

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

54 (3) :352 - 358; 4 March 2014

ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicroen

doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.03.013

禽网状内皮组织增生症病毒 p30-gp90 串联表达蛋白及其免疫原性

陈瑞爱^{1,2}, 李延鹏³, 郭凯¹, 刘正伟¹

¹华南农业大学兽医学院, 广东 广州 51000

²广东大华农动物保健品股份有限公司, 广东 广州 527400

³中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

摘要:【目的】研究禽网状内皮组织增生症病毒 (Reticuloendotheliosis Virus, REV) 群特异性抗原 P30 与囊膜糖蛋白 gp90 体外共表达蛋白的免疫原性, 为研发新型 REV 抗体诊断试剂盒提供基础。【方法】根据 REV 脾脏坏死病毒 (spleen necrosis virus, SNV) 株的前病毒基因组 cDNA 序列, 设计合成 2 对引物, 以 pPB101 质粒为模板, 分别扩增 REV p30 基因和 gp90 基因片段。将 PCR 产物依次克隆入表达载体 pET-28a (+) 中, 通过酶切鉴定和测序分析, 筛选阳性重组克隆 pET-p30-gp90。重组菌经异丙基硫代 D-半乳糖苷 (IPTG) 诱导后, 通过 SDS-PAGE 电泳分析表达情况, Western blot 检测表达蛋白与特异性血清之间的反应性。制备表达蛋白的抗血清, 以该抗血清与 REV 感染的鸡胚成纤维细胞 (CEF) 进行间接免疫荧光实验 (IFA), 验证表达蛋白的免疫原性。【结果】经 SDS-PAGE 电泳后能观察到预期大小的表达条带, Western blot 结果显示, 重组蛋白能与 REV 抗血清反应。将表达产物纯化后免疫 Balb/c 小鼠, 制备 p30-gp90 抗血清, 该抗血清与 REV 感染 CEF 在 IFA 中呈现特异性荧光反应。【结论】体外串联表达 REV p30-gp90 蛋白, 表达蛋白具有良好的免疫原性。

关键词: 禽网状内皮组织增生症病毒, p30, gp90, 免疫原性

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2014) 03-0352-07

禽网状内皮组织增生症 (Reticuloendotheliosis, RE) 是由逆转录病毒科的禽网状内皮组织增生症病毒 (REV) 引起的鸡、鸭、火鸡和其他禽类的一种以淋巴-网状细胞增生为特征的肿瘤性病理综合征^[1-2]。REV 已经呈世界性分布, 该病在澳大利亚、匈牙利、英国、德国等国均有报道, 我国于 1988 年在南京首次分离到 REV-C45 株^[3]。由于其具有

致癌性, 感染后会引起禽的免疫抑制, 干扰其他禽病疫苗的免疫效果, 导致免疫失败^[4]。因此, REV 成为继马立克氏病病毒 (MDV)、禽白血病病毒 (ALV) 之后又一重要的禽致癌性病毒, 而且常与其他病毒混合感染, 使养禽业生产性能下降, 造成严重的经济损失^[5]。

REV 是逆转录病毒, 属逆转录病毒科 C 型逆转

基金项目: 重大动物疫病新型疫苗的关键技术与产业化 (2011A090200117)

作者简介: 陈瑞爱 (1970 -), 女, 广东新兴县人, 教授, 博导, 从事兽医微生物与免疫学研发。Tel: +86-766-2986727; E-mail: chenruiaidhn@126.com

收稿日期: 2013-07-16; **修回日期:** 2013-09-14

录病毒属,其基因组为单股 RNA,其基因序列的同源性与哺乳动物的反转录病毒很接近^[6-7],主要包括 gag、pol 和 env 等结构基因以及两端的长末端重复序列(LTR)。gag 是 REV 的核衣壳蛋白基因,位于 1034 - 2533 位碱基之间,全长 1500 bp,共 499 个氨基酸,编码 P12、PP18、PP20、P30、PP10 五种结构蛋白。P30 是主要的群特异性抗原,在病毒粒子的装配中起作用^[8]。env 是 REV 的囊膜糖蛋白基因,也是 REV 的主要变异基因,与产生中和抗体有关。env 基因位于 6052 - 7812 位碱基之间,全长 1761 bp,共编码 586 个氨基酸,具有 9 个可能的糖基化位点,编码两种糖蛋白 gp90 和 gp20, gp20 为穿膜蛋白,而 gp90 蛋白是 REV 的表面囊膜糖蛋白,含有顺序和构象抗原表位,是 REV 病毒的保护性抗原,具有受体结合功能,能够激发感染宿主产生中和抗体^[9-10]。

