



## 研究报告

## 动物病毒学专栏

## 猪流行性腹泻病毒 S2 截短肽的原核表达及其线性 B 细胞表位区鉴定

李凤平<sup>1,2</sup> 刘英杰<sup>2,4</sup> 董世娟<sup>2,3</sup> 王瑞阳<sup>1,2</sup> 王剑<sup>2,3</sup> 于瑞嵩<sup>\*2,3</sup> 李震<sup>\*2,3</sup>

1 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306

2 上海种猪工程技术研究中心 上海市农业科学院畜牧兽医研究所 上海 201106

3 上海农业遗传育种重点实验室 上海 201106

4 齐鲁工业大学生物工程学院(山东省科学院) 山东 济南 250353

**摘要:**【背景】由猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的猪流行性腹泻给养猪业造成了巨大的经济损失。PEDV S 蛋白可以诱导宿主产生中和抗体。【目的】原核表达 PEDV CV777 疫苗株 S2 截短肽(aa: 961–1 382)并制备其多克隆抗体; 鉴定表达的 S2 截短肽上的线性 B 细胞表位区。

【方法】将经密码子优化的 PEDV S2 截短肽编码 DNA (*s2<sub>t</sub>*)克隆至载体 pET-28a 中并转化 *Escherichia coli* BL21(DE3), 利用 IPTG 诱导 S2 截短肽表达。以经 SDS-PAGE 切胶纯化的重组 S2 截短肽免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体。在 *E. coli* BL21 中 GST 融合表达覆盖 S2 截短肽序列全长、彼此重叠 8 个氨基酸残基的系列 16 肽。以制备的抗 S2 截短肽兔血清为一抗, 通过 Western blot (WB) 筛选系列 16 肽中的阳性反应性 16 肽, 鉴定 S2 截短肽上的线性 B 细胞表位区。【结果】重组 PEDV S2 截短肽的相对分子质量约为 50 kD; 诱导 4 h 表达量最高, 且主要形成包涵体。WB 结果显示, 纯化的 S2 截短肽能被猪抗 PEDV 血清识别; 以纯化的 S2 截短肽免疫新西兰大白兔制备多抗血清, ELISA 法检测抗体效价位于 1:25 600–1:102 400 之间。免疫组化和间接免疫荧光分析均表明, 制备的多抗血清可以识别 Vero 细胞培养的 PEDV DR13 弱毒株。以制备的多抗血清通过 WB 从 52 个 GST 融合表达的 16 肽中鉴定到 11 个阳性反应性 16 肽。WB 分析显示, 得到的阳性反应性 16 肽都可以被猪抗 PEDV 血清识别。鉴定到的阳性 16 肽在 S2 截短肽上形成 4 个线性 B 细胞表位区(aa: 969–984; 1 065–1 096; 1 225–1 280; 1 361–1 382)。

【结论】高效价抗 PEDV S2 截短肽多克隆抗体的制备和 S2 截短肽上线性 B 细胞抗原表位区的确定有助于了解 S 蛋白的结构与功能, 为建立有效的 PEDV 检测方法奠定了基础。

**关键词:** 猪流行性腹泻病毒, S 蛋白, 多克隆抗体, 线性 B 细胞表位

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500101); National Natural Science Foundation of China (31402219, 315725199); Shanghai Key Project on Agricultural Development (2015-6-1-9)

**\*Corresponding authors:** YU Rui-Song: Tel: 86-21-62200389; E-mail: yursong@163.com  
LI Zhen: Tel: 86-21-62206391; E-mail: zhenli60@163.com

**Received:** 02-01-2019; **Accepted:** 05-05-2019; **Published online:** 22-05-2019

**基金项目:** 国家重点研发计划(2016YFD0500101); 国家自然科学基金(31402219, 315725199); 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:** 于瑞嵩: Tel: 021-62200389; E-mail: yursong@163.com

李震: Tel: 021-62206391; E-mail: zhenli60@163.com

**收稿日期:** 2019-01-02; **接受日期:** 2019-05-05; **网络首发日期:** 2019-05-22

## Prokaryotic expression of truncated S2 subunit of porcine epidemic diarrhea virus and identification of its linear B cell epitopes containing regions

LI Feng-Ping<sup>1,2</sup> LIU Ying-Jie<sup>2,4</sup> DONG Shi-Juan<sup>2,3</sup> WANG Rui-Yang<sup>1,2</sup> WANG Jian<sup>2,3</sup>  
YU Rui-Song<sup>\*2,3</sup> LI Zhen<sup>\*2,3</sup>

1 College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 Shanghai Engineering Research Center of Breeding Pig, Institute of Animal Husbandry & Veterinary Science, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

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

4 School of Biological Engineering, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan, Shandong 250353, China

**Abstract:** [Background] Porcine epidemic diarrhea (PED) caused by porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) has caused significant economic losses in pig industry. PEDV S protein can induce the host to produce neutralizing antibodies. [Objective] To prokaryotically express the truncated S2 (aa: 961–1 382) of PEDV CV777 vaccine strain and prepare polyclonal antibodies with which to identify regions containing linear B cell epitopes on the truncated S2. [Methods] The codon-optimized DNA fragment encoding the truncated S2 of PEDV (*s2<sub>t</sub>*) was inserted into pET-28a. The resulting pET-28a-S2<sub>t</sub> was then transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) for expression under the induction of IPTG. Polyclonal antibody was prepared by immunizing New Zealand white rabbits with the truncated S2 purified by cutting out the aimed band from the SDS-PAGE. Serial 16-mers, overlapping 8 aa each other and covering the whole sequence of the truncated S2, were GST-fusion expressed in *E. coli* BL21. Positive 16-mers were identified by western blot (WB) using prepared polyclonal serum as the primary antibody. Linear B cell epitopes containing regions were located. [Results] The truncated S2, about 50 kD, mainly existed in form of inclusion body, of which the expression level reached the maximum at 4 h post induction. The purified truncated S2 could be recognized by porcine anti-PEDV serum in WB analysis. The titer values of the polyclonal serum ranged from 1:25 600 to 1:102 400. Immunohistochemical and indirect immunofluorescence analyses indicated that the polyclonal antibodies showed specific reactivity with PEDV DR13 in Vero cells. Eleven positive 16-mers were identified from 52 GST-fused 16-mers by WB using the prepared serum. All the 11 16-mers could be recognized by porcine anti-PEDV serum in WB analysis. The identified positive 16-mers formed 4 linear B cell epitopes containing regions on the truncated S2 (aa: 969–984, 1 065–1 096, 1 225–1 280, and 1 361–1 382). [Conclusion] The preparation of high titer polyclonal antibodies against truncated S2 of PEDV and the identification of linear B cell epitopes containing sequences on it laid a foundation for understanding the structure and function of S protein, as well as developing effective PEDV diagnostic methods.

