

# IBV 核蛋白的表达纯化及在监测中应用

李中华<sup>1\*</sup> 肖运才<sup>2</sup> 毕丁仁<sup>2</sup> 胡思顺<sup>2</sup> 吴仁蔚<sup>2</sup>

(1 福建省动物疫病预防控制中心 福州 350003 2 华中农业大学动物医学院 武汉 430070)

**摘要** 鸡传染性支气管炎病毒(*Infectious bronchitis virus*, IBV)是禽类一种变异性很强的冠状病毒,为获得高度纯化的 IBV 核蛋白,建立监测 IBV 抗体的方法,通过 RT-PCR 从 IBV 中扩增 IBV-N 基因,定向连接到表达载体 pGEX-KG 中,转化 *E. coli* BL21(DE3)菌株,诱导获得表达产物,SDS-PAGE 分析产物大小、Western blot 分析其免疫学活性,通过亲和层析法获得高度纯化的表达蛋白,建立一种检测 IBV 抗体的方法,并应用于临床监测。结果显示,IBV-N 基因全长 1230bp, GST 融合蛋白表达产物大小约为 80kDa,表达量约占菌体总蛋白的 25%,具有良好的免疫学活性;通过 GST 亲和层析柱成功获得纯化蛋白,以该蛋白包被酶标板,成功地建立了一种检测血清中 IBV 抗体的间接 ELISA 方法。研究表明重组 N 蛋白作为 IBV 诊断抗原,具有制备简便、特异性强、敏感性高、重复性好的特点,可用于该病的临床监测,为该病疫情监测、发病机制研究奠定了基础。

**关键词** 传染性支气管炎病毒 核蛋白 原核表达 ELISA

**中图分类号** S855.3

鸡传染性支气管炎(*Infectious bronchitis*, IB)是鸡的一种急性、高度接触性传染病,呈世界分布,是严重危害养鸡业的重大传染病之一<sup>[1]</sup>。该病由鸡传染性支气管炎病毒(*Infectious bronchitis virus*, IBV)引起, IBV 属于冠状病毒科冠状病毒属的一种单股正链 RNA 病毒<sup>[2]</sup>,纤突蛋白(S 蛋白)是其结构蛋白中最主要的中和性抗原<sup>[3]</sup>,但由于变异性强、抗原性结构复杂、体外表达困难等原因<sup>[4]</sup>,限制了其应用;核蛋白(N 蛋白)是 IBV 最为保守的抗原,不仅与病毒的复制与转录有关<sup>[5,6]</sup>,而且具有很强的免疫原性,因此适合作为一种良好的群特异性抗原<sup>[7]</sup>。该病原现已有 30 种血清型报道,新的血清型和变异株仍在不断出现,各种血清型之间交叉保护性差<sup>[3]</sup>,鉴于此,有必要获得一种广谱性抗原,建立检测 IBV 的方法,监测群体的抗体水平,为预防和控制该病提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 病毒、菌株及质粒 毒株传染性支气管炎病毒

H<sub>52</sub>株,宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* BL21(DE3),质粒 pGEX-KG 均由本实验室保存。

1.1.2 酶与试剂 *M-MLV* 逆转录酶为 Promega 公司提供;限制性内切酶、ExTaq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、dNTP Mix、分子量标准均为 TaKaRa 公司产品;磁珠 DNA 胶回收试剂盒为 TOYOKA 公司生产;HRP 标记的羊抗鸡 IgG 购自 SAB 公司。鸡的各种阳性血清由中国药监所提供,其它均为进口或国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

1.2.1 病毒繁殖、纯化及 RNA 抽提 IBV H<sub>52</sub>毒株经尿囊腔接种 10d SPF 鸡胚增殖后,用 PEG20000 透析浓缩,经 SDS-PRO K 方法抽提 RNA,直接进入逆转录体系。

1.2.2 RT-PCR 和 cDNA 克隆 参照报道 IBV Beaudete 株 N 基因序列设计一对引物<sup>[8]</sup>:引物 P1:5' GGA TCC ATG GCA AGC GGT AAA GCAG 3',对应于 N 基因 ORF 的 1~19 位,含 *Bam*H I 位点和 ATG 起始密码子;引物 P2:5' CC GAG CTC TCA AAG TTC ATT CTC TCC 3',对应于 N 基因 ORF 的 1211~1230 位,含 *Sac* I 位点和终止密码子。引物由北京奥科生物公司合成,使用前稀释成终浓度 20mmol/L。

