孵育 1 小时以上；树脂装柱，20 mmol/L 咪唑缓冲液洗杂蛋白，每次上样 1mL，避免填料干燥收缩，洗至流出液无蛋白浓度；500 mmol/L 洗脱，每次上样 1mL，分管收集，得到 TEV 蛋白，-80℃保存。

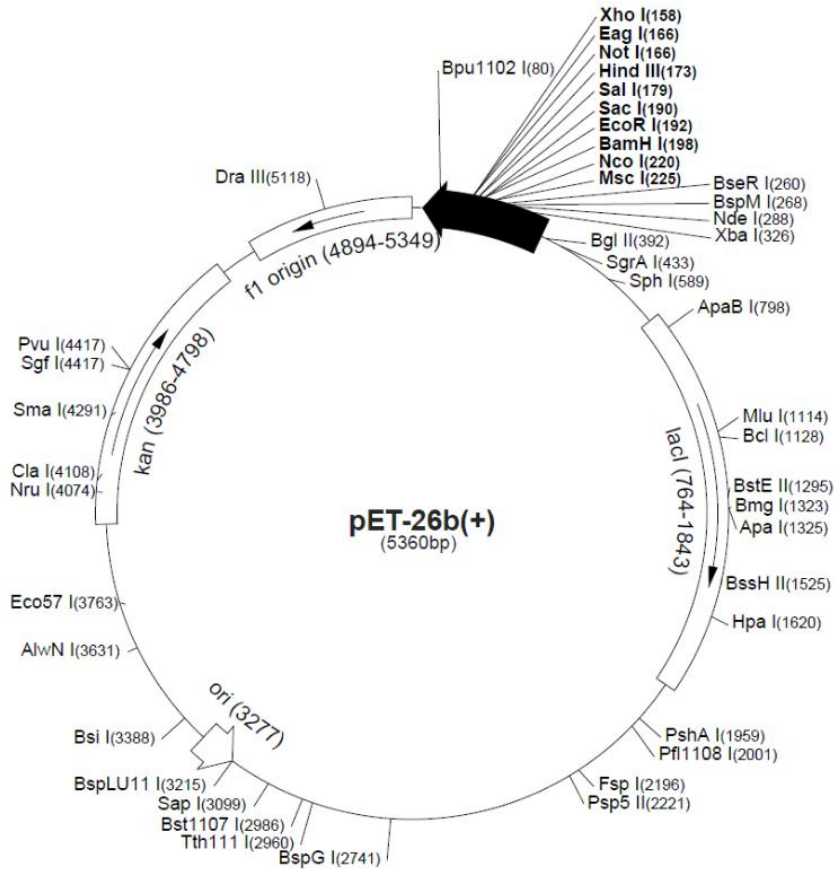


图 2-3 原核表达载体 pET-26b 示意图

2.4.9.2 B475L-MBP 融合蛋白真核表达的纯化

将转染效率良好的细胞收集于离心管中，4℃，2000 r/min 离心 3 分钟；空离一次，尽可能吸掉细胞上的培养液；适量还原性蛋白纯化缓冲液重悬细胞，加入蛋白酶抑制剂；25%功率超声破碎细胞，开 1 秒停 0.5 秒，每 2 分钟降温避免蛋白变性，至菌液微澄清；高速离心机 20000 r/min 离心 20 分钟，弃沉淀

碎片；上清与 MBP 树脂结合，4℃孵育 1 小时以上；树脂装柱，还原性蛋白纯化缓冲液洗杂蛋白，每次上样 1mL，避免填料干燥收缩，洗至流出液无蛋白；20 mmol/L 麦芽糖洗脱，每次上样 1mL，分管收集，得到目的融合蛋白。

2.4.9.3 B475L-MBP 融合蛋白原核表达的纯化

诱导结束后 4000 r/min 离心 20 分钟；弃掉上清菌液，每 800 mL 菌液加入 25 mL 的还原性蛋白纯化缓冲液，加入现配的 DNase 和溶菌酶，400 μ L 蛋白酶抑制剂（100 mmol/L PMSF）；匀浆机把菌块打散；超声破碎大肠杆菌细胞，为防止温度过高全程置于冰上，功率 50%，开 1 秒停 0.5 秒，每 2 分钟降温避免蛋白变性，至菌液微澄清；高速离心机 20000 r/min 离心 20 分钟，弃沉淀碎片；上清与 MBP 树脂结合，4℃孵育 1 小时以上；树脂装柱，还原性蛋白纯化缓冲液洗杂蛋白，每次上样 1mL，避免填料干燥收缩，洗至流出液无蛋白；20 mmol/L 麦芽糖洗脱，每次上样 1mL，分管收集，得到目的融合蛋白。

2.4.9.4 利用 MBP 标签对 KR177R 蛋白的纯化

带有组氨酸标签的截短跨膜区 KR177R-MBP 融合蛋白诱导表达后，4000 r/min 离心 20 分钟；弃掉上清菌液，每 800 mL 菌液加入 25 mL 的非还原性蛋白纯化缓冲液，加入现配的 DNase 和溶菌酶，400 μ L 蛋白酶抑制剂（100 mmol/L PMSF），加入终浓度为 20 mmol/L 的咪唑；匀浆机把菌块打散；超声破碎大肠杆菌细胞，为防止温度过高全程置于冰上，功率 50%，开 1 秒停 0.5 秒，每 2 分钟降温避免蛋白变性，至菌液微澄清；高速离心机 20000 r/min 离心 20 分钟，弃沉淀碎片；上清与镍树脂结合，4℃孵育 1 小时以上；树脂装柱，20 mmol/L 咪唑缓冲液洗杂蛋白，每次上样 1mL，避免填料干燥收缩，洗至流出液无蛋白浓度；500 mmol/L 咪唑洗脱；将洗脱液与 MBP 树脂结合，4℃孵育 1 小时以上；树脂装柱，非还原性蛋白纯化缓冲液洗杂蛋白，每次上样 1mL，避免填料干燥收缩，洗至流出液无蛋白浓度；20 mmol/L 麦芽糖洗脱，每次上样 1mL，分管收集，得到目的融合蛋白。

为去除 MBP 标签，20: 1 加入 TEV 酶 4℃过夜酶切。分别利用高分辨率强阴离子柱（HiTrap Q HP 1mL）和镍预装柱（HisTrap 5mL）进行进一步分离，预实验进行洗脱梯度设置，通过 AKTA Purified 蛋白纯化系统观察蛋白洗脱位置状态，收集器收集后 SDS-PAGE 蛋白电泳验证。

2.4.9.5 组氨酸标签 KR177R 蛋白的纯化

KR177R 无跨膜区水溶性部分的二级结构预测结果含有 3 个 α -螺旋和 4 个 β -折叠，其中最靠近 N 端的为第 28-36 位氨基酸的 α -螺旋，最靠近 C 端的为第 136-139 位氨基酸的 β -折叠。全长含 8 个半胱氨酸，KR177R 无跨膜区水溶性部

将通过 Superdex75 Increase 分子筛柱置换缓冲液且高度纯化的蛋白浓缩后，选择所需的结晶试剂盒（Crystal Screen、Index PEG/Ion 等）。采用坐滴汽相扩散法，吸取 96 孔深孔板中的结晶试剂盒条件液，加入 200 μL 至 96 孔结晶板孔槽种；然后按照条件液与浓缩的蛋白液 1: 1 的比例滴在结晶孔上，为了提高结晶的概率，可点 2 个液滴，此过程需快速高效以避免由于液体挥发造成的误差。在蛋白量不足时，此过程可采取全自动蛋白质结晶工作站进行操作，最低可以达到 0.2 μL ，但混合量少会导致较大误差，仍需手动操作进行混合。操作完成后，胶带密封，将晶体板放于 20 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中。高倍偏光显微镜定期对晶体情况进行观测，并绘制表格记录相关信息。

2.4.10.2 蛋白结晶优化

仅仅通过商业化结晶筛选试剂盒初步筛选而得到的蛋白质晶体，往往衍射能力较弱，分辨率较低。采用悬滴气相扩散法，对晶体生长环境进行进一步条件的摸索。设置不同组分浓度和 pH 的梯度配置条件液。