**Keywords:** PEDV, S protein, Polyclonal antibodies, Linear B cell epitope

猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)属于尼多病毒目(Nidovirale)冠状病毒科(Coronaviridae) α-冠状病毒属(Alpha-coronavirus),是引起猪,特别是新生仔猪严重腹泻的主要病原之一。PEDV主要感染猪小肠上皮细胞,引起肠绒毛萎缩和吸收不良,其临床症状包括水样腹泻、呕吐、厌食和脱水,常伴随着哺乳仔

猪的高致死率及仔猪的消瘦<sup>[1-3]</sup>。虽然猪流行性腹泻(Porcine epidemic diarrhea, PED)首次发现于欧洲,但其在亚洲地区却广泛流行<sup>[4-6]</sup>。2010年底开始, PED再次在我国大范围暴发。2013年美国首次报道了 PED,并迅速扩散至美洲、欧洲和亚洲的其他地区,给全球养猪业造成了严重的经济损失<sup>[7-8]</sup>。

PEDV 基因组为单股正链 RNA, 长度约 28 kb。在 PEDV 基因组的 5' 和 3' 非编码区中间包含 7 个开放阅读框(Open reading frame, ORF), 分别编码多聚蛋白(pp1a 和 pp1ab)、纤突蛋白(S, 180–220 kD)、膜蛋白(M, 27–32 kD)、囊膜蛋白(E, 7 kD)和核衣壳蛋白(N, 55–58 kD)以及非结构蛋白 ORF3 蛋白<sup>[8-9]</sup>。PEDV S 蛋白是病毒表面的主要纤突糖蛋白, 在病毒感染的吸附、受体结合、膜融合以及入侵过程中发挥重要作用。根据与其他冠状病毒 S 蛋白序列的相似性比对发现, PEDV 的 S 蛋白可以分为 S1 和 S2 两个亚基, 分别负责病毒与细胞表面受体的结合以及病毒与宿主细胞的膜融合<sup>[10]</sup>。S 蛋白也是诱导宿主产生中和抗体的关键抗原蛋白<sup>[10-11]</sup>。以全长的 S 蛋白或截短的 S 蛋白免疫母(仔)猪均可以产生保护性免疫反应<sup>[12-14]</sup>。利用单克隆抗体或抗 PEDV 多抗血清已经在 S 蛋白上鉴定到 4 个表位区<sup>[15-20]</sup>: S1 蛋白 N 端(aa: 19–220)<sup>[20]</sup>、Collagenase equivalent (COE) 抗原区(aa: 499–638)<sup>[18]</sup>、S1/S2 连接区(aa: 636–789)<sup>[17]</sup>和 C-端抗原区(aa: 1 371–1 377)<sup>[19,21]</sup>。虽然这些表位区主要集中在 S 蛋白的 S1 亚基区, 最近研究表明 PEDV S 蛋白的 S2 亚基上存在具有免疫优势的中和抗原表位<sup>[19]</sup>, 并且 PEDV S 蛋白的 S2 亚基较 S1 亚基保守。对其他冠状病毒的研究也显示, S2 亚基的表位可以诱导产生中和性抗体; S2 亚基也是研制疫苗的重要靶抗原<sup>[22]</sup>。因此本研究以 PEDV CV777 疫苗株的 S 蛋白为靶蛋白, 更详细地分析其 S2 亚基上的线性 B 细胞表位分布。

本研究原核表达不包含融合肽的 PEDV CV777 疫苗株 S 蛋白的 S2 截短肽(aa: 961–1 382)并制备其多克隆抗体, 利用制备的多抗对覆盖 S2 截短肽全长、彼此重叠 8 氨基酸残基的系列 GST 融合表达的 16 肽进行筛选, 鉴定 S2 截短肽上的线性 B 细胞表位区, 以期为将来 PEDV 的免疫、净化以及 S 蛋白功能性研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 病毒、细胞、菌株和质粒

*Escherichia coli* TOP 10 和 BL21(DE3)购自天根生化科技(北京)有限公司; 原核表达载体 pET-28a、pXXGST-1 为本实验室保存。Vero 细胞、PEDV DR13 弱毒株均为本实验室保存。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶、DNA 聚合酶、DNA 连接酶购自上海皓嘉科技发展有限公司; 弗式完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自上海前尘生物科技有限公司; 质粒提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自 Axygen 生物技术(杭州)有限公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Alexa Fluor 647 标记的山羊抗兔 IgG 购自上海碧云天生物技术有限公司; ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; PVDF 膜购自上海鼎国生物技术有限责任公司。

PCR 仪、凝胶电泳仪、半干转膜仪、凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 超声波细胞破碎仪, 宁波新芝生物技术有限公司; 高速冷冻离心机, 希格玛实验室离心机公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 PEDV S2 截短肽表达载体的构建

以插入密码子优化的 PEDV CV777 疫苗株 *s* 基因的 pJET1.2-S 为模板, 利用引物对(F: 5'-GGCCTG GTGCCGCGCGGCAGCCATATGGGTCTTACGAC CGCAGCGGCG-3'; R: 5'-CAGTGGTGGTGGTG GTGGTGCTCGAGCTGCACATGAACCTTCTCGA AAGCC-3'; 下划线序列为载体同源臂序列) PCR 扩增 S2 截短肽编码序列 *s<sub>2</sub>*。PCR 反应体系: 10×*Ex Taq* buffer 5 μL, dNTP mixture (各 2.5 mmol/L) 4 μL, DNA 模板(约 100 ng/μL) 1 μL, 引物 F 和 R (10 μmol/L)各 1 μL, *ExTaq* 酶(5 U/μL) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 50 μL。PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 98 °C 15 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循

环; 72 °C 5 min。PCR 产物切胶纯化后通过同源重组克隆至 pET-28a 的 *Nde* I/*Xho* I 位点得到 pET-28a-S2<sub>i</sub>; 表达的重组 S2 截短肽的 N 端和 C 端均带有 6×His 标签, 以便于利用抗 His 标签单抗验证表达的目标蛋白。

