

网络出版时间:2019-03-07 13:33 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.09.003
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190307.1332.006.html

猪流行性腹泻病毒 S1-NTD 蛋白表达及其免疫原性研究

孙 裴¹,张 娟²,舒金琪¹,施杏芬³,FAHD¹,舒建洪²,钱 泓²

(1 安徽农业大学 动物科技学院,安徽 合肥 230036;2 浙江理工大学 生命科学与医药学院,浙江 杭州 310018;
3 浙江省兽药饲料监测所,浙江 杭州 310020)

【摘要】【目的】在昆虫细胞中表达猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus,PEDV) S1-NTD 蛋白,研究其免疫原性,为基于 PEDV S 蛋白的基因工程亚单位疫苗的研究奠定基础。【方法】PCR 扩增 PEDV S1-NTD 基因,构建其重组表达质粒 pFastBac Dual PEDV S1-NTD 和重组穿梭质粒 Ac-PEDV S1-NTD。将 Ac-PEDV S1-NTD 转染 sf9 昆虫细胞,利用昆虫杆状病毒表达系统制备重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD。将 P2 代重组杆状病毒感染 sf9 细胞,Western blot 鉴定重组蛋白的表达,空斑试验测定重组杆状病毒的滴度。在此基础上,分别以感染复数(multiplicity of infection,MOI)为 0.1、1 和 3 的 P2 代重组杆状病毒感染 sf9 细胞,并在感染后 1、2、3、4 和 5 d 收集细胞,通过 Western blot 和空斑试验分别检测目的蛋白的表达量和重组杆状病毒的增殖情况。将 MOI 为 0.1 的 P3 代重组杆状病毒皮下注射免疫 BALB/c 小鼠,每隔 2 周免疫 1 次,共免疫 3 次,以注射 PBS、空载体 Bacmid 和 PEDV 商业疫苗为对照组,于首免后不同时间采集血液分离其血清,ELISA 法检测血清中 PEDV 特异性抗体的水平;于首免后 35 d 剖取小鼠脾脏,分离其淋巴细胞;PEDV 刺激后,MTT 法检测小鼠脾淋巴细胞的增殖情况。【结果】PCR 扩增获得了约 738 bp 的 PEDV S1-NTD 基因;成功构建了重组表达质粒 pFastBac Dual PEDV S1-NTD、重组穿梭质粒 Ac-PEDV S1-NTD 和重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD。利用杆状病毒表达系统在 sf9 细胞内成功表达了重组 PEDV S1-NTD 蛋白,且杆状病毒以 MOI 为 1 感染 sf9 细胞后在第 3 天蛋白表达量达到最高。在首免后 35 d,重组杆状病毒免疫组小鼠血清效价达到最高值,为 1:5 000,与商业疫苗组效价一致;淋巴细胞增殖试验表明,重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD 免疫组小鼠脾淋巴细胞对 PEDV 的刺激也发生了显著增殖($P<0.05$),而 PBS 和空载体 Bacmid 对照组淋巴细胞未发生明显增殖($P>0.05$)。【结论】成功构建了重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD,在昆虫细胞中成功表达了 PEDV S1-NTD 蛋白,且具有较好的免疫原性。

【关键词】猪流行性腹泻病毒;S1 蛋白;昆虫杆状病毒表达系统;免疫原性;基因工程疫苗
【中图分类号】 Q786;S852.4⁺3 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2019)09-0017-08

Expression and immunogenicity of S1-NTD protein of porcine epidemic diarrhea virus in insect cells

SUN Pei¹,ZHANG Juan²,SHU Jinqi¹,SHI Xingfen³,FAHD¹,SHU Jianhong²,QIAN Hong²

(1 College of Animal Science and Technology,Anhui Agricultural University,Hefei,Anhui 230036,China;
2 College of Life Sciences and Medicine,Zhejiang Science and Technology University,Hangzhou,Zhejiang 310018,China;
3 Zhejiang Institute of Veterinary Drug and Feed Control, Hangzhou,Zhejiang 310020,China)

Abstract: 【Objective】The S1-NTD gene of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) was expressed in

【收稿日期】 2018-07-19
【基金项目】 安徽省自然科学基金项目(1708085MC83);浙江省重点研发计划项目(2019C02043);家畜疫病病原微生物学国家重点实验室开放基金项目(SKLVEB2016KFKT003);安徽省质量工程项目“动物医学专业卓越兽医师教育培养计划”(2016zjjh022)
【作者简介】 孙 裴(1979—),男,安徽合肥人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事动物传染病研究。E-mail:sunpei1979@126.com
【通信作者】 舒建洪(1978—),男,浙江金华人,教授,博士,硕士生导师,主要从事动物传染病研究。E-mail:shujh1978@163.com

