

陈东奇, 郑殿重, 魏志颖, 等. 猪流行性腹泻病毒 Nsp6 蛋白的分段表达及多克隆抗体制备 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (1): 91-97.

CHEN D Q, ZHENG D Z, WEI Z Y, et al. Expression of segmented Nsp6 protein of porcine epidemic diarrhea virus and its polyclonal antibody preparation [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (1): 91-97.

猪流行性腹泻病毒 Nsp6 蛋白的分段表达及多克隆抗体制备

陈东奇¹, 郑殿重^{1,2}, 魏志颖¹, 王莹¹, 李佳璇¹, 崔文¹, 姜艳平¹, 王晓娜¹,
周晗¹, 王丽¹, 乔薪瑗¹, 李一经¹, 唐丽杰¹, 单智夫^{1*}

(1. 东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;

2. 黑龙江省农业科学院畜牧所, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 的非结构蛋白 Nsp6 在诱导宿主细胞自噬中起着重要作用。为进一步确定 Nsp6 蛋白诱导细胞自噬的关键功能域, 本研究利用 RT-PCR 扩增技术获得了 Nsp6 及其 3 个分段基因。首先构建了重组原核表达质粒 pSUMO-Nsp6, 并转化至大肠杆菌 Rosetta 感受态中, 经 IPTG 诱导并纯化后, 所得蛋白用于小鼠免疫, 制备抗 Nsp6 蛋白的多克隆抗体。再将 Nsp6 及其 3 个分段基因分别构建至真核表达载体 pCMV-HA, 并将其转染至 IPEC-J2 细胞进行真核表达, 通过 Western blot 和双荧光标记法来确定蛋白表达情况。结果: Nsp6 蛋白在 Rosetta 中成功表达, 并通过免疫小鼠获得了效价为 1 : 10 240 的多克隆抗体, 该抗体具有与 PEDV 和 Nsp6 蛋白特异性结合的能力; 免疫荧光及 Western blot 结果表明, Nsp-6 及其截短基因在 IPEC-J2 细胞中成功表达, 且与制备的 Nsp6 多克隆抗体发生特异性结合。综上, 本研究原核表达了 Nsp6 蛋白并制备了相应的特异性抗体, 验证了 Nsp6 及其分段基因在细胞中的真核表达, 为进一步研究 Nsp6 蛋白的特性和功能奠定了基础。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; Nsp6 基因; 多克隆抗体; 分段表达; 真核表达

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2024)01-0091-07

Expression of segmented Nsp6 protein of porcine epidemic diarrhea virus and its polyclonal antibody preparation

CHEN Dongqi¹, ZHENG Dianzhong^{1,2}, WEI Zhiying¹, WANG Ying¹, LI Jiakuan¹, CUI Wen¹, JIANG Yanping¹,
WANG Xiaona¹, ZHOU Han¹, WANG Li¹, QIAO Xinyuan¹, LI Yijing¹, TANG Lijie¹, SHAN Zhifu^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. Institute of Animal Husbandry, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150030, China)

Abstract: The non-structural protein 6 (Nsp6) of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) plays an important role in inducing autophagy in host cells. In order to further determine the key functional domains of Nsp6 protein in inducing autophagy, transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification technique was utilized in this study to obtain Nsp6 and its three segment genes. Firstly, a recombinant prokaryotic expression plasmid pSUMO-Nsp6 was constructed and transformed into *Escherichia coli* Rosetta competent cells. After induction with IPTG and purification, the obtained protein was used for immunization of mice to generate polyclonal antibodies against Nsp6 protein. Then, Nsp6 and its three segment genes were separately constructed into a eukaryotic expression vector pCMV-HA and transfected into IPEC-J2 cells for eukaryotic expression. The expression was identified by Western blot and double fluorescence labeling. The experimental results showed that Nsp6 protein was successfully expressed in Rosetta cells, and polyclonal antibodies with a titer of 1 : 10 240 were obtained after immunization of mice. The antibodies exhibited specific ability to bind to PEDV and Nsp6 protein. Immunofluorescence and Western blot results showed that Nsp6 and its truncated genes were successfully expressed in IPEC-J2 cells and specifically bound to the prepared Nsp6 polyclonal antibody. In conclusion, this study successfully expressed Nsp6 protein in prokaryotes and generated corresponding specific antibodies, confirming the eukaryotic expression of Nsp6 and its segment genes in cells; which laid the foundation for further investigation of the characteristics and functions of Nsp6 protein.

