

网络出版时间:2018-01-10 16:16

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2018.04.001

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180110.1614.002.html

PEDV CH-HeB14 株 S1 蛋白表达及其 多克隆抗体的制备

唐青海¹, 李晓蓉², 杨海¹, 黎露¹, 陈果亮¹, 何丽芳¹, 刘最¹, 王芳宇¹

(1 衡阳师范学院 生命科学与环境学院 生物药物研究所衡阳师范学院湖南益豚生态农业有限责任公司联合研究中心,
湖南 衡阳 421008; 2 中国科学院 武汉病毒研究所, 湖北 武汉 430071)

【摘要】【目的】制备猪流行性腹泻病毒(PEDV)CH-HeB14 毒株 S1 蛋白的多克隆抗体,为 PEDV 新流行毒株诊断试剂盒和疫苗研制提供基础材料。【方法】利用 RT-PCR 扩增 PEDV CH-HeB14 毒株 S1 基因,对序列特征进行生物信息学分析,用 PCR 将 S1 基因截成不同片段(S1A、S1B、S1C、S1C-1 和 S1C-2),分别克隆至原核表达载体 pET28a,转化 BL21(DE3)构建重组表达菌株;用 IPTG 诱导重组蛋白表达,并进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定。将表达蛋白与佐剂乳化制备免疫原免疫多克隆抗体,Western blotting 和免疫过氧化物酶单层细胞染色法(IP-MA)检测抗体的免疫活性。【结果】PEDV S1、S1A、S1B、S1C、S1C-1 和 S1C-2 片段长度依次为 2 079,600,600,878,549 和 447 bp。系统进化树表明,CH-HeB14 株与 2010 年以来的 22 个新流行毒株亲缘关系较近,而与经典疫苗株 CV777、attenuated DR13 亲缘关系较远。成功截短表达了 S1 蛋白不同区段 S1A、S1B 和 S1C-1 重组蛋白(rS1A、rS1B 和 rS1C-1),且蛋白均以包涵体形式表达。制备了抗 rS1A、rS1B 和 rS1C-1 蛋白的多克隆抗体,其与这 3 种蛋白反应良好,且抗 rS1A 重组蛋白的多克隆抗体 Western blotting 效价为 1:32 000;IPMA 结果显示,该抗体能与 PEDV CH-HeB14 毒株和经典疫苗毒株 attenuated DR13 均发生特异性反应。【结论】成功克隆、表达了变异毒株 PEDV CH-HeB14 的 S1 基因,所制备的 S1 蛋白多克隆抗体具有良好的免疫活性。

【关键词】 猪流行性腹泻病毒;S1 蛋白;多克隆抗体

【中图分类号】 S858.28

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2018)04-0001-12

Expression of porcine epidemic diarrhea virus CH-HeB14 strain S1 protein and preparation of its polyclonal antibody

TANG Qinghai¹, LI Xiaorong², YANG Hai¹, LI Lu¹,
CHEN Guoliang¹, HE Lifang¹, LIU Zui¹, WANG Fangyu¹

(1 College of Life Sciences and Environment & Institute of Biological Medicine, Joint Research Centre of Hunan Yi-tun Ecological Agriculture LLC and Hengyang Normal University, Hengyang Normal University, Hengyang, Hunan 421008, China;
2 Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei 430071, China)

Abstract: 【Objective】 This study prepared polyclonal antibody of S1 protein of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) CH-HeB14 strain to provide basis for the development of diagnostic kit and vaccine. 【Method】 The S1 gene of PEDV CH-HeB14 strain was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), analyzed by bioinformatics software, truncated into different segments (S1A, S1B, S1C, S1C-1 and S1C-2) by PCR, sub-cloned into prokaryotic expression vector pET28a and transformed in-

【收稿日期】 2017-02-06

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金项目(31101837);衡阳师范学院引进人才专项(16D20);湖南省教育厅优秀青年项目(17B041)

【作者简介】 唐青海(1982—),男,湖南祁阳人,讲师,博士,硕士生导师,主要从事生物制药与疫苗工程研究。

E-mail: qinghaitang109@126.com

【通信作者】 杨海(1978—),男,湖南浏阳人,副教授,硕士生导师,主要从事生物药物研究。E-mail: 270749499@qq.com

to BL21(DE3) to obtain the expression recombinants. IPTG was used to induce the expression of recombinant protein before being analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting. The expressed proteins were purified and emulsified with immune adjuvant, and the immunogen was inoculated into rabbits to prepare polyclonal antibodies (pAb) against PEDV S1 protein. The immune competence of the pAb was evaluated by immune peroxidase monolayer assay (IPMA) and Western blotting. 【Result】 The molecular weights of S1, S1A, S1B, S1C, S1C-1 and S1C-2 were 2 079, 600, 600, 878, 549 and 447 bp, respectively. Phylogenetic tree showed that PEDV CH-HeB14 strain S1 gene had close relationship with the 22 novel prevailing strains since 2010, while they differed genetically from the vaccine strains (CV777 and attenuated DR13). The truncated proteins (rS1A, rS1B and rS1C-1) were successfully expressed in form of inclusion body (IB). The pAb against these three truncated proteins (rS1A, rS1B and rS1C-1) showed good activity and the Western blotting titer of anti-recombinant rS1A protein pAb was 1 : 32 000. IPMA results revealed that the pAb showed specific activity when reacting with the attenuated DR13 strain or CH-HeB14 strain viruses infected cells. 【Conclusion】 PEDV CH-HeB14 strain S1 gene was successfully cloned and expressed, and the prepared anti-S1 pAb showed good immune-activity.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus; S1 protein; polyclonal antibody

猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的以水样腹泻、呕吐及脱水为主要特征的急性肠道传染病。经典 PEDV 毒株感染以地方性流行为主要特点^[1], 而自 2010 年以来, 我国陆续出现新的 PEDV 流行毒株, 其表现出传播快、流行范围广、发病率和死亡率高特点^[2-5]。2013 年 4 月 PED 疫情在美国爆发并迅速传播, 给养猪业造成了巨大的损失^[6-7]。我国的 PEDV 新毒株无论是在致病性还是流行特点方面都与以往的毒株有所不同, 基因差异程度较大^[8-10], 美国 PEDV 新流行毒株与我国 2011—2012 年流行的部分毒株基因同源性达 99% 以上^[7], 韩国也分离到基因型与美国流行株同源性高度相似的毒株^[11]。尽管不同国家和地区分离的 PEDV 新毒株的基因序列有所差异, 但它们都处在同一个遗传分支上, 而以往的 PEDV 毒株处在另外一个遗传分支上; 相对经典毒株, 新流行毒株的主要抗原基因出现较大范围的插入、缺失和点突变, 这表明新流行毒株发生较大变异, 给 PED 的防治提出了新的挑战。

PEDV 是一种冠状病毒, 其基因组为具有感染性的单股正链 RNA, 编码 4 种主要的结构蛋白, 分别是纤突蛋白 (S)、膜蛋白 (M)、小膜蛋白 (E) 和核衣壳蛋白 (N)^[12]。其中 S 蛋白位于病毒粒子表面, 可以划分为 S1 (第 1—789 位氨基酸) 和 S2 (第 790—1 383 位氨基酸) 两个功能区, 其中 S1 结构不仅含有介导病毒侵入机体细胞的受体结合域, 还拥有介导

