

**IBV 广东分离株 GD05 S1 基因的克隆、鉴定及其表达\***黄亚东<sup>1</sup>, 郑 青<sup>1</sup>, 王林川<sup>2</sup>, 李校堃<sup>1\*\*</sup>, 黄自然<sup>3</sup>

(1. 暨南大学医药生物技术研究开发中心, 广州 510632; 2. 华南农业大学动物医学系, 广州 510642; 3. 华南农业大学蚕桑系, 广州 510642)

**Cloning and Determination of S1 Gene of IBV GD05 Strain  
and Its Expression in *E. coli*.**HUANG Ya-dong<sup>1</sup>, ZHEN Qing<sup>1</sup>, WANG Lin-chuan<sup>2</sup>, LI Xiao-kun<sup>1\*\*</sup>, HUANG Zi-ran<sup>1</sup>

(1. Biopharmaceutic R&amp;D center of Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Department of veterinary medicine, South china Agriculture University, Guangzhou 510642, China; 3. Department of Sericulture, South china Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** According to Avian Infectious Bronchitis virus (IBV) Beaudette strain S1 gene sequence, a pair of primers were designed and synthesized. With the primers, IBV Guangdong isolation strain GD05 S1 gene was successively amplified by RT-PCR. PCR product was digested with *Bst* Y I, *Hae* III and *Pst* I respectively, the result showed RFLP pattern of was the same as that of M41 S1 gene. IBV GD05 strain was thought as Mass serotype primarily. IBV GD05 S1 gene was cloned into pGEM-T vector and sequenced, its sequence was consisted of 1611 base pairs. By comparison, the nucleotide sequence was 97.14% identical to that of IBV M41. IBV GD05 S1 gene was subcloned into expression vector pET21d. SDS-PAGE experiment showed that it expressed in *E. coli*.

**Key words:** Avian Infectious Bronchitis Virus (IBV); S1 gene; Cloning; Expression

**关键词:** IBV; S1 基因; 克隆; 表达

**中图分类号:** S852.65 **文章标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2002)03-0266-04

鸡传染性支气管炎病毒 (Infectious Bronchitis virus, IBV) 属于冠状病毒科冠状病毒属, 可引起鸡呼吸道、输卵管、肾脏、肠道及腺胃等多部位病变。近年来, 由于新的 IBV 变异毒株不断出现, 从而导致鸡传染性支气管炎病的不断爆发, 造成严重的经济损失<sup>[1,2]</sup>。IBV 的基因组为单股 RNA, 主要编码 3 种主要结构蛋白: 纤突蛋白 (S)、膜蛋白 (M) 和核衣壳蛋白 (N), 其中 S 蛋白成熟裂解为 S1 和 S2 两个蛋白亚基。S1 蛋白是 IBV 的主要免疫原基因, 可刺激机体产生中和抗体, 决定病毒的组织亲嗜性, 在病毒血清学分类中起主要作用<sup>[1,3]</sup>。GD05 株是从广东地方鸡场分离获得的典型肾病变 IBV 毒株, 本

研究利用 RT-PCR 方法成功地从 GD05 中扩增出 S1 基因, 对扩增产物进行 *Bst* Y I, *Hae* III 和 *Pst* I 酶切和序列分析, 并将 IBV S1 基因亚克隆到表达载体 pET21d 中进行研究, 为进一步研制和开发 IBV 基因工程疫苗奠定基础。

**1 材料与方法****1.1 病毒**

肾病变型 IBV 广东分离株 GD05 和标准毒株 M41 由华南农业大学禽病室提供。

**1.2 寡核苷酸引物**

根据已报道<sup>[3]</sup>的 IBV Beaudette 株 S1 基因序

收稿日期: 2001-12-29, 修回日期: 2002-03-11

\* 基金项目: 广东省青年基金资助 (950416); 国家自然科学基金资助 (39470538)

作者简介: 黄亚东 (1971-), 男, 博士, 讲师。研究方向为生化化学及分子生物学。

\*\* 通讯作者: 李校堃 (1964-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为生物工程。Correspondence author.

