

鸡传染性支气管炎病毒 E 蛋白基因的表达^{*}

周玉长, 刘胜旺^{**}, 孔宪刚

(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, 黑龙江哈尔滨 150001)

Expression of Avian Infectious Bronchitis Virus E Protein in *E.coli*

ZHOU Yu-chang, LIU Sheng-wang, KONG Xian-gang

(National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Institute of Harbin Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Science, Harbin 150001, China)

Abstract : Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to amplify the Small Envelope (E) gene of avian *Infectious bronchitis virus* (IBV) LX4 strain and the gene was cloned into the pMD18-T vector. By digestion with restriction enzymes *Sal* and *Bam*H, the E gene was subcloned into pET-30a vector to construct recombinant plasmid pET-30a-E. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3) and induced with IPTG. It was demonstrated by SDS-PAGE that a protein of 14kDa, which was comparable in size to the native E protein, was expressed in *E. coli*. The 14KDa protein was purified and used to prepare the rabbit antiserum against IBV E protein. The result showed that the antibody could react with purified E protein in Western blotting.

Key words : *Infectious bronchitis virus* (IBV); Recombinant E Protein; Rabbit Antiserum

关键词: 传染性支气管炎病毒; 重组 E 蛋白; 兔抗 IBV E 蛋白多克隆血清

中图分类号: S831.7

文献标识码: A

文章编号: 1003-5153(2006)01-0078-03

鸡传染性支气管炎(Infectious Bronchitis, IB)是由传染性支气管炎病毒(*Infectious Bronchitis Virus*, IBV)引起的鸡的一种急性、高度接触性传染病。该病是危害全球养禽业的重要传染病之一^[1,2]。其感染的主要特征是气管啰音、咳嗽和打喷嚏。此外,该病还可以引起蛋鸡产蛋量下降和蛋品质下降。雏鸡可由于呼吸道或肾脏的感染而死亡。虽然疫苗的使用对 IB 的流行起到了一定的预防和控制作用,但由于 IBV 血清型众多,不同血清型毒株之间具有较小的交叉保护性甚至无交叉保护性。因此,IB 目前仍在免疫鸡群和非免疫鸡群发生和传播,给养禽业造成了严重的经济损失。

IBV 属于 Nido 病毒目(*Nidovirales*)冠状病毒科(*Coronaviridae*)冠状病毒属(*Coronavirus*)中第三群的成员^[3,4]。病毒基因组由单股不分节段的正链 RNA 组成,长约 27.6kb。含有 4 种结构蛋白,即

纤突(Spike, S)糖蛋白、核衣壳(Nucleocapsid, N)蛋白、膜(Membrane, M)糖蛋白和小膜(Small Envelope, E)糖蛋白^[5]。1985 年 Bournsnel 等人发现 IBV 基因组中存在 E 基因并且发现该基因是以 IBV 为代表的抗原群冠状病毒区别于抗原群冠状病毒的主要标志之一^[6]。对鼠肝炎病毒(Mouse hepatitis virus, MHV)、猪传染性胃肠炎(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)以及包括 SARS 冠状病毒在内的其它冠状病毒的 E 蛋白研究发现,其羧基端位于病毒粒子内部,氨基端朝病毒粒子外部且包埋在脂质双层中,跨膜一次^[7-12]。E 蛋白单独表达也可以诱导病毒样粒子的形成^[13]。MHV E 蛋白还可以使表达它的细胞发生凋亡^[14]。E 蛋白与 M 蛋白相互作用,形成冠状病毒样粒子^[15,16]。IBV E 蛋白的研究较少,部分研究发现 IBV E 蛋白也具有其他冠状病毒 E 蛋白的这些特征^[7,8]。然而到目前为止,IBV E 蛋白结

收稿日期: 2005-07-19, 修回日期: 2005-09-12

* 基金项目: 黑龙江省政府博士后科研启动金资助项目(LRB-KY01045)