机体产生中和抗体的抗原表位, 在病毒与宿主细胞膜融合入侵和诱导中和抗体产生的过程中起关键作用^[13-14], 故 S1 蛋白被认为是免疫诊断制剂、治疗性卵黄抗体和亚单位疫苗开发的理想靶标^[15-19]。为研究本课题组 2014 年从河北某猪场分离的 PEDV CH-HeB14 毒株的特点和致病机理, 丰富国内 PEDV 新毒株的研究资料, 本研究克隆表达了 CH-HeB14 株的 S1 基因, 制备该蛋白的多克隆抗体, 以期 S1 蛋白抗原表位精确定位、PEDV 诊断试剂盒和基因工程疫苗研制提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、毒株及试验动物 Vero 细胞和 PEDV CH-HeB14 毒株均由衡阳师范学院生物药物研究所保存; Rosetta (ED3) 和 BL21 (ED3) 原核表达菌株感受态细胞, 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 体质量 3 kg/只左右雌性新西兰大白兔, 购自南华大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 MEM 培养基购自北京清大天一科技有限公司; 胎牛血清购自 Gibico 公司; Trizol 试剂和 HRP-SPA 酶标二抗, 购自 Invitrogen 公司; 原核表达载体 pET28a, 购自 Novagen 公司; Prime-Script™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、Prime-STAR® GXL DNA Polymerase 高保真酶及内切酶, 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 胶回收纯化试剂盒, 购自 Axygen 生物技术有限公司; Mouse

anti-His 单克隆抗体,购自武汉三鹰生物技术有限公司;免疫佐剂 MONTANIDE™ ISA71VG, 购自 SEPPIC;DAB 显色试剂盒,购自北京中杉金桥生物技术有限公司;一站式 His 标记蛋白质微量纯化套装试剂盒,购自北京天恩泽基因科技有限公司; PEDV 阳性血清,由衡阳师范学院生物药物研究所制备保存。

1.2 PEDV 培养、RNA 提取与第一链 cDNA 的合成

Vero 细胞使用含体积分数 8% 胎牛血清的 MEM 培养基培养,待细胞生长至 80% 左右汇合时,弃掉培养液,用 PBS 缓冲液洗涤后加入无血清的 MEM 培养基,补充胰蛋白酶至最终质量浓度为 3 μg/mL,按照 1 : 20 (体积比)的比例接种 PEDV CH-HeB14 毒株传代培养液,置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 24~72 h。待 80% 的细胞出现病变时,反复冻融 3 次,采用 Trizol 试剂提取总

RNA,利用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 中的随机引物进行第一链 cDNA 合成,具体操作参照说明书进行。

1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 中 PEDV 基因组序列 (GenBank 登录号:JQ282909),用 Primer 5.0 软件分别设计 S1 基因全长 PCR 扩增引物和截短片段扩增引物,截短片段依次命名为: S1A、S1B、S1C、S1C-1 和 S1C-2,各片段相对位置如图 1 所示。引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成,序列信息见表 1。其中,引物 PEDV-S1F 和 PEDV-S2079R 用于 S1 全长扩增, PEDV-S1F 和 PEDV-S600R 用于 S1A 片段扩增, PEDV-S601F 和 PEDV-S1200R 用于 S1B 片段扩增, PEDV-S1201F 和 PEDV-S2079R 用于 S1C 片段扩增, PEDV-S1201F 和 PEDV-S1746R 用于 S1C-1 片段扩增, PEDV-S1633F 和 PEDV-S2079R 用于 S1C-2 片段扩增。

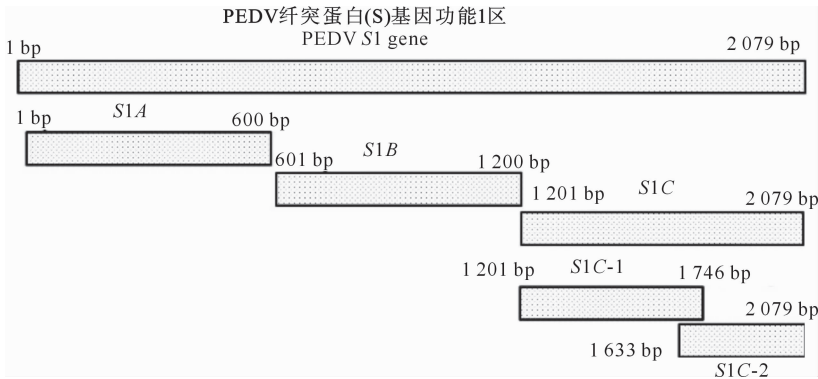


图 1 PEDV S1 基因截短片段 S1A、S1B、S1C、S1C-1 和 S1C-2 示意图
Fig. 1 Schematic diagram of truncated S1A、S1B、S1C、S1C-1 and S1C-2 of PEDV S1 gene

表 1 PEDV S1 基因及其截短片段的 PCR 扩增引物

Table 1 Primers for amplification of truncated segments of PEDV S1 gene by PCR	
引物名称 Primer name	引物碱基序列 (5'→3') Primer sequence
PEDV-S1F	ACTGGATCCATGAAGTCTTTAACTTACTTCTGGTTG
PEDV-S600R	ACTAAGCTTTTATCCACTGTTGTAACACTTTGTGCG
PEDV-S601F	ACTGGATCCGGTTGTGCTATGCAATATGTTTAC
PEDV-S1200R	ACTAAGCTTTTAGATGACAATTTCCCTGACGG
PEDV-S1201F	ACTGGATCCACCAAGTATGGTGATGTTTATGTCA
PEDV-S2079R	ACTAAGCTTTTAAGCACCAGTGTGACATTCTTAAAG
PEDV-S1746R	ACTAAGCTTTTAGTAATCATTAACAGATTGCAAGGTG
PEDV-S1633F	ACTGGATCCGACACTAGACAATTTACCATTTCAGT

注:GGATCC 为 BamH I 限制性酶切位点,AAGCTT 为 Hind III 限制性酶切位点。
Note:The underlined sequences “GGATCC” and “AAGCTT” are the enzyme recognizing sites for BamH I and Hind III, respectively.

1.4 S1 基因的 PCR 扩增与重组原核表达载体的构建

以第一链 cDNA 为模板,利用上述特异性引物进行 PCR 扩增,反应体系和程序参照 GXL DNA

Polymerase 高保真酶说明书进行。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖电泳检测后,用 Axygen PCR 清洁试剂盒纯化,进行双酶切,再经 Axygen PCR 清洁试剂盒纯化后与载体 pET28a 连接(连接前经 BamH I 和

Hind III 双酶切, 及 Axygen PCR 清洁试剂盒纯化), 构建重组原核表达载体, 转化感受态细胞, 其中 pET28a-PEDV-S1 同时转化 BL21(DE3) 和 Rosetta (ED3) 感受态细胞, 截短片段连接产物仅转化 Rosetta (ED3) 感受态细胞。挑取单克隆进行 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 选择阳性克隆进行测序分析, 所获得的重组表达载体分别命名为 pET28a-PEDV-S1、pET28a-PEDV-S1A、pET28a-PEDV-S1B、pET28a-PEDV-S1C、pET28a-PEDV-S1C-1 和 pET28a-PEDV-S1C-2。

表 2 PEDV 参考毒株信息
Table 2 Information of reference PEDV strains

毒株 Strain	来源 Origin	分离时间 Time	GenBank 登录号 Accession No.
CV777	瑞士 Switzerland	1978	AF353511
CH-S	中国 China	1986	JN547228
SM98	韩国 South Korea	1998	GU937797
attenuated DR13	韩国 South Korea	2003	JQ023162
virulent DR13	韩国 South Korea	2003	JQ023161
LZC	中国 China	2006	EF185992
JS2008	中国 China	2008	KC109141.1
BJ	中国 China	2011-04	JN825712
CH/FJND-3/2011	中国 China	2011-05	JQ282909
AJ1102	中国 China	2011-05	JX188454
CHGD-01	中国 China	2011-02	JX261936
LC	中国 China	2011-02	JX489155
ZJCZ4	中国 China	2011-04	JX524137
GD-1	中国 China	2011-12	JX647847
CH/ZMDY/11	中国 China	2011-05	KC196276
GD-A	中国 China	2012-02	JX112709
SD-M	中国 China	2012-02	JX560761
AH2012	中国 China	2012-05	KC210145
CH/FJZZ-9/2012	中国 China	2012-08	KC140102
GD-B	中国 China	2012	JX088695
JS-HZ2012	中国 China	2012	KC210147
USA/Colorado/2013	美国 USA	2013	KF272920
CH/GDGZ/2012	中国 China	2013-03	KF384500
USA/Iowa/16465/2013	美国 USA	2013	KF452322
USA/Indiana/17846/2013	美国 USA	2013	KF452323
MN	美国 USA	2013-06	KF468752
USA/Iowa/18984/2013	美国 USA	2013	KF804028
CHYJ130330	中国 China	2013	KJ020932
OH851	美国 USA	2013	KJ399978
OH1414	美国 USA	2013	KJ408801
K14JB01	韩国 South Korea	2013	KJ623926

