

研究报告

## ORF3 蛋白促进猪流行性腹泻病毒在 Vero 细胞上的增殖

胡晓霞<sup>1,2,3</sup> 于瑞嵩<sup>1,3</sup> 司伏生<sup>1,3</sup> 陈冰清<sup>1,3</sup> 董世娟<sup>1,3</sup> 宋增福<sup>2</sup> 李震<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 上海市农业科学院畜牧兽医研究所 上海 201106)

(2. 水产科学国家级实验教学示范中心(上海海洋大学) 上海 201306)

(3. 上海农业遗传育种重点实验室 上海 201106)

**摘要:**【背景】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)感染猪而引起的一种急性肠道传染病,常导致病猪水样腹泻、呕吐、脱水。自2010年起,其大规模的暴发给养猪业造成巨大的经济损失。由于对PEDV免疫机理及侵入机制知之甚少,至今仍缺乏有效的PED防治措施。【目的】研究 $orf3$ 对PEDV体外增殖的影响。【方法】利用基于RNA同源重组的PEDV反向遗传学操作技术拯救一系列携带不同 $orf3$ 基因及 $orf3$ 基因缺失的重组PEDV;将获得的重组PEDV以MOI 0.1感染Vero细胞,分别于感染的第8、16、24、32、40、48 h测定其TCID<sub>50</sub>并绘制病毒生长曲线;分别在感染25 h和36 h利用全自动细胞计数分析仪对6孔板内的细胞进行计数,并于感染后的第12、24、36、48 h用CCK-8试剂盒对其细胞活力进行测定。【结果】RT-PCR结果及细胞病变观察证明成功拯救到了携带不同 $orf3$ 基因或 $orf3$ 基因缺失的重组PEDV;进一步的免疫组化分析结果证实PEDV的ORF3蛋白可以在Vero细胞中合成。SPSS软件分析表明携带 $orf3$ 基因的重组PEDV的滴度(TCID<sub>50</sub>)显著高于缺失 $orf3$ 基因的重组PEDV的滴度;带有 $orf3$ 基因的重组PEDV感染Vero细胞25 h和36 h时的活细胞数显著高于缺失 $orf3$ 基因的重组病毒感染相同时间时的活细胞数;而且重组PEDV感染Vero细胞24 h后,带有 $orf3$ 基因的重组PEDV的细胞活性显著高于缺失 $orf3$ 基因的重组病毒。【结论】ORF3蛋白对于PEDV在Vero细胞中的增殖具有促进作用,该作用是通过延缓或减少感染细胞的死亡实现的。本研究为揭示PEDV  $orf3$ 基因的功能和PEDV复制机制的研究提供理论基础。

**关键词:**  $orf3$ , 猪流行性腹泻病毒, 体外增殖

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31572519, 31402219); International Science and Technology Cooperation Program of China (2013DFG32370); National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500101); Shanghai Key Project on Agricultural Development (2015-6-1-9)

\*Corresponding author: Tel: 86-21-62206391; E-mail: zhenli60@163.com

Received: December 12, 2017; Accepted: April 19, 2018; Published online (www.cnki.net): May 11, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(31572519, 31402219); 科技部国际合作专项(2013DFG32370); 国家重点研发计划(2016YFD0500101); 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字(2015)第6-1-9号)

\*通信作者: Tel: 86-21-62206391; E-mail: zhenli60@163.com

收稿日期: 2017-12-12; 接受日期: 2018-04-19; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-05-11

## ORF3 protein promotes the proliferation of porcine epidemic diarrhea virus on Vero cells

HU Xiao-Xia<sup>1,2,3</sup> YU Rui-Song<sup>1,3</sup> SI Fu-Sheng<sup>1,3</sup> CHEN Bing-Qing<sup>1,3</sup>  
DONG Shi-Juan<sup>1,3</sup> SONG Zeng-Fu<sup>2</sup> LI Zhen<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

(2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education (Shanghai Ocean University), Shanghai 201306, China)

(3. Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China)

**Abstract:** [Background] Porcine epidemic diarrhea (PED) caused by porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) is an acute intestinal infectious disease of pigs that is characterized by diarrhea, vomiting, and dehydration. Its massive outbreak has caused huge losses to the pig industry since 2010. Due to the poor understanding of the immune mechanism and invasion mechanism of PEDV, there is still no effective prevention and treatment about PED. [Objective] The main aim of this study is to explore the effects of ORF3 protein on the proliferation of PEDV *in vitro*. [Methods] Recombinant PEDV DR13 (attenuated) strains with *orf3* genes from different origins or without *orf3* gene were rescued by using reverse genetics operating system based on targeted RNA recombination. Then the Vero cells were infected with the acquired recombinant PEDV strains at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1. The viral titers (TCID<sub>50</sub>) at 8, 16, 24, 32, 40, 48 hours post infection (hpi) were measured and the growth curve of each recombinant PEDV was drawn. The intact cells at 25 and 36 hpi were counted by using an automatic cell counting analyzer. Meanwhile, the cell viability were measured at 12, 24, 36, 48 hpi using Cell Counting Kit-8. [Results] Successful rescue of recombinant PEDV strains with or without *orf3* was verified by using RT-PCR and observing the cytopathic effect (CPE). The results of immunohistochemistry assay indicated that *orf3* gene of recombinant PEDV was expressed in Vero cells. The viral titers of recombinant PEDV strains with *orf3* gene were significantly higher than that without *orf3* gene. Furthermore, the statistical analysis results using SPSS showed that the numbers of intact cells left in the flasks infected with the recombinant PEDV strain with *orf3* gene at both 25 and 36 hpi were significantly higher than that infected with the strain without *orf3* gene and viability of the cells infected by recombinant PEDV strain with *orf3* gene were significantly higher at 24, 36 and 48 hpi than that infected with the strain without *orf3* gene. [Conclusion] PEDV ORF3 protein promotes the proliferation of PEDV on Vero cells, the mechanism of which might be the time delay of death of infected cells by the ORF3 protein. These results provided information on the function of PEDV *orf3* gene and were helpful in understanding the replication mechanisms of PEDV.

