

禽白血病病毒 J 亚群 *env* 基因产物的抗原性分析*

秦爱建 刘岳龙 金文杰

(扬州大学 畜牧兽医学院动物医学系 扬州 225009)

Lucy Lee Aly Fadly

(Avian disease and oncology laboratory, USDA, East Lansing, MI 48823 USA)

摘 要:用 PCR 扩增方法将 ALV-J *env* 基因不同片段进行了克隆,并构建了 *env* 基因片段 GST 融合蛋白载体。用 Western blot 实验证明,大肠杆菌表达的不同 *env* 基因片段的 GST 融合蛋白能与相应的单克隆抗体产生特异性反应性,单克隆抗体 JE9 和 G2 识别的抗原位点位于 gp85 的氨基酸 65~155 区域,而 I45 识别的抗原表位位于 *env* 基因的另一区域(156~233 位氨基酸)。ALV-J 氨基酸多肽而非糖基化位点决定 ALV-J 的亚群特异性。

关键词: 禽白血病病毒, J 亚群, *env* 基因, 表达, 抗原分析

中图分类号: Q939.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2002) 01-0099-06

禽白血病病毒(ALV)基因组的主要组成包括三个部分即编码病毒内部结构蛋白的 *gag* 基因,编码 RNA 依赖性的 DNA 聚合酶或反转录酶的 *pol* 基因和编码包膜蛋白的 *env* 基因^[1]。ALV 亚群特异性由 *env* 基因编码的蛋白所决定,*env* 基因编码有两个蛋白,其一是表面包膜蛋白 gp85,其二是穿膜蛋白 pg37。pg37 使 gp85 定着于细胞膜上。*env* 基因含有 2 个高变区 hr1、hr2 和 3 个可变区 vr1、vr2、vr3。高变区和可变区是决定 ALV 的中和性和特异性的关键区域,该区的某一个碱基或某一个氨基酸的改变将影响病毒的特性。不同毒株的差异性主要在高变区和可变区。1991 年,Payne 及其同事^[2]报道的新的非急性转化性禽白血病病毒为 J 亚群,生物学分析揭示了 J 亚群病毒不同于过去的 A-E 病毒亚群, J 亚群包膜基因可能是通过一个或几个外源性病毒和内源性病毒多次重组而产生^[3,4] (Bai 等 1995, Benson 等 1998)。近几年来,ALV-J 已呈流行趋势。根据 ALV-J 的致病特点和广泛的宿主范围,研究其包膜的生物学和生物化学特性,将有助于了解 ALV-J 的致病机制,从而提出控制 ALV-J 的程序。为此,我们对其包膜基因进行了克隆和表达,对其抗原特性进行了分析。

1 材料和方法

1.1 抗体

特异性抗 ALV-J 包膜糖蛋白单克隆抗体 G2.3、JE943 和 I45 系用杆状病毒系统 Sf9 细胞表达的 *env* 基因产物免疫小鼠,取其脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 NS1 细胞经 PEG 融合筛选而制成^[5]。

* 江苏省教育厅自然科学基金重点项目(OOKJB230002);教育部基金

作者简介:秦爱建(1961-),男,江苏通州人,现为扬州大学教授,博士。主要研究方向动物分子病毒学和免疫学。

收稿日期:2001-01-12,修回日期:2001-03-26

1.2 gp85 不同基因区域片段的 PCR 扩增

根据已报道的 ALV-J HPRS103 株的前 DNA 序列^[3]进行 gp85 的高变区和可变区 hr2、hr3、vr2、vr3 和 gp37 的 PCR 引物设计(图 1),再根据计算机对 PCR 引物的分析,对引物序列稍作上下游调整。设计的引物的序列组成如:

引物 1	5' GGGGATCCGGGGAGTTCATCTATTG3'	正向引物
引物 2	5' GGGTCGACTAAAATATCCAATTCTTG3'	反向引物
引物 3	5' GGGTCGACCTCTACGTTTATTGGACT3'	反向引物
引物 4	5' GGGTCGACGTTGCTGGAACATTTTGT3'	反向引物
引物 5	5' GGGGATCCGCTCGCTGAGTCGTCTCTCGCC3'	正向引物
引物 6	5' GGGTCGACGCGCCTGCTACGGTGGTG3'	反向引物
引物 7	5' GGGGTCGACGATTCCGCAAGTTTCATACCCCT-3'	反向引物

