

DOI:10.13350/j.cjpb.220802

• 论著 •

猪急性腹泻综合征病毒 N 基因多克隆抗体的制备及其生物信息学分析*

于子萍¹, 兰添¹, 陈伟月¹, 张华韵¹, 于宁^{2,3}, 吕莽⁴, 施瑶凯⁵, 刘宇梦^{2,4}, 李程凯⁵, 鲁会军², 孙文超^{1**}, 金宁一^{2**}

(1. 温州大学病毒学研究所温州市病毒学与免疫学重点实验室, 浙江温州 325035; 2. 中国农业科学院长春兽医研究所; 3. 吉林大学动物医学学院; 4. 广西大学动物科学技术学院; 5. 温州医科大学附属第二医院育英儿童医院)

【摘要】 目的 制备 SADS-CoV N 蛋白的多克隆抗体, 进一步了解及探究 SADS-CoV N 蛋白的基本结构, 为猪急性腹泻综合征病毒疫苗的研制奠定基础。方法 将 N 蛋白基因片段克隆至 pCold II 载体, 并将其转化至 BL21 感受态细胞, 采用 1 mmol/L IPTG 诱导蛋白表达, 经 Ni-NTA 柱纯化后免疫小鼠, 制备多克隆抗体。利用生物信息学软件对 SADS-CoV N 蛋白的理化性质、亲疏水性、信号肽、二级结构、三级结构及 B 淋巴细胞与 T 淋巴细胞抗原表位进行预测。

结果 重组菌在 37 °C 经 1 mmol/L IPTG 诱导表达分子质量为 48 ku 的目的蛋白, 与预期 N 蛋白分子质量相符。用该蛋白免疫小鼠, 制备的抗 N 蛋白多克隆抗体的效价可达 1 : 200 000; 经 IFA、Western blot 鉴定, 制备的多克隆抗体能够特异性识别 SADS-CoV 感染猴肾细胞(Vero)表达的 N 蛋白, 具有较高的抗体效价及特异性。生物信息学分析 SADS-CoV N 由 375 个氨基酸组成, 分子质量为 41.636 ku, 等电点为 9.90; N 蛋白为亲水性蛋白, 无信号肽, 无跨膜结构; 螺旋和无规则卷曲是 N 蛋白二级结构中主要的蛋白质元件; N 蛋白存在 9 个潜在的 B 细胞表位, 第 127-135 位、134-142 位、275-283 位可能存在 T 细胞表位。结论 成功构建 pCold II-SADS-CoV-N 重组质粒, 用表达的重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠获得高效的特异抗体血清。生物信息学预测 SADS-CoV N 含有丰富的螺旋和无规则卷曲结构, 以及 B、T 淋巴细胞抗原表位, 为揭示 SADS-CoV N 蛋白的功能及 SADS-CoV 相关的转录机制奠定了基础。

【关键词】 猪急性腹泻综合征病毒; N 蛋白; 生物信息学; 原核表达; 多克隆抗体

【中图分类号】 S852.65

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)08-0873-07

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Aug.; 17(8):873-879.]

Polyclonal antibodies preparation and bioinformatic analysis of swine scute diarrhea syndrome coronavirus N protein

YU Zi-ping¹, LAN Tian¹, CHEN Wei-yue¹, ZHANG Hua-yun¹, YU Ning^{2,3}, LV Qiao⁴, SHI Yao-kai⁵, LIU Yu-meng^{2,4}, LI Cheng-kai⁵, LU Hui-jun², SUN Wen-chao¹, JIN Ning-yi² (1. Wenzhou Key Laboratory for Virology and Immunology, Institute of Virology, Wenzhou University, Wenzhou, Zhejiang 325035, China; 2. Changchun Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences; 3. Jilin University School of Veterinary Medicine; 4. College of Animal Science and Technology, Guangxi University; 5. The Second Affiliated Hospital and Yuying Children's Hospital, Wenzhou Medical University) ***

【Abstract】 **Objective** To prepare polyclonal antibodies to the SADS-CoV N protein, further understand and investigate the basic structure of the SADS-CoV N protein and lay the foundation for vaccine research. **Methods** N protein gene fragments were cloned to pCold II vectors, converted to BL21 competent cell. And than, with the stimulation of 1 mmol/L IPTG and purification of Ni-NTA column, polyclonal antibodies were prepared in immune mice. Meanwhile, bioinformatics software is employed for detecting the physicochemical properties, hydrophobicity, signal peptides, secondary structure, tertiary structure, antigenic determinants and epitopes of B cell and T cell. **Results** The recombinant protein, which relative molecular weight was 48 ku, was successfully expressed at 37 °C with the inducement of 1 mmol/L IPTG; the titer of the anti-N protein polyclonal antibody can reach 1 : 200 000; the result of IFA and Western Blot confirmed that the prepared monoclonal antibody with high antibody titer and specificity, which can specifically recognize the N protein expressed by SADS-CoV-infected monkey kidney cells (Vero). SADS-CoV N were composed by 375 amino acids, has the relative molecular mass weighted 41.636 ku, and the isoelectric point is 9.90; The N protein lacked signal peptide and transmembrane spiral structure is featured by the hydrophilic protein. And spiral and irregular curl plays a vital role in

