

猪流行性腹泻病毒 S 蛋白受体结合域的分析

孙东波^{1,2}, 陈建飞¹, 时洪艳¹, 申识川¹, 吕茂杰¹, 范秀萍¹, 陈洪岩¹, 冯力^{1*}

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室/猪传染病研究室, 哈尔滨 150001; 2. 黑龙江八一农垦大学 动物科技学院, 大庆 163319)

摘要: 以猪流行性腹泻病毒(PEDV)可溶性的猪氨基肽酶 N 受体为靶蛋白对 PEDV S1 基因特异性文库进行 3 轮生物淘选, 然后对 30 个淘选的噬菌体克隆进行测序。序列分析发现, 2 个噬菌体克隆展示无义氨基酸序列, 其余 28 个噬菌体克隆展示的氨基酸序列位于 PEDV S 蛋白的第 249—529 位氨基酸区域, 这个区域被命名为 MRR。利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统对 MRR 基因进行真核表达。Western blot 结果表明, 表达的 MRR 重组蛋白能够与兔抗 PEDV 多克隆抗体反应。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; S 蛋白; 受体结合域

中图分类号: S852.659.6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)04-0528-05

Analysis of Receptor Binding Domain on the S Protein of Porcine Epidemic Diarrhea Virus

SUN Dong-bo^{1,2}, CHEN Jian-fei¹, SHI Hong-yan¹, SHEN Shi-chuan¹,

LV Mao-jie¹, FAN Xiu-ping¹, CHEN Hong-yan¹, FENG Li^{1*}

(1. Division of Swine Infectious Diseases, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China; 2. College of Animal Science and Technology, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, China)

Abstract: Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) S1 gene-targeted library was micropanned three times by using porcine aminopeptidase N (pAPN) as a cellular receptor of the PEDV, and thirty phage clones were sequenced using the specific primers. The result of sequence analysis indicated that polypeptides displayed by twenty-eight phage clones were focused on amino acids 249-529 (MER) of the S protein with the exception of two meaningless sequences. The MRR recombinant protein was expressed using Bac-to-Bac baculovirus expression kit. The result of Western blot demonstrated that MRR recombinant protein could react with rabbit antisera against PEDV.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus; S protein; receptor binding domain

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) 引起的以腹泻、呕吐、脱水和对哺乳仔猪高致死率为主要特征的一种高度接触性肠道传染病^[1]。PEDV 属于尼多病毒目 (Nidovirales) 冠状病毒科 (Coronaviridae) 冠状病毒属

(Coronavirus), 基因组是单股正链具有感染性的 RNA, 5' 端有 1 个帽子结构 (cap), 3' 端有 1 个 Poly (A) 尾。PEDV 结构蛋白包括纤突蛋白 (S)、膜蛋白 (M)、核衣壳蛋白 (N) 和包膜蛋白 (E), 其中 S 蛋白是位于病毒粒子表面的纤突糖蛋白, 在病毒粒子与细胞表面受体结合后通过膜融合侵入宿主细胞过程

收稿日期: 2008-05-30

作者简介: 孙东波 (1978-), 男, 汉族, 黑龙江密山人, 博士, 讲师, 主要从事动物病毒分子生物学研究

* 通讯作者: 冯力, E-mail: fl@hvri.ac.cn

中发挥重要的生物学作用^[2]。2007 年 Li 等证明 PEDV 的受体是猪氨基肽酶 N(pAPN)^[3]。PEDV 受体的揭示对病毒侵入机制的理解具有重要意义, PEDV 侵入机体的过程是病毒和受体二者之间相互作用的结果,因此,与病毒受体结合的受体结合域的研究对病毒侵入机制的揭示也具有同样重要的意义。迄今为止,关于 PEDV 受体结合域的相关研究尚未见报道。作者以 PEDV 细胞受体 pAPN 为靶蛋白,通过噬菌体展示技术对 PEDV S 蛋白的受体结合域进行了筛选,然后利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统对 MRR 基因进行真核表达,以揭示 PEDV S 蛋白 pAPN 受体结合域的氨基酸序列与结构特征,为 PEDV S 蛋白受体结合域的深入研究以及病毒侵入机制的探讨提供信息。

