

网络出版时间:2019-07-10 10:35 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2020.01.007
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190710.1033.014.html

猪传染性胃肠炎病毒 spike 蛋白亲和肽的原核表达

于天飞^{1a,2},董慧莹^{1a},谢鹏宇^{1a},孙婉姝^{1a},尹海畅^{1a,2},黎明^{1b},于志丹^{1a,2}

(1 齐齐哈尔大学 a 生命科学与农林学院,b 计算机与控制工程学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006;

2 黑龙江省抗性基因工程与寒地生物多样性保护重点实验室,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

[摘要] **【目的】**原核表达猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus of swine,TGEV)spike 蛋白亲和肽(SQHT),检测其病毒亲和性,为建立 TGEV 诊断方法奠定理论和物质基础。**【方法】**人工合成 TGEV spike 蛋白亲和肽基因,亚克隆后将该基因分别插入至原核表达载体 pET-32a 和 pGEX-6p-1 中,构建重组质粒 pET-32a-SQHT 和 pGEX-6p-SQHT,对重组质粒进行 *Bam*H I 单酶切和 *Bam*H I/*Xho* I 双酶切及测序鉴定。将重组质粒分别转化至大肠杆菌 Rosetta(DE3),用 IPTG 进行诱导表达,对其表达产物的生物学活性进行检测。**【结果】**亚克隆获得了 150 bp 的 TGEV spike 蛋白亲和肽基因。成功构建了重组质粒 pET-32a-SQHT 和 pGEX-6p-SQHT,并诱导表达出重组蛋白 TRX-SQHT 和 GST-SQHT,其分子质量分别为 25 和 31 ku。Western blot 分析表明,2 种重组蛋白与 TGEV 病毒粒子具有良好的亲和性;Dot-ELISA 分析表明,2 种重组蛋白与 TGEV 病毒粒子的最低结合滴度 TCID₅₀ 为 5×10^2 mL⁻¹。特异性试验表明,重组蛋白 TRX-SQHT 和 GST-SQHT 均可与 TGEV 产生特异性结合,而不与猪流行性腹泻病毒(PEDV)和猪轮状病毒(PoRV)结合。**【结论】**使用原核细胞成功表达了 TGEV spike 蛋白亲和肽,表达的重组蛋白具有很好的 TGEV 特异亲和性。

[关键词] 猪传染性胃肠炎病毒;spike 蛋白;亲和肽;原核表达

[中图分类号] S852.65⁺1

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2020)01-0049-08

Prokaryotic expression of affinity peptides to spike protein of transmissible gastroenteritis virus

YU Tianfei^{1a,2},DONG Huiying^{1a},XIE Pengyu^{1a},SUN Wanshu^{1a},
YIN Haichang^{1a,2},LI Ming^{1b},YU Zhidan^{1a,2}

(1 a College of Life Science and Agriculture and Forestry,b College of Computer and Control Engineering,

Qiqihar University,Qiqihar,Heilongjiang 161006,China;2 Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Resistance Gene Engineering and Protection of Biodiversity in Cold Areas,Qiqihar,Heilongjiang 161006,China)

Abstract: **【Objective】** Prokaryotic expression of affinity peptides to spike protein of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and analysis of viral affinity activity were conducted to provide basis for establishment of TGEV diagnostic methods.**【Method】** In this study,a tandem gene containing the TGEV spike protein affinity peptide was synthesized. After sub-cloning,the gene was inserted into prokaryotic expression vectors of pET-32a and pGEX-6p-1 to obtain recombinant plasmids pET-32a-SQHT and pGEX-6p-SQHT. The recombinant plasmids were identified by single enzyme digestion of *Bam*H I ,double enzyme digestion of *Bam*H I/*Xho* I and sequencing. Then,the recombinant plasmids were transformed into *E.*

[收稿日期] 2018-11-25

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金项目(QC2014C034);黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划项目(UNPYSCT-2015093);黑龙江省省属高等学校基本科研业务费植物性食品加工技术特色学科专项(YSTSXX201881);齐齐哈尔大学研究生创新科研项目(YJSCX2017-030X)

[作者简介] 于天飞(1980—),男,黑龙江齐齐哈尔人,教授,博士,硕士生导师,主要从事动物病毒分子生物学研究。

E-mail:yutianfei2001@163.com

coli Rosetta (DE3) and induced by IPTG to obtain the expression of recombinant protein. Finally, the biological activity of expression products was measured. 【Result】 A gene about 150 bp of TGEV spike protein affinity peptide was obtained by sub-cloning. Two recombinant plasmids, pET-32a-SQHT and pGEX-6p-SQHT, were constructed and expressed by induction successfully. The molecular weights of the two recombinant proteins were 25 and 31 ku, respectively. Western blot analysis showed that the two recombinant proteins had good affinity with TGEV virions. Dot-ELISA analysis showed that the minimum binding titer of the two recombinant proteins binding to the TGEV virions was $TCID_{50} 5 \times 10^2 \text{ mL}^{-1}$. Specificity experiments showed that the recombinant proteins TRX-SQHT and GST-SQHT did not bind to PEDV or PoRV. 【Conclusion】 The affinity peptides to spike protein of TGEV were successfully expressed using prokaryotic cells and the two recombinant proteins had good specificity affinity to TGEV.

