

PEDV 分离株 S1 基因的重组杆状病毒真核表达

何海健¹, 吴 媛¹, 王鲁彦², 李群景², 巴少波², 石 林²,
邵春艳², 孙 静², 姜 胜², 王晓杜^{2*}

(1. 金华职业技术学院农业与生物工程学院, 金华 321007;

2. 浙江农林大学动物科技学院, 临安 311300)

摘 要: 为了研究猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)分离株(PEDV/LA/2014/02)纤突蛋白(S1)的真核表达及其反应原性,本研究利用杆状病毒真核表达系统表达出重组 His-PEDV-S1 蛋白。利用在线软件分析 PEDV S1 基因在 sf9 细胞内的稀有密码子,经优化密码子后的基因进行人工合成,合成后的 PEDV S1 基因被克隆至杆状病毒的穿梭载体(pFastBac HT A)中,转化大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞进行重组,PCR 方法验证后将重组成功的杆状病毒基因组转染 sf9 细胞,获得包装成功的杆状病毒,该病毒进一步接种 sf9 细胞,显微镜观察重组病毒引起的细胞病变,RT-PCR 方法验证 PEDV S1 基因的 mRNA 表达水平,SDS-PAGE、Western blotting 方法验证重组 PEDV S1 蛋白的表达及其反应原性。结果显示,试验成功构建了重组穿梭质粒 pFastBac HT A-PEDV-S1(pSL598),成功包装表达了 PEDV S1 的重组杆状病毒,重组杆状病毒能使 sf9 细胞出现细胞变大、胞内有空泡等典型病变,PEDV S1 基因的 mRNA 获得表达,重组蛋白 His-PEDV-S1 在 sf9 细胞中得到表达,蛋白质大小为 83 ku 左右,主要存在于细胞沉淀中,表达的重组蛋白能与小鼠抗 His 抗体和猪抗 PEDV 阳性血清反应,说明该蛋白具有较好的反应原性。本研究为研制 PEDV 新流行毒株新型亚单位疫苗和防控该毒株的流行提供了材料。

关键词: 猪流行性腹泻病毒(PEDV);纤突蛋白(S1);杆状病毒表达系统;真核表达

中图分类号: S852.65⁺9.6

文献标识码: A

Doi: 10.16431/j.cnki.1671-7236.2019.03.023

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Eukaryotic Expression of Recombinant Baculovirus of PEDV Isolated Strain S1 Gene

HE Haijian¹, WU Yuan¹, WANG Luyan², LI Qunjin², BA Shaobo², SHI Lin²,
SHAO Chunyan², SUN Jing², JIANG Sheng², WANG Xiaodu^{2*}

(1. School of Agricultural and Biological Engineer, Jinhua Polytechnic,
Jinhua 321007, China; 2. College of Animal Science and Technology,
Zhejiang A&F University, Lin' an 311300, China)

Abstract: In order to study the eukaryotic expression and reactivity of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) isolated strain (PEDV/LA/2014/02) S1 gene, the recombinant protein (His-PEDV-S1) was expressed by the baculovirus expression system. The rare codon of PEDV S1 gene in sf9 cells was analyzed using online software, and the optimized gene was synthesized by biotechnology company. PEDV S1 gene were cloned into the baculovirus shuttle vector (pFastBac HT A), the PEDV S1 gene was recombined into baculovirus genome in *Escherichia coli* DH10Bac cells and identified by PCR. The PEDV-S1 recombinant successfully baculovirus genome was trans-

收稿日期: 2018-07-11

基金项目: 浙江省科技重点研发计划项目(2018C02028); 浙江省自然科学基金(LY16C180001); 金华市农业类重点研发项目(2016-2-013, 2018-2-004)

作者简介: 何海健(1966-), 男, 浙江东阳人, 硕士, 副教授, 研究方向: 动物疫病防控, E-mail: 853431627@qq.com

* 通信作者: 王晓杜, 博士, 副教授, 研究方向: 动物分子病毒学, E-mail: xdwang@zafu.edu.cn

ected into sf9 cells. The packaging viruses were inoculated into sf9 cells, the cytopathic effect was observed by optical microscope. The mRNA level of PEDV S1 gene in sf9 cells was analyzed by RT-PCR. The expression and antigenicity of recombinant PEDV S1 were verified by SDS-PAGE and Western blotting. The results showed that the pFastBac HT A-PEDV-S1 (pSL598) was successfully constructed, the recombinant baculovirus expressing His-PEDV-S1 was packaged, the sf9 cells became big and round, the vacuoles appeared in cytoplasm after baculovirus infection. The mRNA of PEDV S1 gene was expressed in baculovirus infected cells. The recombinant protein His-PEDV-S1 was mainly expressed in sf9 cells precipitation, and the size of the protein was about 83 ku. The His-PEDV-S1 had good reactivity of mouse anti-His antibody and swine anti-PEDV positive antisera. This study provided materials for the development of a new subunit vaccine for the new PEDV strain and the prevention and control of PEDV strain.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus (PEDV); spike protein (S1); baculovirus expression system; eukaryotic expression

猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是目前危害猪场仔猪安全的重要传染性疾病之一, 给亚洲及北美等地规模化猪场带来严重损失^[1-3]。该病一般暴发于冬春季节, 以 10 日龄以内仔猪水样腹泻、最后脱水致死为主要临床特征, 解剖表现出胃内有凝乳块、肠壁变薄和严重出血斑^[4]。2011 年以来, 亚洲地区大规模暴发该病, 发病猪场损失非常严重, 且是常年反复发作^[5]。2013—2015 年, 美国也大规模暴发该病, 导致至少 300 亿美元的损失^[1]。因此, 研制新型的疫苗是防控该病的有效手段, 而研制疫苗则需要寻找有效的抗原靶点。

PED 的病原体为猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV), PEDV 属于冠状病毒科冠状病毒属 α 型冠状病毒, 该病毒外有囊膜, 囊膜上有纤突蛋白 (spike protein, S)、小包膜蛋白 (envelope protein, E)、基质膜蛋白 (membrane protein, M), 它是单股正链 RNA 病毒, 病毒核酸长度为 28 kb 左右^[6]。其中 S 糖蛋白是病毒入侵受体的配体, 可以裂解为 2 个亚基^[7], 其中 S1 绑定细胞上受体氨基肽酶和唾液酸, S2 包含一个融合肽有利于病毒入侵时与细胞膜的融合, 促进细胞对病毒的内吞作用^[8]。尽管 S1 与受体氨基肽酶作用存在争议, 但研究认为其 C 端的氨基肽酶结合区段存在中和表位结构域 COE (499—638 位氨基酸)^[9], N 端的结构域 (19—233 位氨基酸) 负责绑定唾液酸辅助病毒入侵靶细胞^[10], 所以 S1 在 PEDV 入侵靶细胞过程中发挥黏附受体、协助入侵的作用, 也是诱导机体产生中和抗体的主要蛋白^[11-12], 鞭毛蛋白与 PEDV S1 的核心区重组蛋白免疫母猪能显著提高其初乳中 sIgA 的水平^[13]。在临床中, 诱导机体产生针对的

S1 中和抗体, 尤其提高乳汁中 S1 的 sIgA 是保护仔猪免受感染的有效方法, 利用具有天然活性的 PEDV S1 蛋白作为疫苗免疫母猪, 让仔猪获得高水平的被动免疫, 是一种有效防控该病的措施。因此, 利用真核表达系统表达 PEDV S1 纯化蛋白, 一方面可以作为免疫母猪的候选疫苗, 另一方面可以建立基于该蛋白的检测 PEDV 抗体的方法, 为预防和控制该病提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 、DH10Bac 感受态细胞及质粒 pFastBac HT A 均由浙江农林大学动物预防医学与公共卫生实验室保存; sf9 细胞购自 Thermo Scientific 公司; PEDV/LA/2014/02 由浙江农林大学动物预防医学与公共卫生实验室分离并保存。

RT-PCR 一步法试剂盒、限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I、DNA Marker、T4 连接酶均购自 TaKaRa 公司; 盐酸四环素、卡那霉素、庆大霉素均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 质粒小提试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒均购自上海百赛生物技术有限公司; 质粒大提试剂盒购自 Qiagen 公司; KOD plus Neo 购自上海东洋纺公司; 预染蛋白质分子质量标准购自 Thermo Scientific 公司; TR-Izol 试剂盒、sf-900TM II SFM 和 Cellfectin II Reagent 均购自 Invitrogen 公司; NC 膜、His Antibody 均购自碧云天生物技术有限公司; ECL 发光试剂盒、羊抗小鼠 IgG-HRP 和羊抗猪 IgG-HRP 抗体均购自 Sigma 公司; 羊抗猪的 PEDV 阳性血清由中国农业科学院兰州兽医研究所惠赠; 其他试剂为国产

分析纯。

1.2 引物设计及合成

利用 Vector NTI 软件,针对 PEDV S1 基因序列 (GenBank 登录号: AF353511. 1) 设计引物 PEDV-S1-FL-F/PEDV-S1-FL-R,引物 5'端添加酶

