

鸡氨基酶 N 的高效可溶性表达及生物学功能分析

尹鑫, 刘澜澜, 贾莹, 明晓波, 张颖, 李甜甜, 魏萍

东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030

摘要: 本研究旨在克隆鸡氨基酶 N(chAPN) 基因, 高效表达可溶性目的蛋白, 并测定其生物学功能。应用 RT-PCR 方法从鸡胚肾细胞中克隆 chAPN 的基因片段, 经测序鉴定后再克隆至原核表达载体 pCOLD-TF, 构建重组原核表达质粒 pCOLD-TF-chAPN, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中经不同条件诱导表达目的蛋白; 利用镍柱亲和层析法纯化可溶性蛋白, 并进行 SDS-PAGE、Western blotting 鉴定; Leu-PNA 酶促反应和 ELISA 等方法检测目的蛋白生物学功能。结果显示, 重组质粒 pCOLD-TF-chAPN 在大肠杆菌中以可溶形式高效表达; 酶促反应及 ELISA 结果显示该蛋白具有酶活性, 可结合传染性支气管炎病毒(IBV), 并表现为剂量依赖性。这为今后研究 chAPN 的酶活性、作为 IBV 受体及抗病毒功能奠定了实验基础。

关键词: 鸡氨基酶 N, 可溶性, 酶活性

Expression and biological function analysis of chicken aminopeptidase N

Xin Yin, Lanlan Liu, Ying Jia, Xiaobo Ming, Ying Zhang, Tiantian Li, and Ping Wei

College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: To clone and express the gene encoding chicken aminopeptidase N (chAPN), and analysis the biological function of chAPN expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*). The chAPN gene was amplified by RT-PCR from the kidney cells of chicken embryo and then cloned into the prokaryotic expression vector pCOLD-TF. Recombinant expression plasmid of pCOLD-TF-chAPN was constructed and then transformed into the competent *E. coli* BL21(DE3) cells for expression under different conditions such as induction time and inductor concentrations. Purified soluble recombinant chAPN was obtained by Ni-NTA His Bind Resin affinity chromatography and identified by SDS-PAGE gel and Western blotting assay. Its biological function was detected by its reaction with Leu-PNA and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The results showed that the expression product of chAPN gene in *E. coli* was soluble. It was able to bind infectious bronchitis virus (IBV) dose-dependently. In conclusion, chAPN gene has been successfully cloned and expressed in *E. coli*, which will establish a basis for further research the enzymatic activity and antiviral function.

Keywords: chAPN, solubility, enzymatic activity

Received: October 27, 2009; **Accepted:** March 8, 2010

Supported by: Scientific Research Fund of Heilongjiang Provincial Education Department (No. 2003fz012), Program for Innovative Research Team of Northeast Agricultural University (No. CXT-006-4-1).

Corresponding author: Ping Wei. Tel: +86-451-55190125; Fax: +86-451-55190463; E-mail: weiiping@yahoo.com.cn

黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (No. 2003fz012), 东北农业大学创新团队课题 (No. CXT-006-4-1) 资助。

氨肽酶 N(APN), 是一种 II 型金属蛋白酶, 主要分布于肾、小肠、呼吸道上皮细胞、粒细胞、单核细胞、成纤维细胞、内皮细胞、血脑屏障处的脑外膜细胞以及中枢神经系统突触膜等处^[1-2], 具有促进血管生发^[3]、酶解多肽、充当病毒细胞受体、介导信号转导^[1]等多种生物学功能。在冠状病毒属中, APN 可作为多种病毒的细胞受体^[4], 如猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)^[5]、猫传染性腹膜炎病毒(FIPV)^[6]、猫冠状病毒(FCoV)^[7]、犬冠状病毒(CCoV)^[6]及人冠状病毒(HCoV-229E)^[8]等的受体。研究表明, 鸡氨肽酶 N (chAPN) 可作为鸡传染性支气管炎病毒(IBV)的细胞受体^[9], 同时在鸡胚发育过程发挥重要作用^[10]。而国内外未见该蛋白高效可溶性表达, 对其生物学功能研究也极少。本研究成功扩增了 chAPN 的全基因, 构建了重组表达质粒 pCOLD-TF-chAPN, 实现了 chAPN 的高效、可溶性表达, 并探讨了表达产物的生物学功能, 为今后进一步开展相关研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 毒株、菌株、质粒及血清