Key words: transmissible gastroenteritis virus of swine; spike protein; affinity peptides; prokaryotic expression

猪传染性胃肠炎(transmissible gastroenteritis, TGE)是由猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus of swine, TGEV)引起的接触性、传染性肠道疾病^[1]。TGEV 感染猪肠上皮细胞,导致猪严重腹泻,其中 2 周龄内仔猪感染死亡率高达 100%,5 周龄以上的猪感染死亡率较低,成年猪一般无死亡现象^[2]。TGE 在世界范围流行,快速检测和诊断对于该病防控具有重要意义^[3]。

TGEV 为冠状病毒科冠状病毒属成员,其基因组为不分节段的单股正链 RNA,长度约 28.5 kb,编码纤突蛋白(spike)、小膜蛋白(sM)、膜蛋白(M)和核衣壳蛋白(N)等 4 种结构蛋白^[4]。TGEV spike 蛋白是一种糖基化蛋白,分子质量约为 250 ku,位于病毒粒子囊膜上,在其跨膜区的羧基末端附近含有高度保守的区域(富含半胱氨酸的基序 CRM)^[5],可与 M 蛋白相互作用,是病毒颗粒维持正常结构的必要组分^[6-8],spike 蛋白在 TGEV 的致病过程中发挥着重要作用^[9-11]。spike 蛋白具有较好的抗原性,研究者基于该蛋白建立了 TGEV 的酶联免疫(ELISA)检测方法^[12-14]。此外,该蛋白也具有较强的免疫原性,可刺激宿主免疫系统产生中和抗体^[15],是各类潜在疫苗开发的研究热点^[16-18]。TGEV spike 蛋白氨基末端的 600 个氨基酸内存在 C、B、D 和 A 等 4 个抗原位点^[19],其中 A 和 D 位点是引起猪产生中和抗体的主要抗原位点^[20]。

病毒亲和肽是一种可与病毒结合的多肽,在诊断和治疗领域具有良好的应用前景^[21]。Suo 等^[22]通过噬菌体展示技术对 TGEV 病毒亲和肽进行了筛选,成功筛选出 9 种能与靶分子蛋白结合的十二肽,并通过噬菌体 ELISA 试验对亲和肽与病毒粒子的亲和性进行了验证。本研究选取这 9 种十二肽中

亲和性最强的 3 种,通过串联表达方法进行体外表达,并利用 Western blot、Dot-ELISA 等方法检测了重组蛋白的亲和性,旨在为建立 TGEV 诊断方法和检测技术奠定物质基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

原核表达载体 pET-32a 和 pGEX-6P-1、大肠杆菌 DH5 α 和 Rosetta(DE3)、TGEV H 株组织细胞培养半数感染量($TCID_{50}$)为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,由齐齐哈尔大学生命科学与农林学院动物免疫学实验室保存;TGEV 阳性血清、猪流行性腹泻病毒(PEDV)阳性血清和猪轮状病毒(PoRV)阳性血清,购自中国兽医药品监察所;辣根过氧化物酶(HRP)标记 His 标签单克隆抗体和 HRP 标记 GST 标签单克隆抗体,购自 Thermo Fisher 公司;HRP 标记羊抗猪抗体,购自北京中杉金桥生物技术有限公司;TGEV、PEDV 与 PoRV 三联活疫苗(以下简称猪胃轮三联活疫苗),购自吉林正业生物制品股份有限公司。

异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、DNA 标样、T4 DNA 连接酶、*Bam*H I 和 *Xho* I 限制性内切酶,购于 TaKaRa 公司;高保真 KOF *Taq* 酶、dNTP mix 和 4 氯-1-萘酚(4-CN),购自哈尔滨超峰生物科技发展有限公司;质粒提取试剂、胶回收试剂盒,购于上海近岸科技有限公司;蛋白分子质量标样,购自 Thermo Fisher 公司;其余常规试剂为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 spike 蛋白亲和肽基因的设计与合成 基于 Suo 等^[22]的研究结果,从 9 种可与 TGEV spike 蛋白结合的十二肽中选取亲和力最强的 3 种,对其进

行重组,2 种亲和肽之间用 linker(AAAK)连接,获得 spike 蛋白亲和肽。依据大肠杆菌偏爱密码子对 spike 蛋白亲和肽核苷酸序列进行优化后,交由哈尔滨博仕生物技术有限公司进行合成。将合成的 spike 蛋白亲和肽(SQHT)基因插入到 pUC57 质粒中,该质粒命名为 pUC57-SQHT。pUC57-SQHT 用无菌去离子水进行 1:10 000 稀释,作为 PCR 模板。

1.2.2 spike 蛋白亲和肽基因的亚克隆 根据合成的 SQHT 基因序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对引物。上游引物 PU:5'-CGCGGATCCGAATGCATCAAGATCAAT-3',下游引物 PL:5'-GGGC-CGCTCGAGTTAATCCGATATTGG-3',PU 序列中下划线部分为插入的 *Bam*H I 酶切位点,PL 序列中下划线部分为插入的 *Xho* I 酶切位点。引物由哈尔滨博仕生物技术有限公司合成。引物浓度稀释成 50 pmol/ μ L,-20 °C 保存备用。