切位点(下划线处),同时依据 pFastBac HT A 载体序列,设计合成检测重组杆状病毒的通用引物 pUC/M13-fwd 和 pUC/M13-rev(表 1)。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物 Primers	引物序列 Primer sequences (5'→3')	退火温度 Annealing temperature/°C	产物大小 Product size/bp
PEDV-S1-FL-F	CCGGAATTCATGAGGTCTTTAATTTACTTCTGGTTGC	62	2 376
PEDV-S1-FL-R	ACGCGTCGACTCACTGCACGTGGACCTTTTCAAAGCTTCG		
pUC/M13-fwd	CCCAGTCACGACGTTGTAACACG	62	阴性(300)/阳性
pUC/M13-rev	AGCGGATAACAATTTACACACAGG		(300/2 130/2 376)

1.3 PEDV S1 基因的优化

利用 TRIzol 法提取 PEDV 分离株 (PEDV/LA/2014/02) 的 RNA,以随机引物作为反转录引物,以 PEDV-S1-FL-F/PEDV-S1-FL-R 为上、下游引物 PCR 扩增 PEDV S1 基因,RT-PCR 体系按照试剂盒说明书 (RR064A) 配制。PCR 扩增程序: 42 °C 孵育 5 min; 94 °C 变性 1 min, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 15 °C 保存 2 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定正确后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序结果与 GenBank 数据库中公布的 PEDV 序列进行比对,确认序列正确性。利用在线软件 (<http://www.genscript.com>) 对 PEDV S1 基因序列进行 sf9 细胞内稀有密码子分析,密码子优化后的 PEDV S1 基因序列由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.4 pSL598 重组质粒的构建及验证

以合成的 PEDV S1 基因为模板,以 PEDV-S1-FL-F/PEDV-S1-FL-R 为上、下游引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系 25 μL: 质粒模板 1 μL, KOD Plus Neo 酶 0.5 μL, 10 × Buffer 2.5 μL, dNTP 1.25 μL, 上、下游引物各 0.4 μL, ddH₂O 补足体系。PCR 扩增程序同 1.3。鉴定正确的 PCR 产物经 DNA 核酸纯化试剂盒纯化。分别利用 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切纯化 PCR 产物和 pFastBac HT A 载体,酶切产物经纯化后,T4 连接酶连接酶切产物,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,构成重组质粒 pSL598(pFastBac HT A-PEDV-S1)。

1.5 pSL598 质粒与 Bacmid 的重组及验证

依据 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统操作说明书,pSL598 质粒被转染进大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞,利用蓝白斑筛选技术,获得重组成功的阳性克隆。挑取单克隆,37 °C 培养 16~18 h,利用质粒大提试剂盒提取重组的杆状病毒基因组。以 pUC/M13-fwd 和 pUC/M13-rev 为引物,PCR 验证杆状病毒基因组是否重组成功。

1.6 携带 PEDV S1 基因的重组杆状病毒的包装和传代

依据 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统操作方法,将携带有优化 PEDV S1 基因的杆状病毒基因组转染进 sf9 细胞,27 °C 连续培养 3~5 d,观察细胞病变。细胞病变达到 70% 以上时,反复冻融收集病毒,收获的上清作为第一代病毒,以 MOI=5 的接毒量在 sf9 细胞内进行传代,传至第 3 代时,收集上清液留作种毒,4 °C 保存备用。

1.7 SDS-PAGE 和 Western blotting 对目的基因 (PEDV S1) 的表达鉴定

重组杆状病毒感染 sf9 细胞,培养上清在真空浓缩仪中浓缩 10 倍,取适量样品与 5 × Loading Buffer 混合均匀,煮沸裂解后,12 000 r/min 离心 5 min,收集上清,-20 °C 保存备用。重组杆状病毒感染 sf9 细胞的沉淀,一份利用 TRIzol 法提取总 RNA, DNase 消除基因组 DNA 污染,反转录合成 cDNA,以目的基因特异引物进行 RT-PCR,检测 PEDV S1 基因转录情况;另一份加入适量体积的细胞裂解液,超声波破碎仪(工作 0.8 s,间隔 3 min)裂

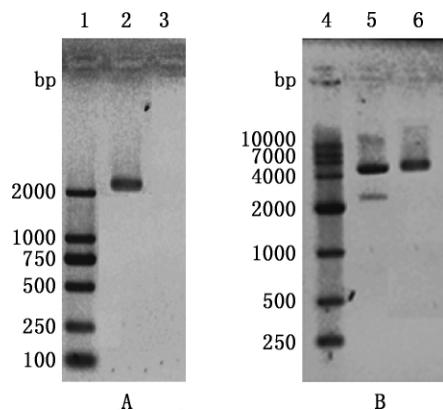
解细胞沉淀,适量的 $5 \times$ Loading Buffer 混合均匀,煮沸 5 min 后,12 000 r/min 离心 5 min,收集上清, -20°C 保存备用。