**Keywords:** *orf3*, Porcine epidemic diarrhea virus, Proliferation *in vitro*

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)感染猪而引起的一种急性接触性肠道传染病,常导致病猪水样腹泻、呕吐、脱水、消化道粘膜发炎、出血及糜烂。不同年龄和不同品种的猪都会感染,1-2周龄哺乳仔猪更容易感染,其发病率和死亡率高达100%<sup>[1-2]</sup>。自从1971年英国首次报道PEDV以来,相继在比利时、德国、加拿大、

日本、瑞士等多个国家均有此病发生的报道<sup>[3-4]</sup>,中国从1976年开始陆续有PEDV的报道<sup>[5]</sup>。自20世纪90年代后期,随着PED疫苗的广泛使用,疫情得到有效控制<sup>[6]</sup>。从2010年起,PED再次在国内外养猪场大规模暴发,给养猪业造成了重大经济损失。目前PED在世界范围内仍呈广泛流行趋势,由于对PEDV免疫机理及侵入机制知之甚少,至今仍缺乏有效的PED防治措施。

*orf3* 位于 PEDV 的 *s* 基因和 *e* 基因之间的第 3 阅读框, 是目前被发现的 PEDV 的唯一一个附属基因, 编码附属蛋白 ORF3。研究者对其他冠状病毒的附属基因及编码蛋白的功能开展了较为详细的研究, 如 Müller 等<sup>[7]</sup>研究发现 HCoV-NL63 的 ORF3 蛋白是与 ERGIC 中的结构蛋白共定位的糖基化蛋白, ORF3 蛋白被整合进病毒粒子中参与病毒粒子的组装; Lu 等<sup>[8]</sup>证明 SARS-CoV *orf3* 编码一种形成离子通道并调节病毒释放的新型结构蛋白 3a; Kint 等<sup>[9]</sup>研究表明 IBV ORF3a 蛋白对其抗 I 型干扰素的功能至关重要。但对于 PEDV *orf3* 基因及其编码蛋白功能的研究处于起步阶段, 目前认为 ORF3 蛋白与病毒的毒力有关<sup>[10-12]</sup>, 但不同研究者的研究结论仍存在争议。

本研究采用本实验室建立的基于靶向 RNA 重组技术的 PEDV 反向遗传学操作技术<sup>[13]</sup>, 以 PEDV DR13 弱毒株(GenBank 登录号 JQ023162)为骨架, 拯救了携带不同 *orf3* 基因及 *orf3* 基因缺失的重组 PEDV, 检测这些重组病毒在细胞上的增殖能力, 并绘制重组病毒在 Vero 细胞上的生长曲线, 同时对不同重组病毒感染细胞一定时间后残留的完整细胞数量进行计数, 并对感染后的细胞活力进行测定, 以此探究 ORF3 蛋白对 PEDV 体外增殖的影响以及可能的作用机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞、质粒与毒株

非洲绿猴肾细胞(Vero)和小鼠成纤维细胞(LR7), PEDV DR13 弱毒株(GenBank 登录号 JQ023162), mPEDV [以鼠肝炎病毒(MHV)的 *s* 基因替换 PEDV DR13 弱毒株的 *s* 基因], *orf3* 基因被 PEDV DR13 强毒株 *orf3* 基因替换的重组 PEDV rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>wt</sup> 和重组质粒 pDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>wt</sup>, 均为本实验室保存。

### 1.2 主要试剂和仪器

DNA 胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒、AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒, 康宁生命科学有限公司; TOP10 感受态细胞, 天根生化科技(北京)有限公司; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、酶标

仪、mMESSAGE mMACHINE<sup>TM</sup>T7 转录试剂盒, Thermo Scientific 公司; 反转录酶 M-MLV Reverse transcriptase、M-MLV-5×Reaction buffer、dNTP Mix、Ribonuclease inhibitor, Promega 公司; TRIzol 总 RNA 提取试剂盒, Invitrogen 公司; CCK-8 试剂盒, 上海翊圣生物科技有限公司。凝胶图像分析系统, UVItec 公司; 全自动细胞计数分析仪, Nexcelom 公司。

### 1.3 RNA 提取及 cDNA 的合成

病毒 RNA 提取使用 AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒; 粪便中的病毒 RNA 提取使用 Invitrogen 公司的 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒。

以病毒 RNA 为模板反转录合成 cDNA。反应过程: RNA (9 μL)与 PCR 下游引物(1 μL)混匀; 70 °C 5 min, 冰上放置 2 min, 依次添加 M-MLV-5×Reaction buffer 5 μL、200 μmol/L dNTP mix 1.5 μL, Ribonuclease inhibitor 0.5 μL、M-MLV Reverse transcriptase 1 μL、DEPC 水 6 μL, 混匀后简短离心; 42 °C 1 h; 70 °C 10 min; 即得 cDNA。cDNA 立即使用或-80 °C 保存备用。

