

## 猪流行性腹泻病毒 *COE* 基因的原核表达和免疫原性分析

杨 榕<sup>1</sup>, 顾超逸<sup>1</sup>, 李 郁<sup>1</sup>, 魏建忠<sup>1</sup>, 孙 裴<sup>1\*</sup>, 杨 勇<sup>2</sup>

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽安泰农业集团, 合肥 230036)

**摘 要:** 为研究猪流行性腹泻病毒中 *COE* 基因的原核表达情况及免疫原性, 从感染猪流行性腹泻病毒的猪体内采集肠内容物、肠段及肠系膜淋巴结, 参照 GenBank 中所收录的猪流行性腹泻病毒 (PEDV) CV777 株的 *COE* 基因序列设计 1 对特异性引物, 通过 RT-PCR 扩增出 *COE* 基因, 克隆到原核表达载体 pET-32 $\alpha$  上, 并构建重组表达质粒 pET-32 $\alpha$ -*COE*, 在大肠杆菌 *Rosetta* 中进行表达, 并进行 Western blot 检测。结果显示, 重组蛋白获得了高效的表达, 并能与多抗血清发生特异的免疫印迹反应。*COE* 基因是猪流行性腹泻病毒的中和抗原位点, 具有良好的免疫学活性。

**关键词:** 猪流行性腹泻病毒; *COE* 基因; 原核表达; 免疫印迹

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)06-0955-04

### Prokaryotic expression and immunogenicity analysis of *COE* gene of porcine epidemic diarrhea virus

YANG Rong<sup>1</sup>, GU Chao-yi<sup>1</sup>, LI Yu<sup>1</sup>, WEI Jian-zhong<sup>1</sup>, SUN Pei<sup>1</sup>, YANG Yong<sup>2</sup>

(1. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Antai Agricultural Group of Anhui, Hefei 230036)

**Abstract:** To study the prokaryotic expression and immunogenicity in the *COE* gene of porcine epidemic diarrhea virus, we collected intestinal contents, bowel and mesenteric lymph nodes in piglets from the pig which infected porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). The specific primers were designed by the sequence of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) CV777 strain *COE* gene reported in GenBank. The purpose gene was amplified by RT-PCR, and then cloned into prokaryotic expression vector pET-32 $\alpha$ , to construct a recombinant expression vector pET-32 $\alpha$ -*COE*. The gene was expressed by transformation into in *E.coli Rosetta*, and was detected by Western blot. The result showed that the recombinant protein was highly expressed, and could react with polyclonal antibody. *COE* gene is neutralization antigenic sites of porcine epidemic diarrhea virus, and has a good immune activity.

**Key words:** porcine epidemic diarrhea virus; *COE* gene; prokaryotic expression; Western blot

猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是一种高度接触性的肠道传染病, 病猪感染 PED 后的主要临床特征是呕吐、腹泻、脱水和食欲下降<sup>[1]</sup>。PED 的病原为猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV), 属于冠状病毒科、冠状病毒属。本病首次报道于 1971 年, 当时英国的猪群中爆发了一种主要引起架子猪和育肥猪群急性腹泻的疾病, 在临床上的表现与猪传染性胃肠炎 (TGEV) 十分的相似, 当时被称为“流行性病毒性腹泻”<sup>[2]</sup>,

随后许多国家相继报道, 1976 年我国也发现该病<sup>[3]</sup>。目前该病在世界各国都广泛流行, 尤其是在亚洲<sup>[4]</sup>。PED 对各个年龄的猪都有致病性, 尤其对新生仔猪的致死率最高, 给养猪业造成了严重的经济损失<sup>[5]</sup>。

目前, 预防该病主要采用疫苗接种的方法, 使用较多的是灭活疫苗或者弱毒疫苗<sup>[6]</sup>。然而, 由于 PEDV 的体外分离培养较为困难, 灭活苗的抗原含量容易出现不足的问题<sup>[7]</sup>, 而弱毒苗存在着成本高、易返祖以及有潜在感染危险等缺陷, 很难在实践中