1.6 S 重组蛋白的诱导表达及 Western blotting 鉴定

将阳性重组表达菌株接种至新鲜 LB 培养基中, 于 37 ℃ 下 200 r/min 培养过夜, 次日, 按 1 : 5 (体积比) 进行转接扩大培养 2 h, 取样后加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37 ℃ 下 200 r/min 诱导 4 h, 将重组表达载体 pET28a-PEDV-S1、pET28a-

1.5 序列进化分析

利用 DNASTar 软件包中的 MegAlign, 对包括疫苗毒株 CV777、attenuated DR13 和近年来新流行毒株在内的 31 个毒株(各毒株信息见表 2)的 S1 基因进行序列分析; 借助生物学软件 MEGA 5.0, 采用最大值法、最小值法和邻近法绘制 CH-HeB14 流行株基因的系统进化树。同时用 DNASTar 对 CH-HeB14 株、CV777 株、attenuated DR13 株、OH851 株、GD-1 株及 USA/Iowa/18984/2013 的氨基酸序列差异进行分析。

PEDV-S1A、pET28a-PEDV-S1B、pET28a-PEDV-S1C、pET28a-PEDV-S1C-1 和 pET28a-PEDV-S1C-2 所表达的重组蛋白分别命名为 rS1、rS1A、rS1B、rS1C、rS1C-1 和 rS1C-2。取诱导和未诱导菌体, 经超声破碎(功率为 65%, 超声 5 s, 停 5 s)后, 8 000 r/min 离心 15 min, 分别收集上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 检测后, 转印到 PVDF 膜上, 用 20 g/L 的脱

脂奶粉于 37℃ 封闭 1 h, PBST 漂洗 3 次后与 PEDV 阳性血清(1:100 倍稀释)孵育 1 h, PBST 漂洗 3 次, 与 HRP-SPA(1:3 000 倍稀释)孵育 1 h, PBST 漂洗后, 用 DAB 显色试剂盒显色。

1.7 S 蛋白多克隆抗体的制备

获得的 S 重组蛋白采用一站式 His 标记蛋白质微量纯化试剂盒进行纯化, 具体操作根据说明书进行。纯化的蛋白等质量混合均匀后与免疫佐剂(MONTANIDE™ ISA71VG)按 3:7(体积比)的比例混合, 充分乳化制成免疫原, 采用皮下多点注射方式免疫新西兰大白兔, 每只免疫蛋白量为 1 mg, 分别于首免后的 21 和 58 d, 采用同样的免疫原以同样的方式进行第 2 次和第 3 次免疫。三免后 7 d 兔心脏采血, 制备血清。设未免疫兔作为阴性对照。

1.8 S 蛋白多克隆抗体活性鉴定

1.8.1 Western blotting 检测 纯化后的 rS1A、rS1B 和 rS1C-1 包涵体蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 转印到 PVDF 膜上, 采用 Western blotting 检测多克隆抗体与蛋白本身的反应活性, 其中, 一抗为所制备的多克隆抗体(1:2 000 倍稀释)、未免疫兔阴性血清(1:2 000 倍稀释), 二抗为 1:5 000 稀释的 HRP-SPA。为了检测多克隆抗体的效价, 选取 rS1A 作为抗原, 利用 Western blotting 进行检测,

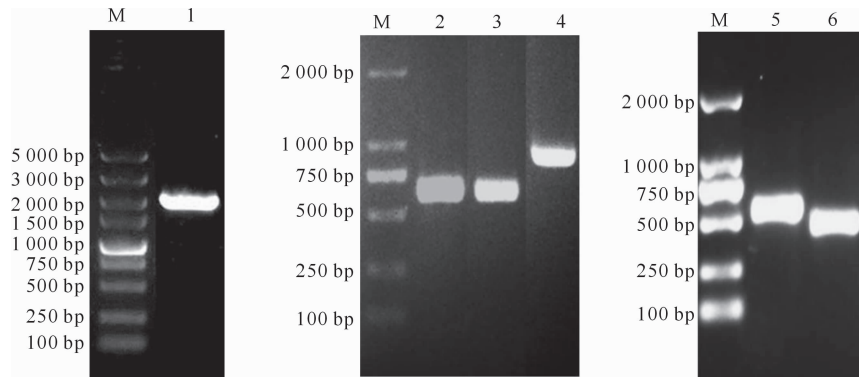
将多克隆抗体按初始 1:1 000 倍稀释, 在此基础上按 2 倍比例倍比稀释到 1:64 000 倍, 测定多克隆抗体的效价。

1.8.2 与病毒的反应活性 采用免疫过氧化物酶单层细胞染色法(IPMA)检测抗体的反应活性。培养 Vero 细胞, 待其长至 60%~80% 汇合度时, 按培养基 1/10 体积比例分别接种 PEDV CH-HeB14 和 attenuated DR13 株, 感染 48 h 后弃培养基, 用体积分数 30% 丙酮-PBS 固定 30 min, 干燥后加入 S1 蛋白多克隆抗体(1:100 倍稀释), 设未免疫阴性兔血清(1:100 倍稀释)作为对照, 37℃ 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 加入 HRP-SPA(1:3 000 倍稀释), 37℃ 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 加入 AEC 显色液, 37℃ 孵育 30 min, 弃去显色液加入去离子水终止反应, 于倒置显微镜下观察、判定结果。

2 结果与分析

2.1 PEDV S1 基因及其截短片段的扩增

PEDV S1、S1A、S1B、S1C、S1C-1 和 S1C-2 片段 PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖电泳检测, 结果分别在约 2 079, 600, 600, 878, 549 和 447 bp 处得到了特异性的扩增条带(图 2), 与预期片段长度相符。



M, DL2000 DNA Marker; 1~6. 依次为 PEDV S1、S1A、S1B、S1C、S1C-1 和 S1C-2 片段扩增产物
M, DL2000 DNA Marker; 1-6 are PCR products of PEDV S1, S1A, S1B, S1C, S1C-1 and S1C-2, respectively

图 2 PEDV S1 基因及其截短片段的 PCR 扩增
Fig. 2 Amplification of PEDV S1 gene by PCR

2.2 PEDV S1 重组原核表达载体的鉴定

重组载体 pET28a-PEDV-S1、pET28a-PEDV-S1A、pET28a-PEDV-S1B、pET28a-PEDV-S1C、pET28a-PEDV-S1C-1 和 pET28a-PEDV-S1C-2 经 BamH I 和 Hind III 双酶切, 分别得到 2 079, 600, 600, 878, 549 和 447 bp 大小条带(图 3), 与预期结果一致, 序列测定分析表明读码框正确无误。

2.3 PEDV S1 基因序列进化分析

为进一步分析 CH-HeB14 流行株与其他毒株在遗传进化上的关系, 应用 MEGA 5.0 软件将该毒株的 S1 基因与国内外已发表的毒株建立遗传进化树, 结果表明, CH-HeB14 流行株与 2010 年以后的流行毒株如 CH/FJND-3/2011 处于同一分支, 均属于基因 I 群, 与处于 II 群的经典疫苗株 CV777、at-

tenuated DR13、virulent DR13、韩国株 SM98 亲缘关系较远(图 4)。同属基因 II 群的两个不同的基因群毒株在进化上明显处于不同分支,这表明近年来流行的 PEDV 毒株发生了显著变异。

