

## 猪传染性胃肠炎病毒 S1 融合蛋白的构建及其免疫原性研究

王芳, 徐进平\* (武汉大学生命科学学院, 病毒学国家重点实验室, 湖北武汉 430072)

**摘要** [目的]研究猪传染性胃肠炎病毒 S1 融合蛋白的免疫原性。[方法]表达和纯化了猪传染性胃肠炎病毒 S1 与 TAT 转导肽序列的融合蛋白 S1-TAT, 将融合蛋白 S1-TAT 经腹腔注射和灌胃方式免疫昆明小鼠, 采集免疫小鼠血液和粪便样品, 检测血清 IgG 抗体和黏膜 IgA 抗体水平, 期间观察小鼠体重变化。[结果]腹腔注射组诱导产生的血清 IgG 抗体水平明显高于其他试验组 ( $P < 0.01$ ), 但其黏膜 IgA 抗体水平较低; 而灌胃组能够诱导中等水平的血清 IgG 抗体和较高水平的黏膜 IgA 抗体 ( $P < 0.01$ ); 在试验周期中, 各组小鼠体重均正常。融合蛋白 S1-TAT 的穿肠活性较好, 与对照组之间差异极显著 ( $P < 0.01$ )。[结论]融合蛋白 S1-TAT 经口服或注射小鼠后, 能够有效诱导小鼠机体产生体液免疫应答, 并且融合蛋白 S1-TAT 经口服可诱导小鼠机体产生黏膜免疫应答; 融合蛋白 S1-TAT 具有穿肠功能; 融合蛋白 S1-TAT 经口服或注射小鼠, 均安全。

**关键词** 猪传染性胃肠炎病毒 S1 基因; 转导肽; 免疫原性

**中图分类号** S852.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)13-0104-04

## Construction and Immunogenicity of Transmissible Gastroenteritis Virus S1 Fusion Protein

WANG Fang, XU Jin-ping (State Key Lab of Viral, School of Life Science, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072)

**Abstract** [Objective] To investigate the immunogenicity of fusion protein S1-TAT consisting of transmissible gastroenteritis virus S1 and transcriptional activator protein (TAT). [Method] The recombinant plasmid S1-TAT was expressed in prokaryotic system and purified. Kunming mice were immunized with fusion protein S1-TAT by intraperitoneal injection and intragastric administration respectively, collected the blood and stool samples of mice and determined for serum IgG and mucosal IgA antibody, observed the change of bodyweight. [Result] The level of serum IgG antibody of intraperitoneal injection group was significantly higher than other groups ( $P < 0.01$ ), but mucosal IgA antibody was lower. However, the intragastric administration group induced a moderate level of serum IgG antibody and higher level of mucosal IgA antibody ( $P < 0.01$ ). Throughout the immune process, the bodyweight of each group was within the normal range. The intestine activity of fusion protein S1-TAT was better compared with the control group ( $P < 0.01$ ). [Conclusion] The fusion protein S1-TAT can effectively induce the humoral immune response in mice after oral administration or injection, and the mucosal immune response can be induced by oral administration. The fusion protein S1-TAT has intestinal function. It is safe to immune mice by oral administration or injection.

**Key words** Transmissible gastroenteritis virus S1 gene; Transduction peptide; Immunogenicity

猪传染性胃肠炎病毒 (transmissible gastroenteritis virus, TGEV) 是一种可以引起以幼猪呕吐、腹泻和高死亡率为主要特征的急性传染肠道疾病的 RNA 病毒<sup>[1]</sup>。纤突糖蛋白 S 作为诱导保护免疫的主要结构蛋白<sup>[2-3]</sup>, 在其氨基末端 S1 区域含有 4 个主要抗原位点, 从 N 端到 C 端依次是 C、B、D 和 A<sup>[4]</sup>。A 位点是能够诱导机体产生中和抗体的关键糖基化位点<sup>[5]</sup>, 存在于病毒粒子的表面上; D 位点虽不经过细胞内的糖基化修饰作用, 但应用仅含 D 抗原位点基因免疫小鼠产生的血清特异性抗体也具有中和活性。如果 S 基因中缺乏 A、D 这 2 个位点, 那么表达的蛋白质就不能诱导机体产生中和抗体<sup>[6-7]</sup>。另外有研究表明, TGEV S1 基因诱导产生的免疫效果要优于 S 全基因<sup>[8-9]</sup>。