对上述处理好的裂解上清和细胞沉淀,利用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,经考马斯亮蓝染色直接检测 PEDV S1 表达情况。经 SDS-PAGE 电泳分离后,采用三明治夹心法使胶上蛋白质平行转移到相应位置的 NC 膜上,该 NC 膜经含 5% 脱脂乳封闭液封闭 1 h,洗涤 3 次,每次 5 min,分别采用小鼠抗 His 的抗体 (1 : 1 000) 和猪抗 PEDV 阳性血清 (1 : 500) 作为一抗,孵育 2 h,然后 PBST 洗涤 3 次,每次 5 min,随后分别使用羊抗小鼠 IgG-HRP 和羊抗猪 IgG-HRP 作为二抗孵育 45 min,然后洗涤 PBST 5 次,每次 5 min,利用 ECL 发光试剂盒进行显色,化学发光成像仪拍照。

2 结果

2.1 pSL598 重组质粒鉴定

将 PCR 验证为阳性的菌落扩大培养后,用质粒提取试剂盒提取重组质粒 pSL598 (pFastBac HT A-PEDV-S1),以所提质粒作为模板,经再一次 PCR 验证 (图 1A),确认为阳性的质粒经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切验证,琼脂糖凝胶电泳表明在质粒和目的基因预期片段大小位置有特异条带 (图 1B),经测序验证目的基因插入正确,表明 pSL598 已构建成功。



1, DL2000 DNA Marker; 2, PEDV S1 基因 PCR 产物; 3, 阴性对照; 4, DL10000 DNA Marker; 5, pSL598 阳性质粒; 6, pFastBac HT A 空载体

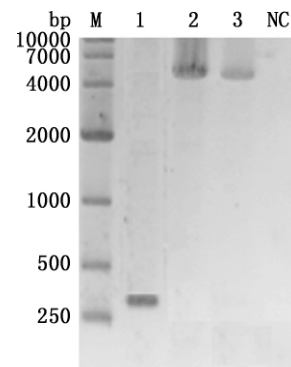
1, DL2000 DNA Marker; 2, PCR product of PEDV S1 gene; 3, Negative control; 4, DL10000 DNA Marker; 5, Positive plasmid of pSL598; 6, Blank plasmid of pFastBac HT A

图 1 PEDV S1 基因 PCR 扩增 (A) 和 pSL598 质粒的酶切鉴定 (B)

Fig. 1 PCR amplification of PEDV S1 gene (A) and enzyme digestion of pSL598 by *EcoR* I and *Sal* I (B)

2.2 重组 Bacmid (杆状病毒基因组 DNA) 的鉴定

将供体质粒 (pSL598) 转化大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞,在辅助质粒的作用下,目的基因与 DH10Bac 中的 Bacmid 重组,获得带有目的基因的重组 Bacmid。分别以 DH10Bac 菌落和纯化的重组 Bacmid 作为模板,以 pUC/M13-fwd 和 pUC/M13-rev 引物进行 PCR 扩增,结果显示,PCR 扩增获得 4 806 bp (PEDV-S1) 大小片段,空 Bacmid 载体对照获得 300 bp 的扩增片段 (图 2),说明 PEDV S1 基因成功整合到杆状病毒基因组。



M, DL10000 DNA Marker; 1, 空 Bacmid 对照; 2、3, 含 PEDV S1 基因的重组 Bacmid; NC, 阴性对照

M, DL10000 DNA Marker; 1, Blank Bacmid control; 2 and 3, Recombinant bacmid of PEDV S1 gene; NC, Negative control

图 2 PEDV S1 基因重组 Bacmid 的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of PEDV S1 gene recombinant Bacmid

2.3 重组杆状病毒包装、传代和鉴定

2.3.1 重组杆状病毒的转染 重组 Bacmid (杆状病毒基因组) 纯化后,转染 sf9 细胞, 27°C 培养 3~5 d 后,收集上清,作为 P1 代病毒。设置阴性 (sf9) 对照、空 Bacmid 对照、PEDV-S1 组,用 P1 代重组杆状病毒感染 sf9 细胞,获得 P2 代病毒,继续传代至 P3 代,作为种毒。P3 感染 sf9 细胞 24 h 后,荧光倒置显微镜观察细胞病变,结果表明,与阴性对照组相比,感染组细胞的生长明显受到抑制,感染组细胞变大、变圆,细胞浆内有许多黑色的小颗粒,部分细胞有空泡 (图 3),表明重组杆状病毒包装成功。

