

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.17.011

不同致病型的三株 IBV 与 chAPN 体外结合能力的比较 *

刘澜澜¹ 明晓波² 徐放¹ 王亚贤¹ 魏萍^{2△}

(1 黑龙江中医药大学基础医学院 黑龙江 哈尔滨 150040; 2 东北农业大学动物医学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要 目的:比较不同致病型鸡传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus, IBV) IBV 与鸡氨肽酶 N 体外结合能力的差异。**方法:**将已构建的 pET-32a-chAPN 转入大肠杆菌 BL21 中进行诱导表达, SDS-PAGE 分析表达结果。表达的 His-chAPN 纯化后进行 western-blotting 验证, 应用酶促反应检测其活性。以不同稀释度的纯化 chAPN 包被 ELISA 板, 加入经过荧光定量 PCR 方法定量的含有相同数量病毒粒子的三株不同致病型 IBV(呼吸型 M41、肾型 S-03 和腺胃型 A2-2), 测定三株与 chAPN 的结合能力。**结果:**pET-32a-chAPN 在受体菌内成功表达, 主要以包涵体的形式存在。经纯化复性的重组 His-chAPN, Western blotting 分析显示其具有良好的抗原性, 酶促反应显示该重组 His-chAPN 与天然的具有良好的生物活性。ELISA 结果显示 chAPN 与三株 IBV 均能结合, 其结合能力为 A2-2>S-03>M41, 并表现为剂量依赖性。**结论:**不同致病型 IBV 与 chAPN 的体外结合力有一定差异。

关键词:致病型; IBV; chAPN; 结合能力

中图分类号: Q95-3; S858.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)17-3243-04

Comparison of the Binding Capacity on three Pathotype IBV Strains with Chicken Aminopeptidase N in vitro*

LIU Lan-lan¹, MING Xiao-bo², XU Fang¹, WANG Ya-xian¹, WEI Ping^{2△}

(1 College of Basic Medical Science, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, 150040, China;

2 College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang, 150030, China)

ABSTRACT Objective: To compare the binding capacity on different pathotype infectious bronchitis virus (IBV) strains with cellular protein chicken Aminopeptidase N (chAPN) in vitro. **Methods:** The pET-32a-chAPN was converted into *E.coli* BL21 cells to induce expression. SDS-PAGE analysis were used to examine the fusion protein. The purified His-chAPN was detected by Western blotting and its activity was determined by enzymatic reaction. ELISA plates were coated by the different dilution His-chAPN, and the equivalent amount of three different pathotype IBV strains (respiratory type IBV strain M41, nephropathogenic IBV strain S-03 and proventriculitis type IBV strain A2-2) quantified by Q-PCR were added into the wells, determined the difference among the binding capacity on three different pathotype IBV strains and chAPN in vitro. **Results:** It showed that the recombinant pET-32a-chAPN was expressed successfully in an inclusion body form. The purified His-chAPN had expected antigenicity tested by western blotting analysis and had enzymatic activity which was similar to the natural chAPN. ELISA data demonstrated the His-chAPN was able to bind three IBV strains dose-dependently, A2-2>S-03>M41. **Conclusions:** The binding capacity on different pathotype IBV strains with chAPN in vitro was different to a certain extent.

Key words: Pathotype; IBV; ChAPN; Binding capacity

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; S858.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)17-3243-04

前言

鸡传染性支气管炎病毒 (Infectious bronchitis virus, IBV) 1931 年以来首次报道以来, 已经成为危害世界养殖业的重要病原之一。IBV 血清型众多, 且持续变异, 不同血清型的 IBV 毒株间的交叉保护效果不理想^[1], 免疫失败的现象时有发生; 同时, IBV 的组织嗜性也不断变化, 由最初发现的亲呼吸系统和泌尿系统逐步扩展到对消化系统、生殖系统以及肌肉组织的亲

嗜性, 目前已有呼吸型^[2]、肾型^[3]、腺胃型^[4]、肠型^[5]、793B 型^[6]以及多型混合的 IBV 毒株, 致病性越来越复杂。

氨肽酶 N 也叫 CD13, 是一种 II 型金属蛋白酶, 在机体内分布广泛^[7]。多种 I 型冠状病毒以氨肽酶 N 为受体^[8,9], 包括人冠状病毒 229E、猪传染性胃肠炎病毒、猫传染性腹膜炎病毒、犬冠状病毒等。作为冠状病毒第三群的代表病毒, IBV 是否以鸡氨肽酶 N (chicken aminopeptidase N, chAPN) 为受体呢? 学者 Miguel 等^[10]发现将猫氨肽酶 N (feline aminopeptidase N, fAPN)

