

禽传染性支气管炎病毒纤突蛋白的研究进展*

王林川 刘福安

(华南农业大学动物医学系, 广州, 510642)

摘要 本文对禽传染性支气管炎病毒(IBV)纤突蛋白的形态、结构、免疫学活性、血凝活性、与病毒血清型的关系,尤其是其分子生物学研究的新近进展进行了综述,以期对IBV基因工程疫苗的制备及疾病的快速诊断和防治打下基础。

关键词 禽传染性支气管炎病毒; 纤突蛋白; 分子生物学

中图分类号 S855.3

禽传染性支气管炎病毒(IBV)是一种冠状病毒,蛋白结构成分主要有3种:核衣壳蛋白(N)、膜蛋白(M)和纤突蛋白(S)。N蛋白的分子量约为50 kD, M蛋白的分子量约为30 kD, S蛋白是一种由 S_1 和 S_2 组成的寡聚蛋白, S_1 和 S_2 均为糖多肽,其分子量分别为90 kD和84 kD, 而用酶移去寡糖后的 S_1 和 S_2 的分子量则分别为64 kD和61 kD。

IB呈世界性广泛流行,目前仍难控制,免疫接种的失败往往是由于疫苗株与流行野毒株血清型的不同,或是有重组的新的IBV毒株的出现。近年来,对不同病毒血清型的研究结果表明,病毒纤突表现出较强的型特异性,并可能在刺激机体产生保护性免疫力中起着决定性的作用。因此,国内外对IBV的研究重点也落在其纤突蛋白、基因上。本文就这方面的研究状况综述如下:

1 纤突蛋白的形态结构

Davies等(1979)用磷钨酸负染电镜观察,发现IBV纤突在病毒子囊膜表面,呈外观均匀的特征性杵状突起,长度约为20 nm。Cavanagh(1983)用非离子去污剂2%NP40对病毒进行裂解,结合蔗糖密度梯度离心提纯了S蛋白,经透析、冻干、浓缩后,在电镜下观察,发现S蛋白聚集在一起形成特征性的玫瑰花样结构,测得S蛋白分子量为 $354(\pm 17)$ kD, 经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳发现S蛋白是由等摩尔分子的 S_1 (190 kD)和 S_2 (84 kD)2部分组成。

关于S蛋白组成的结构模式,尽管说法不太一致,但大多数学者认为S蛋白是由糖蛋白 S_1 和 S_2 各两个拷贝组成,以寡聚体形式存在。 S_1 是通过 S_2 而连接到膜上的, S_1 和膜有很少或几乎没有连接。 S_1 为形成S球状末端突起的主要成份。 S_2 在S蛋白C端,占S蛋白的一半,有一个穿膜锚和组成S蛋白茎的两个 α -螺旋结构。纤突中 S_1 和 S_2 连接非常弱,是通过肽键之间的二硫键来连接的。