本研究将 REV 群特异性抗原编码基因 p30 和囊膜糖蛋白 gp90 基因串联,成功实现了串联基因在大肠杆菌体内的表达。经 Western blot 检测,表达蛋白能与 REV 特异性抗血清反应。将纯化的表达产物免疫小鼠后,制备抗血清,能与 REV 感染的鸡胚成纤维细胞呈现特异性阳性反应。研究表明,体外表达的重组串联 p30-gp90 蛋白具有良好的免疫原性,为研发高敏感性的 REV 抗体诊断试剂盒奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株:质粒 pPB101(含 REV SNV 株前病毒基因组 cDNA)购自美国菌种保藏中心(ATCC);原核表达载体 pET-28a(+),大肠杆菌工程菌 DH5 α 、BL21(DE3)由本实验室保存。

1.1.2 试剂:T4 DNA 连接酶、Taq LA 酶、限制性内切酶、质粒小提试剂盒、凝胶回收试剂盒、DNA marker 和小分子蛋白 Marker 等均购自大连宝生物工程公司;弗氏完全佐剂与不完全佐剂、辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗鸡 IgG 抗体、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠 IgG 抗体均购自 Sigma 公司;鸡源 REV 多克隆抗体购自美国 Charles River 公司;脂质体(Lipofectamine)购于 Gibco BRL 公司。

1.2 PCR 扩增

1.2.1 引物设计与合成:参照 REV SNV 株基因组序列,利用 Lasergene 软件设计 2 对引物。用于扩增 p30 的引物为:上游引物 F(p30): 5'-TAGAATTTCGATGATTGCCAGCAA-3', 5'端含 EcoRI 位点;下游引物 R(p30): 5'-GCGTCGACTAATTCCTCTACCAA-3', 5'端含 Sal I 位点,预期的 PCR 产物大小为 726 bp。用于扩增 gp90 的引物为:上游引物 F(gp90): 5'-CAGGTCGACCAGATAGCTACTCA-3', 5'端 Sal I 位点;下游引物 R(gp90): 5'-AGACTCGAGGACATCTTCAATCA-3', 5'端含 XhoI 位点,预期的 PCR 产物大小为 996 bp。引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.2.2 p30 和 gp90 基因的扩增:p30 和 gp90 基因的 PCR 扩增反应体系如下:pB101 质粒模板 1 μ L, 上游引物 1 μ L (25 pmol), 下游引物 1 μ L (25 pmol), 10 \times reaction buffer 5 μ L, dNTP 4 μ L, Taq LA 酶 1 μ L, 补水至总体积 50 μ L。反应程序均为:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 45 s, 54 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 进行 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析,大小正确后,用凝胶回收试剂盒回收。

1.3 重组质粒 pET-P30-gp90 的构建

将 p30 PCR 产物用 EcoRI 和 Sal I 双酶切,回收 PCR 酶切产物,与同酶处理的 pET-28a(+)载体进行连接,转化 DH5 α 感受态细胞,随机挑取 4 个生长出的单个菌落,接种含卡那霉素的 LB 液体培养基(kan 终浓度为 50 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 过夜培养,次日提取质粒进行酶切鉴定,获得的阳性质粒命名为 pET-p30。

将 gp90 PCR 产物用 Sal I 和 XhoI 双酶切,回收后与同酶处理的 pET-p30 质粒进行连接,转化 BL21(DE3)感受态细胞。按上述方法酶鉴定,将酶切鉴定的阳性克隆送至上海生工生物技术有限公司进一步测序验证,阳性克隆命名为 pET-p30-gp90。

1.4 重组质粒的诱导表达

将空载体与重组质粒分别重新转化宿主菌 BL21(DE3)感受态细胞,挑取单菌落接种含卡那霉素的 LB 液体培养基,于 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 12 h 以上。取培养菌液按照 1:100 转接种 2 \times YT 培养基,37 $^{\circ}$ C 培养至 $OD_{600} = 0.4 - 0.5$ 时,加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG),于 30 $^{\circ}$ C 诱