* 基金项目: 黑龙江中医药大学校科研基金(BS201402); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(2003fz012)

作者简介: 刘澜澜 (1982-), 女, 博士, 讲师, 主要研究方向: 微生物学与免疫学, E-mail: lanlan0112@126.com

△ 通讯作者: 魏萍, 教授, 博士, E-mail: weiping@yahoo.com.cn

(收稿日期: 2015-01-13 接受日期: 2015-02-05)

fAPN 转染至 BHK-21 细胞后,细胞从对 IBVArk-99 株非易感状态转变为易感状态,似乎表明 fAPN 能够作为 IBV 的受体。然而,Chu 等^[11]发现 fAPN 的表达并不能有效改变 IBV 多种毒株对 BHK-21 细胞的易感性。明晓波等^[12]克隆鸡 APN 全基因并构建真核表达质粒,转染至 IBV 非敏感细胞,使细胞获得了对 IBV 的易感性,这两个几近相同的实验结果均表明 chAPN 为 IBV 的受体。

本研究拟测定不同致病型的三株 IBV(呼吸型、肾型和腺胃型)与表达纯化的 chAPN 的体外结合能力,旨在分析不同致病型 IBV 之间的差异,探究 IBV 多组织嗜性可能的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体菌株、毒株和实验动物 pET-32a-chAPN、pMD18T-IBV-N 由本实验室构建并保存,感受态 *E.coli* BL21 受体菌购于美国 Invitrogen 公司。IBV M41 株(呼吸型)由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供。IBV S-03 株(肾型)和 IBV A2-2 株(腺胃型)由东北农业大学动物医学院动物传染病实验室分离鉴定并保存。新西兰大白兔购自黑龙江中医药大学实验动物中心。

1.1.2 试剂 荧光定量试剂盒 One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit II 购于宝生物工程(大连)公司。His-Tag 纯化试剂盒、抗 His 标签单抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 和辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 chAPN 的原核表达、纯化和 western blotting 鉴定 将阳性表达重组质粒 pET-32a-chAPN 转化至感受态细胞 *E.coli* BL21,随机挑取 Amp 抗性的单菌落,接种于含 Amp 的 LB 液体培养基中,37℃ 振荡培养过夜,取该培养物按 1:50 的比例加入到 LB 液体培养基中,37℃ 剧烈振荡至 OD₆₀₀ 为 0.4-0.6 时,加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达,5 h 后收集菌体。菌体经超声破碎后离心,分别收集沉淀和上清,然后进行 SDS-PAGE 检测。按照 His-Tag 纯化试剂盒说明书,利用 Ni²⁺ 树脂柱对原核表达的 chAPN 进行纯化。如目的蛋白主要以包涵体形式表达,则用盐酸胍溶解蛋白,采用透析的方法进行蛋白的复性。取纯化后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 检测,将凝胶中的蛋白带转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉配制的封闭液中,4℃ 封闭过夜。一抗使用抗 His 标签鼠单克隆抗体、二抗为 HRP-羊抗鼠 IgG,进行 Western blotting 检测,使用 DAB 显色试剂盒进行显色。

1.2.2 His-chAPN 的活性测定 参照 Blackmon 等的方法^[13],将纯化的 His-chAPN 蛋白比稀释(1:20 至 1:320)后各取 0.5 mL,均加入 1 mL Tris-NaCl Buffer,0.05 mL leu-PNA,将反应体系置于 37℃ 水浴 1 小时,最后加入 0.1 mL Na₂CO₃(0.4 mol/L)终止反应;同时取等量等浓度蛋白加入 1 mL Tris-NaCl Buffer,0.05 mL leu-PNA,0.1 mL Na₂CO₃(0.4 mol/L)作为标准液进行结果判定,并以空质粒菌体蛋白做对照,以标准管调节吸光度值为 0,在 410 nm 波长下测定各管的吸光度值(OD),测定三次取平均值。

1.2.3 三株 IBV 及 chAPN 多克隆抗体的制备 将三株 IBV

病毒的尿囊液分别 37℃/-20℃ 反复冻融三次,4000 r/min 离心 30 分钟,取上清,进行 30-60%蔗糖密度梯度离心,收集病毒条带。透析去除蔗糖,PEG6000 浓缩后,-20℃ 保存备用。将纯化的 IBV M41、IBV S-03、IBV A2-2 和 His-chAPN 蛋白分别皮下接种新西兰大白兔,分四次免疫,每次间隔 2 周。最后一次免疫 10 天后收集血清,ELISA 检测中和抗体效价,并与 AIV(H9N2)、NDV 和 IBDV 反应,检测中和抗体的特异性。

