

## 研究报告

## 棘突蛋白氨基端嵌入标签(记)蛋白的重组猪流行性腹泻病毒的拯救和鉴定

孙如晶<sup>1</sup>, 董世娟<sup>2,3</sup>, 于瑞嵩<sup>2,3</sup>, 李震<sup>2,3</sup>, 李春华<sup>2,3</sup>, 司伏生<sup>2,3</sup>, 谢春芳<sup>2,3</sup>, 陈冰清<sup>\*2,3</sup>, 张道敬<sup>\*1</sup>

1 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

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

3 上海农业遗传育种重点实验室, 上海 201106

孙如晶, 董世娟, 于瑞嵩, 李震, 李春华, 司伏生, 谢春芳, 陈冰清, 张道敬. 棘突蛋白氨基端嵌入标签(记)蛋白的重组猪流行性腹泻病毒的拯救和鉴定[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2534-2545.

SUN Rujing, DONG Shijuan, YU Ruisong, LI Zhen, LI Chunhua, SI Fusheng, XIE Chunfang, CHEN Bingqing, ZHANG Daojing. Rescue and identification of a recombinant porcine epidemic diarrhea virus carrying a tagged peptide at the N terminus of S protein[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2534-2545.

**摘要:** 【背景】猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是严重影响养猪业健康发展的动物传染病, 其致病原为猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)。PEDV 结构蛋白之一——棘突蛋白(spike protein, S protein)负责病毒的侵染、入胞等过程, 该蛋白结构和功能研究是 PEDV 分子生物学研究的热点。S 蛋白分为两个功能域, N 端的 S1 亚单位和 C 端的 S2 亚单位, 以往研究表明 PEDV DR13<sup>att</sup> 毒株 S1<sup>N</sup> (19–233 aa)结构域缺失, 不影响 DR13<sup>att</sup> 毒株的存活和增殖。【目的】基于靶向 RNA 重组技术, 在 PEDV (DR13<sup>att</sup>) S1<sup>N</sup> 结构域分别引入 HA 标签基因、抗坏血酸过氧化物酶(APEX2)基因, 构建重组 PEDV, 考察 S1<sup>N</sup> 结构域能否被标签(记)蛋白或多肽替换。【方法】利用靶向 RNA 重组技术的 PEDV 反向遗传学操作平台, 将转移载体 p-PEDV-DR13<sup>att</sup> 的 S1<sup>N</sup> 结构域(1–234 aa)分别替换成 HA 基因、APEX2 基因, 进行重组转移载体的构建, 再分别将线性化的载体体外转录的 RNA 转染至 mPEDV 感染的 LR7 细胞, 然后在 Vero 细胞上拯救重组 PEDV。通过观察细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)、RT-PCR 检测、测序、间接免疫荧光分析(immunofluorescence assay, IFA)、Western blotting 检测对重组病毒进行验证, 最后测定重组病毒滴度并绘制重组病毒生长曲线, 探究重组病毒与亲本病毒的生长特性。【结果】构建的重组病毒经过拯救和传代, 发现引入 HA 标签蛋白的重组猪流行性腹泻病毒 rPEDV-DR13-S1<sup>N</sup>-HA (rPEDV-DSH)在 P1 代出现细胞病变, 引入 APEX2 蛋白的重组猪流行性腹泻病毒 rPEDV-DR13-S1<sup>N</sup>-APEX2 (rPEDV-DSA)盲传至 P4 代, 未出现细胞病变。对

资助项目: 上海市科技创新行动计划扬帆专项(22YF1440600); 动物疾病防控团队(沪农科卓[2022]012)

This work was supported by the Shanghai Science and Technology Innovation Action Plan Sailing Special Project (22YF1440600) and the SAAS Program for Excellent Research Team ([2022]012).

\*Corresponding authors. E-mail: CHEN Bingqing, c13919966733@163.com; ZHANG Daojing, djz@ecust.edu.cn

Received: 2024-01-24; Accepted: 2024-02-26; Published online: 2024-04-11

P4 代的 rPEDV-DSH、rPEDV-DSA 进行 RT-PCR 检测、测序、间接免疫荧光分析、蛋白质印迹法验证,证实引入 HA 标签的重组病毒 rPEDV-DSH 拯救成功,而携带 APEX2 的重组病毒未能拯救成功。重组病毒 rPEDV-DSH 生长曲线表明 rPEDV-DSH 与亲本毒株 DR13<sup>att</sup> 有相似的生长趋势,但病毒增殖水平显著低于亲本毒株。【结论】HA 标签替换 S1<sup>N</sup>(1–234 aa)结构域的重组 PEDV rPEDV-DSH 成功拯救,为进一步研究 S 蛋白与宿主细胞的互作机制建立了基础。

关键词:猪流行性腹泻病毒;HA 标签;靶向 RNA 重组技术;S1<sup>N</sup> 结构域

## Rescue and identification of a recombinant porcine epidemic diarrhea virus carrying a tagged peptide at the N terminus of S protein

SUN Rujing<sup>1</sup>, DONG Shijuan<sup>2,3</sup>, YU Ruisong<sup>2,3</sup>, LI Zhen<sup>2,3</sup>, LI Chunhua<sup>2,3</sup>, SI Fusheng<sup>2,3</sup>, XIE Chunfang<sup>2,3</sup>, CHEN Bingqing<sup>\*2,3</sup>, ZHANG Daojing<sup>\*1</sup>

1 State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

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

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

**Abstract: [Background]** Porcine epidemic diarrhea caused by porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) is a severe porcine infectious disease causing serious losses to the pig industry. The spike (S) protein, one of the structural proteins of PEDV, is responsible for viral infection and entry in host cells. The structure and function of S protein are a research hotspot in the molecular biology of PEDV. The S protein of PEDV has two functional domains: the N-terminal S1 domain and the C-terminal S2 domain. Deletion of the S1<sup>N</sup> domain (position: 19–233 aa) did not impair the survival or propagation of the PEDV strain DR13<sup>att</sup> *in vitro*. **[Objective]** To know whether a tagged protein or peptide can substitute the S1<sup>N</sup> domain, we introduced the HA tag and soybean ascorbate peroxidase (APEX2) gene respectively into the S1<sup>N</sup> domain of DR13<sup>att</sup> to establish recombinant viruses by targeted RNA recombination. **[Methods]** The S1<sup>N</sup> domain (position: 1–234 aa) of the transfer vector p-PEDV-DR13<sup>att</sup> was respectively substituted with HA gene and APEX2 gene and the transfer vectors were linearized. The RNA of linearized transfer vectors were electrotransferred to the LR7 cells infected with mPEDV, and the recombinant PEDV was rescued on Vero cells. The recombinant virus was validated by observation of cytopathic effect (CPE), RT-PCR, sequencing, indirect immunofluorescence assay (IFA), and Western blotting. Finally, the titer of each recombinant virus was measured and the growth curve of each recombinant virus was plotted to reveal the growth characteristics of the recombinant viruses and their parent virus. **[Results]** The constructed recombinant viruses were rescued and passaged. The recombinant virus rPEDV-DR13-S1<sup>N</sup>-HA (rPEDV-DSH) carrying the HA tag instead of the S1<sup>N</sup> domain showed CPE in P1. The recombinant virus rPEDV-DR13-S1<sup>N</sup>-APEX2 (rPEDV-DSA) carrying APEX2 had not

presented CPE until blind passage to P4. The RT-PCR, sequencing, IFA, and Western blotting of rPEDV-DSH and rPEDV-DSA in P4 confirmed that rPEDV-DSH with the HA tag was successfully rescued, while rPEDV-DSA was not rescued. The growth curves indicated that rPEDV-DSH had a similar growth trend but decreased proliferation level compared with the parent strain DR13<sup>att</sup>. **[Conclusion]** The recombinant virus rPEDV-DSH carrying a HA tag in the S1<sup>N</sup> domain (position: 1–234 aa) was successfully rescued, which laid a foundation for further research on the interaction mechanism between the S protein and host cells.