收稿日期:2014-03-11 修回日期:2014-03-24

\* 电子信箱:imagin169@163.com

RT-PCR 以 10 $\mu$ l 病毒 RNA 为模板,按 Promega 公司 cDNA 合成说明书合成 cDNA 第一链,再以 cDNA 第一链为模板,PCR 扩增整个基因,反应条件为 94  $^{\circ}$ C 30s, 50 $^{\circ}$ C 45s, 72  $^{\circ}$ C 1min 30s, 35 个循环后 72  $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物经鉴定后按试剂盒操作方法克隆到 pMD18-T 载体中,构建 pT-NP 质粒,并转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  克隆并用于测序。

1.2.3 序列测定及分析 重组质粒经北京奥科生物技术公司测序,然后将序列测定结果与 GeneBank 中的有关数据进行同源性分析。

1.2.4 重组表达载体的构建 将 pT-NP 和 pGEX-KG 分别用 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切,回收 1.2kb 左右的 N 基因片段与用相同的酶消化的 pGEX-KG 片段,T4 连接酶在 16  $^{\circ}$ C 定向连接构建 GST 融合表达载体 pGEX-NP。重组表达载体转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,用含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板进行筛选培养,并对阳性进行 PCR 及酶切分析鉴定。

1.2.5 转化菌的诱导表达及表达产物的检测纯化 将鉴定正确的重组质粒分别转入宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 进行筛选诱导表达,转化菌的表达产物的提取按 pGEX 表达系统操作手册进行。表达产物的 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 分析按参考文献[9]进行,目的蛋白的纯化按 Hi-Trap GST 纯化柱的操作说明进行。

1.2.6 间接 ELISA 方法的建立 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 最佳反应条件的选择:通过方阵滴定方法,确定抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度。抗原从 1:20 稀释到 1:640,血清从 1:10 稀释到 1:320,按其稀释度分别加到酶标板的 1 至 6 行和 1 至 6 列,阴性血清按阳性血清同样的稀释度加到第 7 至 12 列,按间接 ELISA 方法进行操作,测定  $OD_{450}$  值,计算阳性  $OD$  值比阴性  $OD$  值 ( $P/N$  值),结果最大的孔所对应的抗原包被浓度和血清稀释度,判为最佳抗原包被浓度和血清稀释度。

结果判定标准的确定:将临床未经免疫的 144 份鸡血清,进行 ELISA 检测,计算平均值  $\bar{x}$ ,标准差  $s$ ,阴阳界限值按计算公式: $\bar{x} + 3s$  确定。

重复性试验:用相同批次、不同批次的酶标板,对抗体水平不同的 6 份血清样品进行批内、批间重复性测定,参照参考文献[10]计算批内、批间的吸收变异系数。

交叉性试验:分别检 AIV、NDV、IBDV、EDS76 等禽常见病毒的标准阳性血清,同时设阳性血清、阴性血清和空白对照。

阻断试验:将 IBV H52 阳性的鸡胚尿囊液与等体积 IBV 阳性血清混合,37 $^{\circ}$ C 作用 45min,作倍比稀释,ELISA 检测,同时设不做任何处理的正常尿囊液和阳性血清混合物作为对照。

诊断特异性、敏感性与符合率试验:选用国内外公认的检测方法,即血凝抑制试验 (HI) 作为参照试验方法,与本研究建立的 ELISA 诊断方法相比较,确定该 ELISA 诊断方法的诊断特异性、敏感性与符合率。血凝抑制试验 (HI) 按 OIE 手册中方法进行<sup>[11]</sup>。

间接 ELISA 的应用:用建立的 ELISA 方法检测江夏、新洲、黄陂等地区临床送检的 400 份血清。

## 2 结果

### 2.1 N 基因的克隆

RT-PCR 产物电泳显示,目的片段在 1.2kb 左右,将目的基因回收后连到 pMD18-T 载体转入 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,提取质粒,用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切切出 1.2kb、2.7kb 左右的两条带,用 *Bam*H I 单酶切仅一条 (图 1),这说明所挑选的克隆产物为目的基因正向插入质粒,其大小与预期一致。通过测序,测得 N 基因序列长度为 1230bp,编码 409 个氨基酸,涵盖了从 ATG 至 TGA 一个完整的阅读框。通过 NCBI BLAST 方法进行分析,该基因与 LKQ3 (H<sub>52</sub>) 毒株同源性最高,为 97%,以上表明扩增片段为目的基因。