目前, TGEV S1 基因已在多种不同的表达系统中得到了有效的表达<sup>[10]</sup>, 但在通过口服方式免疫动物时, 由于各种消化酶作用以及本身大分子性质, 达不到很好的免疫效果。该研究借助能够携带外源蛋白穿过细胞膜的 TAT 转导肽序列<sup>[11-13]</sup>, 将其与 S1 基因进行融合表达, 比较融合蛋白 S1-TAT 以不同给药方式免疫小鼠产生的免疫效果, 为 TGEV 口服疫苗的研究提供一种新的思路。

## 1 材料与方

## 1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒。大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3)、质粒

pGEX-6p-1 为武汉大学生命科学学院病毒学国家重点实验室保存。

**1.1.2 生化试剂。**质粒小提取试剂盒和 ELISA 试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司, Bio-Rad ECL 化学发光检测试剂盒 (170-5061)、GST-Resin 纯化柱购自七海生物, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 和 HRP 标记的羊抗鼠 IgA 购自佰泰科生物技术有限公司, 抗 GST 血清为武汉大学生命科学学院病毒学国家重点实验室保存。

**1.1.3 试验动物。**SPF 级别 6~8 周龄的雄性昆明小鼠购自湖北省疾控中心的实验动物研究中心。

## 1.2 方法

**1.2.1 基因合成与鉴定。**参照 TGEV TH-98 株 S1 基因序列 (KU729220), 在 S1 基因 C 端融合 TAT 转导肽序列, 并将重组基因 S1-TAT 克隆至表达载体 pGEX-6p-1 中。用 pGEX-6p-1 通用引物 (上游引物 F: 5'-GGGCTGGCAAGC-CACG TTTGGTG-3'; 下游引物 R: 5'-CCGGGAGCTGCATGT-GTCAGAGG-3') 扩增 S1-TAT 基因, 经 *Bam*H I/*Eco*RI 双酶切及基因测序鉴定重组质粒为 pGEX-6p-1-S1-TAT。

**1.2.2 重组工程菌的制备。**将实验室保存的大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 接种于 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6 左右。取 1.5 mL 菌液离心, 弃上清, 加入 200 μL 预冷的 0.1 mol/L 氯化钙轻轻摇动重悬菌体沉淀, 冰浴 30 min。4 °C、4 000 r/min 离心 10 min 后弃上清, 加入 100 μL 预冷的 0.1 mol/L 氯化钙重悬菌体, 得到制备好的 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞。取 1 μL 重组质粒 pGEX-6p-

**作者简介** 王芳 (1992—), 女, 湖南张家界人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物学。\* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事微生物学与基因工程药物研究。

**收稿日期** 2018-02-25

1-S1-TAT 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞,将转化产物均匀涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板上,37 °C 培养过夜,经菌液 PCR 鉴定阳性重组子。

**1.2.3 融合蛋白 S1-TAT 的表达与纯化。**挑取转化有重组质粒的单菌落接种于 5 mL 选择性 LB 液体培养基中,37 °C 过夜培养。次日,按 1:100 的比例转接到 20 mL 选择性 LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.6 时,加入 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导剂,30 °C、250 r/min 振荡培养 4 h。将菌液在 4 °C、10 000 r/min 离心 1 min,收集菌体沉淀,加入 pH 7.4 PBS 缓冲液进行重悬,400 W 超声破碎至菌液不再黏稠后,12 000 r/min 离心 10 min,取少量样品加入适当上样缓冲液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离和 Western blot 分析。将破碎上清溶液与 GST 纯化柱在 4 °C 孵育过夜,4 °C、3 000 r/min 离心 5 min。缓慢去除上清液,加入 PBS 清洗杂蛋白,4 °C、3 000 r/min 离心 5 min。缓慢去除上清液后,加入 pH 8.0 Elution buffer,室温轻摇 10 min,4 °C、3 000 r/min 离心 5 min,收集上清液,SDS-PAGE 电泳分析蛋白纯化情况。

**1.2.4 试验动物分组、免疫和采样。**将昆明小鼠随机分 4 组,每组 8 只。融合蛋白 S1-TAT 分别经腹腔注射和灌胃给药免疫昆明小鼠,每只小鼠每次免疫剂量 100 μg,共免疫 3 次,间隔 14 d 以相同剂量加强免疫 1 次,同时设置 PBS 对照。在首次免疫后的第 7、14、21、28、35 和 42 天收集免疫小鼠血液和粪便样品:全血 37 °C 静置 1 h 后,4 °C 放置过夜,次日 4 °C、2 000 r/min 离心 20 min,分离血清;每 0.1 g 粪便使用 200 μL 0.01 mol/L 的 PBS 充分混匀,4 °C 作用 1.5 h,离心收集上层液体。