PCR 扩增反应体系为 25 μ L:2 $\times$ *Taq* 酶预混液(包含 Buffer, dNTP)12.5 μ L,PU 0.5 μ L(25 pmol/ μ L),PL 0.5 μ L(25 pmol/ μ L),模板 0.5 μ L,ddH₂O 10.5 μ L,KOF 酶 0.5 μ L。PCR 程序设计:94 °C 90 s;94 °C 30 s,40 °C 30 s,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 7 min,4 °C 保存。试验设以 ddH₂O 代替模板的扩增处理为阴性对照。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 重组表达载体的构建 将 SQHT 基因序列、原核表达载体 pET-32a 和 pGEX-6p-1 分别用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切,回收酶切产物。将回收的 SQHT 基因片段分别与 pET-32a 或 pGEX-6p-1 连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布 LB 平板(含氨苄青霉素(Amp)100 μ g/mL),37 °C 过夜培养。次日,挑取单菌落接种至含 100 μ g/mL Amp 的液体 LB 中,37 °C 过夜培养,提取质粒,进行 *Bam*H I 单酶切和 *Bam*H I/*Xho* I 双酶切鉴定质粒。试验同时设 pET-32a 和 pGEX-6p-1 空载体 *Bam*H I 单酶切对照。将经酶切初步鉴定正确的质粒所对应的克隆菌交由哈尔滨博仕生物科技有限公司进行序列测定。测序鉴定正确的重组质粒分别命名为 pET-32a-SQHT 和 pGEX-6p-SQHT。

1.2.4 重组蛋白的诱导表达 将重组质粒 pET-32a-SQHT 和 pGEX-6p-SQHT 分别转化大肠杆菌 Rosetta (DE3),涂布 LB 平板(含 Amp 100 μ g/mL),培养过夜后,挑取单菌落,获得重组菌株。将重组菌接种 LB 液体培养基,37 °C 振荡培养过夜,

然后以 1% 比例转接新鲜的 LB 液体培养基,37 °C 振荡培养 2~3 h 后,测菌液在 600 nm 处的吸光度(OD₆₀₀)达 0.5~0.6 时,加入 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L,37 °C 诱导 1,2,3 和 4 h 后取样,进行 SDS-PAGE 电泳分析。重组蛋白分别命名为 TRX-SQHT 和 GST-SQHT。BandScan 5.0 软件分析重组蛋白表达情况。

1.2.5 重组蛋白的纯化及鉴定 (1)纯化。重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,用 4 °C 预冷的 0.3 mol/L KCl 溶液预染 5 min,切下含目的蛋白的凝胶,碾碎,加入 PBS 重悬凝胶,反复冻融 3 次,12 000 g 离心 5 min,取上清液。采用 Bradford 检测法分别对重组蛋白 TRX-SQHT 和 GST-SQHT 的含量进行测定。

(2)鉴定。纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 后,转印至硝酸纤维素(NC)膜上,50 g/L 脱脂乳 4 °C 封闭过夜;PBST 洗 3 次(10 min/次),浸入 1:100 稀释的 HRP 标记的 His 标签单克隆抗体或 HRP 标记的 GST 标签单克隆抗体中,37 °C 作用 2 h,PBST 洗涤 3 次后用 4-CN 显色。

1.2.6 重组蛋白的病毒亲和性 (1)Western blot 鉴定。纯化的重组蛋白 TRX-SQHT(设 TRX 标签蛋白对照)或 GST-SQHT(设 GST 标签蛋白对照)经 SDS-PAGE 后,转印至 NC 膜上,用 50 g/L 脱脂乳 4 °C 封闭过夜;PBST 洗 3 次(10 min/次,下同),浸入 TGEV H 株(TCID₅₀ 为 1×10^5 mL⁻¹)稀释液中,37 °C 作用 2 h;PBST 洗 3 次,浸入 PBS 稀释的质量浓度为 1 mg/mL 的重组蛋白 GST-SQHT 或 TRX-SQHT 中,室温作用 2 h;PBST 洗涤 3 次,浸入 1:1 000 稀释的 HRP 标记 GST 标签单克隆抗体或 HRP 标记 His 标签单克隆抗体中,室温作用 1 h;PBST 洗涤 3 次,用 4-CN 显色。

(2)Dot-ELISA 鉴定。按照以下步骤进行 Dot-ELISA 操作。在 NC 膜表面划 4 mm $\times$ 4 mm 小方格,先将 NC 膜在去离子水中浸泡 10 min,取出置于室温晾干。用微量移液器吸取 1 μ L 1 mg/mL 的重组蛋白 TRX-SQHT 或 GST-SQHT,点于小方格的正中央,置于室温晾干。将包被的膜片放入 50 g/L 脱脂乳中,37 °C 封闭 60 min 后取出,PBST 洗涤 3 次(5 min/次,下同),室温晾干。将膜片裁剪成小片,点样面朝上置于 96 孔酶标板孔内,加入 100 μ L PBS 倍比稀释(TCID₅₀ 分别为 1×10^3 , 5×10^2 , 2.5×10^2 , 1.25×10^2 mL⁻¹)的 TGEV H 株中,37 °C 60 min;每孔加入 150 μ L PBST 泡洗 2 次,再用 PBS 洗涤 1 次;加入 100 μ L 1 mg/mL 的重组蛋白