向条件液池中加入不同组分浓度和 pH 的 500 μL 条件液，按照条件液与浓缩蛋白液 1: 1 的比例制备 2-4 μL 混合液，滴在结晶玻片上，为了提高结晶的概率，设置 2 个蛋白液的浓度，将结晶玻片倒扣在条件液池上，孔槽周围被胶质密封；密封完成后，将晶体板平稳放置于 20 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中。高倍偏光显微镜定期对晶体情况进行观测，并绘制表格记录相关信息。

第 3 章 ASFV 蛋白哺乳动物体系下的表达筛选

3.1 本章引论

在没有融合标签的帮助下,许多功能蛋白的表达产量不仅低而且溶解度差,这些复杂的蛋白质往往与自身相互作用形成多聚体。MBP (Maltose Binding Protein) 是一种麦芽糖结合蛋白,其分子量为 42 kDa。单体晶体结构显示其由两个球状结构域组成,这两个结构域通过三个短肽连接,形成结合麦芽糖的深沟,为亲和层析常用标签之一。MBP 对于稳定和保护下游蛋白翻译提供可靠的环境,并降低蛋白酶的降解作用^[56]。

ASFV 蛋白初筛需要表达多种蛋白,检测目的蛋白常规方法为凝胶层析分子筛和 SDS-PAGE 凝胶染色。分子筛又称凝胶过滤层析,是利用多孔的网状结构对蛋白等物质进行排阻,根据分离样品的相对分子量差异进行分离。十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis) 通过破坏蛋白质内部非共价键使蛋白质变性,根据大小不同的蛋白结合 SDS 数量不同因此所带电荷也不同这一性质对蛋白质组分进行分离,从而确定蛋白质分子量大小。这两种常规方法均需要大量表达蛋白以达到微克至毫克级的表达量。FSEC (荧光检测分子筛) 技术相较常规方法更灵敏和高效,可以在小量表达的情况下检出蛋白。

通常情况,ASFV 蛋白在哺乳动物表达体系下有更为良好的表达环境。本课题采用 FSEC (荧光检测分子筛),通过检测荧光来检测 ASFV-MBP 融合蛋白在哺乳动物表达体系下的表达情况和蛋白性质,从而在小量表达的情况下完成表达量高、性质稳定的蛋白筛选。

3.2 结果与分析

3.2.1 ASFV 蛋白生物信息学分析结果

对 ASFV 蛋白 CP123L、X69R、EP152R、E199L、E66L、E183L、I329L、B475L、C84L、C217R、E248R、KR177R、MGF110-1L、B169L、O61R、EST-B 进行生物信息学分析。

利用在线 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/> 预测,对蛋白的结构域进行分析,确定蛋白的基本信息。利用 ExPASy (Expert Protein Analysis System,

蛋白质专家分析系统)中的 ProtParam 工具,对 ASFV 蛋白的氨基酸序列进行生物信息学分析,以确定蛋白质的分子量、等电点、稳定性和氨基酸构成等基本信息,作为表达和纯化蛋白的基本依据。

并对 ASFV 蛋白进行跨膜区情况的预测 <http://smart.embl-heidelberg.de/> 和信号肽预测 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>。

利用 Blast 功能 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi> 进行 ASFV 蛋白同源序列的查找,比对其序列。对于结构已经解析的蛋白,从 PDB 数据库 <http://www.rcsb.org/> 下载其结构文件,在 Pymol 软件中进行结构观察分析,获得目的同源蛋白结构相关信息:结合分子与位点、原子间相互作用、二级结构构成特点及走向、结构比对等。

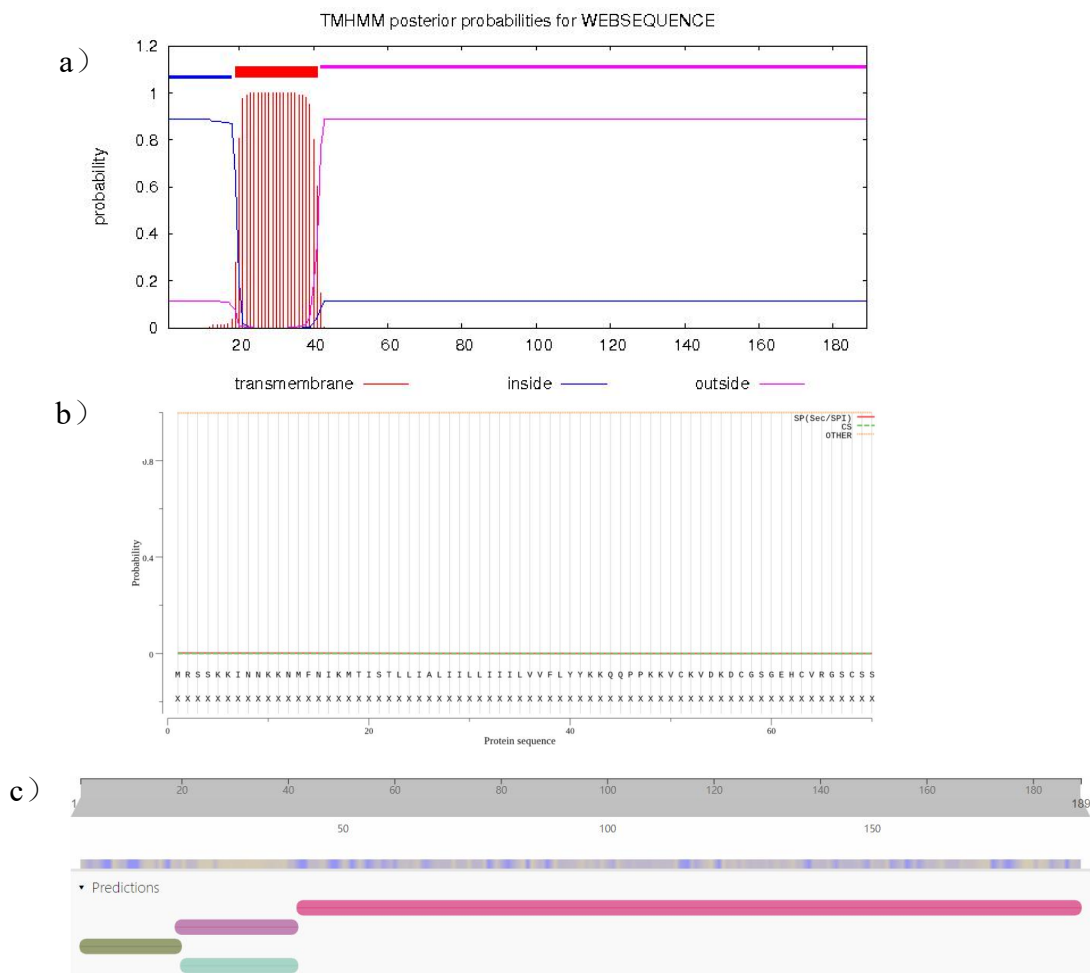


图 3-1 ASFV 蛋白生物信息学分析结果以 KR177R 为例

(a.KR177R 跨膜区预测结果; b.KR177R 信号肽预测结果; c.KR177R 结构域预测结果)

以 KR177R 为例蛋白等电点为 8.84，分子量 21.6 kDa。预测结果为单次跨膜蛋白，跨膜区位于第 18 号氨基酸至第 40 号氨基酸，序列前端含信号肽。具有四个螺旋结构 (helix)，六个折叠结构 (strand)，比对序列未发现结构已解析的同源蛋白结构。KR177R 蛋白生物信息学分析结果如图 3-1 所示。

3.2.2 ASFV 蛋白克隆构建结果

将 ASFV 基因片段 CP123L、X69R、EP152R、E199L、E66L、E183L、I329L、B475L、C84L、C217R、E248R、KR177R、MGF110-1L、B169L、O61R、EST-B 通过 PCR 或从原载体双酶切获得后，与线性化载体 pCMHG、pCMHG-S6 进行闪电克隆连接或 T4 连接酶连接，并将连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞中，通过抗生素筛选菌株，去内毒素质粒小提。将双酶切验证片段大小正确的质粒如图 3-2 所示将其送至吉林库美生物科技有限公司进行测序，将测序结果与原序列进行比对，得到正确的重组质粒。