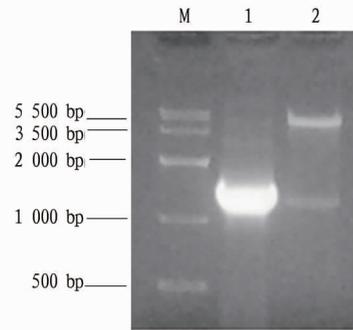
**1.2.5 抗体检测。**将融合蛋白 S1-TAT 以 100 μL/孔包被酶标板,4 °C 放置过夜;次日弃除孔中液体,PBST 反复洗涤 3 次,按 200 μL/孔加入 5% 脱脂奶粉,37 °C 封闭 2 h;弃除孔中液体,PBST 洗涤 3 次,按 100 μL/孔加入适当倍数稀释好的待检样品,37 °C 孵育 2 h;弃除孔中液体,PBST 洗涤 5 次,按 100 μL/孔加入 1:5 000 稀释的二抗(HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体或 HRP 标记羊抗鼠 IgA 抗体),37 °C 孵育 2 h;弃除孔中液体,PBST 洗涤 5 次,每孔加入 100 μL OPD 底物溶液,避光显色 5 min 后终止反应,测定样品的 OD 值。

**1.2.6 迟发型过敏反应。**将融合蛋白 S1-TAT 与氟氏完全佐剂按比例充分混匀后注射于小鼠的右后足垫皮下,注射量为 10 μg,并在同一小鼠左后足垫皮下注射 PBS 缓冲液。用千分卡尺测量注射抗原后 24、48、72 h 以及 7、14 d 小鼠的左右足垫厚度,观察肿胀的发生和消长情况,结果以 ++、+、- 表示(++ 代表明显肿胀;+ 代表轻度肿胀;- 代表无肿胀)。

**1.2.7 融合蛋白 S1-TAT 的穿肠活性检测。**取 5 cm 昆明小鼠肠管,用 PBS 缓冲液冲洗小鼠肠管,将肠管一端扎紧,用移液枪吸取浓度为 100 μg/mL 的融合蛋白 S1-TAT 至扎好的小鼠肠管,扎好肠管另一端,投入装有 10 mL PBS 缓冲液的试管中,并使 PBS 缓冲液完全浸没小鼠肠管,设置阴性对照,30 °C 下静置,间隔 1 h 取样,ELISA 方法检测待检样品。

## 2 结果与分析

**2.1 重组质粒的鉴定** 重组质粒 pGEX-6p-1-S1-TAT 为模板,用引物扩增 S1-TAT 序列,PCR 鉴定重组质粒。用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶双酶切重组质粒 pGEX-6p-1-S1-TAT,酶切鉴定重组质粒。结果如图 1 所示,PCR 和双酶切后,琼脂糖凝胶电泳均可见有 1.2 kb 的 S1-TAT 基因。经后续测序鉴定,重组质粒 pGEX-6p-1-S1-TAT 构建正确。



注:M. DNA Marker IV;1. PCR 扩增产物;2. 双酶切产物

Note:M. DNA Marker IV;1. PCR amplified products;2. Double enzyme digestion product

图 1 重组质粒的鉴定

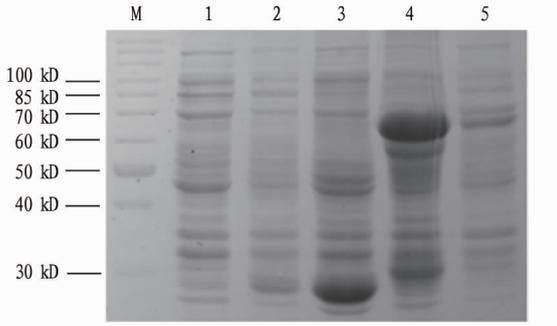
Fig.1 Identification of recombinant plasmids

**2.2 融合蛋白 S1-TAT 的诱导表达** 将重组质粒 pGEX-6p-1-S1-TAT 转化大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 以 0.5 mmol/L IPTG、30 °C 诱导表达 4 h。诱导后的 S1-TAT 原核表达重组大肠菌在分子量约为 70 kD 出现特异性蛋白条带,与预期的融合蛋白大小基本一致(图 2)。相对应未经诱导的重组大肠菌没有出现此条带,而诱导的空载体 pGEX-6p-1 对照重组大肠菌在 26 kD 左右出现 GST 蛋白条带,上述结果初步表明融合蛋白 S1-TAT 在大肠杆菌中获得表达。

