

# 猪流行性腹泻病毒 ORF3 蛋白 40–91 aa 是其细胞质定位的关键结构域

陈冰清<sup>1,2\*</sup>, 沈媚<sup>3\*</sup>, 司伏生<sup>1,2</sup>, 董世娟<sup>1,2</sup>, 于瑞嵩<sup>1,2</sup>, 谢春芳<sup>1,2</sup>, 李震<sup>1,2</sup>

1 上海市农业科学院畜牧兽医研究所 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106

2 上海种猪工程技术研究中心, 上海 201106

3 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201106

陈冰清, 沈媚, 司伏生, 等. 猪流行性腹泻病毒 ORF3 蛋白 40–91 aa 是其细胞质定位的关键结构域. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1113–1125.

Chen BQ, Shen M, Si FS, et al. The 40–91 aa sequence of porcine epidemic diarrhea virus ORF3 protein is the key structural domain controlling its location in cytoplasm. Chin J Biotech, 2020, 36(6): 1113–1125.

**摘要:** ORF3 蛋白是猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 基因组编码的唯一的辅助蛋白, 与病毒毒力相关。为确定 PEDV ORF3 细胞质定位信号, 文中构建了系列 PEDV DR13<sup>wt</sup> ORF3 蛋白全长或截短肽重组表达载体, 转染 Vero 细胞并利用激光共聚焦显微镜分析与 EGFP 融合表达的全长 ORF3 蛋白和其系列截短肽在细胞内的分布。结果表明, 全长 ORF3 蛋白或所有包含 2 个跨膜域的 40–91 aa 基序的 ORF3 截短肽均只定位于细胞质中, 而不包含 40–91aa 基序的 ORF3 截短肽分布于整个细胞中 (细胞质和细胞核均有分布)。这表明 40–91 aa 是猪流行性腹泻病毒 ORF3 蛋白细胞质定位的关键结构域。PEDV ORF3 蛋白细胞质定位结构域的明确为进一步研究其细胞内转运和生物学功能提供了参考。

**关键词:** 猪流行性腹泻病毒, ORF3 蛋白, 细胞质定位, 定位信号, 跨膜域

**Received:** February 20, 2020; **Accepted:** May 11, 2020

**Supported by:** Shanghai Key Project on Agricultural Development (No. 2015-6-1-9), National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0500101); National Natural Science Foundation of China (Nos. 31572519, 31602060).

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

上海市科技兴农重点攻关项目 (No. 2015-6-1-9), 国家重点研发计划 (No. 2016YFD0500101), 国家自然科学基金 (Nos. 31572519, 31602060) 资助。

网络出版时间: 2020-05-28

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20200527.1127.002.html>

# The 40–91 aa sequence of porcine epidemic diarrhea virus ORF3 protein is the key structural domain controlling its location in cytoplasm

Bingqing Chen<sup>1,2\*</sup>, Mei Shen<sup>3\*</sup>, Fusheng Si<sup>1,2</sup>, ShiJuan Dong<sup>1,2</sup>, RuiSong Yu<sup>1,2</sup>, ChunFang Xie<sup>1,2</sup>, and Zhen Li<sup>1,2</sup>

1 Institute of Animal Husbandry & Veterinary Science, Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

2 Shanghai Engineering Research Center of Breeding Pig, Shanghai 201106, China

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

**Abstract:** ORF3 protein, the single accessory protein encoded by porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), is related to viral pathogenicity. In order to determine the cytoplasmic location signal of PEDV ORF3, we constructed a series of recombinant plasmids carrying full-length or truncated segments of PEDV DR13 ORF3 protein. When the acquired plasmids were transfected into Vero cells, expression and distribution of the EGFP-fused full-length ORF3 protein and its truncated forms in the cells were observed by laser confocal microscopy. The results showed that ORF3 protein or their truncated forms containing 40–91 aa segment including two transmembrane domains were localized in the cytoplasm, whereas ORF3 truncated peptides without the 40–91 aa segment were distributed in the whole cell (in both cytoplasm and nucleus). This suggests that the 40–91 aa is the key structural domain determining cytoplasmic location of PEDV ORF3 protein. The discovery provides reference for further clarifying intracellular transport and biological function of PEDV ORF3 protein.

**Keywords:** porcine epidemic diarrhea virus, ORF3 protein, cytoplasmic location, location signal, transmembrane 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) 引起的一种高度传染性肠道疾病<sup>[1-2]</sup>。虽然不同年龄的猪均对 PEDV 易感, 但 PEDV 对哺乳仔猪的危害最为严重, 致死率可达 90% 以上。自 20 世纪 70 年代首次在英国和比利时发现以来, 亚洲和欧洲国家都报道了 PED 的流行。1980 年后, PED 一直是许多亚洲国家如中国、日本、韩国和泰国养猪业面临的严重问题<sup>[3]</sup>。自 2010 年以来, 新变异株 PEDV 在猪群中再次暴发流行, 给东南亚、北美等地区的养猪业造成了巨大的经济损失<sup>[4-10]</sup>。由于缺乏有效的疫苗, PED 仍在世界范围内流行。

PEDV 属于尼多病毒目 (Nidovirales)、冠状病毒科 (Coronaviridae)、 $\alpha$  冠状病毒属<sup>[11]</sup>。PEDV 基因组全长约 28 kb, 包含 5' 端非翻译区 (5'UTR)、3' 端非翻译区 (3' UTR) 和分别编码纤突蛋白 (S)、囊膜蛋白 (E)、膜蛋白 (M)、核衣壳

蛋白 (N)、多聚蛋白 (1a/1ab) 以及附属蛋白 (ORF3) 的 7 个开放阅读框 (ORFs)。

ORF3 蛋白是 PEDV 唯一的辅助蛋白。虽然 ORF3 蛋白是 PEDV 的体外复制非必需的, 但是 ORF3 蛋白影响病毒的复制, 与病毒毒力相关。Wang 等<sup>[12]</sup>的研究表明 ORF3 具有离子通道活性, 调节病毒的释放。Ye 等<sup>[13]</sup>发现 ORF3 蛋白可以延长细胞 S 期、促进弱毒株 PEDV 的增殖。最近, Kaewborisuth 等<sup>[14]</sup>发现 ORF3 蛋白可与 S 蛋白发生相互作用而影响病毒的复制。Zou 等<sup>[15]</sup>发现 ORF3 通过上调 GRP78 蛋白表达和激活 PERK-Eif2 $\alpha$  信号通路触发内质网应激反应并诱导自噬, 但不影响细胞凋亡。与此 ORF3 细胞表达结果不同, 我们最近重组 PEDV 感染研究发现完整或自然截短的 ORF3 可以通过抑制 PEDV 诱导的细胞凋亡过程而促进病毒的复制<sup>[16]</sup>。上述研究也发现表达的 ORF3 蛋白位于细胞质中<sup>[13-17]</sup>, 融合表达的标签 (如 EGFP、Flag 或 Myc) 和表达的细胞

系 (如 Vero 细胞、HeLa 细胞、293 T 细胞或 PK15 细胞) 对 ORF3 蛋白在细胞质内定位没有影响<sup>[15]</sup>。然而, ORF3 蛋白的细胞质定位信号未见报道。