导培养 4 h 后收集菌液。将收集的菌液 $10000 \times g$ 离心 10 min, PBS 洗涤菌体沉淀, 超声裂解(工作时间 5 s, 间隔时间 5 s, 循环 99 次)。裂解产物 $10000 \times g$ 离心 10 min 后收集上清, 按照分子克隆实验指南上的方法进行 SDS-PAGE。电泳结束后, 置于考马斯亮蓝染液中染色 1 h, 转移到脱色液中脱色。

1.5 免疫印迹法(Western blot)检测表达蛋白

将 1.4 中裂解产物经 SDS-PAGE 后, 转印至 NC 膜上, 5% 脱脂乳封闭过夜后, 用 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 将 NC 膜置于 1:100 稀释的 REV 抗血清常温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 洗涤后的 NC 膜置于 1:10000 稀释的 HRP 标记的兔抗鸡 IgG 抗体溶液中作用 1 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 将洗涤好的 NC 膜用 DAB 辣根过氧化物酶显色试剂显色。

1.6 p30-gp90 多抗血清的制备

p30-gp90 表达产物经 BCA 蛋白浓度定量后, 与等量弗氏完全佐剂乳化后, 按 $200 \mu\text{g}/\text{只}$ 腹腔注射 6 周龄的 Balb/c 小鼠。隔 2 周用等量的弗氏不完全佐剂乳化后, 进行二免, 隔 2 周后, 用 p30-gp90 融合蛋白加强免疫 1 次, 10 天后内眦眶静脉窦采血, 分离血清。

1.7 REV 拯救及间接免疫荧光法(IFA)检测

1.7.1 pPB101 质粒转染: 提取包含 SNV 全基因组的质粒 pPB101 并定量, 按常规制备鸡胚成纤维细胞(CEF), 参照 GiBco BRL 公司 Lipofectamine 说明书将 pPB101 转染 CEF。简略步骤如下: $2 \mu\text{g}$ 待转染的质粒 pPB101 及 $4 \mu\text{L}$ 脂质体稀释于 $200 \mu\text{L}$ 不含血清的 DMEM 中, 室温下孵育 30 min 后, 加入 1.2 mL 不含血清的 DMEM, 轻轻摇匀, 配成转染溶液; 将转染溶液轻轻加入到生长密度达 80% 的 CEF 细胞表面, 37°C $5\% \text{ CO}_2$ 孵育 12 h 后吸除无血清培养液, 换入含 1% 血清的 DMEM 培养基继续培养 120 h 以上。同时设平行转染空载体 pSK 作为阴性对照。

1.7.2 IFA 检测拯救的 REV 病毒: 用丙酮:乙醇(3:1 = V:V) 固定液固定后, 按一般方法进行 IFA, 使用的一抗体为 1.6 中制备的血清(1:100 稀释), 二抗为异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠 IgG 抗体, 最后在荧光显微镜下观察并拍摄实验结果。

2 结果

2.1 p30 和 gp90 基因的扩增以及重组质粒的构建

以质粒 pPB101 为模板, F(p30) 和 R(p30) 为引物, 扩增获得了与预期大小为 726 bp 的目的条带; 以 F(gp90) 和 R(gp90) 为引物, 扩增获得了与预期大小为 996 bp 的目的条带(图 1)。经连接、转化后筛选得到的重组质粒, 酶切鉴定于预期吻合(图 1)。经测序鉴定, 结果与已 SNV 株公布的基因序列一致。

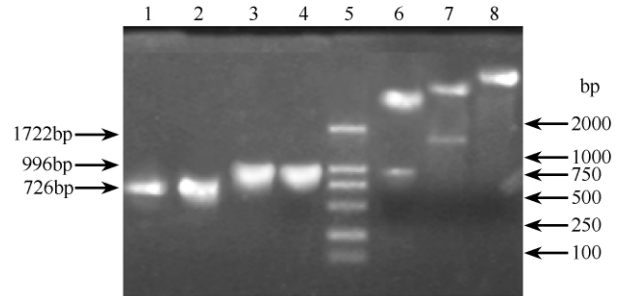


图 1. p30 和 gp90 基因的 PCR 扩增及重组质粒酶切结果电泳图

Figure 1. PCR amplification of the p30 and gp90 genes and restriction enzyme analysis for the recombinants. Lane 1 - 2: p30 PCR products; lane 3 - 4: gp90 PCR products; lane 5: DL2000 marker; lane 6: pET-p30-gp90 recombinant digested by *Sal* I and *Xho* I; lane 7: pET-p30-gp90 recombinant digested by *EcoR* I and *Xho* I; Lane 8: pET-p30-gp90 recombinant digested by *EcoR* I.