作者简介: 周玉长(1977-), 男, 湖南新邵县籍, 硕士研究生, 主要从事动物病毒分子生物学和分子免疫学研究。

** 通讯作者: 刘胜旺(1969-), 男, 研究员, 主要从事病毒分子生物学和分子免疫学研究。

Corresponding author. Tel: 0451-85935065, E-mail: swliu@hvri.ac.cn

构和功能仍未明了,许多方面有待进一步研究。本研究克隆并表达了 IBV E 基因,以便进一步研究该蛋白的结构和功能。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

3.5 月龄的新西兰白兔和 10 日龄的 SPF 鸡胚由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。IBV 分离株 LX4 由本课题组分离鉴定和保存^[2]。pET-30a 表达载体、受体菌 TG1、BL21(DE3) 由本实验室保存。克隆载体 pMD18-T、ExTaq DNA 聚合酶、DNA Marker(DL2000, DL15,000)、*Sal*、*Bam*H, 均购自宝生物工程(大连)有限公司。鼠源反转录酶(M-MLV)RNasin、TRIzol RNA 提取试剂盒与 DNA 片段回收试剂盒均购自 Invitrogen 公司。上下游引物参照提交于 GenBank 中的 LX4 株序列(登录号:AY338732)设计,上游引物(ZEU) 5'-GGATCCATGCCGAATTTATTGAATAAATCG-3', 下游引物(ZEL) 5'-GTCGACTCAAGGGTGC AATTTGTCACG-3', 委托上海生工生物工程技术服务有限公司合成。抗兔 IgG 购自 Sigma 公司。

1.2 病毒的增殖与病毒 RNA 的提取

将 -70℃ 保存的 IBV LX4 病毒接种 10 日龄的 SPF 鸡胚, 37℃ 培养 72h 并连续传代 2 次, 无菌收集鸡胚的尿囊液(弃去 24h 内死亡的鸡胚)。取 300 μL 尿囊液加到 400 μL TRIzol 试剂中, 按 TRIzol 试剂盒说明的方法提取基因组 RNA^[2]。

1.3 LX4 病毒 E 基因的克隆和在大肠杆菌中表达及纯化确证性测序

应用 RT-PCR 按文献^[2]方法扩增 IBV LX4 E 蛋白基因并进行克隆。将含外源基因的阳性质粒委托上海生物工程有限公司对阳性重组质粒进行确证性测序。将测序正确的阳性重组质粒 pMD18-T-E 分别用 *Sal* 和 *Bam*H 酶切后, 克隆于表达载体 pET-30a 连接并转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中, 提取质粒, 用 PCR 以及 *Sal* 和 *Bam*H 进行酶切鉴定, 将阳性质粒命名为 pET-30a-E。将含 E 基因质粒的工程菌在 Kan^rLB 液体培养基中 37℃ 按文献进行振荡培养^[17]。将不同时间收集的菌样处理^[17]进行 SDS-PAGE, 并经薄层扫描测定表达的目的蛋白在细菌中的含量。以最佳诱导时间将含 E 基因质粒的工程菌进行大量(10mL)诱导培养, 培养完成后用 ProBondTM 纯化试剂盒按文献^[17]的方法进行蛋白的纯化, 取纯化过程中各阶段收集的产物进行 SDS-PAGE, 观察纯化结果。

1.4 抗 IBV LX4 重组 E 蛋白的多克隆血清的制备及鉴定

在纯化的重组 E 蛋白按文献^[17]的方法免疫 3.5 月龄的新西兰白兔三次。第三次免疫后 1 周, 心脏采血分离血清。将 SDS-PAGE 凝胶电泳的重组 E 蛋白带转移到硝酸纤维素膜, 以此血清为第一抗体, 进行 Western blotting, 检测重组 E 蛋白的抗原性。

2 结果

2.1 IBV-LX4 E 基因克隆及确证性测序

用 RT-PCR 扩增得到的 E 基因大小约为 330 bp。将此基因克隆到 pMD18-T 载体, 经 PCR 以及 *Sal* 和 *Bam*H 双酶切鉴定, 得到了重组质粒 pMD18-T-E。将该质粒进行测序, 结果表明 IBV LX4 E 蛋白基因与 GenBank 中的序列一致。