为揭示 PEDV ORF3 细胞质定位信号, 本研究构建了 PEDV DR13 野毒株 (DR13<sup>wt</sup>) ORF3 蛋白全长或系列 ORF3 蛋白截短肽的 EGFP 融合表达载体, 利用激光共聚焦显微镜分析重组 ORF3 蛋白及其系列截短肽在细胞内的分布, 研究结果将为进一步研究 ORF3 蛋白的细胞内转运及功能提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 非洲绿猴肾细胞 (Vero CCL-81) 购自 ATCC, 插入 PEDV DR13<sup>wt</sup> ORF3 基因的重组 pJET1.2-ORF3 由本实验室构建<sup>[16]</sup>; 质粒 pEGFP-C1 购自华越洋生物 (北京) 科技有限公司。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

Prime STAR<sup>TM</sup> HS DNA polymerase、DNA Marker 购自大连宝生物有限公司; 同源重组试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司; T4 克隆试剂盒购自 NEB 公司; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Bgl* II 购自 Thermo Scientific 公司; 质粒提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自 Axygen 公司; 琼脂糖购自 Sigma 公司; 脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 胎牛血清、DMEM 培养液、Opti-MEM 培养基购自 Gibco 公司; Hoechst 33342 购自北京索莱宝公司。

PCR 仪购自 BIO-RAD 公司; 紫外凝胶成像仪购自上海天能科技有限公司; 激光共聚焦显微镜购自 Leica 公司; CO<sub>2</sub> 细胞培养箱购自 Thermo 公司。

#### 1.1.3 ORF3 蛋白及截短蛋白编码 DNA 扩增引物

以 PEDV DR13<sup>wt</sup> ORF3 基因序列 (GenBank 登录号: AFE85963.1) 为参考序列, 设计扩增全

长、截短 ORF3 基因的引物, 送生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 ORF3 基因的比对及跨膜区预测

PEDV CV777 野毒株 ORF3 (CV777<sup>wt</sup> ORF3, GenBank 登录号: AAK38657.1) 和 PEDV DR13 野毒株 ORF3 (DR13<sup>wt</sup> ORF3, GenBank 登录号: AFE85963.1) 氨基酸序列比对采用 Clustal X2。利用 TMHMM 2.0 在线预测 ORF3 蛋白的跨膜域 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)。

#### 1.2.2 DR13<sup>wt</sup> ORF3 及截短肽真核表达载体的构建

利用设计的引物, 以 pJET1.2-ORF3 为模板 PCR 扩增 PEDV DR13<sup>wt</sup> *orf3* 基因全长和系列截短肽编码 DNA; PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳纯化后通过同源重组连接至经 *Bam*H I 和 *Bgl* II 双酶切的 pEGFP-C1 载体, 构建 ORF3 及其截短肽的 EGFP 融合表达质粒。重组质粒经酶切和测序验证。得到的重组质粒见表 1。

表 1 本研究构建的重组质粒

Table 1 Recombinant plasmids constructed in this study

No	Plasmids name
1	pEGFP-ORF3
2	pEGFP-ORF3 <sup>1-173</sup>
3	pEGFP-ORF3 <sup>174-225</sup>
4	pEGFP-ORF3 <sup>1-91</sup>
5	pEGFP-ORF3 <sup>92-173</sup>
6	pEGFP-ORF3 <sup>1-39</sup>
7	pEGFP-ORF3 <sup>40-91</sup>
8	pEGFP-ORF3 <sup>Δ40-91</sup>
9	pEGFP-ORF3 <sup>40-63</sup>
10	pEGFP-ORF3 <sup>64-74</sup>
11	pEGFP-ORF3 <sup>75-91</sup>
12	pEGFP-ORF3 <sup>40-74</sup>
13	pEGFP-ORF3 <sup>64-91</sup>
14	pEGFP-ORF3 <sup>40-63+5SG+75-91</sup>
15	pEGFP-ORF3 <sup>40-91</sup> (AA)
16	pEGFP-ORF3 <sup>40-91</sup> (GG)
17	pEGFP-ORF3 <sup>40-91</sup> (HH)
18	pEGFP-ORF3 <sup>40-91</sup> (EE)

### 1.2.3 ORF3 蛋白及其截短肽的真核表达

将 Vero 细胞接种至预先放置细胞爬片的 24 孔板中, CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 °C 培养; 待细胞生长至 75% 的汇合度时, 按照 Lipofectamine 2000 使用说明书配置 Lipofectamine 2000 与重组质粒混合液, 室温下静置 5 min; 每孔加入 50  $\mu$ L 混合液, 轻摇混匀, 继续培养 16–18 h 表达 ORF3 蛋白及其截短肽。

### 1.2.4 细胞固定和细胞核染色

重组质粒转染后 16–18 h 弃培养液, 以 PBS 漂洗 3 次, 每次 3 min; 4% 的多聚甲醛于 37 °C 固定 15 min; 以 PBS 漂洗 3 次, 每次 3 min; Hoechst 33342 室温染核 15 min; 以 PBS 漂洗 3 次, 每次 3 min; 利用激光共聚焦显微镜观察融合蛋白表达及其细胞定位。

### 1.2.5 数据分析

利用 McMaster Biophotonics Facility ImageJ 软件的 Plot Profile 插件进行细胞切面荧光强度分析; 利用 Colocalization Finder 插件进行共定位定量分析, 共定位比率采用皮尔逊相关系数分析<sup>[18-19]</sup>。利用 SPSS Statistics 17.0 进行统计分析,  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 ORF3 蛋白定位于细胞质中

将 PEDV DR13<sup>wt</sup> *orf3* 基因克隆至 pEGFP-C1, 通过 EGFP 荧光观察 ORF3 蛋白在 Vero 细胞中定位。结果显示, 与 EGFP 蛋白分布于整个细胞 (细胞质和细胞核) 中不同, EGFP-ORF3 位于靠近细胞核的细胞质中 (图 1A)。细胞切面荧光强度分析<sup>[18]</sup>