IBV M41 株由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所刘胜旺研究员馈赠; pCOLD-TF 由本研究室保存; 大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3) 由本研究室保存; 兔抗 IBV M41 血清由本研究室制备保存。

1.1.2 主要仪器与试剂

fast 200 总 RNA 提取试剂盒购于 Fastgene 公司; Wizard Purification Plasmid DNA Purification System 购自 Promega 公司; 质粒小量提取试剂盒购于宝泰克公司; 氨苄青霉素购于 Amersco 公司; IPTG (Dioxane free)、M-MLV 反转录酶、Oligo(dT)₁₈、dNTPs、RNase Inhibitor、pMD 18-T Simple 载体、T4 DNA 连接酶、EcoR I、Sal I 等均购于 TaKaRa 公司; 蛋白纯化试剂盒购于 Novagen 公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG 购于 Sigma 公司。

1.1.3 引物

根据 GenBank 上已登录的鸡氨肽酶 Ey 序列 (Accession No. D87992) 及 pCOLD-TF 多克隆位点

设计引物如下: chAPN-Up: 5'-GAATTCATGGCAG CCGGCTTCTTCAT-3' (下划线处为 EcoR I 酶切位点); chAPN-Down: 5'-GTCGACGGCTAGCTGGAGG CCGTCTC-3' (下划线处为 Sal I 酶切位点), 用以扩增 chAPN 基因序列。引物由上海生工有限公司合成, 预期扩增目的片段为 2906 bp。

1.1.4 鸡胚

18 d 鸡胚购于东北农业大学孵化场。

1.2 chAPN 基因的克隆与鉴定

1.2.1 鸡胚肾组织的处理及总 RNA 提取

无菌采集 18 d 鸡胚肾组织, 液氮研磨后, 按照 Fastgen 公司 fast 200 总 RNA 提取试剂盒说明书上的操作方法提取总 RNA。

1.2.2 chAPN cDNA 第一链的合成

取 10 μ L 上述提取的 RNA 与 2 μ L Oligo (dT)₁₈, 混匀, 65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 立即置冰上 2 min。然后加入 4 μ L 5 \times buffer, 2 μ L dNTP Mix, 1 μ L RNase Inhibitor, 1 μ L M-MLV, 共 20 μ L 体系, 混匀, 42 $^{\circ}$ C 水浴 60 min, 得到 cDNA, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 chAPN 全长基因扩增

以上述合成的 cDNA 第一链为模板, 扩增 chAPN 基因片段。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 50 s, 61.6 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 20 min。反应结束后对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 chAPN 基因的克隆

将 PCR 产物用 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化后与 pMD 18-T Simple 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, LB 平板 (AMP 抗性) 过夜培养筛选, 挑选单菌落, 振荡培养后用质粒小量提取试剂盒提取质粒, PCR 和 EcoR I、Sal I 双酶切及 EcoR I 单酶切鉴定均为阳性的质粒送上海生工生物工程技术有限公司测序, 进一步测序鉴定正确的阳性重组质粒命名为 PMD 18-T-chAPN。

1.3 chAPN 原核表达载体的构建与鉴定

EcoR I 和 Sal I 双酶切阳性重组质粒 PMD 18-T-chAPN, 切出 chAPN 目的基因, 同时用 EcoR I 和 Sal I 双酶切 pCOLD-TF 空载体; 经 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒分别回收 chAPN 目的基因和

pCOLD-TF 空载体部分; 在 T4 DNA 连接酶作用下 16°C 连接过夜, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 涂布含 Amp 的 LB 平板, 37°C 培养箱过夜, 挑取单菌落, 振荡培养后用质粒小量提取试剂盒提取质粒, 进行 PCR 鉴定及 *EcoR* I 单酶切、*EcoR* I/*Sal* I 双酶切鉴定, 鉴定均为阳性的质粒送 TaKaRa 公司测序, 进一步测序鉴定正确的阳性重组质粒命名为 pCOLD-TF-chAPN。