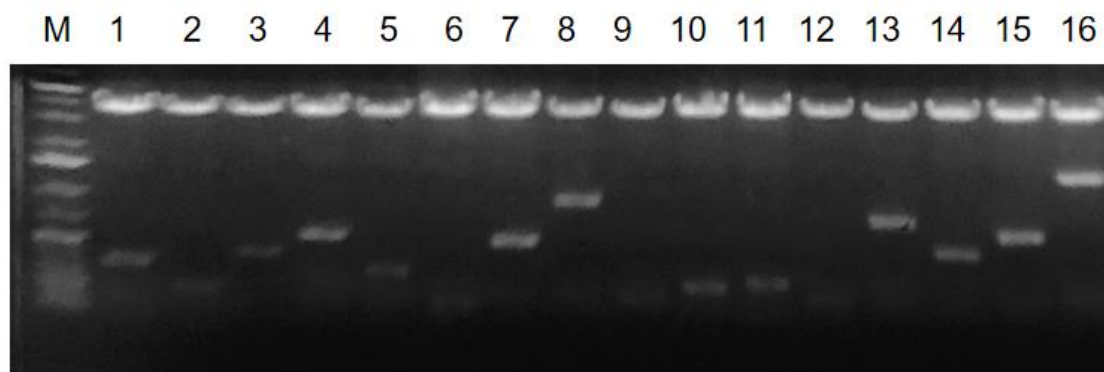


图 3-2 ASFV 克隆双酶切验证凝胶电泳图 (1.CP123L、2.X69R、3.EP152R、4.E199L、5.E183L、6.E66L、7.I329L、8.B475L、9.O61R、10.C84L、11.EST-B、12.B169L、13.C217R、14.KR177R、15.E248R、16.MGF110-1L)

3.2.3 ASFV 蛋白转染、小量表达、筛选结果

采用聚乙烯亚胺(PEI)介导的瞬时转染技术将 ASFV 基因片段 CP123L、X69R、EP152R、E199L、E66L、E183L、I329L、B475L、C84L、C217R、E248R、KR177R、MGF110-1L、B169L、O61R、EST-B 转入贴壁培养的 HEK293F 细胞中，诱导表达蛋白。在荧光显微镜下观测转染效率较高，达 80%以上如图 3-3。

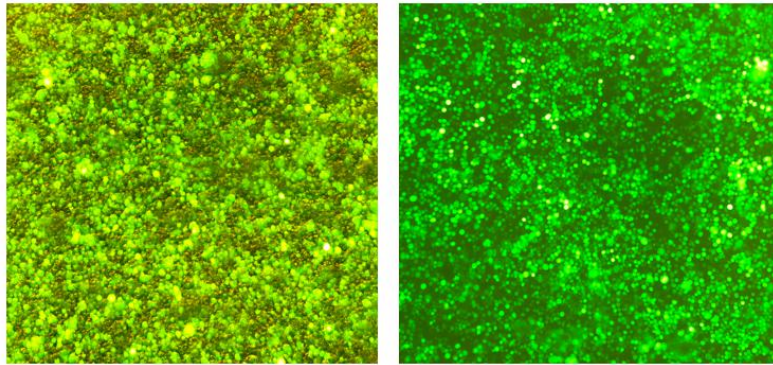


图 3-3 ASFV 基因瞬时转染荧光结果

根据蛋白类型（膜蛋白，胞外水溶性蛋白）相对应方式进行蛋白收集，制样，采用 FSEC（荧光检测分子筛）技术，利用 Superdex200 Increase 分子筛柱进行筛选。分子筛又称凝胶过滤层析是利用多孔的网状结构对蛋白等物质进行排阻，根据分离样品的相对分子量差异进行分离，实验所采用的 Superdex200 Increase 分子筛柱为高分辨率凝胶过滤预装柱，适用于高效小规模的分选检测分子量在 10,000-600,000 的蛋白。具体洗脱体积对应蛋白关系如图 3-4 所示。

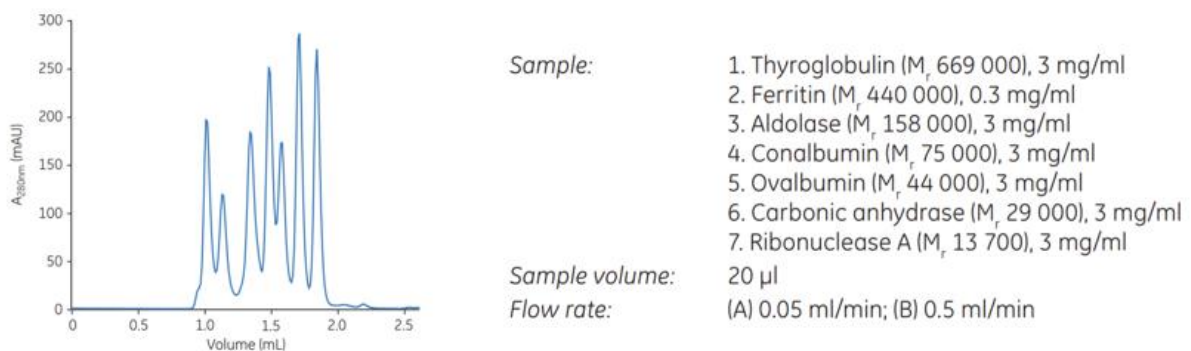


图 3-4 Superdex200 Increase 分子筛柱洗脱体积与蛋白分子量对应关系

在 ASFV 蛋白表达筛选中发现，在哺乳动物表达体系中有明显表达的有 E248R、E199R、KR177R(截短跨膜区水溶性蛋白) B475L（全长水溶性蛋白）；CP123L、EP84R（全长膜蛋白）如图 3-5 所示。

其中水溶性蛋白 E248R 与 E199L 与全长膜蛋白 CP123L、EP84R 表达水平较低，

其他蛋白表达水平良好。B475L 蛋白在生物信息学预测结果中显示存在跨膜区，但根据胞内蛋白收集方式，在没有去垢剂的帮助下仍显示良好的富集水平，经实验验证其为水溶性蛋白。