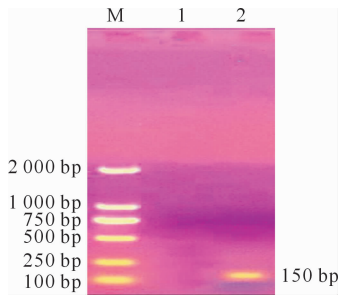
GST-SQHT 或 TRX-SQHT 中,37 ℃ 60 min;弃去重组蛋白,每孔加入 150 μL PBST 泡洗 2 次,再用无磷酸盐缓冲液洗涤 1 次;每孔加入 100 μL 1 : 1 000 稀释的 HRP 标记 GST 标签单克隆抗体或 HRP 标记 His 标签单克隆抗体,37 ℃ 作用 30 min;弃去酶标抗体,每孔加入 150 μL PBST 泡洗 2 次,再用 PBS 洗涤 1 次;每孔加入 100 μL 显色液,37 ℃ 避光显色,5 min 后观察;弃去显色液,每孔加入 150 μL 去离子水泡洗 3 次(1 min/次),甩干后取出膜片干燥,拍照。

1.2.7 Spike 蛋白亲和肽的特异性鉴定 将猪胃流轮三联活疫苗分别与 TGEV 阳性血清、PEDV 阳性血清和 PoRV 阳性血清 4 ℃ 作用过夜,12 000 g 离心 30 min,取上清。Dot-ELISA 法检测阻断效果。膜片预处理按前述方法进行。按 1.2.6 节(2)中所述的 Dot-ELISA 方法分别对未阻断处理的猪胃流轮三联活疫苗、TGEV 阻断的猪胃流轮三联活疫苗、PEDV 阻断的猪胃流轮三联活疫苗、PoRV 阻断的猪胃流轮三联活疫苗、PEDV 和 PoRV 阻断的猪胃流轮三联活疫苗和 3 种病毒全部阻断的猪胃流轮三联活疫苗进行检测,观察其反应情况。

2 结果与分析

2.1 spike 蛋白亲和肽基因的 PCR 扩增

以重组质粒 pUC57-SQHT 为模板,PCR 扩增 SQHT 基因,结果获得了 150 bp 片段(图 1),与预期结果相符。

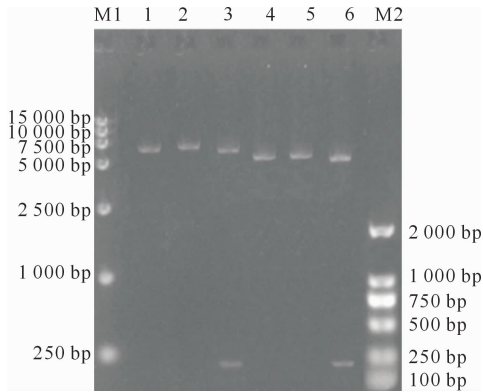


M. DNA Marker DL2000;1. 阴性对照;2. PCR 产物
M. DNA Marker DL2000;1. Negative control;2. PCR product
图 1 TGEV spike 蛋白亲和肽基因的 PCR 扩增
Fig.1 PCR amplification of affinity peptide gene to TGEV spike protein

2.2 重组表达载体 pET-32a-SQHT 和 pGEX-6p-SQHT 的鉴定

构建的重组表达质粒 pET-32a-SQHT 和 pGEX-6p-SQHT 分别进行 *Bam*H I 单酶切和 *Bam*H I /*Xho* I 双酶切,经琼脂糖凝胶电泳检测,

结果(图 2)表明,pET-32a-SQHT 经 *Bam*H I 单酶切获得了 6 050 bp 的 DNA 条带,经 *Bam*H I /*Xho* I 双酶切获得了 5 900 bp 的载体片段和 150 bp 的目的条带;pEGX-6p-SQHT 经 *Bam*H I 单酶切获得了 5 140 bp 的 DNA 条带,经 *Bam*H I /*Xho* I 双酶切获得了 4 990 bp 的载体片段和 150 bp 的目的条带。上述酶切结果与预期一致,测序结果证明,SQHT 基因插入位置与重组质粒的阅读框均正确。

