

梅 梅, 胡晓田, 秦爱建, 等. A 亚群禽白血病病毒 *env* 基因在昆虫细胞中的表达与鉴定[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(6): 1316-1320.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.06.017

## A 亚群禽白血病病毒 *env* 基因在昆虫细胞中的表达与鉴定

梅 梅<sup>1,2</sup>, 胡晓田<sup>2,3</sup>, 秦爱建<sup>2,3</sup>, 陆吉虎<sup>1,2</sup>, 张雪花<sup>1,2</sup>, 侯继波<sup>1,2</sup>, 唐应华<sup>1,2</sup>

(1.江苏省农业科学院动物免疫工程研究所, 江苏 南京 210014; 2.江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009; 3.扬州大学江苏省动物预防医学重点实验室, 江苏 扬州 225009)

**摘要:** 为获得 A 亚群禽白血病病毒 (ALV-A) *env* 基因的表达产物, 以 ALV-A AH10 毒株病毒 RNA 为模板, 通过反转录 PCR 扩增得到 *env* 基因, 将其克隆到转移载体 pFastBac1 中, 转化 DH10Bac 感受态细胞, 获得重组穿梭质粒 rBacmid-*envA*, rBacmid-*envA* 转染昆虫细胞 Sf9, 获得重组杆状病毒。间接免疫荧光试验 (IFA) 和免疫印迹试验 (Western-blot) 结果显示, 重组蛋白可与抗 ALV-A 抗体发生特异性反应, 重组蛋白分子大小约为 90 000, 与预期大小相符, 表明 *env* 基因在 Sf9 细胞中获得了良好表达。

**关键词:** A 亚群禽白血病病毒; *env* 基因; 表达

**中图分类号:** S855.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)06-1316-05

## Expression and identification of subgroup A avian leukosis virus *env* in insect cell

MEI Mei<sup>1,2</sup>, HU Xiao-tian<sup>2,3</sup>, QIN Ai -jian<sup>2,3</sup>, LU Ji-hu<sup>1,2</sup>, ZHANG Xue-hua<sup>1,2</sup>, HOU Ji-bo<sup>1,2</sup>, TANG Ying-hua<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Veterinary Immunology and Engineering, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, China; 3. Key lab of Jiangsu Preventive Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** To obtain the expression product of subgroup A avian leukosis virus *env* gene, the *env* gene amplified from subgroup A avian leukosis virus strain AH10 was cloned into transfer vector pFastBac1 and cloned into the shuttle vector Bacmid by transferred into DH10Bac competent cell. The recombinant shuttle plasmid rBacmid-*envA* was then transfected into Sf9 cells to generate recombinant virus. The results of indirect immunofluorescence assay (IFA) and western blot showed that the recombinant protein could be recognized specifically by the polyclonal antibody against ALV-A with the molecule weight about 90 000, which was consistent with the expected, and all the results indicated that the *env* gene was expressed well in Sf9 cells.

**Key words:** avian leukosis virus subgroup A (ALV-A); *env* gene; expression

收稿日期: 2017-07-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31201881)

作者简介: 梅 梅 (1982-), 女, 江苏东台人, 博士, 助理研究员, 主要从事动物免疫学研究。(E-mail) jacqui18@163.com

通讯作者: 秦爱建, (E-mail) aijian@yzu.edu.cn; 唐应华, (E-mail) tyin-ghua@126.com

根据病毒囊膜蛋白中 gp85 蛋白抗原性的不同, 将禽白血病病毒分为 11 个 (A-K) 亚群, 其中只有 A 亚群、B 亚群、C 亚群、D 亚群、E 亚群、J 亚群和 K 亚群能感染鸡<sup>[1-2]</sup>。外源性禽白血病以 A 亚群、B 亚群、J 亚群和 K 亚群为主<sup>[3-5]</sup>, A 亚群 (尤其是来航

鸡)被认为是商业产蛋鸡群中最普遍的外源性病毒亚群,可导致淋巴细胞性白血病<sup>[6-7]</sup>。近几年,对禽白血病病毒(ALV)感染的血清学调查结果也证明了 AH10 毒株感染的普遍性,并且 A 亚群禽白血病病毒(ALV-A)会与其他亚群 ALV 混合感染<sup>[8-9]</sup>,临床症状以淋巴细胞性白血病为主,引起鸡的免疫抑制<sup>[10-11]</sup>。因此,若能研制出 A 亚群禽白血病病毒的快速检测试剂盒<sup>[12]</sup>,将会对临床禽白血病的检测发挥一定的作用<sup>[13-15]</sup>。

本研究拟利用 Bac-to-Bac 系统克隆和表达 A 亚群禽白血病病毒 *env* 蛋白,以期为进一步研制 ALV-A 单克隆抗体并建立检测方法等提供试验材料,为实现 A 亚群禽白血病的快速特异性诊断和种鸡群净化提供基础材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒

A 亚群禽白血病病毒 AH10 毒株来自扬州大学兽医学院江苏省动物预防医学重点实验室。

### 1.2 试剂

RNA 小量提取试剂盒购自 Axygen 公司, Super-Script RNA 逆转录试剂盒购自 Invitrogen 公司, 氯仿和苯酚均购自上海生物工程有限公司, pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司, *Bam* H I 和 *Sal* I 购自 Fermentas 公司, Cell FECTIN 试剂购自 Life technologies 公司。