### 1.2.2 PEDV S2 截短肽的原核表达

将测序验证的 pET-28a-S2<sub>i</sub> 转化至 *E. coli* BL21, 挑取单克隆, 转接至 LB 培养基(含卡纳霉素 50 µg/mL)中, 37 °C、220 r/min 培养过夜。次日以 1:100 接种量各转接 9 支 LB 试管, 37 °C、220 r/min 培养至 *OD*<sub>550</sub> 约为 0.5, 分别向 8 支试管中加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 37 °C 诱导 PEDV S2 截短肽的表达, 分别于诱导的第 0、3、4、5、6、7、8、9 h 取出 1 管; 另一支试管作为未诱导对照继续培养 9 h。各取 2 mL 菌液 4 °C、12 000 r/min 离心 1 min 收集菌体, -20 °C 保存。

### 1.2.3 PEDV S2 截短肽的纯化

将 *E. coli* BL21(pET-28a-S2<sub>i</sub>) 37 °C 诱导培养 4 h, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。以 PBS (10 mL/g 菌体)重悬, 冰上超声破碎 20 min (150 W, 超声 4 s, 停 4 s), 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min 收集包涵体。包涵体以双蒸水悬浮后加入等体积的 2×上样缓冲液, 上样进行 SDS-PAGE (12%)电泳, 电泳结束后以 0.25 mol/L 的 KCl 染色 10 min, 使用手术刀片将目的蛋白条带切下, 切成 2 mm 的碎片后装入透析袋, 60 V 电泳洗脱 120 min, 反向电泳 15 min, 回收纯化的 PEDV S2 截短肽, 浓缩、分装后-80 °C 保存。

### 1.2.4 抗 PEDV S2 截短肽血清的制备

将纯化的 PEDV S2 截短肽与等体积的弗氏完全佐剂混合, 以 0.5 mg/只的剂量经大腿内侧多点注射免疫 3 只新西兰大白兔, 同时以 PBS 免疫 1 只大白兔作为对照。此后, 每隔 14 d 加强免疫 1 次, 共免疫 4 次。分别于第一次免疫后的第 14、28、42、56、70 天进行耳部静脉取血, 间接 ELISA 检测抗体水平, 第 70 天颈动脉采血并收集血清, 分装后-80 °C 保存。

### 1.2.5 ELISA 法检测血清的效价

以纯化的 PEDV S2 截短肽(1 µg/mL)包被酶标板, 4 °C 过夜。以 PBST 洗板 3 次, 加入 5%的脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h; 以 PBST 洗涤 3 次。加入 1:1 000 倍稀释的血清(免疫后不同时间点采集的兔血清)或倍比稀释的血清(免疫后 70 d 收集的兔血清), 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次; 加入 1:10 000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG, 37 °C 孵育 45 min, PBST 洗涤 3 次; 加入 TMB 底物显色液, 暗处显色 15 min, 加入 2 mol/L 的硫酸终止液, 酶标仪读取 *OD*<sub>450</sub> 值。

### 1.2.6 抗 PEDV S2 截短肽血清与 PEDV DR13 弱毒株的特异性反应

抗 PEDV S2 截短肽血清与 PEDV DR13 弱毒株的特异性反应通过免疫组化和间接免疫荧光检测。

(1) 免疫组化。将 Vero 细胞接种至预先放置盖玻片的 24 孔板中, 待盖玻片上的细胞生长至 80% 后接入 100 TCID<sub>50</sub> 病毒。待 60%–80% 细胞出现病变(约 18 h), PBST 漂洗 3 次; 以 4%的多聚甲醛固定细胞 15 min; 接着以含有 0.1% Triton X-100 的 PBS 透化 15 min; 然后用 5%羊血清室温封闭 1 h; 加入抗 PEDV S2 截短肽血清(1:100), 37 °C 孵育 1 h; 再加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1:200), 37 °C 孵育 1 h; DAB 显色后用尼康显微镜观察并拍照。

(2) 免疫荧光。将 Vero 细胞接种至预先放置盖玻片的 24 孔板中, 待盖玻片上的细胞生长至 80% 后接入 100 TCID<sub>50</sub> 病毒。待 60%–80% 细胞出现病变(约 18 h), PBST 漂洗 3 次; 以 4%的多聚甲醛固定细胞 15 min; 接着以含有 0.1% Triton X-100 的 PBS 透化 15 min; 用 5%羊血清室温封闭 1 h; 加入 5%羊血清稀释的抗 PEDV S2 截短肽血清(1:2 000), 37 °C 孵育 1 h; 再加入 5%羊血清稀释的 Alexa Fluor 647 标记的山羊抗兔 IgG (1:200), 37 °C 孵育 1 h; DAPI (1:1 000) 37 °C 孵育 15 min 染细胞核; 蔡司荧光显微镜观察并拍照。

### 1.2.7 系列 GST 融合 16 肽的表达

覆盖 PEDV S2 截短肽序列全长、彼此重叠

8个氨基酸的系列16肽的GST融合表达参照文献[23]的方法。将合成并体外退火的5'端和3'端分别带有 *Bam*H I 和 *Sal* I 粘性末端的各16肽编码DNA片段插入到原核表达载体 pXXGST-3 的 *Bam*H I 和 *Sal* I 位点。重组质粒测序验证后转化 *E. coli* BL21 并诱导重组蛋白表达。4 °C、12 000 r/min 离心 1 min 收集菌体, 通过 SDS-PAGE 筛选正确表达的阳性克隆。表达融合蛋白的菌体-20 °C 保存, 以备用于 Western blot (WB) 筛选阳性反应性融合16肽。

### 1.2.8 SDS-PAGE 及 WB

SDS-PAGE 及 WB 参照文献[23]的方法。菌体沉淀上样12%或15%的SDS-PAGE, 电泳结束后, 凝胶用考马斯亮蓝 G-250 染色观察目的蛋白的表达; 通过 WB 检验目标蛋白表达或筛选阳性反应性16肽时, 将凝胶上的蛋白以12 V 恒压半干转移52 min 至 PVDF 膜上, 转印膜以10%的脱脂奶粉4 °C 封闭过夜, 加入一抗(抗 His 单抗、抗 PEDV S2 截短肽兔血清或 PEDV 阳性猪血清, 1:6 000)室温孵育 1 h, 以 TBST 洗涤 3 次, 加入二抗(IgG-HRP, 1:60 000)室温孵育 50 min, 以 TBST 洗涤 4 次, ECL 显色, 暗室显影。

