

祁光宇, 刘 斌, 赵兴绪, 等. 猪流行性腹泻病毒 HB2015 分离株 *N* 基因表达及单克隆抗体的制备[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(1): 76-80.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.01.011

猪流行性腹泻病毒 HB2015 分离株 *N* 基因表达及单克隆抗体的制备

祁光宇^{1,2}, 刘 斌^{1,2}, 赵兴绪¹

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 中农威特生物科技股份有限公司, 甘肃 兰州 730046)

摘要: 根据已经发表的猪流行性腹泻病毒 *N* 基因序列 (GenBank: KX016034.1), 设计 1 对特异性引物 (上、下游分别插入 *Bam* H I 和 *Xho* I 酶切位点), 通过 RT-PCR 技术扩增 *N* 基因, 在测序鉴定正确后经 *Bam* H I 和 *Xho* I 双酶切, 将其克隆至原核表达载体 pET-32a 上, 获得重组表达质粒 pET32a-*N*。表达的蛋白质经纯化后进行 Western blotting 鉴定分析。以表达的 PEDV-*N* 蛋白作为抗原, 免疫 BALB/c 小鼠, 取其脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合, 经间接 ELISA 筛选及亚克隆, 获 2 株 PEDV-*N* 特异性单克隆抗体。对获得的单抗进行 Western blotting 鉴定和间接免疫荧光试验 (IFA) 分析, 结果显示 2 株单抗均能与 PEDV-*N* 蛋白特异性结合和识别。以上结果表明 PEDV-*N* 蛋白在大肠杆菌中成功表达, 且成功制备了 2 株具有生物学活性的特异单抗, 为建立 PEDV 金标试纸诊断方法奠定了基础。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; *N* 基因; 原核表达; 单克隆抗体; IFA 分析

中图分类号: S858.282.65 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2018)01-0076-05

Expression of *N* gene of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) HB2015 strain and preparation of monoclonal antibodies against PEDV

QI Guang-yu^{1,2}, LIU Bin^{1,2}, ZHAO Xing-xu¹

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Agricultural Veterinary Biological Science and Technology Co., Ltd, Lanzhou 730046, China)

Abstract: According to the published sequence (GenBank: KX016034.1) of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) *N* gene, a pair of primers (*Bam* H I enzyme site was inserted in upstream primers and *Xho* I enzyme site was inserted in downstream primers) were designed, and *N* gene was amplified by RT-PCR. The fragment after sequencing identification and vector pET-32a were digested by *Bam* H I and *Xho* I, and then the fragment was inserted into prokaryotic expression vector pET-32a to construct recombinant plasmid pET32a-*N*. The expression protein was purified, and then was identified by Western blotting. Using the *N* protein of PEDV as the antigen hybridoma cell lines stably secreting monoclonal antibody against *N* protein of porcine epidemic diarrhea virus were generated by fusing SP2/0 myeloma cells with splenocytes from the immunized BALB/c mice. Two hybridoma cell lines secreting monoclonal antibody suitable for *N* protein of

PEDV were established by indirect ELISA and subcloning. Western blotting identification and IFA analysis of obtained monoclonal antibodies were conducted. The results showed that monoclonal antibodies could specifically bind and identify *N* protein of PEDV. The above results indicated that PEDV-*N* protein was successfully expressed in *Escherichia coli* and specific monoclonal antibodies with biologi-

收稿日期: 2017-06-02

基金项目: 甘肃省科技计划项目 (1104NKCA167)

作者简介: 祁光宇 (1978-), 男, 辽宁辽阳人, 博士, 助理研究员, 从事分子病毒学与免疫学研究。 (E-mail) qiguangyu0931@126.com

通讯作者: 赵兴绪, (E-mail) zhaoxx@gsau.edu.cn

cal activity were successfully prepared, which laid the foundation for establishing of colloidal gold strip for PEDV detection.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus; *N* gene; prokaryotic expression; monoclonal antibody; indirect immunofluorescence assay (IFA) analysis

猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 引起的一种急性、高度传播性的猪特别是仔猪肠道疾病,以猪急性肠炎、水样腹泻、呕吐和严重脱水为主要特征^[1-2]。中国在 2010 年 PEDV 出现新的变异株^[3]。这些新变异株造成较高的新生仔猪和哺乳猪发病率和死亡率^[4]。PEDV 感染不但给养猪业造成巨大经济损失,并且导致国内猪肉价格上涨。

PEDV 基因组为单股正链 RNA, 整个基因组长约为 28 Kb, 编码的必须结构蛋白质有 4 种, 分别为突蛋白 (S)、小膜蛋白 (sM)、膜蛋白 (M) 和核蛋白 (N)^[5-6]。PEDV 的核心部分是 N 蛋白与基因组 RNA 结合形成的螺旋状核蛋白体。N 蛋白是 PEDV 已知结构蛋白中唯一的磷酸化蛋白, 也是组成病毒核衣壳的结构基础。除此之外, N 蛋白还具有保守性强的特点, 而猪在感染 PEDV 的早期, 体内就能产生高水平的抗 N 蛋白抗体。因而利用 N 蛋白建立 PEDV 分子生物学诊断技术具有很好的应用前景^[7]。猪流行性腹泻与猪传染性胃肠炎、轮状病毒病和细菌性腹泻等从临床症状上很难区分^[8], 必须进行实验室检测才能确诊。目前, 检测猪流行性腹泻病毒的主要方法有反转录聚合酶链反应 (RT-PCR)、抗原酶联免疫吸附试验 (ELISA)、免疫组化等^[9-10], 这些方法费时费力, 所以快速、准确的实验室诊断方法对于猪流行性腹泻的监测和防控具有重要意义。本研究以原核表达的 N 蛋白为基础制备单克隆抗体, 以期为进一步研制猪流行性腹泻病快速诊断方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和主要试剂

猪流行性腹泻病毒 B2015 株由中农威特研发中心分离保存。载体 pET-32a(+) 由本实验室保存。T-Vector pMDTM 19 (Simple)、PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、TaKaRa Ex Taq[®] 试剂盒、限制性内切酶为宝日医生物技术有限公司产品, One Step RT-PCR Kit、Gel Extraction Kit D2500 琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂、Vi-

ral RNA Kit 为 OMEGA 公司产品, 克隆 DH5 α 感受态细胞、表达 BL21 (DE3) 感受态细胞、HRP 标记的羊抗鼠 IgG、FITC 标记的羊抗鼠 IgG、DMEM 培养基、胎牛血清为全式金公司产品, His-trap HP 型镍离子亲和层析柱为 GE 公司产品。其他常规试剂为国产分析纯。

1.2 引物设计与合成

根据国内近几年猪流行性腹泻病毒株, 参考 GenBank 中 KX016034.1 全基因组序列设计 1 对特异引物扩增 *N* 基因。根据载体酶切位点的要求, 引物分别加入 *Bam* H I 和 *Xho* I 位点, 引物 NF 序列为 5'-AACGGATCCATGGCTTCTGTCAGTTTTC-3', NR 为 5'-AGACTCGAGTTAATTTCTGTATCGAAG-3'。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.3 病毒总 RNA 提取与 One Step RT-PCR 扩增

按照 Viral RNA Kit 试剂盒说明书提取猪流行性腹泻病毒 B2015 株的基因组 RNA。以提取的 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 扩增 *N* 基因。反应体系: 5 \times Reaction buffer 10 μ l, Template RNA 10 μ l, Sense primer (10 μ mol/L) 1 μ l, Anti-sense primer (10 μ mol/L) 1 μ l, M-MLV RTase/*Taq* DNA Polymerase Mix 1 μ l, Nuclease-free water 271 μ l。反应程序: 42 $^{\circ}$ C 30 min, 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 电泳产物用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行纯化。