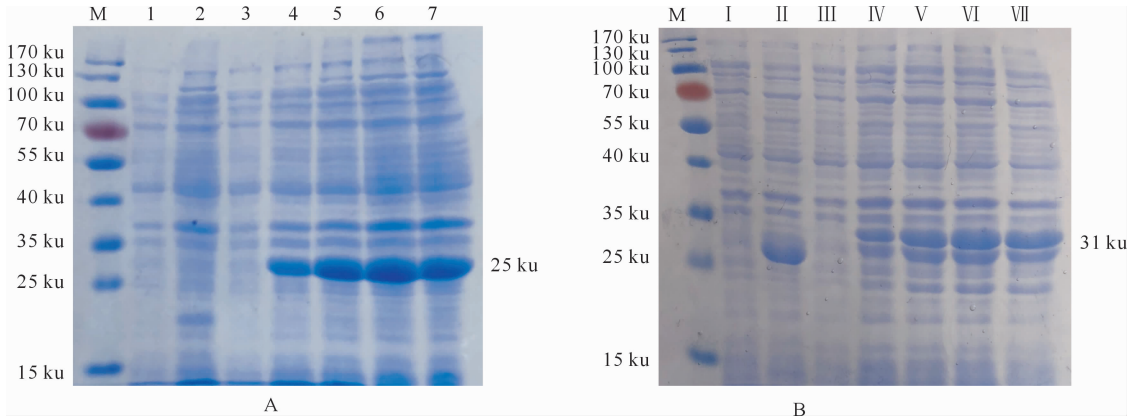


M1. DNA Marker DL15000;1. pET-32a 空载体 *Bam*H I 单酶切产物;2. pET-32a-SQHT *Bam*H I 单酶切产物;3. pET-32a-SQHT *Bam*H I /*Xho* I 双酶切产物;4. pGEX-6p-1 空载体 *Bam*H I 单酶切产物;5. pGEX-6p-SQHT *Bam*H I 单酶切产物;6. pGEX-6p-SQHT *Bam*H I /*Xho* I 双酶切产物;M2. DNA Marker DL2000
M1. DNA Marker DL15000;1. The product of pET-32a digested by *Bam*H I ;2. The product of pET-32a-SQHT digested by *Bam*H I ;3. The product of pET-32a-SQHT digested by *Bam*H I /*Xho* I ;4. The product of pGEX-6p-1 digested by *Bam*H I ;5. The product of pGEX-6p-SQHT digested by *Bam*H I ;6. The product of pGEX-6p-SQHT digested by *Bam*H I /*Xho* I ;M2. DNA Marker DL2000

图 2 重组表达载体 pET-32a-SQHT 和 pGEX-6p-SQHT 的酶切鉴定
Fig.2 Restriction enzyme digestion identification of recombinant expression vectors pET-32a-SQHT and pGEX-6p-SQHT

2.3 重组蛋白 TRX-SQHT 和 GST-SQHT 的诱导表达

将重组质粒 pET-32a-SQHT 和 pGEX-6p-SQHT 分别转化大肠杆菌 Rosetta (DE3),用 1.0 mmol/L IPTG 进行诱导表达,SDS-PAGE 检测全菌体细胞沉淀,结果(图 3)表明,获得了重组蛋白 TRX-SQHT 和 GST-SQHT,其分子质量分别为 25 和 31 ku,与预期结果相符。BandScan 5.0 软件分析结果表明,37 ℃ 诱导 3 h,重组蛋白 TRX-SQHT 和 GST-SQHT 的表达量最高,分别为 56.9%和 50.4%。



M. 蛋白质分子量标准;1. 诱导前的 pET-32a 空载体;2. 诱导 4 h 的 pET-32a 空载体;3. 未诱导的 pET-32a-SQHT; 4~7. 分别为诱导 1,2,3,4 h 的 pET-32a-SQHT。 I. 诱导前的 pGEX-6p-1 空载体; II. 诱导 4 h 的 pGEX-6p-1 空载体; III. 未诱导的 pGEX-6p-SQHT; IV~VII. 分别为诱导 1,2,3,4 h 的 pGEX-6p-SQHT

M. Protein Marker;1. pET-32a before induction;2. pET-32a induced for 4 h;3. pET-32a-SQHT before induction; 4—7. pET-32a-SQHT induced for 1,2,3,4 h, respectively.

I. pGEX-6p-1 before induction; II. pGEX-6p-1 induced for 4 h; III. pGEX-6p-SQHT before induction; IV—VII. pGEX-6p-SQHT induced for 1,2,3,4 h, respectively.

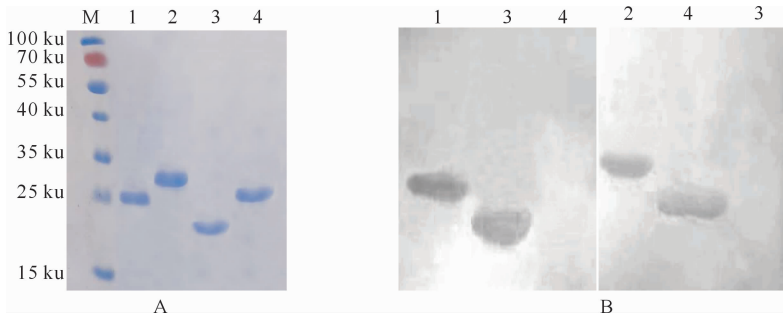
图 3 重组蛋白 TRX-SQHT(A)和 GST-SQHT(B)的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant proteins TRX-SQHT(A)and GST-SQHT(B)

2.4 重组蛋白 TRX-SQHT 和 GST-SQHT 的纯化及鉴定

重组蛋白切胶纯化结果(图 4-A)显示,TRX-SQHT 和 GST-SQHT 的纯化效果良好,SDS-PAGE 无明显杂蛋白条带。Bradford 法测定纯化后

的 TRX-SQHT 和 GST-SQHT 蛋白质量浓度分别为 1.78 和 1.94 mg/mL。HRP 标记 His 标签单克隆抗体和 HRP 标记 GST 标签单克隆抗体鉴定结果(图 4-B)表明,TRX-SQHT 和 GST-SQHT 确实为重组目的蛋白。



M. 蛋白质分子量标准;1. TRX-SQHT;2. GST-SQHT;3. TRX 标签蛋白;4. GST 标签蛋白

M. Protein Marker;1. TRX-SQHT;2. GST-SQHT;3. TRX;4. GST

图 4 重组蛋白 TRX-SQHT 和 GST-SQHT 的纯化(A)及鉴定(B)