收稿日期: 2013-04-07

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-36-生猪) 和安徽省生猪产业技术体系资金共同资助。

作者简介: 杨 榕, 女, 硕士研究生。E-mail: ronger5210616@163.com

\* 通信作者: 孙 裴, 男, 副教授。E-mail: sunpei1979@126.com

推广应用<sup>[8]</sup>。因此,传统疫苗在防治 PED 中暴露出越来越多的问题<sup>[9]</sup>。随着 PED 的广泛流行,迫切需要研究出既经济实用又安全可靠的 PEDV 疫苗<sup>[10]</sup>。因而,利用基因工程技术,开展 PED 的基因工程疫苗研究具有广阔应用前景<sup>[11]</sup>。PEDV 的 S 蛋白为其纤突糖蛋白,位于病毒粒子的表面<sup>[12]</sup>。S 蛋白是 PEDV 的主要结构蛋白,携带 PEDV 主要的 B 淋巴细胞抗原表位<sup>[13]</sup>,能够诱导机体产生中和抗体进而对机体提供免疫保护的作用<sup>[14]</sup>。Chang 等<sup>[15]</sup>通过研究 TGEV 的中和抗原位点并且比较 TGEV 和 PEDV 的共同点,在 PEDV 的 S 基因上标记出一个可能的中和抗原位点,并命名为 COE,将其 COE 通过大肠杆菌进行原核表达制成重组蛋白,而后用此重组蛋白免疫动物制备超免血清,接着将超免血清加入已接种过 PEDV 的 Vero 细胞中,发现其能够抑制蚀斑形成。由此可见,COE 基因编码的部分 S 蛋白具有免疫原性,可以诱导机体产生中和抗体<sup>[16]</sup>。

为了探索 COE 基因作为 PEDV 基因工程疫苗候选基因的可行性,作者将 PEDV 的中和抗原位点基因 COE 克隆到 pET-32 $\alpha$  原核表达载体上,构建了重组表达质粒 pET-32 $\alpha$ -COE 并进行诱导表达,对其免疫原性进行分析,从而对猪流行性腹泻病毒的基因工程疫苗的研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病料来源

感染 PEDV 的猪肠内容物、肠段及肠系膜淋巴结采集自安徽省某猪场病猪。

### 1.2 载体与菌株

pMD18-T Simple Vector 为 TaKaRa 公司产品,大肠杆菌 DH5 $\alpha$  与 Rosetta 及表达载体 pET-32 $\alpha$  均由本实验室保存。

### 1.3 试剂

限制性内切酶 Hind III、EcoR I 和 T4 DNA Ligase 均购自 TaKaRa 公司;RNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、普通质粒小提试剂盒、dNTP、2 $\times$ Go Taq Master Green Mix、M-MLV 反转录酶、DNA Marker I、DNA Marker D2000、DNA Marker D15000、低分子量蛋白质 Marker 均购自天根公司;猪源抗 PEDV 高免血清由本实验室保存;HRP 标记的兔抗猪 IgG 为 Sigma 公司产品;其他试剂为进口或国产分析纯。

### 1.4 引物的设计

根据 GenBank 上登录的 PEDV CV777 株全基因序列 AF353511,利用 Primer5.0 引物设计软件,设

计 1 对引物 P1、P2 扩增 COE 基因,目的片段大小为 480 bp。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

上游引物 P1:

GATGAATTCATGCATGAACAGCCAATTC

下游引物 P2:

GGGAAGCTTGATAGTATACTTGGTACACACATCC

## 1.5 目的基因的扩增

**1.5.1 RNA 的提取** 将病料研磨并用灭菌的 PBS 作 10 倍稀释,反复冻融 3 次后于 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r $\cdot$ min $^{-1}$ ,离心 10 min,取上清 100  $\mu$ L 参照 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。

**1.5.2 cDNA 的合成** 在 10  $\mu$ L 总 RNA (步骤 1.5.1) 中加入 1  $\mu$ L 下游引物 P2 和 3  $\mu$ L dNTP, 70 $^{\circ}$ C 作用 5 min,冰浴 2 min,再加入 5  $\mu$ L 5 $\times$ first strand buffer 和 1  $\mu$ L M-MLV 反转录酶,混匀,42 $^{\circ}$ C 水浴反应 50 min,95 $^{\circ}$ C 水浴灭活 5 min。反转录产物于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

**1.5.3 COE 基因的 PCR 扩增** 取 5  $\mu$ L cDNA (步骤 1.5.2) 为模板,分别加入 1  $\mu$ L 上游引物 P1、下游引物 P2,PCR 扩增带有 EcoR I 和 Hind III 酶切位点的目的基因。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min 后进入 PCR 循环,94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,58.1 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s,30 个循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后,取 5  $\mu$ L PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果。