2 纤突蛋白的免疫学活性

Cavanagh(1984)分离提纯了IBV的S、M、N蛋白,并免疫鸡制取相应的抗血清。发现

1993-12-07 收稿

* 本文为高等学校博士学科点专项科研基金资助项目。

只有 S 蛋白才能产生中和抗体,而 M 蛋白和 N 蛋白均不能刺激机体产生中和及血凝抑制抗体。S 蛋白由 S_1 和 S_2 组成的。Mockett(1984)用富含 S 蛋白的 IBV-M₄₁ 制备物免疫 Balb/C 小鼠,继而用免疫鼠的脾脏细胞和骨髓瘤细胞系 CPS-NSI-Ag4-1 融合,成功地建立了 4 株分泌抗 IBV-M₄₁ 的特异性抗体的杂交瘤细胞株,其中 2 株具有血凝抑制和中和活性,且只能和 S_1 反应,而不和 S_2 反应。似乎 S 中仅 S_1 才能刺激机体产生中和及血凝抑制抗体。Cavanagh(1986a)用 6 mol/L 尿素处理提纯的 IBV,再蔗糖密度梯度离心制得 S_1 和缺乏 S_1 的 IBV,用 IBV 完整病毒、 S_1 蛋白、缺乏 S_1 的 IBV 分别免疫鸡群,并在一定时间内攻毒,发现完整 IBV 和 S_1 蛋白均能使免疫鸡群产生高滴度中和及血凝抑制抗体,而缺乏 S_1 的 IBV 不能产生中和及血凝抑制抗体。完整病毒免疫鸡群有一部分鸡在攻毒时得到保护。因此,确证了只有 S_1 才能诱导产生中和抗体和血凝抑制抗体,并继而使机体得以保护。但这并未完全排除 S_2 的诱导机体产生中和抗体和血凝抑制抗体的可能性。一些学者认为尿素处理病毒,可能导致 S_2 的构象发生改变:一方面是移去 S_1 ,另一方面是尿素对 S_2 的变性效应。

3 纤突蛋白的血凝活性

Cavanagh(1986b)发现缺乏 S_1 的 IBV 不再具有传染性,也不能引起血凝反应;然而缺乏 S_1 的放射性标记的 IBV 仍可吸附到红细胞和小鸡肾细胞,其吸附细胞的程度与完整病毒相差无几;用磷脂酶 C 处理 IBV,能引起血凝,但并不能增加 IBV 吸附到红细胞上的数目,从而揭示了缺乏 S_1 的病毒吸附到细胞与完整病毒吸附到细胞上的机制差异。即缺乏 S_1 的病毒是通过 S_2 的锚的作用,而完整病毒还有 S_1 与细胞表面的受体结合的途径来吸附到细胞上。没有 S_1 的病毒虽能吸附到细胞上,但已不具备传染性,因为缺乏 S_1 的病毒不再具有同细胞膜融合的能力,而融合的目的主要是释放其病毒的 RNA,故导致了传染力的丧失。从而也证实了 Sturman 等(1983)所提出的纤突蛋白是膜融合所必需的重要组分这一结论。但 S_2 在膜融合中的作用还不太清楚。

4 纤突蛋白与病毒血清型

病毒血清型是由病毒与抗体作用的特异性来确定的。早已证实 IBV 存在有很多的血清型,但许多学者采用不同的方法对 IBV 血清型进行研究并加以比较得出不同的结论。随着 IBV 分子生物学研究的深入,纤突在病毒血清型中的作用已越来越引起人们的兴趣。Binns(1986)通过基因工程技术,分别完成了编码 IBV-M₄₁、IBV-Beaudette、IBV-6/82 株纤突蛋白的核苷酸序列测定并确定了相应的氨基酸序列。发现马萨诸塞(M)血清型的 M₄₁ 和 Beaudette 的氨基酸序列有显著的相似性,在 1162 个氨基酸中只有 44 个氨基酸不同(其中 26 个存在于 S_1 多肽中),二者差异程度仅为 3.7%;新分离株 6/82 的纤突蛋白氨基酸顺序与 Beaudette 的不同,差异程度为 13.8%。这一纤突分子生物学的研究结果与其它一些常规方法的结果基本相同,前者则更大大地前进了一步,但在差异序列的氨基酸中,究竟哪几种是定 IBV 血清型的关键,目前有用 Mab 来确定这些区域的研究,但结果不成完备体系。

5 纤突蛋白基因的研究概况

IBV 基因组为 +ssRNA,5'端有帽子结构,3'端有聚(A)尾。Boursnell 等(1987)测定了 IBV 的基因全序列,共有 27608bp(包括聚 A 尾),比目前所知的任何稳定的 RNA 病毒要大得多;其转录出一套共 6 个 mRNA,都具有同一的 3'端和相同的 65 个核苷酸的 5'端先