insect cells and its immunogenicity was analyzed to provide basis for subunit vaccine research. **【Method】** PEDV S1-NTD gene was amplified by PCR to construct recombinant expression plasmid (pFastBac Dual PEDV S1-NTD) and recombinant shuttle plasmid (Ac-PEDV S1-NTD). The recombinant shuttle plasmid Ac-PEDV S1-NTD was transfected into sf9 insect cells, and the expression system of insect baculovirus was used to construct rvAcPEDV S1-NTD. The expression of recombinant protein was confirmed by Western blot, and the titer of recombinant baculovirus was measured by plaque assay. The sf9 cells were then infected with P2 recombinant baculovirus with the multiplicity of infection (MOI) of 0.1, 1 and 3, respectively, and the cells were collected 1, 2, 3, 4 and 5 days after infection. Western blot and plaque assay were performed to detect the expression of target protein and proliferation of recombinant baculovirus, respectively. BALB/c mice were subcutaneously injected with P3 recombinant baculovirus with MOI of 0.1, once every 2 weeks for a total of three times. Blood was collected at different times after the first dispensation, the serum was isolated, and the specific antibody level of PEDV in the serum of mice was detected by ELISA, and the spleen of mice was cut off 35 d after the first dispensation to isolate lymphocytes. After PEDV stimulation, the proliferation of mouse spleen lymphocytes was detected by MTT. **【Result】** The PEDV S1-NTD gene of about 738 bp was obtained by PCR amplification. The recombinant expression plasmid pFastBac Dual PEDV S1-NTD, the recombinant shuttle plasmid Ac-PEDV S1-NTD and the recombinant baculovirus rvAc-PEDV S1-NTD were successfully constructed. Recombinant PEDV S1-NTD protein was successfully expressed in sf9 cells by baculovirus expression system, and the recombinant protein reached the maximum when using baculovirus 1 MOI to infect sf9 cells and collecting the infected sf9 cells on the third day. At 35 days after the first immunization, the serum titer of mice in the recombinant baculovirus immunization group reached the highest value of $1:5\,000$, which was same as the titer of the commercial vaccine group. Lymphocyte proliferation test showed that the splenic lymphocytes stimulated by recombinant baculovirus rvAcPEDV S1-NTD immunized mice also had significant proliferation to PEDV ($P < 0.05$), while PBS and empty vector Bacmid control group had no significant proliferation ($P > 0.05$). **【Conclusion】** The recombinant baculovirus rvAcPEDV S1-NTD was successfully constructed, and S1-NTD protein was successfully expressed in insect cells with good immunogenicity.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus (PEDV); S1 protein; baculovirus expression system; immunogenicity; genetically engineering vaccine

猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的猪流行性腹泻病 (porcine epidemic diarrhea, PED) 具有高致病性、高死亡率等特点, 且在世界范围内广泛分布^[1]。1978 年, 比利时首次确认 PED 的病原^[2], 此后该病在匈牙利、德国、日本、中国、韩国、越南等多个欧亚国家相继发生^[3]。2013—2014 年, 美国、加拿大、古巴、墨西哥和日本出现 PED 疫情^[4-5]。PED 在我国部分地区时有发生和流行, 且多为混合感染爆发, 给养猪业带来了巨大的经济损失^[6-7]。疫苗接种是预防和控制 PED 的主要手段, 目前市场上的疫苗多为传统的弱毒疫苗或灭活疫苗, 而该类疫苗在安全性等方面存在诸多隐患^[8-9]。基因工程疫苗可有效解决传统疫苗存在的问题, 所以研究开发新型 PEDV 基因工程疫苗具有重要的意义。

PEDV 病毒囊膜上的纤突 (S) 蛋白^[10-12], 属于 I 型糖蛋白, 呈辐射状连接在病毒粒子囊膜表面上, 是病毒的主要抗原, 负责与宿主细胞的受体结合; 同时 PEDV S 蛋白也是诱导病毒产生中和抗体的主要抗原。在病毒侵染靶细胞时, S 蛋白与靶细胞膜上的相应位点结合, 通过膜融合进入细胞内部, 从而调节中和抗体的产生^[13-14]。因此 S 蛋白被认为是基因工程疫苗研究的关键候选抗原。编码 PEDV S 蛋白的基因序列大小约 4 125 nt, 编码 1 383 个氨基酸, 蛋白分子质量 180~220 ku。PEDV S 蛋白可以分为 2 个区域: S1 区 (1~789 位氨基酸) 和 S2 区 (790~1 383 位氨基酸), 其中 S2 蛋白较为保守, 而 S1 蛋白变异较大, 也是 S 蛋白主要的功能区^[15]。S1 蛋白包含 N 端结构域 (N terminal domain, NTD) 和 C 端结构域 (C terminal domain, CTD), 这 2 个结构域都

可能作为受体结合区(RBD)识别不同的细胞蛋白和糖,而诱导中和抗体产生的表位位于 RBD 内^[16]。

杆状病毒是昆虫的病原体,其所具有的一些典型特征(如在晚期基因高水平表达)使其非常适合作为外来基因表达的载体^[17-18]。为推进 PEDV 基因工程疫苗的探索和创新,本研究利用昆虫杆状病毒表达系统表达 PEDV S1-NTD 蛋白,并验证了其免疫原性,旨在为利用昆虫杆状病毒表达系统制备 PEDV 基因工程亚单位疫苗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

pFastBac Dual 载体、大肠杆菌 K-12 菌株 TG1、大肠杆菌 DH5 α 、大肠杆菌 DH10Bac、昆虫细胞 sf9,均由浙江省家蚕生物反应器和生物医药重点实验室保存。6 周龄 BALB/c 小鼠,由杭州玄竹生物科技有限公司提供。

