

猪流行性腹泻病毒安徽分离株 N 基因的克隆与表达

潘孝成^{1,2}, 沈学怀^{1,2}, 赵瑞宏^{1,2}, 戴银^{1,2}, 胡晓苗^{1,2}, 侯宏艳^{1,2}, 周学利^{1,2}, 张丹俊^{1,2*}

(1. 安徽省农业科学院畜牧兽医研究所, 安徽合肥 230031; 2. 安徽省畜禽疫病研究中心, 安徽合肥 230031)

摘要 [目的]克隆和表达猪流行性腹泻病毒(PEDV)的 N 基因。[方法]采用 RT-PCR 方法对 PEDV FD 株的 N 基因进行扩增,将扩增产物连接 pET-28B 载体,阳性质粒转入大肠杆菌 BL21 感受态细胞,诱导表达目的蛋白。[结果]PEDV FD 株 N 基因序列全长为 1 326 个核苷酸,编码 441 个氨基酸;重组 N 蛋白为可溶性表达,大小约 58 ku;Western blot 检测结果表明,重组 N 蛋白与 PEDV 抗体阳性血清发生特异性反应。[结论]该试验制备的 PEDV 重组 N 蛋白具有较好的免疫原性,可用于 PEDV 诊断方法的开发及相关研究。

关键词 猪流行性腹泻病毒;N 蛋白;原核表达

中图分类号 S852.65+7 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)17-0091-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.17.026

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

**Cloning and Expression of N Gene of Porcine Epidemic Diarrhea Virus from Anhui Province**

PAN Xiao-cheng^{1,2}, SHEN Xue-huai^{1,2}, ZHAO Rui-hong^{1,2} et al (1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230031; 2. Livestock and Poultry Epidemic Diseases Research Center of Anhui Province, Hefei, Anhui 230031)

Abstract [Objective] To clone and express the N gene of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). [Method] N gene of PEDV FD strain was amplified by RT-PCR and clone into pET-28B vector, the positive plasmid was transformed into BL21 competent cell of *Escherichia coli* to express N protein under IPTG induction. [Result] N gene of PEDV FD strain contained 1 326 nucleotides in whole length, encoding 441 amino acids. The expressed recombinant N protein was soluble and it was about 58 ku. Western-blot detection results showed that the N protein and PEDV positive sera reacted specifically. [Conclusion] The recombinant N protein of PEDV had a good immunogenicity, which could be used for the diagnosis method development and research of PEDV.

Key words Porcine epidemic diarrhea virus; N protein; Prokaryotic expression

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的一种以腹泻、脱水和呕吐为特征的传染病,尤其以哺乳仔猪受害最严重,发病率可达 100%,平均病死率为 50%,10 日龄内哺乳仔猪死亡率可高达 90%,成年猪一般无死亡^[1]。PEDV 属于冠状病毒科冠状病毒属,为有囊膜的、不分节段的、单股正链 RNA 病毒,基因组全长约 28 kb,编码有纤突(spike, S)蛋白、小膜(small envelope, E)蛋白、膜(membrane, M)蛋白和核衣壳(nucleocapsid, N)蛋白 4 种主要结构蛋白^[2]。PEDV 的 N 蛋白由 441 个氨基酸组成,主要参与病毒的复制以及诱导特异性免疫反应的产生,而且在 PEDV 感染早期宿主能够产生针对 N 蛋白的高水平抗体,因而利用 N 蛋白建立 PEDV 诊断技术具有很好的应用前景^[3-6]。笔者对 PEDV FD 株的 N 基因进行克隆,原核表达并纯化其 N 蛋白,旨在为进一步建立 PEDV 的诊断方法提供基础和依据。

1 材料与方

1.1 病毒 PEDV FD 株从安徽省肥东县某发生猪流行性腹泻病猪场的仔猪小肠黏膜中分离,由安徽省农业科学院畜牧兽医研究所兽医研究室鉴定和保存。

1.2 主要试剂与菌株 RNAiso Plus 试剂、反转录试剂盒(M-MLV)、限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、dNTP、IPTG 和 X-gal、pET-28B 载体等均购自 TaKaRa 公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒、*E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3)、DNA Marker、蛋白 Marker 等购自生工生物工程(上海)股份有限公司;其他常用试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 PEDV N 基因的扩增

1.3.1 引物合成。根据 GenBank 数据库已发表的 PEDV N 基因序列,设计了 1 对引物, P₁(NdeI 酶切位点)为 5'-CTAGCTAGCATGGCTTCTGTCAGCTTTCAGG-3', P₂(XhoI 酶切位点):5'-CCGCTCGAGCCTGTATCGAAGATCTCGTTG-3',由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,扩增 1 326 bp 基因片段,包含 PEDV N 基因全长。