**Keywords:** porcine epidemic diarrhea virus; HA tag; targeted RNA recombination; S1<sup>N</sup> domain

猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)是猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)的病原, 主要引起不同年龄段的猪发生以腹泻、呕吐、脱水为特征的接触性肠道传染病。该病最初是在 20 世纪的 70–80 年代被发现, 但是从 2010 年起, 国内外大规模暴发 PED, 给养猪业造成重大损失<sup>[1–2]</sup>。PEDV 是冠状病毒科  $\alpha$  冠状病毒属的成员, 基因组为单股正链 RNA, 长 28–32 kb<sup>[3–4]</sup>, 包括 6 个开放阅读框, 分别编码复制酶(replicase, Rep), 棘突蛋白(spike, S), ORF3 附属蛋白, 囊膜蛋白(envelope, E)、膜蛋白(membrane, M)以及核衣壳蛋白(nucleocapsid, N)。

S 蛋白是冠状病毒细胞受体的配体, PEDV S 蛋白分子量为 180–200 kDa, 包含 1 383 个氨基酸, 含多个 N-糖基化位点<sup>[4–5]</sup>。S 蛋白胞外部分(ectodomain)可分为两个功能域: N 端的 S1 亚单位和 C 端的 S2 亚单位, 前者负责受体结合, 后者主要负责膜融合<sup>[5]</sup>。S1 亚单位又可分为有唾液酸结合活性的 N 末端功能域(19–233 位氨基酸, S1<sup>N</sup>)以及与蛋白受体结合的 C 端功能域(501–629 位氨基酸)<sup>[6–7]</sup>。研究表明 S1<sup>N</sup> 结构域的唾液酸结合活性有利于病毒的感染, 然而不同的 PEDV 毒株展现出不同的结合唾液酸能力, 结合唾液酸也不是所有 PEDV 毒株的普遍特征, 如 S1<sup>N</sup> 结构域缺失, 并不影响 DR13<sup>att</sup> 毒株的增殖效率<sup>[6]</sup>。然而, 将 S1<sup>N</sup> 端结构域替换

成其他的蛋白, 是否会改变 S 蛋白的构象进而影响病毒的侵染, 目前尚无相关报道, 有待进一步研究。

用不同蛋白进行标记已被广泛用于可视化 and 表征病毒蛋白<sup>[8]</sup>。HA 标签(氨基酸序列: YPYDVPDYA)是一段来源于人流感病毒血凝素(hemagglutinin, HA)蛋白第 98–106 位氨基酸的短序列, 分子量为 1.1 kDa, 是目前广泛应用的表位标签之一<sup>[9]</sup>。将 HA 标签融合到目的蛋白的 C 端或 N 端后, 抗 HA 标签抗体可用于 HA 标记的靶蛋白的检测、分离和纯化, 而无需蛋白特异性抗体或探针。工程抗坏血酸过氧化物酶(APEX2)用于蛋白质相互作用的邻近标记技术, 在底物生物素苯酚作用下, 能够快速标记 20 nm 半径区域内所有的蛋白质<sup>[10–11]</sup>。有研究报告, 将 APEX2 串联靶蛋白基因或信号肽序列表达融合蛋白不仅可以鉴定细胞器的蛋白<sup>[12–14]</sup>, 还可用于检测细胞表面的蛋白<sup>[15]</sup>。

本研究将基于已经建立的靶向 RNA 重组技术<sup>[16]</sup>, 将 PEDV (DR13<sup>att</sup>)的 S1<sup>N</sup> (1–234 aa)端结构域分别替换成 APEX2 基因和标签蛋白 HA 基因, 考察在病毒的 S1<sup>N</sup> 端引入外源基因是否影响病毒的拯救和侵染, 研究结果不仅能够揭示 PEDV S 蛋白 N 端的空间结构和功能的柔性, 而且为 PEDV 与宿主细胞互作研究提供更多技术手段。

# 1 材料与amp;方法

## 1.1 材料

LR7 细胞(稳定表达鼠肝炎病毒受体的 L-2 鼠成纤维细胞系)由乌得勒支大学 Peter JM Rottier 教授赠送; Vero 细胞(CCL-81 非洲绿猴肾细胞), American Type Culture collection (ATCC); LR7 细胞和 Vero 细胞均在补充有 10%胎牛血清和青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 μg/mL)的 DMEM 培养液中进行培养。mPEDV 为携带小鼠肝炎冠状病毒 S 蛋白的胞外域的重组 PEDV, 该病毒能够感染小鼠 LR7 细胞, 由本实验室保存。转移载体 p-PEDV-S<sup>att</sup>-ΔORF3/RLuc、DR13<sup>att</sup> 毒株均由本实验室保存。兔抗 PEDV N 单克隆抗体和兔抗 HA 单克隆抗体, 上海安驰生物技术公司; 鼠抗 β-actin 单克隆抗体, 碧云天生物技术有限公司; 兔抗 PEDV M 多克隆抗体由本实验室制备; Alexa Fluor 647 标记的羊抗兔和 Alexa Fluor 488 标记的羊抗鼠抗体, 碧云天生物

技术有限公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 或辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG, 北京索莱宝科技有限公司。pcDNA3.0 APEX2-NES (plasmid#49386), Addgene 公司。

T7 RNA 聚合酶试剂盒, 英潍捷基(上海)贸易有限公司; 点突变试剂盒 Mut Express II Fast Mutagenesis Kit V2 和同源重组试剂盒 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; RIPA 缓冲液, 北京全式金生物技术有限公司; RT-PCR 试剂, 宝生物工程(大连)有限公司; 胎牛血清, 浙江天杭生物科技股份有限公司; TIANamp 病毒 RNA 试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 反转录试剂, 普洛麦格(北京)生物技术有限公司。Evos 荧光显微镜, Thermo Fisher 公司; 蛋白质印迹分析系统, GE Healthcare 公司; 基因脉冲仪, Bio-Rad 公司。