列设计 PCR 引物 P1 (5' CGCGAATTCAGAGATGTTGGTAA'3) 和 P2 (5' GACGGATCCTAACATAAGGGCAA'3), 由上海生物工程公司合成。为了克隆的方便, 引物 P1 的 5' 端引入了 *EcoR* I 酶切位点, 引物 P2 的 5' 端引入了 *Bam* H I 酶切点。

### 1.3 病毒增殖及 RNA 提取

病毒 RNA 的提取和 RT-PCR 参照 Binns 和王林川等方法作改进<sup>[3,4]</sup>。反应产物作 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。

### 1.4 RT-PCR 产物的酶切分析

将 IBV GD05 株及 M41 毒株的 PCR 产物分别用 *Bst* Y I, *Hae* III 和 *Pst* I 进行酶切后, 在 2% 琼脂糖凝胶(含 EB)上电泳后紫外检测。

### 1.5 IBV GD05 株 S1 基因的克隆及全序列分析

参照 pGEM-T Easy systemII KIT 说明书进行。用 M13 通用引物在 ABI PRISM™377 自动测序仪上进行序列分析。

### 1.6 IBV GD05 株 S1 基因表达载体的构建及表达

参考文献<sup>[5]</sup>进行。

## 2 结果

### 2.1 IBV GD05 株 S1 基因的 PCR 扩增

IBV GD05 株, M41 株经 RT-PCR 扩增后电泳分析表明二者均扩增得到了约 1.65kb 的片段, 与预期结果一致。

### 2.2 PCR 产物酶切分析

分别用 *Bst* Y I, *Hae* III 和 *Pst* I 对 IBV GD05 株与 M41 株 RT-PCR 产物进行酶切分析, 结果表明 IBV GD05 株 S1 基因 PCR 产物经 *Bst* Y I 酶切得到 1.0kb 和 0.65kb 两个片段, 经 *Hae* III 酶切得到 0.9kb、0.4kb 和 0.35kb 三个片段, 经 *Pst* I 酶切得到 0.56 和 1.09kb 二个片段。IBV GD05 株与 M41 株 S1 基因 PCR 产物酶切结果完全一致, 按 Kwon 等<sup>[6]</sup>的 PCR/RFLP 分型方法, 可判定 IBV GD05 株属于 Mass 血清型, 结果见图 1。

### 2.3 IBV GD05 株 S1 基因的克隆

IBV GD05 株 S1 基因 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体连接后转化 *E. coli* JM109, 在筛选平板上挑取多个白色单菌落, 小量提取质粒 *EcoR* I 酶切分析电泳检测, 经筛选获得阳性重组子 pGEMGDS5。重组质粒 pGEMGDS5 的鉴定结果见图 2。

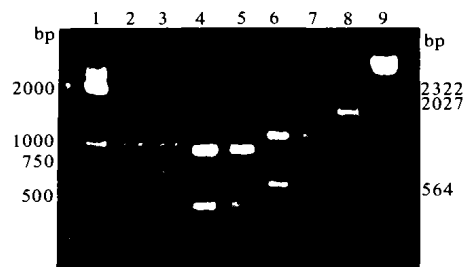


图1 IBV GD05 S1 基因的 RT-PCR 产物的酶切分析

Fig.1 Restriction enzyme digestion of RT-PCR of IBV GD05 S1 gene

Lane 1, 250bp DNA Marker; 2, M41 S1/RT-PCR product/*Bst* Y I; 3, GD05 S1/RT-PCR product/*Bst* Y I; 4, M41 S1/RT-PCR product/*Hae* III; 5, GD05 S1/RT-PCR product/*Hae* III; 6, M41 S1/RT-PCR product/*Pst* I; 7, GD05 S1/RT-PCR product/*Pst* I; 8, GD05 S1/RT-PCR product; 9,  $\lambda$ DNA/*Hind* III.

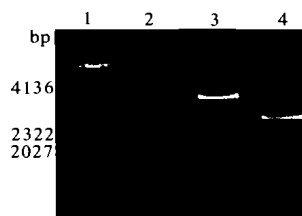


图2 重组质粒 pGEMGDS5 的酶切及 PCR 鉴定结果

Fig.2 Restriction Enzyme Digestion and PCR of Recombinant plasmid pGEMGDS5

Lane 1,  $\lambda$ DNA/*Hind* III; 2, PCR/pGEMGDS5; 3, pGEMGDS5/*Bam* H I; 4, pGEMGDS5/*EcoR*I.

### 2.4 IBV GD05 株 S1 基因的全序列分析

用 M13 通用引物在 ABI PRISM™377 自动测序仪上进行序列分析, 测序结果与标准毒株 M41 同区段序列作同源性比较分析, 结果表明, IBV GD05 株 S1 基因从起始密码 ATG 到 S 前体蛋白裂解位点总长为 1.611kb 的全序列, 与已发表的标准株 M41 同区段序列相比较, 仅有 47 个碱基差异, 同源性达到 97.14%。从碱基变化来, 在 47 个碱基差异中, 有 25 个碱基是 T 与 C 之间互换, 并且变异区段集中在 5' 端。