PCR 高保真酶混合液、Cellfection II 转染试剂(Invitrogen,美国),DNA Marker (BioLabs,美国),DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒、PCR 清洁回收试剂盒(QIAGEN,德国),Quick-Cut 限制性内切酶(Takara,大连),SF-900IISFM 培养基(Gibco,美国),鼠源 Flag 单克隆抗体、鼠源抗 His6 单克隆抗体(Roche,瑞士),刀豆蛋白 ConA(Sigma,美国),PEDV 商业疫苗(浙江诗华诺倍威有限公司,杭州),HRP-羊抗小鼠单克隆抗体(Abcam,美国),小鼠淋巴细胞分离液(达科为生物技术有限公司),PEDV 酶联免疫试剂盒(Andy,美国)。

1.2 PEDV S1-NTD 基因 PCR 的扩增

利用 DNASTar 软件设计 S1-NTD 基因扩增引物,交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列:PEDV S1-NTD For:5'-TCCCCGGGATGCATCACCATCACCATCACGGCCAGTCCCTAGCTTT-3'(下划线碱基为 *Sam* I 酶切位点);PEDV S1-NTD Rev:5'-GGGGTACCTTAGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGACTGACAAATC-3'(下划线碱基为 *Kpn* I 酶切位点)。

以 PEDV S 基因(由浙江省家蚕生物反应器和生物医药重点实验室保存)为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为:PCR 高保真酶混合液 45 μ L,上、下游引物(10 μ mol/mL)各 2 μ L,DNA 模板 1 μ L。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,共 25 个循环;72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物用 1%琼脂糖凝胶

电泳进行鉴定。

1.3 重组表达质粒和穿梭质粒的构建及鉴定

将扩增出的 PEDV S1-NTD 基因进行 *Sam* I / *Kpn* I 双酶切,然后与经同样双酶切的 pFastBac Dual 载体连接,转入 TG1 感受态细胞中,构建出 pFastBac Dual PEDV S1-NTD 重组表达质粒,将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 后的菌液涂抹至含 0.1 mg/mL 氨苄青霉素的培养板上筛选阳性克隆,摇菌提取质粒后进行 *Sam* I / *Kpn* I 双酶切、PCR 扩增和测序鉴定。

将构建成功的 pFastBac Dual PEDV S1-NTD 重组表达质粒转化 DH10Bac 菌,与其中的 Bacmid 质粒进行同源重组,得到重组穿梭质粒 Ac-PEDV S1-NTD,并进行蓝白斑试验筛选。设计引物 M13 F:5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3',M13 R:5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3',交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以蓝白斑试验筛选的阳性重组质粒为模板,用 M13F/M13R、M13F/PEDV S1-NTD Rev、M13R/PEDV S1-NTD For、PEDV S1-NTD For/PEDV S1-NTD Rev 对重组穿梭质粒 Ac-PEDV S1-NTD 进行 PCR 鉴定。

1.4 重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD 的构建

将鉴定正确的重组穿梭质粒 Ac-PEDV S1-NTD 感染 sf9 细胞,观察细胞的发病状态。收集感染的 sf9,用细胞与上清中的 P1 代重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD 再次感染 sf9 细胞,获得 P2 代重组杆状病毒,用空斑试验测定其滴度。用其感染 sf9 细胞,48 h 后收集细胞,用细胞裂解液裂解后取上清液,用 10%的 SDS-PAGE 电泳分离细胞总蛋白,以鼠源抗 His6 单克隆抗体为一抗进行 Western blot 试验,验证重组蛋白 S1-NTD 在 sf9 细胞中的表达情况。

用密度为 1×10^6 mL⁻¹ 的处于对数生长期的健康 sf9 细胞铺六孔板,27 $^{\circ}$ C 静置 1 h,将 P2 代重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD 以感染复数(multiplicity of infection,MOI)为 0.1 感染 sf9 细胞,于感染后第 1,2,3,4,5 和 6 天收集细胞上清液,用空斑试验测定病毒滴度,进而绘制重组杆状病毒的增殖曲线。

1.5 目的蛋白 PEDV S1-NTD 在 sf9 细胞中的表达量

将 MOI 为 0.1,1 和 3 的 P2 重组杆状病毒分别感染 sf9 细胞,于感染后第 1,2,3,4 和 5 天分别收集细胞(MOI=3 时,第 5 天的细胞大量死亡,故未

收集细胞样品),PBS 洗涤后用细胞裂解液裂解后取上清液,以鼠源抗 His6 单克隆抗体作为一抗,用 Western blot 测定重组蛋白的表达量,同时以 β -actin 为内参蛋白。

1.6 重组蛋白 PEDV S1-NTD 的免疫原性分析

用 P2 代重组杆状病毒继续感染 sf9 细胞,制备 P3 代重组杆状病毒。用 MOI 为 0.1 的 P3 代重组杆状病毒感染 sf9 细胞,第 4 天收取上清液即病毒液。利用 30 ku 的超滤管浓缩病毒以达到要求的病毒滴度。取 24 只 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠,随机平均分为重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD 组及 PBS、空载体 Bacmid 和 PEDV 疫苗对照组,分别皮下注射免疫 rvAcPEDV S1-NTD、PBS、空载体 Bacmid、PEDV 商业疫苗,其中 rvAcPEDV S1-NTD 免疫量为 1×10^8 pfu/只,PBS 和 PEDV 商业疫苗的免疫量为 200 μ L/只,空载体 Bacmid 的免疫量为 1×10^8 pfu/只,每隔 2 周免疫 1 次,共免疫 3 次。

