

PEDV S 蛋白 B 细胞抗原表位的筛选和鉴定*

孙东波¹⁾ 朗洪武²⁾ 时洪艳¹⁾ 陈建飞¹⁾ 崔晓辰¹⁾ 王承宝¹⁾ 佟有恩¹⁾ 冯力^{1)**}

¹⁾中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室, 猪传染病研究室, 哈尔滨 150001;

²⁾中国兽医药品监察所, 北京 100081)

摘要 以猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) S 基因的免疫优势区 S1 (1~2 367 bp) 为靶基因, 利用基于 gⅢ 表达外源多肽的 fd 丝状噬菌体展示系统, 构建 S1 基因噬菌体展示肽库, 以纯化病毒制备的兔抗 PEDV 多克隆血清为靶蛋白, 对 S1 基因噬菌体展示肽库进行 3 轮生物淘选, 结果获得 3 个高亲和力的序列, 分别命名为 S1P1(248~280 位氨基酸)、S1P2 (442~499 位氨基酸) 和 S1P3 (697~742 位氨基酸)。ELISA 和蛋白质印迹结果显示, S1P1、S1P2 和 S1P3 短肽都能被兔抗 PEDV 多克隆血清识别, 其中 S1P3 反应性最强。为了进一步揭示 S1P1、S1P2 和 S1P3 短肽的抗原性, 制备了 3 个短肽 GST 融合蛋白和它们串连后 GST 融合蛋白的单因子血清, 间接免疫荧光试验 (IFA) 结果证实, 抗 S1P2-GST、S1P3-GST 和 S1P123-GST 融合蛋白的单因子血清能够识别 Vero 细胞培养物中天然的 PEDV。

关键词 猪流行性腹泻病毒, S 蛋白, 抗原表位, 噬菌体展示

学科分类号 S852.65, Q78, S852.4

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, 以腹泻、呕吐、脱水和对幼龄仔猪高致死率为主要特征的一种高度接触性肠道传染病^[1]。PED 是世界范围内发生的猪病之一, 给养猪业带来严重的影响和经济损失^[2]。PEDV 与 SARS 冠状病毒同属于尼多病毒目 (Nidovirales) 冠状病毒科 (Coronaviridae) 冠状病毒属 (Coronavirus)。S 蛋白 (spike, S) 是 PEDV 一个重要的结构蛋白, 它是位于病毒粒子表面的纤突糖蛋白, 在病毒感染宿主机体后介导中和和抗体产生的过程中发挥重要生物学作用, 所以, S 蛋白是 PEDV 基因工程疫苗和诊断技术等方面研究中最重要的一個靶蛋白^[3~5]。目前, 关于 PEDV S 蛋白抗原表位的研究较少, 本试验利用 fd 丝状噬菌体展示技术对 PEDV S 蛋白免疫优势区的抗原表位进行了研究, 结果鉴定出 3 个抗原表位: S1P1(248~280 位氨基酸)、S1P2 (442~499 位氨基酸) 和 S1P3 (697~742 位氨基酸), 这 3 个表位与国外报道的不同, 是 PEDV S 蛋白 3 个新的抗原表位。另外, 免疫荧光测定 (immunofluorescence assay, IFA) 试验结果提示, S1P2 和 S1P3 表位是位于 PEDV S 蛋白表面结构域中, 为 PEDV 表位疫苗和诊断方法的研究提供了理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

fd 丝状噬菌体展示系统由 Smith 教授赠送; PEDV S 基因阳性质粒 pMD-18TS、兔抗 PEDV 多克隆血清和 pGEX-6p-1 载体由本实验室保存; QIAquick® Gel Extraction Kit (Cat.NO.28704)、QIAGEN® Plasmid Midi Kit (Cat.NO.12143) 和 QIAquick® PCR Purification Kit (Cat.NO.28104) 购自 QIAGEN 公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG 和 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司; Klenow 片段、T4DNA 聚合酶、小牛肠碱性磷酸酶 (CIAP)、ExTaq 酶和 DNaseI 购自 TaKaRa 公司; T4DNA 连接酶、Pvu II 限制性内切酶购自 Fermentas 公司; B-PER® GST Spin Purification Kit 购自 PIERCE 公司, BALB/c 鼠购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心; 酶标仪为 BIO-RAD680; 电穿孔仪为 Bio-Rad Gene Pulser X cell; 转印仪为 Bio-Rad SEMI-DRY TRANSFER CELL TRANS-BLOT SD。