Keywords: porcine epidemic diarrhea virus; Nsp6 gene; polyclonal antibody; Nsp6 fragments expression; eukaryotic expression

收稿日期: 2023-02-18; 修回日期: 2023-11-20

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (LH2021C042); 东北农业大学“青年才俊”项目 (20QC19)

第一作者: 陈东奇, 女, 学士, 助理兽医师

* 通信作者: 单智夫, 讲师, 主要从事猪腹泻病毒感染机制及应用方面的研究, E-mail: shanzhifu@126.com。

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) 感染引起猪的一种急性烈性肠道传染病。该病呈世界性分布, 以腹泻、脱水、呕吐为主要临床特征, 常可导致仔猪死亡。PEDV 感染严重影响动物的生产性能, 自 2010 年以来, 在包括中国在内的主要养猪国家暴发和流行, 成为最重要的猪病毒性腹泻病之一, 极大地阻碍了全球养猪业的健康发展^[1]。对于 PED 的防控, 最主要的措施是接种疫苗。然而, 由于 PEDV 亚型多、具有很强的变异性, 且存在持续性感染, 接种疫苗并没有达到预期的预防效果。PEDV 的致病机制复杂, 临床上目前没有有效的治疗药物。因此, 深入研究 PEDV 的致病机制对该病的防控具有重要意义。

细胞自噬是一种具有多种调节功能、可维持真核细胞稳态的正常细胞生理活动。目前研究发现, 细胞自噬与病毒的感染与复制之间存在着密切的联系, 如自噬可降解侵染细胞的病毒, 同时病毒可阻碍自噬的发生, 以逃避自噬对其本身复制的影响, 甚至某些病毒会利用自噬体促进自我复制。目前对 PEDV 感染的致病机制, 尤其是诱导细胞自噬的机制仍不十分清楚。Guo 等^[2]发现自噬有利于 PEDV 复制, 并且自噬可能与炎性细胞因子的表达有关, 在 PEDV 感染期间与 NF- κ B 信号通路具有正反馈调节作用。用雷帕霉素诱导细胞自噬会抑制 PEDV 的感染, 并减轻 PEDV 诱导上皮细胞的死亡^[3]。Sun 等^[4]发现活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 在 PEDV 感染期间在调节内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 应激介导的自噬中发挥重要作用, 并且 PERK 和 IER1 通路参与诱导 ROS 依赖性内质网应激介导的自噬。Lin 等^[5]筛选出 PEDV 非结构蛋白 6 (Nsp6) 可诱导 IPEC-J2 细胞发生细胞自噬, 是能够引起细胞自噬的关键蛋白, 然

而其诱导细胞自噬的关键功能域尚未确定。因此, 本研究获得了在大肠杆菌系统中重组表达的 PEDV Nsp6 重组蛋白, 纯化后免疫小鼠制备相应的多克隆抗体, 用于鉴定 Nsp6 分段基因的真核表达情况, 为进一步确定 Nsp6 蛋白诱导细胞自噬的关键功能域奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

4 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自辽宁长生实验动物中心。PEDV 毒株 CH/HLJ/18 (GenBank: MW561264.1)、猪小肠上皮细胞 IPEC-J2 购自上海信裕生物科技有限公司; 鼠抗 PEDV-N 蛋白单克隆抗体、pMD19-T Simple 载体、pSUMO 原核表达载体 pCMV-HA 真核表达载体、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞及大肠杆菌 Rosetta 感受态细胞均由本实验室保存; 小鼠抗 His 标签、HA 标签单克隆抗体均购自赛默飞世尔科技公司; HRP/FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体购自北京中杉金桥公司; T4 DNA 连接酶、dNTP Mixture、DNA Marker 及 PageRuler™ Plus 预染蛋白分子量标准购自宝生物工程 (大连) 公司; 中剂量质粒提取试剂盒购自 Promega 公司; 限制性内切酶 BamH I、Xho I 和 EcoR I 均购自 NEB 公司; 其他所用试剂均为分析纯。

1.2 PCR 引物的设计与合成

参照 GenBank 中 PEDV Nsp6 基因序列 (Gene ID: 935181) 及 SMART 网站对 Nsp6 基因功能域的预测, 将 Nsp6 基因分为 Nsp6-1、Nsp6-2、Nsp6-3 段, 并使用 Oligo 6.0 软件设计克隆引物对 Nsp6-F/Nsp6-R、N1-F/N1-R、N2-F/N2-R 和 N3-F/N3-R (见表 1), 分别用于 PEDV Nsp6、Nsp6-1、Nsp6-2、Nsp6-3 基因的扩增。

