

韩翔舒, 官震, 刘淑悦, 等. 牛冠状病毒 S 蛋白生物信息学分析及其受体结合域的多克隆抗体制备 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (8): 69-77.
HAN X S, GONG Z, LIU S Y, et al. Bioinformatic analysis of bovine coronavirus S protein and preparation of polyclonal antibody against its receptor-binding domains [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (8): 69-77.

牛冠状病毒 S 蛋白生物信息学分析及其受体结合域的多克隆抗体制备

韩翔舒¹, 官震², 刘淑悦³, 范昊宇¹, 付修龙³, 李晓卓³, 梁纤纤³,
郑启铭³, 李月², 平继辉⁴, 蒋松^{1*}, 夏俊^{2*}

(1. 石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832061;

2. 新疆畜牧科学院兽医研究所 (新疆畜牧科学院动物临床医学研究中心), 新疆 乌鲁木齐 830000;

3. 新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830000; 4. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 旨在预测和分析牛冠状病毒 (BCoV) S 蛋白的结构和潜在功能, 并进行克隆表达及多克隆抗体的制备, 为疫苗研究和实验室诊断提供基础。利用生物信息学软件预测分析 S 蛋白生物学特性, 克隆其受体结合域 (RBD) 基因并与原核表达载体 pET-30a (+) 连接, 构建重组质粒后转化 BL21 感受态细胞并利用 IPTG 诱导表达, 表达的蛋白经镍柱纯化后免疫小鼠, 制备多克隆抗体并检测。结果: S 蛋白由 1 364 个氨基酸组成, 相对分子质量为 150.81 kDa, 等电点为 5.51, 不稳定指数为 33.22, 脂溶性指数为 87.22; 该蛋白 1~1 307 aa 为胞外区, 1 308~1 330 aa 为跨膜区, 1 331~1 363 aa 为胞内区, 1~14 aa 为信号肽, 310~612 aa 为 RBD; 有 36 个潜在的 B 细胞表位, RBD 中包含 12 个; 该蛋白 α -螺旋占 27.95%, β -折叠占 23.04%, 无规则卷曲占 49.01%; 分析 S 蛋白三级结构, 与二级结构预测结果基本一致; 成功克隆了 S 蛋白 RBD, 大小与预期相符, 与载体 pET-30a (+) 连接后经双酶切、测序验证表明载体构建成功; 经 SDS-PAGE 与 Western blot 验证蛋白成功表达后, 将纯化后的蛋白免疫小鼠并分离血清, 效价可达 1:128 000; 经间接免疫荧光试验与 Western blot 验证多克隆抗体能够识别病毒 S 蛋白, 证明重组蛋白具有良好的免疫原性, 可诱导产生病毒特异性抗体。结论: 成功分析和预测了 BCoV S 蛋白的结构及功能, 并获得 S 蛋白 RBD 的重组蛋白及多克隆抗体, 为后续的研究奠定了基础。

关键词: 牛冠状病毒; S 蛋白; 受体结合域; 生物特性; 多克隆抗体

中图分类号: S852.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)08-0069-09

Bioinformatic analysis of bovine coronavirus S protein and preparation of polyclonal antibody against its receptor-binding domains

HAN Xiangshu¹, GONG Zhen², LIU Shuyue³, FAN Haoyu¹, FU Xiulong³, LI Xiaozhuo³, LIANG Xianxian³,
ZHENG Qiming³, LI Yue², PING Jihui⁴, JIANG Song^{1*}, XIA Jun^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832061, China;

2. Institute of Veterinary Medicine, Xinjiang Academy of Animal Husbandry Sciences (Xinjiang Academy of Animal Husbandry Sciences Animal Clinical Medicine Research Center), Urumqi 830000, China;

3. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830000, China;

4. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: This study was to predict and analyze the structure and potential function of bovine coronaviruses (BCoV) S protein, and to clone and express the protein and prepare polyclonal antibodies, so as to provide the basis for vaccine research and laboratory diagnosis. Bioinformatics software was used to predict and analyze the biological characteristics of S protein, its receptor binding domain (RBD) gene

收稿日期: 2024-08-15; 修回日期: 2025-06-16

基金项目: 新疆维吾尔自治区天山英才青年科技拔尖人才项目 (2022196128); 新疆维吾尔自治区重大科技专项项目 (2022273334); 新疆维吾尔自治区肉牛产业技术体系项目 (XJARS-10); 新疆畜禽疫病防控体系质量提升工程项目 (2023A02007)

第一作者: 韩翔舒, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 蒋松, 副教授, 研究方向: 动物临床疾病诊断与防控技术, E-mail: jsshzu@126.com; 夏俊, 研究员, 研究方向: 动物临床疾病诊断与防控技术, E-mail: 1065291747@qq.com。

was cloned and linked to prokaryotic expression vector pET-30a (+). Recombinant plasmids were constructed. BL21 receptor cells were transformed and their expression was induced by IPTG. The expressed protein was purified by nickel column and was immunized mice to prepare polyclonal antibodies which were then detected. The results were that S protein was composed of 1 364 aa, with a relative molecular weight of 150.81 kDa, the isoelectric point at 5.51, an instability index of 33.22, and a fat solubility index of 87.22. The amino acids 1-1 307 of the protein were in an extracellular region, 1 308-1 330 aa were in a transmembrane region, 1 331-1 363 aa were in an intracellular region, 1-14 aa were signalpeptides, and 310-612 aa were RBD. There were 36 potential B-cell epitopes, 12 of which were contained in RBD, with α -helix accounting for 27.95%, β -fold accounting for 23.04%, and random curling accounting for 49.01%, respectively. The analysis results of S protein tertiary structure were basically consistent with the prediction results of the secondary structure. The size of RBD of S protein successfully cloned here was consistent with the expectation, and the vector was successfully constructed by double enzyme digestion and sequenced after being connected to the vector pET-30a (+). After the successful expression of the protein was verified by SDS-PAGE, the purified protein was immunized on mice and serum samples were isolated. The polyclonal antibody was verified by indirect immunofluorescence to recognize the corresponding antigen, which proved that the recombinant protein had good immunogenicity. The structure and function of BCoV S protein were analyzed and predicted successfully, and the polyclonal antibodies of the S protein receptor binding domain were obtained, which laid the foundation for subsequent studies.