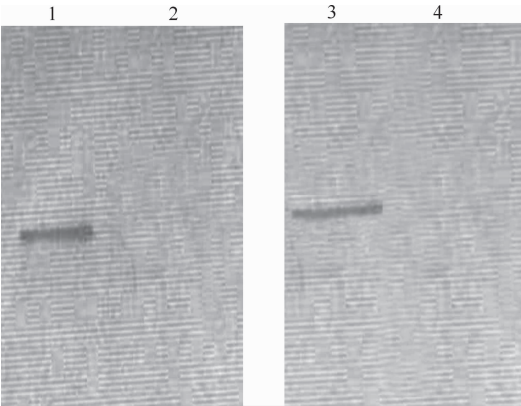
Fig. 4 Purification(A)and identification(B)of recombinant proteins TRX-SQHT and GST-SQHT

2.5 重组蛋白 TRX-SQHT 和 GST-SQHT 病毒亲和性的鉴定

2.5.1 Western blot 鉴定 纯化的重组蛋白 TRX-SQHT 或 GST-SQHT 转印至 NC 膜上后,与 TGEV 病毒粒子孵育,再与重组蛋白 GST-SQHT 或 TRX-SQHT 孵育,最后用抗 GST 或 His 单抗进行检测,结果(图 5)显示,2 种重组蛋白都有条带出现,而对照 TRX 和 GST 标签蛋白均无条带出现。

2.5.2 Dot-ELISA 鉴定 将纯化的重组蛋白

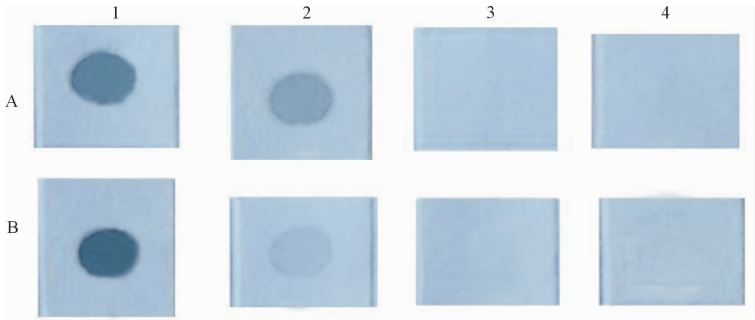
TRX-SQHT 或 GST-SQHT 包被至 NC 膜上后,与 TGEV 病毒粒子孵育,再与重组蛋白 GST-SQHT 或 TRX-SQHT 孵育,最后用抗 GST 或 His 单抗进行检测,结果(图 6)显示,2 种重组蛋白均在 TCID₅₀ 分别为 1×10³ 和 5×10² mL⁻¹ 时显示出阳性反应,而在 TCID₅₀ 为 2.5×10² mL⁻¹ 及以下时未见阳性反应,且 2 种重组蛋白检测 TGEV 的最低滴度无明显差异。



1. TRX-SQHT;2. TRX 标签蛋白;3. GST-SQHT;4. GST 标签蛋白
1. TRX-SQHT;2. TRX;3. GST-SQHT;4. GST

图 5 重组蛋白 TRX-SQHT 和 GST-SQHT TGEV 亲和性的 Western blot 鉴定

Fig. 5 Western blot identification of the affinity of recombinant proteins TRX-SQHT and GST-SQHT to TGEV



1. $TCID_{50}=1\times10^3\text{ mL}^{-1}$;2. $TCID_{50}=5\times10^2\text{ mL}^{-1}$;3. $TCID_{50}=2.5\times10^2\text{ mL}^{-1}$;4. $TCID_{50}=1.25\times10^2\text{ mL}^{-1}$

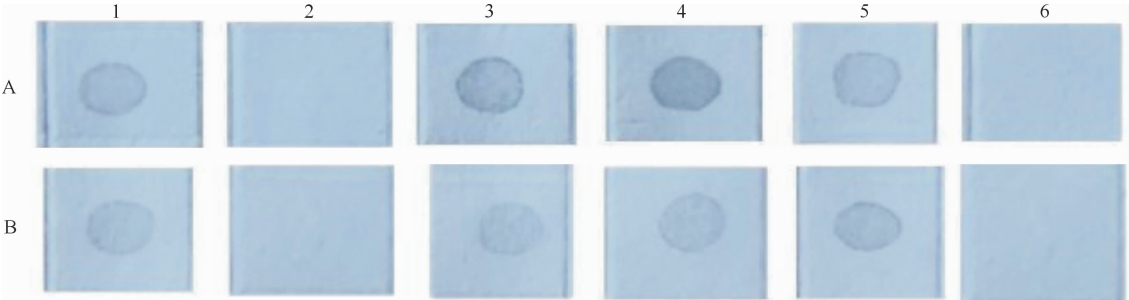
图 6 重组蛋白 TRX-SQHT(A)和 GST-SQHT(B) TGEV 亲和性的 Dot-ELISA 鉴定

Fig. 6 Dot-ELISA identification of the affinity of recombinant proteins TRX-SQHT(A) and GST-SQHT(B) to TGEV