**2.3 融合蛋白 S1-TAT 的 Western blot 鉴定结果** 将重组表达菌 *E. coli* BL21 (DE3) (pGEX-6p-1-S1-TAT) 进行小量诱导,诱导后的菌体经过 SDS-PAGE 电泳分离后转移到 NC 膜上,ECL 化学发光检测结果。结果显示,这些表达与 GST 融合的蛋白能被抗 GST 的单克隆抗体识别,蛋白条带大小与预期符合,证实融合蛋白 S1-TAT 在大肠杆菌中得以表达正确(图 3)。

**2.4 融合蛋白 S1-TAT 的纯化** 收集诱导后 *E. coli* BL21 (DE3) (pGEX-6p-1-S1-TAT) 破碎液上清,将其与 GST 纯化柱 4 °C 过夜孵育后,用适量 PBS 洗去杂蛋白,最后用 pH 8.0 的还原性谷胱甘肽洗脱液洗脱目的蛋白,从而获得纯化蛋白(图 4)。

**2.5 免疫小鼠的血清 IgG 抗体水平** 融合蛋白 S1-TAT 经腹腔注射和灌胃给药方式免疫昆明小鼠的 42 d 内,间隔 7 d 随机取 3 只试验小鼠断尾取血,分离血清。血清 IgG 抗体 ELISA 检测结果显示(图 5),腹腔注射组小鼠在免疫后第 7 天即产生了特异性 IgG 抗体,与阴性对照组之间差异极显著 ( $P < 0.01$ ),其抗体水平随着免疫次数的增加和时间的延长逐渐升高。而灌胃组小鼠在免疫后第 14 天才开始有抗体产

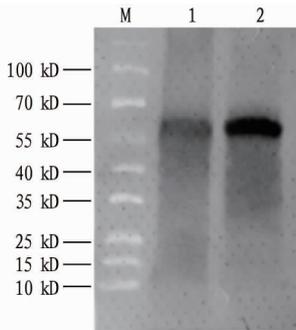


注: M. 蛋白 Marker; 1. 未诱导的 *E. coli* BL21 (DE3) (pGEX-6p-1-S1-TAT) 菌液; 2. 诱导后 *E. coli* BL21 (DE3) (pGEX-6p-1) 破碎液上清; 3. 诱导后 *E. coli* BL21 (DE3) (pGEX-6p-1) 破碎液沉淀; 4. 诱导后 *E. coli* BL21 (DE3) (pGEX-6p-1-S1-TAT) 破碎液上清; 5. 诱导后 *E. coli* BL21 (DE3) (pGEX-6p-1-S1-TAT) 破碎液沉淀

Note: M. Protein Marker; 1. Uninduced *E. coli* BL21 (DE3) (pGEX-6p-1-S1-TAT) liquid; 2. Induced *E. coli* BL21 (DE3) (pGEX-6p-1) broken liquid supernatant; 3. Induced *E. coli* BL21 (DE3) (pGEX-6p-1) broken liquid precipitation; 4. Induced *E. coli* BL21 (DE3) (pGEX-6p-1-S1-TAT) broken liquid supernatant; 5. Induced *E. coli* BL21 (DE3) (pGEX-6p-1-S1-TAT) broken liquid precipitation

图 2 融合蛋白 S1-TAT 的诱导表达分析

Fig. 2 Expression analysis of fusion protein S1-TAT



注: M. 蛋白 Marker; 1. 诱导后 *E. coli* BL21 (DE3) (pGEX-6p-1-S1-TAT) 破碎液上清; 2. 诱导后 *E. coli* BL21 (DE3) (pGEX-6p-1-S1-TAT) 破碎液沉淀

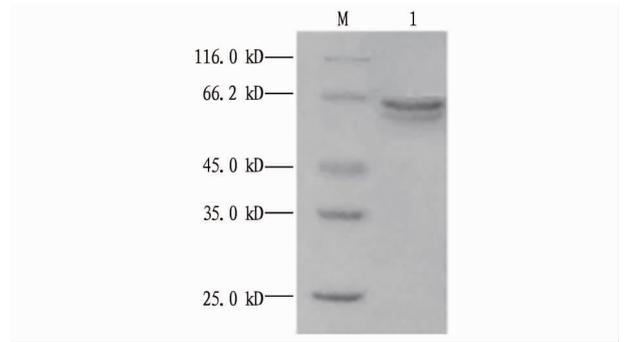
Note: M. Protein Marker; 1. Induced *E. coli* BL21 (DE3) (pGEX-6p-1-S1-TAT) broken liquid supernatant; 2. Induced *E. coli* BL21 (DE3) (pGEX-6p-1-S1-TAT) broken liquid precipitation