Keywords: BCoV; S protein; receptor binding domain; biological characteristics; polyclonal antibody

牛冠状病毒 (bovine coronavirus, BCoV) 是牛病毒性腹泻的重要病原之一, 成年牛感染后临床症状通常表现为粥样腹泻伴有出血、发热、抑郁、脱水、厌食、绞痛和产奶量下降^[1-2]。幼年牛常表现为黄色水样粪便、脱水、体温降低, 进而引起犊牛代谢性酸中毒、高烧或死亡。该病毒通过呼吸道和粪-口途径传播^[3]。

冠状病毒 (CoV) S 蛋白包含 3 个主要部分, 细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域^[2]。在 CoV 成熟过程中, S 蛋白的胞外结构域被宿主蛋白酶识别后, 裂解成 2 个亚基, 即 S1 亚基和 S2 亚基^[4]。BCoV 通过 S 蛋白的 S1 亚基部分与宿主细胞膜受体 (N-乙酰基-9-O-乙酰基神经氨酸) 结合从而入侵细胞^[5], S2 部分调节病毒与宿主细胞膜融合, 进而实现进入宿主细胞^[6]。目前的研究将 CoV S1 亚基划分为 2 个结构域, N-端结合域 (S1-NTD) 和 C-端结合域 (S1-CTD), 这 2 个结构域都能作为受体结合域 (RBD)^[7]。它们主要负责识别 CoV 受体并介导病毒粒子与受体的结合^[8]。到目前为止, 大多数关于 CoV 的研究都与 RBD 有关, 因为 RBD 含有主要的中和表位, 具有很强的免疫原性, 并且能够诱导宿主产生免疫反应^[9-10]。因此, RBD 是制备抗体、疫苗和抗病毒药物靶点的首选。

本试验借助生物信息学方法对 S 基因的氨基酸序列进行分析, 了解 BCoV 蛋白结构特征, 并对该毒株的 RBD 部分进行表达, 制备出多克隆抗体, 为研究开发诊断试剂盒以及新型 BCoV 亚单位疫苗提供理论和技术基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 (DE3) 感受态细胞、

HRP 标记山羊抗牛 IgG 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; TIANprep Mini Plasmid Kit 质粒小提试剂盒 (离心柱型) 和 DL4500 DNA Marker 购自天根生化科技有限公司; 180 kDa Prestained Protein Marker、DL5000 DNA Marker、ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit、ECL 化学发光液购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 限制性核酸内切酶 *Bam*H I、*Not* I 购自纽英伦生物技术有限公司; DNA 上样缓冲液 (6 \times)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5 \times)、小鼠抗 His 单克隆抗体、兔抗小鼠 IgG-HRP、GAPDH 小鼠单抗、FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、NP-40 裂解液、免疫染色强力通透液、免疫染色固定液, 均购自碧云天生物技术有限公司。

1.2 实验动物与毒株

BALB/c 小鼠购自新疆医科大学北校区动物试验中心 [生产许可证号: SCXK (新) 2018-0002]。结肠癌肿瘤细胞 (HRT-18) 由新疆动物疫病研究重点实验室前期保存。新疆动物疫病研究重点实验室分离测序 BCoV 新疆分离株 XJ-SHZ-37 (OR750853.1)。

1.3 S 蛋白生物信息学分析

利用表 1 所示生物信息学软件或网站对 BCoV XJ-SHZ-37 毒株 (GenBank 登录号: OR750853, 分离自新疆石河子) 的 S 蛋白氨基酸序列进行预测与分析。

1.4 遗传进化树构建

从 NCBI 的 GenBank 数据库中下载国内 BCoV 的参考序列, 使用 Megalign 软件的 Clustal W 算法与本试验中 BCoV XJ-SHZ-37 毒株 (GenBank 登录号: OR750853) 进行多序列比较, 再在 MEGA X 软件中采用邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树, 设置布展值 (Bootstrap values) 检验为 1 000 次重复。

表 1 生物信息学分析软件

名称	网址	功能
NCBI	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi? PROGRAM =	核酸序列相似性搜索
SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html	二级结构
SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org/interactive	三级结构
EXpasy	http://web.Expasy.org/protparam/	蛋白质理化性质预测
SignalP	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-5.0/	信号肽分析
TMHMM	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php? TMHMM-2.0	跨膜结构域
IEDB	http://tools.iedb.org/bcell	B 细胞抗原表位
ProtScale	http://web.expasy.org/proscale	蛋白的亲水性

1.5 目的基因提取及 PCR 扩增回收

使用 TRIzol 法 (异硫氰酸胍-苯酚法) 对病毒液进行全 RNA 提取。在测定 RNA 浓度后, 使用反转录试剂盒进行反转录。

设计针对 BCoV XJ-SHZ-37 毒株 (GenBank 登录号: OR750853) S 蛋白 RBD 序列的引物 (表 2), 并以上述反转录的 cDNA 为模板进行 RBD 基因扩增。反应体系为: 2×Phanta Max Buffer 25 μ L, dNTP Mix