2.6 Spike 蛋白亲和肽的特异性

用 Dot-ELISA 方法分别对未阻断的猪胃流轮三联活疫苗、TGEV 阻断的猪胃流轮三联活疫苗、PEDV 阻断的猪胃流轮三联活疫苗、PoRV 阻断的

猪胃流轮三联活疫苗、PEDV 和 PoRV 阻断的猪胃流轮三联活疫苗和 3 种病毒全部阻断的猪胃流轮三联活疫苗进行检测。结果如图 7 所示。



1. 未阻断处理的猪胃流轮三联活疫苗;2. TGEV 阻断的猪胃流轮三联活疫苗;3. PEDV 阻断的猪胃流轮三联活疫苗;
4. PoRV 阻断的猪胃流轮三联活疫苗;5. PEDV 和 PoRV 阻断的猪胃流轮三联活疫苗;6. TGEV、PEDV 和 PoRV 阻断的猪胃流轮三联活疫苗
1. Swine TGEV,PEDV and PoRV live vaccine without blocking;2. Swine TGEV,PEDV and PoRV live vaccine with TGEV blocking;
3. Swine TGEV,PEDV and PoRV live vaccine with PEDV blocking;4. Swine TGEV,PEDV and PoRV live vaccine with PoRV blocking;
5. Swine TGEV,PEDV and PoRV vaccine live with PEDV and PoRV blocking;6. Swine TGEV,PEDV and PoRV live vaccine with
TGEV,PEDV and PoRV blocking

图 7 重组蛋白 TRX-SQHT(A)和 GST-SQHT(B)的特异性鉴定

Fig. 7 Specificity identification of recombinant proteins TRX-SQHT(A) and GST-SQHT(B)

由图 7 可以看出,重组蛋白 TRX-SQHT 和 GST-SQHT 可与未阻断处理的猪胃流轮三联活疫苗、PEDV 阻断的猪胃流轮三联活疫苗、PoRV 阻断的猪胃流轮三联活疫苗、PEDV 和 PoRV 阻断的猪胃流轮三联活疫苗产生阳性反应,而与 TGEV 阻断的猪胃流轮三联活疫苗和 3 种病毒全部阻断的猪胃流轮三联活疫苗无阳性反应,表明 2 种重组蛋白均可与 TGEV 产生特异性结合,而不与 PEDV 和 PoRV 结合。

3 讨 论

检测 TGEV 的常规方法,如病毒分离、免疫荧光检测、电镜检测等^[23-24],耗时费力,并且需要训练有素的技术人员。目前已开发了一系列基于 RT-PCR 的 TGEV 检测方法,如 RT-PCR^[25]、纳米颗粒辅助 RT-PCR^[26]和实时荧光定量 RT-PCR^[27],这些新方法需要高精度、复杂且昂贵的仪器,以及良好的实验室环境,不适合在装备不足的实验室和现场应用。最近开发的用于 TGEV 检测的 RT-LAMP 测定法反应时间在 60 min 以内,较为省时,可通过琼脂糖凝胶电泳观察结果^[28-29]。

分析筛选高选择性、高灵敏度的病毒亲和肽,能为疾病检测、治疗及其分子机制研究提供新的思路 and 手段^[21]。Suo 等^[22]以筛选出的 TGEV Spike 蛋白亲和肽中结合力最高的 4 个噬菌体建立了噬菌体 ELISA,可以检测到最低的病毒量为 0.1 μg ,略优于常规 ELISA(最低病毒检测量为 0.6 μg)。Zou 等^[30]以相似的方法筛选出 TGEV M 蛋白亲和肽中结合力最高的 3 个噬菌体,并建立了噬菌体 ELISA,可以检测到的最低病毒量为 0.02 μg 。本研究获得的 spike 蛋白亲和肽可以检测到最低 TCID₅₀ 为 $5 \times 10^2 \text{ mL}^{-1}$ 的 TGEV 病毒,且与 PEDV、PoRV 等致猪腹泻性病毒无交叉反应,特异性良好。原核表达重组蛋白简单,操作性强,试剂均为实验室常用药品,费用低。综上,以 spike 蛋白亲和肽建立的检测方法有望应用到 TGEV 的临床诊断中。

[参考文献]

[1] Yang W T, Li Q Y, Ata E B, et al. Immune response characterization of mice immunized with *Lactobacillus plantarum* expressing spike antigen of transmissible gastroenteritis virus [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(19): 8307-8318.

[2] Ma Y, Wang C, Xue M, et al. Coronavirus TGEV evades the type I interferon response through IRE1 α -mediated manipulation of the miR-30a-5p/SOCS1/3 Axis [J]. Journal of Virology, 2018, 92(22): e00728-18.

[3] 王 赛, 苏 菲, 徐丽华, 等. 猪传染性胃肠炎病毒双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学, 2018, 48(8): 946-952.

Wang S, Su F, Xu L H, et al. Development of a double antibody sandwich ELISA for the detection of transmissible gastroenteritis virus [J]. Chinese Veterinary Science, 2018, 48(8): 946-952.

[4] 曹贝贝, 兰培英, 韩 丽, 等. 猪 TGEV HN-2012 株 ORF3a 和 ORF3b 基因遗传变异分析及其真核表达研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(4): 10-16.

Cao B B, Lan P Y, Han L, et al. Genetic variation and eukaryotic expression of ORF3a and ORF3b from porcine TGEV HN-2012 strain [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2016, 44(4): 10-16.

[5] Jin Y B, Yang W T, Shi C W, et al. Immune responses induced by recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing the spike protein derived from transmissible gastroenteritis virus in piglets [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(19): 8403-8417.

[6] Gelhaus S, Thaa B, Eschke K, et al. Palmitoylation of the alphacoronavirus TGEV spike protein S is essential for incorporation into virus-like particles but dispensable for S-M interaction [J]. Virology, 2014, 464/465: 397-405.