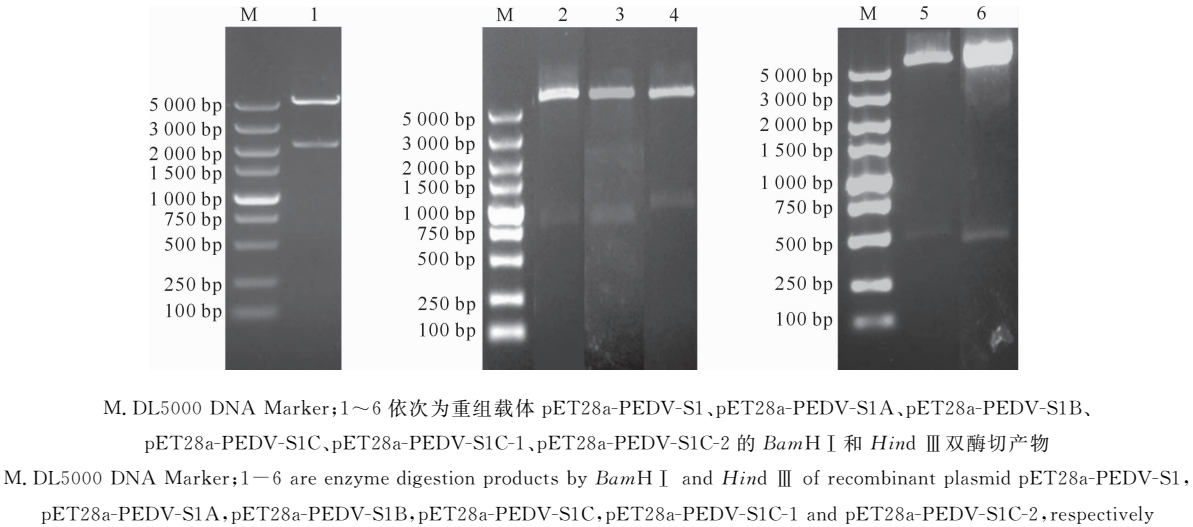


图 3 PEDV S1 及其截短片重组原核表达载体的双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of PEDV S1 complete and truncated fragments recombinant prokaryotic expression plasmids by double enzymes digestion

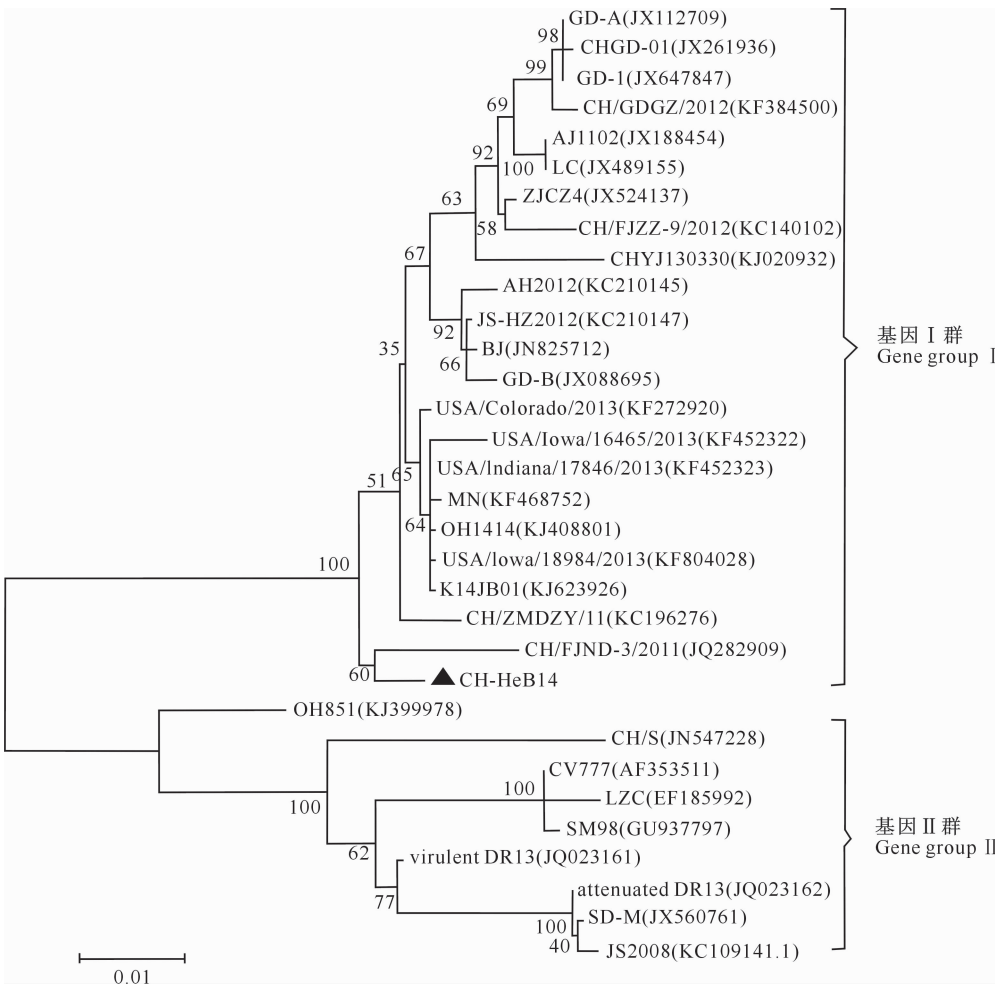
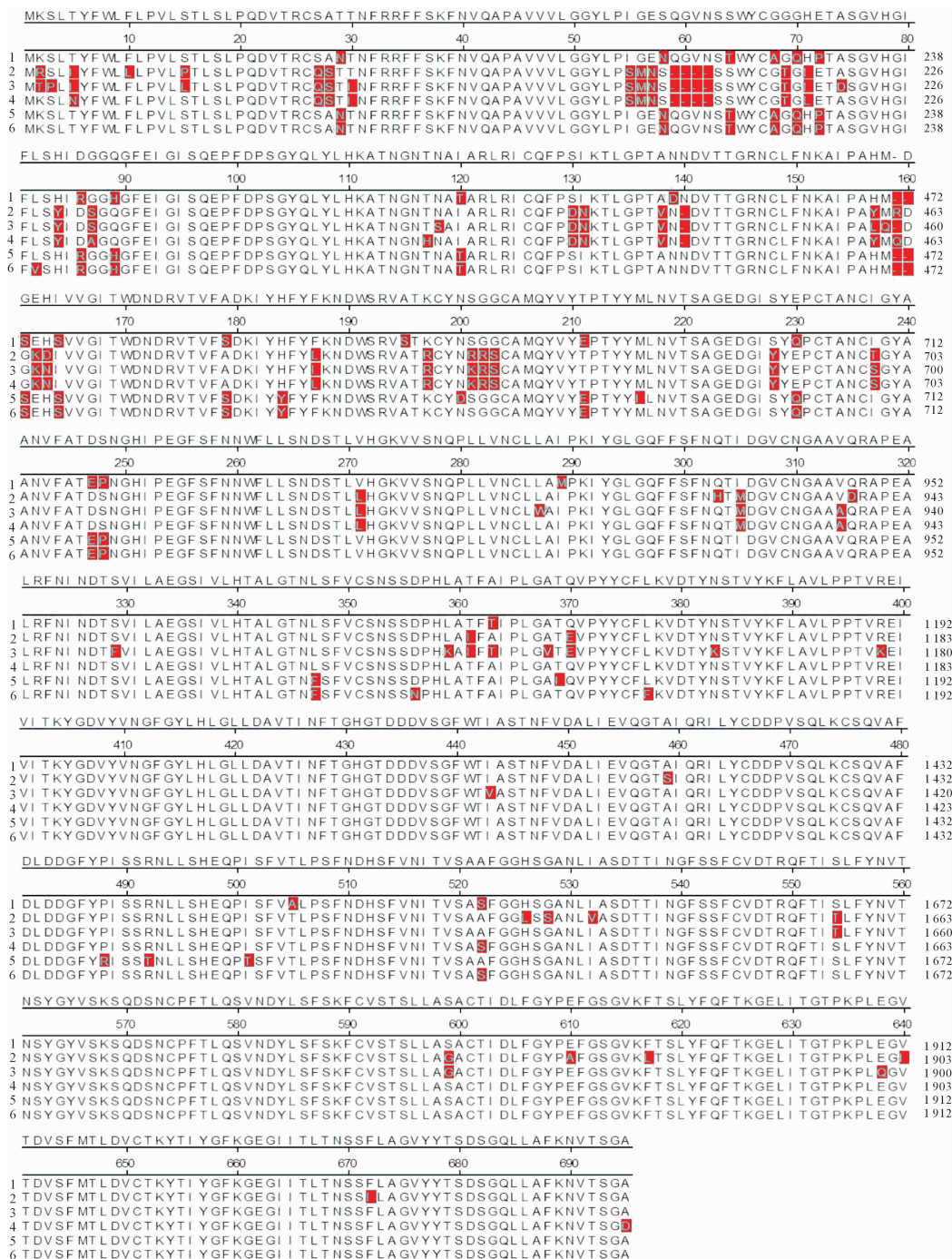