表 1 引物序列

目的基因	引物名称	引物序列 (5'→3')
Nsp6	Nsp6-F	ACCGGATTCATGAGTGGTTATGTTTCACGC
	Nsp6-R	CCGCTCGAGTTACTGAACGGAAGAAATCTT
Nsp6-1	N1-F	CATGAATTCGGATGAGTGGTTATGTTTCACGC
	N1-R	ACTCTCGAGTTAAACATCAAATGCC
Nsp6-2	N2-F	CGAGAATTCGGATGGATGTTGAAGTTT
	N2-R	AACCTCGAGTTAAAAATAGTTATATGCC
Nsp6-3	N3-F	CGAGAATTCGGATGTATTTTTACGCTAGTGACAT
	N3-R	CCGCTCGAGTTACTGAACGGAAGAAATCTT

1.3 目的基因的扩增及重组质粒的构建与鉴定

提取感染 PEDV 的 IPEC-J2 细胞总 RNA, 经反转录成 cDNA 后, 以 Nsp6-F/Nsp6-R 为引物对, 扩增 PEDV Nsp6 基因。PCR 扩增结束后, 对 PCR 产物进行纯化并对回收片段双酶切 (*Bam*H I 和 *Xho* I), 再利用 T4 DNA 连接酶在 16 °C 下作用 14 h, 连接到同样双酶切处理的 pSUMO 原核表达载体上。将连接产物热转化至大肠杆菌 Rosetta 感受态细胞, 涂布在含卡那霉素抗性的 LB 固体培养基上, 倒置于 37 °C 培养箱中培养; 12 h 后随机挑取单菌落并进行扩大培养, 提取质粒。一方面以质粒为模板进行 PCR 鉴定; 另一方面进行双酶切鉴定, 鉴定正确的质粒送吉林库美有限公司进行测序验证, 测序正确的质粒命名为 pSUMO-Nsp6, 菌种命名为 pSUMO-Nsp6/Rosetta。

以 pSUMO-Nsp6 质粒为模板, 分别以 Nsp6-F/Nsp6-R、N1-F/N1-R、N2-F/N2-R 及 N3-F/N3-R 为引物对, PCR 扩增 PEDV Nsp6、Nsp6-1、Nsp6-2、Nsp6-3 基因。将胶回收产物与 pMD19-T Simple 连接, 再将连接产物热转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布在含氨苄青霉素抗性的 LB 固体培养基上培养后随机挑取单菌落并进行扩大培养, 提取质粒。一方面以质粒为模板进行 PCR 鉴定; 另一方面进行单、双酶切鉴定, 均正确的质粒送吉林库美有限公司进行测序验证, 测序正确的质粒分别命名为 pMD-19T-Nsp6、pMD-19T-Nsp6-1、pMD-19T-Nsp6-2、pMD-19T-Nsp6-3, 菌种分别命名为 pMD-19T-Nsp6/DH5 α 、pMD-19T-Nsp6-1/DH5 α 、pMD-19T-Nsp6-2/DH5 α 、pMD-19T-Nsp6-3/DH5 α 。

分别提取 pMD-19T-Nsp6、pMD-19T-Nsp6-1、pMD-19T-Nsp6-2、pMD-19T-Nsp6-3 及 pCMV-HA 质粒, 利用限制性核酸内切酶 *Eco*R I 和 *Xho* I 进行双酶切, 利用胶回收试剂盒回收目的片段。将胶回收的目的片段与 pCMV-HA 真核表达载体连接, 并将连接产物热转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞培养; 12 h 后随机挑取单菌落并进行扩大培养, 提取质粒。一方面以质粒为模板进行 PCR 鉴定; 另一方面进行单、双酶切鉴定, 均正确的质粒送吉林库美有限公司进行测序验证, 测序正确的质粒分别命名为 pCMV-Nsp6、pCMV-Nsp6-1、pCMV-Nsp6-2、pCMV-Nsp6-3, 菌种分别命名为 pCMV-Nsp6/DH5 α 、pCMV-Nsp6-1/DH5 α 、pCMV-Nsp6-2/DH5 α 、pCMV-Nsp6-3/DH5 α 。

1.4 PEDV Nsp6 的原核表达及鉴定

将重组大肠杆菌 pSUMO-Nsp6/Rosetta 培养至 $OD_{600\text{nm}}$ 为 0.5 时, 取 1 mL 诱导前的菌体和上清液样品作为对照, 其余加入 IPTG 进行诱导, 使 IPTG 终