### 1.4 重组质粒的构建

以 pDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>wt</sup> 为模板, 用引物 4 和引物 5 (表 1) PCR 扩增基因片段 S-E1。反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 20 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。以 CV777 (GenBank 登录号 AF353511) RNA 为模板反转录合成 cDNA, 并以其为模板, 以引物 1 和 2 (表 1) PCR 扩增 ORF3<sup>CV777</sup>。反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 43 s, 25 个循环; 72 °C 10 min。以某猪场采集的病猪粪便 RNA 为模板合成 cDNA, 并以其为模板, 以引物 1 和 2 (表 1) PCR 扩增目的基因片段 ORF3<sup>NY</sup>。反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 43 s, 25 个循环; 72 °C 10 min。用 *Eco72* I 和 *BshT* I 双酶切 PCR 产物和重组质粒 pDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>wt</sup>, 连接并转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞得到重组质粒 pDR13<sup>att</sup>-ΔORF3、pDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>CV777</sup> 和 pDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>NY</sup>, 重组质粒进行酶切及测序验证。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

引物 Primer	位置 Location <sup>a</sup>	序列 Sequence (5'→3')	PCR 产物 PCR product
1	24 737–24 786	TGAAAAGGTCCACGTGCAGTGATGTTTCTTGGACTIONTTTC AATACACGAT	ORF3 <sup>wt</sup>
2	25 363–25 412	AAAGTATGACATTAAGTCTAGACCATTATCATTCACTAAT TGTAGCATA	ORF3 <sup>CV777</sup>
3	24 608–24 628	TCTCATCTTTGTTGTGTGCATT	ORF3 <sup>NY</sup>
4	25 480–25 500	ATAGGTGTGTAAACTGCGCTA	S-E2
5	24 726–25 378	TACGAAGCTTTTGAAAAGGTCCACGTGCAGTGAACCTCAA TTCAACTAGACGAGTATGCTACAATTAGTG	S-E1

注: <sup>a</sup>: 引物的位置参考 PEDV DR13 毒株(GenBank 登录号 JQ023162)的全长基因组序列。

Note: <sup>a</sup>: The location of primers is relative to the full genome sequence of the PEDV DR13 strain (GenBank accession number JQ023162).

## 1.5 重组病毒的拯救

重组病毒的拯救参照 Li 等<sup>[13]</sup>进行, 将重组质粒进行线性化并用 mMESSAGE mMACHINE<sup>TM</sup>T7 转录试剂盒转录 RNA, -80 °C 保存备用。mPEDV 感染 LR7 细胞 24 h, 待出现 90% CPE 时将转录后的 RNA 通过电穿孔的方法转染 LR7 细胞, 并将转染后的 LR7 细胞铺到 Vero 细胞上于 37 °C 细胞培养箱中培养, 观察重组病毒在 Vero 细胞上的病变情况; 以终末稀释法纯化得到的重组病毒并通过 RT-PCR、测序验证; 参照 Karber 法测定病毒的 TCID<sub>50</sub> (50% Tissue culture infective dose)。

## 1.6 重组病毒的鉴定

### 1.6.1 RT-PCR

以 rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>wt</sup>、rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>NY</sup>、rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>CV777</sup> 的 RNA 为模板, 利用引物 2 (表 1) 反转录合成 cDNA, 以合成的 cDNA 为模板, 利用引物 1 和引物 2 (表 1) PCR 扩增 *orf3* 基因并测序验证; 重组病毒 rDR13<sup>att</sup>-ΔORF3 鉴定以引物 5 (表 1) 反转录合成 cDNA, 以合成的 cDNA 为模板, 利用引物 3 和引物 4 及引物 4 和引物 5 (表 1) PCR 扩增 S-E1 和 S-E2 片段并测序验证。

### 1.6.2 免疫组化(Immunohistochemistry, IHC)

Vero 细胞以 2×10<sup>5</sup> 个/mL 的细胞密度接种于 24 孔细胞培养板, CO<sub>2</sub> 培养箱 37 °C 培养 24 h; 重组病毒以 MOI 为 0.1 感染 Vero 细胞, 37 °C 吸附 1 h 后, 弃病毒接种液, PBS 洗 2 次, 每孔加入 3 mL

DMEM 培养液继续培养 18 h 后免疫组化分析。具体步骤: PBS 洗 2 次, 以 3.7% 多聚甲醛固定 15 min; PBS 洗 3 次, 每孔加入 200 μL 0.1% TritonX-100, 15 min 后弃 0.1% TritonX-100, 以封闭液(5% 羊血清)洗 1 次, 每孔加入 200 μL 封闭液室温封闭 1 h; 以免抗 ORF3 多抗为一抗(1:50)室温孵育 1 h, 用含 0.1% Tween-20 的 PBS 洗 3 次; 以 HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗(1:200)孵育 40 min, PBST 洗 3 次; 用 DAB 显色液显色 5–8 min; 弃显色液, 每孔加入 200 μL PBS 终止反应, 显微镜下观察、拍照。

## 1.7 病毒生长曲线的绘制及细胞计数

Vero 细胞以 2×10<sup>5</sup> 个/mL 的细胞密度接种于 6 孔细胞培养板, CO<sub>2</sub> 培养箱 37 °C 培养 24 h; 重组病毒以 MOI 为 0.1 感染 Vero 细胞; 37 °C 吸附 1 h 后, 弃病毒接种液, PBS 洗 2 次, 每孔加入 3 mL DMEM 培养液; 在不同时间点终止感染并取样分别做病毒生长曲线和细胞计数。病毒生长曲线样品处理: 6 孔细胞培养板反复冻融 3 次后收集各孔的病毒液及细胞, 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 取上清, -20 °C 冻存, 测定 TCID<sub>50</sub>。细胞计数样品处理: PBS 洗 2 次, 0.5 mL 胰酶消化 1 min, 0.5 mL 重悬, 全自动细胞计数分析仪计数。