导序列,自长至短顺序命名为 mRNA₁、mRNA₂、……mRNA₆, 长的 mRNA 比下一个 mRNA 多出的 5'端编码一种蛋白。所以,国际病毒分类委员会脊椎动物病毒分会冠状病毒研究小组 Cavanagh 等(1990)确立 IBV 基因组的序列为 1-S(S₁-S₂)-3-M-5-N。Kusters(1987)用 RNA T₁ 酶指纹图表明,荷兰毒株可分为二簇:第一簇包括 H₅₂,H₁₂₀,D₃₈₇,V₁₂₅₉,V₁₃₈₅,V₁₃₉₇, 估计序列同源性为 99%;第二簇包括 D₂₀₇,D₂₇₄, D₂₁₂,D₁₄₆₆,D₃₁₂₈,D₃₈₉₆, 序列同源性为 95%;M₄₁ 不属于上二簇。

Binns(1985)确定了 Beaudette 株 S 蛋白的基因序列,有 3554 碱基。Cavanagh(1986)报道 Mass 株在 519/520 氨基酸位点 S 蛋白断裂成 2 个糖蛋白 S₁,S₂,但也有报道在 535~545 处断裂的。Kusters(1989b)报道 S₁ 的 545 氨基酸中,仅 243 个保守,大多数的病毒血清型决定点(即有变异处)位于头 300 个氨基酸中;且用 RNaseT₁ 指印迹反应发现有由于基因重组而形成的一些新的病毒株。

Kwon(1993)用 PCR 技术获取了包含有 S₁ 序列的 11 个病毒血清型的 1700bp 序列,用限制性酶切片长度多形型(RFLP)来检测,用酶 Hae III, 可将 Holte,Arkansas DPI, SE 17,Md27,Iowa97 与其它 IBV 区分出来;Beaudette,Massachusetts 41,Connecticut,Florida 88 虽有相同的 Hae III RFLP 型,但可用 Xcm I 和 BstY I 来区分;而 Gray 和 JMK 用 23 种限制性内切酶都不能区分。用 PCR 和 RFLP 分析的结果与用中和试验得出的传统的病毒血清型结果一致。

王林川等(1994a)对用于肾变型 IB 防疫的广东地方株 D₄₁ 的 S₁ 基因的 PCR 产物用 Hae III 酶切,发现其结果与 M₄₁ 的一致,与美国的标准肾变株 Gray 不一致,这似乎表明国内流行的 IBV 已有变异,且毒株的变异还可导致临床病型的改变。

6 纤突蛋白与 IBV 基因工程疫苗

对于 IB 的控制,目前仍是使用弱毒疫苗或灭活疫苗,虽有一定效果,但因血清型有不同和重组毒株的出现,使得 IB 仍有发生,有时还相当严重。从上面的叙述可知,IBV 的纤突蛋白在刺激机体产生保护性免疫反应中起着关键的作用,并且知道了编码病毒纤突的基因序列,因此,制备安全、高效的基因工程疫苗已成为可能。Tomley 等(1987)用 IBV Beaudette 株纤突蛋白基因和痘苗病毒 WR 株重组,得到了能感染细胞产生含有 S₁ 和 S₂ 亚基的糖基化的 180 kD 多肽前体的重组病毒;此多肽免疫小鼠产生的抗体,ELISA 检测为针对 IBV 纤突抗原,能中和 IBV 对培养的支气管纤毛细胞的感染。

7 结束语

IBV 分子生物学研究国内现才略有报道,国外 80 年代初就已开始,至今已取得了较丰富的资料,且有突破性进展,这对指导国内的理论研究和生产实践有意义。我国鸡的年饲养量在 6 亿只以上,IBV 究竟有哪几种血清型在流行,变异株情况如何,这些工作还不全面;常规的检测方法需时很长,无法适应实际工作需要。对纤突蛋白基因进行 PCR 及 RFLP 实验,既敏感准确又简单快速(2~3 天即可),既可诊断又可定型,无疑为 IB 的诊断防治开辟了新的前景。华南农业大学动物医学系已组织了力量就此深入研究,王林川等(1994a)用 RT-PCR 技术已取得了 IBV-M₄₁ 及广东地方毒株 D₄₁ 的 S₁ 基因片段,并正着手其 RFLP 分析及将之导入昆虫多角体病毒进行表达的工作,希望对本领域的研究有所推进。