图 3 融合蛋白 S1-TAT 的 Western blot 分析

Fig. 3 Western blot analysis of fusion protein S1-TAT

生,且抗体水平上升缓慢,与阴性对照组之间差异极显著 ( $P < 0.01$ ),整个免疫过程中抗体水平低于腹腔注射组。

**2.6 免疫小鼠的黏膜 IgA 抗体水平** 在首次免疫后的第 7、14、21、28、35 和 42 天,采集腹腔注射组和灌胃组免疫小鼠的粪便样品,间接 ELISA 检测肠道黏膜 IgA 抗体。结果显示 (图 6),灌胃组小鼠在免疫 7 d 后,体内产生了较高水平的黏膜 IgA 抗体,与阴性对照组的差异达到极显著 ( $P < 0.01$ )。随着免疫次数的增加,灌胃组黏膜 IgA 抗体在第 35 天上升至最高,免疫后第 42 天抗体略微下降,但仍处于相对较高的



注: M. 预染蛋白 Marker; 1. 纯化后的融合蛋白 S1-TAT

Note: M. Pre-dyed protein Marker; 1. Purified fusion protein S1-TAT

图 4 融合蛋白 S1-TAT 的纯化

Fig. 4 Purification of fusion protein S1-TAT

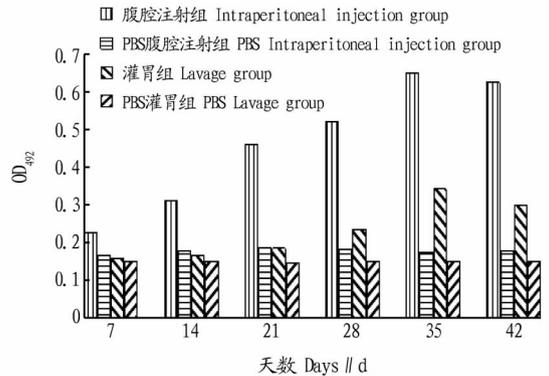


图 5 免疫小鼠血清 IgG 抗体的间接 ELISA 检测

Fig. 5 Indirect ELISA analysis of IgG antibody in murine serum

水平 ( $P < 0.01$ )。而腹腔注射组小鼠在整个免疫过程中,体内的黏膜 IgA 抗体一直处于较低水平。

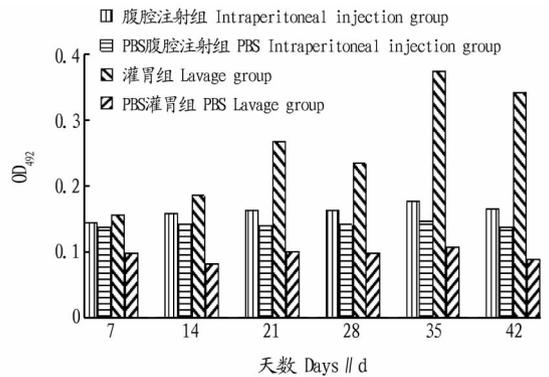


图 6 免疫小鼠黏膜 IgA 抗体的间接 ELISA 检测

Fig. 6 Indirect ELISA analysis of IgA antibody in murine mucosa

**2.7 对小鼠体重的影响** 体重是衡量个体体质状况的重要标志之一,在一定程度上可以反映出小鼠的生长发育水平。首次免疫后间隔 14 d 称量计算小鼠的平均体重,比较各组小鼠的体重变化,结果显示 (图 7),各组之间差异不显著 ( $P > 0.05$ ),表明融合蛋白 S1-TAT 不影响小鼠的体重变化,可以初步评价为比较安全可靠的免疫原。