## 2 结果与分析

### 2.1 PEDV S2 截短肽的原核表达及 WB 检测

SDS-PAGE 分析显示, 同诱导前和未诱导的样品相比, 重组 *E. coli* BL21(pET-28a-S2<sub>tr</sub>) 诱导后出现了约 50 kD 的蛋白条带(图 1A), 与预期的重组 PEDV S2 截短肽的大小一致。在诱导的前 4 h 内随着诱导时间的增加, PEDV S2 截短肽的表达量逐渐增加; 诱导时间继续增加, 目标蛋白的表达量基本维持不变。WB 结果表明, 表达的 PEDV S2 截短肽可以与抗 His 标签单抗发生特异性反应(图 1B)。

为了分析 PEDV S2 截短肽以可溶性表达还是形成包涵体, 分别将不同 IPTG 诱导浓度(0.05–1.0 mmol/L)以及不同诱导温度(16 °C 和

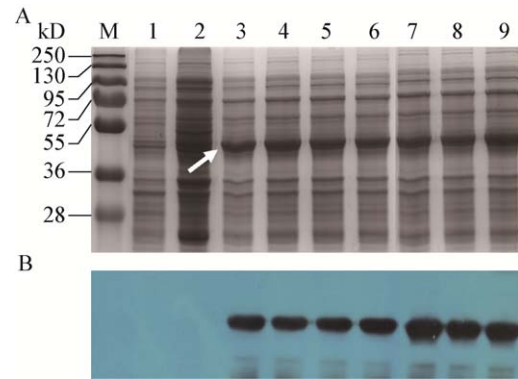


图1 诱导时间对 PEDV S2 截短肽表达的影响(A)和 WB 验证(B)

**Figure 1** The expression time course of PEDV truncated S2 (A) and confirmation with WB (B)

注: A: SDS-PAGE 分析 PEDV S2 截短肽的表达; M: 蛋白质分子量标准; 1: 重组 *E. coli* BL21 诱导前; 2: 未诱导的菌体; 3–9: 诱导 3–9 h 的菌体。B: 利用抗 His 标签单抗 WB 验证 PEDV S2 截短肽的表达。箭头指向 PEDV S2 截短肽的位置。

Note: A: SDS-PAGE analysis of the expression of PEDV truncated S2; M: Protein marker; 1: Precipitate of cultured recombinant *E. coli* BL21 before induction; 2: Precipitate of un-induced recombinant *E. coli* BL21; 3–9: Precipitate of recombinant *E. coli* BL21 induced 3–9 h, respectively. B: WB analysis of PEDV truncated S2 with anti-His monoclonal antibody. Arrow points to the position of PEDV truncated S2.

37 °C) 诱导后的菌体超声波破碎、离心, 分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。如图 2A、2B 所示, 各种诱导条件下表达的 PEDV S2 截短肽均形成不可溶性的包涵体, 破碎上清中几乎无目标蛋白出现, 这也得到了 WB 分析结果的证实(图 3A)。综合考虑实验成本, 选择 37 °C、0.2 mmol/L IPTG 诱导 4 h 的重组菌体纯化 PEDV S2 截短肽, 用于免疫新西兰大白兔制备抗 PEDV S2 截短肽多抗血清。

### 2.2 PEDV S2 截短肽的纯化和 WB 检测

如图 3A 所示, 采用 SDS-PAGE 割胶、电洗脱纯化得到了高纯度的 PEDV S2 截短肽。以抗 His 标签的单克隆抗体(图 3Ab)和 PEDV 阳性猪血清(图 3Bb)通过 WB 分析纯化的重组 PEDV S2 截短肽, 结果表明得到的 PEDV S2 截短肽与抗 His 标签单抗和猪抗 PEDV 血清均可以反应。

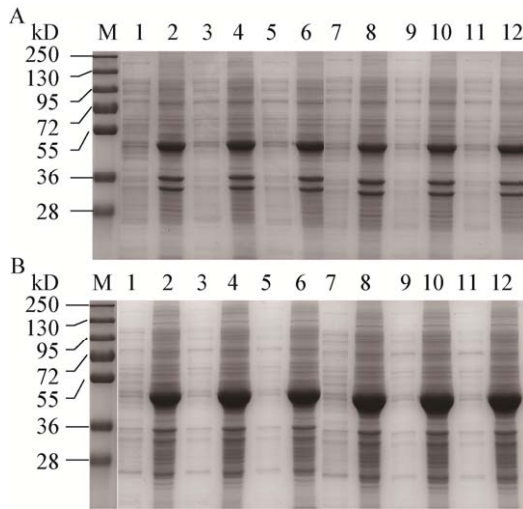


图 2 诱导温度及 IPTG 浓度对 PEDV S2 截短肽包涵体形成的影响

**Figure 2 The effects of induction temperature and IPTG concentration on the formation of inclusion bodies of the expressed PEDV truncated S2**

注: A、B: 16 °C、37 °C 时不同 IPTG 浓度对包涵体形成的影响; M: 蛋白质分子量标准; 1、3、5、7、9、11: 0.05、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后重组 *E. coli* BL21(pET-28a-S2) 超声破碎、离心上清; 2、4、6、8、10、12: 0.05、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后重组 *E. coli* BL21(pET-28a-S2) 超声破碎、离心沉淀。

Note: A and B: Effects of IPTG concentration on the formation inclusion bodies induced at 16 °C and 37 °C, respectively; M: Protein marker; 1, 3, 5, 7, 9, 11: Centrifugal supernatant of cultured recombinant *E. coli* BL21(pET-28a-S2) induced with 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mmol/L IPTG for 4 h, respectively; 2, 4, 6, 8, 10, 12: Centrifugal precipitate of cultured recombinant *E. coli* BL21(pET-28a-S2) induced with 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mmol/L IPTG for 4 h, respectively.