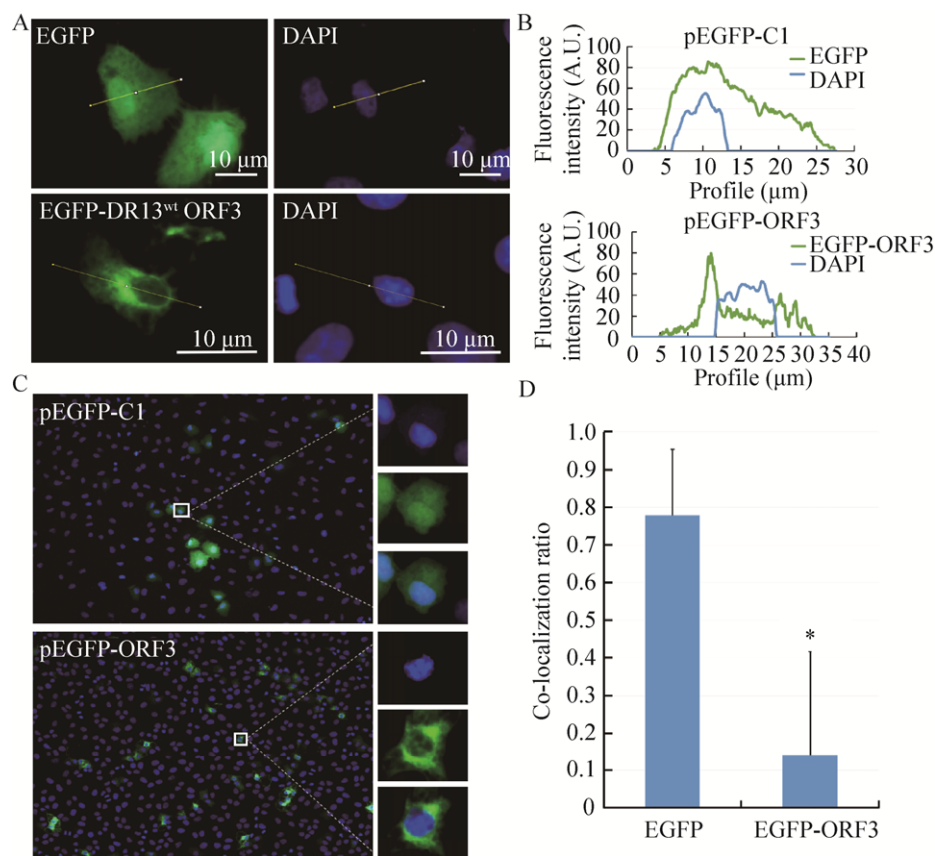


图 1 EGFP-ORF3 融合蛋白的细胞定位分析

Fig. 1 Localization of EGFP-ORF3. (A) Single-channel fluorescence image. (B) Fluorescence intensity analysis of the cell section in the figure A. (C) Multi-channel superimposed fluorescence images (200 $\times$ ). (D) Quantitative analysis of co-localization ratio of expressed proteins with nuclei in Figure C. The Pearson correlation coefficient is used for the co-localization ratio. \*  $P < 0.05$ .

也显示 EGFP 蛋白的荧光峰与核的荧光强度峰完全重叠,而融合蛋白 EGFP-ORF3 荧光信号几乎不与细胞核荧光信号重叠 (图 1B)。为了进一步分析 ORF3 蛋白的细胞内定位情况,我们分析了同一视野范围内所有阳性细胞中 EGFP 蛋白和 EGFP-DR13<sup>wt</sup> ORF3 融合蛋白与细胞核共定位比率<sup>[18-19]</sup>(图 1C),结果表明 EGFP 蛋白和融合蛋白 EGFP-DR13<sup>wt</sup> ORF3 的绿色荧光与细胞核(DAPI)的蓝色荧光共定位比率分别为 0.75 和 0.1,两者差异显著 (图 1D)。上述结果表明 PEDV ORF3 蛋白位于细胞质中。

2.2 PEDV DR13<sup>wt</sup> ORF3 蛋白序列分析及跨膜结构域预测

Wang 等<sup>[12]</sup>预测 PEDV CV777<sup>wt</sup> ORF3 蛋白包含 4 个预测跨膜域 (TM1 40–63 aa、TM2 75–91 aa、

TM3 116–139 aa、TM4 150–173 aa)。PEDV DR13<sup>wt</sup> ORF3 蛋白和 CV777<sup>wt</sup> ORF3 蛋白的氨基酸序列进行比对显示,两者氨基酸序列相似度为 97.32%,有 6 个氨基酸不同 (图 2)。TM1 和 TM3 的氨基酸序列完全相同,在 TM2、TM4 分别有 3 个和 1 个氨基酸差异。

为了进一步了解 DR13<sup>wt</sup> ORF3 蛋白的结构,使用 TMHMM 2.0 分析预测软件预测 DR13<sup>wt</sup> ORF3 蛋白、CV777<sup>wt</sup> ORF3 蛋白的跨膜域。如图 3 所示,DR13<sup>wt</sup> ORF3 蛋白与 CV777<sup>wt</sup> ORF3 蛋白预测的跨膜域完全一致,都仅有 2 个预测跨膜域 TM1 41–63 aa 和 TM2 76–98 aa。

2.3 ORF3 蛋白的 40–91aa 是其定位于细胞质中的关键基序

首先参照 Wang 等预测的 4 个跨膜域信息将

		Section 1					
		(1)	1	10	20	30	40 80
DR13 <sup>wt</sup> ORF3	(1)	M	F	L	G	L	F
CV777 <sup>wt</sup> ORF3	(1)	M	F	L	G	L	F
		Section 2					
		(51)	51	60	70	80	90 100
DR13 <sup>wt</sup> ORF3	(51)	S	V	F	I	Y	F
CV777 <sup>wt</sup> ORF3	(51)	S	V	F	I	Y	F
		Section 3					
		(101)	101	110	120	130	140 150
DR13 <sup>wt</sup> ORF3	(101)	T	L	I	G	R	L
CV777 <sup>wt</sup> ORF3	(101)	T	L	I	G	R	L
		Section 4					
		(151)	151	160	170	180	190 200
DR13 <sup>wt</sup> ORF3	(151)	D	H	Y	I	T	F
CV777 <sup>wt</sup> ORF3	(151)	D	H	Y	I	T	F
		Section 5					
		(201)	201	210	220	224	
DR13 <sup>wt</sup> ORF3	(201)	H	Q	I	V	G	I
CV777 <sup>wt</sup> ORF3	(201)	H	Q	I	V	G	I

图 2 PEDV DR13<sup>wt</sup> 和 CV777<sup>wt</sup> ORF3 蛋白氨基酸序列比较

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of ORF3 proteins of PEDV DR13<sup>wt</sup> and CV777<sup>wt</sup>. The predicted transmembrane domains were shaded gray; differential amino acids were in the bold red.

DR13<sup>wt</sup> ORF3 蛋白分成两段：包含 4 个跨膜域的 ORF3<sup>1-173</sup> 和 ORF3<sup>174-225</sup>。分别构建重组表达质粒 pEGFP-ORF3<sup>1-173</sup> 和 pEGFP-ORF3<sup>174-225</sup>，转染 Vero 细胞。激光共聚焦结果显示 EGFP-

ORF3<sup>174-225</sup> 融合蛋白在细胞质和细胞核中均存在，而 EGFP-ORF3<sup>1-173</sup> 仅存在于细胞质中（图 4），表明 ORF3<sup>1-173</sup> 中存在影响 ORF3 定位于细胞质中的关键序列。