**2.8 迟发型过敏反应** 小鼠足垫肿胀试验是用于测定动物能否出现迟发型过敏反应及其强度的一种方法<sup>[14]</sup>。由表 1

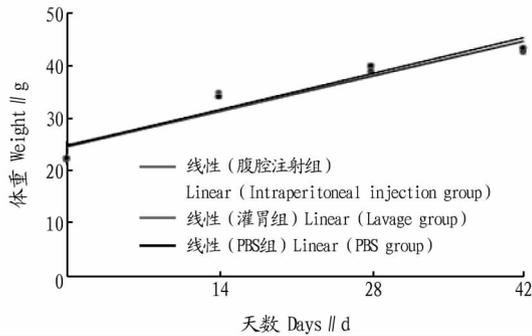


图7 免疫小鼠的体重变化

Fig. 7 The change of bodyweight in murine

可知,昆明小鼠的右后足垫在注射融合蛋白 S1 - TAT 后的 24 h 左右出现轻度红肿,随着时间的延长红肿明显,至 72 h 反应达到高峰。此后,肿胀反应减轻,第 14 天小鼠足垫厚度基本恢复正常。而同一昆明小鼠的左后足垫免疫 PBS 缓冲液后未见足垫肿胀反应。

表1 免疫小鼠足垫肿胀程度

Table 1 The swelling degree in foot pads of murine

时间 Time d	右后足垫 Right rear foot pads	左后足垫 Left rear foot pads
1	+	-
2	+	-
3	++	-
7	+	-
14	-	-

**2.9 融合蛋白 S1 - TAT 的穿肠活性** 取小鼠肠管作为研究融合蛋白 S1 - TAT 穿肠功能的生物膜屏障,检测肠管外环境中融合蛋白 S1 - TAT 的吸光值。结果如图 8 所示,小鼠肠管外融合蛋白 S1 - TAT 在静置 1 h 后开始上升,随着时间的延长,管外的融合蛋白 S1 - TAT 持续上升,在静置 4 h 后达到最大值,5 h 略有下降,与 PBS 对照组之间的差异均达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ),证实 S1 蛋白在 TAT 转导域介导下能够有效地穿过小鼠肠壁细胞。

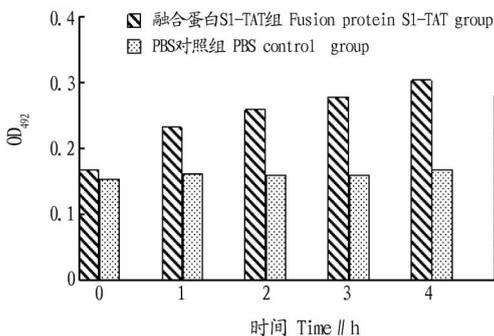


图8 融合蛋白 S1 - TAT 的穿肠活性检测

Fig. 8 The intestinal activity of fusion protein S1-TAT

### 3 讨论

近年来,对如何防治猪传染性胃肠炎病毒的研究越来越多,TGEV S1 基因作为诱导免疫中和反应的核心序列,利用

其翻译的 S1 蛋白制作亚单位疫苗具有良好的可行性。然而,在将 S1 蛋白亚单位疫苗通过注射方式免疫小鼠时,虽然能够诱导机体产生较高水平的血清 IgG 抗体,但 TGEV 主要攻击宿主的肠道组织,肠道黏膜免疫所产生的分泌型 IgA 抗体才是抵抗该病毒的有效抗体,而 IgG 等血清抗体对黏膜感染的病毒免疫保护效果并不理想。相比之下口服免疫作为一种简单可行的免疫接种途径,有着可以诱导产生黏膜 IgA 抗体的优势。但亚单位疫苗本身是蛋白质,在经口服免疫时容易被胃环境中的各种消化酶降解而最终失去免疫原性,且很难穿过肠系膜进入到血液循环中,导致了能够产生有效的黏膜 IgA 抗体的基因工程疫苗依旧缺乏。但有研究发现,在自然界中存在着一类能够安全有效地实现外源生物大分子穿过生物膜结构的蛋白转导域家族,其中研究较多且较为深入的便是 TAT 蛋白转导肽,它的发现为 TGEV 口服亚单位疫苗的研究提供了新的思路。

该研究基于 TGEV S1 基因的诱导中和抗体作用及 TAT 转导肽的跨膜转导特性,首次将 S1 与 TAT 转导肽进行融合,成功构建了重组质粒 pGEX - 6p - 1 - S1 - TAT,并表达与纯化了融合蛋白 S1 - TAT。为了研究融合蛋白 S1 - TAT 经口服和注射小鼠后体内的免疫应答方式,该研究比较了 2 种不同给药方式诱导产生的抗体水平。结果显示,腹腔注射组能够诱导产生较高水平的血清 IgG 抗体,产生速度较快,但其黏膜 IgA 抗体一直处于较低水平;而灌胃组除了可以诱导小鼠产生中等水平的血清 IgG 抗体之外,其黏膜 IgA 抗体水平也是显著高于其他试验组 ( $P < 0.01$ )。以上结果说明融合蛋白 S1 - TAT 经口服或注射小鼠后,能够有效诱导小鼠机体产生体液免疫应答,并且融合蛋白 S1 - TAT 经口服可诱导小鼠机体产生黏膜免疫应答,为口服抗 TGEV 基因工程疫苗的研制提供一定的参考价值。