(10 mmol/L) 1 μ L, 上下游引物各 2 μ L, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μ L, cDNA 0.5 μ L, 超纯水补充至 50 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物由 1% 琼脂糖凝胶电泳进行观察分析。使用 FastPure[®] Gel DNA Extraction Mini Kit 试剂盒进行目的片段的回收。回收后使用分光光度计进行浓度测定。

表 2 基因扩增引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	位置/bp	片段大小/bp
pET-RBD-F	GGTGGTCTCGAGTGC CGGCCG AACGGTTACTGTTCAGCCAATTG	931~955	936
pET-RBD-R	GCCATGGCTGATATC GGATTC CTGATTTTTGTAAATCAGTAGAAGAA GTAGTACCACATATTAACAT	2 226~2 270	

注: 斜体部分分别为上游引物 (*Bam*H I) 和下游引物 (*Not* I) 的酶切位点。

1.6 表达载体构建

利用 *Bam*H I 和 *Not* I 对 pET-30a (+) 进行双酶切, 加入 DNA 上样缓冲液 (6×) 进行核酸凝胶电泳, 使用 FastPure[®] Gel DNA Extraction Mini Kit 试剂盒进行目的片段的回收, 回收后测定浓度。使用同源重组试剂盒将回收后的目的条带与线性化载体连接, 连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 并涂布于卡那霉素 (Kan) 抗性的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 12 h 后挑取单克隆菌落, 加入 1 mL 的 Kan 抗性液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 120 r/min 摇床培养 6 h, PCR 验证后, 将阳性菌落提取质粒并进行双酶切验证, 条带正确的质粒委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

1.7 蛋白诱导表达及表达条件优化

将验证成功的质粒转化至大肠杆菌 BL21 感受态细胞中, 并涂布于 Kan 抗性固体培养基, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 12 h 后挑取单克隆菌落, 加入 15 mL Kan 抗性液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 120 r/min 摇床培养, 使菌液

OD 值达到 0.4~0.6 之间, 加入终浓度为 0.1 mmol/L IPTG, 37 $^{\circ}$ C 120 r/min 摇床培养 6 h 后收取菌液。超声破碎离心后, 分别取上清液和沉淀物进行 SDS-PAGE, 鉴定表达方式。

最佳 IPTG 终浓度确定: 将 IPTG 终浓度设置为 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1 mmol/L。最佳诱导时间确定: 将诱导时间设置为 4、6、8、10、12、24 h。根据 SDS-PAGE 结果, 确定最佳 IPTG 终浓度、最佳诱导时间。

1.8 蛋白纯化及 Western blot 鉴定

参考上述最佳表达条件, 将蛋白进行表达。镍柱亲和层析法获得纯化后重组蛋白。根据 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白浓度。将纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE, 转印至 PVDF 膜, 5% 的脱脂奶室温摇床封闭 1 h; 以 1:1 000 稀释的小鼠抗 His 单克隆抗体和 1:300 稀释的牛阳性血清为一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育 12 h; 10 mL PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min; 以 1:1 000 稀释的兔抗小鼠 IgG-HRP 抗体和 1:5 000

稀释的山羊抗牛 IgG-HRP 为二抗，室温孵育 1 h；PBS 洗涤 3 次，每次 5 min；膜上滴加发光液观察。

1.9 多克隆抗体的制备及效价测定

4 周龄 BALB/c 小鼠断尾采血 200 μL 分离阴性血清。将弗氏完全佐剂与等纯化蛋白等体积混合乳化，背部皮下分点注射 40 μg 蛋白。2 周后使用弗氏不完全佐剂乳化蛋白液，背部皮下分点注射 40 μg 蛋白。第 2 次免疫 2 周后使用弗氏不完全佐剂乳化蛋白，背部皮下分点注射 80 μg 蛋白。第 3 次免疫后 1 周对小鼠进行心脏采血，获得的血浆静置过夜后，在 4 ℃ 5 000 r/min 离心 10 min 获得小鼠血清后，检测抗体效价。用 PBST 将待检血清进行 1 : 1 000~1 : 256 000 倍比稀释，阴性血清为对照组。

1.10 Western blot 鉴定

将感染 BCoV 72 h 的 HRT-18 细胞裂解后制样，以未感染病毒的细胞作为阴性对照，经 SDS-PAGE 后，转印到 PVDF 膜上。5% 脱脂奶封闭 4 ℃ 过夜，以制备的多抗血清为一抗（1 : 1 000）稀释后，37 ℃ 孵育 2 h，以 HRP 标记的兔抗小鼠 IgG 为二抗（1 : 1 000），37 ℃ 孵育 2 h，滴加发光液观察。