浓度为 1.0 mmol/L, 于 37 °C 震荡培养 12 h 后, 离心收集菌体沉淀重悬并超声破碎, 再次离心后分别收集超声后的沉淀和上清液, 分别加入 125 μ L 5 \times SDS, 混匀后置于沸水中作用 10 min, 用于 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定。分别配制 12% 分离胶和 5% 积层胶, 用于 SDS-PAGE 检测。点样后进行电泳, 80 V 电泳 1 h, 120 V 电泳 2 h; 电泳结束, 将凝胶放入考马斯亮蓝染色液中, 置于室温染色 30 min, 经脱色液脱色后, 观察蛋白表达情况。用同样方法将电泳后的蛋白转印至 0.2 μ m PVDF 膜, 在 100 V 电压下湿转 1.5 h; 放入 5% 脱脂乳在室温条件下封闭 2 h 后, 利用 1 \times PBST 反复清洗 PEDV 膜并加入小鼠抗 His 标签的单克隆抗体作为一抗, 辣根过氧化物酶标记的标记山羊抗鼠 IgG 为二抗, 依次经室温孵育 1 h 后进行 ECL 显色。

1.5 真核表达质粒的转染与蛋白表达和鉴定

使用 Promega 中剂量质粒提取试剂盒制备无内毒素质粒 pCMV-Nsp6、pCMV-Nsp6-1、pCMV-Nsp6-2 和 pCMV-Nsp6-3 备用, 将 IPEC-J2 细胞铺至 24 孔板中, 调整细胞密度为 5×10^5 个/孔, 待细胞长成单层后进行转染。向无菌 EP 管中依次加入 50 μ L 无血清 Opti-MEM 培养液、转染试剂 Lipo3000 (LipofectamineTM 3000 Transfection Reagent, Thermo, L3000001) 3 μ L 及去内毒素的重组质粒 1 μ g, 轻柔混匀, 室温作用 5 min; 向 EP 管中加入 P3000 (LipofectamineTM 3000 Transfection Reagent, Thermo, L3000001) 2 μ L, 轻柔混匀, 室温作用 20 min; 清洗 IPEC-J2 细胞单层, 每孔加入 150 μ L 无血清的 DMEM 培养液, 并向孔板中均匀滴加转染试剂。转染 24 h 收集细胞, 再通过以鼠抗 HA 标签单抗为一抗的免疫荧光法 (IFA) 和以小鼠抗 Nsp6 多抗为一抗的 Western blot 检测法来判定 Nsp6 及截短蛋白在细胞中的表达情况。

1.6 PEDV Nsp6 蛋白的纯化及多克隆抗体的制备

取 200 mL 诱导后的重组大肠杆菌 pSUMO-Nsp6/Rosetta 菌液, 按照 1.4 所述方法制备蛋白样并进行 SDS-PAGE; 电泳结束后, 将凝胶放入提前配制好的低温 KCl 溶液中染色 10 s, 使用刀片切下白色的目的带并将其放入含 2 mL 电泳缓冲液的透析袋中浸没; 正向 100 V 电泳 2 h 后, 再反向电泳 10 min, 使蛋白从胶中析出; 取出剩余胶条, 将透析袋浸没于 1 \times PBS 中, 4 °C 平衡 12 h; 收集透析袋中溶液获得纯化的目的蛋白。

每 100 μ g 纯化的 PEDV Nsp6 蛋白与 100 μ L 弗氏完全佐剂混合, 充分乳化后分别在第 0、7 和 14 天按每只 50、50 和 100 μ g 的剂量腹腔注射免疫 4 周龄

BALB/c 小鼠。第 3 次免疫完成后 7 d, 采集小鼠血清, 并采用间接 ELISA 方法测定血清抗体效价。以 PEDV CH/HLJ/18 株细胞培养毒包被酶标板, 封闭后, 按照 1:20、1:40、1:80……1:20480 倍比稀释待检血清并孵育, 再添加辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 作为二抗, 加入显色液作用后终止反应, 并用全波长酶标仪读取各孔 $OD_{450\text{ nm}}$ 值。不同稀释度血清与阴性对照 OD 值比值 (P/N) ≥ 2 的最大稀释度判定为血清抗体的效价。

1.7 鼠抗 PEDV Nsp6 蛋白多克隆抗体的特异性检测

通过 Western blot 首先验证鼠抗 PEDV Nsp6 蛋白多克隆抗体与 Nsp6 蛋白的结合情况。先将纯化的 Nsp6 蛋白样转印至 PVDF 膜, 加入 1:200 稀释的多克隆抗体孵育后再加入 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 作为二抗, 最后进行 ECL 显色。为检测多克隆抗体与 PEDV 培养物结合的情况, 将 PEDV 细胞培养物及 IPEC-J2 细胞蛋白样转印至 PVDF 膜, 按 1:200 加入稀释后的多克隆抗体孵育, 再加入 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 作为二抗, 最后进行 ECL 显色。