2.3.2 RT-PCR 检测目的基因 mRNA 表达

P2、P3 代重组杆状病毒感染 sf9 细胞,病毒上清利用 Wizard® 基因组 DNA 纯化试剂盒提取杆状病毒及基因组 DNA,以此 DNA 为模板,以 pUC/M13-fwd、pUC/M13-rev 引物进行 PCR 扩增,检测目的

基因是否一直留存于病毒基因组。RNA 提取试剂盒提取病毒感染的 sf9 细胞总 RNA, 利用 DNase 去除总 RNA 中的 DNA, Oligo(dT) 引物合成 cDNA, 以此 cDNA 为模板, 使用目的基因特异引物进行

RT-PCR 扩增, 检测目的基因 (PEDV-S1) 的转录水平表达情况, 结果显示, 目的基因成功整合到杆状病毒基因组, 并一直留存于基因组 (图 4A), 目的基因的 mRNA 也得到表达 (图 4B)。

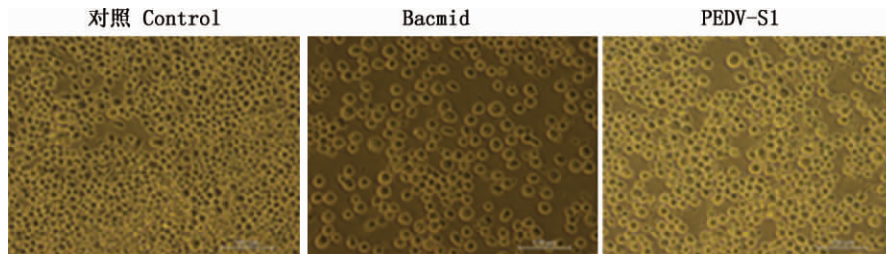
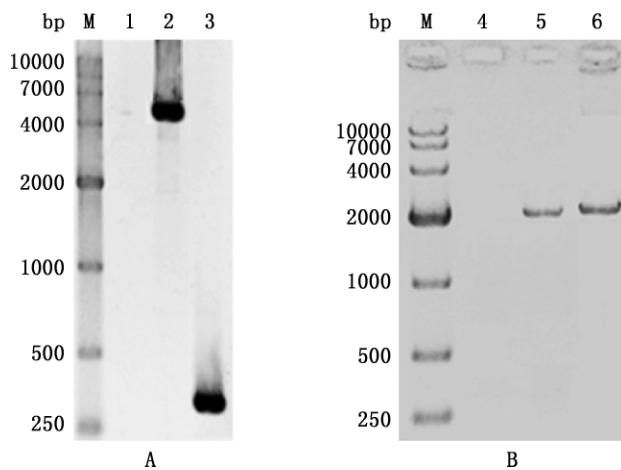


图 3 重组杆状病毒的细胞病变 (100×)

Fig. 3 CPE of recombinant baculovirus (100×)



① A, pUC/M13 引物 PCR 扩增; B, 特异引物 RT-PCR 扩增。② M, DL10000 DNA Marker; 1, 正常 sf9 细胞上清; 2, PEDV S1 P2 代细胞上清; 3, 空杆状病毒 P2 代细胞上清; 4, 正常 sf9 细胞沉淀; 5, PEDV S1 P2 代细胞沉淀; 6, PEDV S1 P3 代细胞沉淀

① A, PCR amplification of pUC/M13 primers; B, RT-PCR amplification of specific primers. ② M, DL10000 DNA Marker; 1, Supernatant of normal sf9 cells; 2, Supernatant of PEDV-S1 P2 generation cells; 3, Supernatant of P2 generation cells blank baculovirus; 4, Sedimentation of normal sf9 cells; 5, Sedimentation of PEDV S1 P2 generation cells; 6, Sedimentation of PEDV S1 P3 generation cells

图 4 RT-PCR 鉴定目的基因 mRNA 表达

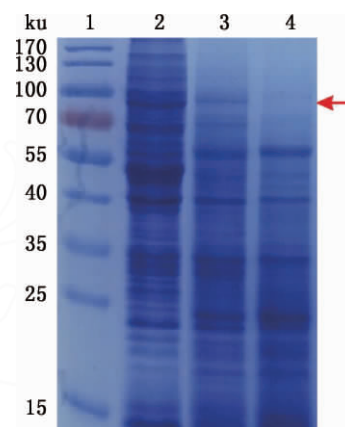
Fig. 4 mRNA expression of target genes by RT-PCR