本研究中使用的引物见表 1。所有构建载体均通过测序验证。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	扩增片段 Amplified fragment	产物大小 Product size (bp)
DR13-V (F)	GCCAATGTATTTGCCACTGATTCCAATGGCCATAT	p-PEDV-DR13-S <sup>ΔN</sup>	10 550
DR13-V (R)	TTGTTTACGTTGACCAAATGATTAGAAAAGCCACA		
DSALx (F)	CATTGGTCAACGTAAACAAATGAAGTCTTTAACCTACTTCTG GTTGTTCTTACCAGTACTTTTAACAGGTCTTGCTCAAGCTGGA AAGTCTTACCCAAGTGT	SP-APEX2-L	828
DSAL (R)	TCAGTGGCAAATACATTGGCACCACCAGAACCACCAGAGGCA TCAGCAAACCCAAGCT		
DSHx (F)	CATTGGTCAACGTAAACAAATGAAGTCTTTAACCTACTTCTG GTTGTTCTTACCAGTACTTTTAACACTTAGTCTTGCTCAATATC CTTATGATGTTCTGATTATGCTGCCAATGTATTTGCCACTGA	p-DSH	10 610
DSHx (R)	TCAGTGGCAAATACATTGGCAGCATAATCAGGAACATCATAAG GATATTGAGCAAGACTAAGTGTTAAAGTACTGGTAAGAACA ACCAGAAGTAGGTTAAAGACTTCATTTGTTTACGTTGACCAAA TG		
PrDF (F)	GACACCATTGTGGCTTTTCT	DSAL1/DSH1	1 206/438
PrDF (R)	GAGGAATTACTGCAAACAAA		

## 1.2 重组 PEDV 转移载体的构建

在转移载体 p-PEDV-S<sup>att</sup>-ΔORF3/RLuc 的基础上, 构建重组病毒的转移载体。将 p-PEDV-S<sup>att</sup>-ΔORF3/RLuc 中的 S 基因的 S1<sup>N</sup> 结构域(1-234 aa) 替换成 PEDV 普遍应用的信号肽(signal peptide, SP, 序列: MKSLTYFWLFLPVLLTSLAQ) 和 HA 标签(27 nt)的基因。具体实验过程: 以转移载体 p-PEDV-S<sup>att</sup>-ΔORF3/RLuc 为模板, DR13-V (F)和 DR13-V (R)分别为上、下游引物, 扩增缺失 S1<sup>N</sup> 端的 p-PEDV-S<sup>att</sup>-ΔORF3/RLuc-S<sup>ΔN</sup> (S<sup>ΔN</sup>, 235-1 383 aa)。PCR 反应体系: p-PEDV-S<sup>att</sup>-ΔORF3/RLuc (约 200 ng/μL) 0.5 μL, 引物 DR13-V (F)和 DR13-V (R) (10 μmol/L)各 2 μL, 2×Phanta Max Master Mix 12.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 8 μL。PCR 反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 15 s, 58 °C 15 s, 72 °C 8 min, 共 30 个循环; 72 °C 5 min。以 p-PEDV-S<sup>att</sup>-ΔORF3/RLuc-S<sup>ΔN</sup> 为载体, DSHx (F) 和 DSHx (R)为上、下游引物, 应用一步克隆试剂 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 将载体 p-PEDV-S<sup>att</sup>-ΔORF3/RLuc-S<sup>ΔN</sup> 和引物同源重组为携带有 S 基因信号肽 SP 和 HA 标签的转移载体, 该转移载体记作 p-DSH。PCR 反应体系 (10 μL): 载体片段 p-PEDV-S<sup>att</sup>-ΔORF3/RLuc-S<sup>ΔN</sup> 3 μL, 引物 DSHx (F)和 DSHx (R) (10 μmol/L)各 1 μL, 2×ClonExpress Mix 5 μL。PCR 反应条件: 50 °C 30 min。将重组产物加入 100 μL *E. coli* DH5α 感受态细胞中进行转化, 挑取阳性克隆, 提取质粒, 测序验证, 获得载体 p-DSH。

将 p-PEDV-S<sup>att</sup>-ΔORF3/RLuc 中的 S 基因的 S1<sup>N</sup> 结构域(1-234 aa)替换成信号肽(SP, 序列: MKSLTYFWLFLPVLLTSLAQ) 和 APEX2 (747 nt)的基因, 考虑具有较大分子质量的 APEX2 (31.8 kDa)与缺失 S1<sup>N</sup> 结构域的 S 蛋白形成融合蛋白后可能会对彼此结构和构象有较大影响, 因此我们在两段基因之间插入一段 6 个

氨基酸的 linker (SGGSGG)。具体实验过程: 以 pcDNA3.0 APEX2-NES 为模板, DSALx (F)和 DSAL (R)为上、下游引物, 扩增融合 S 基因信号肽 SP、APEX2 及 linker 的 SP-APEX2-linker 序列, 命名为 SP-APEX2-L。PCR 反应体系: pcDNA3.0 APEX2-NES (约 200 ng/μL) 0.5 μL, 引物 DSALx (F)和 DSAL (R) (10 μmol/L)各 2 μL, 2×Phanta Max Master Mix 12.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 8 μL。PCR 反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 15 s, 58 °C 15 s, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 5 min。采用 Fusion-PCR 的方法, 以 p-PEDV-S<sup>att</sup>-ΔORF3/RLuc-S<sup>ΔN</sup> 为载体, SP-APEX2-L 为插入片段, 使用一步克隆试剂 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 将载体 p-PEDV-S<sup>att</sup>-ΔORF3/RLuc-S<sup>ΔN</sup> 和片段 SP-APEX2-L 同源重组。PCR 反应体系: 胶回收载体片段 p-PEDV-S<sup>att</sup>-ΔORF3/RLuc-S<sup>ΔN</sup> (约 50 ng/μL) 3 μL, 插入片段 SP-APEX2-L (约 200 ng/μL) 1 μL, 2×ClonExpress Mix 5 μL, ddH<sub>2</sub>O 1 μL。PCR 反应条件: 50 °C 30 min。另外, 以上述构建好的转移载体 p-DSAP 为模板, APEX C31S (F) (5'-GCTGAGAAGAGAAAGCGCTCCTCTAATGC-3') 和 C31S (R) (5'-GCATTAGAGGAGCGCTTCTCTTCTCAGC-3')为上、下游引物, 应用点突变试剂 Mut Express II Fast Mutagenesis Kit V2 将 APEX2 上 C31 位的半胱氨酸(C)变成丝氨酸(S)<sup>[17]</sup>, 提高 APEX2 的表达水平, 该转移载体记作 p-DSA。PCR 反应体系: 转移载体 p-DSA (约 200 ng/μL) 1 μL, APEX C31S (F)和 C31S (R) (10 μmol/L) 各 1 μL, 2×Max Buffer 12.5 μL, dNTP Mix (10 mmol/L each) 1 μL, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 8 μL。PCR 反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 15 s, 58 °C 15 s, 72 °C 10 min, 共 30 个循环; 72 °C 5 min。将 PCR 产物加入 *Dpn* I 酶 1 μL, 37 °C 1 h。加入 *Dpn* I 酶消化产物(约 400 ng/μL) 1 μL, 5×CE II Buffer

4  $\mu\text{L}$ , Exnase II 2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 13  $\mu\text{L}$ , 37 °C 30 min。将重组产物加入 100  $\mu\text{L}$  *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中进行转化,挑取阳性克隆,提取质粒,测序验证,获得载体 p-DSA。