1.4 表达载体的构建与鉴定

将回收产物连接至 T-Vector pMDTM 19 (Simple) 载体上, 并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养后挑取单菌落接种至含 100 μ g/ml 氨苄青霉素 (Amp⁺) 的 LB 液体培养基中增殖培养, 提取重组质粒进行鉴定和测序。将测序正确的重组质粒 pMDTM 19-*N* 和质粒 pET32a(+) 用 *Bam* H I 和 *Xho* I 两种内切酶进行酶切, 对两种酶切产物进行切胶回收后, 使用 T4 DNA ligase 分别连接同样经酶切后的质粒 pET32a(+) 和质粒 pMDTM 19-*N*, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接后的产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 并涂布于 Amp⁺LB 固体培养基平板中, 培养

板倒置于 37 ℃ 培养箱中过夜培养。挑取单菌落至 Amp+LB 液体培养基中增殖培养,提取质粒进行酶切和 PCR 鉴定、测序。质粒测序由宝日医生物技术有限公司进行。

1.5 重组 N 蛋白的表达、鉴定及纯化

将测序正确的重组质粒 pET32a-N 转化至大肠杆菌 BL21(DE3) Chemically Competent Cell 感受态细胞,并涂布于 Amp+LB 平板中,挑取单菌落至 Amp+LB 液体培养基中培养活化,加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 在 37 ℃ 条件下诱导表达 5 h。将不同时间收集的菌液 12 000 r/min 离心 5 min,弃上清。沉淀用 50 μ l PBS 重悬后加等量的 2 \times SDS 凝胶上样缓冲液,沸水煮 10 min 后进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.6 表达蛋白纯化及动物免疫

将大量表达的细菌沉淀用 Binding Buffer 重悬并用超声波裂解菌体,离心取上清部分,参照 His-trap HP 型镍离子亲和层析柱说明书纯化蛋白质。将所得蛋白质免疫 6 周龄 BALB/c 小鼠,同时做空白对照,在融合前 3 d 每只小鼠腹腔注射 200 μ g 进行加强免疫。

1.7 PEDV-N 蛋白单抗的制备

小鼠尾静脉取血,用 ELISA 方法测定各小鼠血清效价,效价高于 1:10 000 的鼠脾脏细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞按聚乙二醇(PEG)方法进行杂交融合。用间接 ELISA 对杂交瘤细胞上清液进行筛选,阳性孔再经过 3 次有限稀释法进行亚克隆^[11],待阳性率达到 100% 时扩大培养,用于制备腹水,并保存于液氮。参照文献^[12]制备腹水,待小鼠腹部膨大后抽取腹水,离心取上清液。

1.8 单克隆抗体 Western blot 检测

将 PEDV 感染的细胞用细胞裂解液和 SDS 处理,进行 SDS-PAGE 试验,转 PVDF 膜后封闭。以制备的单克隆抗体反应 1 h, TBST 洗涤后加入 HRP 标记羊抗鼠 IgG 反应 1 h, TBST 洗涤后显色进行鉴定。同时设立空质粒表达的菌体蛋白为阴性对照组。

1.9 单克隆抗体的间接免疫荧光试验(IFA)检测

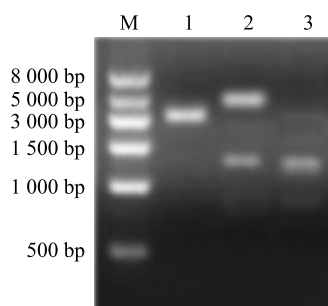
用 PEDV 感染接种于 24 孔细胞板的 Vero 细胞。培养至出现明显病变时,先用甲醛固定细胞,PBS 洗涤之后加入 PBSA 封闭 1 h。PBS 洗涤后加入制备的单克隆抗体反应 1 h, PBS 洗涤干净,并