## 1.6 COE 基因的克隆与鉴定

将 PCR 产物经琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收纯化,回收产物克隆至 pMD 18-T 载体,转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞。PCR 筛选阳性克隆,送至上海生工生物工程有限公司进行测序,将测序结果与已发布的 PEDV CV777 株序列和其他毒株序列进行核苷酸比对。

## 1.7 原核表达载体 pET-32 $\alpha$ -COE 的构建

将阳性克隆质粒和表达载体 pET-32 $\alpha$  分别进行 EcoR I、Hind III 双酶切,切胶回收,16 $^{\circ}$ C 连接过夜,转化入 Rosetta 感受态细胞中。经 PCR 和双酶切鉴定筛选阳性重组质粒,送至上海生工生物工程有限公司进行测序。

## 1.8 重组表达载体 pET-32 $\alpha$ -COE 的诱导表达

将鉴定的阳性重组表达质粒接种于含有氨苄青霉素 AMP (50  $\mu$ g $\cdot$ mL $^{-1}$ ) 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。再以 1:100 的比例接种于含有氨苄青霉素 AMP (50  $\mu$ g $\cdot$ mL $^{-1}$ ) 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 值达到 0.6~0.8。加入 IPTG 使其终浓度为 1 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ ,37 $^{\circ}$ C 继续振荡培养,分别于诱导前 0 h 及诱导后 4 h 收集菌液,以同样的方法

诱导含空质粒 pET-32 $\alpha$  的 *Rosetta* 的 4 h 菌液作对照, 进行 SDS-PAGE 电泳观察表达结果。

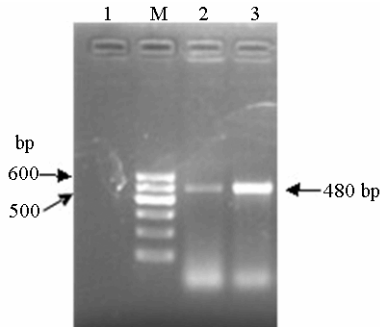
### 1.9 重组表达蛋白的 Western blot 检测

以猪源抗 PEDV 高免血清作为一抗, 利用免疫印迹分析 (Western blot) 检测重组表达蛋白免疫学活性。将重组表达蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 电转印至 NC 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入一抗 (1:100) 温育 2 h, 再加入 HRP 标记的羊抗猪 IgG (1:1 000) 温育 2 h, 最后进行 DAB 显色并观察结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 COE 基因的扩增结果

将从病料中提取的 RNA 经反转录和 PCR 扩增后产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳中检测, 结果显示扩增的 COE 基因片段长度与预期的 480 bp 相符 (见图 1)。



M. DNA Marker I; 1. 阴性对照; 2. 阳性对照; 3. COE 基因扩增产物

M. DNA Marker I; 1. Negative control; 2. Positive control; 3. PCR product of COE gene

图 1 COE 基因的 RT-PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳结果  
Figure 1 Electrophoresis pattern of RT-PCR products of COE gene on 1% agarose gel

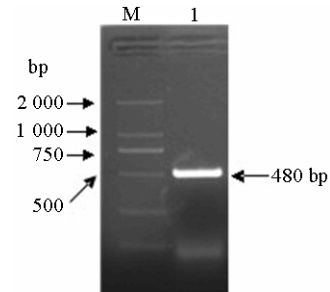
### 2.2 重组表达载体 pET-32 $\alpha$ -COE 的构建结果

将重组质粒进行 PCR 鉴定 (见图 2) 和 *Eco*R I、*Hind* III 双酶切鉴定 (见图 3), 表明成功构建了表达载体 pET-32 $\alpha$ -COE。将构建好的质粒送至上海生工生物工程有限公司进行测序。结果表明, 扩增出的 COE 基因序列与 PEDV CV777 毒株的 COE 基因序列同源性为 97%。

### 2.3 重组表达载体 pET-32 $\alpha$ -COE 的 SDS-PAGE 检测结果

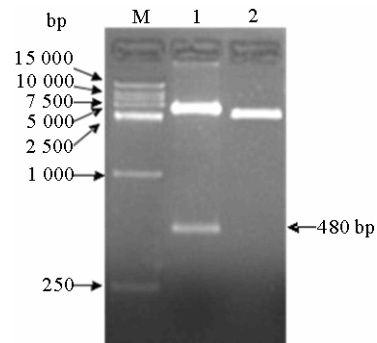
将重组表达载体 pET-32 $\alpha$ -COE 在宿主菌 *Rosetta* 中经 IPTG 诱导表达, 目的蛋白大小为 17.6 ku, 表达载体 pET-32 $\alpha$  的标签蛋白共有 20 ku, 故融合蛋白大小约为 37.6 ku。经 SDS-PAGE 电泳检测, 在约 37.6 ku 处见到表达条带 (见图 4), 与预计大小相符。而未加 IPTG 诱导的菌液没有表达条带,