2.2 p30-gp90 重组蛋白的表达与鉴定

阳性重组质粒 pET-p30-gp90 转化 BL21 感受态细胞, 经 IPTG 诱导后, 发现重组菌裂解物在相对分子质量约 60 kDa 的位置出现 1 条蛋白条带(图 2)。将菌体超声波裂解, 离心取裂解物上清与沉淀, 分别进行 SDS-PAGE 分析, 结果表明: 细胞裂解上清中目的蛋白的量较多, 而沉淀中几乎没有, 这表明目的蛋白是以上清表达形式表达。将重组菌裂解产物进行经 SDS-PAGE 电泳后, 转移至 NC 膜上硝酸纤维素膜(NC)膜上, 用 REV 抗血清进行 Western blotting 鉴定, 结果在大约 60 kDa 位置处出现特异性的条带(图 3), 表明本研究表达的 p30-gp90 蛋白能与 REV 阳性血清反应, 具有良好的免疫反应性。

2.3 p30-gp90 抗血清的制备与 IFA 检测

将 p30-gp90 表达蛋白产物免疫 6 周龄 Balb/c

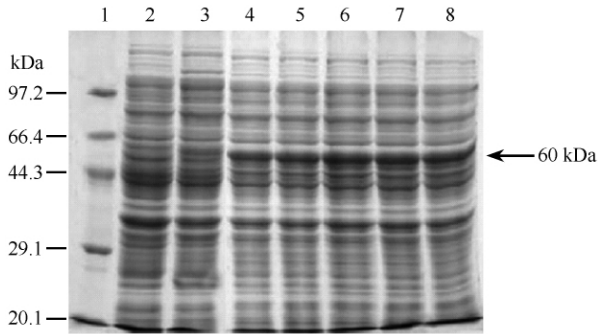


图 2. pET-p30-gp90 重组菌的诱导表达 SDS-PAGE 分析

Figure 2. SDS-PAGE analysis for the expression p30-gp90 induced by the recombinant pET-p30-gp90. Lane 1. Protein marker with low molecular weight; lane 2. The lysis of *E. coli*. BL21 (DE3) without plasmids; lane 3. The lysis of *E. coli*. BL21 (DE3) containing plasmid pet28a; lane 4-8. The lysis of *E. coli*. BL21 (DE3) containing plasmid pET-p30-gp90.

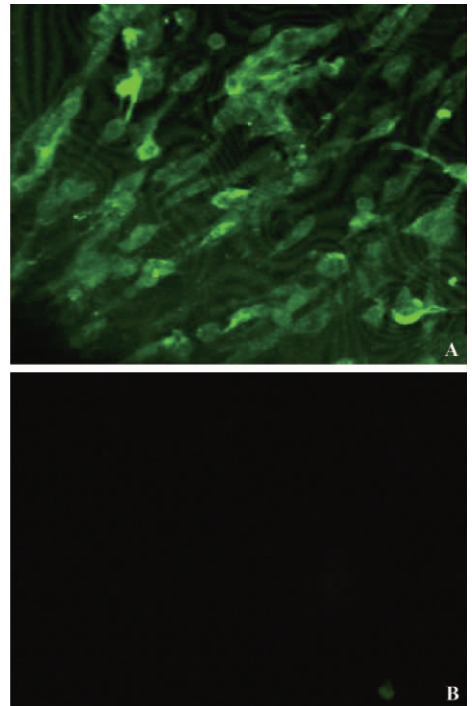


图 4. SNV 转染拯救病毒与 p30-gp90 抗血清 IFA 结果

Figure 4. IFA detection for SNV rescued viruses with p30-gp90 antiserum. A: p30-gp90 anti-mouse serum; B: normal mouse serum (show negative).