加入绿色荧光二抗反应 1 h,洗涤干净后进行荧光观察。同时设未感染的细胞作空白对照。

2 结果

2.1 PEDV N 基因重组表达质粒 pET-32a-N 的鉴定

对重组质粒 pET-32a-N 进行 Bam H I、Xho I 双酶切和 PCR 后进行电泳,分别在约 6 000 bp 和 1 326 bp 处出现明亮的条带,与预期大小一致(图 1)。测序结果显示与标准基因同源率为 100%,说明已成功构建了猪流行性腹泻病毒 N 基因原核表达载体 pET-32a-N。



M: DNA 标准 DL 8000; 1: 重组表达质粒 pET-32a-N 对照; 2: pET-32a-N 的 Bam H I、Xho I 双酶切; 3: N 基因的 PCR 产物。

图 1 猪流行性腹泻病毒 N 基因重组表达质粒 pET-32a-N 的鉴定

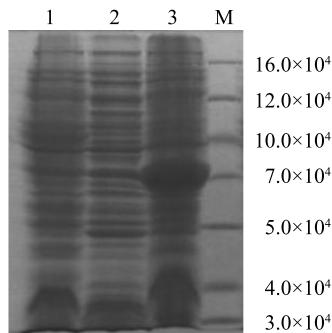
Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pET-32a-N of porcine epidemic diarrhea virus N gene

2.2 重组 N 蛋白的诱导表达和纯化

含有重组质粒的 *E. coli* BL21(DE3) 经 IPTG 诱导表达后, SDS-PAGE 电泳分析结果显示有 1 条分子量约为 6.8×10^4 大小的蛋白质条带,与预期大小一致,说明重组质粒在大肠杆菌中成功表达(图 2)。将纯化后的蛋白质经 SDS-PAGE 电泳后,转印到 NC 膜上,用猪流行性腹泻阳性血清进行 Western blotting 鉴定。结果显示,在分子量约 6.8×10^4 处可见特异性条带,而菌体蛋白无条带(图 3)。

2.3 阳性杂交瘤细胞的筛选

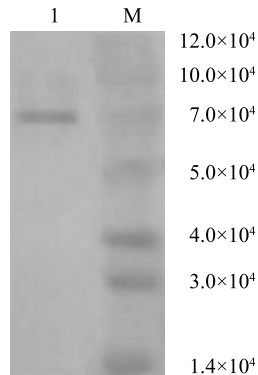
用 ELISA 方法筛选得到稳定的阳性杂交瘤细胞。将初步筛选出的阳性杂交瘤细胞再经 3 次亚克隆,共获得 2 株稳定分泌抗 N 蛋白的杂交瘤细胞株,分别命名为 C5D3 和 H3E7,将其扩大培养后保存于液氮备用。



M:蛋白质分子质量标准;1:诱导后的 pET-32a(+)空载体;2:未诱导的 pET-32a-N/*E. coli* BL21(DE3)重组菌;3:诱导后的 pET-32a-N/*E. coli* BL21(DE3)重组菌。

图2 重组N蛋白的SDS-PAGE分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of recombinant N protein



M:蛋白质分子质量标准;1:纯化N蛋白。

图3 纯化的重组N蛋白Western blotting分析

Fig.3 Western blotting analysis of purified recombinant N protein

2.4 单克隆抗体 C5D3 和 H3E7 的 Western blotting 鉴定

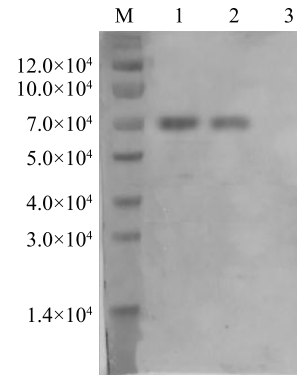
2株单抗C5D3和H3E7均可特异性识别N蛋白,在分子量约 6.8×10^4 处出现特异性条带,而与空质粒表达的菌体蛋白不发生反应(图4)。