### 1.3 重组 PEDV 的靶向 RNA 重组与拯救

病毒拯救参照实验室前期建立的技术流程<sup>[13]</sup>。首先 LR7 细胞生长至 90%汇合时,将 mPEDV 以 MOI=1.0 进行感染。当接种后约 8 h 开始出现明显的细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)时,用胰蛋白酶处理细胞以产生单细胞悬液,并用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次。构建的转移载体经 *Pac* I 酶线性化后,利用 T7 RNA 聚合酶试剂将线性化的转移载体体外转录成 RNA (供体 RNA)。随后使用基因脉冲仪通过电穿孔(300 V、975  $\mu\text{F}$  和 2 个连续脉冲)将供体 RNA 转染到上述 mPEDV 感染的 LR7 细胞中。最后,将电穿孔的细胞重悬于 DMEM 中,并覆盖在长至单层的 Vero 细胞上。将 Vero 细胞置于二氧化碳培养箱中,37 °C 孵育 4–5 d,观察 Vero 细胞病变,冻融 3 次后收获培养上清液中的子代病毒,记作 P0 代,P0 代病毒盲传至 P4 代并进行后续鉴定。

### 1.4 间接免疫荧光鉴定

将 Vero 细胞置于 48 孔板中培养,待细胞生长至 90%汇合,将 150  $\mu\text{L}$  重组病毒培养物接种至细胞中,孵育 2 h 后,除去接种物,补充 DMEM 培养液进行培养。24 h 后,用 PBS 清洗细胞 3 次,在室温下用 4%多聚甲醛固定 15 min,并在 37 °C 下用含有 0.1% Triton X-100 的 PBS 溶液透化 15 min。再将细胞用 5%山羊血清在 37 °C 下封闭 1 h 后,以兔抗 PEDV M 多克隆抗体(1:100)和鼠抗 HA 单克隆抗体(1:150)为一抗,Alexa Fluor 647 标记的羊抗兔(7:100)和 Alexa Fluor 488 标记的羊抗鼠(1:200)抗体为二抗进行孵育。最后,将 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)

(1:1 000 稀释液)作用于细胞,37 °C 孵育 15 min, PBS 清洗细胞 3 次。使用 Evos 荧光显微镜进行观察,捕获免疫荧光细胞的图片。

### 1.5 Western blotting 鉴定

将 Vero 细胞接种至 10 cm 培养皿中,当细胞生长至 90%汇合时,将 2 mL 重组病毒培养物接种到细胞中。孵育 2 h 后,除去接种物,补充 DMEM 培养液进行培养。36 h 后收获细胞并用 200  $\mu\text{L}$  预冷的 RIPA 缓冲液在冰上裂解 30 min。4 °C、12 000 $\times g$  离心 15 min 收集上清液。样品通过 12% SDS-PAGE 电泳分离后转移至 PVDF 膜,置于含 5%脱脂奶粉的 TBST 缓冲液中 4 °C 封闭过夜,然后以兔抗 PEDV N 单克隆抗体(1:3 000)、兔抗 HA 单克隆抗体(1:2 000)或鼠抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体(1:2 000)为一抗,以辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG (1:20 000)或辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG (1:20 000)为二抗进行 Western blotting 鉴定。

### 1.6 病毒滴度测定

使用 50%组织培养感染剂量(TCID<sub>50</sub>)测定法在 96 孔板中测量病毒滴度。将培养物上清液以 10 倍倍比连续稀释至 10<sup>-8</sup>,每次稀释做 3 个重复,并添加到 96 孔培养板中的单层 Vero 细胞中。感染 5 d 后,根据 Reed-Muench 方法测定病毒滴度<sup>[18]</sup>。

### 1.7 重组病毒生长动力学测定

将 Vero 细胞接种于 6 孔板中,待细胞长成单层,感染重组病毒(MOI=1),每个组设置 3 个平行。接种 2 h 后,除去接种物,补充 DMEM 培养液,在 37 °C 二氧化碳培养箱进行培养。在感染 6、12、18、24、30、36、42、48、54 和 60 h 时,分别收集培养物上清,保存于-80 °C 冰箱,后续测定培养物上清的病毒滴度,绘制病毒生长曲线;并通过 RT-PCR 方法检测培养物上清中病毒粒子的拷贝数<sup>[19]</sup>。

## 1.8 统计分析

使用 GraphPad Prism 软件进行数据统计分析。数据表示为平均值 $\pm$ 标准误差(SEM)。采用  $t$  检验确定平均值之间差异的统计显著性 ( $P<0.01$ )。病毒 RNA 拷贝数和病毒滴度相关的数据被转换为  $\lg$  以保持正态分布。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组猪流行性腹泻病毒转移载体的构建

以转移载体 p-PEDV-S<sup>att</sup>- $\Delta$ ORF3/RLuc 为模板, 扩增缺失 S1<sup>N</sup> (1-234 aa) 端的载体片段 p-PEDV-S<sup>att</sup>- $\Delta$ ORF3/RLuc-S<sup>AN</sup>, 再与引物 DSHx (F) 和 DSHx (R) 进行同源重组构建缺失 S1<sup>N</sup> 结构域、引入 HA 标签基因的 p-DSH 载体。以 pcDNA3.0 APEX2-NES 为模板, DSALx (F) 和 DSAL (R) 为上下游引物, 扩增融合 S 基因信号肽 SP、APEX2 及 linker 的序列 SP-APEX2-L, 再与 p-PEDV-S<sup>att</sup>- $\Delta$ ORF3/RLuc-S<sup>AN</sup> 载体进行同源重组构建缺失 S1<sup>N</sup> 结构域、引入 APEX2 基因的 p-DSA 载体。转移载体 p-DSH 和 p-DSA 结构示意图如图 1A 所示。获得的 p-DSH、p-DSA 转移载体经 *pac* I 线性化后, 电泳显示条带大小与预期相符(图 1B), 进一步测序确认转移载体 p-DSH 和 p-DSA 序列正确, 表明成功构建 p-DSH 和 p-DSA (图 1C)。

### 2.2 重组猪流行性腹泻病毒的拯救

将获得的转移载体 p-DSH 和 p-DSA 线性化后, 使用 T7 RNA 聚合酶试剂盒合成 RNA 转录本, 通过电穿孔转染至感染 mPEDV 的 LR7 细胞中, 然后将 LR7 细胞覆盖到 Vero 细胞上。37 °C 孵育 4-5 d 后, 将细胞冻融 3 次, 收获培养上清液中的子代病毒, 并进行盲传。结果显示, 重组病毒 rPEDV-DSH 盲传至 P1 代时, Vero 细胞出现 CPE, 细胞变圆并脱落。而重组病毒 rPEDV-DSA 与电转阴性对照/细胞阴性对照一