1.4 chAPN 的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

将测序正确的阳性表达重组体质粒转化至感受态 *E. coli* BL21 (DE3), 随机挑取 Amp 抗性单菌落, 接种于 5 mL 含 Amp 的 LB 和 SOC 培养液中, 37°C 振荡培养过夜, 次日按 1:100 比例接种于 10 mL 含 Amp 新鲜 LB 和 SOC 培养基, 37°C 剧烈振荡至菌液 OD_{600} 为 0.5~0.7, 15°C 预冷培养物 30 min 后, 加入终浓度为 0.1~2.0 mmol/L 的 Isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG), 15°C 低温诱导表达, 分别于 4、8、12、24、36、48 h 取等量菌液, 4°C、5000 r/min 离心 10 min, 收集菌体。于冰浴中超声波破碎菌体, 超声时间 10 s, 间隔时间 10 s, 功率 300 W, 破碎 10 min。裂解菌液于 4°C、12 000 r/min 离心 10 min, 取等量上清液和沉淀, 进行 8% SDS-PAGE 电泳, 用考马斯亮蓝染色, 观察蛋白表达结果。Bandscan 软件分析不同诱导表达条件下目的蛋白相对表达量。

1.5 chAPN 表达产物的亲和纯化

取 3 g 诱导表达菌用 20 mL 的非变性纯化裂解液超声破碎, 4°C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清进行蛋白纯化。层析柱预先用 Binding Buffer 平衡 10 倍柱体积, 上样后用 Binding Buffer 洗至基线, 然后用 6 倍柱体积的 Wash Buffer (500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, 80 mmol/L 咪唑, pH 7.9) 洗去非特异吸附蛋白, 最后以 Elute Buffer (500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, 1 mol/L 咪唑, pH 7.9) 洗脱特异性结合的融合蛋白, 收集洗脱液。纯化目的蛋白经蛋白纯化仪脱盐处理后, 将其超滤浓缩, 以 Bradford 法蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白浓度, 即得到最终的目的蛋白。利用 8% SDS-PAGE 电泳检测纯化产物。

1.6 Western blotting 分析

取纯化的重组蛋白样品作 SDS-PAGE 分析, 将凝胶内蛋白条带转印至硝酸纤维素 (NC) 膜上, 用 5% 脱脂奶粉 4°C 封闭过夜后, 将膜放置于鼠抗 His 单抗 (1:2000) 中, 37°C 温育 2 h; 再加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG (1:5000) 于 37°C 孵育 60 min, DAB 避光显色。

1.7 氨肽酶活性的测定

参照 Blackmon 等^[1]的方法。取 1 mL 不同稀释浓度的纯化目的蛋白, 加入 1 mL Tris-NaCl Buffer, 50 μ L Leu-PNA 中, 37°C 水浴 1 h, 再加入 0.1 mL 0.4 mol/L Na₂CO₃ 使反应终止, 在 410 nm 波长下测定各测定管的吸光度值 (OD_{410}), 同时取 1 mg 蛋白质所在相同的体积加入 1 mL Tris-NaCl Buffer, 50 μ L Leu-PNA, 0.1 mL 0.4 mol/L Na₂CO₃ 作为标准液, 每次试验至少重复测定 3 次, 以 3 次平行试管的算术平均值表示, 比较不同浓度表达蛋白与 Leu-PNA 反应后 OD_{410} 的差异性。

1.8 ELISA 检测 chAPN 与 IBV 的结合能力

用不同稀释度的纯化目的蛋白包被酶标板, 4°C 包被 16 h, PBST 洗涤 3 次; 经 1% BSA 于 37°C 封闭 30 min 后加入倍比稀释 IBV 尿囊液进行方阵滴定, 37°C 孵育 60 min; 加入兔抗 IBV 多抗血清 (1:8000), 37°C 孵育 60 min, 洗涤后加入新鲜稀释的酶标羊抗兔 IgG, 37°C 孵育 60 min, TMB 显色后检测 450 nm 波长 OD 值, 同时设阴性对照及空白对照。