说明该蛋白为插入的目的片段所表达。



M. DNA Marker D2000; 1. 重组质粒 pET-32 $\alpha$ -COE  
M. DNA Marker D2000; 1. The recombinant plasmid pET-32 $\alpha$ -COE

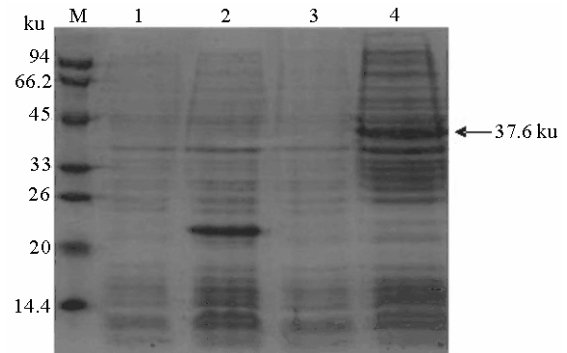
图 2 重组质粒 pET-32 $\alpha$ -COE 的 PCR 鉴定  
Figure 2 PCR identification of the recombinant plasmid pET-32  $\alpha$ -COE



M. DNA Marker D15000; 1. 重组质粒 pET-32 $\alpha$ -COE; 2. 质粒 pET-32 $\alpha$

M. DNA Marker D15000; 1. The recombinant plasmid pET-32  $\alpha$ -COE; 2. The plasmid pET-32  $\alpha$

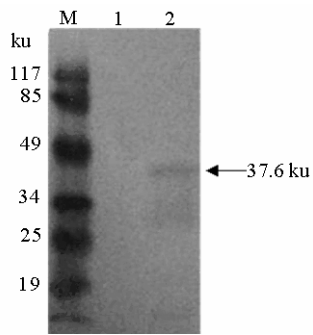
图 3 重组质粒 pET-32 $\alpha$ -COE 的双酶切鉴定  
Figure 3 Restriction endonuclease identification of the recombinant plasmid pET-32  $\alpha$ -COE



M. 标准蛋白分子量非预染 Marker; 1. 质粒 pET-32 $\alpha$  诱导前; 2. 质粒 pET-32 $\alpha$  诱导后; 3. 重组质粒 pET-32 $\alpha$ -COE 诱导前; 4. 重组质粒 pET-32 $\alpha$ -COE 诱导后

M. Molecular Weight Marker; 1. pET-32 $\alpha$  expression result with non IPTG induced; 2. pET-32 $\alpha$  expression result with IPTG induced; 3. pET-32 $\alpha$ -COE expression result with non IPTG induced; 4. pET-32 $\alpha$ -COE expression result with IPTG induced

图 4 重组质粒 pET-32 $\alpha$ -COE 的诱导表达  
Figure 4 Induced expression results of pET-32 $\alpha$ -COE



M. 标准蛋白分子量预染 Marker; 1. 质粒 pET-32 $\alpha$  诱导后菌体蛋白; 2. 重组蛋白

M. Pre-stained protein Marker; 1. pET-32 $\alpha$  induced by IPTG; 2. Recombinant protein

图 5 重组表达蛋白的 Western blot 检测

Figure 5 Western blot analysis of recombinant protein

#### 2.4 重组表达蛋白的 Western blot 检测结果

以重组表达蛋白为抗原, 猪源抗 PEDV 高免血清为一抗, 进行 Western blot 检测。结果表明, 在 37.6 ku 处出现一条清晰的反应条带, 说明重组蛋白在大肠杆菌中得到了正确表达并保留了其免疫学活性 (见图 5)。

### 3 讨论

猪流行性腹泻对养猪业的危害很大, 而目前国内外对于其疫苗的研究相对较少。COE 基因是 PEDV 的部分保护性抗原基因, 其编码的部分 S 蛋白具有免疫原性<sup>[17]</sup>。因此, COE 基因在 PEDV 基因工程疫苗的研究中是最重要的一个靶基因。