1 材料与方 法

1.1 质粒、细胞、菌种和肽库

E. coli DH10Bac 感受态细胞、pFastBacHTB 转移载体和 sf9 细胞由作者实验室保存;PEDV S1 基因阳性质粒(pMD18-TS1)和 S1 基因特异性肽库均由作者实验室构建^[4]。

1.2 仪器与试剂

低温培养箱(Incubator MIR-153, SANYO 公司);低温台式高速离心机(Allegra™ 21R centrifuge, 美国 Beckman 公司);PCR 仪(Gene Amp PCR System 2400 型, 美国 PERKIN-ELMER 公司);酶标仪为 BIO-RAD680;转印仪为 Bio-Rad SEMI-DRY TRANSFER CELL TRANS-BLOT SD。小量质粒纯化试剂盒及胶回收试剂盒购自 BioFlux 公司;ExTaq 聚合酶购自 TaKaRa 公司;T4 DNA Ligase、BamH I 和 Xho I 限制性内切酶均购自 Fermentas 公司;猪氨基肽酶 N(pAPN)购自 Sigma 公司;HRP 标记羊抗鼠 IgG 和 HRP 标记兔抗猪 IgG 均购自 Sigma 公司。

1.3 pAPN 对 PEDV S1 基因特异性肽库的淘选

以 pAPN 为靶蛋白,按 Smith 试剂盒程序对 PEDV S1 基因特异性肽库进行 3 轮生物淘选^[5]。第 1 轮生物淘选条件:pAPN 包被浓度为 $60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, TBST 洗液中 Tween-20 含量为 0.1%;第 2 轮生物淘选条件:pAPN 包被浓度为 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, TBST 洗液中 Tween-20 含量为 0.3%;第 3 轮生物淘选条件:pAPN 包被浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, TBST 洗液中 Tween-20 含量为 0.5%。

每一轮淘选噬菌体肽库加入量为 10^8 TUs(转导单位)。S1 基因特异性肽库第 3 轮生物淘选后,对其洗脱的噬菌体病毒粒子进行 TUs 滴定,滴定后随机挑取 30 个单菌落,按照 Smith 介绍方法提取噬菌体的双链复制型^[6],以提取的噬菌体基因组为模板,上游引物:5'-TTTTGGAGATTTTCAACGTG-3',下游引物:5'-CAGCCCTCATAGTTAGCGTA-3',进行 PCR 扩增, fuse I 空载体对照扩增大小为 201 bp, PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳中检测。用 BioFlux 公司的 BioSpin Gel Extraction Kit 对 PCR 产物进行纯化,然后对纯化的 PCR 产物进行测序。

1.4 MRR 重组蛋白的真核表达

1.4.1 MRR 基因重组 pFastBacHTB 转移载体的构建 以 pMD18-TS1 阳性质粒为模板,利用特异性引物 MRRG-F (5'-GGAGGATCCGGTTT-TAGTTTTAATAATTGG-3') 和 MRRG-R (5'-GATCTCGAGTTAAGATGCAATGAGGTTGG-C-3') 通过 PCR 扩增 pAPN 受体结合区的 MRR 基因。MRR 基因 PCR 产物用 BamH I 和 Sal I 限制性内切酶处理后克隆到 pFastBacHTB 转移载体,将阳性质粒命名为 pFastBacHTB-MRR。

1.4.2 MRR 基因重组杆粒的制备 pFastBacHTB-MRR 重组质粒转化 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞后涂布含 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那霉素、 $7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 庆大霉素、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 四环素、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ X-gal 和 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ IPTG 的 LB 平皿, 37°C 培养 48 h。挑取 LB 平板上的单个白色菌落接种于含 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那霉素、 $7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 庆大霉素、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 四环素的 LB 液体培养基,于 37°C 过夜振荡培养。用碱裂解法提取质粒 DNA,提取的质粒 DNA 用酚/氯仿(1:1)抽提 1 次,然后用 $40 \mu\text{L}$ TE(pH8.0)溶解 DNA 沉淀,贮存于 4°C 。以提取的质粒 DNA 为模板,用 M13 Forward (-40) (5'-GTTTTTCCCAGTCACGAC-3') 和 M13 Reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') 为特异性引物进行 PCR 扩增,PCR 产物于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳中检测,将阳性的重组杆粒命名为 MRR-Bacmid。