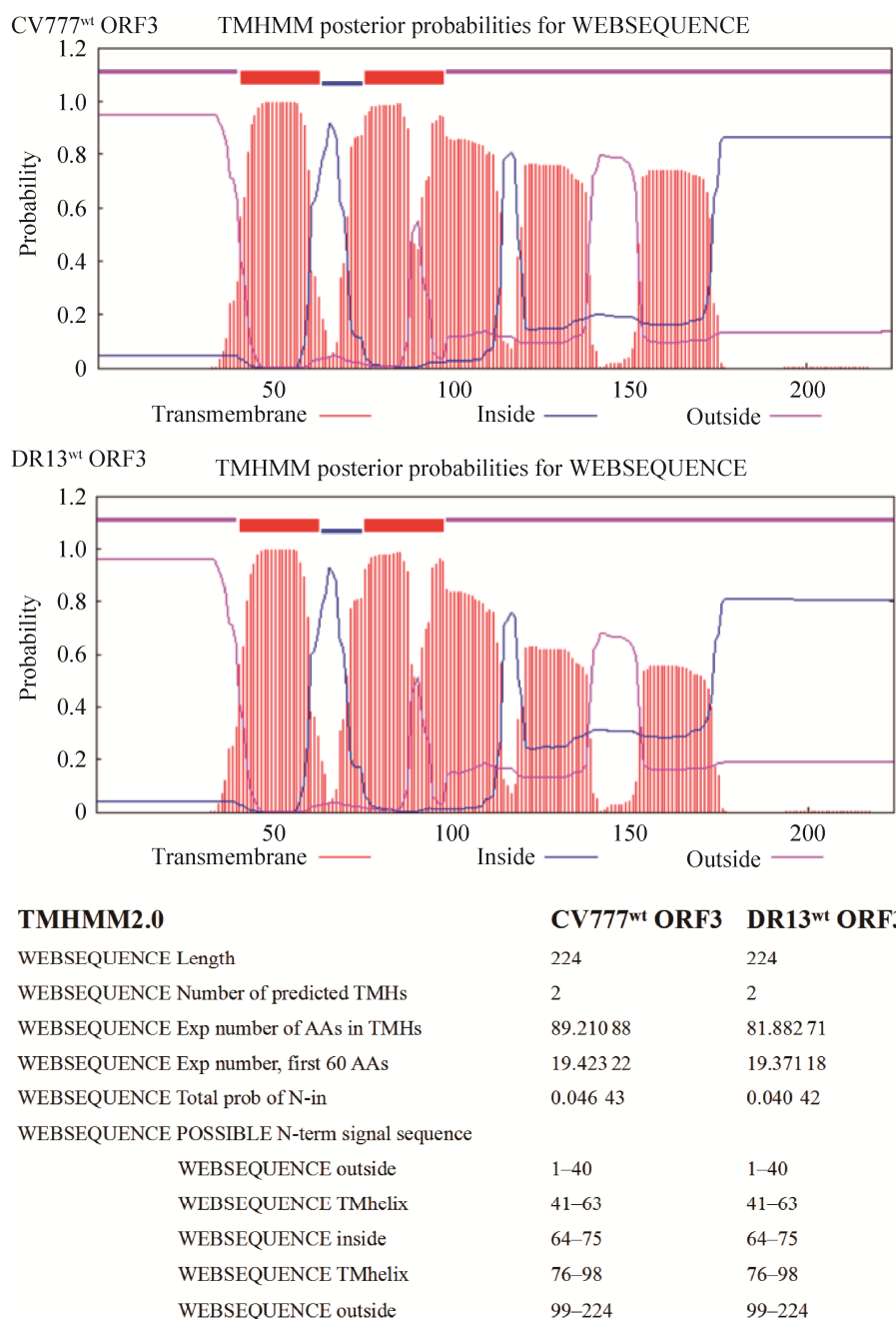


图 3 利用 TMHMM2.0 软件预测 PEDV ORF3 蛋白跨膜域

Fig. 3 Schematic representation of the predicted transmembrane topology with TMHMM Server version 2.0 of PEDV ORF3 protein.

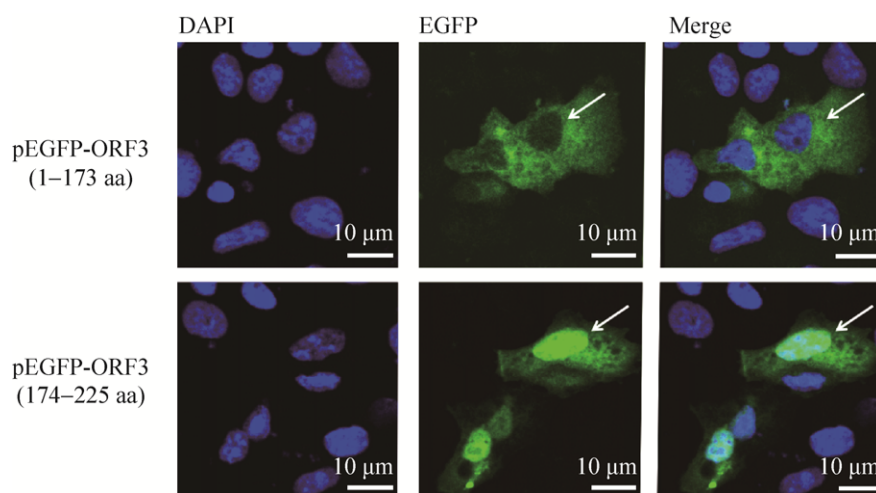


图 4 EGFP-ORF3<sup>1-173</sup> 和 EGFP-ORF3<sup>174-225</sup> 在 Vero 细胞中定位。

Fig. 4 Localization of EGFP-ORF3<sup>1-173</sup> and EGFP-ORF3<sup>174-225</sup> in Vero cells. The arrows indicate the nuclei.

为了确定 ORF3 的细胞质定位信号, 将 ORF3<sup>1-173</sup> 分为两段: 包含 Wang 等预测前两个跨膜域的 ORF3<sup>1-91</sup> 和 ORF3<sup>92-173</sup>。结果显示, EGFP-ORF3<sup>92-173</sup> 融合蛋白存在于细胞质和细胞核中, 而 EGFP-ORF3<sup>1-91</sup> 融合蛋白仅存在于细胞质中(图 5), 表明 ORF3<sup>1-91</sup> 中存在 ORF3 细胞质定位信号。

随后, 将 ORF3<sup>1-91</sup> 分为预测胞外区 ORF3<sup>1-39</sup> 和包含了两个预测跨膜域的 ORF3<sup>40-91</sup>。构建相应的重组质粒, 转染 Vero 细胞。结果显示 EGFP-ORF3<sup>1-39</sup> 融合蛋白分布在细胞质和细胞核中, 而 EGFP-ORF3<sup>40-91</sup> 仅分布在细胞质中(图 6), 说明 ORF3<sup>40-91</sup> 中存在影响 ORF3 定位于细胞质的关键序列。