1.2.4 三株 IBV 病毒液的定量 以 pMD18T-IBV-N 为标准品进行荧光定量 PCR 建立定量 IBV 的标准曲线。分别提取 IBV M41、IBV S-03 和 IBV A2-2 病毒液的总 RNA,应用宝生物工程公司的 One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit II 进行荧光定量 RT-PCR,依据建立定量 IBV 的标准曲线测定三株 IBV 单位体积内的病毒拷贝数,根据数据结果将其液稀释到含有相等的病毒粒子浓度。

1.2.5 ELISA 检测三株 IBV 与 chAPN 体外结合能力 把纯化的 His-chAPN 融合蛋白分别稀释 50 倍、100 倍、200 倍,包被 96 孔酶标板 37℃ 温育 1 h,同时设包被液的空白对照。洗涤三次拍干后用封闭液于 37℃ 封闭 1 h,洗涤三次拍干后分别加入适量且等量的三株 IBV 病毒液于 37℃ 孵育 2 h,同时设病毒液的空白对照。洗涤后加入相应的兔抗 IBV 血清 37℃ 孵育 1 h,同时设阴性血清对照。洗涤后加入 HRP 标记羊抗兔 IgG(1:8000),于 37℃ 孵育 1 h。洗涤后加入 TMB 避光显色 5 min,2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,于 450 nm 波长下读取吸光度值(OD)。

2 结果

2.1 chAPN 的原核表达、纯化和 western blotting 鉴定

SDS-PAGE 分析显示,沉淀和上清样品中均出现了 1 条大小约为 110 kD 特异的蛋白质条带,与预期结果一致(图 1a),而空载体、空菌对照中并无此条带,说明重组质粒在受体菌中得到了成功表达,包括包涵体表达及可溶性表达两种形式,其中包涵体表达量很高。因此在使用 Ni²⁺ 树脂柱纯化目的蛋白后,我们采用透析的方法对包涵体进行了复性。western blotting(图

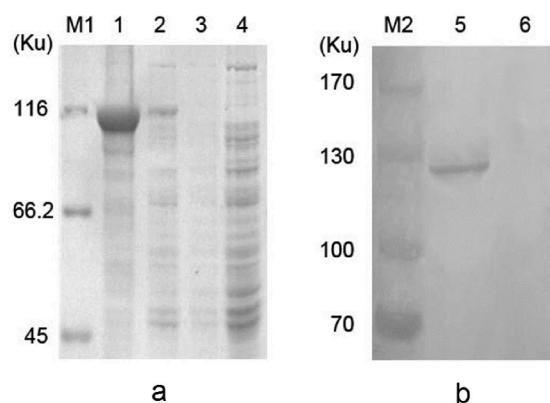


图 1 chAPN 原核表达 SDS-PAGE 分析和 Western blotting 检测
M1、M2:蛋白质分子量;1:重组质粒菌体沉淀;2:重组质粒菌体上清;
3:空质粒菌体;4:空菌;5:重组质粒菌体沉淀;6:空质粒菌体
Fig. 1 SDS-PAGE analysis and western blotting analysis of recombinant expression protein chAPN

M1, M2: Protein Molecular Weight Marker; 1: BL-21 with pET-32a-chAPN(sediment); 2: BL-21 with pET-32a-chAPN (supernatant); 3: BL-21 with empty pET-32a; 4: BL-21; 5: BL-21 with pET-32a-chAPN; 6: BL-21 with empty pET-32a

1b)分析表明融合蛋白能与 His 标签鼠单克隆抗体发生特异免疫反应,具有良好的抗原性。

2.2 His-chAPN 的活性测定

氨肽酶 N 可特异性作用于 leu-PNA 底物,释放出黄色的

对硝基苯胺,在 410 nm 下有最大吸光度的特性。分光光度计测定显示,随着 His-chAPN 浓度梯度性的变化,吸光度也呈现梯度性变化,结果表明,融合蛋白 His-chAPN 具有良好的酶活性。

表 1 His-chAPN 的活性测定
Table 1 Examination of His-chAPN activity

Dilution multiple	× 20	× 40	× 80	× 160	× 320
chAPN	0.147	0.1128	0.0799	0.042	0.0264
BL-21 with empty pET-32	0.0532	0.0497	0.0379	0.0203	0.0119