2.4 PEDV S1 的表达鉴定

以 P3 代重组杆状病毒作为种毒感染 sf9 细胞, 收集其细胞沉淀和上清分别进行 SDS-PAGE 电泳,

考马斯亮蓝染色, 结果发现, 重组 PEDV S1 杆状病毒感染的细胞沉淀中有明显的特异性条带 (图 5), 而上清中几乎没有特异性条带。

P3 代重组杆状病毒的细胞沉淀和上清进行 Western blotting 鉴定, 分别用小鼠抗 His 抗体和猪抗 PEDV 阳性血清作为一抗, 检测目的基因的表达, 结果表明, PEDV S1 在细胞沉淀中有明显表达 (图 6), 上清中也有表达, 但表达量有待提高。表达产物能与猪阳性血清反应 (图 7), 说明该重组病毒表达产物具有较好的免疫反应性。

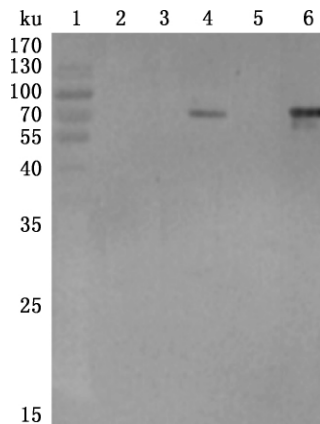


1, 蛋白质分子质量标准; 2, sf9 细胞沉淀; 3, 重组 PEDV S1 杆状病毒的细胞沉淀; 4, 空杆状病毒的细胞沉淀

1, Protein Marker; 2, Sedimentation of sf9 cells; 3, Sedimentation of recombinant PEDV S1 baculovirus; 4, Sedimentation of blank baculovirus

图 5 SDS-PAGE 分析重组蛋白的表达

Fig. 5 Expression of recombinant protein by SDS-PAGE

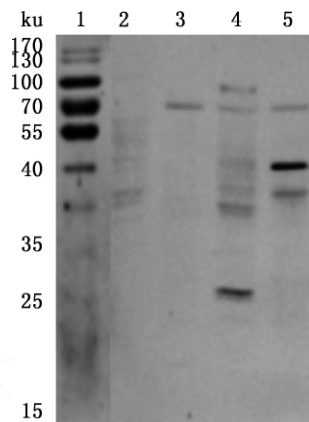


1, 蛋白质分子质量标准; 2, 正常 sf9 细胞上清; 3, 空杆状病毒上清; 4, PEDV S1 杆状病毒培养上清; 5, PEDV S1 杆状病毒细胞沉淀; 6, His-PEDV-N 原核表达产物

1, Protein Marker; 2, Supernatant of sf9 cells; 3, Supernatant of blank baculovirus; 4, Supernatant of PEDV S1 baculovirus; 5, Sedimentation of PEDV S1 baculovirus cells; 6, Prokaryotic expression product of His-PEDV-N

图 6 Western blotting 分析 PEDV 重组蛋白的表达 (His 抗体)

Fig. 6 Expression analysis of recombinant protein by Western blotting (His antibody)



1, 蛋白质分子质量标准; 2, 空杆状病毒感染细胞培养上清; 3, PEDV S1 杆状病毒感染细胞培养上清; 4, PEDV S1 杆状病毒感染细胞沉淀; 5, PEDV 感染 Vero 细胞沉淀

1, Protein Marker; 2, Supernatant of blank baculovirus; 3, Supernatant of PEDV S1 baculovirus infected sf9 cells; 4, Sedimentation of PEDV S1 baculovirus infected sf9 cells; 5, Sedimentation of PEDV infected Vero cells

图 7 Western blotting 分析重组蛋白的表达 (PEDV 阳性血清)

Fig. 7 Expression of recombinant protein by Western blotting (positive antisera)

3 讨论

PEDV 的暴发给中国和世界养猪业带来重大损失, 如何有效地预防该病成为当前的首要任务。该病最开始暴发时, 美国各个猪场采用的是给予母猪“返饲”技术, 即用患病仔猪的排泄物混入饲料中饲喂母猪^[14], 让母猪获得高水平的抗体, 进而母源抗体保护新生仔猪免受感染, 能迅速控制该病进一步蔓延扩散。但是在中国养殖场疫情复杂的情况下, 很多不明因子会给母猪带来更加严重的危害, 导致母猪流产等, 所以该项技术在临床中基本叫停了。目前一些疫苗公司和科研机构已经开发了 PEDV 灭活疫苗、PEDV 弱疫苗, PEDV/TGEV/RV 弱疫苗三联疫苗和乳酸杆菌表达 PEDV S 蛋白疫苗^[15-16], 对 PEDV 的防控起到了一定作用。但是灭活疫苗存在抗体产生慢、sIgA 抗体水平不高等问题, 而不管是“返饲”还是弱疫苗, 都是活病毒在母猪体内反复感染产生高水平抗体, 进而母源抗体保护仔猪, 这些方法从根本上还存在毒力返强、不明因子感染等生物安全风险。Kim 等^[17]构建 PEDV S 的 N 端 231—501 位氨基酸肽段的原核表达系统, 能激活猪的特异性黏膜免疫应答。然而, PEDV 作为 RNA 病毒, 在猪体内免疫压力情况下存在较强的变异能力, 其主要的 S1 基因变异频率较高^[18-19], 给疫苗的防控带来较大困扰。本研究表达出的 PEDV S1 蛋白, 不存在毒力返强的风险, 是一种安全、高效的疫苗后选产品。