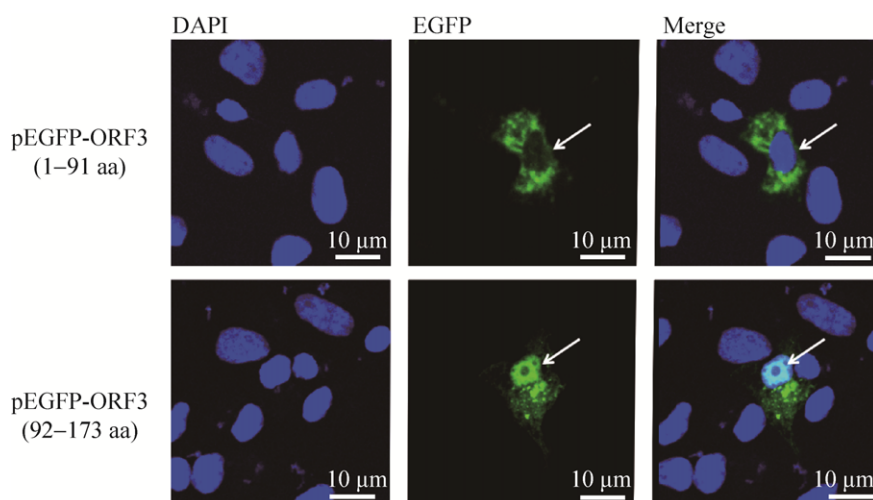


图 5 EGFP-ORF3<sup>1-91</sup> 和 EGFP-ORF3<sup>92-173</sup> 在 Vero 细胞中的定位

Fig. 5 Localization of EGFP-ORF3<sup>1-91</sup> and EGFP-ORF3<sup>92-173</sup> in Vero cells. The arrows indicate the nuclei.



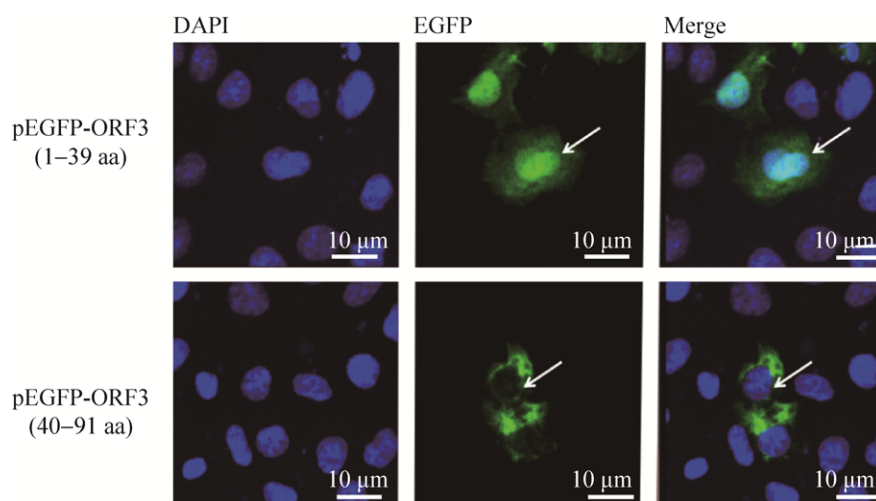


图 6 EGFP-ORF3<sup>1-39</sup> 和 EGFP-ORF3<sup>40-91</sup> 在 Vero 细胞中的定位

Fig. 6 Localization of EGFP-ORF3<sup>1-39</sup> and EGFP-ORF3<sup>40-91</sup> in Vero cells. The arrows indicate the nuclei.

## 2.4 ORF3<sup>40-91</sup> 的 3 个结构域 40-63 aa、64-74 aa 和 75-91 aa 单独或两两组合均不能定位于细胞质中

为了进一步确定影响 ORF3 蛋白定位的最小基序，分别将 ORF3 蛋白第一跨膜域 ORF3<sup>40-63</sup>、胞内区 ORF3<sup>64-74</sup> 和第二跨膜域 ORF3<sup>75-91</sup> 的编码

DNA 克隆至 pEGFP-C1，并分别转染 Vero 细胞。激光共聚焦显微镜分析显示表达的融合蛋白 EGFP-ORF3<sup>40-63</sup>、EGFP-ORF3<sup>64-74</sup>、EGFP-ORF3<sup>75-91</sup> 均位于细胞质和细胞核中 (图 7)，表明这 3 个多肽片段不能单独定位于细胞质中。

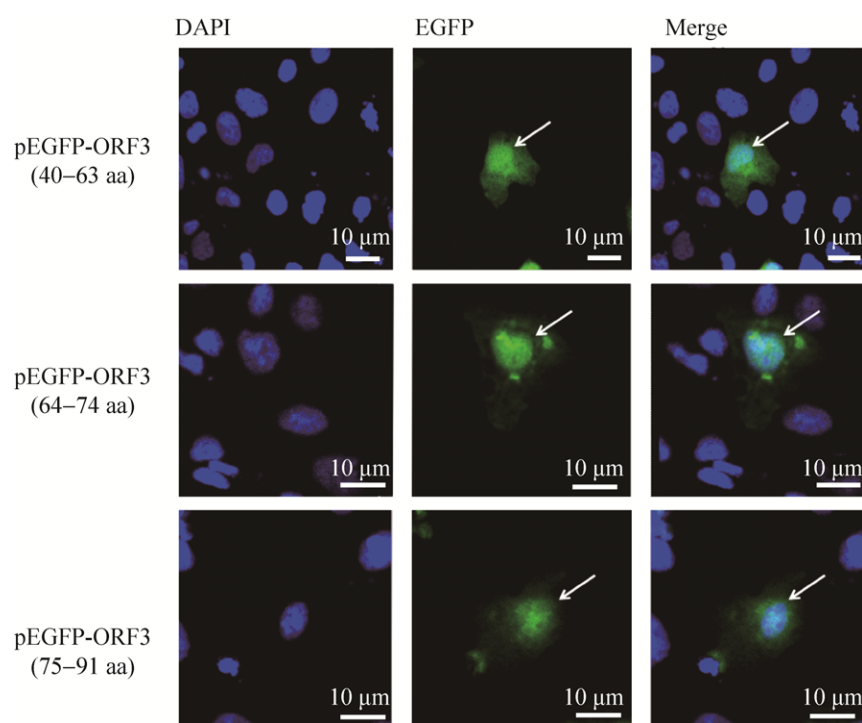


图 7 EGFP-ORF3<sup>40-63</sup>、EGFP-ORF3<sup>64-74</sup> 和 EGFP-ORF3<sup>75-91</sup> 在 Vero 细胞中定位

Fig. 7 Localization of EGFP-ORF3<sup>40-63</sup>, EGFP-ORF3<sup>64-74</sup> and EGFP-ORF3<sup>75-91</sup> in Vero cells. The arrows indicate the nuclei.