* 兽医生物技术国家重点实验室开放基金项目。

** 通讯联系人。Tel: 0451-85935073, E-mail: fengli_h@163.com

收稿日期: 2007-01-26, 接受日期: 2007-04-02

1.2 方法

1.2.1 PEDV S1 基因噬菌体展示肽库的构建.

a. S1 基因随机片段的制备. S1 基因 PCR 产物用终浓度为 0.25U/ml DNase I 进行消化, 然后用 QIAquick® Gel Extration Kit 回收长 50~400 bp 的 S1 基因短片段. 用 T4 DNA 聚合酶和 Klenow 片段对回收的 S1 基因短片段进行补平. 补平产物用 QIAquick® PCR Purification Kit 进行纯化, 取 1 μ l 纯化产物于 2%琼脂糖凝胶电泳中进行检测, 同时用凝胶成像系统对纯化产物浓度进行定量.

b. fuse I 丝状噬菌体载体制备. 用 QIAGEN® Plasmid Midi Kit 提取并纯化 fuse I 载体, 然后用 *Pvu* II 限制性内切酶进行单酶切, 酶切产物用 QIAquick® Gel Extration Kit 纯化, 纯化产物用小牛肠碱性磷酸酶 (CIAP) 进行去磷酸化, 用 QIAquick® PCR Purification Kit 对去磷酸化的产物进行纯化, 取 1 μ l 纯化产物于 0.8%琼脂糖凝胶电泳中进行检测, 同时用凝胶成像系统对纯化产物浓度进行定量.

c. S1 基因特异性肽库的建立及鉴定. 将处理的 S1 基因短片段(16 ng)和 fuse I 载体 (250 ng) 连接后, 电转化(C: 25 μ F, R: 200 Ω , U: 2 500 V) 200 μ l *E. coli* MC1061 感受态细胞, 转化产物接种于 10 ml 含 0.2 mg/L 四环素的 SOC 培养基中, 37°C, 220 r/min 摇菌 1 h, 然后转移至 90 ml 含 20 mg/L 四环素的 LB 培养基中, 37°C, 220 r/min 摇菌 12 h, 用 PEG/NaCl (16.7% PEG₈₀₀₀, 3.3 mol/L NaCl) 对过夜培养物上清中的噬菌体进行纯化, 纯化的噬菌体即为 PEDV S1 基因特异性肽库, -20°C 保存. 肽库容量、病毒粒子浓度和四环素转导单位 (tetracycline transducing units, TU) 的测定按 Smith 试剂盒方法进行^[6,7]. S1 基因特异性肽库的随机性和插入片段长度测定: 原始肽库 TU 滴定后, 随机挑取 12 个单菌落, 按 Smith 试剂盒说明方法提取噬菌体基因组 DNA, 以基因组 DNA 为模板, 上游引物为: 5' TTTTGGAGATTTTCAACGTG 3', 下游引物为: 5'CAGCCCTCATAGTTAGCGTA 3', 进行 PCR 扩增, fuse I 空载体对照扩增大小为 201 bp, PCR 产物于 1%琼脂糖凝胶电泳中检测, 同时对纯化的 PCR 产物进行测序, 分析插入片段的大小和位置^[8].

1.2.2 S1 基因噬菌体展示肽库的生物淘选. 用纯化的 PEDV 多克隆抗体为靶蛋白, 按 Smith 试剂盒程序对 S1 基因噬菌体展示肽库进行三轮生物淘选^[9].

第一轮生物淘选条件: PEDV 多克隆抗体包被浓度为 100 mg/L, TBST 洗液中 Tween-20 含量为 0.1%; 第二轮生物淘选条件: PEDV 多克隆抗体包被浓度为 30 mg/L, TBST 洗液中 Tween-20 含量为 0.3%; 第三轮生物淘选条件: PEDV 多克隆抗体包被浓度为 10 mg/L, TBST 洗液中 Tween-20 含量为 0.5%. 计算每一轮淘选后病毒粒子的产率(产率=产出病毒粒子数/投入病毒粒子量 $\times$ 100%), 对第三轮淘选后 30 个噬菌体克隆进行测序, 并与 CV777 (AF353511)、Brl/87 (Z25483)、JS (AY653204)、KPEDV (AF500215) 和 Chinju99 (AY167585) 毒株 S 蛋白的相应序列进行比对分析, 测序引物为: 5' TTTTGGAGATTTTCAACGTG 3', 测序方法按 Smith 试剂盒说明进行^[10].