2 结果

2.1 目的基因的扩增及重组质粒的鉴定

提取 PEDV 的 RNA, 并反转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 扩增 Nsp6 基因片段并将其构建到重组质粒 pSUMO-Nsp6, 经过 PCR 鉴定, 可获得大小

为 840 bp 的目的条带 (图 1A)。再利用限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 进行双酶切鉴定, 可以获得大小约为 5 598 bp 的载体片段及大小约为 840 bp 的目的条带 (图 1B)。

以 pSUMO-Nsp6 质粒为模板, 利用 *Eco*R I 及 *Xho* I 切割下 Nsp6 并连接至 pCMV-HA 真核表达载体上, 获得重组质粒 pCMV-Nsp6。根据 SMART 网站对 Nsp6 功能域的预测, 将 Nsp6 基因分为 3 段, 分别连接到 pCMV-HA 真核表达载体上, 构建出 pCMV-Nsp6-1、pCMV-Nsp6-2 和 pCMV-Nsp6-3 三种重组质粒, 并进一步进行 PCR 鉴定, 获得长度分别为 840、258、210 和 402 bp 的目的片段 (图 2A); 再次经过限制性内切酶进行单、双酶切鉴定后获得相应大小的目的片段 (图 2B)。

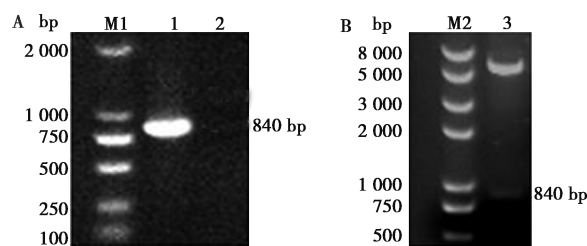


图 1 重组质粒 pSUMO-Nsp6 的 PCR (A) 和酶切鉴定 (B)

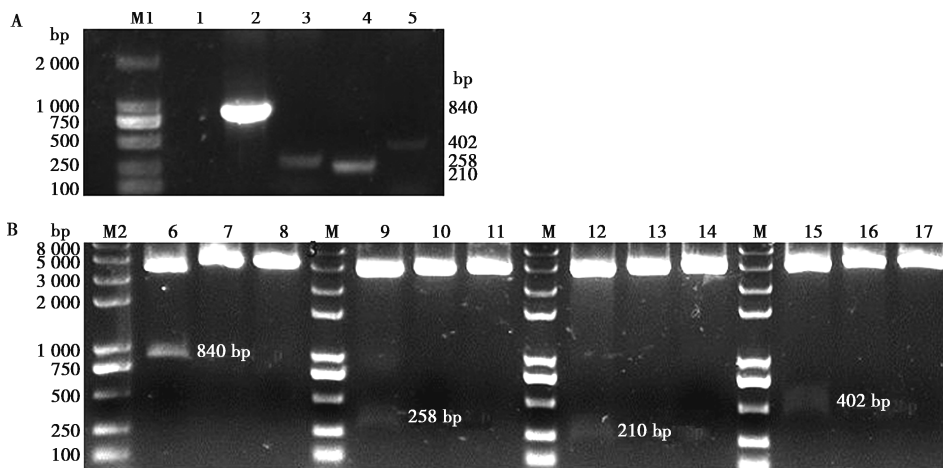
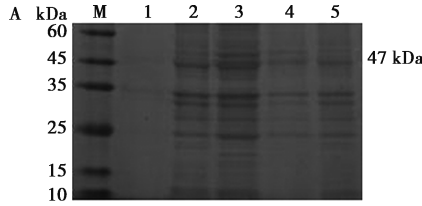


图 2 重组质粒 pCMV-Nsp6、pCMV-Nsp6-1、pCMV-Nsp6-2 和 pCMV-Nsp6-3 的 PCR (A) 和酶切鉴定 (B)

2.2 Nsp6 蛋白原核表达及纯化鉴定

将鉴定正确的重组菌 pSUMO-Nsp6/Rosetta 进行大量培养, 用 IPTG 诱导蛋白表达。经 SDS-PAGE 分析后结果如图 3A 所示, 诱导后菌体和超声后菌体沉



M. 蛋白 Marker; 1. 诱导后上清液; 2. 诱导 12 h 菌体; 3. 诱导 12 h 超声后沉淀; 4. 诱导 12 h 超声后上清液; 5. 诱导前菌体沉淀; 6-7. 纯化的 Nsp6 蛋白; 8. 空载体对照。

淀及上清液中, 在 47 kDa 处可见目的蛋白表达条带。以带 His 标签的单克隆抗体为一抗通过 Western blot 对其进一步鉴定, 结果表明可在正确位置出现特异性条带 (图 3B)。