2.3 ELISA 检测三株 IBV 与 chAPN 体外结合能力

结果表明表达纯化后的 chAPN 与 IBV 均具有较好的结合能力,并随着稀释浓度的不同而呈线性变化。经生物统计软件

SSPS13 分析数据,三株 IBV 病毒与 chAPN 的体外结合力有明显差异($P<0.05$)差异, A2-2>S-03>M41,见表 2。

表 2 三株 IBV 与 chAPN 体外结合能力的比较
Table 2 Comparison of binding capacity on three IBV isolates with chAPN in vitro

Dilution multiple of chAPN	× 50	× 100	× 200
IBV M41+Rabbit serum anti-M41	0.151± 0.05	0.132± 0.04	0.117± 0.06
IBV S-03+Rabbit serum anti-S-03	0.216± 0.07	0.202± 0.04	0.191± 0.04
IBV A2-2+Rabbit serum anti-A2-2	0.320± 0.05	0.303± 0.04	0.256± 0.07
IBV M41+Rabbit negtive serum	0.071± 0.05	0.071± 0.06	0.070± 0.04
IBV S-03+Rabbit negtive serum	0.072± 0.02	0.067± 0.02	0.068± 0.04
IBV A2-2+Rabbit negtive serum	0.071± 0.05	0.067± 0.05	0.068± 0.02
PBS +Rabbit serum anti-M41	0.114± 0.03	0.113± 0.04	0.103± 0.04
PBS +Rabbit serum anti-S-03	0.132± 0.03	0.125± 0.05	0.108± 0.06
PBS +Rabbit serum anti-A2-2	0.148± 0.04	0.134± 0.02	0.119± 0.03
No chAPN coated +IBV M41		0.117± 0.03	
No chAPN coated+IBV S-03		0.100± 0.03	
No chAPN coated+IBV A2-2		0.115± 0.02	

3 讨论

多组织亲嗜性一直是 IBV 的一个研究热点。在高密度免疫的背景下,疫苗株和 IBV 野毒能够通过基因重组等方式产生新的变异株^[14-16],若变异株能够长期存在,就将影响 IBV 组织嗜性的变异。病毒的组织亲嗜性变化不仅与病毒自身的变异有关,还和病毒的受体密切相关^[17],特别是病毒与受体间的相互作用。IBV 病毒自身的变异与其组织亲嗜性变化固然存有关联。然而病毒的组织亲嗜性与病毒的受体也密切相关^[17],特别是病毒与受体间的相互作用。由于受体蛋白在不同组织中的表达、分布特点存在差异^[18],因此对于 IBV 这种组织嗜性多样化的病毒来说,病毒与受体的结合能力可能直接影响 IBV 对于不同组织细胞的亲嗜性。目前国内尚无此方面的报道,本研究则以此为切入点以期能够为阐释 IBV 受体与其组织嗜性之间的关系提供一些参考。

本实验选择使用 chAPN 的原核表达产物,是因为目前尚无商品化的 chAPN 蛋白,其提取工艺又十分复杂。但从融合蛋白 His-chAPN 对底物 leu-PNA 的分解能力来看,该融合蛋白具

有良好的酶活性,这说明本实验所表达 His-chAPN 蛋白与鸡体内的天然 chAPN 在功能具有较高的相似性,能保证实验结果的准确性。

从 ELISA 实验结果可以看出,三株 IBV 与 chAPN 在体外均有结合能力,而该结合力与抗原和抗体之间的结合存在本质区别;有研究表明受体蛋白的键合类型、糖链的结构及其拓扑结构^[19,21]均对病毒与细胞的结合有影响,故病毒与受体的结合力低于抗原与抗体的结合力。本实验中三株 IBV 与 chAPN 的结合力表现为 A2-2>S-03>M41,这说明不同的 IBV 毒株与受体 chAPN 的结合力的确存在差异;又由于三株 IBV 分别来自不同的致病型,这提示 IBV 的多组织嗜性和这种结合力可能存在某种关联性。但是不能确定 IBV 与 chAPN 之间的结合力是否就是腺胃型 IBV> 肾型 IBV> 呼吸性 IBV。腺胃型 IBV 与 chAPN 的结合力> 肾型 IBV> 呼吸性 IBV? 这需要更大的样本数量,即本研究结果中所体现的不同致病型 IBV 与受体 chAPN 结合力差异的趋势是否具有普遍性还需要进一步论证,在后续的研究当中将选取更多致病型明确的 IBV 分离株进行研究,以期发现 IBV 与 chAPN 结合力与病毒组织嗜性之间的