1.6.1 抗体效价 在第 1 次免疫后的第 0(第 1 次免疫当天),14,28 和 35 天,每组随机取 3 只小鼠,断尾采血,分离血清,100 倍稀释后,用 ELISA 法检测各组小鼠血清的效价,具体方法参照试剂盒说明书。

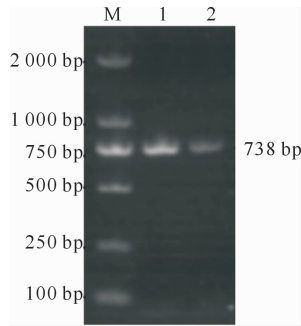
1.6.2 脾淋巴细胞增殖 在 小鼠第 1 次免疫后的第 35 天,每组取 3 只小鼠处死,在体积分数 75% 的酒精中浸泡 3 min 后,在超净工作台中解剖,分离脾脏,按照小鼠淋巴细胞分离液说明书分离脾淋巴细胞。以密度 1×10^6 mL⁻¹ 的脾淋巴细胞铺 96 孔板(100 μ L/孔),设置 ConA 阳性组、PEDV 刺激组和 PBS 阴性对照组,每组设置 3 个重复。ConA 阳性组脾淋巴细胞加入 20 μ g/mL 的 ConA,100 μ L/孔;PBS 阴性组加入 PBS 100 μ L/孔;PEDV 刺激组加 MOI 为 1 的 PEDV 病毒液,100 μ L/孔。各组细胞培养 42 h 后,加入 20 μ L 5 mg/mL MTT,振荡 1

min,放置 6 h 后弃掉上清液,每孔加入 100 μ L DM-SO,振荡 2 min,于 492 nm 下测定吸光值(OD₄₉₂)。计算刺激指数(SI),判断淋巴细胞的增值程度。刺激指数(SI)=刺激组 OD₄₉₂ 平均值/PBS 阴性对照组 OD₄₉₂ 平均值。

2 结果与分析

2.1 PEDV S1-NTD 基因的 PCR 扩增结果

PEDV S1-NTD 基因的 PCR 扩增产物电泳后,获得了约 738 bp 的片段(图 1),与预期结果(738 bp)相符。



M. DNA Marker DL2000;1,2. PCR 扩增产物

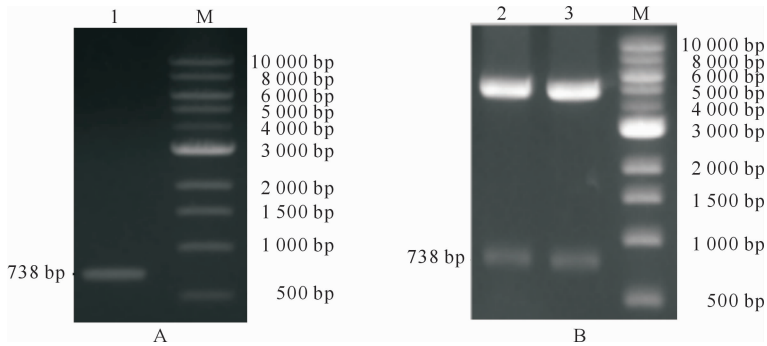
M. DNA Marker DL2000;1,2. PCR amplification product

图 1 PEDV S1-NTD 基因 PCR 扩增产物的电泳结果

Fig.1 PCR products of PEDV S1-NTD gene identified by agarose gel electrophoretogram

2.2 PEDV S1-NTD 基因表达质粒和重组穿梭质粒的鉴定

对构建完成的重组表达质粒 pFastBac Dual PEDV S1-NTD 进行 PCR 与双酶切鉴定,结果均在 738 bp 附近出现符合预期长度的特异性条带(图 2)。测序分析表明,构建完成的重组质粒中的目的基因 S1-NTD 序列与模板序列一致,表明重组质粒已构建成功。



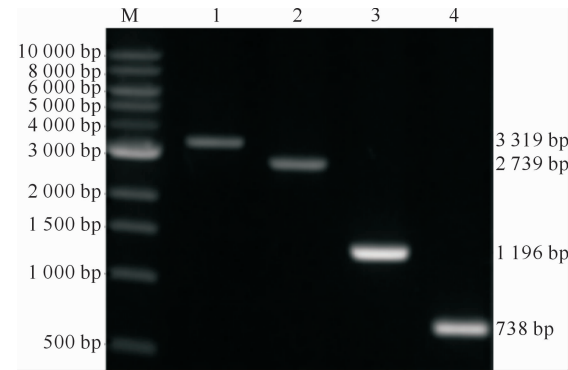
M. DNA Marker DL10000;1. PCR 扩增产物;2,3. pFastBac Dual PEDV S1-NTD 的 *Sam* I /*Kpn* I 双酶切产物