图 4 PEDV S1 基因的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of nucleotide sequences from different PEDV S1 genes

选取具有代表性的 PEDV 毒株 S1 蛋白氨基酸序列信息,采用 DNASTar 软件进行分析表明,CH-HeB14 与 GD-1、USA/Iowa/18984/2013 毒株亲缘关系很近,同源性分别为 98.0%和 98.6%。与 CV777 经典株、attenuated DR13 疫苗株的同源性依次为 90.7%和 90.4%。通过 S1 蛋白氨基酸序列

比对发现,CH-HeB14 株 S1 蛋白氨基酸序列不同区域都存在明显突变,尤其在第 1—240 位氨基酸间突变频率最高,在 59—62 位插入 QGVN,在 140 位插入 N,而在 159—160 位缺失 RD,此外还有大量氨基酸发生了点突变(图 5)。



1. CH-HeB14; 2. CV777(AF353511); 3. attenuated DR13(JQ023162); 4. OH851(KJ39978);
5. GD-1(JX647847); 6. USA/Iowa/18984/2013

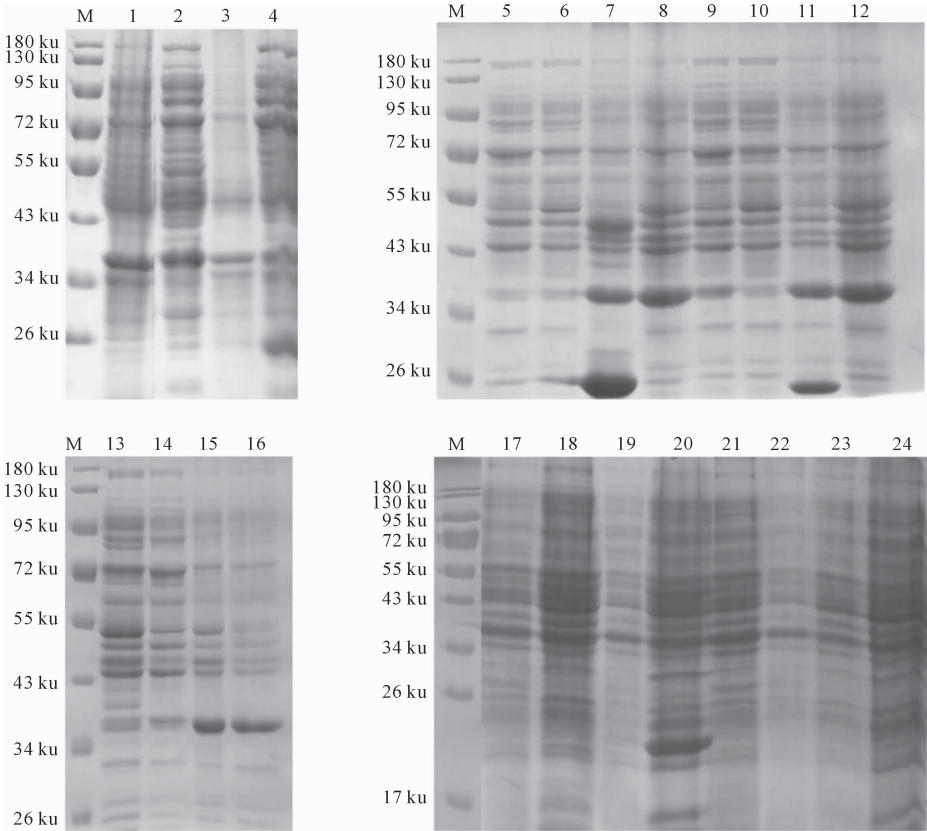
图5 PEDV CH-HeB14 株与参考毒株 S1 氨基酸序列对比分析

Fig. 5 Comparison of S1 amino acid sequences of PEDV CH-HeB14 strain and reference strains

2.4 PEDV S1 重组蛋白的原核表达与鉴定

将重组菌株经 IPTG 诱导目的蛋白表达,经 SDS-PAGE 检测,rS1A 的沉淀在 25 ku 处有一条明显的蛋白条带,rS1B 的沉淀在 23 ku 处有一条明显的蛋白条带,rS1C-1 的沉淀在 20 ku 处有一条带,说明这 3 个片段均以包涵体形式表达;rS1、rS1C 和 rS1C-2 未诱导、诱导后的上清及沉淀蛋白中均无明显

特征条带(图 6),说明这 3 个区段未能表达,且 rS1 在 Rosetta(DE3)菌种中亦无表达(结果在图中未给出)。Western blotting 检测显示,抗 PEDV 阳性血清特异性识别 rS1A、rS1B 和 rS1C-1 目的蛋白,条带大小与预期大小相符(图 7),说明表达的重组蛋白具有很好的反应原性。

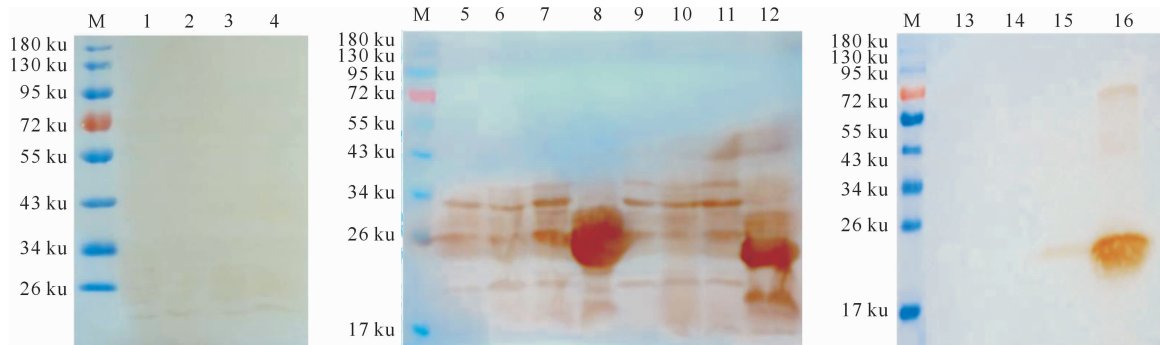


M. 蛋白 Marker;1. rS1 诱导沉淀(BL21(DE3));2. rS1 诱导上清(BL21(DE3));3. rS1 未诱导沉淀(BL21(DE3));4. rS1 未诱导上清(BL21(DE3));5. rS1A 诱导上清;6. rS1A 未诱导上清;7. rS1A 诱导沉淀;8. rS1A 未诱导沉淀;9. rS1B 诱导上清;10. rS1B 未诱导上清;11. rS1B 诱导沉淀;12. rS1B 未诱导沉淀;13. rS1C 诱导上清;14. rS1C 未诱导上清;15. rS1C 诱导沉淀;16. rS1C 未诱导沉淀;17. rS1C-1 未诱导上清;18. rS1C-1 未诱导沉淀;19. rS1C-1 诱导上清;20. rS1C-1 诱导沉淀;21. rS1C-2 未诱导上清;22. rS1C-2 未诱导沉淀;23. rS1C-2 诱导上清;24. rS1C-2 诱导沉淀