* **【基金项目】** 温州市基础性科研项目(No. N20190005, N20180010)。

** **【通讯作者】** 孙文超, E-mail: sunwenchao131@163.com; 金宁一, E-mail: ningyik@126.com

【作者简介】 于子萍(1998-), 女, 辽宁沈阳人, 主要从事动物新发病毒分子诊断方面研究。E-mail: Y19817563015@163.com

constructing protein elements of the secondary structure of N protein. N protein contains 9 potential B cell epitopes, and possible T cell epitopes namely positions 127-135, 134-142 and 275-283. **Conclusion** The pCold II-SADS-CoV-N recombinant plasmid was successfully constructed and BALB/c mice were immunized with the recombinant protein for obtaining high-efficiency and specific antibody. The result of bioinformatics demonstrated that there were numerous helical and random coil structures as well as B and T lymphocyte antigenic epitopes consisted in SADS-CoV N. Besides this study lays a foundation for revealing the function of the SADS-CoV N protein and the transcriptional mechanism associated with SADS-CoV.

【Key words】 SADS-CoV; N protein; bioinformatic; prokaryotic expression; polyclonal antibodies

猪急性腹泻综合征冠状病毒(Swine Acute Diarrhea Syndrome Coronavirus, SADS-CoV)即猪肠道 α 冠状病毒(SeACoV)或猪肠性 α 病毒(PEAV)^[1],是2017年新发现的仔猪腹泻冠状病毒,为仔猪体内发现的第5种猪冠状病毒^[2]。SADS-CoV是导致仔猪腹泻的重要病原体,除此之外还可导致仔猪发烧、食欲不振、呕吐、严重腹泻、脱水,病死率可达90%,^[3]。该病毒首次于2016年8月在中国广东猪群中发现^[4],经回顾性调查与研究发现,感染SADS-CoV后仔猪的患病率为43.53%。2018年,Li等^[5]报道在福建地区发现了SADS-CoV CN/FJWT/2018毒株。同年在江西也发现了SADS病例^[6]。表明该病毒在南方养猪场广泛流行。但至今尚无有效的抗病毒药物与疫苗,目前主要通过控制传染源与切断传播途径两种方式对该病毒进行防控^[7]。

SADS-CoV属于冠状病毒(*coronavirus*, CoV)套式病毒目(*Nidovirales*)冠状病毒科(*Coronaviridae*)冠状病毒亚科(*Coronavirinae*),是一种有囊膜包被的单股正链RNA病毒^[8],其基因组全长约为27 kb,基因组结构类似于蝙蝠状的HKU2冠状病毒株,包括4种结构蛋白(S蛋白、E蛋白、M蛋白、N蛋白)^[9]和3种辅助蛋白(ORF 1a/1b、NS3、NS7a)等^[10]。核衣壳蛋白N可与病毒基因组RNA相互作用,促进病毒的核衣壳结构形成,对形成完整的病毒粒子至关重要。

N蛋白是重要的结构蛋白^[11],也是冠状病毒中含量最丰富的蛋白^[12]。高含量的N蛋白被认为有利于冠状病毒感染细胞后产生有效免疫力^[13]。表达N蛋白需要对N蛋白的性质及结构有进一步的了解,采用生物信息学方法对其进行预测,有助于成功表达N蛋白。目前生物信息学已广泛应用于生命科学、临床医学及药物筛选与分析等领域。表位是存在于抗原表面的,决定抗原特异性的化学集团,是被免疫细胞识别并与抗体结合形成免疫反应的基本单位^[14,15]。因此,淋巴细胞表位预测是免疫信息学中的重要研究内容。本研究对SADS-CoV-N蛋白进行生物信息学分析,对SADS-CoV-N蛋白的基本理化性质、空间结构及B淋巴细胞与T淋巴细胞的表位等进行预测与分析^[16,17];

克隆SADS-CoV的N基因,利用原核表达系统表达重组SADS-CoV-N蛋白,纯化后免疫小鼠,制备鼠抗SADS-CoV-N多克隆抗体,为N蛋白的生物学功能和致病机制研究以及疫苗研发提供理论依据和实验材料。

材料与方法

1 材料

1.1 细菌、载体及实验动物 *E. coli* DH5 α 与BL21大肠埃希菌感受态细胞购自上海生物工程有限公司;pMD-19T载体购自日本TAKARA公司;BALB/c小鼠购自温州大学病毒学研究所实验动物中心。

1.2 主要试剂 2 \times Phanta Max Master Mix购自南京诺唯赞生物有限公司;质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自美国AXYGEN有限公司;Xba I与Sac I限制性内切酶,以及T4连接酶购自美国赛默飞生物技术有限公司;蛋白上样缓冲液和辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)购自碧云天生物技术公司。