M. DNA Marker DL10000;1. PCR amplification product;2,3. Products of pFastBac Dual PEDV S1-NTD digested by enzyme *Sam* I and *Kpn* I

图 2 重组表达质粒 pFastBac Dual PEDV S1-NTD 的 PCR 鉴定(A)和双酶切鉴定(B)

Fig.2 PCR detection(A)and dual enzyme digestion(B)of recombinant plasmid pFastBac Dual PEDV S1-NTD

重组穿梭质粒 Ac-PEDV S1-NTD 经 M13F/M13R、M13F/PEDV S1-NTD Rev、M13R/PEDV S1-NTD For、PEDV S1-NTD For/PEDV S1-NTD Rev 引物 PCR 鉴定,分别获得了 3 319,2 739,1 196,738 bp 的片段,片段长度均与预期目的片段长度一致(图 3),表明重组穿梭质粒构建成功。



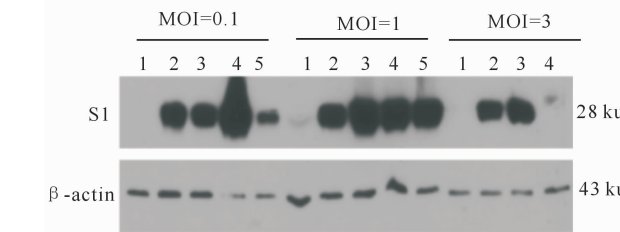
M, DNA Marker;1~4. 分别以 M13F/M13R、M13F/PEDV S1-NTD Rev、M13R/PEDV S1-NTD For、PEDV S1-NTD For/PEDV S1-NTD Rev 为引物的 PCR 扩增产物
M, DNA Marker;1~4. Products amplified with M13F/M13R, M13F/PEDV S1-NTD Rev, M13R/PEDV S1-NTD For, PEDV S1-NTD For/PEDV S1-NTD Rev as primers

图 3 重组穿梭质粒 Ac-PEDV S1-NTD 的 PCR 鉴定
Fig. 3 PCR detection of recombinant Ac-PEDV S1-NTD

2.3 重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD 的制备

将鉴定正确的重组穿梭质粒 Ac-PEDV S1-NTD 感染 sf9 细胞,5 d 后显微镜下观察到细胞体积增加,细胞核变大,停止生长,部分细胞贴壁不牢固,悬浮在培养基中,并有一部分细胞发生裂解死亡,说明细胞已经出现病变。利用空斑试验测定 P2 代重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD 的滴度为 8.5×10^6 pfu/mL。

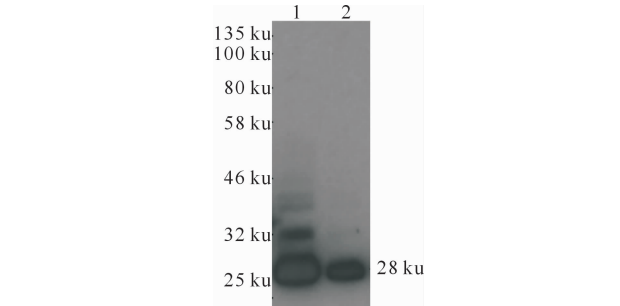
Western blot 检测结果(图 4)显示,在 25~32 ku 处出现条带,与预测的重组蛋白分子质量大小



1~5. 分别为转染后第 1,2,3,4,5 天
1-5. 1,2,3,4,5 days after transfection, respectively

图 6 PEDV S1-NTD 蛋白表达的 Western blot 检测

(28 ku)相符,表明重组蛋白已经在 sf9 细胞中成功表达。



1. 蛋白 Marker;2. 目的蛋白
1. Protein Marker;2. Target protein

图 4 PEDV S1-NTD 蛋白在 sf9 细胞中表达的 Western blot 鉴定
Fig. 4 PEDV S1-NTD protein expression in sf9 cell detected by using Western blot

重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD 的增殖曲线如图 5 所示。由图 5 可知,在感染后第 3 天时病毒滴度达到最高,为 8.1×10^6 pfu/mL。

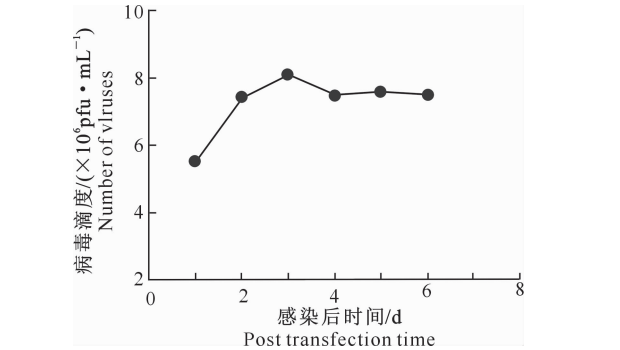


图 5 重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD 的增殖曲线
Fig. 5 Growth of recombinant baculovirus of rvAcPEDV S1-NTD

2.4 重组 PEDV S1-NTD 蛋白的表达量

由图 6 可知,P2 代重组杆状病毒感染 sf9 细胞时,MOI 为 0.1 的第 4 天和 MOI 为 1 的第 3 天,重组 PEDV S1-NTD 蛋白的表达量达到最高。