M. Protein Marker;1. Precipitate of induced rS1(BL21(DE3));2. Supernatant of induced rS1(BL21(DE3));3. Precipitate of non-induced rS1(BL21(DE3));4. Supernatant of non-induced rS1(BL21(DE3));5. Supernatant of induced rS1A;6. Supernatant of non-induced rS1A;7. Precipitate of induced rS1A;8. Precipitate of non-induced rS1A;9. Supernatant of induced rS1B;10. Supernatant of non-induced rS1B;11. Precipitate of induced rS1B;12. Precipitate of non-induced rS1B;13. Supernatant of induced rS1C;14. Supernatant of non-induced rS1C;15. Precipitate of induced rS1C;16. Precipitate of non-induced rS1C;17. Supernatant of non-induced rS1C-1;18. Precipitate of non-induced rS1C-1;19. Supernatant of induced rS1C-1;20. Precipitate of induced rS1C-1;21. Supernatant of non-induced rS1C-2;22. Precipitate of non-induced rS1C-2;23. Supernatant of induced rS1C-2;24. Precipitate of induced rS1C-2

图 6 PEDV S1 及其截短片重组蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 6 Detection of recombinant protein expression of PEDV S1 and its truncated fragments by SDS-PAGE



M. 蛋白 Marker;1. rS1 诱导沉淀(BL21(DE3));2. rS1 诱导上清(BL21(DE3));3. rS1 未诱导沉淀(BL21(DE3));4. rS1 未诱导上清(BL21(DE3));5. rS1A 未诱导上清;6. rS1A 未诱导沉淀;7. rS1A 诱导上清;8. rS1A 诱导沉淀;9. rS1B 未诱导上清;10. rS1B 未诱导沉淀;11. rS1B 诱导上清;12. rS1B 诱导沉淀;13. rS1C-1 未诱导上清;14. rS1C-1 未诱导沉淀;15. rS1C-1 诱导上清;16. rS1C-1 诱导沉淀

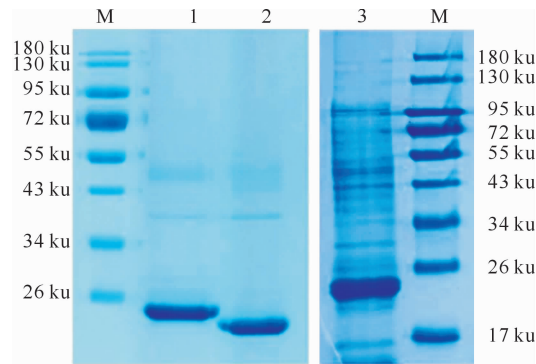
M. Protein Marker;1. Precipitate of induced rS1(BL21(DE3));2. Supernatant of induced rS1(BL21(DE3));3. Precipitate of non-induced rS1;4. Supernatant of non-induced rS1;5. Supernatant of non-induced rS1A;6. Precipitate of non-induced rS1A;7. Supernatant of induced rS1A;8. Precipitate of induced rS1A;9. Supernatant of non-induced rS1B;10. Precipitate of non-induced rS1B;11. Supernatant of induced rS1B;12. Precipitate of induced rS1B;13. Supernatant of non-induced rS1C-1;14. Precipitate of non-induced rS1C-1;15. Supernatant of induced rS1C-1;16. Precipitate of induced rS1C-1

图 7 PEDV S1 及其截短片段重组蛋白的 Western blotting 鉴定

Fig. 7 Identification of recombinant protein expression of PEDV S1 and its truncated fragments by Western blotting

2.5 PEDV S1 包涵体蛋白的纯化

PEDV S1 包涵体蛋白经一站式 His 标记蛋白质微量纯化试剂盒纯化后,用 SDS-PAGE 电泳检测结果显示,得到较高纯度的重组蛋白 rS1A、rS1B 和 rS1C-1(图 8)。



M. 蛋白 Marker;1. 纯化的 rS1A 包涵体;

2. 纯化的 rS1B 包涵体;3. 纯化的 rS1C-1 包涵体

M. Protein Marker;1. Purified rS1A inclusion body protein;2. Purified rS1B inclusion body protein;3. Purified rS1C-1 inclusion body protein

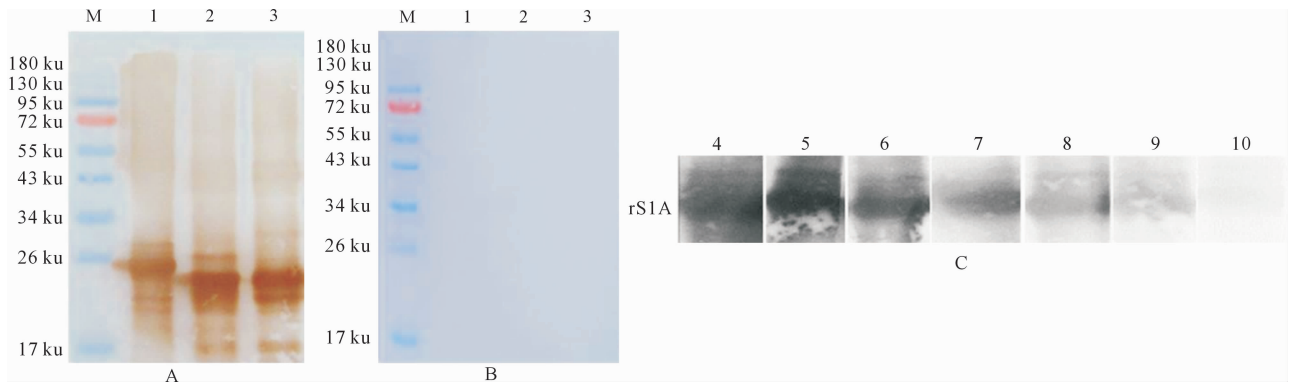
图 8 PEDV rS1A、rS1B 和 rS1C-1 纯化后包涵体蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 8 Detection of purified inclusion bodies of PEDV rS1A, rS1B and rS1C-1 proteins by SDS-PAGE

2.6 PEDV S1 蛋白多克隆抗体的活性检测

Western blotting 检测结果显示,1 : 2 000 倍稀释的 PEDV S1 蛋白多克隆抗体与重组蛋白 rS1A、rS1B 和 rS1C-1 反应后分别在 25,23 和 20 ku 处出现特异性条带(图 9-A),1 : 2 000 倍稀释的兔阴性血清与目的蛋白均无特异性反应条带(图 9-B);为了测定该多克隆抗体的效价,利用 rS1A 为抗原,采用 Western blotting 进行检测,结果表明,1 : 32 000 倍稀释的多抗与 rS1A 重组蛋白反应后在 25 ku 处仍有微弱的特异性条带,1 : 64 000 倍稀释多抗与 rS1A 反应后无条带(图 9-C),表明所制备的多克隆抗体对 rS1A 蛋白的 Western blotting 效价为 1 : 32 000。鉴于所制备的多克隆抗体在 1 : 2 000 倍稀释时与重组蛋白 rS1A、rS1B 和 rS1C-1 均有良好的反应性,说明在一般的检测应用中,这个滴度抗体的效价已经足够,因此本试验未对所制备的混合型抗体对 rS1B 和 rS1C-1 的效价进行进一步检测。