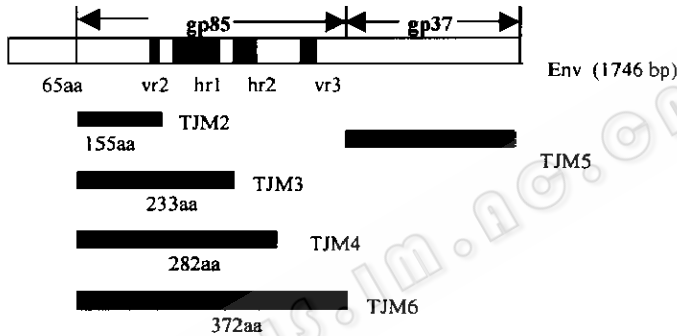


图 1 PCR 扩增 env 基因片段示意图

Fig. 1 fragment of envelope gene of ALV-J amplified by PCR

以引物 1 正向引物分别与反向引物 2,引物 3,引物 4,引物 6 进行扩增 ADOL-4817 病毒感染鸡胚成纤维细胞(CEF)的 DNA,产生的 PCR 产物分别命名为 TJM2、TJM3、TJM4、TJM6。以正向引物 5 与反向引物 7 扩增 gp37,PCR 产物称之为 TJM5。所有引物均含有一个 *Bam*HI 酶切位点或 *Sal*I 酶切位点,且扩增的 DNA 片段的蛋白质阅读框均必须与 GST 的 ORF 相吻合,PCR 反应的组成和反应条件与文献[6]报道的相同。

1.3 env-GST-融合蛋白表达性载体质粒的构建

将 PCR 片段 env 质粒和 GST 表达性载体质粒 pGEX-5X-3 连接(Pharmacia Biotech A B, Uppsala, Sweden),分别进行酶切,并用 T4DNA 连接酶进行连接,转化 TG1 细菌,筛选正确插入 DNA 片段的细菌菌落,质粒 DNA 进一步用内切酶消化和序列分析进行鉴定。

1.4 E. coli 表达 GST-env 融合蛋白

表达的方法按文献^[5]。简述如下,单个 pGST-env 转化的 *E. coli* (TG1)细胞克隆,接种于 2mL 2x TY-G 培养基(2x TY 含有 2% 葡萄糖,100 μ g/mL 氨苄青霉素),培养于 37 $^{\circ}$ C,振荡培养 5h,在细菌量达到 $A_{260} = 1 \sim 2$,用 0.1mmol/L IPTG (Boelinger, Mannheim corporation, Indianapolis, IN),诱导 5~6,细菌细胞经 PBS 洗涤 1 次并悬浮于 0.5mL H₂O 中,细胞悬液用超声波 30KHz 15s 破碎细菌,并离心除去细胞碎片,上清存放于 -20 $^{\circ}$ C 作为粗制的 GST-

env 融合蛋白。

1.5 Western blot

Western blot 其操作过程按文献[7]报道进行。

2 结果

2.1 ALV-J *env* 基因片段的克隆

对感染 ALV-J 毒株 ADOL-4817 的鸡胚成纤维细胞(CEF)进行基因组 DNA 抽提后,用不同引物对 ADOL-4817 毒株的 *env* 基因进行了 PCR 扩增,试验结果获得了大小分别为 0.25、0.49、0.64、0.92 和 0.6kb 的特异性条带,而与之对照的无 ALV-J 感染的鸡胚成纤维细胞系 DF1 细胞 DNA 不能扩增出相应的条带,说明此 PCR 扩增效果良好(见图 2)。将 PCR 产物经 1% 琼脂凝胶中电泳后,用 Qiagen 试剂盒分别对切割下的 DNA 条带进行纯化,使经纯化的 DNA 片段溶于 50 μ L TE buffer,取其 5 μ L 纯化的 DNA 片段按 5:1 的比率与 pCR-Blunt vector DNA 进行混合,并用 T4DNA 连接酶连接,最后用电穿孔的方法将连接混合物转化 *E. coli* TG1。结果在含 Zeocin 抗菌素的培养基上分别筛选出数百个菌落,经过小样质粒 DNA 制备和酶切分析,分别获得了数个阳性克隆。将这些插入正确 DNA 片段的质粒 DNA 分别命名为 pTJM2、pTJM3、pTJM4、pTJM5 和 pTJM6。其中 pTJM2 包含 gp85 基因的 Vr2;pTJM3 包含 gp85 基因的 Vr2 和 hr1;pTJM4 包含 TJM3 以及 gp85 基因的 hr2;pTJM5 为 *env* 基因中的 gp37 基因;pTJM6 为 *env* 基因中的 gp85 基因,它包含了 hr1、Hr2、Vr2 和 Vr3。