2 方法

2.1 引物设计与合成 根据NCBI SADS-CoV GDS04毒株(登录号:MF167434)设计引物。SADS-CoV-NF: 5'-ATGGAGCTCATGGCCACCGTTAAT-TGGGGTGAC-3'; SADS-CoV-NR: 5'-CTATCTA-GATTAGTTAATAATTTTCATCCACCAT-3'。引物由上海生物工程有限公司合成。

2.2 SADS-CoV-N基因原核表达载体的构建 以优化合成的SADS-CoV-N序列质粒为模板进行N基因的PCR扩增。PCR扩增体系(25 μ L): SADS-CoV-N基因质粒DNA 1 μ L, 2 \times Phanta Max Master Mix 12.5 μ L, SADS-CoV-NF 0.5 μ L, SADS-CoV-NR 0.5 μ L, 用去离子水补至25 μ L。PCR产物与pCold II载体分别用Xba I与Sac I双酶切,纯化后在T4连接酶作用下连接,连接产物转化至DH5 α 感受态细胞,转化细胞涂布于含氨苄青霉素抗性的LB培养基。挑取单克隆,扩大培养后提取质粒,委托上海生物工程有限公司测序,测序正确后于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

2.3 SADS-CoV-N表达、鉴定及纯化 将重组质粒转化至BL21(DE3)感受态细胞,于37 $^{\circ}$ C以220 r/min

摇菌培养;加入适量 IPTG(终浓度为 1 mmol/L),采用不同的温度和时间进行诱导条件的优化。采用优化后的表达条件大量诱导目的蛋白表达并 8 000 r/min 离心收集菌体,PBS 重悬菌体经超声破碎至溶液澄清后,使用蛋白纯化试剂盒纯化目的蛋白,采用 SDS-PAGE、Western blot 分析蛋白表达情况,蛋白浓度采用 BCA 定量法测定。

2.4 多克隆抗体的制备 将纯化的重组蛋白与铝盐佐剂混合后免疫四周龄 BALB/c 小鼠 6 只(150 μ L/只,10 μ g 蛋白/只),1 周后尾缘静脉采取,分离血清,-20 $^{\circ}$ C 保存。免疫 4 周后进行二次免疫,二次免疫 1 周后尾缘静脉采血,分离血清,-20 $^{\circ}$ C 保存。

2.5 Western blot 测定免疫血清抗体效价 将 N 基因阳性对照制备成蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后转膜,以免疫小鼠血清(按比例稀释)为一抗,以辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)为二抗进行 Western blot,测定抗体的效价。

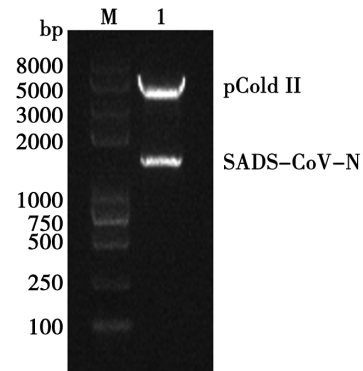
2.6 免疫血清的间接免疫荧光(IFA)试验 用 SADS-CoV 病毒感染 Vero 细胞,48 h 后收集细胞样品,弃上清,用 4% 细胞组织固定液固定 30 min,PBST 洗涤;用 0.5% Triton-X 通透 15 min,PBST 洗涤;用含 1% BSA 的 PBST 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h,洗涤;加入系列稀释的免疫小鼠血清,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,PBST 洗涤;加入 FITC 标记抗鼠 IgG,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,洗涤;加入 DAPI 对细胞核染色 5 min,荧光显微镜观察。

2.7 SADS-CoV-N 蛋白生物信息学分析 利用 Protparam tool(<http://web.expasy.org/protparam>)在线分析软件预测 N 蛋白的氨基酸数量、等电点、分子量,氨基酸组成、分子式以及不稳定系数等;分别利用在线网站 Prot Scale(<http://web.expasy.org/protscale/>)、Signal 4.1 Server(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1>)、TM-HMM Server2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测蛋白的亲疏水性、信号肽及跨膜结构;采用在线网站 SOPMA(http://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)对 N 蛋白的二级结构进行分析;利用软件 Phyre2(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)建立 N 蛋白的三级结构模型,主要分析蛋白与模型对的可信度和蛋白覆盖率;通过在线软件 Hum-mPLo 3.0 预测蛋白亚细胞定位(https://services.healthtech.dtu.dk/cgi-bin/sw_request);采用在线软件 IEDB(<http://www.iedb.org/>)预测 B 细胞抗原表位;使用在线软件 nHLAPred ComPred 在线程序(<https://webs.iitd.edu.in/raghava/nhlapred/comp.html>)预测 N 蛋白的 T 细胞 CTL 表位。

结果

1 SADS-CoV-N 基因原核表达载体的构建及鉴定

目的基因 PCR 产物及载体经酶切后连接,连接产物经 Xba I 与 Sac I 双酶切,得到大小约 1 200 bp 的目的基因片段和 4 400 bp 的载体片段(图 1),与预期相符。测序表明重组质粒构建正确。