杆状病毒表达系统是一种非常高效的表达系统^[20], 既可以利用外膜蛋白的自我组装机制单独使用, 表达外源蛋白, 也可使病毒的几个关键膜蛋白基因一起表达, 形成病毒样颗粒^[21-22]。杆状病毒表达系统与一般的大肠杆菌、酵母、哺乳动物细胞等表达系统相比, 具有以下特点: ①能够容纳较大片段的外源基因, 多角体启动子的作用下使外源基因在 sf9 细胞中过量表达, 外源基因的过量表达不影响杆状病毒本身的增殖^[23]; ②表达的蛋白产物易于纯化, 无内毒素污染, 生物安全性高, 对植物和脊椎动物均无致病性^[24-25]; ③杆状病毒表达的外源蛋白几乎都是可溶性蛋白, 其生物活性非常接近天然来源的分离物, 因此蛋白的免疫原性接近病毒的天然结构, 用该系统表达的重组蛋白制备的生物制品对激发免疫应答更加高效^[26-27]。本试验结果发现, PEDV S1 基因序列中存在较多的 sf9 细胞稀有密码子, 较难直接表达, 所以通过 PEDV S1 基因的密码子优化, 人

工合成优化后的基因序列,包装重组杆状病毒,使 PEDV S1 基因在杆状病毒表达系统中得到稳定表达,表达产物具有较好的反应原性,能特异地被猪阳性血清识别,加上真核表达通常具有天然构象,一般具有较好的免疫原性,所以本研究所开发的 PEDV 重组杆状病毒可以作为防治该病的候选疫苗。

研究表明,诱导机体产生针对 PEDV 的中和抗体主要在其 PEDV S 蛋白^[28],其中 S1 和 S2^[29]都有较好的中和表位,能产生广泛的中和抗体,而 S1 由于变异较大,是病毒逃逸宿主抗体防御的重要靶向蛋白,因此建立有效的针对 PEDV S 蛋白的 ELISA 检测方法,将为开展 PEDV 流行病学监测和疫苗免疫效果评估提供有效工具。而目前市场使用的主要是针对 PEDV N 的抗体检测试剂盒,不能反映 PEDV 中和抗体状况。本研究所表达的 PEDV S1 具有天然构象,能最真实地反映病毒囊膜结构蛋白,结果证实其能与猪的 PEDV 阳性血清进行反应,所以该重组蛋白可以作为开发检测 PEDV 中和抗体的 ELISA 试剂盒的包被抗原。

4 结 论

本研究利用杆状病毒表达系统成功表达了 PEDV 流行毒株的 S1 蛋白,该蛋白的表达为 PEDV 的防控提供了新的疫苗候选,为建立 PEDV 中和抗体检测方法及防控该病提供了新的技术支持。

参考文献 (References):