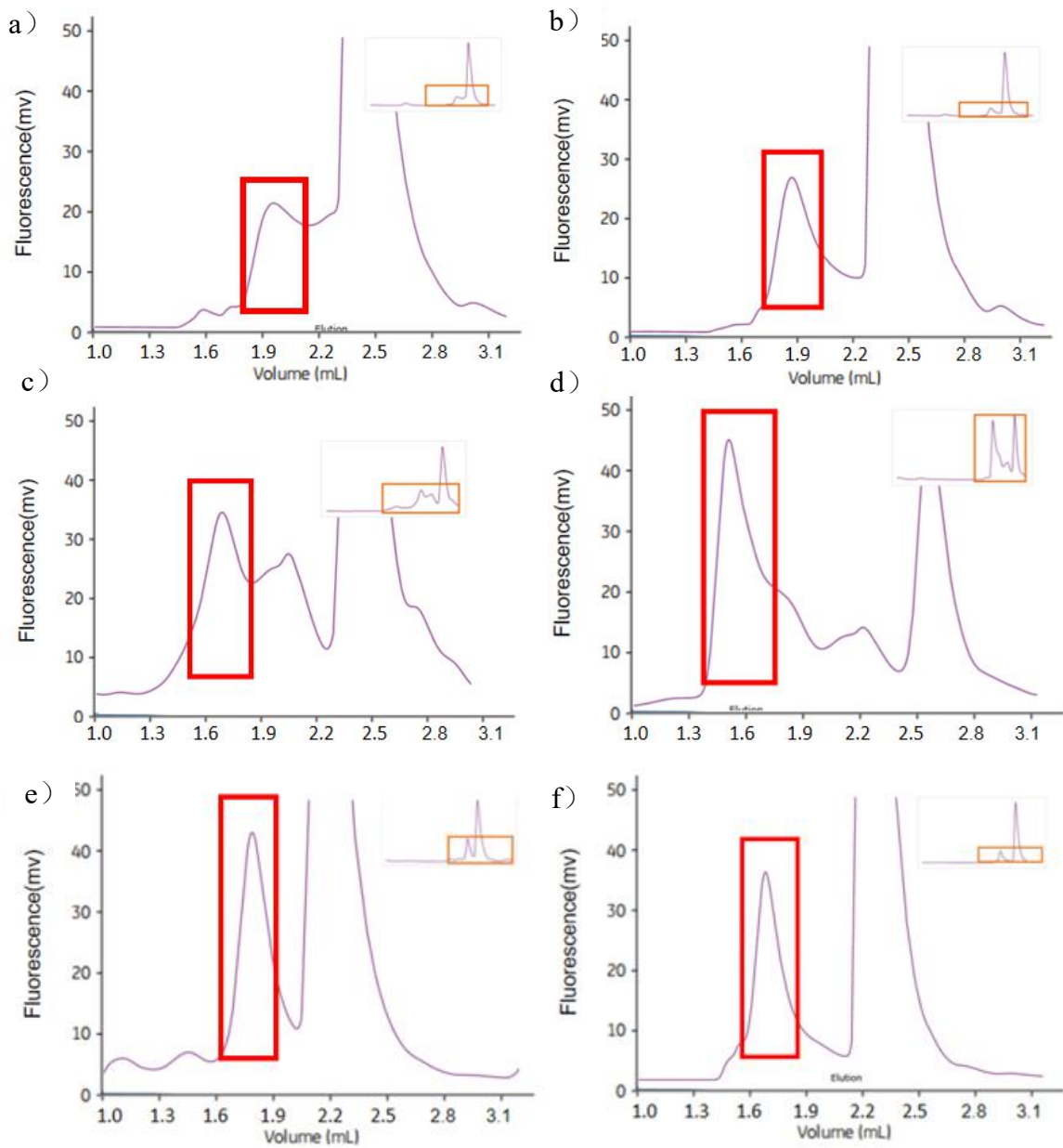


图 3-5 哺乳动物细胞初筛表达良好的 ASFV 蛋白的荧光峰图

(a. EP84R, b. CP312R, c. EP248R, d. E199L, e. KR177R, f. B475L)

3.3 本章小结

通过分子克隆, 获得 ASFV 全长基因片段 CP123L、X69R、EP152R、E199L、E66L、E183L、I329L、B475L、C84L、C217R、E248R、KR177R、MGF110-1L、B169L、O61R、EST-B, 和 E248R、KR177R、I329L、MGF110-1L、E199L 的去跨膜区水溶性片段。并将 ASFV 基因片段与带有 MBP 标签、His 标签、TEV 酶切位点的哺乳动物表达载体 pCMHG、pCMHG-S6 构建了重组载体。

采用聚乙烯亚胺(PEI)介导的瞬时转染技术将 ASFV 基因片段转入贴壁培养的 293F 细胞中, 诱导表达蛋白。根据蛋白类型(膜蛋白, 胞外水溶性蛋白)相对应方式进行蛋白收集, 采用 FSEC(荧光检测分子筛)技术, 利用 Superdex200 Increase 分子筛柱进行筛选。在 ASFV 蛋白表达筛选中发现, 在哺乳动物表达体系中有明显表达的有 E248R、E199R、KR177R(截短跨膜区水溶性蛋白); B475L(全长水溶性蛋白); CP123L、EP84R(全长膜蛋白)。其中 E248R、E199R、CP123L、EP84R 表达量较低, 选取表达良好的 KR177R 和 B475R 进行进一步的蛋白表达优化、纯化、结晶的研究。

第 4 章 ASFV 蛋白表达优化、纯化、结晶

4.1 本章引论

在 ASFV 蛋白哺乳动物表达筛选中, KR177R 截短跨膜区水溶性蛋白和 B475L 全长胞内水溶性蛋白有较高的表达水平, 选取这两个蛋白进行蛋白表达优化、纯化、结晶的研究。尝试原核表达体系、昆虫细胞表达体系进行表达体系的优化; 尝试利用不同标签亲和层析、离子交换层析、凝胶层析等方式进行蛋白纯化的优化, 并进行结晶的筛选及优化。

KR177R 蛋白为非洲猪瘟结构蛋白位于膜表面, 推测其胞外水溶性片段与病毒侵染、识别相关。高纯度构象均一的非洲猪瘟 KR177R 蛋白可以用于非洲猪瘟病毒抗体的制备、相关功能的研究、试剂盒的研发。对晶体利用 X-射线衍射法进一步进行结构解析将对相关机理功能的探究、侵染靶点的确定、相关亚疫苗的开发均更为直观和清晰的认知。对 B475L 蛋白的表达纯化优化, 也为 ASFV 功能机制的研究提供一定的思路。

4.2 结果与分析

4.2.1 MBP-B475L 融合蛋白表达体系的优化结果

蛋白在不同的表达体系中的表达水平常常有显著差异, 选择恰当的表达系统对蛋白高效、准确表达至关重要。目前在蛋白的结构功能研究中常用的三种表达体系细菌、昆虫细胞、哺乳动物细胞各有其优势和劣势。

大肠杆菌(*E.coli*)原核表达系统具有生长快、周期短、操作易、成本低、产量高等优势。但其由于无法对蛋白进行糖基化修饰, 蛋白内部维持正确三维构象的分子间作用力可能遭到破坏, 表达体系简单具有表达蛋白的局限性。而哺乳动物细胞表达系统能够很好的在细胞内质网中进行蛋白的加工修饰, 适用于大多数蛋白。但在瞬时转染过程中需要大量 DNA, 成本较高、操作复杂。以杆状病毒介导的昆虫细胞表达体系, 可以在无需大量制备 DNA 的情况下大量诱导表达功能蛋白, 相较原核表达体系更具优势。

ASFV 蛋白在哺乳动物表达体系小量表达初筛中, MBP-B475L 融合蛋白在 293F 细胞贴壁培养瞬时转染条件下表达良好。在尝试大肠杆菌体系表达, 利用

MBP 标签亲和层析纯化过程中未达到理想效果，蛋白降解严重、且杂蛋白多，不利于后续实验。

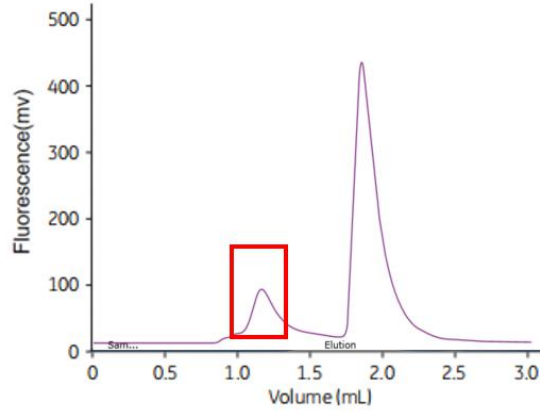


图 4-1 MBP-B475L 蛋白荧光峰图



图 4-2 MBP-B475L 蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳

尝试昆虫表达体系，利用二代病毒侵染宿主细胞，诱导表达，收集蛋白利用荧光分子筛检测如图 4-1 所示。利用 MBP 标签亲和层析纯化后，根据 SDS-PAGE 电泳结果验证得到较高纯度的 MBP-B475L 融合蛋白，经过 TEV 酶 4°C 过夜酶切后得到 MBP、B475L 蛋白、和少量未切开的 MBP-B475L 融合蛋白；与镍树脂结合后收集流穿液，能够得到无标签的 B475L 蛋白如图 4-2 所示。但还是存在杂蛋白，分离效率不高，且蛋白表达量低，损耗大。对于 MBP-B475L

融合蛋白及无标签 B475L 蛋白在昆虫表达体系下的表达量及分离效率问题仍需进一步探索。

4.2.2 利用 MBP 标签对 KR177R 蛋白的表达与纯化结果

带有组氨酸标签的截短跨膜区 KR177R-MBP 融合蛋白在 293F 细胞贴壁培养瞬时转染条件下表达良好。在尝试大肠杆菌体系表达，利用 MBP 标签与 His 标签亲和层析纯化后，得到较高纯度的 MBP-KR177R 融合蛋白。经过 TEV 酶 4℃ 过夜酶切后得到 MBP、KR177R 蛋白、TEV 酶和少量未切开的 MBP-KR177R 融合蛋白。