1.4.3 MRR 基因重组杆状病毒的制备与鉴定

1.4.3.1 MRR 重组杆状病毒的制备:将 $2 \mu\text{g}$ MRR-Bacmid 质粒和 $7 \mu\text{L}$ 脂质体分别稀释于 $100 \mu\text{L}$ Grace's 培养基中,然后将二者的稀释液混合,在室温下作用 45 min。向混合液中加入 $800 \mu\text{L}$

Grace's 培养基,旋涡振荡混匀后加入到培养 sf9 细胞的 6 孔板中,27 °C 培养 5 h,同时设脂质体转染和正常 sf9 细胞对照。转染 5 h 后,小心吸去转染混合液和转染对照液,加 2 mL Grace's 完全培养基(含 10%胎牛血清),27 °C 继续培养的同时观察细胞病变,培养到 96 h 时收取上清,500×g 离心去掉细胞碎片得到 P1 代病毒。将第 1 代重组病毒在 sf9 细胞传 3 代,得到高滴度的第 4 代重组病毒。

1.4.3.2 MRR 重组杆状病毒 PCR 鉴定:按 Bacto-Bac 杆状病毒表达系统的操作说明提取 MRR 重组杆状病毒的基因组 DNA,然后以 MRR 重组杆状病毒的基因组 DNA 为模板,利用 M13 Forward (-40) (5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3') 和 M13 Reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') 引物进行 PCR 扩增,PCR 产物于 0.8%琼脂糖凝胶电泳中检测。

1.4.3.3 MRR 重组蛋白的表达检测:MRR 重组杆状病毒感染 sf9 细胞 72 h 后收获细胞(6 孔培养板),用 PBS 洗涤细胞 3 次后,用 200 μL PBS 将细胞吹下,混匀后进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.5 MRR 重组蛋白的免疫活性分析

MRR 重组蛋白的免疫活性通过 Western blot 检测,具体程序如下:MRR 重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后转印至 NC 膜,用 5%脱脂乳封闭 1 h,然后与兔抗 PEDV 多克隆血清(1:100)在 37 °C 条件下作用 1 h,PBST 洗 3 次后与 HRP-羊抗兔 IgG(1:2 000)在 37 °C 条件下作用 1 h,PBST 洗 3 次,用 DAB 底物对其进行显色。

2 结果

2.1 PEDV S1 基因特异性肽库的 pAPN 淘选

用 pAPN 对 PEDV S1 基因特异性肽库进行 3 轮生物淘选,对第 3 轮洗脱后的噬菌体进行 TUs 滴定,然后随机挑取 30 个噬菌体克隆,用特异性引物通过 PCR 扩增噬菌体展示氨基酸的编码基因,然后对 PCR 产物进行测序,分析与 pAPN 结合的氨基酸序列。PCR 结果显示,淘选噬菌体展示片段为 100~300 bp(图 1)。序列分析结果表明,P14 和 P24 两个噬菌体克隆展示无义氨基酸序列,其余 28 个噬菌体克隆展示的氨基酸序列位于 PEDV S 蛋白的第 249-529 位氨基酸区域,这个区域被命名为 MRR。



1~8. 噬菌体克隆 P1~P8 的 PCR 扩增结果;9、18. DNA marker DL2000;10、19. fuse I 载体 PCR 扩增结果;11~17. 噬菌体克隆 P9~P15 的 PCR 扩增结果;20~34. 噬菌体克隆 P16~P30 的 PCR 扩增结果