1.2.3 抗原短肽 ELISA 和蛋白质印迹分析. 制备并纯化展示 S1P1、S1P2 和 S1P3 序列的噬菌体, 以纯化的噬菌体作为包被原进行 ELISA, 噬菌体 ELISA 程序^[11]: 纯化噬菌体(1.0×10^{10} 个/ml)和野生噬菌体对照(1.0×10^{10} 个/ml) 4°C 包被 12 h, 5%脱脂乳 37°C 封闭 1 h, 兔抗 PEDV 抗体 (100 mg/L) 37°C 作用 1 h, HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:8 000) 37°C 作用 1 h, TMB 底物 37°C 显色 10 min, 用 2 mol/L H₂SO₄ 终止 5 min, 在 450 nm 处测定吸光值. 将 S1P1、S1P2 和 S1P3 构建到 pGEX-6p-1 载体进行原核表达, GST 融合蛋白用 B-PER® GST Spin Purification Kit 纯化, 以纯化的 S1P1-GST、S1P2-GST 和 S1P3-GST 融合蛋白进行 ELISA 和蛋白质印迹分析. ELISA 程序: 用浓度为 1 mg/L GST 融合蛋白和纯化的 PEDV 对照 (10 mg/L) 包被, 其他操作程序同噬菌体 ELISA; 蛋白质印迹按《分子克隆》实验指南第二版上的方法进行^[12]. 合成在 5' 端和 3' 端分别含有 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点的 S1P1、S1P2 和 S1P3 串连核苷酸序列 S1P123, 并在 S1P1、S1P2 和 S1P3 序列之间依次加上不影响抗原性的甘氨酸(G)、脯氨酸(P)和甘氨酸(G)3 个疏水性氨基酸的密码子, 按上述方法对 S1P123 进行原核表达和纯化, 纯化的 S1P123-GST 融合蛋白进行 ELISA 和蛋白质印迹分析.

1.2.4 抗原短肽的免疫原性分析. 用纯化的 GST、S1P1-GST、S1P2-GST、S1P3-GST 和 S1P123-GST 蛋白对 BALB/c 鼠进行 2 次免疫来制备单因子血清, 用单因子血清进行以纯化 PEDV 作为包被原的 ELISA (pELISA) 及间接免疫荧光 (indirect immunofluorescence assay, IFA) 试验. IFA 程序: 用

PEDV(10^3 TCID₅₀/0.1 ml) 感染 96 孔板培养的 Vero E6 细胞, 当 70%~80%细胞出现细胞病变(CPE)时, 弃去培养液, PBS (pH 7.4) 洗板 3 次, 加冰冷丙酮(50%)和甲醇(50%)混合液固定 10 min, PBS 洗板 3 次, 加 100 μ l 单因子血清 (1:50 倍稀释), 同时设鼠抗 PEDV 阳性血清、GST 免疫血清和正常鼠血清对照, 37 $^{\circ}$ C 作用 1 h, PBS 洗板 3 次, 加入 50 μ l FITC 标记的羊抗鼠 IgG (1:100) 37 $^{\circ}$ C 作用 45 min, PBS 洗板 5 次, 自然干燥后荧光显微镜下观察. pvELISA 程序: 以浓度为 10 mg/L 纯化的 PEDV 作为包被原, 一抗为 1:200 倍稀释的单因子血清, 二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:8 000), 设鼠抗 PEDV 阳性血清和正常鼠血清对

照, 操作程序同噬菌体 ELISA.

2 结 果

2.1 S1 基因特异性肽库鉴定

S1 基因特异性肽库的库容为 2.0×10^6 , 四环素转导单位(TU)为 2.7×10^8 TU/ml, 病毒浓度为 2.58×10^{12} 个 /ml, 12 个随机噬菌体克隆 PCR 扩增后, 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示, S1 基因特异性肽库的插入片段范围为 50~400 bp (图 1), 测序结果表明, 12 个随机噬菌体克隆中有 10 个展示阅读框正确的 S1 基因序列, 它们位于 S1 基因的不同位置.