### 2.2 表达载体构建及鉴定

将 pGEX-NP 质粒转化的细菌经培养,挑取单个菌落培养用于小量制备质粒 DNA,并通过酶切、PCR 筛选正确插入目的基因的重组质粒。结果显示,*Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切产物电泳后可见清晰的 1.2kb 和 4.9kb 的 2 条带;经 *Bam*H I 单酶切消化,电泳后可见一条大小约 6.1kb DNA 带 (图 2)。这说明我们获得了正确插入目的基因的阳性克隆。

### 2.3 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

SDS-PAGE 电泳结果显示:含 pGEX-KG 的 *E. coli* BL21 的对照在约 26kDa 有明显的表达带,相当于 GST 蛋白的大小,含重组质粒 pGEX-NP 的大肠杆菌在约 80kDa 处有明显的表达带,相当于 N 蛋白与 GST 蛋白融合表达的产物,结果表明目的基因在重组菌中获得了表达;经扫描分析,在 IPTG 诱导 3h 左右的细菌中,该蛋白表达量占总蛋白量的 25%,达到最高 (图 3)。Western blot 分析表明:重组表达的 80kDa 蛋白带,能与 IBV 的标准阳性血清发生特异性的免疫反应,证实表达

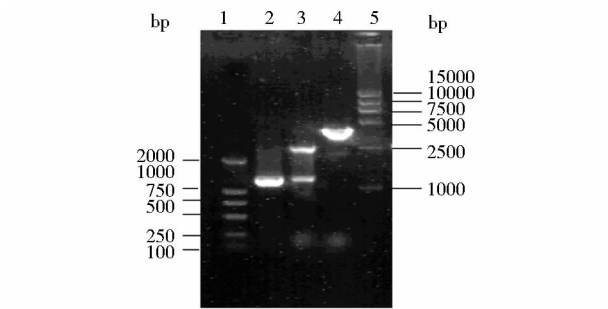


图 1 重组质粒 (pT-NP) 的酶切鉴定

**Fig.1 Identification of recombinant plasmid (pT-NP) digested with *Bam*H I and *Sca* I**

1:DL2000 Marker; 2:PCR product; 3:pT-NP/*Bam*HI;4: pT-NP/*Sac* I; 5: DL15000 Marker

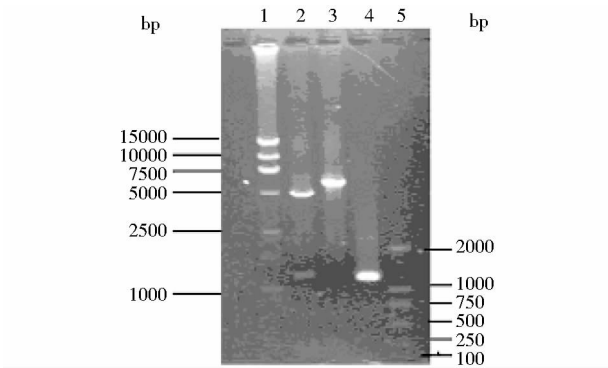


图 2 重组表达质粒 pGEX-NP 的酶切结果

**Fig.2 Identification of recombinant expression plasmid (pGEX-NP)**

1:DL15000 marker;2: pGEX-NP/*Bam*H I and *Sac* I ;3:pGEX-NP/*Bam*HI; 4:PCR product;5:DL2000 marker

产物具有很好的免疫学活性(图 3)。

2.4 NP-ELISA 的建立与应用

2.4.1 NP-ELISA 最适条件及阴阳界限的确定 试验

表 1 IBV NP-ELISA 交叉性试验\*

Table 1 The result of cross-reaction test with IBV NP-ELISA

Type of Serum	AIV (H5)	AIV (H9)	NDV	IBDV	EDS 76	Positive control	Negative control	Blank control
OD(450)	0.218	0.265	0.202	0.217	0.221	1.670	0.190	0.092

\* AIV (H5):H5 亚型禽流感病毒;AIV (H9):H9 亚型禽流感病毒;ND:禽新城疫病毒;EDS76:禽减蛋综合征病毒;Control:对照

2.4.3 重复性试验 结果表明批间重复的吸收变异系数在 3.62%~9.49% 之间,批内重复的吸收变异系数在 3.29%~7.97% 之间,说明该诊断方法具有良好的重复性。