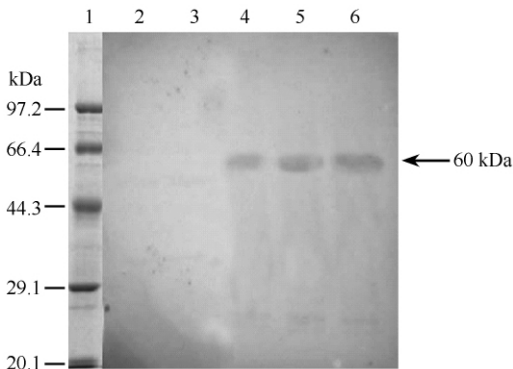


图 3. pET-p30-gp90 重组表达蛋白的 Western blot 分析

Figure 3. Western blot analysis for the expression p30-gp90 induced by the recombinant pET-p30-gp90. Lane 1. Protein marker with low molecular weight; lane 2. The lysis of *E. coli*. BL21 (DE3) without plasmids; lane 3. The lysis of *E. coli*. BL21 (DE3) containing plasmid pet28a; lane 4-6. The lysis of *E. coli*. BL21 (DE3) containing plasmid pET-p30-gp90.

小鼠 3 次后分离血清, 将分离得到的抗血清与 SNV 全基因组质粒转染的 CEF 进行 IFA 试验, 结果 pPB101 质粒转染的 CEF 在荧光显微镜下, 可观察到胞浆中呈现特异性绿色荧光 (图 4), 非免疫的阴性对照血清在 IFA 中无荧光, 表明本研究表达的 p30-gp90 蛋白免疫动物后, 能产生具有与 REV 病毒反应的能力, 表达蛋白具有良好的免疫原性。

3 讨论

REV 最早是 1958 年从患有内脏型淋巴瘤的火鸡脾脏中分离, 经过火鸡和鸡 300 次连续传代而获得的病毒。目前分离到的 REV 有 30 多株, 虽然不同毒株的致病力不同, 但均具有相似的抗原特性^[11]。REVs 主要包括 REV-T 株、鸡合胞体病毒 (CS)、脾坏死病毒 (SNV)、鸭传染性贫血病毒 (DIA) 及 C45 株^[12]。其中, SNV 虽然分离于鸭体, 但其基因组组装过程更接近哺乳动物逆转录病毒, 其 env 蛋白与 D 型逆转录病毒更为接近, 受体与 baboon 内源性逆转录病毒和 Mason-Pfizer 猴病毒相同^[13-14]。

REV 由 gag、pol 和 env 等结构基因以及两端的长末端重复序列 (LTR) 组成, 其中 gp90 蛋白由 env 基因编码, 其 C 端抗原表位位于感染细胞的表面, 含有顺序和构象表位, 是病毒的免疫显性蛋白^[15], 能够激发感染宿主产生中和抗体^[16]。gp90 编码基因容易变异, 对不同地区不同时间分离的 REV 全基

因组测序表明, env 基因序列同源性在 92 % 以上, gp90 可能与病毒的变异、毒力、致病性、致病机理等有关^[17]。

REV 不同分离株虽属同一个血清型,但国内外分离的不同种属来源、不同年代的毒株之间基因的同源性 91.3% - 99.5%, 其中 1999 年中国分离株 HA9901 与鸭源的 SNV 株同源性最低 (91.3%)。对 REV 致病性的研究表明:不同种属来源的毒株都造成了 1 日龄 SPF 鸡的生长迟缓和 NDV 和 AIV 油乳苗免疫后 HI 抗体滴度的抑制作用,但他们之间的致病性并无显著差异。这说明 REV 的致病性与 env 蛋白之间的相关性尚有待进一步证实^[18]。能有效提高了 REV 诊断的进行免疫学检测是 REV 确诊的关键所在。而衣壳蛋白 P30 是构成病毒粒子双层衣壳的内壳-衣壳主要组分,在病毒粒子的装配中发挥着重要作用,其氨基酸组成相对保守,同属病毒的衣壳蛋白具有相同或相似的抗原性,比如有一个与其他不同亚类逆转录病毒共同的抗原簇,即²⁴SDLYNWK³⁰,是 REV 群特异性抗原,适合用于家禽的群体监测和筛查^[18]。

国内已有学者针对本研究中的 p30 和 gp 90 基因分别建立了大肠杆菌表达系统,并获得了具有良好免疫原性的表达蛋白^[11, 18]。由于 p30 是 REV 群特异性抗原,建立在 p30 基础上的检测方法应该会提高检测的特异性,但它并不是主要的免疫保护性抗原,机体内产生的抗体水平会受到一定程度的限制,从而在一定程度上影响检测的敏感性。gp90 是 REV 的主要免疫保护性抗原,抗体水平产生较高,提高了检测的敏感性。在此背景下,本研究选择群特异性的抗原 p30 和主要免疫保护性抗原 gp90,并将二者串联,获得了理想的表达,避免了单纯使用其中一种蛋白可能导致敏感性和特异性下降。