将 ORF3<sup>40-91</sup> 包含的 3 个结构域分别两两组合, 构建重组表达质粒 pEGFP-ORF3<sup>40-74</sup>、pEGFP-ORF3<sup>64-91</sup> 和 pEGFP-ORF3<sup>40-63+5SG+75-91</sup>, 转染 Vero 细胞并观察他们的细胞内定位。在 ORF3 的 2 个跨膜域 40-63 aa 和 75-91 aa 中间插入 5 对 Ser-Gly 的 linker 片段 (SGSGSGSGSG) 替代其胞内区以有利于跨膜域的形成。激光共聚焦显微镜分析结果显示表达的 EGFP-ORF3<sup>40-74</sup>、EGFP-ORF3<sup>64-91</sup> 和 EGFP-ORF3<sup>40-63+5SG+75-91</sup> 在细胞定位没有明显差异, 均分布在细胞质和细胞核中 (图 8), 表明 ORF3<sup>40-91</sup> 包含的 3 个结构域的两两组合也不能定位到细胞质中。

## 2.5 ORF3<sup>40-91</sup> 中 <sup>66</sup>RR<sup>67</sup> 的基序不是其细胞质定位信号

我们对 ORF3<sup>40-91</sup> 序列分析比对发现其胞内区的存在 <sup>66</sup>RR<sup>67</sup> 双精氨酸结构。有研究证实双精氨酸结构是内质网定位信号<sup>[20-21]</sup>, 为了验证 <sup>66</sup>RR<sup>67</sup> 是否为 ORF3<sup>40-91</sup> 的细胞质定位信号, 将 pEGFP-ORF3<sup>40-91</sup> 的双精氨酸密码子分别突变为

非极性的丙氨酸 (GCG) (中性)、极性的甘氨酸 (GGC) (中性)、带正电荷的组氨酸 (CAT) (碱性) 和带负电荷的谷氨酸 (GAG) (酸性)。结果显示突变前后的融合蛋白在细胞内的分布没有明显的差异 (图 9), 表明 <sup>66</sup>RR<sup>67</sup> 不是 ORF3<sup>40-91</sup> 的细胞质定位信号。

## 2.6 ORF3<sup>Δ40-91</sup> 分布在细胞质和细胞核中

为进一步验证 ORF3<sup>40-91</sup> 是 PEDV ORF3 细胞质定位的关键序列, 我们构建敲除 40-91 aa 片段的 EGFP-ORF3<sup>Δ40-91</sup> 表达载体 pEGFP-ORF3<sup>Δ40-91</sup>, 并转染 Vero 细胞。激光共聚焦分析显示, 与 EGFP-ORF3<sup>40-91</sup> 仅定位于细胞质中不同, EGFP-ORF3<sup>Δ40-91</sup> 融合蛋白分布在细胞核和细胞质中 (图 10A), 与 EGFP 蛋白的细胞内分布相似 (图 1A)。细胞切面荧光强度分析显示 EGFP-ORF3<sup>40-91</sup> 融合蛋白的荧光强度峰集中在细胞质中 (图 10B), 与 EGFP-ORF3 的细胞定位相似 (图 1B); 而 EGFP-ORF3<sup>Δ40-91</sup> 融合蛋白的荧光强度峰与细胞核的荧光强度峰几乎完全重叠 (图 10B), 表明

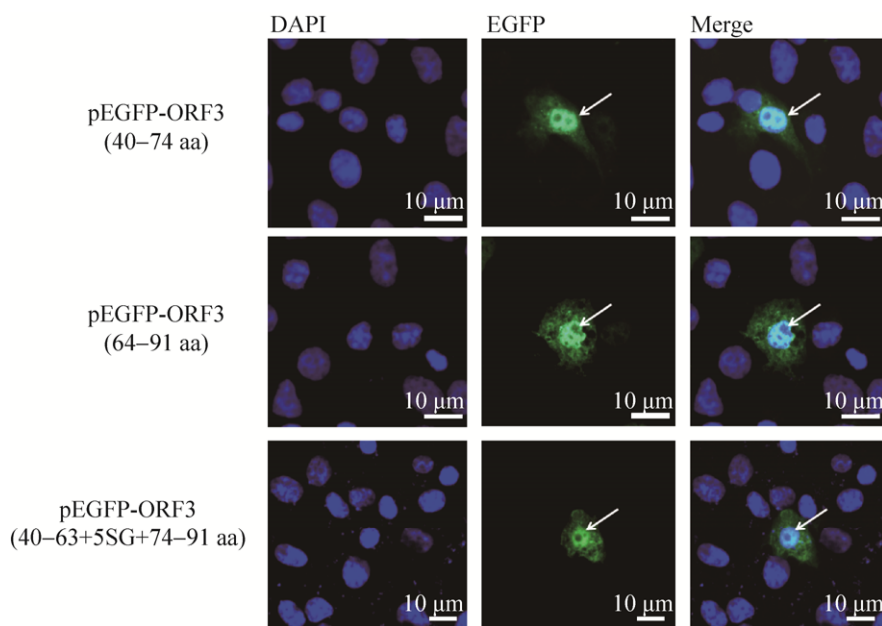


图 8 EGFP-ORF3<sup>40-74</sup>、EGFP-ORF3<sup>64-91</sup> 和 EGFP-ORF3<sup>40-63+5SG+75-91</sup> 在 Vero 细胞中的定位

Fig. 8 Localization of EGFP-ORF3<sup>40-74</sup>, EGFP-ORF3<sup>64-91</sup> and EGFP-ORF3<sup>40-63+5SG+75-91</sup> in Vero cells. The arrows indicate the nuclei.

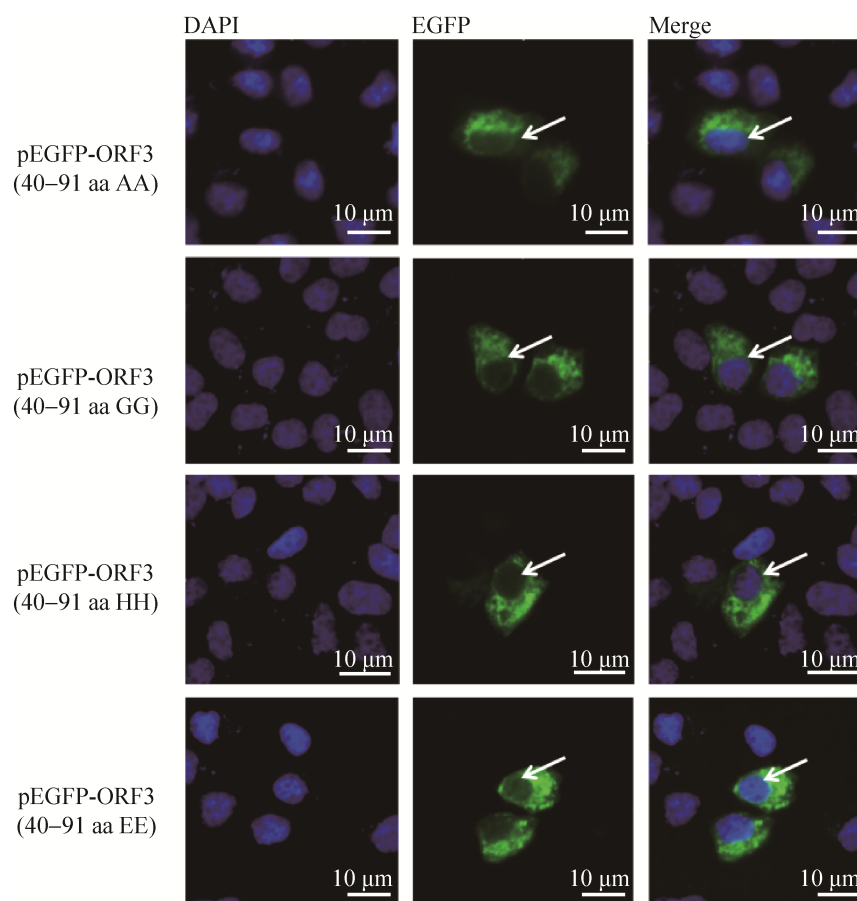


图 9 EGFP-ORF3<sup>40-91(AA)</sup>、EGFP-ORF3<sup>40-91(GG)</sup>、EGFP-ORF3<sup>40-91(HH)</sup>和 EGFP-ORF3<sup>40-91(EE)</sup>在 Vero 细胞中的定位

Fig. 9 Localization of EGFP-ORF3<sup>40-91(AA)</sup>, EGFP-ORF3<sup>40-91(GG)</sup>, EGFP-ORF3<sup>40-91(HH)</sup> and EGFP-ORF3<sup>40-91(EE)</sup> in Vero cells. The arrows indicate the nuclei.