## 1.8 病毒感染 Vero 细胞后细胞活力的测定

Vero 细胞以 2×10<sup>5</sup> 个/mL 的细胞密度接种于 96 孔板, CO<sub>2</sub> 培养箱 37 °C 培养 24 h; 重组病毒以

MOI 为 0.1 感染 Vero 细胞, 以只有细胞的孔为阴性对照, 即为 A(0 加药); 只有培养基溶液的孔为空白对照, 即为 A(空白), 试验组和对照组各 6 个重复孔; 37 °C 培养一段时间后, 向每孔内加 10  $\mu$ L CCK-8 溶液; 37 °C 孵育 1 h 后用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。细胞活力按如下所示公式计算:

$$\text{细胞活力}(\%) = \frac{A(\text{加药}) - A(\text{空白})}{A(0 \text{ 加药}) - A(\text{空白})} \times 100;$$

A(加药): 具有细胞、CCK8 溶液和药物溶液孔的吸光度;

A(空白): 具有培养基和 CCK8 溶液而没有细胞孔的吸光度;

A(0 加药): 具有细胞、CCK8 溶液而没有药物溶液孔的吸光度。

### 1.9 数据分析

生长曲线及细胞计数每个试验重复 3 次, 取平均值。采用 SPSS 17.0 对所得数据统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 S-E1、ORF3<sup>CV777</sup>、ORF3<sup>NY</sup> 的扩增及重组质粒的鉴定

为了构建携带不同 *orf3* 基因或 *orf3* 基因缺失的重组质粒并利用基于 RNA 同源重组的 PEDV 反向

遗传学技术拯救携带不同 *orf3* 基因或 *orf3* 基因缺失的重组 PEDV 毒株, 首先通过 PCR 扩增得到了 191 bp 的 S-E1 片段和 725 bp 的 ORF3<sup>CV777</sup> 和 ORF3<sup>NY</sup> 基因(图 1A); 测序结果表明得到了正确的目的 DNA 片段。用 *Eco72* I 和 *BshT* I 双酶切鉴定构建的重组质粒 pDR13<sup>att</sup>- $\Delta$ ORF3、pDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>wt</sup>、pDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>NY</sup>、pDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>CV777</sup>, 酶切后 pDR13<sup>att</sup>- $\Delta$ ORF3 可以得到 130 bp 左右的 DNA 条带; 另外 3 个质粒可以得到 770 bp 左右的 *orf3* 基因片段(图 1B); 重组质粒测序结果也证实其序列正确。

### 2.2 重组病毒拯救及鉴定

将构建成功的重组质粒 pDR13<sup>att</sup>- $\Delta$ ORF3、pDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>NY</sup>、pDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>CV777</sup> 体外转录成 RNA 并电转至 mPEDV 感染的 LR7 细胞, 在 Vero 细胞上筛选重组 PEDV, 分别在电转后的第 60、52、52 h 观察到 Vero 细胞上病变产生。以终末稀释法纯化得到的重组病毒, 在 Vero 细胞上有 CPE 出现(图 2)。

采用 RT-PCR 对所拯救的重组病毒进行鉴定, 结果如图 3 所示。重组病毒 rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>wt</sup>、rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>NY</sup>、rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>CV777</sup> 可以扩增出

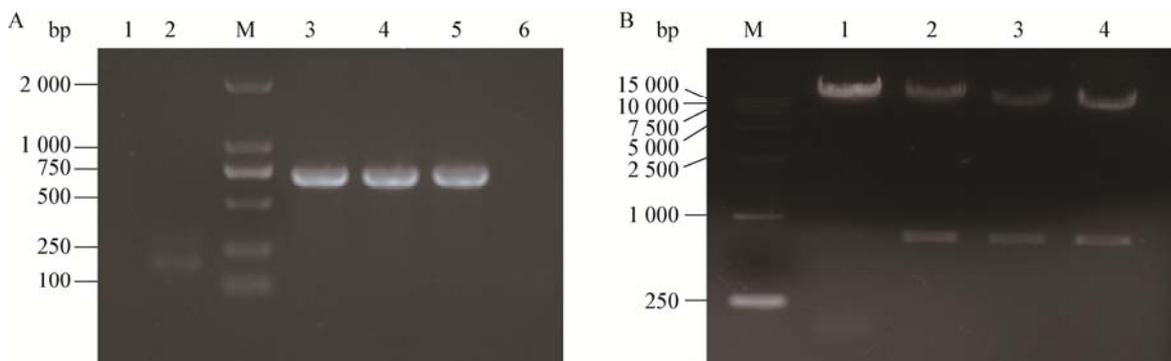


图 1 S-E1、ORF3<sup>CV777</sup>、ORF3<sup>NY</sup> 的 PCR 扩增(A)及重组质粒的鉴定(B)

Figure 1 PCR amplification of S-E1, ORF3<sup>CV777</sup> and ORF3<sup>NY</sup> (A) and confirmation of recombinant plasmids by digestion with restriction enzymes (B)

注: A: M: DL2000 marker; 1、6: 阴性对照; 2: S-E1; 3: ORF3<sup>wt</sup>; 4: ORF3<sup>CV777</sup>; 5: ORF3<sup>NY</sup>. B: M: DL15000 marker; 1: pDR13<sup>att</sup>- $\Delta$ ORF3; 2: pDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>wt</sup>; 3: pDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>NY</sup>; 4: pDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>CV777</sup>.