致, 没有细胞病变, 盲传至 P4 代也未出现细胞病变现象(图 2)。利用引物 PrDF (F) 和 PrDF (R) 对 P4 代上清液进行 RT-PCR 检测, 结果表明重组病毒 rPEDV-DSH 扩增的条带大小与预期相符, 重组病毒 rPEDV-DSA 未扩增到相应的条带(图 3)。重组病毒 rPEDV-DSH 测序结果显示, 信号肽序列和 HA 基因序列重组至重组病毒 rPEDV-DSH, 扩增的序列与预期一致。

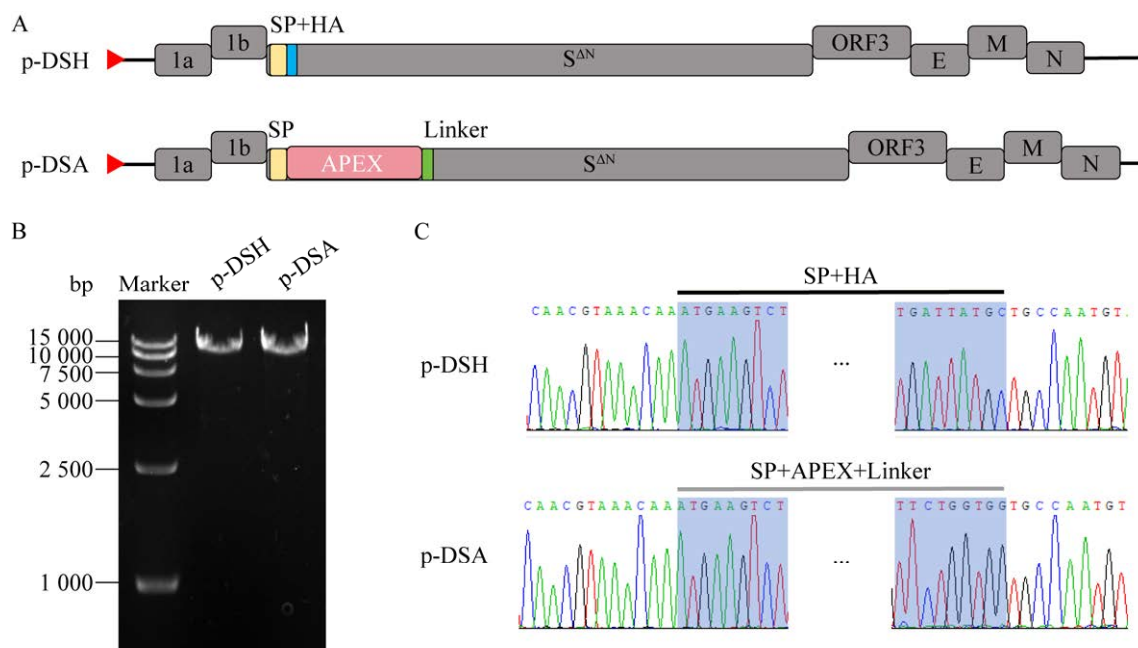
### 2.3 重组 PEDV 的间接免疫荧光鉴定

为了确定重组病毒的拯救情况, 我们利用间接免疫荧光(indirect immunofluorescence assay, IFA)鉴定重组病毒。将盲传至 P4 代的重组病毒 rPEDV-DSH、rPEDV-DSA、病毒感染细胞对照 PEDV (DR13<sup>att</sup> 毒株) 和电转的阴性对照的培养物感染 Vero 细胞, 24 h 后固定细胞并应用兔抗 PEDV M 多克隆抗体和鼠抗 HA 单克隆抗体进行免疫荧光鉴定。结果显示, 以兔抗 PEDV M 多克隆抗体为一抗, DR13<sup>att</sup> 毒株和重组病毒 rPEDV-DSH 感染的细胞均出现红色荧光; 而电转的阴性对照和重组病毒 rPEDV-DSA 感染的细胞未出现荧光。以鼠抗 HA 单克隆抗体为一抗, 重组病毒 rPEDV-DSH 感染的细胞出现绿色荧光(图 4), 其他病毒与阴性对照组均未出现荧光。重组病毒 rPEDV-DSH HA 蛋白的绿色荧光和 PEDV M 蛋白的红色荧光少部分重合后呈黄色荧光。上述结果说明重组病毒 rPEDV-DSA 未被拯救成功, 而重组病毒 rPEDV-DSH 拯救成功, 且 S 基因前端插入的 HA 基因成功翻译表达。

### 2.4 重组 PEDV 的蛋白质免疫印迹鉴定

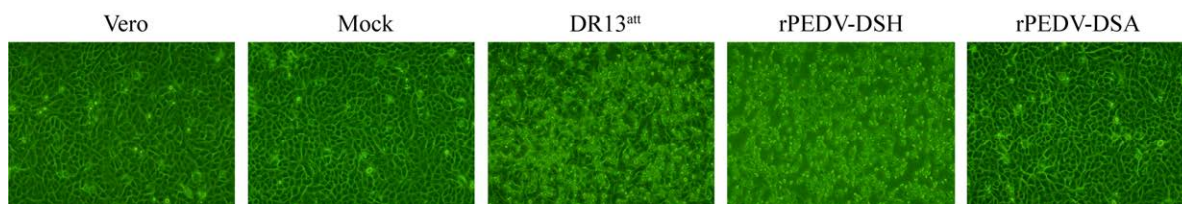
为了进一步验证重组病毒的拯救情况, 我们利用 Western blotting 验证上述结果。将盲传至 P4 代的重组病毒 rPEDV-DSH、rPEDV-DSA、病毒 DR13<sup>att</sup> 和电转的阴性对照的培养物感染 Vero 细胞, 36 h 后收集细胞, 以兔抗 PEDV N 蛋





**图 1 转移载体的构建** A: 转移载体 p-DSH 和 p-DSA 的结构示意图. B: 转移载体 p-DSH 和 p-DSA 酶切鉴定. C: 转移载体 p-DSH 和 p-DSA 的基因测序

Figure 1 Construction of transfer vectors. A: A schematic drawing of p-DSH and p-DSA transfer vectors. B: Confirmation of transfer vectors p-DSH and p-DSA by digestion with restriction enzymes. C: Sequencing of transfer vectors p-DSH and p-DSA.



**图 2 重组病毒的细胞病变** Mock: 电转阴性对照

Figure 2 The cytopathic effect of recombinant virus. Mock: Electric transfer to negative control.