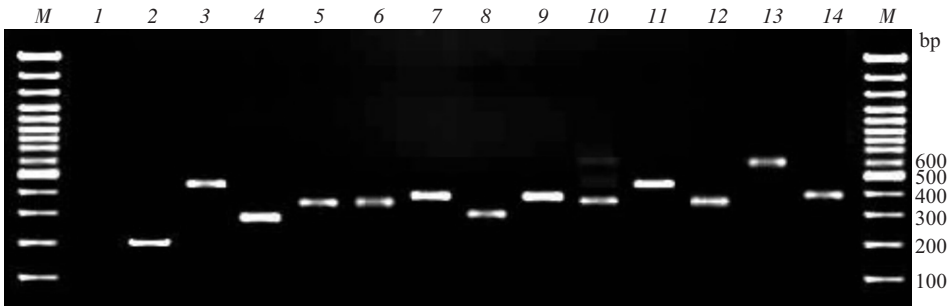


Fig. 1 PCR identification of length of S1 gene library random fragments
M: GeneRulerTM 100 bp DNA ladder plus. 1: H₂O as negative control; 2: Fuse I vector control; 3~14: Insert fragments.

2.2 S1 基因特异性肽库生物淘选结果

S1 基因特异性肽库 3 次生物淘选的产率分别为 1.75×10^{-6} , 3.28×10^{-6} , 1.13×10^{-4} , 说明噬菌体病毒粒子得到了富集. 30 个噬菌体克隆测序的结果显示, 它们均展示阅读框正确的 S1 基因序列, 其中

10 个噬菌体克隆展示 S1P1 序列(248~280 个氨基酸), 7 个噬菌体克隆展示 S1P2 序列(442~499 个氨基酸), 13 个噬菌体克隆展示 S1P3 序列(697~742 个氨基酸). 序列比对分析发现, 这 3 个序列与 PEDV Chingju99、KPEDV、JS、BrI/87 和 CV777

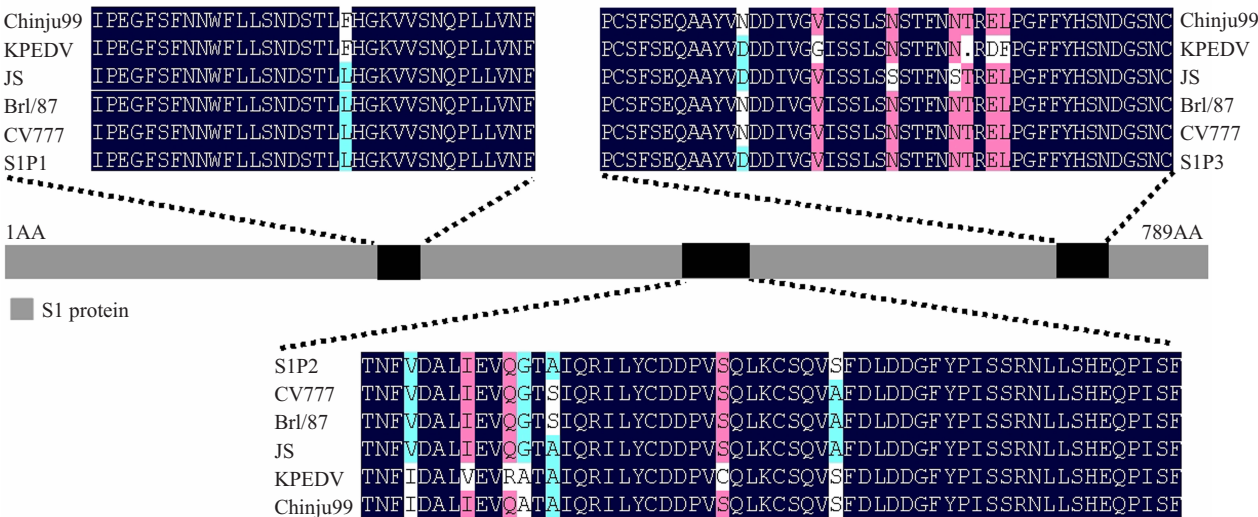


Fig. 2 Sequence alignment of S1P1, S1P2 and S1P3 polypeptide

毒株的 S 蛋白相对应的氨基酸序列同源性分别为 99.02%、96.55%和 96.74%，这说明获得的 3 个短肽序列在各毒株之间是比较保守的(图 2)。

2.3 抗原短肽 ELISA 和蛋白质印迹分析结果

噬菌体 ELISA 和 GST 融合蛋白的 ELISA 与蛋白质印迹结果表明，S1P1、S1P2 和 S1P3 短肽都与兔抗 PEDV 多克隆血清反应，而且均以 S1P3 短肽