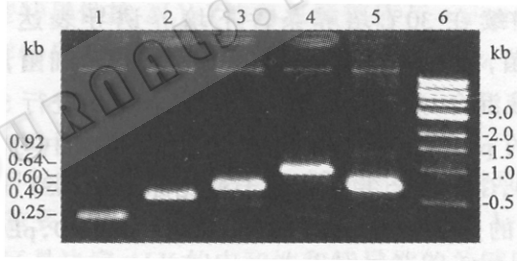


图 2 ALV-J ADOL4817 *env* 基因不同片段的 PCR 结果

Fig.2 Results of ALV-J ADOL4817 *env* gene fragment amplified by PCR

Lane1 ~ 5, PCR products of TJM2, TJM3, TJM4, TJM6 and TJM5 respectively; Lane 6, 1k standard DNA marker.

2.2 *env* 基因不同片段的 GST 融合蛋白载体的构建

将不同片段 *env* 基因从 pTJM2、pTJM3、pTJM4、pTJM5 和 pTJM6 中用 *Bam*HI 和 *Sal*I 双酶切下后,与经过相应酶切的 pGEX-5X-3 GST 融合蛋白载体质粒 DNA 进行连接反应,并转化 TG1 细菌,经挑取抗氨苄青霉素的白色细菌菌落小样培养制备质粒 DNA 再进行酶切鉴定,结果获得了数十个阳性克隆,将这些阳性克隆用 *Bam*HI 和 *Sal*I 或 *Eco*RI 单酶切和双酶切,均证明插入的 DNA 片段大小与原来设计的大小相符(图 3),这一结果证明了获得的阳性克隆是正确的,将这些克隆命名为 pGX-TJM2、pGEX-TJM3、pGEX-TJM4、pGEX-TJM5 和 pGEX-TJM6。

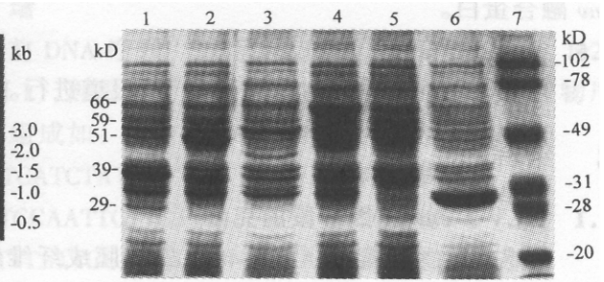
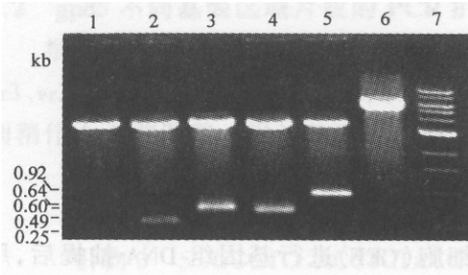


图3 ALV-J ADOL4817 env 基因不同片段的酶切分析

图4 SDS-PAGE 分析大肠杆菌表达 env 基因不同片段产物

Fig.3 Analysis results of truncated env gene digested with restricted enzymes

Fig.4 SDS-PAGE analysis results of truncated env-GST fusion protein expressed in Escherichia coli

Lane1 ~ 5, pGEX-TJM2, pGEX-TJM3, pGEX-TJM4, pGEX-TJM5 and pGEX-TJM6 respectively digested with BamHI 和 Sall;

Lane1 ~ 5, pGEX-TJM2, pGEX-TJM3, pGEX-TJM4, pGEX-TJM6 and pGEX-TJM5 GST fusion proteins respectively;

Lane 6, pGEX-TJM6 digested with BamHI; Lane7, 1k standard DNA marker.

Lane 6, GST protein; Lane7, molecular marker.

2.3 不同 GST-env 片段基因在大肠杆菌中表达的融合蛋白的鉴定

为了鉴定在大肠杆菌中表达的这些 env 基因片段,先将上述的 pGEX-TJM 阳性细菌克隆用 2x YT 培养基在 37℃ 培养 6h 后,然后在培养基中加入 2mmol/mL 的 IPTG 以诱导 GST-融合蛋白质的表达,继续在 30℃ 培养条件下培养诱导表达 6h。在培养结束后,以 10 000r/min 离心取出细菌,将细菌悬浮于 Lysis buffer 以裂解细菌,然后离心取上清作为样本与等量 2X 样本缓冲液混合,煮沸变性 5min 后离心加样,进行 SDS-PAGE 电泳分析。结果表明,本研究所构建的 pGEX-TJM 表达质粒,在大肠杆菌中均能高效表达相应的片段 env-GST 融合蛋白(图 4),GST 融合蛋白的分子量比原来的 GST 分子量增大。根据计算,表达的这些融合蛋白质的分子量分别是 pEGX-TJM2 为 39kD, pEGX-TJM3 为 49kD, pEGX-TJM4 为 53kD, pEGX-TJM5 为 51kD 和 pEGX-TJM6 为 66kD,去除 GST 的 29kD 分子量,这些 env 片段所表达蛋白质的分子量大小分别为 10kD、20kD、24kD、22kD 和 35kD,这些结果与理论计算获得的数值基本相符。