一些规律。

4 结论

本研究以原核表达纯化的 chAPN 包被 ELISA 板,加入含有相同数量病毒粒子的三株不同致病型 IBV (呼吸型 M41、肾型 S-03 和腺胃型 A2-2),测定三株 IBV 与 chAPN 的结合能力。结果三株 IBV 均能 chAPN 结合,结果表明三株 IBV 均能与 chAPN 结合,其结合能力为 A2-2>S-03>M41。提示不同致病型的 IBV 与 chAPN 的结合能力之间存在差异。

参考文献(References)

- [1] Roh HJ, Hilt DA, Williams SM, et al. Evaluation of infectious bronchitis virus Arkansas-type vaccine failure in commercial broilers [J]. Avian Dis, 2013, 57(2): 248-259
- [2] Schalk AF, Hawn MC. An apparently new respiratory disease of baby chicks[J]. J Am Vet Med Assoc, 1931, 78: 413-422
- [3] França M, Woolcock PR, Yu M, et al. Nephritis associated with infectious bronchitis virus Cal99 variant in game chickens [J]. Avian Dis, 2011, 55(3): 422-428
- [4] Ambali AG. Recent studies on the enterotropic strain of avian infectious bronchitis virus[J]. Vet Res Commun, 1992, 16(2): 153-157
- [5] Abro SH, Renström LH, Ullman K, et al. Characterization and analysis of the full-length genome of a strain of the European QX-like genotype of infectious bronchitis virus [J]. Arch Virol, 2012, 157(6): 1211-1215
- [6] Gough RE, Randall CJ, Dagless M, et al. A new strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain [J]. Veterina Record, 1992, 130(22): 493-494
- [7] Chen L, Lin YL, Peng G, et al. Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(44): 17966-17971
- [8] Masters PS. The molecular biology of coronaviruses[J]. Adv Virus Res, 2006, 66: 193-292
- [9] Bosch BJ, Smits SL, Haagmans BL. Membrane ectopeptidases targeted by human coronaviruses [J]. Curr Opin Virol, 2014, 6C: 55-60
- [10] Miguel B, Pharr GT, Wang C, et al. The role of feline aminopeptidase N as a receptor for infectious bronchitis virus [J]. Arch. Virol, 2002, 147(11): 2047-2056
- [11] Chu VC, McElroy LJ, Aronson JM, et al. Feline aminopeptidase N is not a functional receptor for avian infectious bronchitis virus[J]. Virol J, 2007, 4: 20-29
- [12] 明晓波,张颖,刘澜澜,等.鸡氨肽酶 N 基因转染 BHK-21 细胞后 IBV 感染情况的改变[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(6): 793-797
Ming Xiao-bo, Zhang Ying, Liu Lan-lan, et al. IBV infection difference before and after the chicken aminopeptidase N gene transfected the BHK-21 cell [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2010, 30(6): 793-797
- [13] Blackmon DL, Watson AJ, Montrose MH. Assay of apical membrane enzymes based on fluorogenic substrates[J]. Anal Biochem, 1992, 200 (2): 352-358
- [14] Song JE, Jeong WG, Sung HW, et al. Sequencing, phylogenetic analysis, and potential recombination events of infectious bronchitis viruses isolated in Korea[J]. Virus Genes, 2013, 46(2): 371-374
- [15] Liu X, Ma H, Xu Q, et al. Characterization of a recombinant coronavirus infectious bronchitis virus with distinct S1 subunits of spike and nucleocapsid genes and a 3' untranslated region [J]. Vet Microbiol, 2013, 162(2-4): 429-436
- [16] Zhang Y, Wang HN, Wang T, et al. Complete genome sequence and recombination analysis of infectious bronchitis virus attenuate-dvaccine strain H120[J]. Virus Genes, 2010, 41(3): 377-388
- [17] Graham RL, Donaldson EF, Baric RS. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses [J]. Nat Rev Microbiol, 2013, 11(12): 836-848
- [18] Schneider-Schaulies J. Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis [J]. Journal of General Virology, 2000, 81 (Pt 6): 1413-1429
- [19] Gambaryan A, Yamnikova S, Lvov D, et al. Receptor specificity of influenza viruses from birds and mammals: new data on involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain [J]. Virology, 2005, 334(2): 276-283
- [20] Chandrasekaran A, Srinivasan A, Raman R, et al. Glycantopology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin[J]. Nature Biotechnology, 2008, 26(1): 107-113
- [21] Tharakaraman K, Raman R, Viswanathan K, et al. Structural determinants for naturally evolving H5N1 hemagglutinin to switch its receptor specificity[J]. Cell, 2013, 153(7): 1475-1485