1.3.2 RNA 提取及 cDNA 合成。PEDV FD 株细胞培养液 200 μ L,按 TaKaRa 公司 RNAiso Plus 试剂盒说明书提取总 RNA,使用 TaKaRa 公司 1st Strand cDNA 合成试剂盒进行反转录,合成 cDNA, -20 $^{\circ}$ C 下保存备用。

1.3.3 PCR 扩增和测序。以合成的 cDNA 为模板,利用引物对 P₁/P₂ 进行 PCR 扩增,PCR 扩增体系如下:cDNA 3 μ L、10 \times PCR buffer 2.5 μ L、dNTPs(2.5 mmol/L)2 μ L、上下游引物各 1 μ L(10 pmol/ μ L)、Ex-Taq 酶 0.5 μ L、ddH₂O 15 μ L;PCR 扩增程序如下:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,50 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,31 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 下保存。电泳鉴定为阳性的 PCR 产物,使用 NdeI 和 XhoI 酶切回收 PCR 产物,将酶切产物连接 pET-28B 载体,转入 DH5 α 感受态细

基金项目 安徽省科技重点研发项目(1704a07020066);安徽省农业科学院平台项目(2019YL065);安徽省农业科学院创新团队项目(13C0405);安徽省生猪产业技术体系项目(AHCYTX-05-09);安徽省科技重大专项(17030701008)。

作者简介 潘孝成(1971—),男,安徽霍邱人,助理研究员,博士,从事畜禽传染病研究。*通信作者,研究员,从事畜禽传染病研究。

收稿日期 2019-06-18

胞,挑取单菌落进行培养后提取重组质粒,进行酶切鉴定,将阳性克隆送交生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.4 PEDV N基因的原核表达

1.4.1 重组质粒的诱导表达。将阳性质粒转入 *E. coli* BL21 (DE3)感受态细胞,涂布于含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡培养过夜。挑取单克隆菌落接种到含卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 220 r/min,培养至 OD_{600} 为 0.4~0.6,加入 IPTG 使终浓度为 0.5 mmol/L,15 $^{\circ}\text{C}$ 160~170 r/min,继续培养 24 h。

收集经 IPTG 诱导后的菌液和未经 IPTG 诱导的菌液各 1 mL,10 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 高速离心 2 min,弃去上清液,加入 50 μL PBS 后轻轻摇晃离心管,重悬管内沉淀,并加入 50 μL 2 \times 蛋白电泳 Loading Buffer,在冰浴中用超声波裂解菌体。将超声波裂解后的液体加入相同体积的 5 \times 上样缓冲液,混合均匀后沸水煮浴 10 min,经 12 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 高速离心 2 min,取 10 μL 样品进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.4.2 蛋白表达形式分析及纯化。将经 IPTG 诱导表达后的菌液超声波裂解,经 12 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 高速离心 2 min 后,分别收集上清和沉淀,并将收集到的上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳。大量诱导菌液 500 mL,经超声波裂解后收集上清,参照蛋白纯化说明书操作步骤对收集的上清过镍柱纯化。

1.4.3 重组蛋白的 Western blot 检测分析。蛋白经 SDS-PAGE 电泳、转膜封闭后,用含 5%脱脂奶粉的 PBST 作为转膜封闭液,4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜;将封闭好的 NC 膜浸泡入 200 倍稀释的 PEDV 阳性血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;用 PBST 充分洗涤 NC 膜,然后浸入用 PBST 5 000 倍稀释的羊抗猪 IgG-HRP 中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;PBST 充分洗涤后,加入 AEC 显色 10 min,ddH₂O 冲洗终止反应。

2 结果与分析

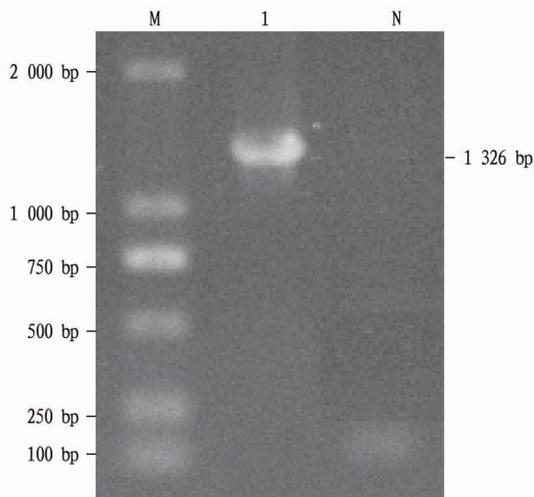
2.1 PEDV N 基因的扩增和测序 以提取的 RNA 为模板,合成 cDNA,用合成的 cDNA 和引物对 P₁/P₂ 进行 PCR 扩增。电泳结果显示,扩增的基因片段大小约 1 300 bp(图 1),与预期结果相符。测序结果表明,PEDV FD 株 N 基因序列全长为 1 326 个核苷酸,编码 441 个氨基酸。