Note: A: M: DL2000 marker; 1, 6: Negative control; 2-5: PCR products of S-E1, ORF3<sup>wt</sup>, ORF3<sup>CV777</sup> and ORF3<sup>NY</sup>, respectively. B: M: DL15000 marker; 1: pDR13<sup>att</sup>- $\Delta$ ORF3; 2: pDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>wt</sup>; 3: pDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>NY</sup>; 4: pDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>CV777</sup>.

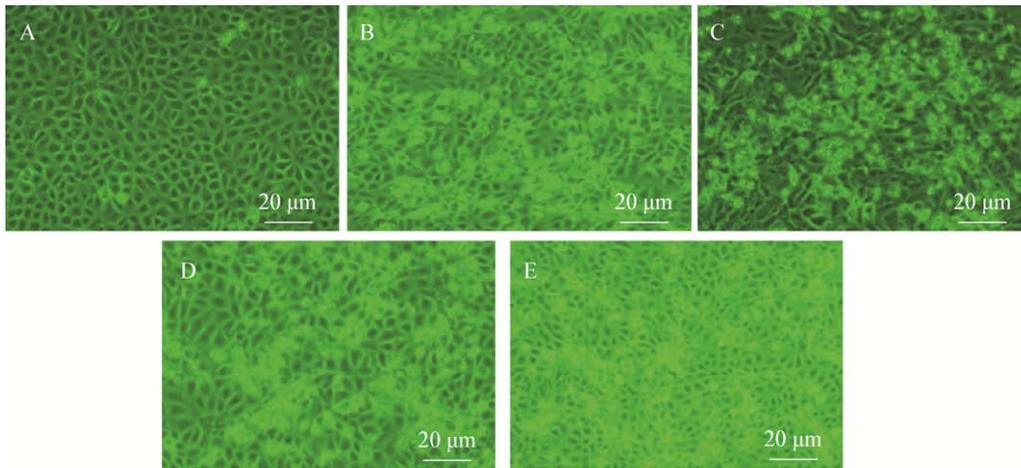


图 2 重组病毒的拯救

**Figure 2 The rescue of recombinant viruses**

Note: A: Mock; B: rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>NY</sup>; C: rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>CV777</sup>; D: rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>wt</sup>; E: rDR13<sup>att</sup>-ΔORF3.

725 bp 的条带, rDR13<sup>att</sup>-ΔORF3 可以扩增出 191 bp 和 309 bp 的条带。测序结果也表明扩增的 DNA 片段的序列与目标序列完全一致, 表明重组病毒拯救成功。

以兔抗 ORF3 多抗为一抗免疫组化鉴定获得重组病毒, 结果表明重组病毒 rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>wt</sup>、



图 3 重组病毒 RT-PCR 鉴定

**Figure 3 Confirmation of recombinant viruses by RT-PCR**

注: M: DL2000 marker; 1、3、8: 阴性对照; 2、4: rDR13<sup>att</sup>-ΔORF3; 5: rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>wt</sup>; 6: rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>CV777</sup>; 7: rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>NY</sup>. 1、2 利用引物 4 和引物 5 扩增, 3、4 利用引物 3 和引物 5 扩增, 5-8 利用引物 1 和引物 2 扩增。

Note: M: DL2000 marker; 1, 3 and 8: Negative control; 2, 4: rDR13<sup>att</sup>-ΔORF3; 5: rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>wt</sup>; 6: rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>CV777</sup>; 7: rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>NY</sup>. 1 and 2 were amplified with primer 4 and primer 5, 3 and 4 were amplified with primer 3 and primer 5, and 5 to 8 were amplified with primer 1 and primer 2.

rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>CV777</sup> 和 rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>NY</sup> 都可以被兔抗 ORF3 多抗特异性识别, 表明 ORF3 蛋白可以在 Vero 细胞中合成; 而 Mock 对照和重组病毒 rDR13<sup>att</sup>-ΔORF3 不能被 ORF3 多抗识别(图 4)。

### 2.3 重组病毒生长曲线的绘制

4 株重组病毒 rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>wt</sup>、rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>NY</sup>、rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>CV777</sup>、rDR13<sup>att</sup>-ΔORF3 具有相似的生长特性, 其病毒滴度(TCID<sub>50</sub>)分别在感染的第 24、24、24、32 h 达到最高(图 5)。重组病毒 rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>wt</sup> 和 rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>NY</sup> 的达到滴度最高, rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>CV777</sup> 次之。同其他 3 株重组病毒相比, 重组病毒 rDR13<sup>att</sup>-ΔORF3 的 LogTCID<sub>50</sub> 在整个感染过程中均低, 其最高滴度仅为 rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>wt</sup> 或 rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>NY</sup> 的 90%, 为 rDR13<sup>att</sup>-ΔORF3 的 95%。SPSS 17.0 分析表明, 重组病毒 rDR13<sup>att</sup>-ΔORF3 的 TCID<sub>50</sub> 显著低于其他病毒 ( $P < 0.05$ ), 表明 ORF3 促进 PEDV 在 Vero 细胞上的增殖。

### 2.4 重组病毒感染后 25、36 h Vero 细胞计数

4 株重组病毒以 MOI 为 0.1 感染 Vero 细胞, 分别在感染 25 h 和 36 h 对细胞瓶内的细胞进行计数, 并在感染 30 h 采集病毒感染图像。结果显示, 缺失