白抗体及兔抗 HA 蛋白抗体为一抗进行 Western blotting 分析。结果显示, 以兔抗 PEDV N 蛋白抗体为一抗, 在分别感染病毒对照 DR13<sup>att</sup> 毒株和重组病毒 rPEDV-DSH 的细胞样品中检测到与预期大小相符的可见条带(图 5), 而电转的阴性对照和重组病毒 rPEDV-DSA 感染的细胞样品中没有检测到相应的可见条带; 以兔抗 HA 蛋白抗体为一抗, 重组病毒 rPEDV-DSH 感染的细胞样品

中检测到与预期大小相符的可见条带(图 5)。上述结果证实重组病毒 rPEDV-DSH S 基因前端插入的 HA 基因成功翻译表达, 表明重组病毒 rPEDV-DSH 拯救成功, 而携带 APEX2 基因的重组病毒 rPEDV-DSA 未被拯救成功。

**2.5 重组病毒 rPEDV-DSH 生长曲线的测定**  
经过上述实验确认 rPEDV-DSH 拯救成功后, 为了解重组 PEDV rPEDV-DSH 的生长情



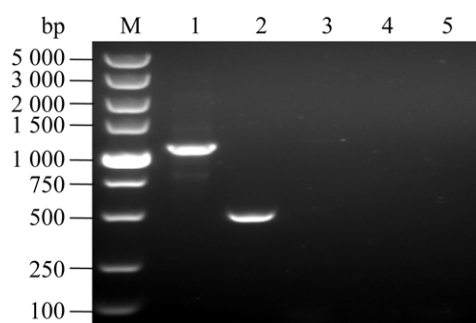


图3 重组病毒RT-PCR鉴定 M:DL5000 DNA Marker; 1: DR13<sup>att</sup>; 2: rPEDV-DSH; 3: rPEDV-DSA; 4: Vero 细胞对照; 5: 电转阴性对照

Figure 3 Confirmation of recombinant viruses by RT-PCR. M: DL5000 DNA Marker; 1: DR13<sup>att</sup>; 2: rPEDV-DSH; 3: rPEDV-DSA; 4: Vero cells control; 5: Mock.

况, 将 rPEDV-DSH 以及 PEDV (DR13<sup>att</sup>) 以 MOI=1 接种至 Vero 细胞, 每隔 6 h 收样并观察细胞病变, 将收取至 60 h 的样品进行生长曲线的测定。通过显微镜观察发现接种 rPEDV-DSH 和 DR13<sup>att</sup> 毒株的 Vero 细胞在 24 h 开始出现细胞病变, 36 h 后开始出现细胞脱落死亡的现象(图 6A)。每隔 6 h 测定病毒滴度, 重组毒株 rPEDV-DSH 的生长动力学与亲本毒株 DR13<sup>att</sup> 相似(图 6B)。但 rPEDV-DSH 增殖的滴度均比 DR13<sup>att</sup> 毒株低。DR13<sup>att</sup> 毒株在 30 h 到达峰值, rPEDV-DSH 在 54 h 到达峰值(图 6C)。表明在 DR13<sup>att</sup> 毒株的 S 蛋白前端引入外源肽段对毒株的增殖有一定影响。

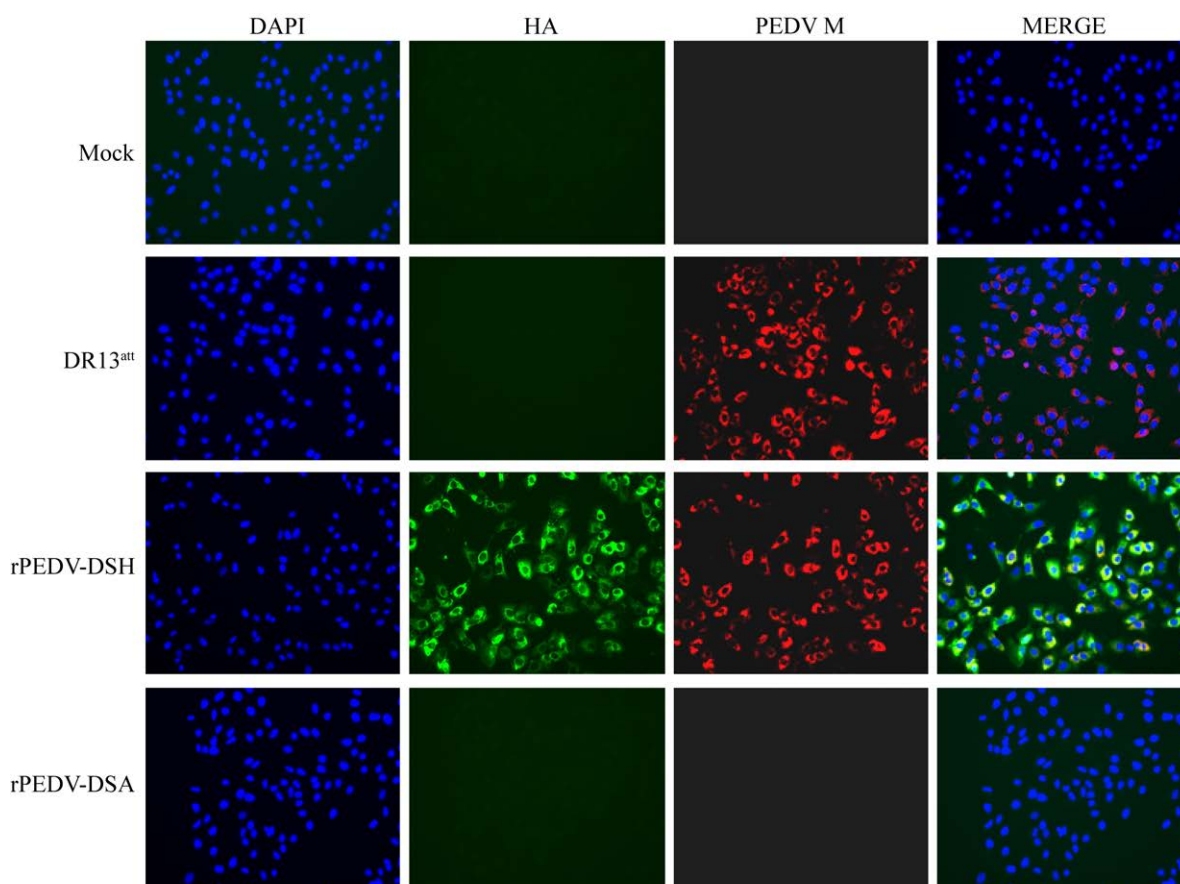


图4 重组病毒间接免疫荧光鉴定(200×)

Figure 4 Indirect immunofluorescence assay of Vero cells infected with recombinant viruses (200×). The MERGE column image is the overlap of the first, second, and third column images.

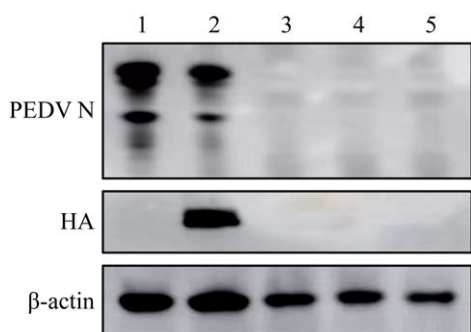


图5 重组病毒 Western blotting 鉴定 1:DR13<sup>att</sup>;2:rPEDV-DSH; 3: rPEDV-DSA; 4: Vero 细胞对照; 5: 电转阴性对照

Figure 5 Western blotting analysis of Vero cells infected with recombinant viruses. 1: DR13<sup>att</sup>; 2: rPEDV-DSH; 3: rPEDV-DSA; 4: Vero cells control; 5: Mock.