的反应性最强。S1P123-GST 融合蛋白 ELISA 和蛋白质印迹结果显示，S1P123-GST 融合蛋白与兔抗 PEDV 多克隆血清反应性高于 S1P1、S1P2 和 S1P3 GST 融合蛋白。这个结果提示我们，S1P3 是 PEDV S1 蛋白中一个主要的抗原表位，同时也揭示 S1P1、S1P2 和 S1P3 的串联表位 S1P123 具有更好的抗原性(图 3~图 5)。

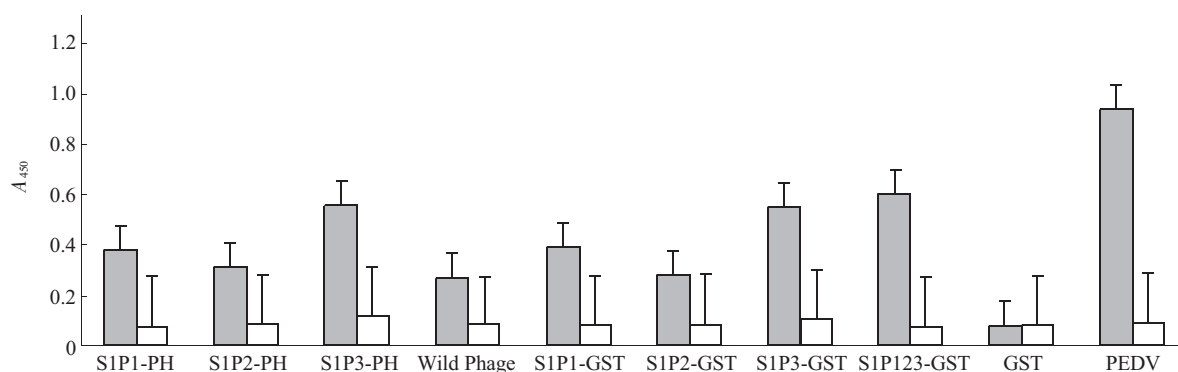


Fig. 3 Result of phage and purified GST fusion protein ELISA

■: Rabbit serum against PEDV; □: Normal rabbit serum. PH: Represented phage clone.

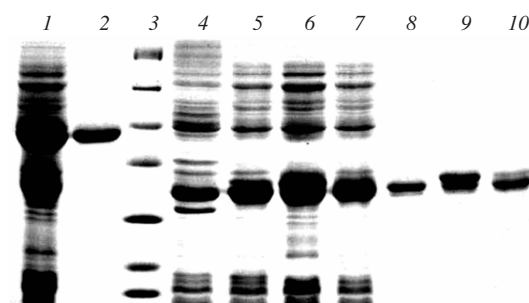


Fig. 4 Expression and purification of S1P1, S1P2, S1P3 and S1P123

1: S1P123-GST; 2: Purified S1P123-GST; 3: Protein marker 116 ~ 14.4 ku; 4: GST control; 5: S1P1-GST; 6: S1P2-GST; 7: S1P3-GST; 8: Purified S1P1-GST; 9: Purified S1P2-GST; 10: Purified S1P3-GST.

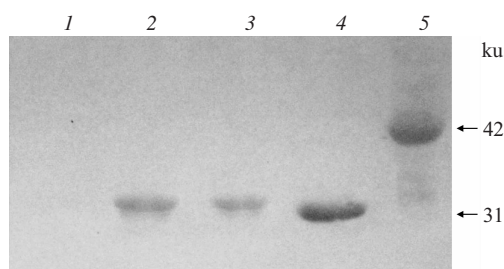


Fig. 5 Western blot of S1P1-GST, S1P2-GST, S1P3-GST and S1P123-GST fusion proteins

1: GST control; 2: S1P1-GST; 3: S1P2-GST; 4: S1P3-GST; 5: S1P123-GST.