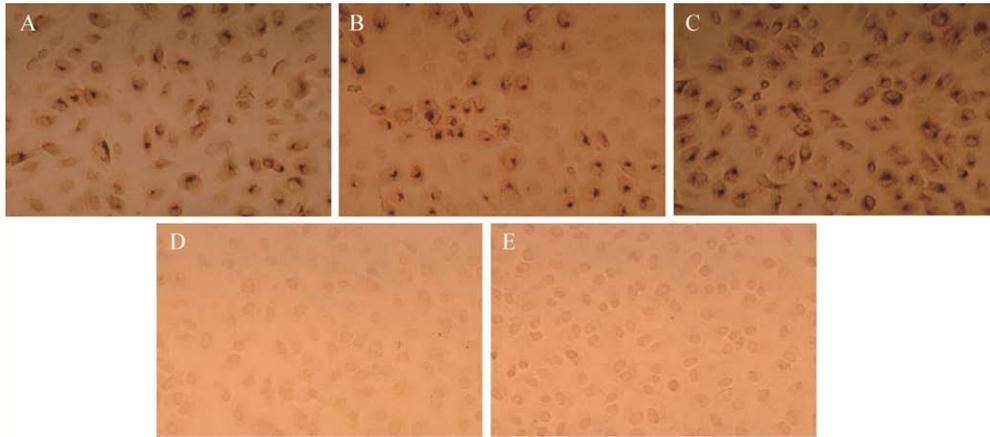


图4 重组病毒的免疫组化分析

Figure 4 IHC analysis of Vero cells infected with recombinant viruses

Note: A: rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>wt</sup>; B: rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>CV777</sup>; C: rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>NY</sup>; D: Mock; E: rDR13<sup>att</sup>-ΔORF3.

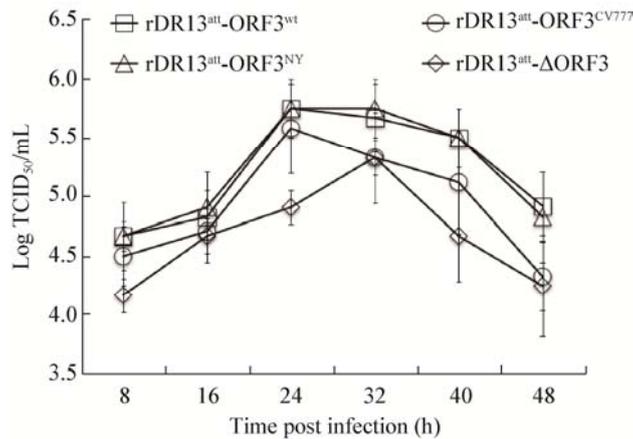


图5 重组病毒生长曲线

Figure 5 Growth curves of recombinant viruses

注: 病毒以 MOI 为 0.1 感染 Vero 细胞, 在不同时间点收集样品并测定其 TCID<sub>50</sub>。

Note: Vero cells were infected with each recombinant PEDV at a MOI of 0.1, and viral titers (TCID<sub>50</sub>) at different time points post infection were determined.

*orf3* 的重组病毒 rDR13<sup>att</sup>-ΔORF3 感染 25 h 和 36 h 时的 Vero 细胞数明显少于其他 3 株重组病毒感染相同时间时的细胞数( $P < 0.05$ , 图 6A、B); CPE 观察发现以相同 MOI 感染同样时间时, 缺失 *orf3* 的重组病毒 rDR13<sup>att</sup>-ΔORF3 的 CPE 比其他重组病毒更显著(图 7)。

## 2.5 病毒感染 Vero 细胞后细胞活力的测定

4 株重组病毒以 MOI 为 0.1 感染 Vero 细胞, 分

别在感染 12、24、36、48 h 后用 CCK-8 试剂盒对 Vero 细胞活力进行测定。SPSS 结果分析显示, 重组病毒感染 Vero 细胞 12 h 时, 各重组病毒感染的 Vero 细胞活力差异并不显著, 而在感染 24、36、48 h 时, 缺失 *orf3* 的重组病毒 rDR13<sup>att</sup>-ΔORF3 感染的 Vero 细胞活力显著低于其他 3 株重组病毒感染相同时间时的细胞活力( $P < 0.05$ , 图 8)。

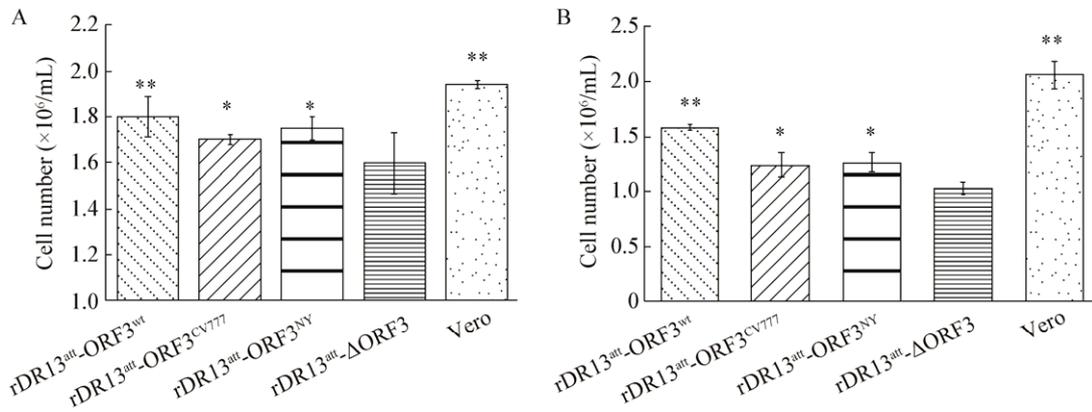


图 6 重组病毒感染 Vero 细胞后不同时间的细胞计数

Figure 6 Vero cells count at different time points post infection by recombinant viruses

注: A: 感染后 25 h 细胞计数; B: 感染后 36 h 细胞计数。

Note: A, B: The numbers of Vero cells at 25 and 36 hpi by recombinant viruses.