1-8. PCR products of P1-8 phage clones; 9,18. DNA marker DL2000; 10,19. PCR products of fuse I vector; 11-17. PCR products of P9-15 phage clones; 20-34. PCR products of P16-30 phage clones

图 1 pAPN 淘选噬菌体克隆 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of the S1 gene library micropanned by pAPN

2.2 MRR 基因重组 pFastBacHTB 真核表达载体的构建

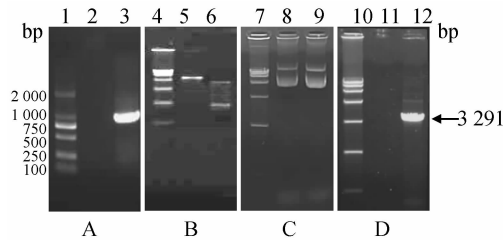
以 pMD18-TS1 质粒为模板利用特异性引物通过 PCR 扩增 MRR 基因,扩增片段与预期的 861 bp 相符(图 2A)。MRR 片段经 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切后成功克隆到 pFastBacHTB 载体,将阳性质粒命名为 pFastBacHTB-MRR(图 2B)。pFastBacHTB-MRR 质粒转化 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞后,提取质粒 DNA,利用 M13 Forward(-40)和 M13 Reverse 引物进行 PCR 鉴定,结果表明,扩增的片段与预期的 3 291 bp 相符(载体 2 430 bp,目的基因 861 bp),并将阳性的重组杆粒命名为 MRR-Bacmid(图 2 C、D)。

2.3 MRR 基因重组杆状病毒的制备及鉴定

MRR-Bacmid 重组杆粒转染 sf9 细胞 72 h 后,与对照 sf9 细胞相比,转染 MRR-Bacmid 质粒的 sf9 细胞出现了明显的细胞病变(CPE)(图 3)。收集 MRR 第 1 代重组病毒后,用 sf9 细胞传至第 4 代,然后提取 MRR 第 4 代重组病毒的基因组 DNA,利用 M13 Forward(-40)和 M13 Reverse 引物进行 PCR 鉴定,PCR 扩增片段为 3 300 bp 左右,结果证明获得的杆状病毒含有 MRR 基因(图 4)。

2.4 MRR 重组蛋白的表达与免疫活性鉴定

将感染 MRR 重组病毒的 sf9 细胞进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果在 35 ku 左右出现特异性的

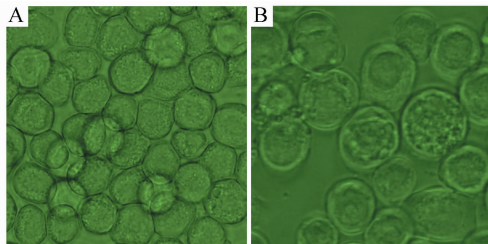


1. DL2000 DNA marker; 2, 11. 相应 PCR 阴性对照; 3. 自 pMD18-TS1 扩增的 MRR; 4, 7, 10. DL15000 DNA marker (15 000、10 000、7 500、5 000、2 500、1 000 bp); 5. pFastBacHTB-MRR 的 *Bam*H I 单酶切鉴定; 6. pFastBacHTB-MRR 的 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定; 8, 9. MRR-Bacmid 重组杆粒; 12. MRR-Bacmid PCR 扩增产物

1. DNA marker DL2000; 2, 11. PCR control; 3. PCR products of the MRR gene; 4, 7, 10. DNA marker DL15000 (15 000, 10 000, 7 500, 5 000, 2 500, 1 000 bp); 5. Restriction enzyme identification of recombinant plasmid pFastBacHTB-MRR by *Bam*H I; 6. Restriction enzyme identification of pFastBacHTB-MRR by *Bam*H I and *Xho* I; 8, 9. The recombinant MRR-Bacmid; 12. PCR products of MRR-Bacmid