### 2.3 抗 PEDV S2 截短肽多抗血清的效价测定及其与 PEDV DR13 的反应性

用纯化的 PEDV S2 截短肽作为包被抗原, 间接 ELISA 法检测 3 只新西兰大白兔免疫后不同时间点采集的血清的效价, 结果显示, 抗 PEDV S2 截短肽抗体在首次免疫后 14 d 即可产生并迅速增加, 至 28 d 后缓慢增加(图 4)。第 4 次免疫后获得的多克隆抗体的滴度, 3 号兔子最高, 达到 1:102 400; 1 号兔子的抗体滴度为 1:51 200; 2 号兔子抗体滴度达到 1:25 600, 表明得到的多抗血清具有很好的敏感性(图 5)。以获得的抗 PEDV S2 截短肽兔血清为一抗, 通过免疫组化和间接免疫荧光验证其与 PEDV 弱毒株 DR13 的反应性。结果如

图 6、7 所示, 获得多抗血清能特异性识别 Vero 细胞中的 PEDV DR13, 而阴性血清不能染色 PEDV DR13 (图 6) 或没有观察到荧光(图 7), 表明制备的多抗血清具有良好的特异性。

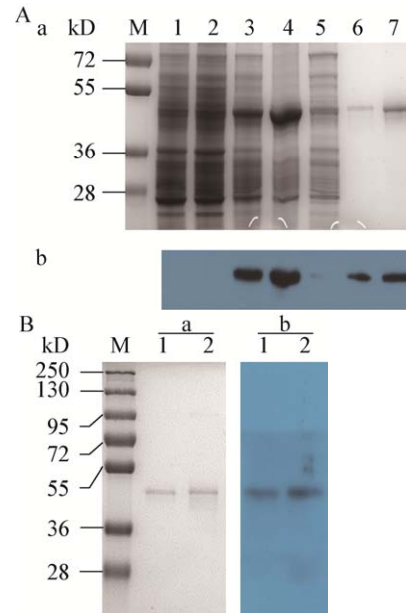


图 3 SDS-PAGE 和 WB 分析表达、纯化的 PEDV S2 截短肽  
**Figure 3 SDS-PAGE and WB analyses of expressed and purified PEDV truncated S2**

注: A: PEDV S2 截短肽的表达与纯化; a: SDS-PAGE 分析表达和纯化的重组 PEDV S2 截短肽; b: 以抗-His 标签单抗 WB 分析表达和纯化的重组 PEDV S2 截短肽; M: 蛋白质分子量标准; 1: 重组 *E. coli* BL21 诱导前; 2: 未诱导的菌体; 3: 诱导 4 h 的菌体; 4、5: 诱导 4 h 的重组 *E. coli* BL21(pET-28a-S2) 超声破碎后离心沉淀和上清; 6: 纯化的 PEDV S2 截短肽; 7: 纯化的 PEDV S2 截短肽浓缩后。B: 纯化的 S2 截短肽与 PEDV 阳性猪血清的反应性; a: SDS-PAGE 分析纯化的重组 PEDV S2 截短肽; b: 以 PEDV 阳性猪血清 WB 分析纯化的重组 PEDV S2 截短肽; M: 蛋白质分子量标准; 1、2: 两次纯化的 PEDV S2 截短肽。

Note: A: Expression and purification of PEDV truncated S2; a: SDS-PAGE analysis of the expressed and purified PEDV truncated S2; b: WB analysis of the expressed and purified PEDV truncated S2 with anti-His mAb; M: Protein marker; 1: Precipitate of recombinant *E. coli* BL21 before induction; 2: Precipitate of un-induced recombinant *E. coli* BL21; 3: Precipitate of recombinant *E. coli* BL21(pET-28a-S2) induced for 4 h; 4, 5: Centrifugal precipitate and supernatant of ultrasonicated recombinant *E. coli* BL21(pET-28a-S2) induced for 4 h, respectively; 6: Purified PEDV truncated S2; 7: Concentrated aliquot of purified PEDV truncated S2. B: Analysis of the reactivity of purified truncated S2 to porcine anti-PEDV pig serum; a: SDS-PAGE analysis of purified PEDV truncated S2; b: WB analysis of purified PEDV truncated S2 with porcine anti-PEDV serum; M: Protein marker; 1, 2: Two times purified PEDV truncated S2, respectively.

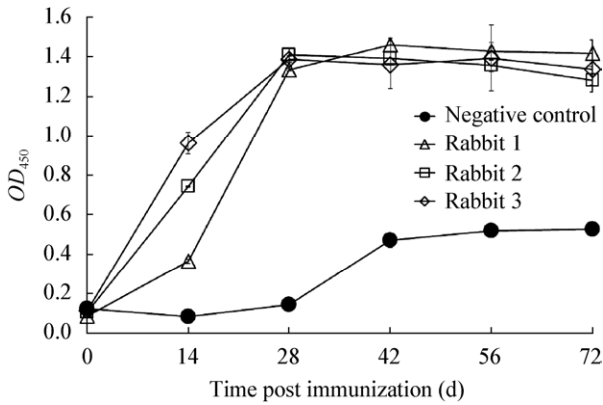


图 4 不同免疫时间的血清抗体水平  
Figure 4 Time course of serum antibody

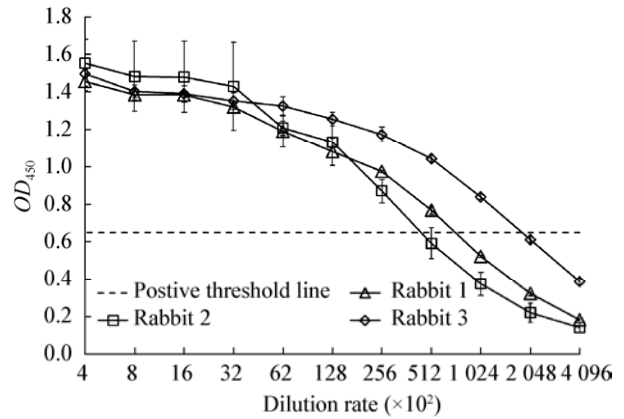


图 5 血清抗体滴度的检测  
Figure 5 Determination of the titers of the anti-serum

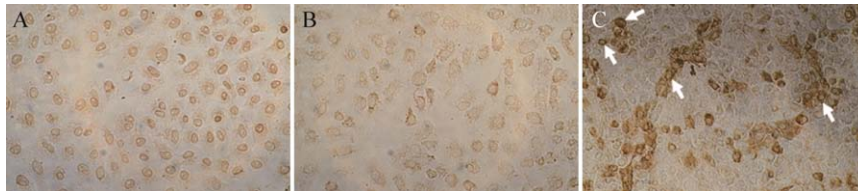


图 6 免疫组化分析抗 PEDV S2 截短肽多抗血清与 PEDV DR13 弱毒株的反应性  
Figure 6 Cross-reaction of anti-PEDV truncated S2 serum with attenuated PEDV DR13 in Vero cell detected by immunohistochemical assay

注: A: Vero 细胞对照; B、C: 均为 PEDV DR13 感染 18 h 的 Vero 细胞; A、C: 一抗为抗 PEDV S2 截短肽多抗血清; B: 一抗为阴性兔血清。箭头指向 PEDV 阳性的细胞。

Note: A: Vero cell control; B, C: Vero cell infected with attenuated PEDV DR13; A, C: Using anti-PEDV truncated S2 serum as the primary antibody; B: Using negative rabbit serum as the primary antibody. The arrow points to PEDV-positive cells.