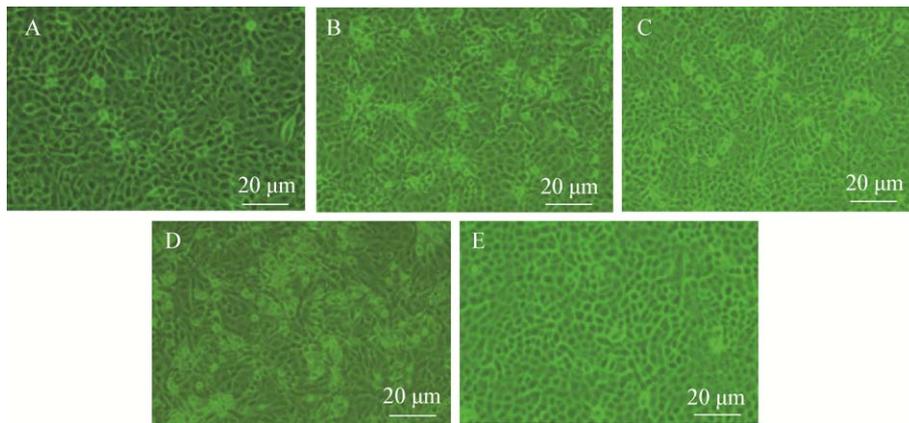


图 7 重组病毒感染 Vero 细胞 30 h CPE 形成

Figure 7 CPE formation at 30 h points post infection by recombinant viruses

Note: A: rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>wt</sup>; B: rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>CV777</sup>; C: rDR13<sup>att</sup>-ORF3<sup>NY</sup>; D: rDR13<sup>att</sup>-ΔORF3; E: Mock.

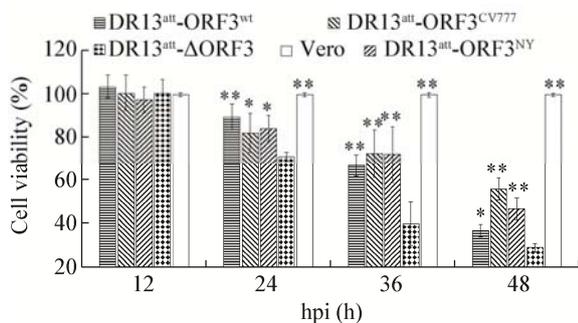


图 8 重组病毒感染 Vero 细胞后不同时间的细胞活力

Figure 8 Vero cells viability at different time points post infection by recombinant viruses

### 3 讨论与结论

ORF3 蛋白是目前发现的 PEDV 的唯一辅助性蛋白, 其功能是 PEDV 的研究热点之一。但目前研究对于其是否有利于病毒增殖的结果不统一, 如有研究证明此蛋白是离子通道蛋白<sup>[14]</sup>, 参与病毒增殖并对病毒增殖有促进作用; Beall 等<sup>[15]</sup>利用基于体外连接的反向遗传学操作技术成功拯救了 *orf3* 基因缺失的重组 PEDV(PC22A-Δ*orf3*), 同带有 *orf3* 基因的重组 PEDV(PC22A)相比, PEDV(PC22A-Δ*orf3*)形成的噬菌斑明显变小, 其病毒滴度也略低于

PEDV(PC22A),说明 ORF3 蛋白对 PEDV 体外增殖起重要作用。近期也有研究者通过构建稳定表达 PEDV ORF3 蛋白的 Vero 细胞系,显示 ORF3 蛋白可以促进 PEDV 增殖<sup>[16]</sup>;但也有研究显示了与上不同的结果,如 Chen 等近期的研究结果显示 *orf3* 基因翻译的提前终止有利于 PEDV 适应 Vero 细胞,并可以提高其在 Vero 细胞上的复制能力<sup>[17]</sup>;而 Sun 等<sup>[18]</sup>对一株非胰酶依赖 PEDV 85-7 的 Vero 细胞传代研究表明,*orf3* 基因突变或翻译提前终止对 PEDV 的复制没有显著影响。Li 等<sup>[13]</sup>利用反向遗传学系统构建了缺失 *orf3* 基因的重组 PEDV,发现 *orf3* 基因缺失株和携带有全长 *orf3* 基因的重组病毒在 Vero 细胞上滴度相同,推测 *orf3* 基因不影响其在 Vero 细胞上的增殖。

PEDV 反向遗传学技术为拯救相同遗传背景的毒株研究 ORF3 蛋白的功能提供了方便。本研究采用基于 RNA 同源重组的 PEDV 反向遗传学操作技术<sup>[13]</sup>,以 PEDV DR13 弱毒株为基因骨架背景,拯救一系列携带有不同 *orf3* 基因的重组 PEDV,同时拯救了 *orf3* 基因缺失的重组 PEDV,研究 ORF3 蛋白对 PEDV 在 Vero 细胞上增殖的影响。免疫组化结果表明 PEDV ORF3 蛋白在 Vero 细胞中表达;一步生长曲线结果(图 5)显示虽然带有不同 *orf3* 基因的重组病毒感染相同时间的 TCID<sub>50</sub> 及出现 CPE 的量(图 7)不尽相同,在整个培养过程中,携带 *orf3* 基因的重组 PEDV 的滴度显著高于 *orf3* 基因缺失的重组 PEDV 的滴度,表明 ORF3 蛋白显著促进 PEDV 在 Vero 细胞上的增殖。本研究不仅是在完全相同遗传背景下和相同实验条件下比较了携带和不携带 *orf3* 基因的重组 PEDV 增殖能力的差异,而且设置了多株携带 *orf3* 基因的重组毒株作为参照,使研究结果更加科学和客观,这是与以往研究重要的不同之处。