### 3 讨论与结论

PEDV 主要利用病毒表面的 S 蛋白与猪肠道细胞表面受体结合,膜融合后侵入细胞内,在猪小肠绒毛上皮细胞进行增殖<sup>[20]</sup>。S 蛋白在病毒侵染宿主细胞过程中,执行了与宿主细胞受体结合、介导病毒膜和细胞膜融合、促进病毒遗传物质进入细胞的功能,对病毒入侵和毒力发挥着关键的作用<sup>[21]</sup>。如果在 S 蛋白 N 端能引入并表达外源基因,能够为病毒侵染机制的研究提供更多技术支持。

Li 等研究发现 PEDV DR13<sup>att</sup> 毒株的 S1<sup>N</sup> 端结构域缺失 220 个氨基酸(保留信号肽序列)不影响病毒的增殖<sup>[6]</sup>。但将 S1<sup>N</sup> 端结构域替换

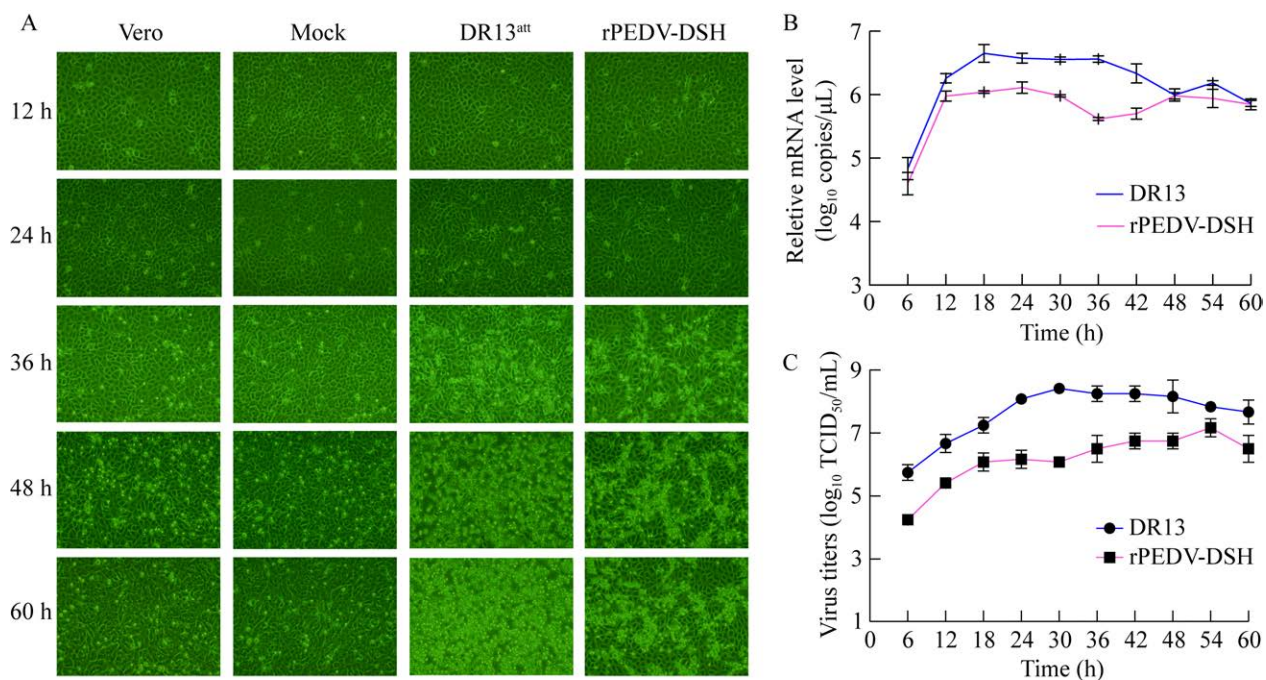


图6 重组病毒 rPEDV-DSH 和亲本病毒 DR13<sup>att</sup> 在 Vero 细胞上增殖及生长曲线 A: 重组病毒 rPEDV-DSH 和亲本病毒 DR13<sup>att</sup> 在 Vero 细胞上的增殖. B: DR13<sup>att</sup> 和 rPEDV-DSH 在 Vero 细胞上增殖 M 蛋白 mRNA 水平. C: DR13<sup>att</sup> 和 rPEDV-DSH 的生长曲线

Figure 6 The proliferation and growth curves of recombinant virus rPEDV-DSH and DR13<sup>att</sup> on Vero cells. A: The proliferation of recombinant virus rPEDV-DSH and DR13<sup>att</sup> on Vero cells. B: M protein mRNA of recombinant virus rPEDV-DSH and DR13<sup>att</sup> on Vero cells. C: Growth curves of recombinant virus rPEDV-DSH and DR13<sup>att</sup> on Vero cells.

成其他基因后病毒是否能拯救成功,目前相关报道极少。在本研究中我们基于靶向 RNA 重组技术的 PEDV 反向遗传学操作平台将 DR13<sup>att</sup> 毒株的 S1<sup>N</sup> 端结构域分别替换成 HA 标签基因和 APEX2 标记基因,构建重组转移载体并进行重组病毒的拯救。重组病毒 rPEDV-DSH 盲传至 P1 代,细胞出现变圆、脱落的细胞病变,而 rPEDV-DSA 盲传 4 代未出现细胞病变。对盲传至 P4 代的细胞上清经过 RT-PCR、IFA 以及 Western blotting 鉴定,证实将 S1<sup>N</sup> 端结构域替换成 HA 基因的 rPEDV-DSH 拯救成功,而替换成 APEX2 基因的 rPEDV-DSA 未拯救成功(3 次重复)。将重组病毒 rPEDV-DSH 和亲本毒株 DR13<sup>att</sup> 分别感染 Vero 细胞,病毒生长曲线表明亲本毒株在 30 h 时病毒增殖达到高峰,滴度为  $10^{8.41}$  TCID<sub>50</sub>/mL,重组毒株在 54 h 时达到峰值,滴度为  $10^{7.17}$  TCID<sub>50</sub>/mL;因此,重组病毒的增殖水平显著低于亲本毒株,我们推断该位置的外源基因 HA 的插入可能轻微影响 S 空间结构。上述研究证实在 PEDV 病毒的 S1<sup>N</sup> 端引入外源基因 HA 可行,但对重组病毒的增殖能力存在一定影响。该重组病毒可为 PEDV 侵染机制研究提供更多技术支持,如利用 HA 标签蛋白特异性抗体检测重组病毒 rPEDV-DSH S<sup>AN</sup> 蛋白的表达、细胞内定位,还可以进行重组病毒 rPEDV-DSH S<sup>AN</sup> 蛋白的免疫共沉淀以及纯化,从而寻找并分析与 S<sup>AN</sup> 蛋白相互作用的蛋白。这是首次证实 PEDV S1<sup>N</sup> 端可以引入外源基因,为 S1<sup>N</sup> 端引入其他基因提供了技术基础,同时也为 S 蛋白结构功能及 PEDV 受体的鉴定研究提供了新路径。

在 S1<sup>N</sup> 端前可以引入外源基因,但并非所有的外源基因均能被成功引入。近年来邻近标记技术兴起,抗坏血酸过氧化物酶(APEX2)邻近标记技术得到广泛应用,研究人员将 APEX2 连接到 SARS-CoV-2 的 S 蛋白,鉴定到 SARS-CoV-2