### 2.5 IBV GD05 株 S1 基因表达载体的构建

将质粒 pGEMGDS5 经 *EcoR* I 酶切, 低熔点回收 1.65kb 的 S1 基因片段, 与 *EcoR* I 酶切消化并用 CIAP 处理过的表达载体质粒 pET21d 进行连接, 连接产物转化受体菌 *E. coli* JM109, 挑取单菌落小量提取质粒, 经酶切分析和 PCR 扩增鉴定, 获

得重组转化子 pET-S1。重组表达载体 pET-S1 的鉴定结果分别如图 3 所示。

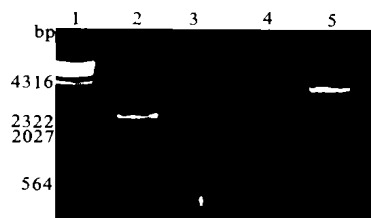


图 3 重组表达载体 pET-S1 的酶切鉴定电泳图谱

Fig. 3 Restriction enzyme Digestion of Recombinant expression vector pET-S1

Lane 1,  $\lambda$ DNA/*Hind* III; 2, pGEMGDS5/*Eco*R I; 3, pETGDS5/*Eco*R I; 4, pET-S1/*Bam*H I; 5, pET-21d/*Eco*R I.

## 2.6 IBV GD05 株 S1 基因的表达及检测

将重组表达载体质粒 pET-S1 转化于感受态细胞 BL21, 挑取单菌落过夜培养, 经 IPTG 诱导表达, 收集菌体作 SDS-PAGE 电泳检测, 结果见图 4。从 SDS-PAGE 图谱可以看出, 重组表达载体转化菌株的蛋白质条带比对照组在对应于蛋白质分子量标准 66-97.4 kD 之间位置处多出一条蛋白质条带。经凝胶成像系统扫描, 绘制分子量曲线, 推算该蛋白质条带的分子量大小为 70 kD 左右。根据本文测定的 1.65 kb 的核苷酸序列推测, IBV S1 基因编码 550 个氨基酸, 加上 pET-21d 载体中的引导肽与 His-Tag, 理论推测表达产物的分子量应为 70 kD 左右。这与实际表达产物的大小基本相符, 由此可以初步推论该特异蛋白质条带为 IBV S1 基因的表达产物。

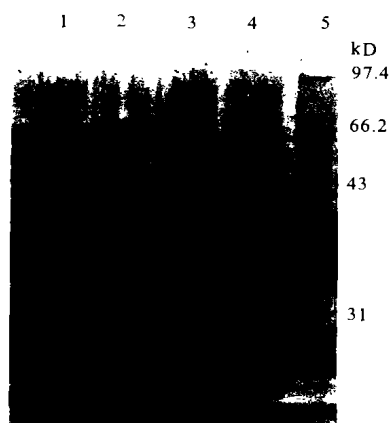


图 4 表达产物的 SDS-PAGE 检测

Fig. 4 Detection of SDS-PAGE of Negative expression product Lane 1, Negative; 2-4, Product of IBV GD05 S1 gene; 5, Protein marker.

## 3 讨论

已测定 IBV GD05 株 S1 基因从起始密码 ATG 到 S 前体蛋白裂解位点全长为 1.611 kb, 该序列与已发表的 M41 同区段序列相比较, 同源性达到 97.14%。它编码一条由 537 个氨基酸组成分子量约为 64 kD 的多肽。疏水性分析表明, 该多肽 N 端有一段较强的疏水区, 包含 18 个氨基酸, 这些结构符合信号肽的共同特征<sup>[7,8]</sup>, 因此可初步判定该部位为 S 蛋白的信号肽。此外, 序列内部无终止密码子, 这说明我们获得的 IBV GD05 株 S1 基因是完整的, 可用于体外表达研究。

将 IBV GD05 S1 基因克隆到大肠杆菌表达载体 pET21d 中进行原核表达研究, 根据 IBV GD05 S1 基因的氨基酸序列, 预计表达产物大小为 64 kD, 另据 Cavanagh<sup>[9]</sup>报道, 成熟的 S1 糖多肽分子量为 90 kD。但从 SDS-PAGE 图谱上来看, 有一条分子量大小约为 70 kD 的特异条带, 该条带可能是 IBV GD05 S1 基因在大肠杆菌中的表达产物。由于大肠杆菌不具备与脊椎动物细胞相似的识别和修饰 N-糖基化位点的能力, 因而表达产物不能被正确地糖基化修饰。此外, 表达产物较预计大小 64 kD 稍大, 这可能是 IBV GD05 S1 基因与表达载体 pET21d 中的引导肽和 His-Tag 融合表达所致。初步的免疫学检测实验结果表明, 该重组蛋白的抗体抗原反应不是十分明显, 分析其中原因最大可能性是由于表达产物没有被糖基化, 这对表达产物免疫原性存在较大的影响。