1.11 间接免疫荧光试验鉴定

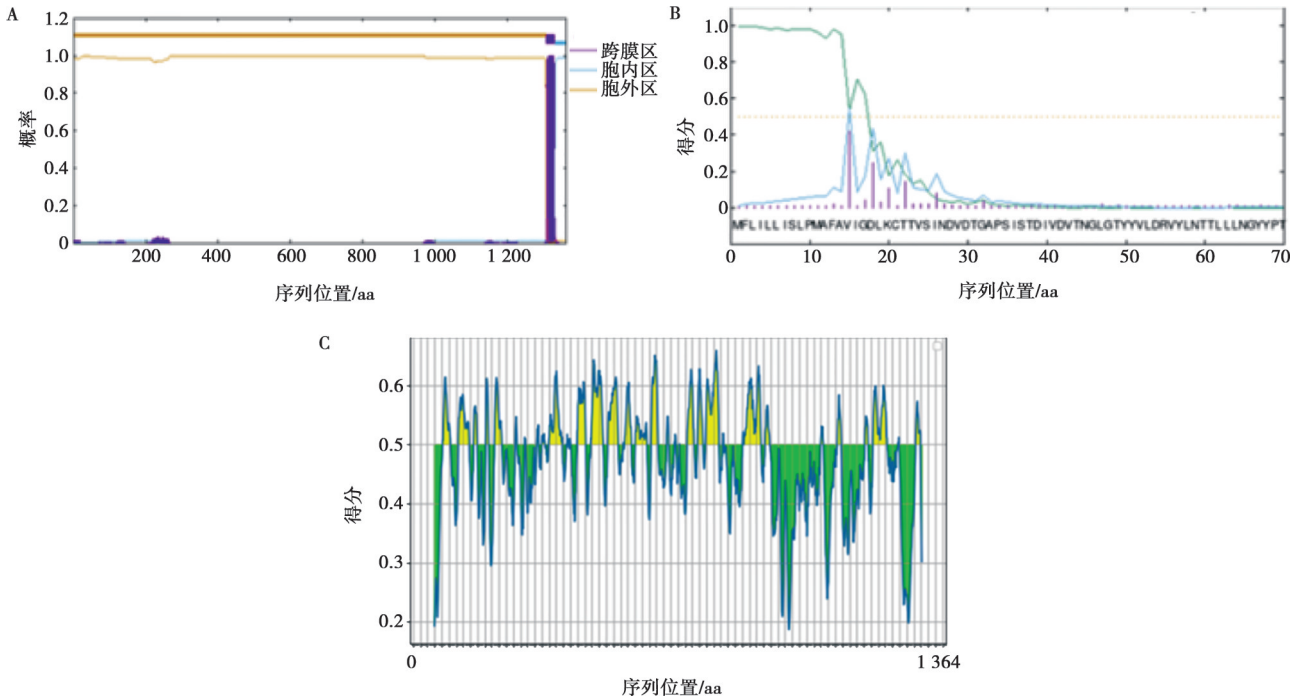
HRT-18 细胞长满单层 6 孔板后，接种 BCoV 毒株作为试验组，以未接毒细胞作为空白对照，以小鼠阴性血清作为阴性对照。病毒感染 72 h 后，弃去上清液，2 mL PBS 清洗细胞表面 3 次，每次 5 min；加入免疫染色固定液 200 μL 室温固定 20 min，弃去固定液，清洗细胞表面 3 次；加入免疫染色通透液，室温 20 min，弃去通透液，再次清洗细胞去除通透液；

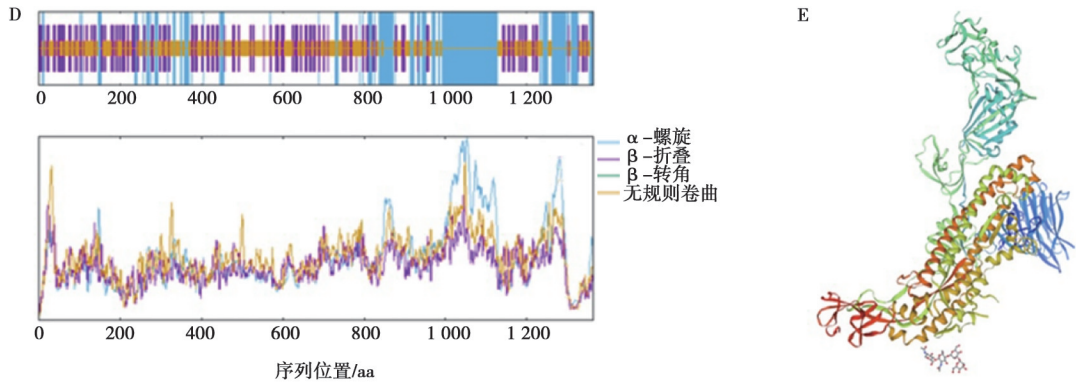
使用 5% 的脱脂奶室温摇床封闭 1 h；以 1 : 1 000 稀释的小鼠血清为一抗，4 ℃ 孵育过夜；弃去上清液，清洗细胞表面去除非特异性结合；加入 1 : 1 000 稀释的 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 室温孵育，1 h 后弃去二抗，PBS 清洗细胞表面 3 次，使用荧光显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

EXpasy 预测结果显示 S 蛋白基因全长 4 092 bp，由 1 364 个氨基酸组成。S 蛋白相对分子质量为 150.81 kDa，等电点为 5.51，不稳定指数为 33.22，脂溶性指数为 87.22。TMHMM 在线软件预测结果显示 S 蛋白 1~1 307 aa 为胞外区，1 308~1 330 aa 为跨膜区，1 331~1 363 aa 为胞内区（图 1A）。SignalP 在线软件预测结果显示 14~15 aa 为信号肽（图 1B）。IEDB 在线软件预测结果显示 S 蛋白有 36 个潜在的 B 细胞表位，其中 RBD 包含 12 个 B 细胞表位（图 1C）。SOPMA 在线软件预测结果显示该蛋白 α-螺旋占 27.95%，β-折叠占 23.04%，无规则卷曲占 49.01%（图 1D）。SWISS-MODEL 分析 S 蛋白三级结构，均存在多个螺旋和折叠区域，主要结构为 α-螺旋和无规则卷曲（图 1E），与二级结构预测结果基本一致。综合上述分析，S 蛋白为稳定蛋白且在 pH 中性溶液中不易发生解离，B 细胞表位多，具有良好的抗原性。相比于 S 蛋白，RBD 具有以上特性的同时还具有相对分子量小且含有的 B 细胞表位较多的优点，因此选择 RBD 开展后续试验。