其与细胞核共定位。对同一视野范围内所有阳性细胞中表达的融合蛋白与细胞核共定位比率统计分析显示 EGFP-ORF3<sup>40-91</sup> 和 EGFP-ORF3<sup>Δ40-91</sup> 的绿色荧光与细胞核 (DAPI) 的蓝色荧光共定位比率平均值分别为 0.1 和 0.65, 具有显著性差异 (图 10C、10D)。综合上述结果, 证实 40-91aa 序列是 PEDV ORF3 蛋白的细胞质定位结构域。

### 3 讨论

由于缺乏有效的疫苗, PED 依然是影响全球 (特别是亚洲国家) 生猪产业的重要疫病之一。与其他冠状病毒常编码多个辅助蛋白不同, PEDV 仅编码一个辅助蛋白 ORF3。研究表明 ORF3 蛋白

与 PEDV 的毒力有关<sup>[22]</sup>, ORF3 蛋白可以通过多种方式影响 PEDV 的增殖<sup>[12,16,23]</sup>。虽然在不同细胞中表达的携带不同标签的 ORF3 蛋白均分布在细胞质中<sup>[13-15]</sup>, 然而对于 ORF3 的细胞质定位信号或关键氨基酸基序目前仍不清楚。为此, 本研究采用可以自由进入细胞核的 EGFP 作为标记鉴定 ORF3 蛋白的细胞质定位标签, 发现包含两个跨膜域的 40-91 aa 片段是 ORF3 蛋白定位于细胞质中的关键结构域。

Zou 等<sup>[15]</sup>通过预测分析, 发现 PEDV CV777 ORF3 蛋白是包含 4 个预测跨膜域的 II 类跨膜蛋白, 这与 Wang 等<sup>[12]</sup>之前的预测结果一致。我们使用 TMHMM 2.0 重新在线预测 PEDV DR13<sup>wt</sup> 和

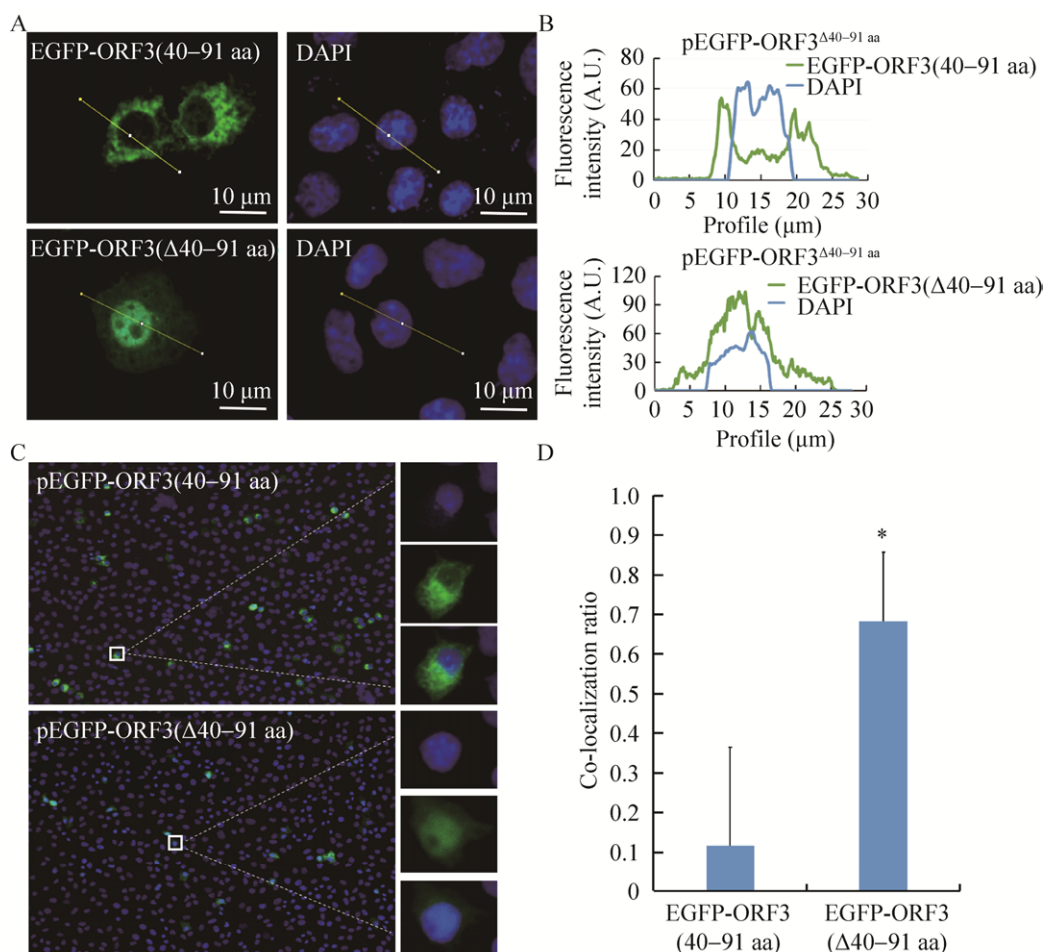


图 10 EGFP-ORF3<sup>40–91</sup> 和 EGFP-ORF3<sup>Δ40–91</sup> 在 Vero 细胞中的定位

Fig. 10 Localization of EGFP-ORF3<sup>40–91</sup> and EGFP-ORF3<sup>Δ40–91</sup> in Vero cells. (A) Single-channel fluorescence image. (B) Fluorescence intensity analysis of the cell section in the figure A. (C) Multi-channel superimposed fluorescence images (200×). (D) Quantitative analysis of co-localization ratio of the expressed proteins with nuclei in Figure C. The Pearson correlation coefficient is used for the co-localization ratio.