2 结果

2.1 chAPN 全长基因的克隆和鉴定

利用合成引物以鸡胚肾细胞的 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增, 并将扩增产物克隆到 pMD 18-T Simple 载体中, 经琼脂糖凝胶电泳分析, 在 2906 bp 处有特异性的单一条带 (图 1), 与预期大小一致, 将该 *chAPN* 基因序列提交 GenBank (Accession No. GU223212)。

2.2 chAPN 基因原核表达载体的构建与鉴定

以 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切含有 *chAPN* 基因的 pMD 18-T Simple, 回收目的基因片段, 插入 pCOLD-TF 载体的相同酶切位点获得重组表达质粒 pCOLD-TF-chAPN, 以重组质粒进行 *EcoR* I 单酶

切、*EcoR* I/*Sal* I 双酶切后琼脂糖凝胶电泳分析, 结果得到长约 2906 bp 的片段 (图 2), 阳性克隆测序并分析后证实基因插入位置、方向、读码框均正确。

2.3 表达产物 SDS-PAGE 鉴定及可溶性分析

SDS-PAGE 电泳结果显示, 在约 160 kDa 处出现特异性目的条带, 大小与预期相符, 而空菌及空载体对照无此特异性条带 (图 3); 经蛋白可溶性分析看出, 融合蛋白 90% 以上以可溶形式表达 (图 4)。

2.4 chAPN 非变性纯化及 Western blotting 检测

菌体裂解上清液中融合蛋白经亲和层析纯化后, SDS-PAGE 结果显示, 出现 160 kDa 的蛋白带, 与预期蛋白的大小一致 (图 5), 经凝胶薄层扫描分析, 其纯度大于 95%。经 Bradford 法定量纯化的

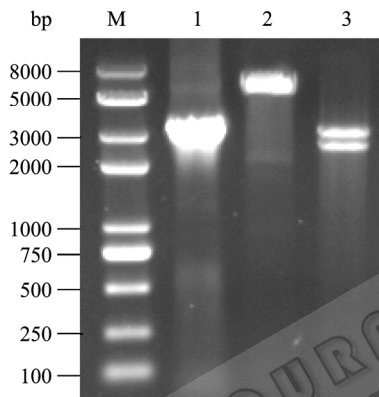


图 1 鸡氨肽酶 N 重组质粒的鉴定

Fig. 1 Identification of the recombinant chicken aminopeptidase N plasmid. M: DNA marker; 1: identification of the recombinant chAPN plasmid by PCR; 2: pMD18-T-chAPN digested with *EcoR* I; 3: pMD18-T-chAPN digested with *EcoR* I and *Sal* I.

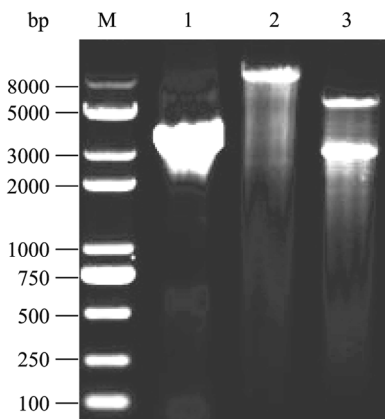


图 2 pCOLD-TF-chAPN 表达载体的构建与鉴定

Fig. 2 Construction and identification of the recombinant pCOLD-TF-chAPN. M: DNA marker; 1: PCR identification of pCOLD-TF-chAPN; 2: pCOLD-TF-chAPN digested with *EcoR* I; 3: pCOLD-TF-chAPN digested with *EcoR* I and *Sal* I.

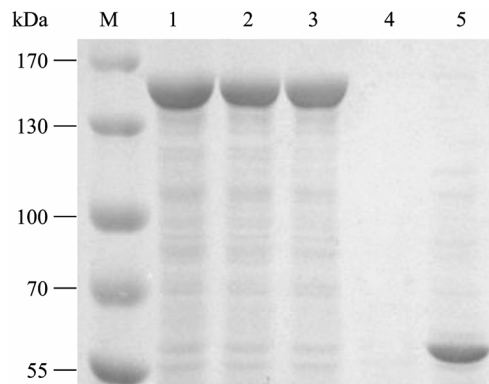


图 3 SDS-PAGE 分析鸡氨肽酶 N 在 pCOLD-TF 表达系统中的表达

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the recombinant chAPN in pCOLD-TF system. M: protein marker; 1: whole fraction of recombinants with pCOLD-TF-chAPN; 2-3: the supernatant of sonicated recombinants with pCOLD-TF-chAPN; 4: control; 5: the supernatant of sonicated recombinants with pCOLF-TF.