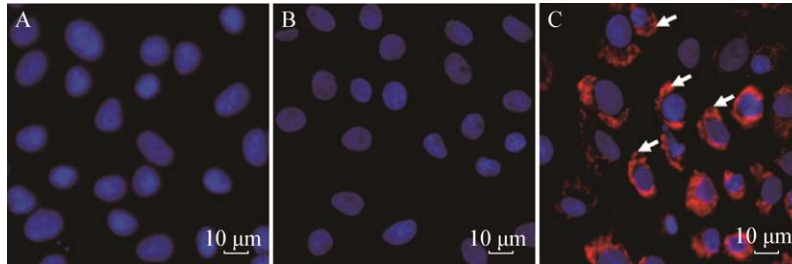


图 7 间接免疫荧光分析抗 PEDV S2 截短肽多抗血清与 PEDV DR13 弱毒株的反应性  
Figure 7 Cross-reaction of anti-PEDV truncated S2 serum with attenuated PEDV DR13 in Vero cell detected by indirect immunofluorescence assay

注: A: Vero 细胞对照; B、C: 均为 PEDV DR13 感染 18 h 的 Vero 细胞; A、C: 一抗为抗 PEDV S2 截短肽兔血清; B: 一抗为阴性兔血清。箭头指向 PEDV 阳性的细胞。

Note: A: Vero cell control; B, C: Vero cell infected with attenuated PEDV DR13; A, C: Using anti-PEDV truncated S2 serum as the primary antibody; B: Using negative rabbit serum as the primary antibody. The arrow points to PEDV-positive cells.

2.4 PEDV S2 截短肽线性 B 细胞表位区的鉴定

SDS-PAGE 分析表明, 52 个覆盖 PEDV CV777 疫苗株 S2 截短肽全长、彼此重叠 8 个氨基酸残基的系列 16 肽除了 P46、P47 (位于 S 蛋白的跨膜区)外都能够有效表达, GST 融合表达的

重组 16 肽的在凝胶上显示为约 22 kD 的条带(图 8A、8C、8E、8G)。利用制备抗 PEDV S2 截短肽兔多抗血清为一抗, 通过 WB 筛选到 11 个阳性反应性 16 肽(包含线性 B 细胞表位), 它们分别是 P2、P14、P16、P34-P39 和 P51-P52 (图 8B、

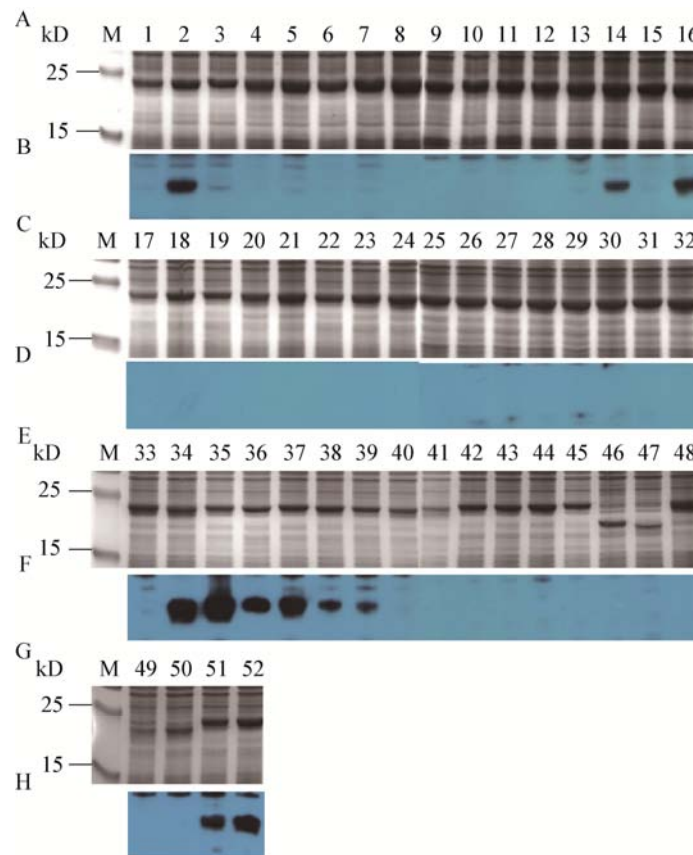


图 8 WB 筛选 PEDV S2 截短肽上的阳性反应性 16 肽

Figure 8 Screening of positive 16-mers on PEDV truncated S2 by using WB

注: A、C、E、G: SDS-PAGE 分析 GST 融合表达的 16 肽; B、D、F、H: WB 筛选线性 B 细胞表位; M: 蛋白质分子量标准; 1-52: 52 个 GST 融合表达的 16 肽, P1-P52.

Note: A, C, E, and G: SDS-PAGE analysis of GST fusion expressed 16-mers; B, D, F, and H: Screening of linear B cell epitopes on PEDV truncated S2 using WB; M: Protein marker; 1-52: Fifty-two GST fusion expressed 16-mers, P1-P52, respectively.

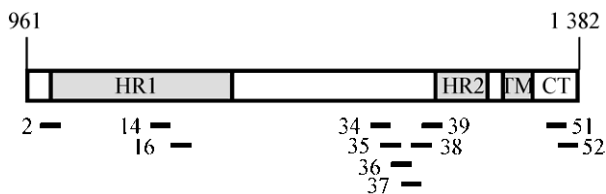


图 9 阳性反应性 16 肽在 PEDV S2 截短肽上的分布示意图  
Figure 9 Schematic diagram of positive 16-mers on PEDV truncated S2

注: HR1、HR2: 七肽重复序列 1 和 2; TM: 跨膜结构域; CT: 胞内结构域; 短横线: 11 个阳性反应性 16 肽, 编号同图 8.