2.4.4 诊断特异性、敏感性与符合率试验 HI 试验和 ELISA 试验检测同一批血清的阴阳性结果如表 2 所示,

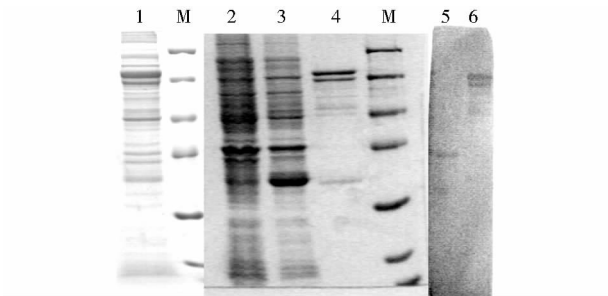


图 3 表达载体 pGEX-NP 诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析和免疫印迹分析

**Fig.3 SDS-PAGE analysis and Western blot of the expressed products by pGEX-NP**

M: Protein marker; 1: Expression product of *E. coli* BL21 with pGEX-NP; 2: Expression product of *E. coli* BL21; 3: Expression product of *E. coli* BL21 with pGEX-KG; 4: Purification of expression product of *E. coli* BL21 with pGEX-NP; 5: Western blot analysis of expression product of *E. coli* BL21 with pGEX-KG; 6: Western blot analysis of expression product of *E. coli* BL21 with pGEX-NP

表明抗原的最佳包被浓度为 1.75μg/ml,抗原最佳稀释度为 1:40,血清最佳稀释度为 1:80,阴性血清平均 OD 值  $\bar{x}$  等于 0.178, $s$  等于 0.061,求得阴阳界限为  $\bar{x} + 3 \times s = 0.178 + 3 \times 0.061 = 0.361$ 。结果判定标准的确立:以空白孔调零为背景,在酶标仪上测各孔 OD<sub>450</sub> 值,若 OD<sub>450</sub> ≥ 0.361 判为血清抗体阳性,表明疫苗免疫鸡群产生了相关抗体或非免疫鸡群受到了野毒的感染;若 OD<sub>450</sub> < 0.361 判为阴性。

2.4.2 交叉性试验 结果表明无关病原抗体 OD 值均在临界值 0.361 以下,说明此方法与 AIV、IBDV、NDV、EDS76 等病原抗体无交叉反应,特异性强(表 1)。

结果显示,以 HI 试验作为参照,ELISA 试验的诊断敏感性为 97.29%,特异性为 60.60%,符合率为 88.89%,说明该方法具有良好的诊断特异性、敏感性与符合率(表 2)。

2.4.5 阻断试验 可以看出经含 IBV 的尿囊液处理的阳性血清 OD 值明显降低,而经健康鸡胚尿囊液处理

表 2 NP-ELISA 诊断特异性、敏感性与符合率试验

Table 2 Diagnosis sensitivity ,specificity and coincidence test of NP-ELISA

type		HI test		total
		+	-	
ELISA	+	108	13	121
	-	3	20	23
	total	111	33	144

的阳性血清的 OD 值没有明显变化(图 4)。

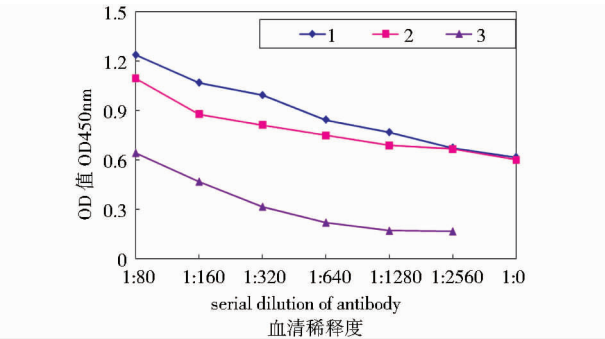


图 4 NP-ELISA 特异性阻断试验

Fig.4 Specific blocking test of NP-ELISA

1:Standard positive serum against IBV;2: Standard positive serum against IBV mixed with negative allantoic fluid;3: Standard positive serum against IBV mixed with allantoic fluid containing IBV

2.4.6 间接 ELISA 在临床的应用 统计表明,临床样品的阳性率为 89.0%,这说明 NP-ELISA 方法能很好地应用于临床 IBV 抗体检测(表 3)。