由于蛋白分子量较接近，利用凝胶层析方法进行分离效率不高。在查询蛋白等电点后，尝试利用高分辨率阴离子交换柱（HiTrap Q HP 1mL）进行进一步分离如图 4-3 所示。阴离子交换柱在低盐条件下将带负电荷的蛋白吸附在基质上，高盐条件下蛋白被洗脱。

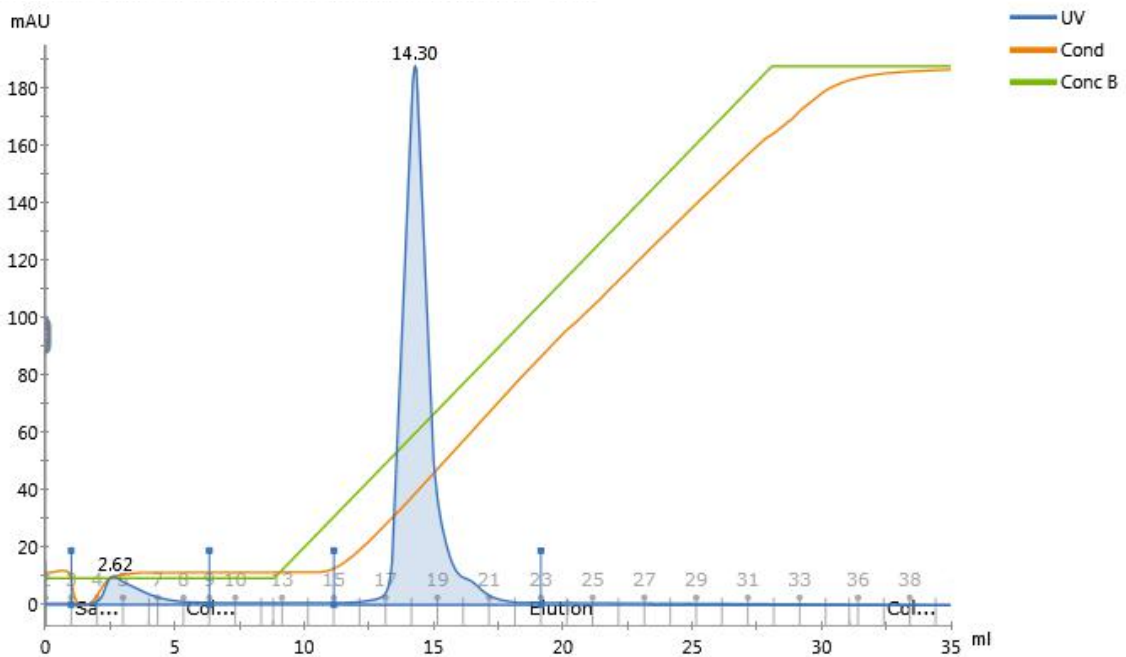


图 4-3 KR177R 蛋白回收 HiTrap Q HP 离子交换柱紫外峰图

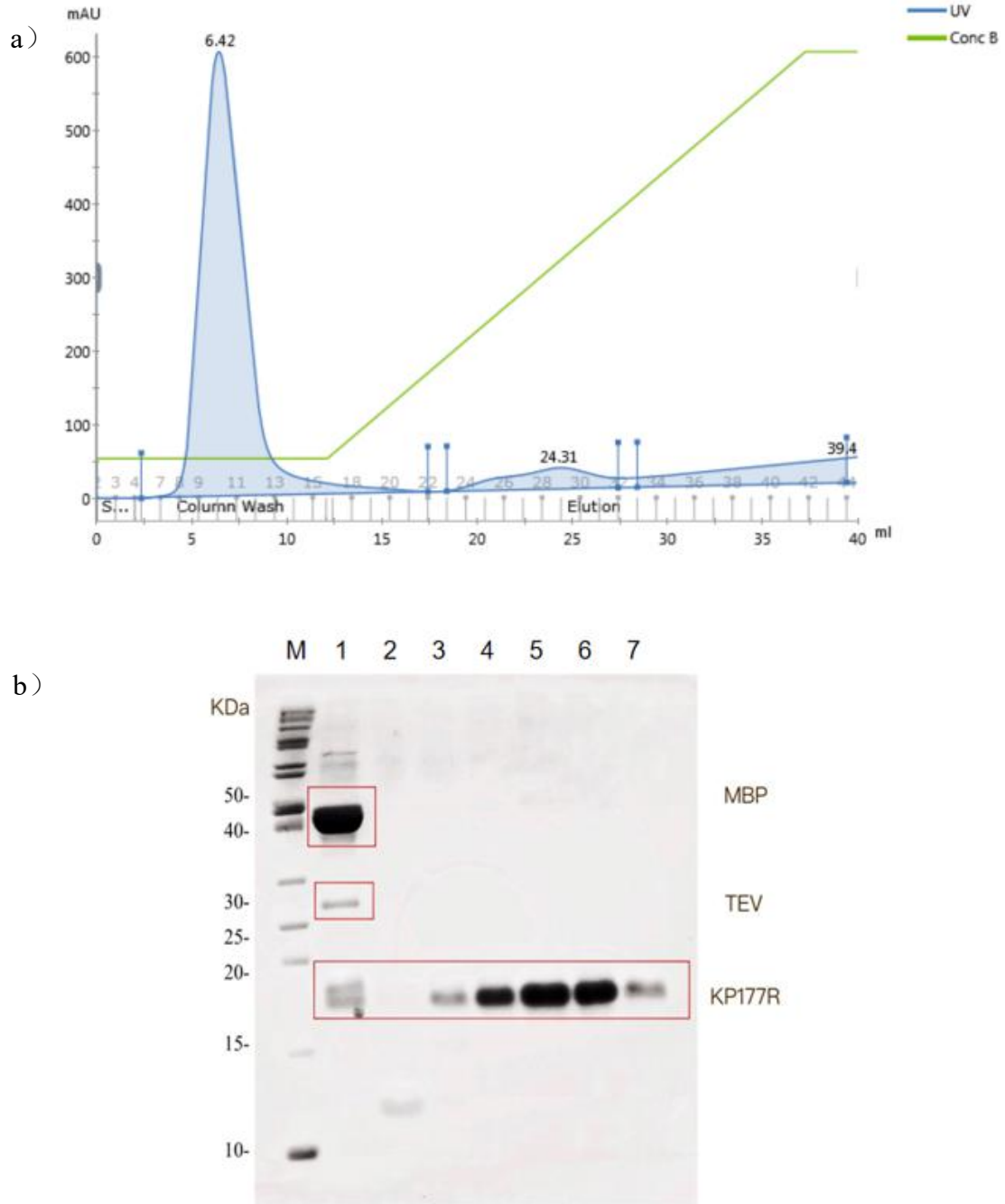


图 4-4 KR177R 蛋白镍预装柱回收紫外峰图及 SDS-PAGE 凝胶电泳图

(a.KR177R 蛋白镍预装柱回收紫外峰图, b.SDS-PAGE 凝胶电泳图, 孔道 1-7 依次为酶切过夜后的混合液、镍预装柱分离第 25 号、镍预装柱分离 9-13 号)

由于酶切后的蛋白混合液中切除的 MBP 标签、TEV 酶和少量未切开的 MBP-KR177R 融合蛋白均带有 His 标签, 尝试利用镍预装柱 (HisTrap 5mL) 进行进一步分离, 多次过柱可使分离效率更高。结果显示使用镍预装柱进行分离效果更佳, 得到高纯度无标签的 KR177R 无跨膜区蛋白如图 4-4 所示 (孔道 1-7 依次为酶切过夜后的混合液、镍预装柱分离第 25 号、镍预装柱分离 9-13 号)。

4.2.3 组氨酸标签 KR177R 蛋白的表达与纯化结果

利用 MBP 标签纯化获得的无标签 KR177R 无跨膜区蛋白, 虽然纯度较高, 但由于步骤繁多, 损耗较大, 所得量较少, 尝试利用组氨酸标签对 KR177R 无跨膜区蛋白进行纯化。同时, 考虑到蛋白末端的柔性短肽会导致蛋白具有较高的构象异质性, 不利于结晶时分子间排列逐步建立秩序并逐渐相互堆叠转变为规则排列的固体状态, 根据蛋白二级结构预测对蛋白进行截短。