M DNA 标志物(DL8 000) 1 SADS-CoV-N 重组质粒 Xba I 与 Sac I 双酶切

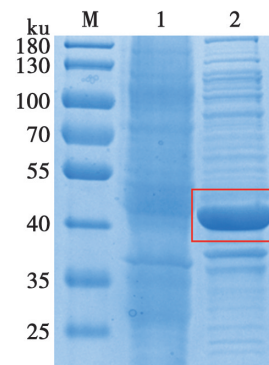
图 1 SADS-CoV-N 重组质粒双酶切鉴定

M DNA molecular standard weight (DL8 000) 1 SADS-CoV-N recombinant pla digested by Xba I and Sac I

Fig. 1 Identification results of SADS-CoV-N recombinant plasmid digestion

2 重组蛋白的诱导表达、鉴定及纯化

重组菌经 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 分析,表达产物分子量在 40~55 ku 之间,与 SADS-CoV-N 重组蛋白分子量理论值相符。且该蛋白主要以包涵体形式表达(图 2)。纯化的重组蛋白为单一电泳条带,浓缩后的蛋白浓度更高(图 3)。



M 蛋白分子量标准 1 pCold II 空载体对照 2 重组质粒转化菌表达的 pCold II-N 重组蛋白

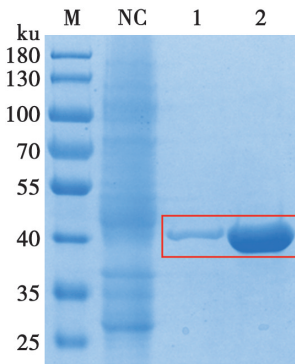
图 2 SDS-PAGE 分析 N 蛋白的表达

M Protein marker 1 pCold II empty vector 2 pCold II-N recombinant protein

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of N protein expression

3 抗体效价

Western blot 测定重组 SADS-CoV-N 免疫小鼠血清多克隆抗体效价达 1 : 200 000(图 4)。

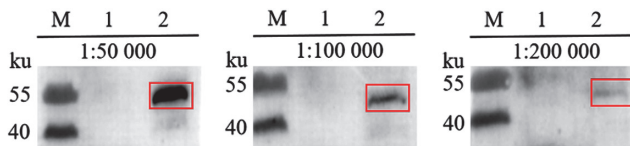


M 蛋白分子质量标准 NC IPTG 诱导 pCold II 空载体对照 1 纯化的 pCold II-N 重组蛋白 2 浓缩的纯化 pCold II-N 重组蛋白

图 3 纯化、浓缩 SADS-CoV-N 蛋白的 SDS-PAGE 分析

M Protein marker NC Induced pCold II empty vector 1 pCold II-N recombinant protein(purified) 2 pCold II-N recombinant protein(concentrated)

Fig. 3 Detection of purified and concentrated SADS-CoV-N protein by SDS-PAGE



M 蛋白分子质量标准 1 阴性对照 2 抗 SADS-CoV-N 抗体与相应抗体反应条带

图 4 Western blot 测定 SADS-CoV-N 蛋白免疫小鼠血清抗体效价

M Protein marker 1 Negative control 2 SADS-CoV-N samples

Fig. 4 Detection of the antibody titer of the SADS-CoV-N protein

4 IFA 检测结果

制备的鼠抗 SADS-CoV-N 多克隆抗体血清经 1 : 50 000-1 : 200 000 稀释后作为一抗进行 IFA 试验。结果显示,鼠抗 SADS-CoV-N 多克隆抗体可与病毒的天然 N 蛋白发生反应(图 5)。表明制备的鼠抗 SADS-CoV-N 多克隆抗体可用于 IFA 检测 N 蛋白。

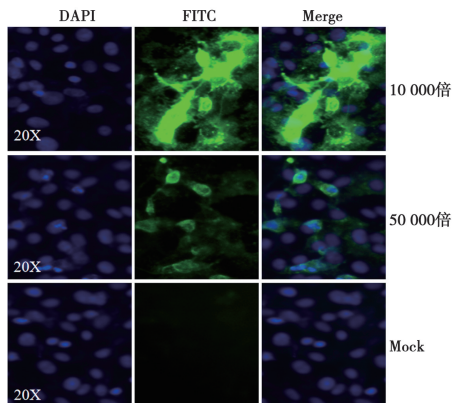


图 5 鼠抗 SADS-CoV-N 多克隆抗体的 IFA 鉴定

Fig. 5 IFA identification of a mouse polyclonal antibody against SADS-CoV-N

5 SADS-CoV-N 蛋白的生物信息学分析

5.1 蛋白序列及理化性质 SADS-CoV-N 蛋白由

375 个氨基酸组成,分子质量为 41. 636 ku,等电点(pI)为 9. 90。负电荷残基总数(Asp+Glu)为 37,正电荷残基总数为(Arg+Lys)为 52。不稳定系数(instability index)为 67. 37。脂肪指数(aliphatic index)为 61. 63。氨基酸各组分见表 1。