Note: HR1, HR2: Heptad repeat region 1 and 2, respectively; TM: Transmembrane domain; CT: Cytoplasmic tail domain; Short segments: Eleven positive 16-mers, numbered as in Figure 8.

8D、8F、8H)。11 个包含线性 B 细胞表位的 16 肽在 PEDV S2 截短肽上的分布如图 9 所示, 其中 9 个包含线性 B 细胞表位 16 肽位于胞外区 (P2、P14、P16、P34-P39), 2 个 16 肽位于胞内区 (P51 和 P52), 没有在跨膜区鉴定到线性 B 细胞表位 (图 9)。

为了验证获得阳性反应性 16 肽能否被 PEDV 感染康复猪血清识别, 通过 WB 分析筛选到的阳性 16 肽与猪抗 PEDV 血清的反应性, 结果如图 10 所示。筛选到 11 个阳性反应性 16 肽都可以被猪抗 PEDV 血清识别, 而随机选



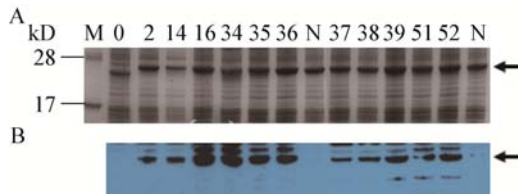


图 10 鉴定到的阳性反应性 16 肽与猪抗 PEDV 血清的反应性

Figure 10 Reactivity of identified positive 16-mers with porcine anti-PEDV serum

注: A: SDS-PAGE 分析的阳性反应性 16 肽; B: WB 验证阳性反应性 16 肽与猪抗 PEDV 血清的反应性; M: 蛋白质分子量标准; 0: 诱导后的转化 pXXGST-1 载体的 *E. coli* BL21; 2、14、16、34-39 和 51-52: 分别 11 个阳性反应性 16 肽, 编号同图 8; N: 阴性 16 肽(图 8 中 P45); 箭头指向 GST 融合表达的 16 肽的位置。

Note: A: SDS-PAGE analysis of the identified 16-mers; B: Reactivity of the identified 16-mers with anti-PEDV serum by WB analysis; M: Protein marker; 0: Induced *E. coli* BL21 transformed with empty pXXGST-1; 2, 14, 16, 34-39 and 51-52: Eleven identified positive 16-mers, respectively, numbered as in Figure 8; N: Negative 16-mer (P45 in Figure 8); The arrow points to the position of the 16-mers fused with GST.

择的 1 个阴性 16 肽和转化空载体 pXXGST-1 的重组 *E. coli* BL21 都没有在相应的位置出现特异性条带。

### 3 讨论与结论

当前乃至今后一段时间, PEDV 引起的腹泻仍将是严重危害仔猪健康的病毒性腹泻之一, 如何有效防控 PED 是养猪业面临的迫切问题。由于冠状病毒 S 蛋白在其入侵细胞过程中发挥关键功能, S 蛋白是诱导宿主体液免疫反应的重要免疫原性蛋白。最近的研究表明, 针对 S 蛋白的中和抗体可能在抵抗 PEDV 感染的保护中发挥关键作用<sup>[11]</sup>。国内外学者已经获得的具有中和活性的单克隆抗体主要识别 S 蛋白<sup>[19-20,24]</sup>, 目前已经在 PEDV S 蛋白的 S1、S1-S2 连接区和 C-端胞内区鉴定到 4 个表位区<sup>[19]</sup>。然而, 对于包含两个七肽重复序列在内的 S2 亚基的表位信息了解较少。本研究聚焦 PEDV S2 亚基的线性 B 细胞表位分布, 利用制备的抗 PEDV CV777 疫苗株 S2 截短肽(融合肽后片段)多抗

血清在 PEDV S2 亚基区鉴定到 4 个线性 B 细胞表位区 I-IV: 阳性反应性 16 肽 P2 位于 I 区(969-984 aa), P14 和 P16 位于 II 区(1 065-1 096 aa), P34-P39 位于 III 区(1 225-1 280 aa), P51-P52 位于 IV 区(1 361-1 382 aa)。

作为 I 型膜融合蛋白, PEDV S2 亚基(726-1 382 aa)包含典型的特征序列如: 疏水的融合肽(FP: 891-908 aa)、七肽重复序列 1 (HR1: 978-1 117 aa)、七肽重复序列 2 (HR2: 1 274-1 313 aa)、跨膜结构域(TM: 1 324-1 346 aa)以及羧基端胞内区(CT: 1 347-1 382 aa)。为了减少融合肽对 PEDV S2 表达的可能影响, 本研究表达了去除融合肽序列的 S2 截短肽并制备了其多克隆抗血清, 以制备的多抗血清为一抗, 采用改良的生物合成肽法<sup>[23]</sup>对 S2 截短肽上的线性 B 细胞表位区进行了鉴定, 除了 2 个位于 S 蛋白跨膜区的 16 肽(P46、P47)不能有效表达外, 利用制备的血清为一抗通过 WB 从 50 个 GST 融合表达的 16 肽中鉴定到 11 个阳性反应性 16 肽(图 8), 其中 3 个(P2、P14、P16)位于 S2 亚基的七肽重复序列 1 区, 6 个(P34-P39)位于两个七肽重复序列之间的区域, 2 个(P51-P52)位于其胞内区(图 9)。在 I 型膜融合蛋白介导的病毒囊膜与细胞膜的膜融合过程中, 需要融合蛋白(如 PEDV S2)的 HR1 和 HR2 反平行区形成稳定的六螺旋束结构, 使插入细胞膜的融合肽与跨膜结构域彼此紧密靠近, 从而启动膜融合过程<sup>[25]</sup>。因此, 推测识别本研究鉴定到的位于 HR1 和 HR2 以及它们之间区域表位的抗体将影响膜融合构象的形成, 进而阻碍膜融合过程。虽然理论上 S 蛋白的羧基端胞内区位于胞内, 不容易被宿主识别而产生特异性抗体, 特别是中和抗体, 但是 Cruz 等和 Okda 等相继获得了识别该区域表位的具有中和 PEDV 活性的单克隆抗体, 表明宿主可以产生针对该区域的体液免疫反应<sup>[16,19]</sup>。Cruz 等用 BALB/c 小鼠免疫实验证实, 包含该区域线性 B 细胞表位(<sup>1368</sup>GPRLQPY<sup>1374</sup>)的 24 肽可以诱导机体产生具有中和 PEDV 活性的抗