IPMA 结果显示,多克隆抗体(1 : 100 倍稀释)分别与 PEDV CH-HeB14 毒株和 attenuated DR13 毒株感染的 Vero 细胞呈特异性反应,感染病毒的细胞质呈棕红色,兔阴性血清(1 : 100 倍稀释)与这 2 种病毒感染细胞均无特异性反应(图 10)。



A、B. 分别为 1 : 2 000 倍稀释的多克隆抗体、未免疫兔阴性血清与重组蛋白 rS1A(1)、rS1B(2) 和 rS1C-1(3)反应；
C. 重组蛋白 rS1A 与倍比稀释(4~10 分别为 1 : 1 000,1 : 2 000,1 : 4 000,1 : 8 000,1 : 16 000,1 : 32 000,1 : 64 000 倍)的多克隆抗体反应；M. 蛋白 Marker
A、B. Rabbit polyclonal antibody against PEDV S1 and non-immunized rabbit serum (diluted at 1 : 2 000) reacted with recombinant protein rS1A(1),rS1B(2) and rS1C-1(3);C. Coupling diluted rabbit polyclonal antibody (4—10,1 : 1 000,1 : 2 000,1 : 4 000,1 : 8 000,1 : 16 000,1 : 32 000 and 1 : 64 000,respectively) against PEDV S1 reacted with recombinant rS1A protein;M. Protein Marker

图 9 PEDV S1 蛋白多克隆抗体活性和效价的 Western blotting 检测

Fig. 9 Identification of activities and titers of prepared pAb against PEDV S1 protein by Western blotting

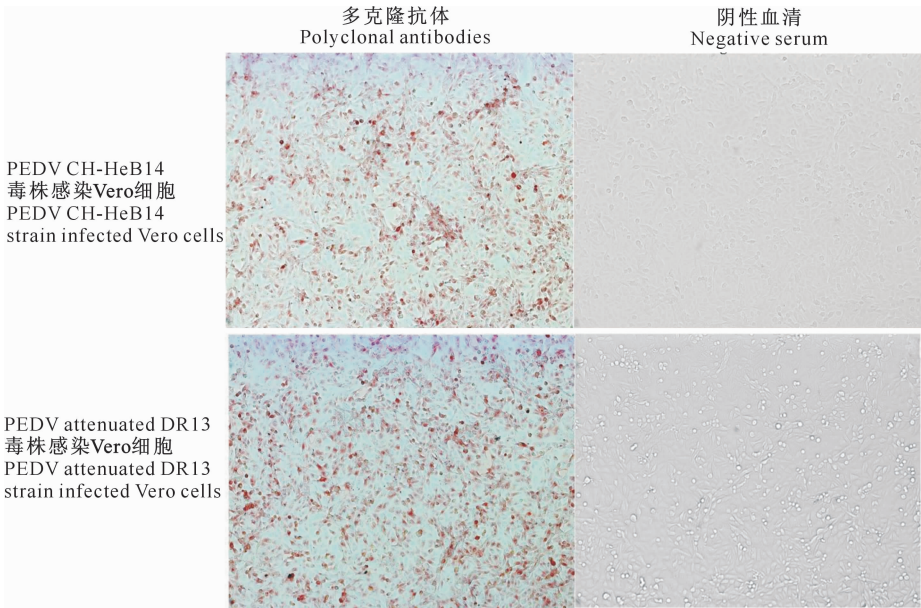


图 10 PEDV S1 蛋白多克隆抗体与不同毒株反应活性的 IPMA 法检测

Fig. 10 Identification of activities of prepared rabbit anti-PEDV S1 pAb with PEDV different strains by IPMA

3 讨论

近年来,PEDV 病毒持续变异,目前已经有多个 PEDV 新毒株的全基因组序列被测定,其致病性和传播能力也引起广泛关注,PEDV 流行株与传统 CV777 疫苗株相比,在基因水平上发生了很大变异^[13,20-22]。本试验将 CH-HeB14 流行株的 S1 基因与国内外已发表的 31 株 PEDV S1 基因序列进行了

比对分析发现,CH-HeB14 流行株与经典疫苗株(CV777、attenuated DR13)、virulent DR13、SM98 韩国株、美国株 OH851 及 2010 年以前分离的部分中国株(LZC、CH-S、JS2008)在进化上明显处于不同分支,而与 2010 年以后的流行毒株处于同一分支,这表明近年来 PEDV S1 基因发生了显著变异,这可能是由于疫苗的长期使用促使 PEDV 在免疫压力下发生变异。同源性分析结果表明,CH-

HeB14 与 GD-1、USA/Iowa/18984/2013 毒株 S1 基因编码的氨基酸同源性在 98.0% 以上;而与 CV777 经典株、attenuated DR13 疫苗株和被称为“过渡毒株”的 OH851 株^[23-24] S1 基因编码氨基酸序列的同源性仅为 90%~93%。相比于 CV777 经典株、attenuated DR13 疫苗株,CH-HeB14 株 S1 基因氨基酸序列不同区域都存在明显突变,尤其在靠近 N 端的前 240 位区段的氨基酸突变频率最高,其他位点也有不同程度的突变、插入或缺失。近年来研究发现,不同分离株 PEDV S 基因 N 端区域存在较高变异性^[25-26],该区段外部结构域有介导机体产生中和抗体的抗原表位及与宿主细胞表面大分子结合的受体结合域,故氨基酸序列的突变,可能导致抗原表位也发生变异,这也可能导致现有商品化的 PEDV 疫苗株产生的抗体不能高效或完全中和新流行毒株,从而导致该病的大面积流行。

鉴于 PEDV S 蛋白 S1 区含有病毒重要的中和表位区,本研究采用原核表达系统对 PEDV rS1 及截短片段(S1A、rS1B、rS1C、rS1C-1、rS1C-2)进行表达,SDS-PAGE 结果显示,rS1 全长在 BL21(DE3)菌株和能够提供密码子的 Rosetta(DE3)菌株中均未表达,rS1A、rS1B 成功表达,而 rS1C 片段仍未表达,将 rS1C 片段分为 rS1C-1 和 rS1C-2 两段,结果仅 rS1C-1 获得表达,这表明 S1 基因内可能存在跨膜结构,且跨膜结构在 S1C-2 区域内。这些截短片段编码蛋白均以包涵体形式表达,Western blotting 检测表明,重组蛋白能够与抗 PEDV 阳性血清反应。IPMA 鉴定结果显示,采用 rS1A、rS1B 和 rS1C-1 重组蛋白联合免疫兔制备的多克隆抗体不仅能够识别重组蛋白,还能与病毒感染的细胞呈特异性反应,表明 PEDV CH-HeB14 株 S1 蛋白多克隆抗体具有很好的免疫活性,且与经典株 attenuated DR13 具有交叉反应性。

目前,国内对 PEDV 流行毒株 S 蛋白原核表达及其免疫原性检测已有所研究。如王晨枫等^[27]将 PEDV HB/FN 株 S 基因抗原性较高的片段分别插入到 pET28a、pET32a 和 pGEX-6p-1 原核表达载体中进行表达,结果显示,S 基因在 pET28a 中表达量最高,目的蛋白以包涵体形式存在。本试验利用 pET28a 原核表达载体得到的重组蛋白也以包涵体形式存在。王国松等^[28]选取 S1 蛋白 502~641 位氨基酸,并将其基因克隆到原核表达载体上,以 GST-S417 重组蛋白免疫家兔制备多克隆抗体,ELISA 效价高达 1:10 000 以上,Western blotting