表 1 N 蛋白的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of N protein

氨基酸 Amino acid	数量/个 Quantity/piece	占比/% Proportion/%
丙氨酸(Ala)	32	8.5
精氨酸(Arg)	29	7.7
天冬酰胺(Asn)	15	4.0
天冬氨酸(Asp)	17	4.5
半胱氨酸(Cys)	1	0.3
谷氨酰胺(Gln)	29	7.7
谷氨酸(Glu)	20	5.3
甘氨酸(Gly)	23	6.1
组氨酸(His)	6	1.6
异亮氨酸(Ile)	11	2.9
亮氨酸(Leu)	17	4.5
赖氨酸(Lys)	23	6.1
蛋氨酸(Met)	6	1.6
苯丙氨酸(Phe)	14	3.7
脯氨酸(Pro)	36	9.6
丝氨酸(Ser)	33	8.8
苏氨酸(Thr)	19	5.1
色氨酸(Trp)	7	1.9
酪氨酸(Tyr)	6	1.6
缬氨酸(Val)	31	8.3

5.2 SADS-CoV-N 蛋白的亲疏水性、信号肽、跨膜结构及亚细胞定位

Protein Scale 网站预测 N 蛋白的平均亲水系数为-0. 769,为亲水性蛋白(图 6);Signal IP 4. 0 Server 在线网站预测 N 蛋白无信号肽(图 7);在线网站 TMHMM Server v. 2. 0 预测 N 蛋白不含跨膜结构(图 8)。采用软件 Hum-mPLoc 3. 0 对 N 蛋白的亚细胞定位进行预测与分析,结果表明 N 蛋白位于细胞核内。

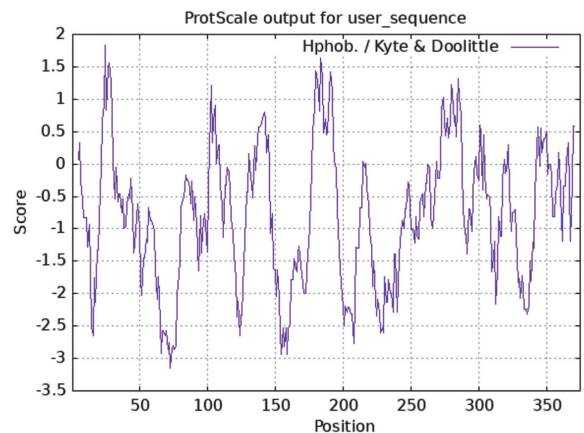


图 6 N 蛋白亲疏水性预测

Fig. 6 Prediction results of N protein hydrophilicity and hydrophobicity

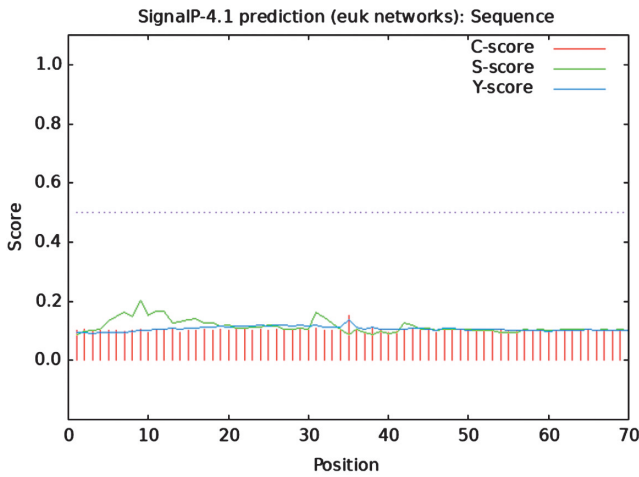


图 7 N 蛋白的信号肽预测
Fig. 7 Signal peptide prediction of N protein

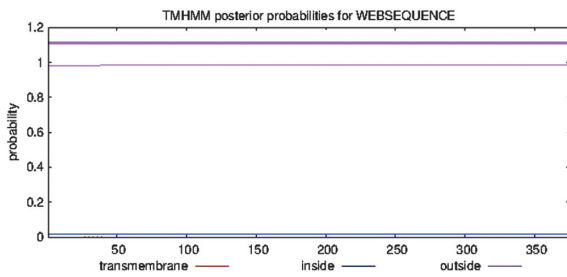


图 8 N 蛋白的跨膜区预测
Fig. 8 Transmembrane region prediction of N protein

5.3 SADS-CoV-N 蛋白的二、三级结构 利用在线软件 SOPMA 和 PHYRE 2 分别预测 N 蛋白的二级和三级结构。从图 9 可以看出, 56 个氨基酸 (14.93%) 参与 N 蛋白 α 螺旋的形成; 60 个氨基酸 (16.00%) 参与 N 蛋白延伸链的形成; 13 个氨基酸 (3.47%) 参与 N 蛋白 β 折叠的形成; 246 个氨基酸 (65.6%) 参与 N 蛋白无规则卷曲结构的形成。由此可见, 螺旋和无规则卷曲是 N 蛋白二级结构中主要的蛋白质元件。基于同源建模法 (Normal), 以 c5n4kA 为模板, 建立 N 蛋白三级结构的三维空间模型, 结果如图 10。可以看出, 129 个残基 (序列的 34%) 通过单个最高评分模板以 100% 的置信度建模。