体<sup>[21]</sup>。本研究鉴定到的2个位于S蛋白胞内区的阳性反应性16肽(P51和P52)的共有序列也包含了上述GPRLQPY序列,但这两个阳性16肽是否含有其他的表位基序则需要通过最终最小表位基序鉴定完成后才能确定。

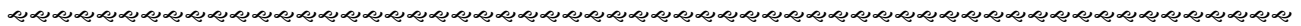
由于原核表达的S2截短肽和病毒粒子中的S蛋白对应肽段在动物宿主中的抗原递呈方式或递呈的表位可能不同,因此我们用WB验证了本研究筛选到的11个阳性反应性16肽与临床猪抗PEDV血清的反应性。虽然与猪抗PEDV多抗血清的反应性强弱存在差异,11个GST融合表达的阳性16肽都可以被猪抗PEDV血清特异性识别。到目前为止,利用单抗在PEDV S蛋白的C端只鉴定到一个线性B细胞表位基序<sup>1368</sup>GPRLQPY<sup>1374</sup><sup>[16]</sup>,本研究筛选到的阳性16肽是PEDV S蛋白的线性B细胞表位(如P51和P52包含GPRLQPY序列),还是其构象性表位的部分基序还有待进一步的验证。我们前期对小反刍兽疫病毒H、N蛋白的线性B细胞表位的研究也表明,采用本方法鉴定到的线性表位基序中包含单抗识别的线性表位基序或构象性表位的部分基序<sup>[23,26]</sup>。

本研究利用大肠杆菌成功表达了PEDV S2截短肽并制备了其多抗血清,利用改良的生物合成肽法鉴定到4个线性B细胞表位区。这为后续对PEDV S蛋白的功能研究及PEDV有效诊断方法的建立提供了理论依据和实验基础,同时也为本课题组正在开展的PEDV S蛋白线性B细胞表位精细作图提供了前期基础。

## REFERENCES

- [1] Jung K, Saif LJ. Porcine epidemic diarrhea virus infection: etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis[J]. *The Veterinary Journal*, 2015, 204(2): 134-143
- [2] Annamalai T, Saif LJ, Lu ZY, et al. Age-dependent variation in innate immune responses to porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling versus weaned pigs[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2015, 168(3/4): 193-202
- [3] Pensaert MB, Martelli P. Porcine epidemic diarrhea: A retrospect from Europe and matters of debate[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 1-6
- [4] Wood EN. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea[J]. *Veterinary Record*, 1977, 100(12): 243-244
- [5] 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
- [6] Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines[J]. *Virus Genes*, 2012, 44(2): 167-175
- [7] Wang D, Fang LR, Xiao SB. Porcine epidemic diarrhea in China[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 7-13
- [8] Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus[J]. *Virology Journal*, 2015, 12: 193
- [9] Huang YW, Dickerman AW, Piñeyro P, et al. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States[J]. *mBio*, 2013, 4(5): e00737-13
- [10] Yu RS, Dong SJ, Si FS, et al. Advances in reverse genetics to treat porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(2): 205-216 (in Chinese)  
于瑞嵩,董世娟,司伏生,等.猪流行性腹泻病毒反向遗传操作技术及其应用[J].*生物工程学报*, 2017, 33(2): 205-216
- [11] Song QY, Stone S, Drebes D, et al. Characterization of anti-porcine epidemic diarrhea virus neutralizing activity in mammary secretions[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 85-92
- [12] Hain KS, Joshi LR, Okda F, et al. Immunogenicity of a recombinant parapoxvirus expressing the spike protein of *Porcine epidemic diarrhea virus*[J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(10): 2719-2731
- [13] Makadiya N, Brownlie R, van der Hurk J, et al. S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein as a vaccine antigen[J]. *Virology Journal*, 2016, 13: 57
- [14] Oh J, Lee K, Choi HW, et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein[J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(11): 2977-2987
- [15] Sun DB. Identification of antigenic epitopes and screening receptor binding domain on the spike protein of porcine epidemic diarrhea virus[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008 (in Chinese)  
孙东波.猪流行性腹泻病毒S蛋白抗原表位鉴定及受体结合域的初步筛选[D].哈尔滨:中国农业科学院博士学位论文, 2008
- [16] Cruz DJM, Kim CJ, Shin HJ. Phage-displayed peptides having antigenic similarities with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) neutralizing epitopes[J]. *Virology*, 2006, 354(1): 28-34
- [17] Sun DB, Li F, Shi HY, et al. Identification of two novel B

- cell epitopes on porcine epidemic diarrhea virus spike protein[J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 131(1/2): 73-81
- [18] Chang SH, Bye JL, Kang TJ, et al. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Molecules and Cells*, 2002, 14(2): 295-299
- [19] Okda FA, 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
- [20] Li CH, Li WT, de Esesarte L, 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
- [21] Cruz DJM, Kim CJ, Shin HJ. The GPRLQPY motif located at the carboxy-terminal of the spike protein induces antibodies that neutralize *Porcine epidemic diarrhea virus*[J]. *Virus Research*, 2008, 132(1/2): 192-196
- [22] Andoh K, Ashikaga K, Suenaga K, et al. Identification of novel linear epitopes located in the infectious bronchitis virus spike S2 region[J]. *Avian Diseases*, 2018, 62(2): 210-217
- [23] Yu RS, Zhu R, Gao WX, et al. Fine mapping and conservation analysis of linear B-cell epitopes of peste des petits ruminants virus hemagglutinin protein[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 208: 110-117
- [24] Gong L, Lin Y, Qin JR, et al. Neutralizing antibodies against porcine epidemic diarrhea virus block virus attachment and internalization[J]. *Virology Journal*, 2018, 15: 133
- [25] Li WT, van Kuppeveld FJM, He QG, et al. Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 117-127
- [26] Yu RS, Fan XM, Xu WX, et al. Fine mapping and conservation analysis of linear B-cell epitopes of peste des petits ruminants virus nucleoprotein[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 175(1): 132-138



## 编辑部公告

### 邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

#### 关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