表 3 IBV 临床检测结果

Table 3 The clinical detection of IBV sera antibody

Serum from	total	NO. positive	Positive rate(%)
jiangxia	48	40	83.3
huangpi	96	84	87.5
caidian	32	32	100
xinzhou	128	113	88.3
hannan	96	87	90.6
total	400	356	89.0

3 讨论

核衣壳蛋白(N)是 IBV 的 3 种主要结构蛋白之一,在遗传进化中最为保守,不同毒株间同源性最高(达 94%~99%),病毒感染过程中表达量最大(S:M:N 3 种蛋白的摩尔比为 1:6:15),与病毒的组装和机体细胞免疫等方面有重要相关性<sup>[56]</sup>,因此研究 N 蛋白基因的

克隆表达对该病有重要的意义。

本研究中,将外源基因插入在 GST 蛋白基因的下游,表达出可溶性的融合蛋白 GST-NP,利用 GST 亲和层析柱进行了纯化。高纯度表达蛋白的获得为 ELISA 检测方法的建立奠定了良好的基础,特别是在克服动物体内大肠杆菌抗体对检测方法的干扰方面有重要的意义。纯化的产物有两种,一种蛋白表达量高,片段较大,为主要产物,另一种表达量较低,片段较短,是附带产物,这与相关融合报道的情况相同<sup>[12]</sup>,可能是蛋白表达时部分蛋白在 C 端提前终止或发生了降解。Western blot 分析与 ELISA 试验均表明,纯化后两种主要表达蛋白均具有很好的免疫学生物活性。

用大肠杆菌表达的重组 N 蛋白取代原病毒作为诊断抗原,是诊断技术发展的一种趋势,优势有以下几点:首先,重组 N 蛋白具有良好的免疫原性,发现在大肠杆菌中表达的 Gray 株 N 蛋白可与多种血清型 IBV 抗体发生良好反应<sup>[13]</sup>。其次,目前传染性支气管炎病毒的检测方法有两种,分别是病原学方法和血清学方法。N 蛋白可作为抗原进行血清学检测,保守性好,可以检测各种血清型的抗体,不存在病原检测中范围狭窄的问题,具有更高可信度。再者,该蛋白易于制备纯化,成本廉价,建立的检测方法安全性好、诊断对象单一,准确性高,从制备、应用效果上均优于昆虫细胞表达的 N 蛋白<sup>[4,14]</sup>,该蛋白对将来 IB 新型疫苗的研制和 IBV 的消除必然有一定的意义。

为对 ELISA 方法的特异性、敏感性与符合率进行评定,本实验进行交叉性、阻断性、重复性试验,同时将 NP-ELISA 诊断方法与血凝抑制试验(HI)相比较,结果表明 NP-ELISA 检测的敏感性、符合率很高,但特异性稍微偏低,这可能由于两种方法的诊断原理和判断标准不同所致。首先,灵敏度不同,HI 虽是一种比较公认的检测方法,但其灵敏度不高,而 ELISA 可达到血清中和试验的 2.3 倍,AGP 的 188 倍,具有很高灵敏度<sup>[12]</sup>;其次,两种方法检测的对象不同,NP-ELISA 专一性地检测 NP 蛋白抗体,诊断对象单一,影响因素少,非特异性小,而 HI 则是检测胰酶消化过的 IB 病毒,其中胰酶本身、盐离子浓度、温度等对血凝性都具有很大的影响,影响因素多,特异性差;再者,实验稳定性不同,ELISA 可以通过一系列的量化方法控制反应条件,而 HI 实验极易受胰酶消化效果和病毒的类型等不可量化控制的条件影响<sup>[11,15]</sup>。所以 NP-ELISA 与 HI 相比的特异性偏低,仅能表明本方法的敏感性比 HI 更高,稳定