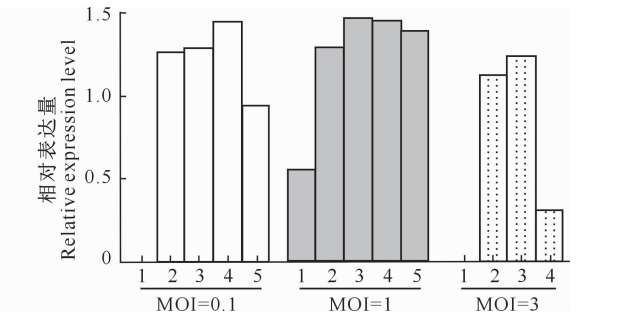


图 6 PEDV S1-NTD 蛋白表达的 Western blot 检测

Fig. 6 Detection of target protein PEDV S1-NTD expression by Western blot

2.5 重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD 的免疫原性

由图 7 可知,PBS 对照组、空载体 Bacmid 对照组小鼠血清中未检测到 PEDV 特异性抗体的产生;重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD 组、PEDV 商业疫苗组小鼠血清中 PEDV 特异性抗体水平随着免疫次数的增加而升高,均在免疫后 35 d 达到最高值,为 1 : 5 000。结果表明,与 PEDV 商业疫苗组一样,重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD 组也可诱

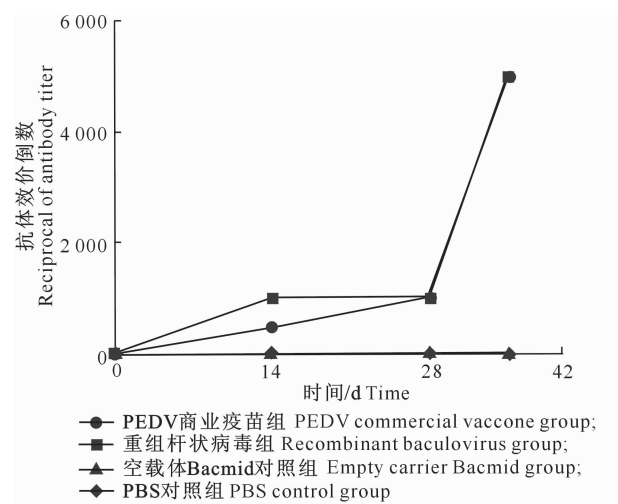


图 7 重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD 免疫小鼠血清 PEDV 特异性抗体的效价检测

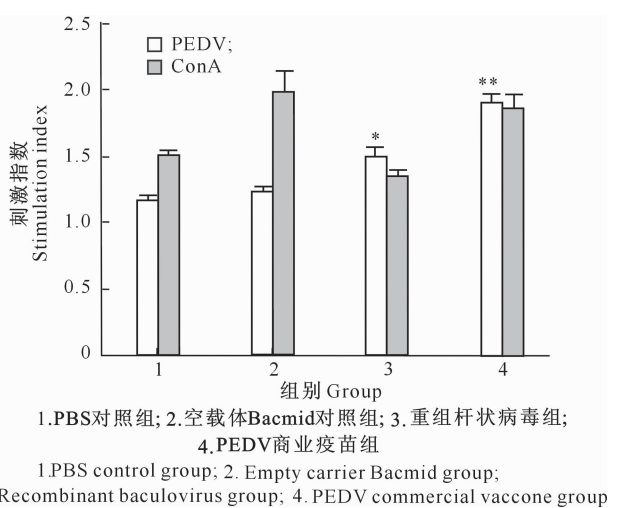
Fig. 7 Tier detection of serum PEDV specific antibody against recombinant baculovirus rvAcPEDV S1-NTD immunized mice

3 讨 论

目前,对于 PEDV S1 蛋白的重组表达所采用的表达系统主要有乳酸乳球菌表达系统^[19]、大肠杆菌表达系统^[20]、干酪乳杆菌表达系统^[21]、腺病毒表达系统^[22]和杆状病毒表达系统^[23]等。与原核表达系统及其他真核表达系统相比,昆虫杆状病毒表达系统由于具有独特的生物学特性而日益受到人们的青睐。杨德强等^[23]通过昆虫杆状病毒 Bac-to-Bac System 表达系统对 PEDV S1 蛋白进行了表达,但其未对表达产物的免疫原性进行检验。史翠萍等^[24]利用杆状病毒表面展示技术表达了 PEDV S1 蛋白,经动物免疫试验证实,表面展示有 PEDV S1 蛋白的重组杆状病毒能够激发有效的体液免疫及细胞免疫反应,具有较好的免疫原性。以上研究结果为本研究的开展提供了理论支撑。为了进一步探讨

导机体产生特异性抗体。

由图 8 可知,PBS 对照组和空载体 Bacmid 对照组小鼠脾淋巴细胞对于 PEDV 的刺激未发生明显增殖($P>0.05$),刺激指数明显小于 ConA 刺激组;重组杆状病毒 PEDV 组和 PEDV 商业疫苗组小鼠脾淋巴细胞对 PEDV 的刺激均发生了明显的增殖,刺激指数分别显著和极显著高于 PBS 对照组。结果表明,与 PEDV 商业疫苗组一样,重组杆状病毒 PEDV 组也可诱导机体产生细胞免疫效应。