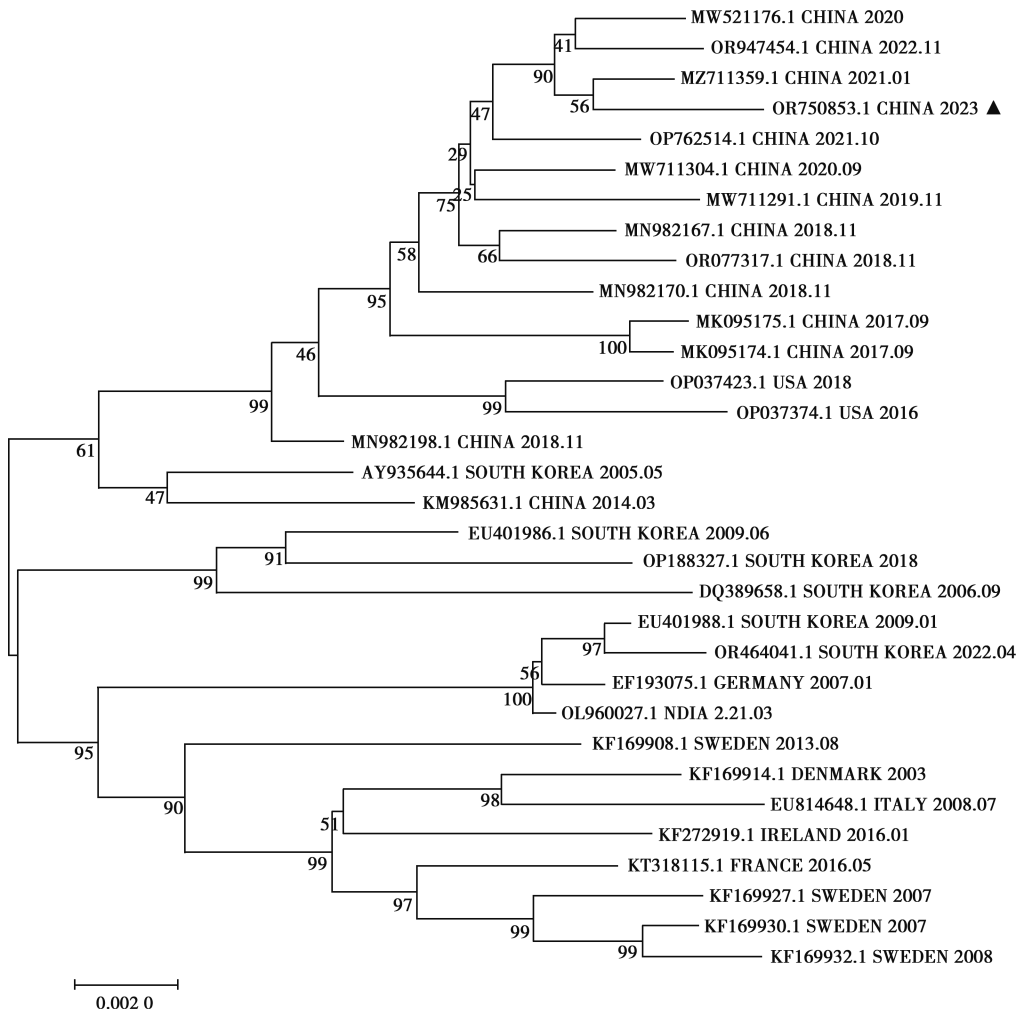
A. 跨膜结构域分析; B. 信号肽分析; C. B 细胞表位预测; D. 二级结构; E. 三级结构。

图 1 生物信息学分析

2.2 遗传进化树构建

根据 S 基因核苷酸序列遗传进化分析结果表明, 2020—2023 年发现的毒株聚在同一簇, 本毒株 (OR750853) 与中国江苏 2021 年分离的牛源毒株 Shx310 (MZ711358.1) 聚为同一分支, 与中国 2020

年 (MW521176.1) 和 2022 年 (OR947454.1) 分离的亲缘关系较近, 与较早在瑞典、意大利等国家分离的毒株属不同簇, 试验用毒株与早期流行的毒株存在差异。

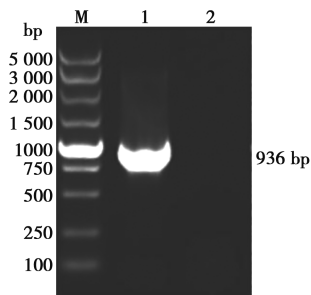


▲. 本试验分离株。

图 2 S 蛋白遗传进化树

2.3 目的基因片段扩增与载体表达构建

对 BCoV S 蛋白 RBD 进行 PCR 扩增，获得与预期片段（936 bp）大小一致的含有酶切位点的基因片段，结果如图 3 所示。



M. DNA Marker; 1. RBD 扩增产物; 2. 阴性对照。

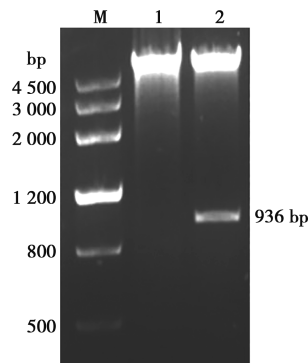
图 3 BCoV S 基因 RBD 片段 PCR 扩增结果

2.4 重组转化载体双酶切鉴定

将回收的目的片段与线性化载体同源重组后，进行菌液 PCR 鉴定，测序正确的菌液提取质粒进行双酶切鉴定。产生与预期片段大小相符条带，结果如图 4 所示。将质粒命名为 pET30a-RBD。