2.2 表达产物的 SDS-PAGE 鉴定 将收集的诱导后菌液和未诱导的菌液处理后进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果如图 2 所示,经 IPTG 诱导后的菌液有一条大约 58 ku 的蛋白条带,与目标条带相符,而未经诱导的重组菌未见相应蛋白条带。

2.3 重组蛋白的表达分析和纯化 将经过 IPTG 诱导表达后的菌液超声波裂解,12 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 高速离心 2 min 后,分别收集上清液和沉淀,并将收集到的上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,可以看出上清液和沉淀均有一条分子量 58 ku 左右的条带,且目的蛋白主要在上清液中,表明重组蛋白为可溶性表达;经镍柱纯化,获得单一目的条带,具体见图 3。

2.4 重组蛋白的 Western blot 检测结果 将过镍柱纯化后

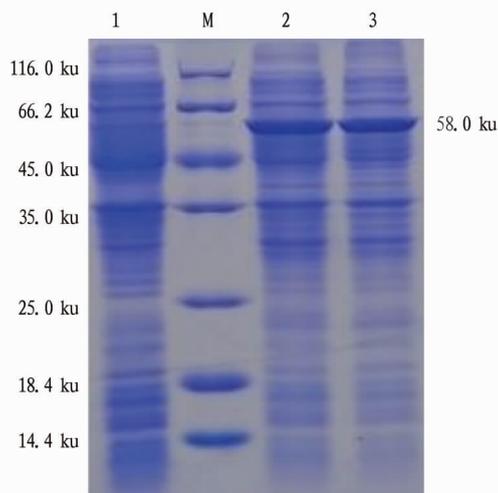
的重组 N 蛋白经 Western blot 分析,结果显示在 58 ku 处出现清晰的反应条带,而阴性对照无反应条带,表明重组 N 蛋白与 PEDV 抗体阳性血清发生特异性反应(图 4)。



注:N 为阴性对照;M 为 D2000 Marker;1 为 P₁/P₂ 引物扩增产物
Note:N. Negative control;M. D2000 Marker;1. P₁/P₂ primer's amplification product

图 1 PEDV N 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of N gene of PEDV



注:M. 蛋白质分子质量标准;1. 重组菌诱导前表达产物;2~3. 重组菌诱导后表达产物

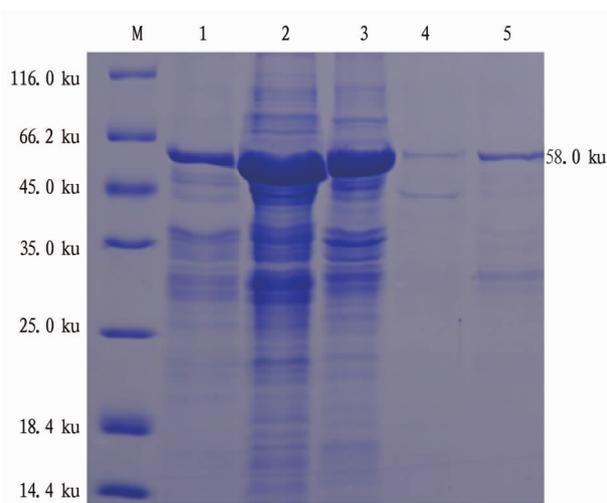
Note: M. The molecular mass standard of protein; 1. The expression product before the induction of recombinant bacteria; 2~3. The expression product after induction by recombinant bacteria

图 2 表达产物的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 2 The results of the expressed product by using SDS-PAGE

3 讨论

猪流行性腹泻病于 1971 年首次发现于英国^[7],我国内地自 20 世纪 80 年代初以来陆续有关于 PEDV 分离和鉴定的报道^[8]。从 2010 年末开始,我国东南沿海地区率先暴发以新生仔猪严重腹泻、高发病率及高死亡率为主要特征的腹泻疫情,哺乳仔猪的死亡率可达 100%,疫情随后扩散至其他各地,给我国养猪业造成了严重的经济损失^[9]。2013 年美国