在证明 ORF3 蛋白促进 PEDV Vero 细胞中增殖的基础上,通过对重组 PEDV 感染后 25 h 和 36 h 的活细胞计数发现,缺失 *orf3* 基因的重组病毒感染

后的活细胞数比携带 *orf3* 基因的重组 PEDV 感染相同时间后的活细胞数要少(图 6),而且前者感染细胞后 CPE 出现的时间更早(图 7);通过对重组 PEDV 感染不同时间后测定细胞活力发现,感染 24 h 后缺失 *orf3* 基因的重组病毒感染后的细胞活力显著低于携带 *orf3* 基因的重组 PEDV 感染相同时间的细胞活力(图 8),该结果进一步证明带有 *orf3* 基因的重组病毒可以使更多细胞维持在生存状态。据此推断 ORF3 蛋白通过维持细胞活性、减缓或抑制细胞的凋亡/死亡以促进 PEDV 在 Vero 细胞上的增殖。Ye 等<sup>[16]</sup>发现 ORF3 蛋白的表达可导致 Vero 细胞高尔基相关囊泡的增生,并伴随一些反式高尔基体囊的膨胀。ORF3 在 Vero 细胞中的表达可延长细胞周期的 S 期,并诱导冠状病毒复制所必需的双层膜结构形成。这些研究表明 ORF3 蛋白的确可以与细胞相关蛋白相互作用,这些作用往往对 PEDV 的增殖是有利的。

总之,本研究通过拯救一系列携带不同 *orf3* 基因或 *orf3* 基因缺失的重组 PEDV,证明了 ORF3 蛋白对于 PEDV 在 Vero 细胞中的增殖具有促进作用;同时提出 ORF3 蛋白的这种作用是通过延迟感染细胞的裂解死亡,为病毒增殖提供更加有利的条件。研究结果不仅丰富了对于 PEDV ORF3 生物功能的认识,也将为 PEDV 疫苗设计、临床防控及药物筛选提供理论基础。

**致谢:**感谢荷兰乌德勒支大学兽医学院的 Peter Rottier 教授在试验设计和结果解释中给予的指导建议。

## REFERENCES

- [1] Park SJ, Kim HK, Song DS, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field isolates in Korea[J]. Archives of Virology, 2011, 156(4): 577-585
- [2] Sun RQ, Cai RJ, Chen YQ, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China[J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18(1): 161-163
- [3] Shibata I, Tsuda T, Mori M, et al. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages[J]. Veterinary Microbiology, 2000, 72(3/4): 173-182
- [4] Takahashi K, Okada K, Ohshima K. An Outbreak of swine

- diarrhea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan[J]. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 1983, 45(6): 829-832
- [5] Cai BX. *Infectious Diseases of Domestic Animal*[M]. 4th ed. Beijing: China Agriculture Press, 2001: 213-214 (in Chinese)  
蔡宝祥. *家畜传染病学*[M]. 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2001: 213-214
- [6] Zhang Z, Li L, Wang SS, et al. The identification and pathogenicity of porcine epidemic disease virus variant[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2012, 32(10): 1423-1428 (in Chinese)  
张志, 李岚, 王赛赛, 等. 猪流行性腹泻新毒株的分离鉴定和致病性研究[J]. *中国兽医学报*, 2012, 32(10): 1423-1428
- [7] Müller MA, van der Hoek L, Voss D, et al. Human coronavirus NL63 open reading frame 3 encodes a virion-incorporated N-glycosylated membrane protein[J]. *Virology Journal*, 2010, 7(1): 6
- [8] Lu W, Zheng BJ, Xu K, et al. Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(33): 12540-12545
- [9] Kint J, Dickhout A, Kutter J, et al. Infectious bronchitis coronavirus inhibits STAT1 signaling and requires accessory proteins for resistance to type I interferon activity[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(23): 12047-12057
- [10] Song DS, Yang JS, Oh JS, et al. Differentiation of a Vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF3[J]. *Vaccine*, 2003, 21(17/18): 1833-1842
- [11] Park SJ, Moon HJ, Luo YZ, et al. Cloning and further sequence analysis of the ORF3 gene of wild- and attenuated-type porcine epidemic diarrhea viruses[J]. *Virus Genes*, 2008, 36(1): 95-104
- [12] Li RF, Qiao SL, Yang YY, et al. Phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field strains in central China based on the ORF3 gene and the main neutralization epitopes[J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(5): 1057-1065
- [13] Li CH, Li Z, Zou Y, et al. Manipulation of the porcine epidemic diarrhea virus genome using targeted RNA recombination[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e69997
- [14] Wang K, Lu W, Chen JF, et al. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production[J]. *FEBS Letters*, 2012, 586(4): 384-391
- [15] Beall A, Yount B, Lin CM, 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] Ye SY, Li ZH, Chen FZ, et al. Porcine epidemic diarrhea virus ORF3 gene prolongs S-phase, facilitates formation of vesicles and promotes the proliferation of attenuated PEDV[J]. *Virus Genes*, 2015, 51(3): 385-392
- [17] Chen FZ, Zhu YX, Wu MZ, et al. Comparative genomic analysis of classical and variant virulent parental/attenuated strains of porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Viruses*, 2015, 7(10): 5525-5538
- [18] Sun M, Ma JL, Yu Z, et al. Identification of two mutation sites in spike and envelope proteins mediating optimal cellular infection of porcine epidemic diarrhea virus from different pathways[J]. *Veterinary Research*, 2017, 48(1): 44