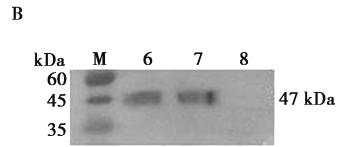


图 3 重组 Nsp6 蛋白 SDS-PAGE 分析 (A) 和 Western blot 鉴定 (B)

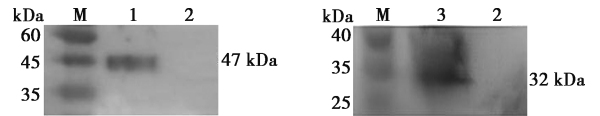
2.3 鼠抗 Nsp6 多克隆抗体的鉴定及效价的测定

将纯化的 Nsp6 蛋白免疫小鼠, 3 次免疫后收集小鼠血清。为了验证所制多抗是否能够与 Nsp6 蛋白相结合, 利用 Western blot 法分别检测含有 SUMO 标签的 Nsp6 蛋白及 PEDV 病毒培养物中的 Nsp6 蛋白与制备的鼠抗 PEDV Nsp6 多克隆抗体的结合情况, 结果如图 4 所示, 分别检测到约为 47 kDa 大小的含 SUMO 标签的 Nsp6 及约为 32 kDa 大小的 PEDV Nsp6 蛋白条带, 说明所制多抗能够与含 SUMO 标签的 Nsp6 蛋白和 PEDV 的 Nsp6 蛋白相结合。利用间接 ELISA 检测免疫小鼠血清抗体效价, 结果如图 5 所示, $P/N \geq 2$ 时, 血清最大稀释比例为 1 : 10 240, 即制备的鼠抗 Nsp6 多克隆抗体的效价为 1 : 10 240。

2.4 Nsp6 截短片段的真核表达及鉴定

为确定连接真核表达载体的 Nsp-6 及其截短蛋白在 IPEC-J2 细胞中的表达情况, 首先利用 IFA 检测 Nsp6 及各截短片段转染至 IPEC-J2 细胞中的表达情况, 结果如图 6A 所示。以鼠抗 HA 标签抗体作为一抗, FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 作为二抗, 转染后 4 种质粒均可在 IPEC-J2 细胞中检测到绿色荧光, 表明目的蛋白获得表达。再利用 Western blot 检测 pCMV-Nsp6、pCMV-Nsp6-1、pCMV-Nsp6-2、pCMV-Nsp6-3 在 IPEC-J2 细胞中的表达, 结果如图 6B 所示。在鼠抗 Nsp6 多克隆抗体的作用下, 分别在