2.2 重组 IBV-LX4 E 基因表达载体的构建及在大肠杆菌中的表达

用 *Sal* 和 *Bam*H 分别酶切质粒 pMD18-T-E, 将其亚克隆于 pET-30a-E, 转化到大肠杆菌 BL21(DE3), 经 IPTG 诱导后, 通过 SDS-PAGE 发现, 有一条约 14kDa 的蛋白带, 与预期目的蛋白大小一致。诱导后 5 h 蛋白表达量最高, 经薄层扫描测得目的蛋白占细菌总蛋白量的 18.5% (见图 1)。

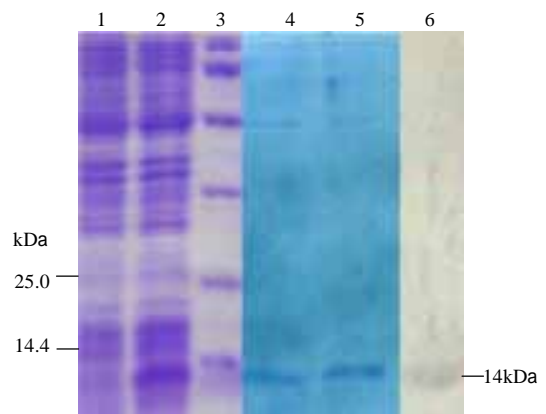


图 1 IBV LX4 E 蛋白在大肠杆菌中表达鉴定

Fig.1 SDS-PAGE and western blotting of IBV LX4 E protein 1, BL21(DE3) as negative control; 2, Total protein from BL21(DE3) induced for 5h; 3, Protein marker; 4 and 5, Recombinant IBV E protein purified with ProBondTM Resin; 6, Western blotting analysis of purified E protein with rabbit antiserum against IBV LX4 E protein.

2.3 重组蛋白的纯化和 Western blotting 鉴定

用 ProBondTM 纯化试剂盒纯化目的蛋白, 通过 SDS-PAGE 分析表明, 目的蛋白得到了纯化。用纯化的重组蛋白免疫兔制备的抗血清与重组蛋白进行 Western blotting, 能检测到重组蛋白(图 1), 表明表达的重组蛋白具有活性。

3 讨论

E 蛋白是冠状病毒的结构蛋白,其分子量小,在成熟的病毒粒子中含量低。在 MHV 和 IBV 基因组中^[6],E 蛋白的 ORF 分别位于双顺反子和三顺反子的最下游。1996 年,Vennema 等^[15]和 Bos 等^[16]报道,体外共表达 MHV E 蛋白和 M 蛋白可形成病毒样粒子。这一研究结果表明 E 蛋白在冠状病毒的装配中起重要作用。IBV 在中国的免疫鸡群和非免疫鸡群广泛流行^[2],因此与 E 蛋白相关的研究不但具有重要的理论意义,而且对于应用具有广泛的指导价值。本研究中用大肠杆菌原核表达系统体外表达了 IBV LX4 E 蛋白,通过 SDS-PAGE 电泳和薄层扫描分析,发现表达的重组蛋白占细菌总蛋白的 18.5%。在外源基因插入位点之前,融合表达载体上含有的核苷酸可编码约 4 kDa 的多肽分子,而 IBV E 蛋白的分子量约为 10 kDa^[5],因此表达分子量约为 14 kDa 的融合蛋白与预期结果一致。

冠状病毒的 E 蛋白为糖基化蛋白,但本研究选用的是大肠杆菌原核表达系统,因此在理论上,表达的重组蛋白未发生糖基化,可能影响重组蛋白的生物学功能。研究表明,IBV E 蛋白靠近氨基端有一个潜在的 N 相连糖基化位点,但 Corse 等人用 N-糖苷酶消化发现,这个预期的糖基化位点并未发生糖基化^[13]。可见,是否糖基化可能不影响 E 蛋白的功能。因此,本研究在大肠杆菌原核表达系统中表达的 IBV E 蛋白,对它的结构和功能的研究是可行的。能够反映天然蛋白的生物学活性。