为了能使串联蛋白得到较好的表达,本研究首先对 p30 和 gp 90 蛋白进行抗原性分析,切除了 p30 基因前 180 bp,选取了 gp 90 基因 325 - 1320 bp 之间的大小为 996 bp 抗原性较强的部分。串联后基因大小为 1722 bp,在大肠杆菌体内最终获得了良好的表达效果。

为了验证 p30-gp90 蛋白的抗原反应性和免疫原性,本文分别用表达蛋白与 REV 的抗血清进行 Western blotting 分析,结果显示表达蛋白与特异性血清之间的良好反应性;以表达蛋白制备的抗血清

同样能与 REV 感染的细胞呈免疫学阳性反应,表明表达蛋白具有良好的免疫原性。本研究为下一步利用 p30-gp90 作为包被抗原,建立适用于临床检测的 ELISA 检测技术,用于监测家禽体内网状内皮增生症病毒的感染奠定了基础。

参考文献

- [1] Cui Z, Sun H, Zhu C. Investigation on the infection of avian leucosis and reticuloendotheliosis. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 1987, (1) : 37-38. (in Chinese)
崔治中, 孙怀昌, 朱承如. 禽白血病及禽网状内皮增生病感染情况的调查. *中国畜禽传染病*, 1987, (1) : 37-38.
- [2] Kang CY, Temin HM. Lack of sequence homology among RNAs of avian leucosis sarcoma viruses reticuloendotheliosis viruses, and chicken endogenous RNA directed DNA polymerase activity. *Journal of Virology*, 1973, 12:1314-13241.
- [3] Li G, Ren X, Yang G, Liu G. Study on the virus distribution in different organs for SPF chicks infected by reticuloendotheliosis virus. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 1999, 29 (1) : 6-7. (in Chinese)
李广兴, 任晓峰, 杨贵君, 刘忠贵. 网状内皮组织增殖病病毒感染 SPF 雏鸡后病毒在各器官内的分布. *中国兽医科技*, 1999, 29 (1) : 6-7.
- [4] Witter RL. Reticuloendotheliosis. // Calnek BW. *Disease of Poultry*. 10th eds. Ames, USA: Iowa State University Press, 1997. 467-484.
- [5] Hu B, Huang Y, Lu X. Serological surveys on antibodies against avian reticuloendotheliosis virus, chicken anemia virus and avian leucosis virus in meat-type breeding chickens. *Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science*, 2009, (34) : 25-27. (in Chinese)
胡北侠, 黄艳艳, 路希山. 禽网状内皮组织增生症、鸡传染性贫血和禽白血病血清学调查. *广东畜牧兽医科技*, 2009, (34) : 25-27.
- [6] Lovinger GG, Mark G, Todaro GJ, Schochetman G. 5'-terminal nucleotide noncoding sequence of retroviruses: relatedness of two old world primate type C viruses and avian spleen necrosis virus. *Journal of Virology*, 1981, 39:238-2451.
- [7] Rice NR, Bonner TI, Gilden RV. Nucleic acid homology