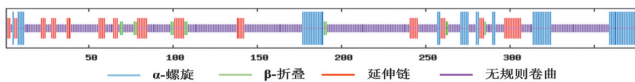


图 9 N 蛋白二级结构预测
Fig. 9 Secondary Structure prediction of N protein

5.4 SADS-CoV-N 蛋白的 B 细胞表位 利用在线软件 IEDB 预测 B 细胞表位, 系统默认阈值为 0.5 时, 预测结果见图 11。B 细胞存在 9 个潜在的优势抗原表位, 分别为 6-22, 32-77, 91-99, 109-137, 140-179, 190-240, 248-267, 290-296, 313-370 (表 2)。

表 2 SADS-CoV-N 蛋白 B 细胞表位预测

Table 2 B cell epitope prediction of SADS-CoV-N protein		
条数 Number of bars	开始位置 Starting position	序列 Sequence
1	6	WGDAVEQAESRGRKRIP
2	32	IDGKNFWNVMPRNGVPTGKGTPDQIQI GYWVEQKRWRMQKGQRKDQP
3	91	ADAPFRKRI
4	109	GAKTSPTGLGVRNRNKEPATPQFGFQLPP
5	140	TVVEVTSRSASRSQRSRNQSQSRSGAQ TPRAQQPSQSV
6	190	DLGIASSQSRPQSGKNTPKPRRAVSPAP APKPARKQMDKPEWKRVPNSEE
7	248	PRSVSRNFGDSDLVQHGVEA
8	290	TTKESGE
9	313	KNLPRFLEQVSAYSQPSQIRRSQSQDLNA DAPVFTAPPATPVSNPAPFLEEEVEMV

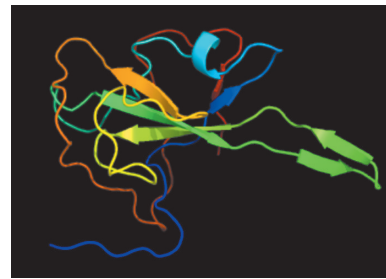


图 10 N 蛋白的三级结构空间模型预测
Fig. 10 The spatial model prediction results of tertiary structure of N protein

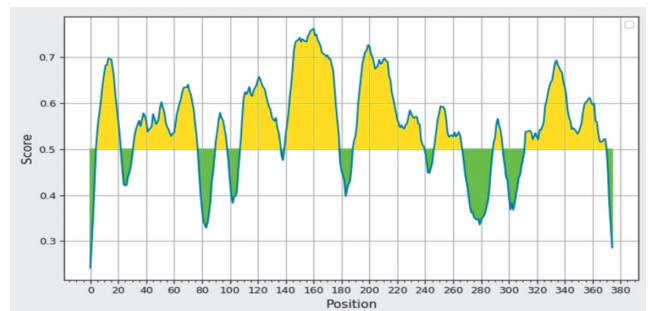


图 11 SADS-CoV-N 蛋白 B 细胞表位预测
Fig. 11 B cell epitope prediction of SADS-CoV-N protein

5.5 SADS-CoV-N 蛋白的 T 细胞表位 利用 nHL-APred 预测 N 蛋白的 T 细胞表位, 系统默认阈值为 0.5 时, 分别预测 5 种不同分子 HLA-A*0201、HLA-A*0202、HLA-A*0203 和 HLA-A*0205 的结合肽。结果如图 12 所示, 由于各等位基因出现重叠区域, 因此推测第 127-135 位、134-142 位、275-283 位可能存在 T 细胞表位。

讨论

近年来, 冠状病毒所引起的仔猪腹泻疾病已成为养猪业健康发展的主要威胁。自 2017 年我国发现首

例 SADS-CoV 感染以来,该病在我国南方地区快速传播并对当地的养猪业造成重大经济损失。由于 SADS-CoV 病毒的结构复杂且未知功能蛋白较多,给病毒的基础研究及疫苗研发带来巨大挑战。为深入研究 SADS-CoV 感染及致病机制,掌握相关蛋白在病毒感染宿主时的表达、功能及定位至关重要。

N 条数	品系 等位基因	SADS-CoV-N	
		开始位置	序列
1	HLA-A2	83	YYLGTGPHA
2		314	NLPRFLEQV
1	HLA-A*201	134	QLPPDLTVV
2		275	ELLPTQAAL
1	HLA-A*202	134	QLPPDLTVV
2		268	KHFPTIAEL
3		275	ELLPTQAAL
1	HLA-A*203	111	QLPPDLTVV
2		127	KHFPTIAEL
3		133	ELLPTQAAL
4		160	SQSRSGAQT
1	HLA-A*205	127	ATPQGFQQL
2		205	NTPKPRSRA
3		345	PVFTPAPPA
4		180	IVAAVKQAL

图 12 SADS-CoV-N T 细胞抗原表位预测
Fig. 12 T cell epitope prediction of SADS-CoV-N protein