**致谢** 本研究部分工作在农业部禽病防治重点实验室完成, 得到该室廖明博士、博士生刘公平等同志的大力帮助, 在此表示感谢。

## 参考文献

- [1] 高福, 刘文军. 禽病学[M]. 第 9 版, 北京: 北京农业大学出版社, 1995, 245-260.
- [2] 朱国强, 王永坤, 孙龙生, 等. 鸡传染性支气管炎腺胃病变型毒株 H95 的研究[J]. 江苏农学院学报, 1996, 17: 55-59.
- [3] Binns M M, Bournsnel M E G, Tomley F M, et al. Comparison of the spike precursor sequences of coronavirus IBV strain M41 and 6/82 with that of IBV Beaudette[J]. J Gen Virol, 1986, 67: 2825-2831.
- [4] 王林川, 刘福安. 禽传染性支气管炎病毒免疫原基因 RT-PCR 研究. 中国兽医杂志, 1994, 20: 3-4.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A labora-

- tory manual(M). 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 368 - 383.
- [6] Kwon H M, Jackwood M W, Jr J G. Differentiation of infection bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis[J]. Avian Disease. 1993, 37:194 - 202.
- [7] 沈同, 王镜岩. 生物化学下册[M]. 第二版, 北京: 高等教育出版社, 1991, 346 - 412.
- [8] Von Heijne G. How signal sequences maintain cleavage specificity[J], J Mol Biol, 1984, 173:243 - 251.
- [9] Cavanagh D. Coronavirus IBV glycopolypeptides: size of their polypeptide oieties and nature of their oligosaccharides[J]. J Gen Virol, 1983, 64:1187 - 1191.

## 第四军医大学实验动物中心 SPF 实验部 向国内外上等级课题开放公告

第四军医大学实验动物中心是一个集繁育、科研、教学及成果转化为一体的在编单位。中心 SPF 饲养部可提供包括裸鼠、C<sub>57</sub>、BALB/c、昆明小鼠、Wistar、SD 大鼠等 20 个品系不同等级的实验动物, 其中裸鼠月供量为 500 只, 年供量 6000-8000 只。特设恒河猴、小香猪与毕格犬培育基地, 面向全国提供合格动物。本中心实验部向社会提供各种细胞瘤株、荷瘤鼠。转基因实验室里配置有转基因显微注射仪、细胞核移植融合仪专供克隆动物课题使用。本中心附设有细胞室、无菌动物实验室、水平层流实验室与 P<sub>3</sub> 级负压实验室, P<sub>3</sub> 级实验室专用于爱滋病或人兽共患烈性传染病病原的研究, 1-3 层共计 29 个独立单元, 一次性可供 100 多个课题同步开展工作, 实验结束后可出具本中心的正式(非复印件)实验报告和 SPF 动物等级证与设施合格证。曾承接包括英国曼彻斯特大学和法国在内的合作课题数十项。来自重庆、广州、合肥、贵阳、上海与北京等高等院校博士和博士后课题 30 多项正在实施, 本中心将以“三满意”、“五保证”为服务宗旨, 竭诚欢迎全国友邻科研院、校、所的科技人员使用本中心提供的上等级动物, 荷瘤鼠与瘤株细胞扩充专用转瓶机, 温室和实验室。

本中心细胞库可提供细胞株与荷瘤株如下:

肝瘤细胞株(HePG<sub>2</sub>; HCC-9724); 乳腺癌细胞株(SKBr-ZHL; ER-30; MCF-7); 胃癌细胞株(M、G、C); 骨髓瘤细胞株(SP<sub>20</sub>); 白血肿瘤细胞株(L<sub>1210</sub>); 皮肤黑色素瘤细胞株(A<sub>375</sub>); 腹水瘤细胞株(S<sub>180</sub>); 小鼠肝癌细胞株(H<sub>22</sub>); 大鼠肝癌细胞株(Walker; CBHR-7919); 绿猴肾细胞(vero)与恒河猴肾细胞株(MA-104); 犬肾细胞(MDck); 猪肾细胞株(LBKS); 猫肾细胞(F-81)。

饲养部联系电话:(029)3374787 联系人:姜春陵

实验部联系电话:(029)3374792 联系人:李杰

项目主持人:动物中心主任李六金 手机:13709180100

网址:<http://www.fmmu.sn.cn/web/anim>

E-mail:siyidashiyuanbu-6@163.com

传真:(029)2532045 邮编:710032

地址:西安市长乐西路第四军医大学实验动物中心