IBV 是冠状病毒的代表毒株,抗鸡传染性支气管炎的疫苗是预防动物冠状病毒疾病中使用的最为成功也是最广泛的疫苗之一^[18]。尽管如此,由于 IBV 的高度变异性以及不同血清型毒株之间具有较小的或无交叉保护性,因此,IBV 仍然在世界范围内广泛流行。由于冠状病毒的 E 蛋白分子量小,结构较为简单,但该蛋白在病毒粒子的形成过程中起着至关重要的作用。因此,将 E 蛋白作为一个候选的靶位点^[19],进行疫苗或治疗药物的研制是确实可行的。本研究进行了 E 蛋白的表达和抗重组 E 蛋白多克隆血清的制备,为进一步研究该蛋白的结构和功能提供了材料。

References

[1] Cavanagh D, Naqi S (2003) Infectious bronchitis. In: Saif Y M, Barnes H J, Glisson J R, Fadly A M, McDougald L R, Swayne D E (eds) Diseases of Poultry, 11th edn. Iowa State University Press.

Ames, IA, pp 101-119.

[2] Liu S W, Kong X G. A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China [J]. Avian pathol, 2004, 33(3):321-327.

[3] Cavanagh D. *Nidovirales*: a new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae* [J]. Arch Virol, 1997, 42/3: 629-633.

[4] Cavanagh D. A nomenclature for avian coronavirus isolates and the question of species status [J]. Avian pathol, 2001, 30:109-115.

[5] Boursnell M E, Brown T D, Foulds I J, et al. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus [J]. J Gen Virol. 1987, 68 (1): 57-77.

[6] Boursnell M E, Binns M M, Brown T D. Sequencing of coronavirus IBV genomic RNA: three open reading frames in the 5' 'unique' region of mRNA D [J]. J Gen Virol. 1985, 66 (10): 2253- 2258.

[7] Lontok E, Corse E, Machamer C E. Intracellular targeting signals contribute to localization of coronavirus spike proteins near the virus assembly site [J]. J Virol, 2004, 78(11):5913-5922.

[8] Kuo L and Masters P S. The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication [J]. J Virol, 2003, 77(8): 4597-4608.

[9] Xu S, Xue J H, Yu C Y, et al. Small envelope protein E of SARS: cloning, expression, purification, CD determination, and bioinformatics analysis [J]. Acta Pharmacol Sin 2003, 24(6): 505-511.

[10] Liu D X, Cavanagh D, Green P, et al. A polycistronic mRNA specified by the coronavirus infectious bronchitis virus [J]. Virology, 1991, 184:531-544.

[11] Yu X, Bi W Z, Weiss S R, et al. Mouse hepatitis virus gene 5b protein is a new virion envelope protein [J]. Virology, 1994, 202: 1018-1023.

[12] Raamsman M J B, Locker J k, Hooge A D, et al. Characterization of the coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 small membrane protein E [J]. J Virol, 2000, 74(5): 2333-2342.

[13] Corse E, Machamer C E. Infectious bronchitis virus E protein is targeted to the Golgi complex and directs release of virus-like particles [J]. J Virol, 2000, 74(9): 4319-4326.

[14] An S W H, Chen C J, Yu X, et al. Induction of apoptosis in murine coronavirus-infected cultured cells and demonstration of E protein as an apoptosis inducer [J]. J Virol, 1999, 73(9):7853-7859.

[15] Vennema H, Godeke G J, Rossen J W, et al. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes [J]. EMBO J. 1996 Apr 15; 15(8): 2020-2028.

[16] Corse E, Machamer C E. The cytoplasmic tails of infectious bronchitis virus E and M proteins mediate their interaction [J]. Virology, 2003, 312:25-34.

[17] Du E Q, Liu S W, Kong X G, (杜恩岐, 刘胜旺, 孔宪刚) et al. Expression and antigenicity of avian infectious bronchitis virus nucleocapsid protein gene in *E. coli*. [J]. Chin J Virol (病毒学报), 2003, 19 : 342-347.

[18] Cavanagh D. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus [J]. Avian pathol, 2003, 32(6):567-582.

[19] Liu D X, Inglis S G. Association of the infectious bronchitis virus 3C protein with the virion Envelope [J]. Virology, 1991, 185: 911- 917.