检测抗体效价可达 1:2 000 以上。任晓峰等^[29]表达猪流行性腹泻病毒 PEDV 截短 S1 基因(rS1 aa636—789),将重组蛋白免疫兔制备 pAb,间接 ELISA 效价可达 1:65 536。本试验采用 rS1A、rS1B 和 rS1C-1 蛋白联合免疫家兔所制备的混合型多克隆抗体能特异性识别这 3 种蛋白,且混合型多克隆抗体对 rS1A 蛋白的 Western blotting 效价为 1:32 000,表明所制备的免疫原具有很高的免疫原性,且所制备的多克隆抗体可用于病毒抗原的检测。3 个重组蛋白联合免疫兔制备的多克隆抗体不仅能与 PEDV CH-HeB14 病毒本身呈特异性反应,还与经典疫苗株 attenuated DR13 病毒反应。鉴于 S1 蛋白是 PEDV 的主要抗原,在诊断^[16]、治疗^[18,30]和疫苗^[19,31]开发中具有重要价值,本课题组下一步将开展抗 S1 蛋白 pAb 对 PEDV CH-HeB14 流行株、经典疫苗株 PEDV attenuated DR13 的中和活性研究及治疗性卵黄抗体制剂和疫苗等研究。

综上所述,本研究利用原核表达系统成功截短表达了 PEDV CH-HeB14 流行株 S1 蛋白,表达的重组蛋白具有很好的免疫原性,所制备的多克隆抗体免疫活性良好,为进一步开展 PEDV 诊断试剂盒和基因工程疫苗研究提供了基础材料。

[参考文献]

- [1] Shibata I, Tsuda T, Mori M, et al. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages [J]. Vet Microbiol, 2000, 72(3/4):173-182.
- [2] Li R, Qiao S, Yang Y, et al. Phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field strains in central China based on the ORF3 gene and the main neutralization epitopes [J]. Arch Virol, 2014, 159(5):1057-1065.
- [3] Gao Y, Kou Q, Ge X, et al. Phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus field strains prevailing recently in China [J]. Arch Virol, 2013, 158(3):711-715.
- [4] Pan Y, Tian X, Li W, et al. Isolation and characterization of a variant porcine epidemic diarrhea virus in China [J]. Virol J, 2012, 9:195.
- [5] Chen J, Wang C, Shi H, et al. Complete genome sequence of a Chinese virulent porcine epidemic diarrhea virus strain [J]. J Virol, 2011, 85(21):11538-11539.
- [6] Huang Y W, Dickerman A W, Pineyro P, et al. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States [J]. MBio, 2013, 4(5):e00737-13.
- [7] Stevenson G W, Hoang H, Schwartz K J, et al. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States; clinical signs, lesions, and viral genomic sequences [J]. J Vet Diagn In-

- vest, 2013, 25(5): 649-654.
- [8] Chen F, Pan Y, Zhang X, et al. Complete genome sequence of a variant porcine epidemic diarrhea virus strain isolated in China [J]. J Virol, 2012, 86(22): 12448.
- [9] Chen J, Liu X, Shi D, et al. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus variant [J]. J Virol, 2012, 86(6): 3408.
- [10] Li W, Li H, Liu Y, et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011 [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(8): 1350-1353.
- [11] Cho Y Y, Lim S I, Kim Y K, et al. Complete genome sequence of K14JB01, a novel variant strain of porcine epidemic diarrhea virus in South Korea [J]. Genome Announc, 2014, 2(3): e00505-14.
- [12] Fan J H, Li Y J. Cloning and sequence analysis of the M gene of porcine epidemic diarrhea virus LJB/03 [J]. Virus Genes, 2005, 30(1): 69-73.
- [13] Yang D Q, Ge F F, Ju H B, et al. Whole-genome analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) from eastern China [J]. Arch Virol, 2014, 159(10): 2777-2785.
- [14] Kamau A N, Park J E, Park E S, et al. Porcine amino peptidase N domain VII has critical role in binding and entry of porcine epidemic diarrhea virus [J]. Virus Res, 2017, 227: 150-157.
- [15] Liu D Q, Ge J W, Qiao X Y, et al. High-level mucosal and systemic immune responses induced by oral administration with *Lactobacillus*-expressed porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) S1 region combined with *Lactobacillus*-expressed N protein [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93(6): 2437-2446.
- [16] Gerber P F, Gong Q, Huang Y W, et al. Detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in serum and colostrum by indirect ELISA [J]. Vet J, 2014, 202(1): 33-36.
- [17] Oh J, Lee K W, Choi H W, et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein [J]. Arch Virol, 2014, 159(11): 2977-2987.
- [18] Lee D H, Jeon Y S, Park C K, et al. Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk antibody (IgY) against a recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein in piglets [J]. Arch Virol, 2015, 160(9): 2197-2207.
- [19] Makadiya N, Brownlie R, van den Hurk J, et al. S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein as a vaccine antigen [J]. Virol J, 2016, 13: 57.
- [20] Sun P, Gu C Y, Ding Y Y, et al. Sequence and phylogenetic analyses of the M and N genes of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strains in Anhui province, China [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4): 13403-13413.
- [21] 杜晓莉, 王一成, 吴润, 等. 2010—2013 年浙江省猪流行性腹泻病毒临床检测及 PEDV-S 基因型分析 [J]. 浙江农业学报, 2014, 26(3): 581-587.
- [22] Tian Y, Su D, Zhang H, et al. Complete genome sequence of a very virulent porcine epidemic diarrhea virus strain, CH/GDGZ/2012, isolated in southern China [J]. Genome Announc, 2013, 1(4): e00645-13.
- [23] Wang L, Hayes J, Byrum B, et al. US variant porcine epidemic diarrhea virus: histological lesions and genetic characterization [J]. Virus Genes, 2016, 52(4): 578-581.
- [24] Lee S, Park G S, Shin J H, et al. Full-genome sequence analysis of a variant strain of porcine epidemic diarrhea virus in South Korea [J]. Genome Announc, 2014, 2(6): e01116-14.
- [25] Kim Y K, Lim S I, Lim J A, et al. A novel strain of porcine epidemic diarrhea virus in Vietnamese pigs [J]. Arch Virol, 2015, 160(6): 1573-1577.
- [26] Temeeyasen G, Srijangwad A, Tripipat T, et al. Genetic diversity of ORF3 and spike genes of porcine epidemic diarrhea virus in Thailand [J]. Infect Genet Evol, 2014, 21: 205-213.
- [27] 王晨枫, 左玉柱, 裴丽华, 等. 猪流行性腹泻病毒 HB/FN 株 S 基因的克隆、原核表达及免疫原性分析 [J]. 动物医学进展, 2013, 34(5): 21-25.
- Wang C F, Zuo Y Z, Pei L H, et al. Cloning, prokaryotic expression and immunogenicity analysis of S gene of porcine epidemic diarrhea virus HB/FN strain [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2013, 34(5): 21-25.
- [28] 王国松, 张明, 朱于敏, 等. 猪流行性腹泻病毒流行毒株 S1 片段的克隆表达及其抗体制备 [J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(12): 103-107.
- Wang G S, Zhang M, Zhu Y M, et al. Cloning and expression of porcine epidemic diarrhea virus truncate S1 protein and preparation its antibodies [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2015, 47(12): 103-107.
- [29] 任晓峰, 贾文龙. 猪流行性腹泻病毒 S1 蛋白截短表达及多抗制备 [J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(9): 46-50.
- Ren X F, Jia W L. Expression and polyclonal antibodies preparation of porcine epidemic diarrhea virus truncate S1 protein [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2013, 44(9): 46-50.
- [30] 胡青松, 李吕木, 张小飞, 等. 猪流行性腹泻病毒 3 种抗原卵黄抗体的制备 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(11): 35-40.
- Hu Q S, Li L M, Zhang X F, et al. Preparation of yolk antibodies against three different antigens of porcine epidemic diarrhea virus [J]. Journal of Northwest A&F University(Natural Science Edition), 2015, 43(11): 35-40.
- [31] Hain K S, Joshi L R, Okda F, et al. Immunogenicity of a recombinant parapoxvirus expressing the spike protein of porcine epidemic diarrhea virus [J]. J Gen Virol, 2016, 97(10): 2719-2731.