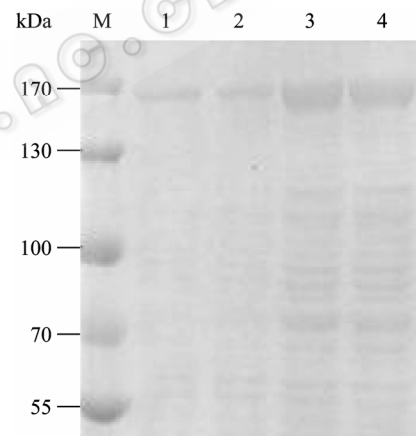


图 4 表达产物的可溶性分析

Fig. 4 Solubility analysis of the expressed product. M: protein molecular weight marker; 1-2: sediment of sonicated recombinants with pCOLD-TF-chAPN; 3-4: supernatant of sonicated recombinants with pCOLD-TF-chAPN.

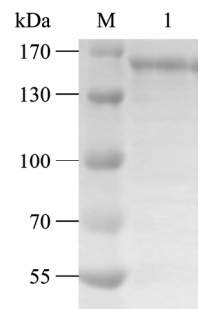


图 5 SDS-PAGE 分析 Ni-NTA 亲和层析纯化的鸡氨肽酶 N

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purified recombinant chAPN. M: protein marker; 1: the purified recombinant chAPN.

chAPN 蛋白浓度为 4.8 mg/mL。Western blotting 分析鉴定, 显示获得良好带 His 标签目的蛋白, 表明获得高表达量的目的蛋白 (图 6)。

2.5 不同诱导条件下目的蛋白的表达量分析

SDS-PAGE 电泳分析不同诱导条件下目的蛋白的表达量, 通过 BandsScan 软件分析目的蛋白表达相对量, 结果显示: pCOLD-TF-chAPN BL21(DE3) 在 SOC 培养基中, IPTG 终浓度为 0.1 mmol/L, 诱导表达时间为 24 h 时目的蛋白产量最高 (图 7、8)。

2.6 蛋白酶活性的测定

氨酸酶 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。结果显示, 随着表达蛋白浓度梯度性的变化, OD_{410} 也呈现梯度性变化(图 9), 结果表明, 表达蛋白具有酶活性。

2.7 ELISA 检测结果

用不同浓度的 chAPN 包被酶标板, 同时设立阴

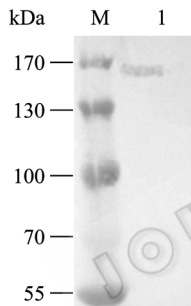


图 6 Western blotting 鉴定鸡氨酸酶 N

Fig. 6 Western blotting analysis of recombinant chAPN. 1: the purified recombinant chAPN reacted with anti-His mAb; M: protein marker.

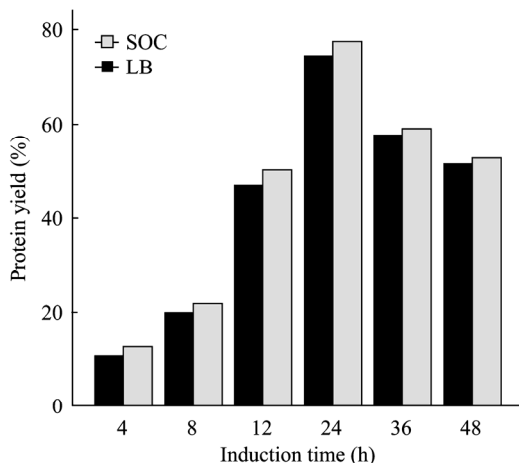


图 7 不同诱导时间目的蛋白表达相对量

Fig. 7 Relative yield of the recombinant chAPN in different stages.