2.5 单克隆抗体 C5D3 和 H3E7 的 IFA 分析

IFA检测结果显示,感染PEDV病毒的细胞出现明显绿色荧光,而对照组无荧光出现(图5),证明这2个单抗能特异地识别和结合PEDV病毒N蛋白。

3 讨论

中国近几年PED的发病率、死亡率均呈明显上升趋势,特别是从2010年10月以后,PED在中国广



M:蛋白质分子质量标准;1:C5D3株;2:H3E7株;3:阴性对照。

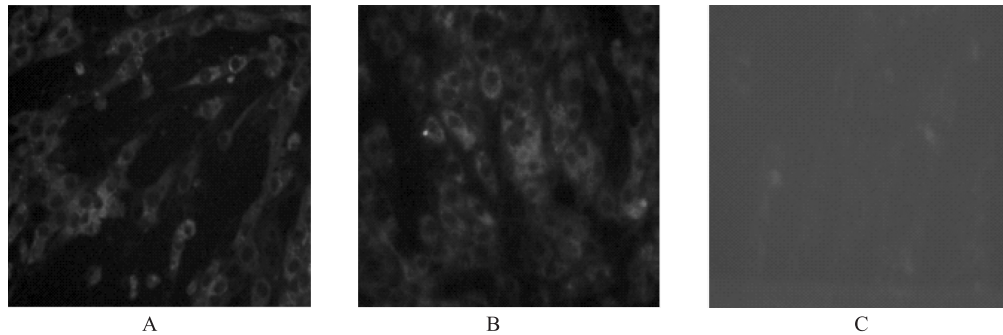
图4 单抗C5D3和H3E7株的Western blotting分析

Fig.4 Western blotting analysis of monoclonal antibody of C5D3 and H3E7

泛流行并出现新的变异株。感染PEDV后,哺乳仔猪死亡率可达80%~100%,但繁殖母猪和公猪感染后很少表现出临床症状。PED大规模暴发的最主要原因是病毒的变异,这给PED的防控带来了新的挑战^[13]。

在PEDV合成过程中,N蛋白既能与病毒RNA缠绕成为病毒粒子的核衣壳,又能结合磷脂和细胞膜,促进形成RNA复合体,对病毒组装有重要作用^[5-6]。同时N蛋白的保守性很高,在猪感染早期,机体就可以产生抗N蛋白抗体,所以N蛋白可以作为早期诊断的靶蛋白,同时可以用于研制开发抗PEDV的表位疫苗^[14]。

本试验通过构建PEDV N基因重组质粒pET-30a-N,然后以纯化后的PEDV-N蛋白为免疫原免疫小鼠,成功制备了2株抗PEDV的单克隆抗体。经ELISA和IFA方法检验,制备的单抗均能与PEDV N蛋白和PEDV结合。在试验过程中,发现对杂交瘤细胞系定期克隆化检测抗体水平是很有必要的,其目的是防止杂交瘤细胞在长期传代过程中丧失分泌抗体的功能,影响后续试验的进行。对杂交瘤细胞稳定性分析结果显示,2株单抗分泌能力稳定性良好,未出现急性下降甚至消失的情况。在制备腹水过程中发现,C5D3株单抗细胞产生腹水量很少,H3E7株细胞产生的腹水量比较多。其中腹水量少的原因:一是于注射石蜡后7d就注射细胞,时间过早;二是细胞量过多也会引起腹水过少或不出现,出现实体瘤现象^[14]。



A: C5D3 株; B: H3E7 株; C: 阴性对照。

图 5 单克隆抗体 C5D3 和 H3E7 与感染 PEDV 的 Vero 细胞 IFA 试验

Fig.5 The indirect immunofluorescence assay (IFA) of PEDV in Vero cells with monoclonal antibody of C5D3 and H3E7