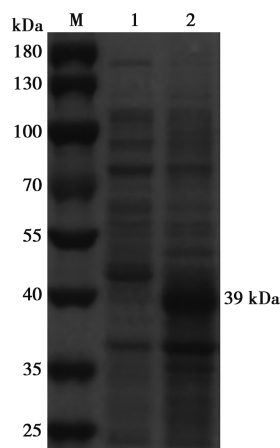
2.5 蛋白表达与表达形式检测

pET30a-RBD 重组质粒在 BL21 中诱导表达，SDS-PAGE 结果如图 5，诱导后 pET30a-RBD 菌体裂解上清液在 39 kDa 处无明显条带，诱导后 pET30a-RBD 裂解沉淀在 39 kDa 处有较浓条带。结果说明该蛋白主要以包涵体形式存在。



M. DNA Marker; 1. 空质粒; 2. pET30a-RBD 质粒。

图 4 重组质粒酶切验证结果

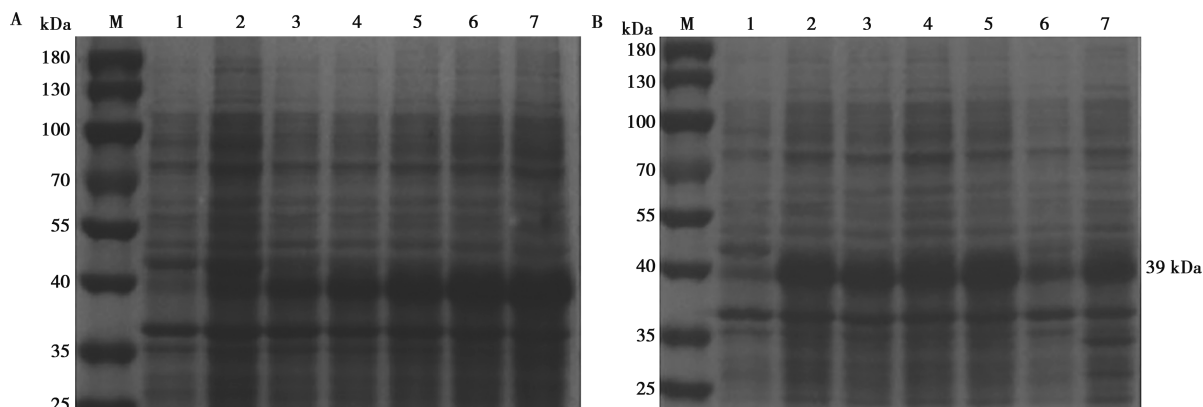


M. 蛋白 Marker; 1. 菌体裂解上清液; 2. 菌体裂解沉淀。

图 5 重组蛋白 SDA-PAGE 鉴定结果

2.6 表达条件优化

结果表明，在 IPTG 终浓度为 1 mmol/L 时，诱导 10 h 包涵体蛋白表达量最高。见图 6。

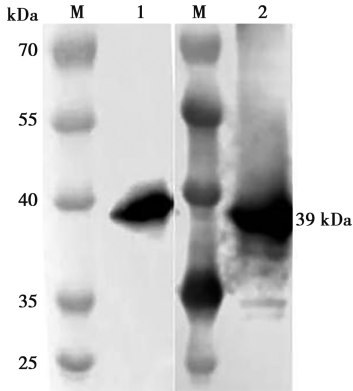


A. IPTG 浓度; M. 蛋白 Marker; 1. 未诱导; 2~7. 分别为 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1 mmol/L IPTG。B. 诱导时间; M. 蛋白 Marker; 1. 未诱导; 2~7. 分别为 4、6、8、10、12、24 h。

图 6 优化表达条件

2.7 Western blot 鉴定

以 His 鼠单抗为和 BCoV 阳性血清一抗，Western blot 检测结果如图 7 所示，在 39 kDa 处都出现与预期大小相符的特异性条带。

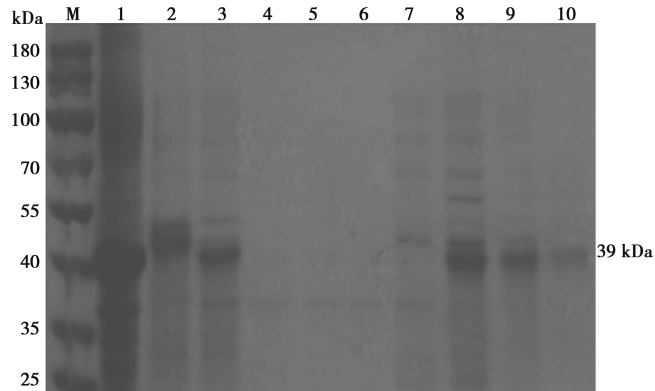


M. 蛋白 Marker; 1. His 单抗检测; 2. BCoV 阳性血清检测。

图 7 重组蛋白 Western blot 鉴定

2.8 蛋白纯化

包涵体蛋白变性、复性后，使用 Ni-NTA 纯化目的蛋白，对纯化产物进行 SDS-PAGE 分析，结果显示在 39 kDa 出现较为单一条带，大小符合预期，表明蛋白纯化成功，经 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定，蛋白浓度为 0.416 mg/mL。



M. 蛋白 Marker; 1. 最佳条件诱导表达菌体沉淀; 2. 蛋白变性后; 3. 蛋白复性后; 4. 流穿液 1; 5. 流穿液 2; 6. 流穿液 3; 7. 150 mmol/L 尿素洗脱液; 8. 250 mmol/L 尿素洗脱; 9. 350 mmol/L 尿素洗脱液; 10. 500 mmol/L 尿素洗脱液。