### 参考文献

- [1] SIRINARUMITR T, KLUGE J P, PAUL P S. Transmissible gastroenteritis virus induced apoptosis in swine testis cell cultures [J]. Arch Virol, 1998, 143(12): 2471 - 2485.
- [2] JIMÉNEZ G, CORREA I, MELGOSA M P, et al. Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization [J]. J Virol, 1986, 60(1): 131 - 139.
- [3] ZHAO Q, ZHU J, ZHU W, et al. A monoclonal antibody against transmissible gastroenteritis virus generated via immunization of a DNA plasmid bearing TGEV S1 gene [J]. Monoclonal antibody immunodiagn immunother, 2013, 32(1): 50 - 54.
- [4] REGUERA J, ORDOÑO D, SANTIAGO C, et al. Antigenic modules in the N-terminal S1 region of the transmissible gastroenteritis virus spike protein [J]. J Gen Virol, 2011, 92(Pt 5): 1117 - 1126.
- [5] TUBOLY T, NAGY É, DENNIS J R, et al. Immunogenicity of the S protein of transmissible gastroenteritis virus expressed in baculovirus [J]. Arch Virol, 199, 137(1/2): 55 - 67.
- [6] DELMAS B, RASSCHAERT D, GODET M, et al. Four major antigenic sites of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus are located on the amino-terminal half of spike glycoprotein S [J]. J Gen Virol, 1990, 71(Pt 6): 1313 - 1323.
- [7] GEBAUER F, POSTHUMUS W P, CORREA I, et al. Residues involved in the antigenic sites of transmissible gastroenteritis coronavirus S glycoprotein [J]. Virology, 1991, 183(1): 225 - 238.
- [8] 任晓峰, 尹杰超, 司微, 等. 猪传染性胃肠炎病毒 TH - 98 株 S 基因核酸疫苗的构建及其免疫效力 [J]. 中国兽医学, 2006, 36(3): 203 - 206.

(下转第 169 页)