参 考 文 献

- 王林川,刘福安.1994a.禽传染性支气管炎病毒免疫原基因的RT-PCR研究.中国兽医杂志,20(8):3~4
- 王林川.1994b.禽传染支气管炎病毒免疫原基因cDNA的构建与鉴定:[学位论文].广州:华南农业大学动物医学系
- Binns M M, Boursnell M E G, Cavanagh D, et al. 1985. Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the coronavirus IBV. *J gen Virol*, 66: 719~726
- Binns M M, Boursnell M E G, Tomley F M, et al. 1986. Comparison of the spike precursor sequences of coronavirus IBV strains M41 and 6/82 with that of IBV Beaudette. *J gen Virol*, 67: 2825~2831
- Boursnell M E G, Brow T D K, Foulds I J, et al. 1987. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J gen Virol*, 68: 57~77
- Cavanagh D. 1983. Coronavirus IBV structural characterization of the spike protein. *J gen Virol*, 64: 2577~2583
- Cavanagh D, Darbyshire J H, Davis P J, et al. 1984. Induction of humoral neutralising and haemagglutination-inhibiting antibody the spike protein of avian infectious bronchitis virus. *Avian pathology*, 13: 573~583
- Cavanagh D, Davis P J, Darbyshire J H, et al. 1986a. Coronavirus IBV: Virus retaining spike glycopolyptide S₂ but not S₁ is unable to induce virus-neutralizing or haemagglutination-inhibiting antibody, or induce chicken tracheal protection. *J gen Virol*, 67: 1435~1442
- Cavanagh D, Davis P J. 1986b. Coronavirus IBV Removal of spike glycopolyptide S₁ by urea abolishes infectivity and haemagglutination but not attachment to cells. *J gen Virol*, 67: 1443~1448
- Cavanagh D, Brian D A, Enjuanes L, et al. 1990. Recommendations of the coronavirus study group for the nomenclature of the structural proteins, mRNA, and genes of coronaviruses. *Virology*, 176: 306~307
- Davies H A, Macnaughton M R. 1979. Comparison of the morphology of three coronaviruses. *Arch Virol*, 59: 25~33
- Kusters J G, Niesters H G M, Bleumink Pluym N M C, et al. 1987. Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus in the Netherlands. *J gen Virol*, 68: 343~352
- Kusters J G, Niesters H G M, Lenstra J A, et al. 1989. Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. *Virology*, 169: 217~221
- Kwon H M, Jackwood M W, Jelb J Jr. 1993. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis*, 37: 194~202.
- Mockett A P A, Cavaanagh D, Brown T D K. 1984. Monoclonal antibodies to the S₁ spike and membrane proteins of avian infectious bronchitis coronavirus strain Massachusetts M₄₁. *J Gen Virol*, 65: 2281~2286
- Sturman L S, Holmes K V. 1983. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res*, 28: 35~112

Tomley F M, Mockett A P A, Boursnell M E G, et al. 1987. Expression of the Infectious bronchitis virus protein by recombinant vaccinia virus and induction of neutralizing antibodies in vaccinated mice. *J gen Virol*, 68: 2291~2298

ADVANCES IN RESEARCH ON THE PEPLIMER PROTIEN OF THE AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS

Wang Linchuan Liu Fuan

(Dept. of Veterinary Medicine, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

This paper is a review article outlining the present state of research on the avian infectious bronchitis virus peplomer protein, emphasizing the molecular biology aspect. The different topics described are as follow: 1. Morphology. 2. Immunology. 3. Haemagglutination activity. 4. Relationship to virus serotyping. 5. Nucleotide composition. The aim and objective of this work is to provide new perspective in genetically-engineered veterinary vaccine and rapid diagnostic techniques.

Key words avian infectious bronchitis virus; peplomer protein; molecular biology