图 2 MRR 基因重组杆粒的构建及鉴定

Fig. 2 Construction and identification of the recombinant Bacmid of the gene MRR



A. 接种转染试剂的 sf9 细胞对照; B. 转染 MRR-Bacmid 的 sf9 细胞

A. sf9 cells transfected by Cellfectin® reagent; B. sf9 cells transfected by MRR-Bacmid

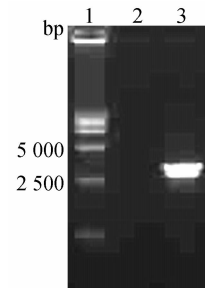
图 3 MRR-Bacmid 转染 sf9 细胞后的细胞病变 200×

Fig. 3 The cytopathic effect (CPE) of sf9 cells transfected by MRR-Bacmid 200×

条带,说明 MRR 重组蛋白得到了表达。Western blot 结果表明,表达的 MRR 重组蛋白能够与 PEDV 多克隆血清反应(图 5)。

3 讨论

冠状病毒是引起人和动物的肠道、呼吸道和神经系统疾病的一个重要病毒属。大量资料显示,冠

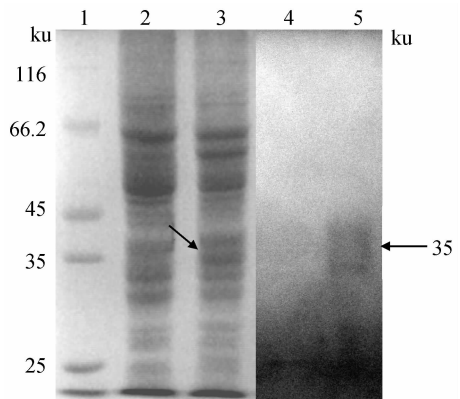


1. DL15000 DNA marker; 2. PCR 对照; 3. MRR 重组杆状病毒 PCR 扩增产物

1. DNA marker DL15000; 2. PCR control; 3. PCR products of the genome of MRR recombinant baculovirus

图 4 MRR 重组杆状病毒 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification of the MRR recombinant baculovirus by PCR



1. 蛋白质相对分子质量标准; 2. sf9 细胞对照; 3. 感染 MRR 重组杆状病毒的 sf9 细胞; 4. sf9 细胞 Western blot 对照; 5. 感染 MRR 重组杆状病毒 sf9 细胞的 Western blot

1. Protein marker; 2. sf9 cells control; 3. sf9 cells infected by MRR recombinant baculovirus; 4. Western blot control of sf9 cells; 5. Western blot of sf9 cells infected by MRR recombinant baculovirus

图 5 MRR 重组蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Fig. 5 SDS-PAGE and Western blot analysis of the recombinant protein MRR

状病毒引起的病理变化主要是由其 S 蛋白的受体结合域与病毒细胞受体相互作用导致病毒侵入机体后造成的,因此,冠状病毒的细胞受体和受体结合域的研究显得至关重要。当前,冠状病毒细胞受体的研究报道较多,而且得到了广泛而深入的研究;相反,关于冠状病毒受体结合域的研究报道较少。目前,在冠状病毒中,猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、人冠

状病毒 229E (HCoV-229E)、鼠肝炎病毒(MHV)和 SARS-冠状病毒(SARS-CoV)的受体结合域已经被鉴定,而且鉴定的受体结合域均位于 S 蛋白的 S1 区^[6-9]。