图 8 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

2.9 多克隆抗体的效价测定

用间接 ELISA 方法对制备的多克隆抗体进行效价检测，阳性血清 OD_{450} 值/阴性血清 OD_{450} 值 ≥ 2.1 为阳性。结果显示，抗体稀释度在 1 : 256 000 处，P/N 值仍大于 2.1，抗体效价满足后续试验需要。

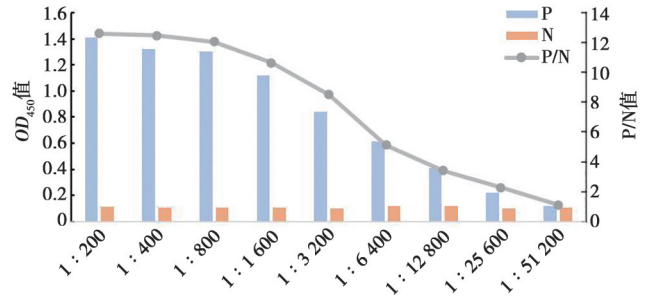
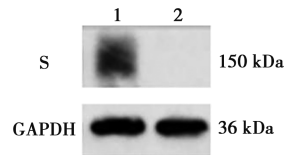


图 9 多克隆抗体效价测定

2.10 应用多克隆抗体进行 Western blot 检测

将 BCoV 感染 72 h 的 HRT-18 细胞裂解后进行 Western blot 检测，以采集的 RBD 鼠血清为一抗 (1 : 1 000 稀释)，以抗鼠 GAPDH 抗体 (1 : 1 000 稀释) 作为内参。结果显示，在 150 kDa 处出现特异性条带，表明制备的多克隆抗体可识别 S 蛋白，该抗体可以用于 Western blot 检测。



1. BCoV 感染后的细胞 2. 未感染的细胞。

图 10 多克隆抗体 Western blot 检测结果

2.11 应用多克隆抗体进行间接免疫荧光试验

以采集的鼠血清为一抗 (1 : 1 000 稀释) 对 BCoV 感染不同时间的 HRT-18 细胞进行间接免疫荧光试验，结果显示，制备的多克隆抗体可以检测到特异性荧光。空白对照组及阴性对照组细胞中未观察到绿色荧光。结果表明，多克隆抗体可以特异性识别 BCoV 感染细胞中的 S 蛋白，并且能够应用于间接免疫荧光试验检测。

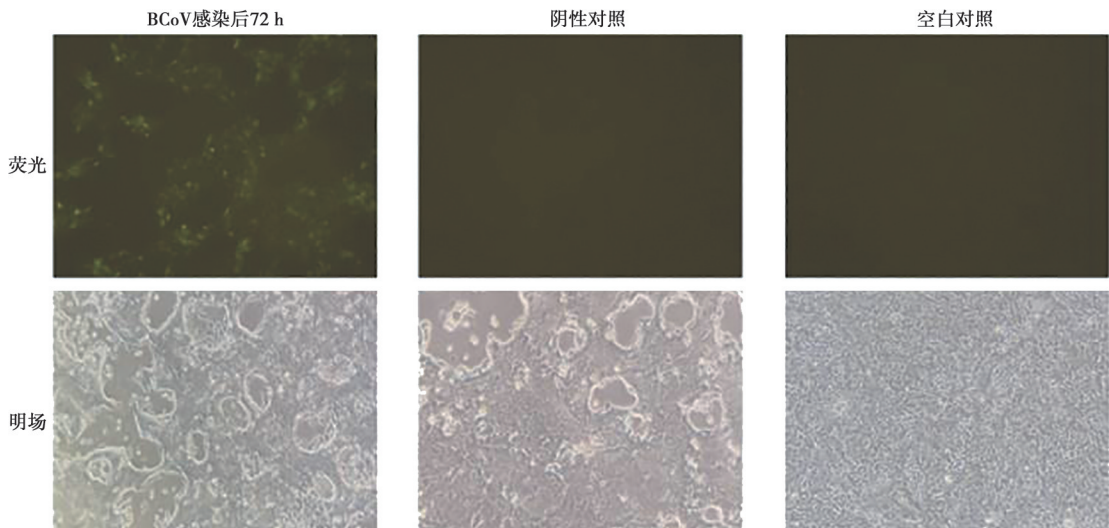


图 11 间接免疫荧光试验检测结果

3 讨论

BCoV 在世界各地流行，对畜牧业生产造成经济损失，最早在 1972 年从牛腹泻粪便中分离，首先在美洲流行，随后在亚洲和欧洲暴发^[11]。1985 年，宋广林等^[12]首次报道了 BCoV 在我国存在的情况。目前尚未研发出合理有效的疫苗及药物，因此本试验通过分析 S 蛋白的生物特性、抗原表位，并构建 RBD 重组蛋白为未来的疫苗研究提供基础，制备多克隆抗体对于日后研发 BCoV ELISA 诊断方法的建立及药物的开发具有重要意义。