- [1] WANG L, BYRUM B, ZHANG Y. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(5): 917-919.
- [2] CHUNG H C, NGUYEN V G, MOON H J, et al. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus during outbreaks in south Korea, 2013-2014 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(12): 2238-2240.
- [3] ZHAO X, LI Z, ZENG X, et al. Sequence analysis of the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus isolated from South China during 2011-2015 [J]. *Journal of Veterinary Science*, 2017, 18(2): 237-243.
- [4] LANGEL S N, PAIM F C, LAGER K M, et al. Lactogenic immunity and vaccines for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): Historical and current concepts [J]. *Virus Research*, 2016, 226: 93-107.
- [5] SONG D, CHEN Y, PENG Q, et al. Full-length genome sequence of a variant porcine epidemic diarrhea virus strain, CH/GDZQ/2014, responsible for a severe outbreak of diarrhea in piglets in Guangdong, China, 2014 [J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(6): e01239-14.
- [6] DIEP N V, NORIMINE J, SUEYOSHI M, et al. Novel porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) variants with large deletions in the spike (S) gene coexist with PEDV strains possessing an intact S gene in domestic pigs in Japan: A new disease situation [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170126.
- [7] DE HAAN C A, HAIJEMA B J, SCHELLEN P, et al. Cleavage of group 1 coronavirus spike proteins: How furin cleavage is traded off against heparan sulfate binding upon cell culture adaptation [J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(12): 6078-6083.
- [8] LIU C, TANG J, MA Y, et al. Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus [J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(11): 6121-6125.
- [9] DENG F, YE G, LIU Q, et al. Identification and comparison of receptor binding characteristics of the spike protein of two porcine epidemic diarrhea virus strains [J]. *Viruses*, 2016, 8(3): 55.
- [10] LI W, VAN KUPPEVELD F J, HE Q, et al. Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Virus Research*, 2016, 226: 117-127.
- [11] GERDTS V, ZAKHARTCHOUK A. Vaccines for porcine epidemic diarrhea virus and other swine coronaviruses [J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 206: 45-51.
- [12] ZHAO P, WANG B, JI C M, et al. Identification of a peptide derived from the heptad repeat 2 region of the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) spike glycoprotein that is capable of suppressing PEDV entry and inducing neutralizing antibodies [J]. *Antiviral Research*, 2018, 150: 1-8.
- [13] LI Q, XU Z, WU T, et al. A flagellin-adjuvanted PEDV subunit vaccine improved protective efficiency against PEDV variant challenge in pigs [J]. *Vaccine*, 2018, 36(29): 4228-4235.
- [14] TUN H M, CAI Z, KHAFIPOUR E. Monitoring survivability and infectivity of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in the infected on-farm earthen manure storages (EMS) [J]. *Front Microbiology*, 2016, 7: 265.
- [15] BEALL A, YOUNT B, LIN C M, et al. Characterization of a pathogenic full-length cDNA clone and transmission model for porcine epidemic diarrhea virus strain PC22A [J]. *MBio*, 2016, 7(1): e01451-15.
- [16] WANG X N, WANG L, ZHENG D Z, et al. Oral immunization with a *Lactobacillus casei*-based anti-porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) vaccine ex-

- pressing microfold cell-targeting peptide Co1 fused with the COE antigen of PEDV[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124(2): 368-378.
- [17] KIM S H, CHO B H, LEE K Y, et al. N-terminal domain of the spike protein of porcine epidemic diarrhea virus as a new candidate molecule for a mucosal vaccine[J]. *Immune Network*, 2018, 18(3): e21.
- [18] ZHAO P D, TAN C, DONG Y, et al. Genetic variation analyses of porcine epidemic diarrhea virus isolated in mid-eastern China from 2011 to 2013[J]. *Canadian Journal Veterinary Research*, 2015, 79(1): 8-15.
- [19] WANG X Y, JI C J, ZHANG X, et al. Infection, genetic and virulence characteristics of porcine epidemic diarrhea virus in northwest China[J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2018, 11(1): 34-39.
- [20] PREMANAND B, ZHONG WEE P, PRABAKARAN M. Baculovirus surface display of immunogenic proteins for vaccine development[J]. *Viruses*, 2018, 10(6): E298.
- [21] WANG W, CHEN X, XUE C, et al. Production and immunogenicity of chimeric virus-like particles containing porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 protein[J]. *Vaccine*, 2012, 30(49): 7072-7077.
- [22] ROLDAO A, MELLADO M C, CASTILHO L R, et al. Virus-like particles in vaccine development[J]. *Expert Review Vaccines*, 2010, 9(10): 1149-1176.
- [23] CHI J N, WU C Y, CHIEN M S, et al. The preparation of porcine circovirus type 2 (PCV2) virus-like particles using a recombinant pseudorabies virus and its application to vaccine development[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 181(3): 12-19.
- [24] GE J, AN Q, SONG S, et al. Construction of recombinant baculoviruses expressing infectious bursal disease virus main protective antigen and their immune effects on chickens[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132993.
- [25] QI J, LIU T, LI Z, et al. Expression of limulus factor C in silkworm larvae by Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system[J]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2014, 30(10): 1594-1601.
- [26] LIU Z, LIU Y, ZHANG Y, et al. Surface displaying of swine IgG1 Fc enhances baculovirus-vectored vaccine efficacy by facilitating viral complement escape and mammalian cell transduction[J]. *Veterinary Research*, 2017, 48(1): 29.
- [27] HE Y, LI J, HECK S, et al. Antigenic and immunogenic characterization of recombinant baculovirus-expressed severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein: Implication for vaccine design[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(12): 5757-5767.
- [28] LI C, LI W, LUCIO DE ESESARTE E, et al. Cell attachment domains of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein are key targets of neutralizing antibodies[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(12): e00273-17.
- [29] OKDA F A, LAWSON S, SINGREY A, et al. The S2 glycoprotein subunit of porcine epidemic diarrhea virus contains immunodominant neutralizing epitopes[J]. *Virology*, 2017, 509: 185-194.

(责任编辑 晋大鹏)