PEDV 属于冠状病毒科冠状病毒 I 群成员,其 S 蛋白的结构与功能与其它冠状病毒 S 蛋白相似。早期的研究已经证明,冠状病毒 I 群成员中的 TGEV、HCoV-229E、猫传染性腹膜炎病毒(FIPV)和犬冠状病毒(CCoV)的细胞受体均是各自宿主的氨基肽酶 N^[10-12]。随后, Li 等构建了表达猪氨基肽酶 N(pAPN)的 PEDV 非易感的犬肾细胞系(MDCK),然后用 PEDV 感染表达 pAPN 的 MDCK 细胞,结果显示, pAPN 能够支持 PEDV 感染其非易感的 MDCK 细胞,并引起明显的细胞病变,同时抗 pAPN 的多克隆血清能够抑制 PEDV 感染 MDCK 细胞, RT-PCR 和间接免疫荧光(IFA)试验结果表明在被感染的 MDCK 细胞中存在着 PEDV 的病毒粒子^[3]。这个研究结果证明,猪氨基肽酶 N(pAPN)也是 PEDV 的受体。猪氨基肽酶 N(pAPN)是相对分子质量为 150 ku 的跨膜糖蛋白,在猪小肠黏膜中高水平表达,其表达量占分化肠细胞顶膜中蛋白总量的 8%,主要功能是从 N-端水解蛋白多肽^[10]。pAPN 属于典型的 II 型糖蛋白,胰酶能将其切割成 N-端亚基(95 ku)和 C-端亚基(50 ku),从猪肾分离的 pAPN 一般以完整的 pAPN、N-端亚基和 C-端亚基混合形式存在^[13]。PEDV 细胞受体的鉴定为 PEDV 感染机制的探讨以及 PEDV 细胞受体结合域的鉴定奠定了基础。本试验中作者利用 fd 丝状噬菌体展示技术在 PEDV S 蛋白上鉴定了 1 个与 pAPN 受体结合的区域,这个受体结合域位于 S 蛋白的第 249-529 位氨基酸区域(MRR)。利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统成功地表达了 MRR 重组蛋白,进一步的 Western blot 结果显示,表达的 MRR 重组蛋白能够与 PEDV 多克隆抗体反应。本试验的研究结果为 PEDV 受体结合域的深入研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] PENSART M B, DEBOUCK P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine[J]. *Arch Virol*, 1978, 58: 243-247.
- [2] Holmes K. Coronaviruses [M]//Fields Virology. KNIPE D M, HOWLEY P M, GRIFFIN D E. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 1187-1197.
- [3] LI B X, GE J W, LI Y J. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus[J]. *Virology*, 2007, 365: 166-172.
- [4] 孙东波, 朗洪武, 时洪艳, 等. PEDV S 蛋白 B 细胞抗原表位的筛选和鉴定[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34: 971-977.
- [5] SMITH G P. Affinity selection [M/OL]. [2005b 2006-05-15]. <http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/PhageDisplayWebsite/AffinitySelection.doc>.
- [6] GODET M, GROSCLAUDE J, DELMAS B, et al. Major receptor-binding and neutralization determinants are located within the same domain of the transmissible gastroenteritis virus (coronavirus) spike protein[J]. *J Virol*, 1994, 68: 8008-8016.
- [7] KUBOTA S, SASAKI O, AMIMOTO K, et al. Detection of porcine epidemic diarrhea virus using polymerase chain reaction and comparison of the nucleocapsid protein genes among strains of the virus[J]. *J Vet Med Sci*, 1999, 61: 827-830.
- [8] BONAVIA A, ZELUS B D, WENTWORTH D E, et al. Identification of a receptor-binding domain of the spike glycoprotein of human coronavirus HCoV-229E[J]. *J Virol*, 2003, 77: 2530-2538.
- [9] BABCOCK G J, ESSHAKI D J, THOMAS W D, et al. Amino acids 270 to 510 of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein are required for interaction with receptor[J]. *J Virol*, 2004, 78: 4552-4560.
- [10] DELMAS B, GELFI J, HARIDON L R, et al. Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV [J]. *Nature*, 1992, 357: 417-420.
- [11] ANNETTE H, ANDREAS F K. Characterization of determinants involved in the feline infectious peritonitis virus receptor function of feline aminopeptidase N [J]. *J Gen Virol*, 1998, 79: 1387-1391.
- [12] CLAUDE L, NATHALIE A, NEIL R C, et al. Involvement of aminopeptidase N (CD13) in infection of human neural cells by human coronavirus 229E[J]. *J Virol*, 1998, 72: 6511-6519.
- [13] DELMAS B, GELFI J, KUT E, et al. Determinants essential for the transmissible gastroenteritis virus-receptor interaction reside within a domain of aminopeptidase-N that is distinct from the enzymatic site[J]. *J Virol*, 1994, 68: 5216-5224.