CV777<sup>wt</sup> ORF3 蛋白跨膜域, 结果显示二者具有相似的结构特性, 均包含 5 段疏水区。与前期的预测结果不同的是, 软件仅认为前 2 个疏水区可形成 2 个跨膜域。造成预测结果与报道有差异的原因可能与我们采用的升级版 TMHMM 2.0 软件的算法中界定跨膜域的界限值提高有关。当然, DR13<sup>wt</sup> ORF3 跨膜域的确定还有待于实验验证。本研究中鉴定到的 PEDV ORF3 的细胞质定位关键基序 40–91 aa 正好包含了预测的 2 个跨膜结构域及其中间的预测的胞内域, 而且 2 个跨膜域中任何一个跨膜域的缺失都将使其细胞质定位能

力, 显示 ORF3 的细胞质定位需要 2 个跨膜域的同时存在。姜普等<sup>[21]</sup>报道跨膜结构域是一类很重要内质网定位信号。如 Ryanonine 受体的内质网定位需要其第 1 个跨膜结构域和第 4 个跨膜区同时起协同作用<sup>[20]</sup>。因此我们推测 PEDV ORF3 也通过 2 个跨膜域定位于内质网上而位于细胞质中。虽然我们选择以亲水性、低电荷效应的 Gly-Ser 组合 5SG 替换 ORF3<sup>40–91</sup> 的胞内区, 但替换后的 EGFP-ORF3<sup>75–91</sup> 不再具有的细胞质定位能力, 显示胞内区 64–74 aa 与 2 个跨膜域在 ORF3 的细胞质定位过程中协同发挥作用。当然我们也

不能排除 5SG 替换通过影响 1 个或 2 个跨膜域的正确折叠而影响了 EGFP-ORF3<sup>75-91</sup> 的细胞质定位。

PEDV ORF3 蛋白的胞内区 64–75 aa 存在 1 个<sup>66</sup>RR<sup>67</sup> 双精氨酸基序。Scott 等<sup>[24]</sup>在对蛋白质的内质网定位信号研究中发现双精氨酸基序为部分蛋白的内质网定位信号。因此,本研究对 EGFP-ORF3<sup>40-91</sup> 上的双精氨酸位点进行突变,发现非极性(丙氨酸)和极性(甘氨酸、组氨酸、谷氨酸)氨基酸的替换均对突变后的融合蛋白的细胞定位没有影响,说明<sup>66</sup>RR<sup>67</sup> 双精氨酸不是影响 ORF3 蛋白细胞质定位的关键基序。

目前,关于 PEDV ORF3 蛋白的亚细胞定位还没有定论。有研究报道,ORF3 蛋白在表达的初期分布在细胞质中,随着时间的延长逐渐在细胞质中聚集为点状<sup>[13,15]</sup>。但也有报道 ORF3 蛋白在细胞质中弥散、均匀分布<sup>[14,17]</sup>。本研究也发现 EGFP-ORF3 表达融合蛋白早期均匀分布在细胞质中,后期有聚集趋势。总之,本研究证实 40–91 aa 是 ORF3 蛋白定位于细胞质中的关键结构域。该研究结果将为 ORF3 细胞转运机制的揭示及其功能研究奠定重要的前期基础。

## REFERENCES

- [1] Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis//Maier HJ, Bickerton E, Britton P, Eds. Coronaviruses. New York: Humana Press, 2015.
- [2] Guo JH, Fang LR, Ye X, et al. Evolutionary and genotypic analyses of global porcine epidemic diarrhea virus strains. Transbound Emerg Dis, 2019, 66(1): 111–118.
- [3] Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. Virus Genes, 2012, 44(2): 167–175.
- [4] Stevenson GW, Hoang H, Schwartz KJ, et al. Emergence of *Porcine epidemic diarrhea virus* in the United States: Clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. J Vet Diagnost Invest, 2013, 25(5): 649–654.
- [5] Wang LY, Byrum B, Zhang Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014. Emerg Infect Dis, 2014, 20(7): 1227–1230.
- [6] Sun RQ, Cai RJ, Chen YQ, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China. Emerg Infect Dis, 2012, 18(1): 161–163.
- [7] Pensaert MB, De Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. Arch Virol, 1978, 58(3): 243–247.
- [8] Temeeyasen G, Srijangwad A, Tripipat T, et al. Genetic diversity of ORF3 and spike genes of porcine epidemic diarrhea virus in Thailand. Infect Genet Evolut, 2014, 21: 205–213.
- [9] Yang DK, Hyun KH, Heon LS, et al. Isolation and characterization of a new porcine epidemic diarrhea virus variant that occurred in Korea in 2014. J Vet Sci, 2018, 19(1): 71.
- [10] Rahman SAE, Hoffmann M, Lueschow D, et al. Isolation and characterization of new variant strains of infectious bronchitis virus in northern Egypt. Adv Anim Vet Sci, 2015, 3(7): 362–371.
- [11] Debouck P, Pensaert M, Coussement W. The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV 777. Vet Microbiol, 1981, 6(2): 157–165.
- [12] Wang K, Lu W, Chen JF, et al. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production. FEBS Lett, 2012, 586(4): 384–391.
- [13] 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. Virus Genes, 2015, 51(3): 385–392.
- [14] Kaewborisuth C, He QG, Jongkaewwattana A. The accessory protein ORF3 contributes to porcine epidemic diarrhea virus replication by direct binding to the spike protein. Viruses, 2018, 10(8): 399.
- [15] Zou DH, Xu JX, Duan XL, et al. Porcine epidemic

- diarrhea virus ORF3 protein causes endoplasmic reticulum stress to facilitate autophagy. *Vet Microbiol*, 2019, 235: 209–219.
- [16] Si FS, Hu XX, Wang CY, et al. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) ORF3 enhances viral proliferation by inhibiting apoptosis of infected cells. *Viruses*, 2020, 12(2): 214.
- [17] Wongthida P, Liwnaree B, Wanasen N, et al. The role of ORF3 accessory protein in replication of cell-adapted porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). *Arch Virol*, 2017, 162(9): 2553–2563.
- [18] Fuchsová B, Novák P, Kafková J, et al. Nuclear DNA helicase II is recruited to IFN- $\alpha$ -activated transcription sites at PML nuclear bodies. *J Cell Biol*, 2002, 158(3): 463–473.
- [19] Dunn KW, Kamocka MM, McDonald JH. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol-Cell Physiol*, 2011, 300(4): C723–C742.
- [20] Bhat MB, Ma JJ. The transmembrane segment of ryanodine receptor contains an intracellular membrane retention signal for Ca<sup>2+</sup> release channel. *J Biol Chem*, 2002, 277(10): 8597–8601.
- [21] Jiang P, Sun W, Zhang YM, et al. Research progress in location signal of endoplasmic reticulum proteins. *Lett Biotechnol*, 2008, 19(6): 895–899 (in Chinese). 姜普, 孙薇, 张迎梅, 等. 内质网蛋白定位信号研究进展. *生物技术通讯*, 2008, 19(6): 895–899.
- [22] 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. *Vaccine*, 2003, 21(17/18): 1833–1842.
- [23] Hu XX, Yu RS, Si FS, et al. ORF3 protein promotes the proliferation of porcine epidemic diarrhea virus on Vero cells. *Microbiology China*, 2018, 45(7): 1508–1517 (in Chinese). 胡晓霞, 于瑞嵩, 司伏生, 等. ORF3 蛋白促进猪流行性腹泻病毒在 Vero 细胞上的增殖. *微生物学通报*, 2018, 45(7): 1508–1517.
- [24] Scott M, Lu G, Hallett M, et al. The Hera database and its use in the characterization of endoplasmic reticulum proteins. *Bioinformatics*, 2004, 20(6): 937–944.

(本文责编 郝丽芳)