32、10.6、8.7 和 15 kDa 的位置检出符合预期大小的蛋白条带, 表明 4 种蛋白在 IPEC-J2 细胞中均获得表达。



M. 蛋白 Marker; 1. 纯化的 Nsp6 蛋白 (含 SUMO 标签); 2. 空白细胞对照; 3. PEDV 培养物中 Nsp6 蛋白。

图 4 鼠抗 Nsp6 多克隆抗体的鉴定

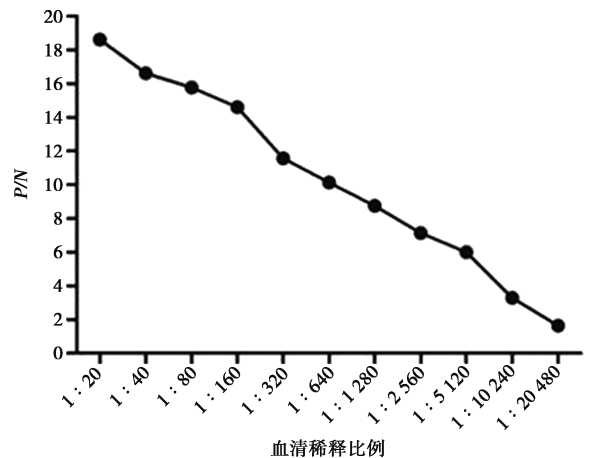


图 5 间接 ELISA 方法检测鼠抗 Nsp6 多克隆抗体效价

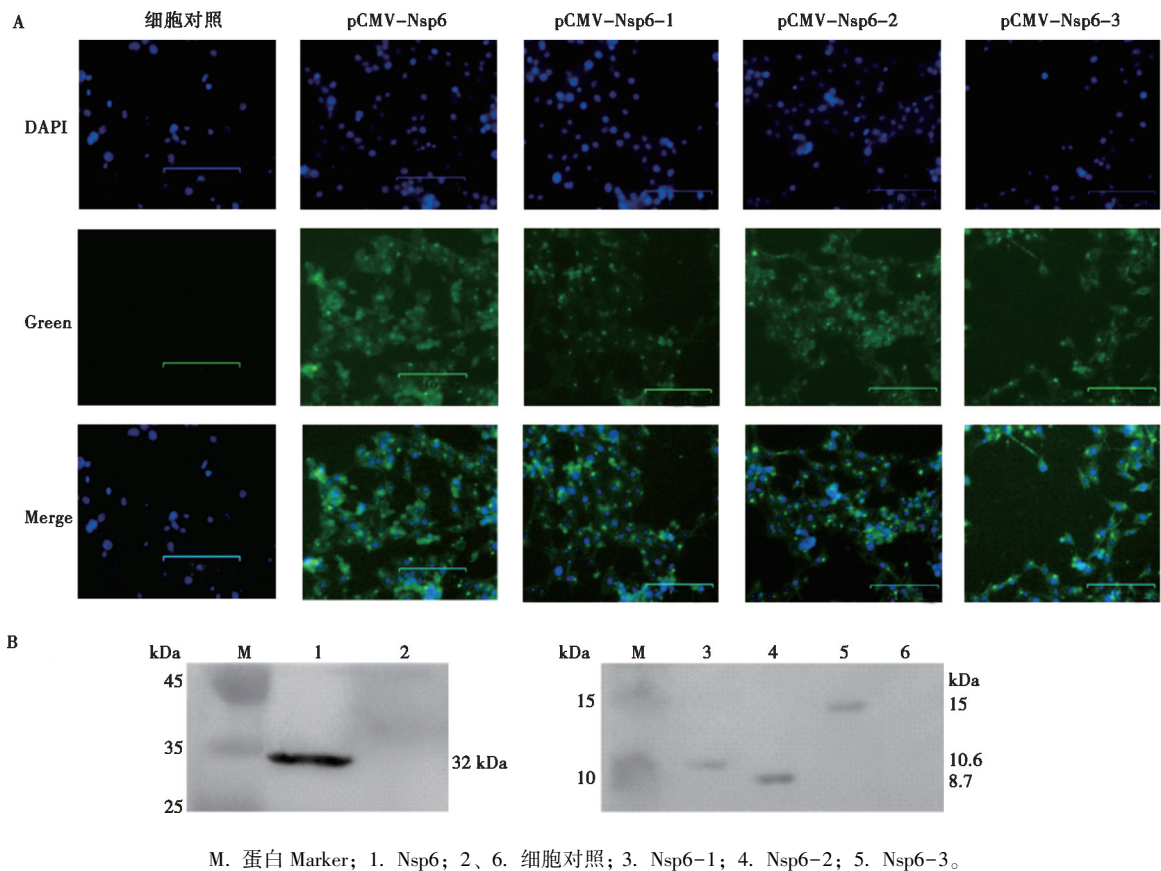


图6 Nsp6及其截短基因的真核表达(A, 比例尺=100 μm)及Western blot鉴定(B)

3 讨论

PEDV是具有囊膜的单链正向RNA病毒,其RNA基因组大小约为28 kb^[6]。PEDV基因组编码4种结构蛋白:刺突蛋白(S)、囊膜蛋白(E)、膜蛋白(M)和核衣壳蛋白(N),以及16种非结构蛋白(Nsp1~Nsp16)和辅助蛋白ORF3^[7]。非结构蛋白是冠状病毒复制和形成转录复合物(RTC)以及逃避免疫系统的关键要素。通过劫持内质网膜,Nsps帮助病毒建立RTC^[8]。目前对于与PEDV同属冠状病毒成员SARS-CoV2的研究表明,Nsp6蛋白也能够引起细胞自噬^[9]。Cottam等^[10]发现Nsp6可以诱导宿主细胞中的内质网形成自噬体。通过突变Nsp6可以导致SARS-CoV-2的毒性降低,从而影响病毒的致病性^[11]。对传染性支气管炎病毒为代表的禽冠状病毒研究也证明了Nsp6损害了由饥饿诱导的自噬溶酶体的形成^[12],进一步证明了Nsp6蛋白对自噬的复杂调节作用。Nsp6、Nsp1及Nsp12蛋白具有干扰素拮抗作用^[13]。此外,Nsp6能够与TANK激酶1(TBK1)结合并不影响TBK1的磷酸化的基础上抑制IRF3的磷酸化,从而减少I型干扰素的产生^[14]。Nsp6和Nsp13能够通过抑制信号转导和转录激活因