- between avian and mammalian type C viruses: relatedness of reticuloendotheliosis virus cDNA to cloned proviral DNA of the endogenous colobus virus CPC-11. *Virology*, 1981, 114: 286-2901.
- [8] Weaver TA, Talbot KJ, Panganiban AT. Spleen necrosis virus gag polyprotein is necessary for particle assembly and release but not for proteolytic processing. *Virology*, 1990, 64: 2642-2652.
- [9] Jackson CA, Dunn SE, Smith DI, Gilchrist PT, Macqueen PA. Proventriculitis "Nakanuke" and reticuloendotheliosis in chickens following vaccination with herpesvirus of turkeys. *Journal of Veterinary*, 1977, 53: 457-458.
- [10] Ji R, Cui Z, Wang X, Sun S. Study of the infectivity of the molecular reticuloendotheliosis virus and its genome. *Chinese Journal of Virology*, 2005, 21 (6): 448-455. (in Chinese)
吉荣, 崔治中, 王锡乐, 孙淑红. 分子克隆化禽网状内皮组织增生症病毒传染性及其前病毒全基因组序列研究. *病毒学报*, 2005, 21 (6): 448-455.
- [11] Ji R, Cui Z, Ding J, Qin A, Liu Y. Expression of avian reticuloendotheliosis virus envelope gp90 in *E. coli*. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2003, 1 (23): 28-32. (in Chinese)
吉荣, 崔志中, 丁家波, 秦爱建, 刘岳龙. 禽网状内皮组织增生症病毒囊膜糖蛋白 gp90 的原核表达. *中国兽医学报*, 2003, 1 (23): 28-32.
- [12] Ma S, Zheng S. The immunosuppression and molecular biological characteristic of avian reticuloendotheliosis virus. *Progress in Veterinary Medicine*. 2007, 28 (4): 57-60. (in Chinese)
- 马春霞, 郑世民. 禽网状内皮组织增生症病毒分子生物学特性与免疫抑制. *动物医学进展*, 2007, 28 (4): 57-60.
- [13] Idali M and Ralph D. Mapping of receptor binding domains in the envelope protein of spleen necrosis virus. *Journal of Virology*, 1995, 69 (7): 4339-4346.
- [14] Kewalramani VN, Panganiban AT, Emerman M. Spleen necrosis virus, an avian immunosuppressive retrovirus, shares a receptor with the type D simian retroviruses. *Journal of Virology*, 1992, 66: 3026-3031.
- [15] Davidson I, Yang H, Witter RL, Malkinson M. The immunodominant proteins of reticuloendotheliosis virus. *Veterinary Microbiology*, 1996, 49: 273-284.
- [16] Cui Z, Du Y, Zhao W, Ji R, Cai J. Reticuloendotheliosis virus infection and immunodepression of chicken flocks. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2000, 34 (1): 1-3. (in Chinese)
崔治中, 杜岩, 赵文明, 吉荣, 柴家前. 禽网状内皮组织增生症病毒感染和鸡群的免疫抑制. *中国兽药杂志*, 2000, 34 (1): 1-3.
- [17] Delwart EL, Panganiban AT. Role of reticuloendotheliosis virus envelope glycoprotein in superinfection interference. *Virology*, 1989, 63 (1): 273-280.
- [18] Zhang S, Yu S, Chen H, Ding C. Prokaryotic expression and detection of p30 protein of avian reticuloendotheliosis virus. *Chinese Journal of Animal Infectious Disease*, 2011, 19 (6): 15-19. (in Chinese)
张石磊, 于圣青, 陈鸿军, 丁铲. 禽网状内皮组织增生症病毒 p30 蛋白的表达及检测. *中国动物传染病学报*, 2011, 19 (6): 15-19.

Immunogenicity of co-expressed p30-gp90 against Reticuloendotheliosis virus

Ruiai Chen^{1,2*}, Yanpeng Li³, Kai Guo¹, Zhengwei Liu¹

¹South China Agricultural University, Guangzhou 51000, Guangdong Province, China

²Guangdong Dahuanong Animal Health Products Co. Ltd, Guangzhou 527400, Guangdong Province, China

³Biotechnology Research Institute, Chinese Agricultural Academic Science, Beijing 100081, China

Abstract: [Objective] To study the immunogenicity of co-expression of p30, one of a group specific antigens, and glycoprotein gp90 genes of Reticuloendotheliosis virus (REV). [Methods] p30 and gp90 genes were amplified with the template of plasmid pPB101 containing the whole sequence of spleen necrosis virus (SNV), and cloned into pET-28a(+) vector. The positive clone pET-p30-gp90 was identified by enzyme analysis and sequencing. The co-expressed protein p30-gp90 was confirmed by SDS-PAGE and Western blot analysis. After quantitation, the purified protein p30-gp90 was immunized to Balb/c mice three times to prepare the p30-gp90 specific anti-serum. Afterwards, we detected the REV infected Chick Embryo Fibroblasts (CEF) by Immunofluorescence assay (IFA) with the prepared anti-serum. [Results] The p30-gp90 was co-expressed efficiently by SDS-PAGE and Western blot analysis. The anti-serum of p30-gp90 reacts with REV infected CEF in IFA. [Conclusion] The expressed protein of p30-gp90 keeps good immunogenicity.

Keywords: Reticuloendotheliosis virus, p30, gp90, immunogenicity

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Innovative Vaccine Research and Industrialization for Major Animal Epidemics (2011 A090200117)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-766-2986727; E-mail: chenruiaidhn@126.com

Received: 16 July 2013/Revised: 14 September 2013

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。