KR177R 无跨膜区水溶性部分的二级结构预测结果含有 3 个 α -螺旋和 4 个 β -折叠, 其中最靠近 N 端的为第 28-36 位氨基酸的 α -螺旋, 最靠近 C 端的为第 136-139 位氨基酸的 β -折叠。全长含 8 个半胱氨酸, KR177R 无跨膜区水溶性部分位于胞外为非还原性条件, 推测 8 个半胱氨酸配对形成四个二硫键。最靠近 N 端的半胱氨酸位于第 8 号氨基酸, 蛋白截短依次截至第 2 位的谷氨酰胺后、第 4 位的脯氨酸后和第 6 位的赖氨酸后。构建带有组氨酸标签的无跨膜区截短 KR177R 蛋白质粒, 将其转化至 Rosetta2 中。在大肠杆菌体系诱导表达后, 收集蛋白, 利用 His 标签亲和层析纯化后, 进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 结果如图 4-5 所示。截短至第 6 位赖氨酸的 KR177R 蛋白、截短至第 4 位脯氨酸的 KR177R 蛋白、截短至第 2 位谷氨酰胺的 KR177R 蛋白及全长 KR177R 蛋白膜外水溶性部分均具有较高的纯度和稳定性, 且表达量良好。利用 Superdex 75 分子筛柱进行凝胶层析分离。实验结果显示截短至赖氨酸的 KR177R 蛋白分离效果最好, 且峰型良好, 蛋白构象均一如图 4-6 所示。在不破坏蛋白二硫键和二级结构、不影响蛋白整体结构的情况下, 蛋白末端的柔性短肽越短, 越有利于结晶时的分子间排列逐步建立秩序并逐渐相互堆叠转变为规则排列的固体状态, 截短至第 6 位赖氨酸的 KR177R 蛋白柔性短肽最短且分离效果表达量俱佳, 具有较高的结晶潜力。

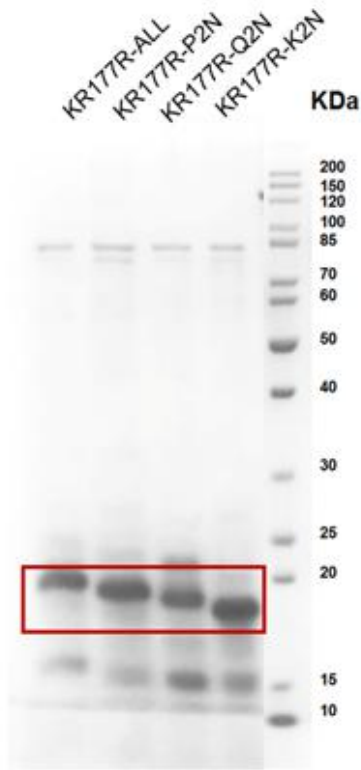


图 4-5 组氨酸截短 KR177R 蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳图

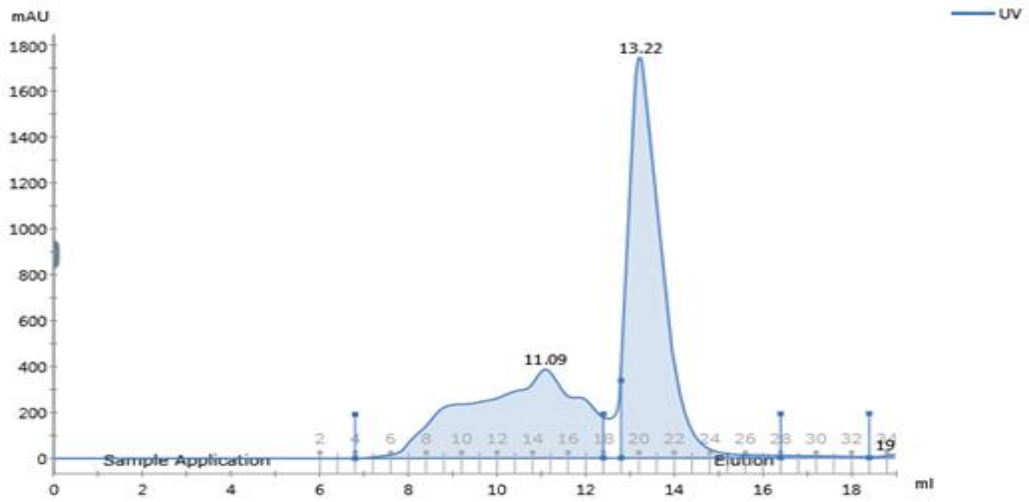


图 4-6 组氨酸标签截短至第 6 位赖氨酸的 KR177R 蛋白 S75 分子筛柱紫外峰图

4.2.4 KR177R 蛋白的结晶结果

分子结晶的过程，是一个分子间排列逐步建立秩序的过程。以蛋白质晶体形成过程为例，蛋白质在溶液中呈自由状态，在结晶过程中，逐渐相互堆叠转变为规则排列的固体状态。

蛋白质晶体生长过程十分复杂，对蛋白结晶条件的摸索需要大量的筛选工作。蛋白在被浓缩至高浓度后与条件液混合，在条件液中沉淀剂的作用下表面失水，随着液体逐渐挥发，蛋白浓度逐渐升高至过饱和状态，进而形成小晶核，当条件液条件适宜使晶核表面结合速度大于解离速度时，晶体逐渐生长。蛋白晶体极不稳定，当条件出现温度变化、剧烈震荡、干燥等情况会导致蛋白晶体的衰退。虽然蛋白晶体的生长过程复杂，但也并非无章可循。影响蛋白结晶的主要因素有：蛋白本身性质、离子种类及浓度、沉淀剂种类及浓度、溶液 pH、缓冲液等。成熟的商业化结晶试剂盒根据一系列经验和设计，用于不同类型生物大分子的结晶初筛，提高效率。

高度纯化的截短至赖氨酸的 KR177R 蛋白浓缩后，经过多浓度多次商业化结晶试剂盒（Crystal Screen、Index PEG/Ion）坐滴汽相扩散法筛选后发现。高度纯化的截短至赖氨酸的 KR177R 蛋白浓缩至 9.5 mg/mL，在商业结晶试剂盒 Crystal Screen HR2-144 第 74 号（0.2M ZnCl₂，0.1M Tris，pH 5.5，30%w/v PEG3350）条件下第 15 天在显微镜下观察到规则六边形晶体如图 4-7。

在使用商业化的初筛试剂盒初步得到晶体之后，通过改变初筛条件中一个或多个组分的浓度，或者使用类似于晶体初筛条件的化学分子作为沉淀剂、添加剂，采用与初筛条件相近 pH 缓冲区的分子作为 pH 缓冲剂，逐步摸索、寻找晶体生长的更好条件。设置 pH 梯度（4.0，4.5，5.0，5.5，6.0，6.5）沉淀剂 PEG3350 浓度 w/v（21%，25%，29%，33%）采用悬滴气相扩散法进行重复和优化，并设置 12 mg/mL, 18 mg/mL 两个蛋白浓度。定期观察三周，尚未观察到晶体。