韩郁茹等^[18]筛选出 5 株抗 SADS-CoV-N 蛋白的单克隆抗体,均具有良好的抗体特异性且效价高。张记宇等^[19]验证了 SADS-CoV 诱导宿主细胞凋亡的分子机制。周芝海等^[20]分析广东 12 个猪场以及 NCBI 上已经公布的 SADS-CoV 的 N 蛋白的序列并制备出可与 SADS-CoV 特异性结合的 N 蛋白多克隆抗体。本研究对 N 基因进行优化表达,提高了 N 蛋白表达含量。

N 蛋白是冠状病毒的主要结构蛋白之一,是一种多功能的磷酸化蛋白,在被感染的宿主细胞中是表达量最高的蛋白之一^[21]。N 蛋白同时也是冠状病毒结构蛋白中最保守的蛋白质,病毒感染前期的检测手段多为针对 N 蛋白进行的^[22]。因此本实验选择对 SADS-CoV 的 N 蛋白进行研究,具有其它蛋白所不具备的优势^[23]。

生物信息学是在生命科学的研究中以计算机为工具对生物信息进行存储、检索和分析以获得大量数据的科学^[17]。生物信息学以已知的核苷酸序列或氨基酸序列为研究对象,与数据库中经研究证实的序列进行比较,预测核酸或蛋白质的生物学结构与功能^[24-25]。结果显示 N 蛋白由 375 个氨基酸组成,分子质量为

41.636×10³ ku,等电点为 9.90,为亲水蛋白,无信号肽及跨膜结构,螺旋和无规则卷曲是 N 蛋白二级结构中主要的蛋白质元件。本研究初步预测分析了 SADS-CoV-N 的理化性质,为该蛋白的分离纯化提供了参考依据,为 SADS-CoV 疫苗研发提供了理论基础。

免疫是人体的一种生理功能,人体依靠免疫功能识别外来的抗原或体内的异己物质,从而破坏和排斥进入人体的抗原物质,或人体自身产生的诸如损伤细胞等的物质,以维持机体的健康^[26]。人类共有 3 种主要的防御机制,其中皮肤和黏膜是第一道防线,体液中的杀菌物质和吞噬细胞为第二道防线。第三道防线为特异性免疫,这种免疫只针对一种病原体,是人体经后天感染或人工预防接种而使机体获得抵抗感染的能力。参与特异性免疫的细胞主要有 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞,其中 B 淋巴细胞主要参与体液免疫,T 淋巴细胞主要参与细胞免疫,T 淋巴细胞被刺激后产生的淋巴因子等物质对 B 淋巴细胞的分化至关重要。本研究初步预测与分析了 N 蛋白的 B 淋巴细胞与 T 淋巴细胞的表位^[16-17],为该蛋白的生物学功能和致病机制研究,以及疫苗的研发奠定了基础。

原核表达技术是目前最为成熟、稳定的一种蛋白表达技术,利用该技术可以在体外快速高效表达目的蛋白^[27],具有成本低、周期短、操作简便、可大量生产、易于蛋白纯化等诸多优点,因而被广泛采用,为病毒蛋白功能研究提供了便利^[28]。本实验用表达纯化的重组 N 蛋白免疫小鼠,制备了高效价的抗 N 蛋白的多克隆抗体血清,该抗体具有良好的特异性及亲和力,为进一步研究 N 基因在 SADS-CoV 侵染宿主时的功能奠定了基础。

本研究制备了高效价的抗 N 蛋白的多克隆抗体,并通过生物信息学分析全面揭示了 N 蛋白的生物学功能,为开发和设计靶向 N 蛋白的快速诊断方法和抗病毒药物提供了科学依据。

【参考文献】

[1] Zhou L, Sun Y, Lan T, et al. Retrospective detection and phylogenetic analysis of swine acute diarrhoea syndrome coronavirus in pigs in southern China [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2019, 66(2): 687-695.
[2] Lou SK, Woo PC, Li KS, et al. Complete genome sequence of bat coronavirus HKU2 from Chinese horseshoe bats revealed a much smaller spike gene with a different evolutionary lineage from the rest of the genome [J]. *Virology*, 2007, 367(2): 428-439.
[3] Wang X, Fang L, Liu S, et al. Susceptibility of porcine IPI-2I intestinal epithelial cells to infection with swine enteric coronaviruses [J]. *Vet Microbiol*, 2019(233): 21-27.
[4] Gong L, Li J, Zhou Q, et al. A new bat-HKU2-like coronavirus in