快速、准确以及操作简单易行的诊断方法是有效防控疫病的基础和前提条件。近年来在 PED 诊断方法上取得了很大进展,目前已经有很多新技术应用于 PED 的诊断,比如 ELISA、RT-PCR 和免疫荧光技术^[15]。虽然这些检测方法准确率较高,但所需试剂繁多、经济成本高,且有设备和技术要求,难以在基层推广普及^[16]。胶体金免疫层析法(GICA)是近些年发展起来的一种以抗原抗体特异性反应为基础的免疫检测技术,可以弥补仪器检测方法的不足,在现场检测方面具有广阔的应用前景^[17]。本试验成功制备并鉴定了抗 PEDV-N 蛋白单克隆抗体,为猪流行性腹泻病毒金标试纸条检测方法的建立奠定了坚实基础。

参考文献:

- [1] 施开创,龙飞翔,栗艳琼,等.猪流行性腹泻病毒强毒株和疫苗株多重 RT-PCR 鉴别检测方的建立及应用[J].中国兽医科学,2017,47(1):1-8.
- [2] 杨云乔,郑建高,姜军华,等.复方中药治疗流行性腹泻病毒感染猪的消化道黏膜电镜观察及相关酶检测[J].江苏农业科学,2017,45(17):159-163.
- [3] CIMA G. Fighting a deadly pig disease: industry, veterinarians trying to contain PED virus, new to the US. J. Am[J]. Vet Med Assoc, 2013, 243:469-470.
- [4] WANG J, ZHAO P, GUO L, et al. Porcine epidemic diarrhea virus variants with high pathogenicity[J]. China Emerg Infect Dis, 2013, 19: 2048-2049.
- [5] 杨敏.猪流行性腹泻病毒结构蛋白基因的克隆与特征分析[D].兰州:甘肃农业大学,2007.
- [6] CHEN J F, SUN D B, WANG C, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of membrane proteins of porcine epidemic diarrhea virus isolates in China[J]. Virus Genes, 2008, 36:355-364.
- [7] 高君恺,刘浩飞,杨倩.猪流行性腹泻病毒的研究进展[J].南京农业大学学报,2014,37(1):1-5.
- [8] YONG K K, SEONG I L, IN S C, et al. A novel diagnostic approach to detecting porcine epidemic diarrhoea virus: The lateral immunochromatography assay[J]. Journal of Virological Methods, 2015, 225: 4-8.
- [9] SOZZI E, LUPPI A, LELLI D, et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and RT-PCR for the detection of porcine epidemic diarrhoea virus[J]. Res Vet Sci, 2010, 88(1): 166-168.
- [10] OH J S, SONG D S, YANG J S, et al. Comparison of an linked immunosorbent assay with serum neutralization enzyme test for serodiagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection[J]. J Vet Sci, 2005, 6(4): 349-352.
- [11] 孙建慧,黄立平,危艳武,等.猪细小病毒 1 型 VP2 蛋白的表达与单克隆抗体的制备及应用[J].中国兽医科学,2014, 44(12):1279-1285.
- [12] 土荣,郑浩,何成华,等.伏马菌素 B1 单克隆抗体的制备及鉴定[J].中国农业科学,2011, 44(20):4302-4308.
- [13] MARTHALER D, JIANG Y, OTTERSON T, et al. Complete genome sequence of porcine epidemic diarrhea virus strain USA/Colorado/2013 from the United States[J]. Genome Announcements, 2013, 1(4): 555-568.
- [14] 于丹.猪流行性腹泻病毒 N 蛋白单抗的制备及其模拟表位鉴定[D].哈尔滨:东北农业大学,2012.
- [15] 尹宝英,吴旭锦,熊忙利.猪流行性腹泻诊断方法研究进展[J].动物医学进展,2013,34(12):156-159.
- [16] 罗亚坤,梁琳,王静,等.猪流行性腹泻病毒环介导等温扩增检测方法的建立及应用[J].中国畜牧兽医,2017,44(2): 344-349.
- [17] 赵兴然,郑小娇,沙芳芳,等.胶体金免疫层析试纸条法快速检测动物性食品中的氨苯[J].河北农业大学学报,2017,40(1): 117-121.

(责任编辑:张震林)