2.4 抗原短肽的免疫原性分析结果

pvELISA 结果显示，S1P1、S1P2、S1P3 和 S1P123 GST 融合蛋白均能够诱导小鼠产生 PEDV S 蛋白特异性的抗体(图 6)。IFA 结果表明，S1P2、S1P3 和 S1P123 呈现出较强荧光信号，这个结果提示，S1P2 和 S1P3 表位序列位于 PEDV S 蛋白表面结构域上，同时也证明 S1P1、S1P2 和 S1P3 的串联表位 S1P123 具有更好的免疫原性(图 7)。

3 讨 论

噬菌体展示技术是一种强有力的用于快速研究蛋白质 - 蛋白质之间相互作用的工具，被广泛地应用于抗原表位的研究。噬菌体展示技术与预测法、化学“切割”法、肽探针扫描技术、X-衍射与核磁共振(NMR)分析等抗原表位研究方法相比，有以下优点：a. 操作简单，b. 可以鉴定线性表位和构象表位，c. 大容量的肽库可以供任何抗体选择。噬菌体展示系统包括基于 gⅢ 和 gⅤ 融合表达外源多肽的 2 种展示形式，其中基于 gⅢ 的噬菌体展示系统适合筛选高亲和力的受体或配体，主要应用在 B 细胞抗原表位的研究。病毒感染宿主动物后能够刺激机体的免疫系统产生免疫应答，然后由分化的 B 淋巴细胞分泌抗该病毒的各种免疫球蛋白亦称多克隆抗体，这个多克隆抗体对病毒具有中和作

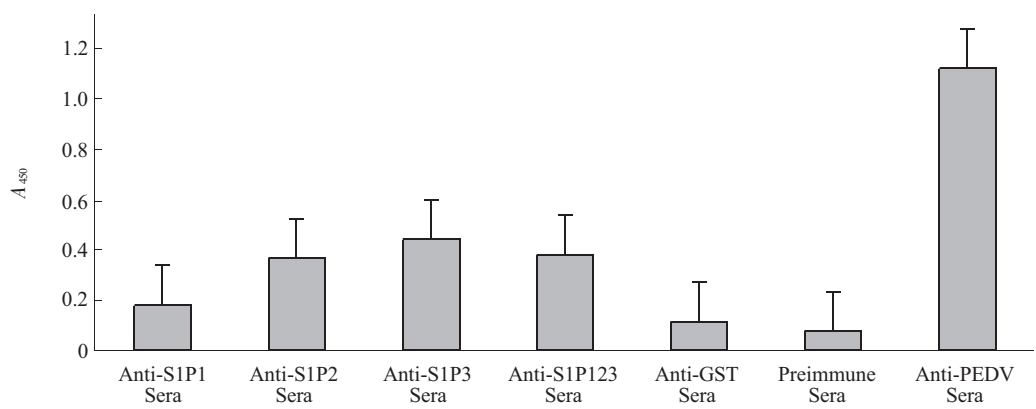


Fig. 6 The pvELISA of immune sera regarding S1P1, S1P2, S1P3, and S1P123 GST fusion proteins

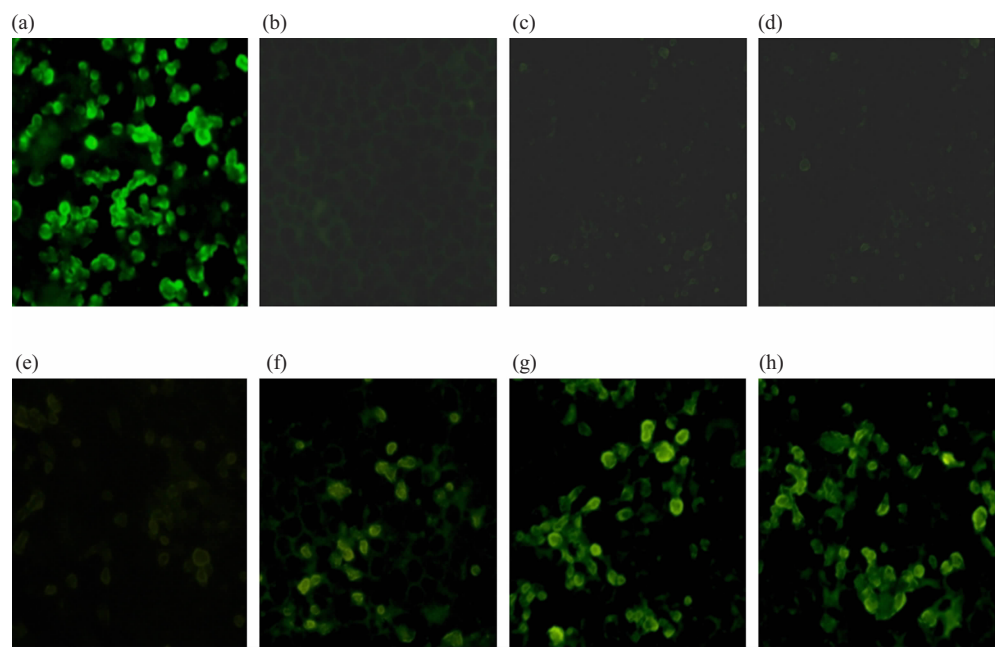


Fig. 7 The result of indirect immunofluorescence assay with the immune sera of GST fusion proteins (100×)