- swine, China, 2017 [J]. Emerg Infect Dis, 2017, 23(9):1607.
- [5] Li K, Li H, Bi Z, et al. Complete genome sequence of a novel swine acute diarrhea syndrome coronavirus, ch/fjw/2018, isolated in Fujian, China, in 2018 [J]. Microbiol Resour Announc, 2018, 7(22):e01259-18.
- [6] 张誉瀚, 袁为锋, 张帆帆, 等. 2018年江西及福建省新现猪急性腹泻冠状病毒的分子流行病学调查[J]. 养猪, 2019(4):113-117.
- [7] Yang YL, Yu JQ, Huang YW. Swine enteric alphacoronavirus (swine acute diarrhea syndrome coronavirus): An update three years after its discovery [J]. Virus Res, 2020(285):198024.
- [8] Masters PS. The molecular biology of coronaviruses [J]. Adv Virus Res, 2006(66):193-292.
- [9] Zhou P, Fan H, Lan T, et al. Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin [J]. Nature, 2018, 556(7700):255-258.
- [10] Yin L, Chen J, Li L, et al. 猪德尔塔冠状病毒不同肠段嗜性与猪氨基肽酶 N 表达量有关而与干扰素应答无关[J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42(6):638.
- [11] 史晗. 猪肠道 α 冠状病毒辅助蛋白 NS7a 调控 I 型 IFN 信号通路的机制研究[D]. 中国农业科学院, 2021.
- [12] Weiss S R, Navas-Martin S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2005, 69(4):635-664.
- [13] 宋红芹, 姜翠翠, 张鑫宇, 等. 非洲猪瘟病毒 NP419L 基因 shRNA 表达质粒的构建与筛选[J]. 中国兽医科学, 2013, 43(1):9-14.
- [14] 梁瑾, 王靖飞. B 细胞表位预测方法研究进展[J]. 生命科学, 2009(2):320-323.
- [15] 毕靖舒. 基于深度学习的 T 细胞表位预测方法研究[D]. 山东师范大学, 2021.
- [16] 丁寿鹏, 李祥芳, 高婧华, 等. 鸟结核分枝杆菌 MAV-5183 蛋白的生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(10):1153-1157.
- [17] 张春霆. 生物信息学的现状与展望[J]. 世界科技研究与发展, 2000, 22(6):17-20.
- [18] 韩郁茹. 猪急性腹泻综合征冠状病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备及其抗原表位的鉴定[D]. 中国农业科学院, 2021.
- [19] 张记宇. 猪急性腹泻综合征冠状病毒诱导宿主细胞凋亡的分子机制[D]. 中国农业科学院, 2021.
- [20] 周芝海, 谭耀荣, 郑瑶瑶, 等. 猪急性腹泻综合征冠状病毒核衣壳蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备[J]. 中国兽医科学, 2019, 49(9):1179-1186.
- [21] Calvo E, Escors D, Lopez J, et al. Phosphorylation and subcellular localization of transmissible gastroenteritis virus nucleocapsid protein in infected cells [J]. J Gen Virol, 2005, 86(8):2255-2267.
- [22] Ying L, Xu S, Yang RF, et al. Identification of an epitope of SARS-coronavirus nucleocapsid protein [J]. Cell Res, 2003, 13(3):141-145.
- [23] 赵冠宇, 黄海鑫, 张世亨, 等. 猪肠道 α 冠状病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(1):35-39.
- [24] Parra GS, Agarwal P, Abril JF, et al. Comparative gene prediction in human and mouse [J]. Genome Research, 2003, 13(1):108-117.
- [25] 王鹏, 廉士珍, 刘晓颖, 等. 犬 I 型腺病毒 IX 蛋白的生物信息学分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021.
- [26] 孙啸, 陆祖宏, 谢建明. 生物信息学概论[M]. 清华大学出版社有限公司, 2004.
- [27] 陈禹, 杜谦, 霍瑞超, 等. 猪圆环病毒 2 型 ORF1、ORF2 和 ORF3 原核表达和多克隆抗体的制备 [J]. 中国兽医学报, 2015, 35(5):686-691.
- [28] Reddy SM, Lupiani B, Gimeno IM, et al. Rescue of a pathogenic Marek's disease virus with overlapping cosmid DNAs: use of a pp38 mutant to validate the technology for the study of gene function [J]. Pro Nat Aca Sci, 2002, 99(10):7054-7059.

【收稿日期】 2022-04-14 【修回日期】 2022-06-09

(上接 872 页)

- [7] Bouwman P, Aly A, Escandell JM, et al. 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers[J]. Nature Structural Mol Biol, 2010, 17(6):688-695.
- [8] Yerlikaya A, Kanbur E, Stanley BA, et al. The ubiquitin-proteasome pathway and epigenetic modifications in cancer[J]. Anti-Cancer Agent Med Chem, 2021, 21(1):20-32.
- [9] Niepmann M, Shalamova LA, Gerresheim GK, et al. Signals involved in regulation of hepatitis C virus RNA genome translation and replication[J]. Front Microbiol, 2018(9):395.
- [10] Manasanch EE, Orlowski RZ. Proteasome inhibitors in cancer therapy[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2017, 14(7):417-433.
- [11] Zhou Y, Zhao Y, Gao Y, et al. Hepatitis C virus NS3 protein enhances hepatocellular carcinoma cell invasion by promoting PPM1A ubiquitination and degradation[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2017, 36(1):42.
- [12] Chen Y, He L, Peng Y, et al. The hepatitis C virus protein NS3 suppresses TNF- α -stimulated activation of NF- κ B by targeting LUBAC[J]. Sci Signaling, 2015, 8(403):ra118.
- [13] Kang X, Chen X, He Y, et al. DDB1 is a cellular substrate of NS3/4A protease and required for hepatitis C virus replication [J]. Virology, 2013, 435(2):385-394.

【收稿日期】 2022-04-05 【修回日期】 2022-06-27