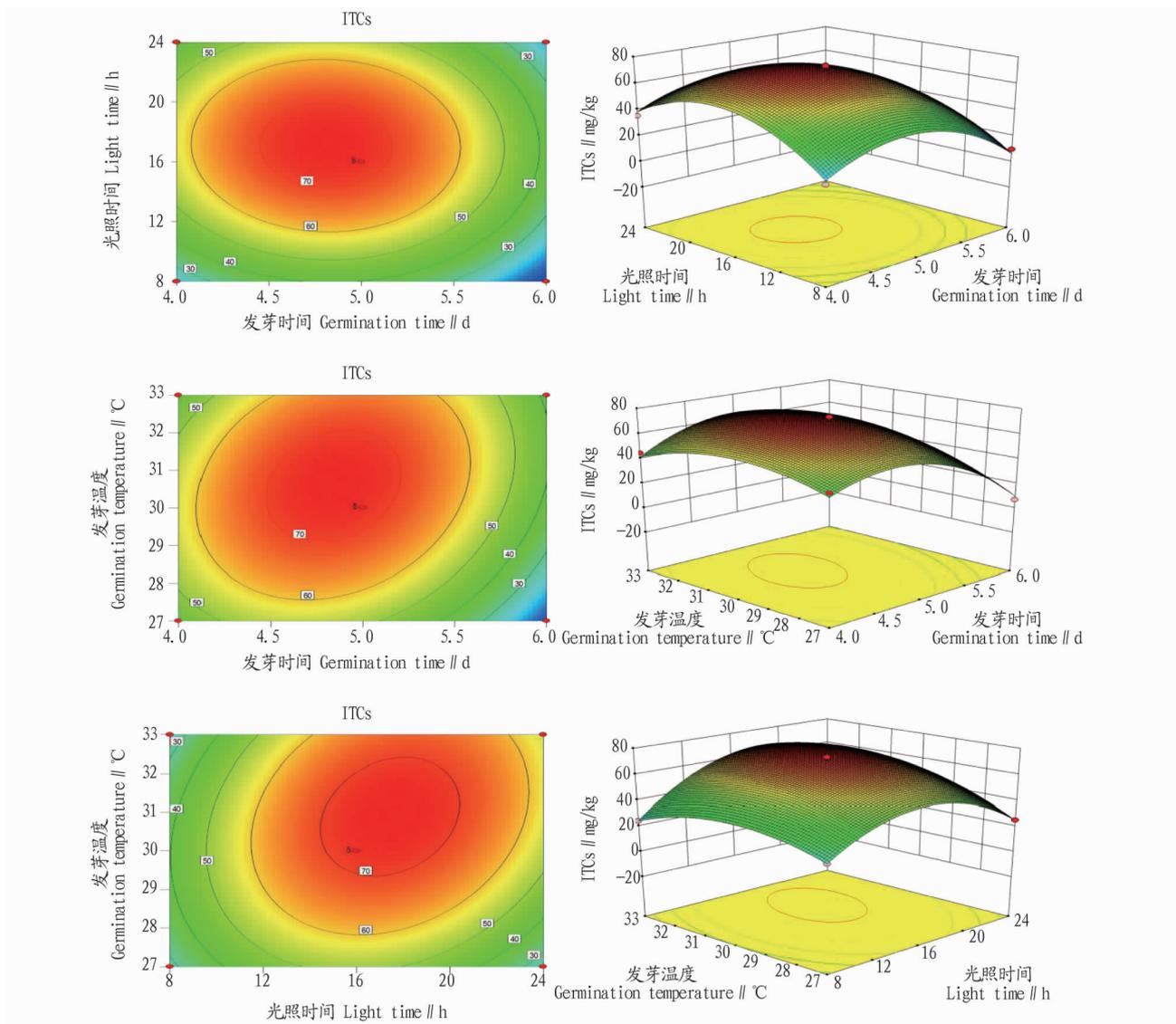


图 2 两因素对芥菜芽苗 ITCs 含量的影响

Fig. 2 Effect of every two factors on ITCs content of germinated mustard

## 参考文献

- [1] 李鲜,陈昆松,张明方. 十字花科植物中硫代葡萄糖苷的研究进展[J]. 园艺学报,2006,33(3):675-679.
- [2] AHN Y H,HWANG Y,LIU H,et al. Electrophilic tuning of the chemoprotective natural product sulforaphane[J]. Proceedings of the national academy of sciences,2010,107(21):9590-9595.
- [3] ROYSTON K J,TOLLEFSBOL T O. The epigenetic impact of cruciferous vegetables on cancer prevention[J]. Current pharmacology reports,2015,1(1):46-51.
- [4] 郭丽萍,王志英,杨润强,等. 西兰花种子发芽过程中生理活性物质含量的变化[J]. 中国食品学报,2016,16(3):160-167.
- [5] LOSSO J N,TRUAX R E. Comparative inhibitory activities of sulforaphane and phenethyl isothiocyanate against leukemia resistant CEM/C2 cancer cells[J]. Journal of functional foods,2009,1(2):229-235.
- [6] 刘佩瑛. 中国芥菜[M]. 北京:中国农业出版社,1996.
- [7] 范永红,沈进娟,董代文. 芥菜类蔬菜产业发展现状及研究前景思考[J]. 农业科学与技术:英文版,2017,18(3):556-564.
- [8] LI R M,SONG D,VRIESEKOP F,et al. Glucoraphenin, sulforaphane, and antiproliferative capacity of radish sprouts in germinating and thermal processes[J]. European food research & technology,2017,243(4):547-554.
- [9] GUO Q H,GUO L P,WANG Z Y,et al. Response surface optimization and identification of isothiocyanates produced from broccoli sprouts[J]. Food chemistry,2013,141(3):1580-1586.
- [10] 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(Pt 2):271-279.
- [11] 杨恒. 猪传染性胃肠炎病毒 DNA 疫苗的构建与免疫原性研究[D]. 雅安:四川农业大学,2009:8-13.
- [12] 艾菁,王丽梅,夏威,等. Tat 蛋白结构与功能的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2005,21(S1):133-135.
- [13] 吴永红,张成岗. HIV-1 TAT 蛋白转导肽的研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2010,30(10):66-73.
- [14] SHEPARD C C,MINAGAWA F,VAN LANDINGHAM R,et al. Foot pad enlargement as a measure of induced immunity to *Mycobacterium leprae* [J]. Int J Lepr Other Mycobact Dis, 1980,48(4):371-381.

(上接第 107 页)