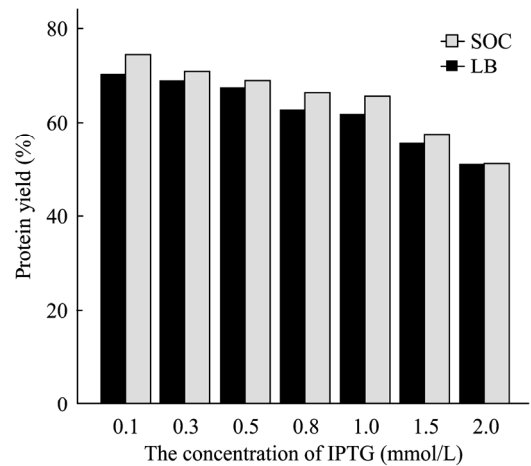


图 8 不同 IPTG 浓度目的蛋白表达相对量

Fig. 8 The relative yield of recombinant chAPN in different concentrations of IPTG.

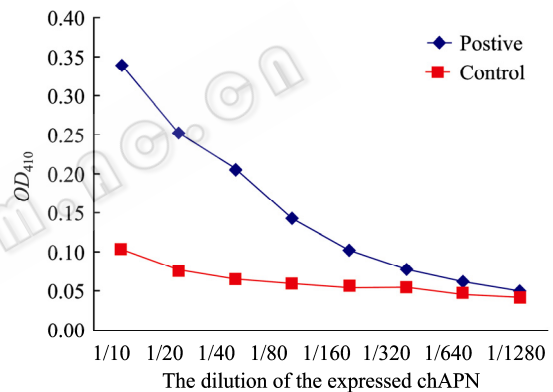


图 9 不同稀释度的鸡氨酸酶 N 酶活性测定结果

Fig. 9 Enzymatic activity of the expressed chAPN at different dilution rates.

性对照与空白对照, 结果表明, 表达目的蛋白与 IBV 具有较好的结合能力, P/N 值均大于 3, 证明了 chAPN 作为 IBV 受体的可能性。方阵滴定显示, 最佳纯化目的蛋白稀释浓度为 1:640, 最佳病毒稀释浓度为 1:1600。

3 讨论

鸡氨酸酶 N 是一种 II 型金属蛋白酶, Ichishima 等从鸡卵黄中分离到, 并将其命名为氨酸酶 $Ey^{[12]}$ 。Sihn 等研究证明 chAPN 在鸡胚胎发育过程中发挥着重要作用^[10], 目前研究表明, chAPN 可介导鸡传染性支气管炎病毒 (IBV) 感染非易感细胞, 可能作为 IBV 的功能性受体^[13]; 本研究从鸡胚肾组织中克隆到表达 chAPN 的全长大小约 2906 bp 的目的基因, 经 PCR 及酶切鉴定阳性后测序结果与公布序列符合

率达 99.48%, 为深入研究 chAPN 的生物学功能创造了条件。

明晓波及陈汉阳利用 pET-28a、pET-32a 原核表达载体表达了 chAPN, 但是表达的融合蛋白主要以包涵体形式存在, 需对包涵体成分进行繁琐的变性复性处理, 而且活性蛋白回收率低^[13-14]。本研究选用 pCOLD-TF 低温调控原核表达载体进行表达, 由于 pCOLD-TF 带有可溶标签 TF (Trigger factor), 能促使融合蛋白最大限度地以可溶形式存在, 同时该原核表达载体带有冷休克蛋白 A (Cold shock protein A), 能使重组菌在 15°C 条件下低温诱导表达, 在该条件下, 非目的蛋白表达受到抑制, 而融合蛋白的表达量、纯度、活性得到相应的提高。本研究通过摸索优化诱导表达条件, 如 IPTG 浓度、诱导时间、培养基等, 提高了目的蛋白的表达量。