性更好,更适合于动物免疫或感染后早期抗体监测。

### 参考文献

- [ 1 ] Saif Y M. Avian Disease ( 12th ). Beijing: China Agriculture Press, 2012. 129-151.
- [ 2 ] Collisson E W, Parr R L, Li W, et al. An overview of the molecular characteristics of avian infectious bronchitis virus. Poultry Science Rev, 1992, 4: 41-55.
- [ 3 ] Dave Cavanagh. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. Vet. Res. 2007, 38: 281-297.
- [ 4 ] 高雅, 栗硕, 刘勇, 等. 鸡传染性支气管炎病毒 Holte 株 S1 基因在昆虫杆状病毒系统的表达及其抗原性分析. 中国预防兽医学报, 2012, 12: 951-954.  
Gao Y, Su S, Liu Y, et al. Eukaryotic Expression and Antigenicity Analyzing fo S1 Gene of IBV Holte Strain. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2012, 12: 951-954.
- [ 5 ] Edward Emmott, Diane Munday, Erica Bickerton. The cellular interactome of the coronavirus infectious bronchitis virus nucleocapsid protein and functional implications for virus biology. Virol, 2013, 87: 9486-9500.
- [ 6 ] Zhiwei Yang, Nan Wu, Yujie Fu, et al. Anti-infectious bronchitis virus ( IBV ) activity of 1, 8-cineole: effect on nucleocapsid ( N ) protein. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2010, 28( 3 ): 323-330.
- [ 7 ] Xdifuna A, Waters A K, Zhou M L, et al. Recombinant nucleocapsid protein is potentially an inexpensive, effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. J Virol Methods. 1998, 70( 1 ): 37-44.
- [ 8 ] Boursnell M E, Binns M M, Brown T K, et al. Sequence of the nucleocapsid genes from two strains of avian infectious bronchitis virus. J Gen Virol, 1985, 66: 573-580.
- [ 9 ] Michael R G, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4<sup>th</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- [ 10 ] Li H Y, Yu K Z, Xin X G, et al. Development and validation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay test kit for detecting anti-influenza virus antibodies. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2000, 22( 3 ): 182-185.
- [ 11 ] 世界动物卫生组织编著. OIE 陆生动物诊断试验和疫苗手册. 第 5 版. 北京: 中国动物卫生与流行病学中心出版, 2004. 796-805.  
OIE. Terrestrial Animal Diagnostic Tests and Vaccines Handbook. 5<sup>th</sup> ed. Beijing: Chinese Animal Health and Epidemiology Center, 2004. 796-805.
- [ 12 ] 张德勇. 基于 IBV 重组表达蛋白的抗体检测技术及基因免疫的研究. 杭州: 浙江大学, 2005.  
Zhang D Y. ELISA techniques based on recombinant protein of IBV and gene immunization of IBV. Hangzhou: Zhejiang University, 2005.
- [ 13 ] Abdul N, Waters A K, Zhou M, et al. Recombinant nucleocapsid protein is potentially an inexpensive, effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. Journal of Virological Methods, 1998, 70( 1 ): 37-45.
- [ 14 ] Chen H, Coote B, Attree S, et al. Evaluation of a nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against infectious bronchitis virus. Avian Pathol. 2003, 32( 5 ): 519-526.
- [ 15 ] 蒋国胜, 阮武营, 马魁芳, 等. 鸡传染性支气管炎病毒 M41 株和 Conn 株的血清交叉血凝抑制试验. 中国畜牧兽医, 2012, 39( 2 ): 209-211.  
Jiang G S, Ruan W Y, Ma K F. M41 strain and Conn strain of serum cross hemagglutination inhibition test of Avian infectious bronchitis virus. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2012, 39( 2 ): 209-211.

## Expression, Purification of Nucleoprotein of IBV and Its Application in Monitoring

LI Zhong-hua<sup>1</sup> BI Ding-ren<sup>2</sup> XIAO Yun-cai<sup>2</sup> HU Si-shun<sup>2</sup> WU Ren-wei<sup>2</sup>

( 1 Fujian Province Animal Disease Control Center, Fuzhou 350003, China )

( 2 College of Veterinary Medicine, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China )

**Abstract** In order to detect antibodies against infectious bronchitis virus ( IBV ) in the serum, the N gene of IBV was cloned, expressed and then utilized in the enzyme linked immunosorbent assay ( ELISA ). N gene ( 1230bp ) of IBV was amplified by RT-PCR from a strain of IBV H52, and confirmed by sequencing and blast

analysis. The N gene was then subcloned into prokaryotic expression vector pGEX-KG in the form of vector pGEX-NP. The fusion protein N-GST which was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) was characterized by SDS-PAGE and Western blotting analysis as 80kDa with immunity and dissolubility, and was purified with GST affinity column, then to establish an indirect ELISA for the detection of antibodies against IBV. The results indicate the assay has excellent reduplication, high sensitivity and specificity. It could be applied to detect the antibodies against IBV fast, to provide technical support for sero-epidemiologic survey of IBV infection and to understand how IBV infect animals.

**Key words** Infectious bronchitis virus Nucleocapsid protein Prokaryotic expression ELISA