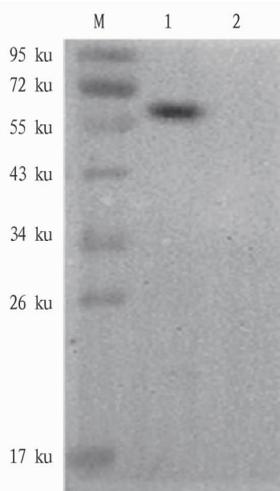


注: M. 蛋白质分子质量标准; 1. 沉淀样; 2. 上清样; 3. 第 1 次清洗样; 4. 第 2 次清洗样; 5. 纯化的 N 蛋白

Note: M. The molecular mass standard of protein; 1. The precipitation sample; 2. The supernatant sample; 3. The first cleaning sample; 4. The second cleaning sample; 5. The purified N protein

图 3 重组蛋白的表达分析和纯化

Fig. 3 Expression analysis and purification of the recombinant protein



注: M. 蛋白质分子质量标准; 1. 纯化后重组蛋白; 2. 阴性对照

Note: M. The molecular mass standard of protein ; 1. The purified recombinant protein; 2. The negative control

图 4 重组蛋白的 Western blot 分析

Fig. 4 Western blot analysis of the recombinant protein

也开始暴发仔猪腹泻疫情,随后墨西哥、加拿大、韩国以及日本等国家和我国台湾地区^[10]也相继暴发具有新流行特点的仔猪腹泻疫情。研究表明,此次全球范围内 PED 暴发与 PEDV 的新变异毒株有关^[11-12]。目前,猪流行性腹泻病的发生在我国呈现常态化^[13],是威胁养猪生产的重要疫病之一,需要给予高度关注。

猪流行性腹泻病毒的 N 蛋白由 441 个氨基酸组成,分子量大小为 55~58 ku,在同属病毒之间的同源性较低,但在同种病毒间具有高度保守性,主要参与病毒的复制以及诱导特异性免疫反应的产生,可作为早期快速检测 PEDV 感染的一个重要指标^[3]。该研究对 PEDV FD 株的 N 基因进行了克隆与原核表达,结果显示重组 N 蛋白为可溶性表达;Western blot 检测结果表明,纯化重组 N 蛋白与 PEDV 抗体阳性血清发生特异性反应,表明 PEDV 重组 N 蛋白具有较好的免疫原性。该研究结果为开发 PED 诊断方法和相关研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 殷霞,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997:688-689.
- [2] LEE C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus[J]. *Virology*, 2015, 12: 1-16.
- [3] 吴玉璐,朱建平,杨莘,等. 猪流行性腹泻病毒 N 基因的表达及抗原性分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2013, 35(4): 299-303.
- [4] LEE H K, YEO S G. Cloning and sequence analysis of the nucleocapsid gene of porcine epidemic diarrhea virus Chinju99[J]. *Virus genes*, 2003, 26(2): 207-212.
- [5] COLOGNA R, SPAGNOLO J F, HOGUE B G. Identification of nucleocapsid binding sites within coronavirus-defective genomes[J]. *Virology*, 2000, 277: 235-249.
- [6] RODÁK L, VALÍČEK L, ŠMÍD B, et al. An ELISA optimized for porcine epidemic diarrhoea virus detection in faeces[J]. *Vet Microbiol*, 2005, 105(1): 9-17.
- [7] PENSART M B, DE BOUCK P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine[J]. *Arch Virol*, 1978, 58(3): 243-247.
- [8] 蔡宝祥. 介绍几种新近发现的猪传染病[J]. *畜牧与兽医*, 1982(5): 218-221.
- [9] 刘孝珍, 陈建飞, 时洪艳, 等. 2011 年猪流行性腹泻病毒的遗传变异分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2012, 34(3): 180-183.
- [10] 翁善钢. 2014 年国际猪病疫情回顾: 猪流行性腹泻在全球的流行与传播[J]. *肉类工业*, 2015(2): 49-50.
- [11] CHEN X, YANG J X, YU F S, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field strains in south China[J]. *Virus genes*, 2012, 45(1): 181-185.
- [12] HUANG Y W, DICKERMAN A W, PIÑEYRO P, et al. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States[J]. *mBio*, 2013, 4(5): 1-8.
- [13] 杨汉春, 周磊. 2018 年猪病流行情况与 2019 年流行趋势及防控对策[J]. *猪业科学*, 2019, 36(2): 38-40.