子1和2(STAT1和STAT2)的磷酸化进而抑制干扰素信号的传导^[15]。

Nsp6在PEDV感染IPEC-J2细胞的过程中也对诱发细胞自噬产生重要的作用^[4],然而目前针对Nsp6蛋白引起细胞自噬产生的具体功能域研究则鲜有报道。为进一步确定Nsp6蛋白诱导细胞自噬产生的关键功能域,本试验通过SMART网站对Nsp6蛋白的潜在结构域进行预测,评估了蛋白可能的跨膜区域。在尽量不破坏其原有的结构域基础上,将Nsp6基因分段为3段,分别构建真核表达质粒,并转染至IPEC-J2细胞中表达。

为确定Nsp6及其分段基因的真核表达情况,本试验构建重组原核表达质粒pSUMO-Nsp6,并将其在大肠杆菌中原核表达,获得的蛋白用于制备抗Nsp6蛋白的多克隆抗体。Western blot结果表明,该抗体既可以与含SUMO标签的Nsp6原核表达蛋白结合,又可以与PEDV的天然Nsp6蛋白相结合,说明该抗体能够用于识别PEDV,且通过Western blot确定了Nsp6及其分段基因在IPEC-J2细胞中均得到了表达。

总之,本文为进一步确定Nsp6蛋白诱导细胞自噬的关键功能域做好了铺垫,为阐明PEDV在感染宿主上皮细胞IPEC-J2过程中的分子机制提供理论基

础,对深入了解 PEDV 的致病机理提供重要线索,也为研究 PEDV 的抗病毒药物提供重要的靶点。

参考文献:

- [1] HAVE P, MOVING V, SVANSSON V, et al. Coronavirus infection in mink (*Mustela vison*). Serological evidence of infection with a coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Vet Microbiol*, 1992, 31 (1): 1-10.
- [2] GUO X, ZHANG M, ZHANG X, et al. Porcine epidemic diarrhea virus induces autophagy to benefit its replication [J]. *Viruses*, 2017, 9 (3): 53.
- [3] KO S, GU M J, KIM C G, et al. Rapamycin-induced autophagy restricts porcine epidemic diarrhea virus infectivity in porcine intestinal epithelial cells [J]. *Antiviral Res*, 2017, 146: 86-95.
- [4] SUN P, JIN J, WANG L, et al. Porcine epidemic diarrhea virus infections induce autophagy in Vero cells via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress through PERK and IRE1 pathways [J]. *Vet Microbiol*, 2021, 253: 108959.
- [5] LIN H, LI B, LIU M, et al. Nonstructural protein 6 of porcine epidemic diarrhea virus induces autophagy to promote viral replication via the PI3K/Akt/mTOR axis [J]. *Vet Microbiol*, 2020, 244: 108684.
- [6] VLASOVA A N, MARTHALER D, WANG Q, et al. Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20 (10): 1620-1628.
- [7] JANG G, WON H, LEE D U, et al. Assessment of the safety and efficacy of an attenuated live vaccine based on highly virulent genotype 2b porcine epidemic diarrhea virus in nursing piglets [J]. *Vet Microbiol*, 2019, 231: 120-128.
- [8] SANTERRE M, ARJONA S P, SAWAYA B E, et al. Why do SARS-CoV-2 NSPs rush to the ER? [J]. *J Neurol*, 2021, 268 (6): 2013-2022.
- [9] BENVENUTO D, ANGELETTI S, GIOVANETTI M, et al. Evolutionary analysis of SARS-CoV-2: how mutation of non-structural protein 6 (NSP6) could affect viral autophagy [J]. *J Infect*, 2020, 81 (1): e24-e27.
- [10] COTTAM E M, MAIER H J, MANIFAVA M, et al. Coronavirus nsp6 proteins generate autophagosomes from the endoplasmic reticulum via an omegasome intermediate [J]. *Autophagy*, 2011, 7 (11): 1335-1347.
- [11] WANG R, CHEN J, HOZUMI Y, et al. Decoding asymptomatic COVID-19 infection and transmission [J]. *J Phys Chem Lett*, 2020, 11 (23): 10007-10015.
- [12] COTTAM E M, WHEL BAND M C, WILEMAN T. Coronavirus NSP6 restricts autophagosome expansion [J]. *Autophagy*, 2014, 10 (8): 1426-1441.
- [13] THOMAS S. Mapping the nonstructural transmembrane proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 [J]. *J Comput Biol*, 2021, 28 (9): 909-921.
- [14] XIA H, CAO Z, XIE X, et al. Evasion of type I interferon by SARS-CoV-2 [J]. *Cell Rep*, 2020, 33 (1): 108234.
- [15] VAN DE LEEMPUT J, HAN Z. Understanding individual SARS-CoV-2 proteins for targeted drug development against COVID-19 [J]. *Mol Cell Biol*, 2021, 41 (9): e0018521.