2.4 ALV-J 不同 env 基因片段的 GST 融合蛋白与抗体的反应

为了进一步鉴定这些表达蛋白的抗原性,我们又用 Western blot 的方法作了鉴定。在 SDS-PAGE 分离蛋白质后,再将分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,用单克隆抗体进行检测。结果表明 Mab G2 和 JE9 及 I45 均不能与 pGEX-TJM5 表达的 GST-gp37 蛋白反应,相反,这些 Mabs 却能与 env 基因的 GST-gp85 产生很强的反应性。这说明 Mab G2、JE9 和 I45 是抗 ALV-J env 基因表达的 gp85 的特异性单克隆抗体。用这些单克隆抗体与不同片段 env-GST 融合蛋白进行 Western blot 的反应结果表明,单克隆抗体 G2 和 JE9 识别的抗原表位位于 env 基因的同域(gp85 的氨基酸 65 ~ 155 #)(图 5-A),而 I45 识别的抗原表位位于 env 基因的另一区域(156 ~ 233 #)(图 5-B),单抗的这一特异性反应结果表明,这些单克隆抗体所针对的抗原表位位于 env 基因的 gp85 蛋白上,而不是 env 基因的 gp37 蛋白。

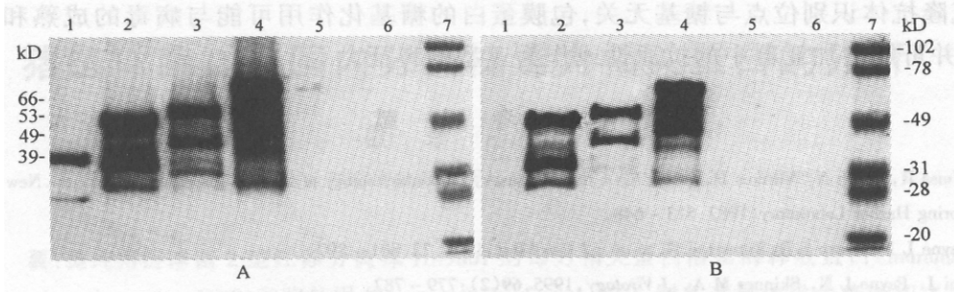


图 5 Western blot 分析 *env* 基因不同片段 GST 融合蛋白

Fig.5 Western blot results of truncated *env*-GST fusion protein

Lane1 ~ 5, pGEX-TJM2, pGEX-TJM3, pGEX-TJM4, pGEX-TJM6 and pGEX-TJM5 GST fusion proteins respectively;

Lane 6, GST protein; Lane7, Molecular marker.

A, Resacted with G2 monoclonal antibody specific to ALV-J envelope protein; B, Reasted with I45 monoclonal antibody specific to ALV-J envelope protein.

2.5 ALV-J 氨基酸多肽决定其亚群特异性

研究结果证明,抗 ALV-J 特异性单克隆抗体 JE9、G2 和 I45 是 ALV-J 亚群所特异的单抗,以此单抗对大肠杆菌表达的 GST-gp85 和 gp37 融合蛋白进行 Western blot 检测结果证明所有三株特异性抗 ALV-J 的单克隆抗体均能呈现强阳性反应,由于大肠杆菌在表达蛋白质时不能对表达产物进行糖基化后加工,所表达的蛋白质不含有糖基成分,主要是表达氨基酸多肽链,所以这些特异性抗 ALV-J 的单克隆抗体与 *env* gp85 的氨基酸多肽发生反应,说明了 ALV-J 的亚群特异性由 *env* 基因的氨基酸多肽决定。