(a) Anti-PEDV sera. (b) Normal Vero E6 cells control. (c) Normal mouse sera control. (d) Anti-GST protein sera control. (e) Antisera of S1P1 GST fusion protein. (f) Antisera of S1P2 GST fusion protein. (g) Antisera of S1P3 GST fusion protein. (h) Antisera of S1P123 GST fusion protein.

用，能抵抗该病毒的再次感染. 所以用抗病毒的多克隆抗体作为筛选蛋白，可以从该病毒主要表面抗原基因的特异性噬菌体肽库中获得其优势表位. 冠状病毒成员主要的抗原决定簇位于 S 蛋白上，它们的抗原表位特征和相对位置具有很高的相似性. 冠状病毒属的猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、牛冠状病毒(BCoV)、猫传染性腹膜炎病毒(FIPV)、鸡传染性支气管炎病毒(IBV)、鼠肝炎病毒(MHV)和人的 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)的 S 蛋白抗原表位都得到了研究和定位，鉴定的抗原表位在诊断和基因

工程疫苗方面得到了很好的应用. PEDV 隶属冠状病毒属中的一员，它的抗原表位研究和揭示同样具有重要的意义，不仅能为 PED 的诊断和疫苗研究奠定基础，而且能为其他冠状病毒成员抗原表位的研究提供参考. 当前，Chang 等^[13]根据猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)S 基因的中和表位区序列的信息，初步鉴定了 PEDV S 基因一个抗原表位区(499~638 位氨基酸)，Cruz 等^[14]利用噬菌体随机肽库鉴定了 PEDV S 蛋白的一个模拟表位(¹³⁶⁸GPRLQPY¹³⁷⁴). 但是，与其他冠状病毒相比，

PEDV S 蛋白的抗原表位还没有得到广泛而深入的研究.

本试验用纯化病毒制备的兔抗 PEDV 多克隆抗体对 PEDV S1 基因特异性肽库进行了生物淘选, 获得了 3 个高亲和力的表位序列. 在淘选过程中, 我们逐渐降低抗体的包被浓度, 同时提高洗液中 Tween-20 的含量, 这样大大提高了筛选的特异性. 3 个表位 GST 融合蛋白的 ELISA 和蛋白质印迹结果进一步印证, 这 3 个表位序列是 S1 蛋白特异性的抗原表位, 而不是噬菌体非特异性结合产生的. S1P1、S1P2 和 S1P3 表位在 PEDV S 蛋白中的位置分别是 248~280 位氨基酸、442~499 位氨基酸和 697~742 位氨基酸, 它们是位于已报道抗原表位区(499~638 位氨基酸)和模拟表位(1 368~1 374 位氨基酸)之外的新抗原表位. S1P1、S1P2 和 S1P3 表位 GST 融合蛋白的噬菌体 ELISA、蛋白质印迹及其单因子血清的 IFA 结果表明, S1P3 表位的抗原性最强, S1P2 表位的抗原性次之, S1P1 表位的抗原性较弱. 我们对这 3 个表位的氨基酸组成分析发现, S1P3 表位的亲水氨基酸最多, 占氨基酸总数 58%, 其次是 S1P2(52%), 最少的是 S1P1(40%). 亲水性氨基酸残基一般位于蛋白质表面, 有利于抗原表位的形成, 这也是 S1P3 表位抗原性强的一个原因. 目前, 多表位基因工程疫苗是疫苗研究的新方向, 为了研究 S1P1、S1P2 和 S1P3 3 个串连表位的免疫原性, 我们合成了编码 S1P1、S1P2 和 S1P3 表位的核苷酸序列, 为了保持各表位区域结构的相对独立性, 在每 2 个表位序列之间加上甘氨酸(G)、脯氨酸(P)和甘氨酸(G)3 个疏水性氨基酸, 以 G-P-G 的形式间隔. 经 ELISA、蛋白质印迹以及融合蛋白单因子血清的 IFA 实验检测, 结果表明, S1P1、S1P2 和 S1P3 串连表位具有良好的免疫原性. 我们应用 fd 噬菌体展示技术鉴定了 PEDV S 蛋白 3 个新的抗原表位, 并且验证了 3 个串连表位的抗原性, 这为 PEDV S 抗原表位结构进一步分析提供了依据, 同时也为 PEDV 的表位疫苗和诊断方法的研究奠定了理论基础.