“*”和“**”表示与 PBS 对照组差异显著和极显著
“*”and “**” means, compared with PBS control group

图 8 重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD 免疫小鼠脾淋巴细胞增殖情况

Fig. 8 Proliferation of spleen lymphatic cells in mice immunized with recombinant baculovirus rvAcPEDV S1-NTD

经杆状病毒表达系统表达的 PEDV S1 蛋白的免疫原性,本研究利用昆虫杆状病毒表达系统成功制备了重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD,用 rvAcPEDV S1-NTD 感染 sf9 细胞后,通过鼠源抗 His6 单克隆抗体进行 Western blot 分析,证实了目的蛋白可成功表达。在此基础上,通过不同 MOI 的重组杆状病毒感染 sf9 细胞后,空斑试验检测证实 MOI 为 0.1 时感染 sf9 细胞第 3 天病毒滴度达到最高值;Western blot 检测证实 MOI 为 1 时感染第 3 天,蛋白表达量达到最高。重组病毒 rvAcPEDV S1-NTD 免疫小鼠后,ELISA 法检测相应的抗体证实,在免疫后 35 d 效价达到最高值,为 1 : 5 000;淋巴细胞增殖试验结果证实,在 PEDV 病毒刺激下重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD 免疫组的淋巴细胞发生了明显的增殖。

综上所述,本研究利用昆虫杆状病毒表达系统

成功构建了重组杆状病毒 rvAcPEDV S1-NTD,并表达了具有免疫原性的 PEDV S1 蛋白,为后续研制 PEDV 亚单位疫苗奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 殷 震,刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997:681-688.
Yin Z, Liu J H. Animal virology [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1997: 681-688.
- [2] Pensaert M B, Bouck P D. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine [J]. Archives of Virology, 1978, 58(3): 243-247.
- [3] Pan Y F, Tian X Y, Li W, et al. Isolation and characterization of a variant porcine epidemic diarrhea virus in China [J]. Virology Journal, 2012, 9(1): 195.
- [4] Song D, Moon H, Kang B. Porcine epidemic diarrhea; a review of current epidemiology and available vaccines [J]. Clinical & Experimental Vaccine Research, 2015, 4(2): 166-176.
- [5] 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]. Veterinary Microbiology, 2000, 72(3): 173-182.
- [6] Supha Sawatt P, Pariwat P, Preeda L, et al. Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhea virus, Thailand [J]. Emerging Infectious Diseases, 2009, 15(7): 1112-1115.
- [7] Makadiya N, Brownlie R, Hurk J V D, et al. S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein as a vaccine antigen [J]. Virology Journal, 2016, 13(1): 1-10.
- [8] 马思奇,王 明,周金法,等.猪流行性腹泻病毒适应 Vero 细胞培养及以传代细胞毒制备氢氧化铝灭活疫苗免疫效力试验 [J]. 中国预防兽医学报, 1994, 16(2): 15-19.
Ma S Q, Wang M, Zhou J F, et al. Porcine epidemic diarrhea virus adaptation to Vero cell culture and preparation of aluminum hydroxide inactivated vaccine by passage cell cytotoxicity [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 1994, 16(2): 15-19.
- [9] 马思奇,王 明.猪传染性胃肠炎与猪流行性腹泻二联氢氧化铝细胞灭活疫苗的研究 [J]. 中国预防兽医学报, 1995, 17(6): 23-27.
Ma S Q, Wang M. Study on two aluminum hydroxide cell inactivated vaccine against transmissible gastroenteritis and swine epidemic diarrhea [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 1995, 17(6): 23-27.
- [10] Belouzard S, Millet J K, Licitra B N, et al. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein [J]. Viruses, 2012, 4(6): 1011-1033.
- [11] 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]. Veterinary Journal, 2014, 202(1): 33-36.
- [12] Li W, Kuppeveld F J M V, He Q, et al. Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus [J]. Virus Research, 2016, 226: 117-127.
- [13] Lei X, Zhao J, Wang X, et al. Development of a hybridoma cell line secreting monoclonal antibody against S protein of a chinese variant of PEDV [J]. Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis & Immunotherapy, 2015, 34(1): 12-16.
- [14] 孙东波,冯 力,时洪艳,等.猪流行性腹泻病毒 S 蛋白中和表位区单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(11): 887-890.
Sun D B, Feng L, Shi H Y, et al. Preparation and characterization of the monoclonal antibodies against neutralizing epitope region of PEDV S protein [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2007, 29(11): 887-890.
- [15] Zhu Q, Guo D, Feng L, et al. Expression and Purification of the scFv from hybridoma cells secreting a monoclonal antibody against S PROTEIN of PEDV [J]. Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis & Immunotherapy, 2013, 32(1): 41-61.
- [16] Li C, Li W, Lucio d E E, et al. Cell attachment domains of the PEDV spike protein are key targets of neutralizing antibodies [J]. Journal of Virology, 2017, 91(12): 1-10.
- [17] Pineda S, Martinez A M, Figueroa J I, et al. Influence of azadirachtin and methoxyfenozide on life parameters of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2009, 102(4): 1490.
- [18] Xu F, Lynn D E, Roode E C, et al. Establishment of a cell line from Chrysodeixis chalcites permissive for Chrysodeixis chalcites and Trichoplusia ni nucleopolyhedrovirus [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2010, 105(1): 56-62.
- [19] 王莉平,韩先杰,王孝彬,等.表达猪流行性腹泻病毒 S1 蛋白的重组乳酸乳球菌的构建及其免疫原性的研究 [J]. 中国兽医科学, 2017(9): 1118-1123.
Wang L P, Han X J, Wang X B, et al. Construction and immunogenicity of recombinant *Lactococcus lactis* expressing S1 protein of porcine epidemic diarrhea virus [J]. Veterinary Science in China, 2017(9): 1118-1123.
- [20] 桂 锐,童 岑,周丹娜,等.猪流行性腹泻病毒 S1 蛋白表达及反应原性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2017, 49(2): 64-67.
Gui R, Tong C, Zhou D N, et al. Prokaryotic expression of S1 protein of porcine epidemic diarrhea virus and its reactogenicity analysis [J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2017, 49(2): 64-67.
- [21] 葛俊伟,姜艳平,汪 森,等.猪流行性腹泻病毒 S1 蛋白在干酪乳杆菌中的分泌表达及免疫原性分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(4): 256-260.
Ge J W, Jiang Y P, Wang M, et al. Recombinant *Lactobacillus casei* secretory expression of porcine epidemic diarrhea virus spike protein and the immunogenicity analysis [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2009, 31(4): 256-260.
- [22] 项林盛,郑红玉,唐丽云,等.猪流行性腹泻病毒 S1 基因的克隆及在腺病毒中的表达 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(7): 110-