3 讨论

ALV *env* 基因表达的包膜糖蛋白,特别是 gp85,在病毒感染动物和诱导动物产生抗病毒亚群特异性抗体具有重要作用^[8]。*env* 基因含有 2 个高变区 hr1、hr2 和 3 个可变区 vr1、vr2、vr3。高变区和可变区是决定 ALV 的中和性和特异性的关键区域,该区的某一个碱基或某一个氨基酸的改变将影响病毒的特性。本研究采用 PCR 扩增的方法将 ALV-J *env* 基因不同片段(区)进行了克隆,并构建了 *env* 基因片段 GST 融合蛋白载体。用 Western blot 实验证明大肠杆菌表达的不同 *env* 基因片段的 GST 融合蛋白能与单克隆抗体产生特异性反应性,然而,不同单克隆抗体在包膜蛋白上识别的位点表现不一样,其中单克隆抗体 JE9 和 G2 识别的抗原位点位于 gp85 的氨基酸 65 ~ 155 #,而 I45 识别的抗原表位位于 *env* 基因的另一区域(156 ~ 233 #),JE47 在 western blot 实验中无反应,这些结果证明包膜蛋白在不同片段的抗原性有明显的差异,这一结果与其他反转录病毒研究的结果相一致^[9]。用这些基因片段表达产物免疫小鼠的初步结果也表明了 ALV-J 的中和性位点位于包膜蛋白的 Vr3,但单一的 Vr3 区诱导产生的中和活性并不显著,当与 Vr2 片段共同免疫时,其中和活性显示有协同作用。有关工作正在深入研究。

本研究用抗 ALV-J 包膜蛋白特异性单克隆抗体与大肠杆菌表达的非糖基化的 gp85-GST 融合蛋白反应的结果证明了,ALV-J 亚群特异性决定于多肽的氨基酸排列顺序,而非糖基化部分,因为大肠杆菌表达的基因产物不能进行表达产物糖基化后加工。所有实验

的单克隆抗体识别位点与糖基无关,包膜蛋白的糖基化作用可能与病毒的成熟和感染有关^[10],并可能增加亚群中的抗原性或作为亚型的特征。

参 考 文 献

- [1] Weiss R, Teich N, Varmus H, *et al.* RNA tumor viruses, *Molecular biology of tumor viruses*, second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 513 ~ 648.
- [2] Payne L N, Brown S R, Burnstead N, *et al.* *J Gen Virol*, 1991, **72**: 801 ~ 807.
- [3] Bai J, Payne L N, Skinner M A. *J Virology*, 1995, **69**(2): 779 ~ 782.
- [4] Benson S J, Ruis B, Garbers A L, *et al.* *J Virol*, 1998, **72**(12): 10302 ~ 10304.
- [5] 秦爱建, 崔治中, Lee L, 等. 病毒学报, 2001, **1**: 52 ~ 58.
- [6] 秦爱建, 崔治中, Lee L, 等. 中国病毒学, 2001, **1**: 68 ~ 73.
- [7] Qin A, Cui Z. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1994, **10**(3): 195 ~ 201.
- [8] Hunt H D, Lee L F, Foster D, *et al.* *Virology*. 1999, **264**(1): 205 ~ 210.
- [9] Cheng-Mayer C, Brown A, Harouse J, *et al.* *J Virol*, 1999, **73**(7): 5294 ~ 5300.
- [10] Delwart E L, Panganiban A T. *Virology*, 1990, **179**(2): 648 ~ 657.

Antigen Analysis of Envelope Gene Products of Avian Leukosis Virus Subgroup J

Qin Aijian Liu Yuelong Jin Wenjie

(Department of veterinary medicine, Yangzhou University, Yangzhou, China 225009)

Lucy Lee Aly Fadly

(Avian disease and oncology laboratory, USDA, East Lansing, MI 48823 USA)

Abstract: Envelope glycoprotein of avian leukosis virus Subgroup J (ALV-J) determines the host range of virus infection and cross-neutralization patterns. The truncated envelope genes of avian leukosis virus subgroup J (ALV-J) were amplified by PCR and cloned them into pGEX-5X-3 vector for expressing *env* GST-fusion protein. Western blot analysis results showed that the products of truncated *env* gene expressed in *Escherichia coli* could reacted with G2, JE9 and I45 monoclonal antibodies (Mabs) specific to envelope protein of ALV-J. Using different Mabs to map the epitopes in the expressed truncated gp85 GST fusion protein, the results showed that Mab G2 and JE9 antibodies recognizing epitope in gp85 was localized between amino acid 65 ~ 155. Mab I45 reacted with the epitope at the location of amino acid 156 ~ 233. It indicated that the specificity of subgroup J virus is determined by the gp85 peptide since GST-gp85 protein expressed in *Escherichia coli* is not glycosylated.

Key words: Avian leukosis virus, subgroup J, Antigen analysis, Envelope gene, Envelope protein