[7] Nguyen V P, Hogue B G. Protein interactions during coronavirus assembly [J]. J Virol, 1997, 71(12): 9278-9284.

[8] Vennema H, Godeke G J, Rossen J W, et al. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes [J]. EMBO J, 1996, 15(8): 2020-2028.

[9] Zhang Y, Zhang X, Liao X, et al. Construction of a bivalent DNA vaccine co-expressing S genes of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* [J]. Virus Genes, 2016, 52(3): 354-364.

[10] Reguera J, Santiago C, Mudgal G, et al. Structural bases of coronavirus attachment to host aminopeptidase N and its inhibition by neutralizing antibodies [J]. PLoS Pathog, 2012, 8(8): e1002859.

[11] Sanchez C M, Izeta A, Sanchez-Morgado J M, et al. Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence [J]. J Virol, 1999, 73(9): 7607-7618.

[12] Lin C M, Gao X, Oka T, et al. Antigenic relationships among porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus strains [J]. J Virol, 2015, 89(6): 3332-3342.

[13] Elia G, Decaro N, Martella V, et al. An ELISA based on recombinant spike protein S for the detection of antibodies to transmissible gastroenteritis virus of swine-like canine coronaviruses [J]. J Virol Methods, 2010, 163(2): 309-312.

[14] Sestak K, Zhou Z, Shoup D I, et al. Evaluation of the baculovirus-expressed S glycoprotein of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) as antigen in a competition ELISA to differen-

- tiate porcine respiratory coronavirus from TGEV antibodies in pigs [J]. J Vet Diagn Invest, 1999, 11(3): 205-214.
- [15] Mou C, Zhu L, Xing X, et al. Immune responses induced by recombinant *Bacillus subtilis* expressing the spike protein of transmissible gastroenteritis virus in pigs [J]. Antiviral Res, 2016, 131: 74-84.
- [16] Yuan X, Lin H, Fan H. Efficacy and immunogenicity of recombinant swinepox virus expressing the A epitope of the TGEV S protein [J]. Vaccine, 2015, 33(32): 3900-3906.
- [17] Tang L, Li Y. Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing porcine transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein [J]. Virus Genes, 2009, 39(2): 238-245.
- [18] Yin J, Ren X, Tian Z, et al. Assembly of pseudorabies virus genome-based transfer vehicle carrying major antigen sites of S gene of transmissible gastroenteritis virus; potential perspective for developing live vector vaccines [J]. Biologicals, 2007, 35(1): 55-61.
- [19] Correa I, Gebauer F, Bullido M J, et al. Localization of antigenic sites of the E2 glycoprotein of transmissible gastroenteritis coronavirus [J]. J Gen Virol, 1990, 71(2): 271-279.
- [20] Laude H, Godet M, Bernard S, et al. Functional domains in the spike protein of transmissible gastroenteritis virus [J]. Adv Exp Med Biol, 1995, 380: 299-304.
- [21] Zhang N, Lu Q, Teng M, et al. Method and progress of the research on virus affinity peptide [J]. Agricultural Science & Technology, 2016, 17(12): 2713-2716.
- [22] Suo S, Wang X, Zarlenga D, et al. Phage display for identifying peptides that bind the spike protein of transmissible gastroenteritis virus and possess diagnostic potential [J]. Virus Genes, 2015, 51(1): 51-56.
- [23] Dulac G C, Ruckerbauer G M, Boulanger P. Transmissible gastroenteritis; demonstration of the virus from field specimens by means of cell culture and pig inoculation [J]. Can J Comp Med, 1977, 41(4): 357-363.
- [24] van Nieuwstadt A P, Cornelissen J B, Vreeswijk J. Solid phase immune electron microscopy for diagnosis of transmissible gastroenteritis in pigs [J]. Res Vet Sci, 1988, 44(3): 286-294.
- [25] 王玉洁, 刘金龙, 彭树英, 等. 应用 RT-nested PCR 检测猪传染性胃肠炎病毒 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(2): 23-26.
- Wang Y J, Liu J L, Peng S Y, et al. Study on detecting transmissible gastroenteritis virus by reverse transcription-nested polymerase chain reactions [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2005, 33(2): 23-26.
- [26] Zhu Y, Liang L, Luo Y, et al. A sensitive duplex nanoparticle-assisted PCR assay for identifying porcine epidemic diarrhea virus and porcine transmissible gastroenteritis virus from clinical specimens [J]. Virus Genes, 2017, 53(1): 71-76.
- [27] 董玲娟, 张彦明, 何雷, 等. 猪传染性胃肠炎病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(2): 13-19.
- Dong L J, Zhang Y M, He L, et al. Establishment of RT-PCR for transmissible gastroenteritis virus [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2012, 40(2): 13-19.
- [28] Chen Q, Li J, Fang X E, et al. Detection of swine transmissible gastroenteritis coronavirus using loop-mediated isothermal amplification [J]. Virol J, 2010, 7: 206.
- [29] Li P, Ren X. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of transmissible gastroenteritis virus [J]. Curr Microbiol, 2011, 62(3): 1074-1080.
- [30] Zou H, Zarlenga D S, Sestak K, et al. Transmissible gastroenteritis virus; identification of M protein-binding peptide ligands with antiviral and diagnostic potential [J]. Antiviral Res, 2013, 99(3): 383-390.