113.
Xiang L S,Zheng H Y,Tang L Y,et al. Cloning of S1 gene of porcine epidemic diarrhea virus and its expression in adenovirus [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine,2014(7):110-113.

[23] 杨德强,李慧春,陈鹏飞,等. 猪流行性腹泻病毒 S1 基因在昆虫细胞中的表达与鉴定 [J]. 中国动物传染病学报,2017,25(3):18-22.
Yang D Q,Li H C,Chen P F,et al. Characterization of porcine epidemic diarrhea virus S1 gene expressed in insect cells [J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases,2017,25(3):18-22.

[24] 史翠萍,严婷婷,崔康乐,等. 表面展示猪流行性腹泻病毒纤突蛋白 S1 的重组杆状病毒及其免疫效果研究 [J]. 蚕业科学,2016,42(6):1041-1048.
Shi C P,Yan T T,Cui K L,et al. Recombinant baculovirus displaying porcine epidemic diarrhea virus spike protein S1 and its immunogenicity analysis [J]. Science of Sericulture,2016,42(6):1041-1048.

(上接第 16 页)

[23] Chen J P,Sun D J,Dong C Z,et al. Genetic analysis of four wild Chum salmon *Oncorhynchus keta* populations in China based on microsatellite markers [J]. Environmental Biology of Fishes,2005,73:181-188.

[24] Hyunju S,Hideaki K,Masahide K. Long-term climate-related changes in somatic growth and population dynamics of Hokkaido chum salmon [J]. Environmental Biology of Fishes,2011,90:131-142.

[25] 王继隆,唐富江,刘 伟. 大麻哈鱼的年龄与生长 [J]. 水生生物学报,2012,36(6):1149-1155.
Wang J L,Tang F J,Liu W. Age and growth of Chum salmon [J]. Acta Hydrobiologica Sinica,2012,36(6):1149-1155.

[26] 王 臣,刘 伟,战培荣,等. 外源 Sr^{2+} 在大麻哈鱼胚胎耳石上的沉积 [J]. 应用生态学报,2015,26(10):3189-3194.
Wang C,Liu W,Zhan P R,et al. Exogenous Sr^{2+} sedimentation on otolith of chum salmon embryos [J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2015,26(10):3189-3194.

[27] 战培荣,刘 伟. 人工环境饲养大麻哈鱼初步试验研究 [J]. 农业工程学报,2011,27(S2):182-186.
Zhan P R,Liu W. Preliminary experiment study on rearing chum salmon in artificial environment [J]. Transactions of the CSAE,2011,27(S2):182-186.

[28] 解玉浩. 东北地区淡水鱼类 [M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,2007:19-23.
Xie Y H. Freshwater fishes in Northeast China [M]. Shenyang:Liaoning Science and Technology Press,2007:19-23.

[29] 张 琪,丛 鹏,彭 励. 通径分析在 Excel 和 SPSS 中的实现 [J]. 农业网络信息,2007(3):109-111.
Zhang Q,Cong P,Peng L. The implementation of path analysis in Excel and SPSS [J]. Agricultural Network Information,2007(3):109-111.

[30] 区又君,吉 磊,李加儿,等. 卵形鲳鲹不同月龄选育群体主要形态性状与体质量的相关性分析 [J]. 水产学报,2013,37(7):961-968.
Ou Y J,ji L,Li J E,et al. Correlation analysis of major morphometric traits and body weight of selective group at different month ages of *Trachinotus ovatus* [J]. Journal of Fisheries of China,2013,37(7):961-968.