的辅助受体 MYH9<sup>[22]</sup>,充分表明利用 APEX2 邻近标记技术可以鉴定冠状病毒的受体。在本研究中 PEDV 病毒的 S1<sup>N</sup> 端引入外源基因 APEX2 基因后,进行多次实验均未拯救到重组病毒 rPEDV-DSA。分析重组病毒 rPEDV-DSA 未拯救成功的原因主要有两个方面。一方面,相较于 HA 基因,APEX2 基因序列(747 nt)比替换的 S1<sup>N</sup> 端结构域更长,即使在 APEX2 基因和 S<sup>AN</sup> 之间加了一段 linker 序列,APEX2 结构仍可能影响 S<sup>AN</sup> 的构象,进而影响病毒的侵染。另一方面,S 蛋白前面的信号肽是影响蛋白表达和定位的主要因素,研究中为了不影响 S 蛋白的表达,我们选用了 PEDV S 蛋白常用的信号肽序列,并利用信号肽在线预测网站 SignalP-5.0 进行预测和改进后,信号肽预测评分为 0.813 8。然而,SP-HA-S1<sup>AN</sup> 信号肽预测评分为 0.935 1,高于基因 SP-APEX2-linker-S1<sup>AN</sup> 的信号肽评分,因此,信号肽也可能是影响病毒拯救的原因,SP-APEX2-linker-S1<sup>AN</sup> 的信号肽序列还需要进一步优化,筛选预测评分比较高的信号肽序列。

综上所述,本研究基于靶向 RNA 重组技术的 PEDV 反向遗传学操作平台成功构建表达外源基因 HA 标签的重组病毒 rPEDV-DSH,证实 PEDV S1<sup>N</sup> 端结构域可以被外源蛋白或多肽替换,但其分子质量可能是主要限制因素。本研究结果为 PEDV S 蛋白结构功能以及病毒与宿主互作机制研究提供了更多的技术支持。

## REFERENCES

- [1] SUN RQ, CAI RJ, CHEN YQ, LIANG PS, CHEN DK, SONG CX. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China[J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18(1): 161-163.
- [2] HUANG YW, DICKERMAN AW, PIÑEYRO P, LI L, FANG L, KIEHNE R, OPRIESSNIG T, MENG XJ. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States[J].

- mBio, 2013, 4(5): e00737-e00713.
- [3] PENSART MB, de BOUCK P. A new coronavirus- like particle associated with diarrhea in swine[J]. Archives of Virology, 1978, 58(3): 243-247.
- [4] LEE C. Porcine epidemic diarrhea virus: an emerging and re-emerging epizootic swine virus[J]. Virology Journal, 2015, 12: 193.
- [5] 沈媚, 陈冰清, 于瑞嵩, 朱于敏, 李震. 冠状病毒 S 蛋白及其受体的结构和功能[J]. 微生物学通报, 2017, 44(10): 2452-2462.
- SHEN M, CHEN BQ, YU RS, ZHU YM, LI Z. Structure and function of coronaviral S proteins and their receptors[J]. Microbiology China, 2017, 44(10): 2452-2462 (in Chinese).
- [6] LI WT, van KUPPEVELD FJM, HE QG, ROTTIER PJM, BOSCH BJ. Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus[J]. Virus Research, 2016, 226: 117-127.
- [7] PENG GQ, SUN DW, RAJASHANKAR KR, QIAN ZH, HOLMES KV, LI F. Crystal structure of mouse coronavirus receptor-binding domain complexed with its murine receptor[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(26): 10696-10701.
- [8] CRIVAT G, TARASKA JW. Imaging proteins inside cells with fluorescent tags[J]. Trends in Biotechnology, 2012, 30(1): 8-16.
- [9] SCHATTE H, EISENSTARK A. Methods in Molecular Biology[M]. New York: Humana Press, 2015.
- [10] RHEE HW, ZOU P, UDESHI ND, MARTELL JD, MOOTHA VK, CARR SA, TING AY. Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging[J]. Science, 2013, 339(6125): 1328-1331.
- [11] LAM SS, MARTELL JD, KAMER KJ, DEERINCK TJ, ELLISMAN MH, MOOTHA VK, TING AY. Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling[J]. Nature Methods, 2015, 12: 51-54.
- [12] MÜLLER M, JAMES C, LENZ C, URLAUB H, KEHLENBACH RH. Probing the environment of emerin by enhanced ascorbate peroxidase 2 (APEX2)-mediated proximity labeling[J]. Cells, 2020, 9(3): 605.
- [13] MICK DU, RODRIGUES RB, LEIB RD, ADAMS CM, CHIEN AS, GYGI SP, NACHURY MV. Proteomics of primary Cilia by proximity labeling[J]. Developmental Cell, 2015, 35(4): 497-512.
- [14] UMMETHUM H, HAMPERL S. Proximity labeling techniques to study chromatin[J]. Frontiers in Genetics, 2020, 11: 450.
- [15] ZHEN Y, HAUGSTEN EM, SINGH SK, WESCHE J. Proximity labeling by a recombinant APEX2-FGF1 fusion protein reveals interaction of FGF1 with the proteoglycans CD44 and CSPG4[J]. Biochemistry, 2018, 57(26): 3807-3816.
- [16] LI CH, LI Z, ZOU Y, WICHT O, van KUPPEVELD FJM, ROTTIER PJM, BOSCH BJ. Manipulation of the porcine epidemic diarrhea virus genome using targeted RNA recombination[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e69997.
- [17] HUANG MS, LIN WC, CHANG JH, CHENG CH, WANG HY, MOU KY. The cysteine-free single mutant C32S of APEX2 is a highly expressed and active fusion tag for proximity labeling applications[J]. Protein Science: a Publication of the Protein Society, 2019, 28(9): 1703-1712.
- [18] REED LJ, MUENCH H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints[J]. American Journal of Epidemiology, 1938, 27(3): 493-497.
- [19] WANG XT, CHEN BQ, YU RS, SI FS, XIE CF, LI Z, DONG SJ, ZHANG DJ. Magnolol, a neolignan-like drug, inhibits porcine epidemic diarrhea virus replication in cultured cells[J]. Pathogens, 2023, 12(2): 263.
- [20] WICHT O, LI WT, WILLEMS L, MEULEMAN TJ, WUBBOLTS RW, van KUPPEVELD FJM, ROTTIER PJM, BOSCH BJ. Proteolytic activation of the porcine epidemic diarrhea coronavirus spike fusion protein by trypsin in cell culture[J]. Journal of Virology, 2014, 88(14): 7952-7961.
- [21] BOSCH BJ, van der ZEE R, de HAAN CAM, ROTTIER PJM. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex[J]. Journal of Virology, 2003, 77(16): 8801-8811.
- [22] CHEN J, FAN J, CHEN ZL, ZHANG MM, PENG HR, LIU J, DING LF, LIU MB, ZHAO C, ZHAO P, ZHANG SY, ZHANG XY, XU JQ. Nonmuscle myosin heavy chain IIA facilitates SARS-CoV-2 infection in human pulmonary cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(50): e2111011118.