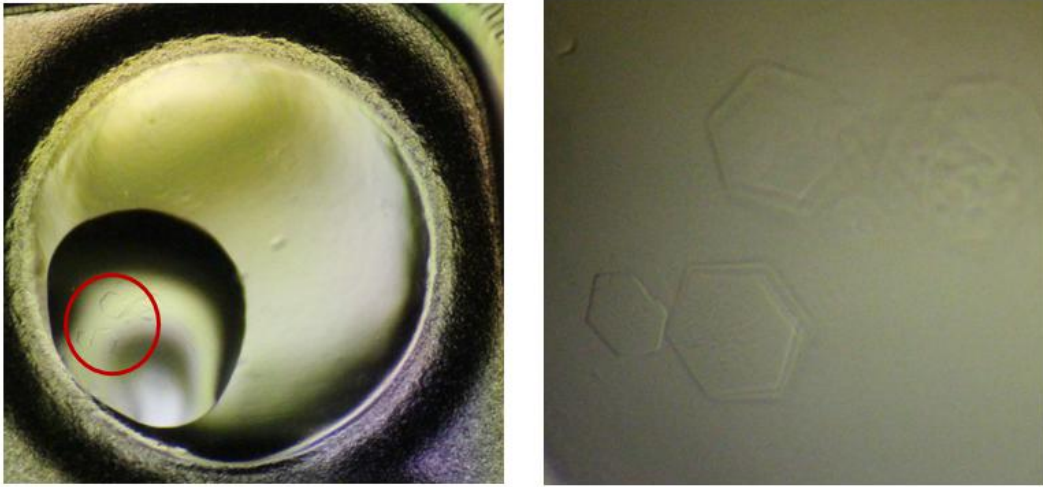


图 4-7 高倍显微镜下的 KR177R 蛋白晶体图

4.3 本章小结

本章介绍了 B475L 蛋白及 KR177R 蛋白胞外水溶性部分的表达纯化的优化。其中对 B475L 蛋白尝试在哺乳动物细胞体系、昆虫细胞体系、大肠杆菌体系进行表达。在大肠杆菌体系下 MBP-B475L 蛋白降解严重、且杂蛋白多，不利于后续实验。在昆虫细胞体系下可以得到较纯的 MBP-B475L 融合蛋白。酶切后回收得到无标签的 B475L 蛋白，但分离效率不高，且蛋白表达量低，损耗大。对于 MBP-B475L 融合蛋白及无标签 B475L 蛋白在昆虫表达体系下的表达量及分离效率问题仍需进一步探索及优化。

KR177R 为 ASFV 结构蛋白中的囊膜蛋白，一般与病毒侵染识别密切相关。相较其他囊膜蛋白，目前 KR177R 的功能研究较少，纯度较高的 KR177R 蛋白对于功能结构的研究有着十分重要的意义，已有针对 KR177R 蛋白开发的 ASFV 检测试剂盒。KR177R 在经历了多次纯化思路和方法改进后，获得纯度较高的无标签及组氨酸标签截短表达的 KR177R 蛋白胞外水溶性部分。对组氨酸标签截短表达的 KR177R 蛋白胞外水溶性部分进行结晶筛选获得六边形晶体，为后续相关蛋白结晶的进一步优化及结构解析奠定基础，提供一定的借鉴。

结 论

1. 通过分子克隆，获得 ASFV 全长基因片段 CP123L、X69R、EP152R、E199L、E66L、E183L、I329L、B475L、C84L、C217R、E248R、KR177R、MGF110-1L、B169L、O61R、EST-B，和 E248R、KR177R、I329L、MGF110-1L、E199L 的去跨膜区水溶性片段。并将 ASFV 基因片段与带有 MBP 标签、His 标签、TEV 酶切位点的哺乳动物表达载体 pCMHG、pCMHG-S6 构建了重组载体。

2. 利用荧光检测分子筛（FSEC）技术对蛋白 CP123L、X69R、EP152R、E199L、E66L、E183L、I329L、B475L、C84L、C217R、E248R、KR177R、MGF110-1L、B169L、O61R、EST-B 在哺乳动物表达体系下进行筛选表达，获得了表达水平良好的 CP123L、B475L、KR177R、E199L、E248R、C84L。

3. 对 B475L 蛋白进行了表达体系的优化，获得了高纯度的 MBP-B475L 融合蛋白，对于 MBP-B475L 融合蛋白及无标签 B475L 蛋白在昆虫表达体系下的表达量及分离效率问题仍需进一步探索。

4. 利用亲和层析、离子交换层析、凝胶层析等技术对 KR177R 蛋白进行纯化，制备了纯度较高的无标签及组氨酸标签截短表达的 KR177R 蛋白胞外水溶性部分。对组氨酸标签截短表达的 KR177R 蛋白胞外水溶性部分进行结晶筛选获得六边形晶体，为后续相关蛋白结晶的进一步优化及结构解析奠定基础，提供一定的借鉴。对非洲猪瘟病毒 KR177R 结构蛋白结构的解析将对相关机理功能的探究、侵染靶点的确定、相关亚疫苗的开发均有积极的作用。

参考文献

- [1] 陈轶. 非洲猪瘟病毒 VP73 蛋白的原核表达纯化及单克隆抗体的制备与鉴定[D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2012
- [2] 王晓丽 等. 非洲猪瘟病毒编码蛋白功能研究进展 [J]. 微生物学通报, 2019, 46(7): 1827-1836
- [3] 卢劲晔, 顾蓓蓓. 浅析非洲猪瘟疫情分布、传播及防控对策. 农业开发与装备, 2017, 10:123-124.
- [4] 王清华 等. 我国首例非洲猪瘟的确诊 [J]. 中国动物检疫, 2018, 35 (9) : 1-4
- [5] Alejo A., et al. The African swine fever virus prenyltransferase is an integral membrane trans-geranylgeranyl-diphosphate synthase. [J].Biol Chem, 1999, 274(25): 33-39.
- [6] Galindo I. and Alonso C. African Swine Fever Virus: A Review. Viruses, 2017, 9, (5)
- [7] Dixon L.K., Sun H. and Roberts H. African swine fever. Antiviral Res, 2019, 165: 34-41.
- [8] Zhou X, Emergence of African swine fever in China [J] . Transbound Emerg Dis, 2018, 65 (6) : 1482-1484.
- [9] 张晓凯. 非洲猪瘟病毒无标签重组 p54、B602L 抗原的制备与应用.[D]. 扬州: 扬州大学, 2019
- [10] Salas ML, Andrés G. African swine fever virus morphogenesis. Virus Res, 2013, 173(1): 29-41.
- [11] Sánchez-Cordón PJ, Montoya M, Reis AL, et al. African swine fever: a re-emerging viral disease threatening the global pig industry. Vet J, 2018, 233: 41-48.
- [12] 史喜菊 等, 非洲猪瘟病原学和流行病学研究新进展 [J].中国动物检疫 2020, 37 (5) : 63-67
- [13] Mazur-Panasiuk, African swine fever virus-persistence in different environmental conditions and the possibility of its indirect transmission[J]. Journal of veterinary research, 2019, 63: 303-310.
- [14] 王功民, 田克恭 . 非洲猪瘟 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [15] 王西西. 非洲猪瘟病毒蛋白对 cGAS--STING 信号通路抑制作用研究 [D].

- 北京：中国农业科学院，2019
- [16] Niederwerder M C , Infectious dose of African swine fever virus when consumed naturally in liquid or feed[J]. *Emerging infectious diseases*, 2019, 25 (5) : 891-897.
- [17] 刘玉伟,辛长勋,孙盼盼,等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白原核表达载体的构建、表达及蛋白纯化 [J]. *黑龙江畜牧兽医*,2019: (24):68-71
- [18] 雷建林 等.非洲猪瘟病毒的生物学特性与疫苗研制的难点 [J].*生物工程学报*, 2020,36 (1) : 13-18
- [19] Nan Wang et al. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly.[J]. *Science*, 2019, doi:10.1126
- [20] P72 郭晶,李重阳,孟庆玲,等. 非洲猪瘟病毒多表位融合蛋白 P72 的构建、表达及免疫学特性研究[J]. *家畜生态学报*,2019,40(6):60-65.
- [21] Beltran-alceudo D , et al. African swine fever : detectin and diagnosis [M]. Rome: FAO, 2018.
- [22] Stone S, Antibody response to inactivated preparations of African swine fever virus in pigs. [J]. *Am. J. Vet Res*, 1967, 28(123):475-481
- [23] Blome S., Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation [J]. *Vaccine*, 2014, 32(31):79-82
- [24] Leitão A, Cartaxeiro C, Coelho R, Cruz B, Parkhouse R, Portugal FC, et al. The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response.[J]. *General Virol.* (2001) 82:513-23.
- [25] 彭志峰 等, 非洲猪瘟病毒疫苗的研究进展 [J]. *中国兽医学报*, 2020, 4 (40) : 859-863
- [26] 吴映彤, 非洲猪瘟病毒免疫抑制基因的筛选及 RPA 检测方法的初步建立.[M]北京 中国农业科学院. 2019
- [27] 张艳艳,周鑫韬,齐宇,等. 非洲猪瘟病毒基因缺失疫苗构建和免疫保护特性研究 [J]. *中国兽医学报*, 2019, 39 (8):1245-1249.
- [28] 王西西 等,非洲猪瘟病毒免疫逃逸相关蛋白研究进展 [J]. *病毒学报*, 2018, 34(6): 929-935
- [29] 张洪亮 等, 非洲猪瘟病毒免疫学及疫苗研究进展 [J]. *病毒学报*, 2019, 35 (3) 533-539
- [30] 王涛 等.非洲猪瘟防控及疫苗研发:挑战与对策[J].*生物工程学报*, 2018, 34(12): 1931-1942
- [31] Cuesta-Geijo Ma, Cholesterol Flux is required for endosomal progression of