Leu-PNA 酶促反应结果显示, 该表达蛋白具有酶活性, 呈现剂量依赖性, 但 chAPN 的性质 (最适温度、最适 pH 值、最适底物浓度、金属离子等) 对酶活性的影响有待进一步研究。Miguel 等认为猫氨肽酶 N 可能作为 IBV 的受体^[15], 但 Victor 等否定了前者的结论^[16]。目前研究显示, chAPN 可作为 IBV 的功能性受体, 为了进一步验证 chAPN 作为 IBV 功能性受体的可能性, 本研究通过体外结合试验检测 chAPN 与 IBV 结合能力, 通过优化反应条件, 显示 chAPN 能够特异性结合 IBV, 且存在剂量依赖性, 这与陈汉阳^[14]的结果相一致, 进一步表明 chAPN 是 IBV 功能性受体之一。chAPN 及其抗体的抗病毒活性, chAPN 是否可作为其他冠状病毒的功能性受体, 其是否与不同血清型的 IBV 的组织嗜性存在一定的关系, 将有待进一步研究。本研究选用 pCOLD-TF 原核表达载体高效表达了 chAPN, 对该诱导表达条件进行了摸索; 对表达蛋白的酶活性、生物学功能进行了探讨, 为进一步研究 chAPN 的生物学功能奠定了基础。

REFERENCES

[1] Albiston AL. Membrane bound members of the M1 family: more than aminopeptidases. *Protein Pept Lett*, 2004, **11**: 491–500.
[2] Jeffery CJ. Moonlighting proteins: old proteins learning

new tricks. *Trends Genet*, 2003, **19**: 415–417.
[3] Fukasawa K, Hideji F, Yurka S, *et al.* Aminopeptidase N (APN/CD13) is selectively expressed in vascular endothelial cells and plays multiple roles in angiogenesis. *Cancer Lett*, 2006, **243**: 135–143.
[4] Paul SM. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res*, 2006, **66**: 193–292.
[5] Delmas B, Gelfi J, Haridon R, *et al.* Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature*, 1992, **357**: 417–420.
[6] Hegyi A, Kolb AF. Characterization of determinants involved in the feline infectious peritonitis virus receptor function of feline aminopeptidase N. *Gen Virol*, 1998, **79**: 1387–1391.
[7] Tresnan DB, Levis R, Holmes KV. Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. *Virol*, 1996, **70**: 8669–8674.
[8] Nomura, R. Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. *Virol*, 2004, **78**: 8701–8708.
[9] Zeng XW. Analysis on the diversity of tissue tropism of IBV strains and studies on IBV induces apoptosis. Harbin: Northeast Agricultural University, 2006: 79–81.
曾祥伟. IBV 组织嗜性差异分析及其诱导细胞凋亡的研究. 哈尔滨: 东北农业大学, 2006: 79–81.
[10] Sihm G, Savary K, Michaud A, *et al.* Aminopeptidase N during the ontogeny of the chick. *Differentiation*, 2006, **74**: 119–128.
[11] Blackmon DL, Watson AJ, Montrose MH. Assay of apical membrane enzymes based on fluorogenic substrates. *Anal Biochem*, 1992, **200**: 352–358.
[12] Ichishima E, Yamagata Y, Chiba H, *et al.* Soluble and bound forms of aminopeptidase from hen's egg yolk. *Agric Biol Chem*, 1989, **53**: 1867–1872.
[13] Ming XB. Tissue quantitation and expression of chicken APN and its potentiality as IBV receptor evaluation. Harbin: Northeast Agricultural University, 2009: 30–35.
明晓波. 鸡 APN 组织定量、表达及其作为 IBV 受体可能性评价. 哈尔滨: 东北农业大学, 2009: 30–35.
[14] Chen HY. Study on infection HeLa cells by infectious bronchitis virus and identification of viral natural receptor. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007: 95–99.
陈汉阳. 鸡传染性支气管炎病毒感染 HeLa 细胞的研究及其天然受体的鉴定. 武汉: 华中农业大学, 2007: 95–99.
[15] Miguel B, Pharr GT, Wang C, *et al.* The role of feline aminopeptidase N as a receptor for infectious bronchitis virus. *Arch Virol*, 2002, **147**: 2047–2056.
[16] Victor C, Lisa J, Jed M, *et al.* Feline aminopeptidase N is not a functional receptor for avian infectious bronchitis virus. *J Virol*, 2007, **4**: 113–128.