生物信息学分析 BCoV S 蛋白对于了解病毒的进化、防治、诊断具有重要意义，因此本研究运用生物信息学软件对 S 蛋白进行综合分析。分析结果显示，该蛋白的无规则卷曲较多，无规则卷曲区域的二级结构比较松散，稳定性差，更易盘旋和扭曲，易与抗体分子结合，推断该区域可能存在优势抗原表位。优势抗原表位与免疫细胞的结合能力强，能供有效诱导机体产生免疫应答，因此 S 蛋白对于疫苗和药物研发具有重要意义。理化性质预测结果显示，S 蛋白的理论等电点偏低，表明该蛋白是带有负电荷的酸性蛋白质且与章高强等^[13]的研究结果相似，说明不同种属 CoV S 蛋白的理论等电点有一定的相似性。本毒株聚集在以中国和韩国为主要聚集支的-亚美分支，与贾开文等^[14]的研究结果相近，而与其不同的是本毒株和中国江苏 2021 年分离的牛源毒株 Shx310 亲缘关系较近，原因可能是该毒株与江苏分离株源自相同的病毒流行地区。通过该基因表达出的 BCoV RBD 重组蛋白主要以包涵体的形式表达，包涵体形式表达的蛋白，由于包埋了酶攻击的位点，可最大限度地抵抗蛋

白酶的攻击。本试验进行表达条件优化和纯化后，获得了高纯度重组蛋白，将重组蛋白免疫小鼠，成功制备了多克隆抗体，初步证明了其具有良好的反应性。

S 蛋白在 BCoV 的初始感染、致病性、组织嗜性、受体识别和诱导宿主免疫应答等多个过程中发挥着重要作用^[15]。S 蛋白是 CoV 最主要的宿主保护抗原，而 RBD 是 S 蛋白与受体结合的核心区域，可通过与受体结合刺激细胞免疫，参与靶细胞识别和病毒的侵入过程，诱导机体产生保护性中和抗体，在宿主感染后的免疫中起重要作用^[16]。有研究表明 S 蛋白的单克隆抗体在体内可防止 BCoV 引发的犊牛肠绒毛萎缩，证实了 S 蛋白在体内的双重保护作用，既能够诱导中和抗体产生，又能够阻断病毒附着和感染的作用^[17]，因此该蛋白在疫苗研究及实验室检测方面具有重要研究价值。而与单克隆抗体相比，多克隆抗体更不易受化学处理造成的抗原表位丢失的影响，稳定性更好，且可以跨物种检测，也降低了实际应用的成本。

综上所述，本研究制备的多克隆抗体通过 Western blot 和间接免疫荧光试验证明，该抗体可以特异性结合 BCoV，表明制备的多克隆抗体有良好的反应原性，为以后的血清学检测方法建立和疫苗研究奠定基础。

参考文献：

- [1] 田梅. 试论牛呼吸道疾病的病原学与防治进展 [J]. 中国畜禽种业, 2019, 15 (6): 147.
- [2] ARMSTRONG J, NIEMANN H, SMEEKENS S, et al. Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus [J]. Nature, 1984, 308 (5961):

- 751-752.
- [3] 郑拓, 苗艳, 朱庆贺, 等. 牛冠状病毒感染的临床症状、诊断和防治 [J]. 现代畜牧科技, 2022 (1): 79-80.
- [4] WILLIAMS A K, LI W, SNEED L W, et al. Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses [J]. *Virus Research*, 1992, 25 (3): 213-222.
- [5] WOO P C Y, HUANG Y, LAU S K P, et al. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis [J]. *Viruses*, 2010, 2 (8): 1804-1820.
- [6] GALLAGHER T M, BUCHMEIER M J. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis [J]. *Virology*, 2001, 279 (2): 371-374.
- [7] JUNG J, BONG J H, KIM T H, et al. Isolation of antibodies against the spike protein of SARS-CoV from pig serum for competitive immunoassay [J]. *Biochip J*, 2021, 15 (4): 396-405.
- [8] GALAN L E B, DOS SANTOS N M, ASATO M S, et al. Phase 2 randomized study on chloroquine, hydroxychloroquine or ivermectin in hospitalized patients with severe manifestations of SARS-CoV-2 infection [J]. *Pathogens and Global Health*, 2021, 115 (4): 1-8.
- [9] MURALIDAR S, GOPAL G, VISAGA AMBI S. Targeting the viral-entry facilitators of SARS-CoV-2 as a therapeutic strategy in COVID-19 [J]. *J Med Virol*, 2021, 93 (9): 5260-5276.
- [10] 潘俊慧, 毛铭显, 周凯钰太, 等. 动物感染新型冠状病毒现状及研究进展 [J]. 南京农业大学学报, 2025, 48 (2): 274-284.
- [11] WORKMAN A M, MCDANELD T G, HARHAY G P, et al. Recent emergence of bovine coronavirus variants with mutations in the hemagglutinin-esterase receptor binding domain in U. S. cattle [J]. *Viruses*, 2022, 14 (10): 2125-2125.
- [12] 宋广林, 董惠兰, 滕庆, 等. 犊牛流行性腹泻病原研究 [J]. 畜牧兽医学报, 1985 (2): 121-124.
- [13] 章高强, 董波, 张晓东, 等. 猫冠状病毒 S 蛋白生物信息学分析与原核表达 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023 (3): 119-124.
- [14] 贾开文, 操义恒, 胡亚辉, 等. 新疆地区犊牛冠状病毒的病原调查及 S 基因的遗传进化分析 [J]. 中国兽医学报, 2024, 44 (4): 664-669.
- [15] 靳双媛, 杜家伟, 王雪妍, 等. 牛冠状病毒 S 和 HE 蛋白研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51 (7): 3118-3127.
- [16] OTHMAN H, BOUSLAMA Z, BRANDENBURG J T, et al. Interaction of the spike protein RBD from SARS-CoV-2 with ACE2; similarity with SARS-CoV, hot-spot analysis and effect of the receptor polymorphism [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 527 (3): 702-708.
- [17] 李长乐, 姚鑫炎, 肖毅, 等. 牛冠状病毒流行病学及检测方法研究进展 [J]. 特产研究, 2025, 47 (3): 185-190.