- African Swine Viruses during the initial establishment of infection [J]. *Virology*, 2016, 90(3):1534
- [32] Hurtado C, Antiviral activity of lauryl gallate against animal viruses [J]. *Antiviral Therapy*, 2008, 13(7):909-917
- [33] Cuesta-Geijo Ma, Endosomal maturation, Rab7 GTPase and phosphoinositides in African swine fever virus entry [J]. *PLOS One*, 2012,7(11):e48853
- [34] Galindo I, The ATF6 branch of unfolded protein response and apoptosis are activated to promote African swine fever virus infection [J]. *Cell Death Dis.*,2012,3:e341
- [35] Mottola C, In vitro antiviral activity of florquinolones against African swine fever virus [J]. *Vet Microbiol*, 2013,165(12):86-94
- [36] Alí Alejo, A Proteomic Atlas of the African Swine Fever Virus Particle. [J]. *Journal of Virology*, 2018,92(23):e01293-18
- [37] Argilagué JM, DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e40942
- [38] Andrés G, African swine fever virus polyproteins pp220 and pp62 assemble into the core shell[J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(24): 12473-12482
- [39] Jia N, Roles of African swine fever virus structural proteins in viral infection[J]. *Journal of Veterinary Research*, 2017, 61(2): 135-143
- [40] Goatley LC, Processing and localization of the African swine fever virus CD2v transmembrane protein[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(7): 3294-3305
- [41] Salas ML, Andrés G. African swine fever virus morphogenesis[J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 29-41
- [42] Alejo A, Matamoros T, Guerra M, et al. A proteomic atlas of the African swine fever virus particle[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(23): e01293-18
- [43] Sanna G, Improved strategy for molecular characterization of African swine fever viruses from Sardinia, based on analysis of p30, CD2v and I73R/I329L variable regions[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(4): 1280-1286
- [44] Burmakina G, African swine fever virus serotype-specific proteins are significant protective antigens for African swine fever[J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(7): 1670-1675
- [45] García-Mayoral MF, Structural models of DYNLL1 with interacting partners: African swine fever virus protein p54 and postsynaptic scaffolding protein gephyrin[J]. *FEBS Letters*, 2011, 585(1): 53-57
- [46] Sánchez EG, African swine fever virus controls the host transcription and

- cellular machinery of protein synthesis[J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 58-75
- [47] L Du, G Zhao, Z Kou, et al. Identification of a receptor-binding domain in the S protein of the novel human coronavirus Middle East respiratory syndrome coronavirus as an essential target for vaccine development. *J Virol*, 2013, 87(17):9939-9942.
- [48] Hakim, M., Fass, D. Dimer interface migration in a viral sulfhydryl oxidase. [J]. *J Mol Biol*, 2009, 391: 758-768
- [49] Changyao Li, Crystal Structure of African Swine Fever Virus dUTPase Reveals a Potential Drug Target. [J]. *Molecular Biology and Physiology*, 2019, 10(5):e0248-19
- [50] Wang, H., Qi, J., Chai, Y., Gao, F. The structural basis of African swine fever virus pA104R binding to DNA and its inhibition by stilbene derivatives. [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 10:1073
- [51] Chen, Y.Q., Zhang, J., Gan, J.H. Unique 5'-P recognition and basis for dG:dGTP misincorporation of ASFV DNA polymerase X. [J]. *PLOS Biology*, 2017, 15(2): e1002599
- [52] Chen, Y., Liu, H., Yang, C., Gao, Y., Structure of the error-prone DNA ligase of African swine fever virus identifies critical active site residues. [J]. *Nature Communications*, 2019, 387(10) :10(1):387
- [53] Grigoriu, S., Bond, R. The molecular mechanism of substrate engagement and immunosuppressant inhibition of calcineurin. [J]. *PLoS Biol* 2013(11): e1001492
- [54] Li, G., Crystal Structure of African Swine Fever Virus pS273R Protease and Implications for Inhibitor Design. [J]. *Virol* 2020, 10:1128
- [55] Qi Liu, Bingting Ma, Nianchao Qian, Structure of the African swine fever virus major capsid protein p72. [J]. *Cell Research*. 2019, 29:953-955
- [56] 房康. 通过使用 MBP 标签高水平原核表达纯化死亡结构域家族蛋白及炎症小体 NLRP1 与 ASC 的结构生物学研究[D]. 北京: 清华大学, 2018

哈尔滨工业大学学位论文原创性声明和使用权限

学位论文原创性声明

本人郑重声明：此处所提交的学位论文《几种非洲猪瘟蛋白的筛选表达及纯化》，是本人在导师指导下，在哈尔滨工业大学攻读学位期间独立进行研究工作所取得的成果，且学位论文中除已标注引用文献的部分外不包含他人完成或已发表的研究成果。对本学位论文的研究工作做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式注明。

作者签名：袁情馨 日期：2020年6月29日

学位论文使用权限

学位论文是研究生在哈尔滨工业大学攻读学位期间完成的成果，知识产权归属哈尔滨工业大学。学位论文的使用权限如下：

(1) 学校可以采用影印、缩印或其他复制手段保存研究生上交的学位论文，并向国家图书馆报送学位论文；(2) 学校可以将学位论文部分或全部内容编入有关数据库进行检索和提供相应阅览服务；(3) 研究生毕业后发表与此学位论文研究成果相关的学术论文和其他成果时，应征得导师同意，且第一署名单位为哈尔滨工业大学。

保密论文在保密期内遵守有关保密规定，解密后适用于此使用权限规定。本人知悉学位论文的使用权限，并将遵守有关规定。

作者签名：袁情馨 日期：2020年6月29日

导师签名：李明峰 日期：2020年6月29日

致 谢

衷心感谢导师李明晖老师的悉心指导，传道、授业、解惑。在课题的实验设计、研究思路、实验细节、论文撰写上都给予了大量的帮助。老师对于科研的严谨专注热忱，值得我们学习，并将始终作为我辈科研道路上的楷模，让我们这些学生能够站在巨人的肩膀上看问题，将目光放远。感谢哈兽研翁长江老师对课题合作的促成，及相关科研材料的提供。

感谢实验室陈丽萍师姐、司开学师兄、贺庭慧同学在日常实验过程中对于实验操作、问题处理讨论、科研工具使用、理论研究的帮助和支持，在由于新冠疫情无法返校的期间，感谢实验室技术员黄越对于论文撰写的帮助。感谢同样研究非洲猪瘟病毒蛋白蛋白的马晓慧师妹在科研实验中的帮助和支持和陪伴，共同面对课题中的问题。

行文至此，感慨良多，硕士生涯的最后撰写论文期间由于新型冠状病毒肺炎无法返校。疫情期间所见所闻每每令人沉思，感谢医护人员、防疫工作者与武汉人民对抗击疫情做出的贡献。同样深刻的意识到科研与科技的重要，及科研工作者的难能可贵。

今当离别，临表涕零，不知所言，硕士生活的结束大概率意味着自己科研生涯的结束。但希望自己对于科研的思索不止于此，严谨务实的科研态度不止于此，时刻自省，独立思考。无论未来如何情境，希望自己可以做出适合自己的不违心的决定，选择自己喜爱的生活方式，拥有自由的灵魂。

“今番良晤，豪兴不浅，他日江湖相逢，再当杯酒言欢。”