本研究按照 GenBank 提供的 PEDV CV777 株的 COE 基因序列来设计引物, 从临床采集病料, 利用 RT-PCR 技术, 扩增出 COE 基因的目的片段, 再将其克隆到原核表达载体 pET-32 $\alpha$  上, 后转化于 Rosetta 感受态细胞中进行诱导表达, 最后检测其免疫原性。

试验过程中, 曾用大肠杆菌 BL21 作为宿主菌, 但是在诱导后的菌体中并没有检测出目的条带 (数据未显示)。分析原因可能是目的片段序列中含有稀有密码子影响其诱导表达, 而 Rosetta 菌株能够提高 tRNA 水平从而提高外源蛋白的表达, 并且能够改善菌体中由于含有稀有密码子而造成的表达限制<sup>[18]</sup>, 故后来宿主菌换为 Rosetta。通过更换诱导温度和诱导时间分别对重组表达载体进行表达后, 选出最适诱导条件, 结果 SDS-PAGE 电泳检测到了目的条带, Western blot 检测结果显示重组蛋白与猪源抗 PEDV 高免血清发生反应, 而空质粒载体 pET-32 $\alpha$  不与猪源抗 PEDV 高免血清发生反应, 证明试验获

得的重组蛋白具有免疫原性, 为进一步研究 PEDV 的基因工程疫苗提供了依据。

#### 参考文献:

- [1] Huy N X, Yang M S, Kim T G. Expression of a cholera toxin B subunit-neutralizing epitope of the porcine epidemic diarrhea virus fusion gene in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.)[J]. Molecular Biotechnology, 2011, 48: 201-209.
- [2] 斯特劳 B E. 猪病学[M]. 8 版. 赵德明, 张仲秋, 沈建忠, 译. 北京: 中国农业大学出版社, 2000: 181-187.
- [3] 程庆华, 牛小迎, 叶成玉. 青海地区猪流行性腹泻病调查[J]. 青海畜牧兽医杂志, 1992, 22(3): 22-23.
- [4] Pensaert M. Porcine epidemic diarrhea now enzootic in Asia[J]. Pig Prog: Enteric Dis Spec III, 2005(Suppl.): 20-21.
- [5] Sun D O, Feng Li, Shi H Y, et al. Identification of two novel B cell epitopes on porcine epidemic diarrhea virus spike protein[J]. Vet Microbiol, 2008, 131(1/2): 73-81.
- [6] 孙东波, 冯力, 时红艳, 等. 猪流行性腹泻病毒分子生物学研究进展[J]. 动物医学进展, 2006, 27(10): 11-14.
- [7] Kim O, Chae C. In situ hybridization for the detection and localization of porcine epidemic diarrhea virus in the intestinal tissues from naturally infected piglets[J]. Vet Pathol, 2000, 37(1): 62-67.
- [8] 郭春和, 黄毓茂, 项林盛, 等. 猪流行性腹泻病毒结构蛋白及疫苗的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2011, 43(12): 83-87.
- [9] Pospischil A, Stuedli A, Kiupel M, et al. Update on porcine epidemic diarrhea[J]. J Swine Health Prod, 2002, 10(2): 81-85.
- [10] Ogra P L, Faden H, Welliver R C. Vaccination strategies for mucosal immune responses[J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(2): 430-445.
- [11] Song D S, Oh J S, Kang B K, et al. Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13 strain[J]. Res Vet Sci, 2007, 27(1): 57-60.
- [12] Brian D, Baric R. Coronavirus genome structure and replication[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2005, 287:1-30.
- [13] Gallagher T, Buchmeier M. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis[J]. Virology, 2001, 279(2): 371-374.
- [14] Duarte M, Laude H. Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhoea virus[J]. J Gen Virol, 1994, 75: 1195-1200.
- [15] Chang S H, Bae J L, Kang T J, et al. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus [J]. Mol Cells, 2002, 14(2): 295-299.
- [16] Bae J L, Lee J G, Kang T J, et al. Induction of antigen-specific systemic and mucosal immune responses by feeding animals transgenic plants expressing the antigen[J]. Vaccine, 2003, 21: 4052-4058.
- [17] Duarte M, Laude H. Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhoea virus[J]. J Gen Virol, 1994, 75: 1195-1200.
- [18] 杨巍. 猪流行性腹泻病毒 S1 蛋白亲和肽的筛选与鉴定 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011: 42-43.