致谢 感谢美国密苏里大学 Smith 教授赠送 fd 丝状噬菌体展示试剂盒.

参 考 文 献

- 1 Pensaert M B, Debouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol*, 1978, **58** (3): 243~247
- 2 Shibata I, Tsuda T, Mori M, *et al.* Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages. *Vet Microbiol*, 2000, **72** (3~4): 173~182
- 3 Knipe D M, Howley P M, Griffin D E, *et al.* Chapter 36: Coronaviruses in *Fields Virology*. 4th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 1187~1197
- 4 Kang T J, Seo J E, Kim D H, *et al.* Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants. *Protein Expr Purif*, 2005, **41** (2): 378~383
- 5 Yeo S G, Hernandez M, Kpell P J, *et al.* Cloning and sequence analysis of the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus Chinju99. *Virus Genes*, 2003, **26** (3): 239~246
- 6 Smith G P. Absorption spectroscopy and quantitation of filamentous phage. <http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsiteIndex.html>, 2006-03-15
- 7 Smith G P. Titering tetracycline transducing units. <http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsiteIndex.html>, 2006-03-15
- 8 Smith G P. Extracting ssDNA from virions. <http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsiteIndex.html>, 2006-03-15
- 9 Smith G P. Affinity selection. <http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsiteIndex.html>, 2006-03-15
- 10 Smith G P. Sequencing phage. <http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsiteIndex.html>, 2006-03-15
- 11 Smith G P. Phage ELISA. <http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsiteIndex.html>, 2006-03-15
- 12 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁, 黎孟枫, 候云德译. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1993. 888~898
- 13 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Translated by Jin D Y, *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. Beijing: Science Press, 1993. 888~898
- 13 Chang S H, Bae J L, Kang T J, *et al.* Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea Virus. *Mol Cells*, 2002, **14** (2): 295~299
- 14 Cruz D J, Kim C J, Shin H J, *et al.* Phage-displayed peptides having antigenic similarities with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) neutralizing epitopes. *Virology*, 2006, **354** (1): 28~34

Screening and Identification of B Cell Antigenic Epitopes of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Spike Glycoprotein by Phage Display*

SUN Dong-Bo¹⁾, LANG Hong-Wu²⁾, SHI Hong-Yan¹⁾, CHEN Jian-Fei¹⁾,
CUI Xiao-Chen¹⁾, WANG Cheng-Bao¹⁾, TONG You-En¹⁾, FENG Li^{1)**}

*¹⁾Division of Swine Infectious Diseases, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research
Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China;*

²⁾China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract S1 gene targeted libraries containing the major immunodominant region (1~2 367 bp) of PEDV spike glycoprotein were constructed by phage-display vectors based on filamentous phage strain fd-tet, in which the exogenous polypeptides were expressed in the N-terminal of gene III coat protein. The S1 libraries were panned three times using the purified rabbit sera against PEDV. Three peptides, displayed on recombinant phages, showed strong binding affinity with the PEDV antisera, and were designated as S1P1 (248~280aa), S1P2 (442~499aa) and S1P3 (697~742aa) respectively. In ELISA and Western blot, the three peptides were all recognized by the PEDV antisera, but S1P3 showed strong binding activity. To further determine antigenicity of the three peptides, the antisera of S1P1-GST, S1P2-GST, S1P3-GST and their ligations GST fusion protein were prepared. In ELISA, S1P1-GST, S1P2-GST, S1P3-GST and S1P123-GST fusion proteins were able to induce the S1-specific antisera. The result of indirect immunofluorescence assay (IFA) demonstrated that the antisera induced by S1P2-GST, S1P3-GST and S1P123-GST fusion proteins possessed binding ability to the native S protein of PEDV cultured in Vero cells.

Key words porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), spike protein, antigenic epitope, phage display

*This work was supported by a grant from The National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS).

**Corresponding author . Tel: 86-451-85935073, E-mail: fengli_h@163.com

Received: January 26, 2007 Accepted: April 2, 2007