### 1.3 病毒 RNA 提取和反转录

AH10 毒株感染 DF-1 细胞 7 d 后,利用 AXY-GEN Biosciences 试剂盒从细胞中提取病毒 RNA,反转录 cDNA。根据 NCBI 公布的 A 亚群禽白血病 *env* 基因序列,设计并合成 1 对针对 *env* 基因的特异性引物(表 1),并在上游引物和下游引物两端分别添加 *Bam* H I 酶和 *Sal* I 酶的酶切位点。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称	引物序列 (5'→3')	片段大小 (bp)
F1	TAGGATCCATGCACITACTCGAGC	1 660
F2	TAGTCGACCTATACTGCTCTTTCCGGGCT	

PCR 反应体系:10×LA *Taq* 酶 buffer 2.5 μl, 25 mmol/L dNTP 2.0 μl, 25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 2.0 μl, LA

*Taq* 酶 0.5 μl, 10 pmol/L 上游引物和下游引物各 0.5 μl, 模板 cDNA 1.0 μl, 补灭菌双蒸水至 25.0 μl。

PCR 反应程序:95 °C 预变性 5 min;94 °C 反应 2 min, 55 °C 反应 2 min, 72 °C 反应 2 min;30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

### 1.4 构建重组载体 pGEM-T Easy-*envA*

将 PCR 产物回收后与 T 载体以 7 : 1 的摩尔比混合,4 °C 连接过夜,连接产物转化 DH5α 感受态细胞,挑取单克隆菌,提取质粒,酶切鉴定并测序。

### 1.5 构建重组转移载体 pFastBac1-*envA*

将 pFastBac1 和重组载体 pGEM-T Easy-*envA* 分别经 *Bam* H I 酶和 *Sal* I 酶双酶切后,回收目的片段后,将 pFastBac1 与 *env* 片段按 1 : 3 的摩尔比混合,4 °C 连接过夜,连接产物转化 DH5α 感受态细胞,37 °C 培养后挑取单菌落扩增培养,提取质粒并酶切鉴定。

### 1.6 构建重组穿梭质粒 rBacmid-*envA*

重组转移载体 pFastBac1-*envA* 转化 DH10Bac 感受态细胞,37 °C 培养 24~48 h,挑取白色菌落,连续传代 3 代后,挑取白色单克隆菌落,利用 *env* 基因上游引物和 M13 下游引物,PCR 鉴定 rBacmid-*envA*。

PCR 反应体系:25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 2.0 μl, 10×LA *Taq* 酶 buffer 2.5 μl, 25 mmol/L dNTP 2.0 μl, LA *Taq* 酶 0.5 μl, 10 pmol/L 上游引物和下游引物各 0.5 μl, 模板 cDNA 1.0 μl, 补灭菌双蒸水至 25.0 μl。

PCR 反应程序:93 °C 3 min,95 °C 45 s,52 °C 45 s,72 °C 2 min,30 个循环,72 °C 延伸 10 min。

### 1.7 转染

取 5 μg rBacmid-*envA* 和 6 μl 转染试剂 Lipofectin,轻柔混匀静置 20 min 后均匀加入细胞,27 °C 孵育 4 h 后弃去转染混合物,加入含 10% 胎牛血清(FCS)的完全培养基,27 °C 继续培养至 Sf9 细胞出现明显病变后,收集细胞和培养上清,500 g 离心 5 min 去除细胞和大的细胞碎片,收集上清,即第一代重组杆状病毒 rBV-*envA*。

### 1.8 间接免疫荧光试验 (IFA) 鉴定重组杆状病毒

重组杆状病毒感染 Sf9 细胞 96 h,弃细胞上清,采用预冷的 4% 多聚甲醛固定细胞,以抗 ALV-A 多抗血清(1 : 100)为一抗,FITC 标记的羊抗鸡荧光抗体(1 : 300)为二抗,鉴定重组杆状病毒在 Sf9 细胞

中的表达。

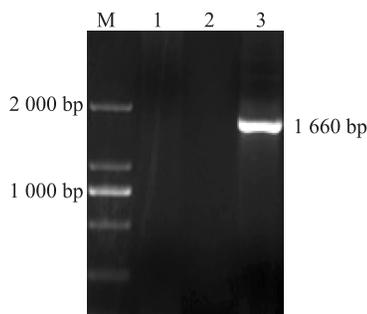
### 1.9 Western blot 鉴定重组杆状病毒

重组杆状病毒感染 Sf9 细胞 72~96 h, 收获细胞和上清, 1 000 r/min 离心 5 min, 取上清进行 SDS-PAGE, 转膜后, 以抗 ALV-A 多抗血清为一抗, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, Western blot 鉴定重组蛋白的表达。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增 A 亚群禽白血病病毒 *env* 基因

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 其大小约为 1 660 bp (图 1), 与预期大小相符, 而阴性对照未出现相应条带, 说明 PCR 扩增正确。



M: DL2000 DNA marker; 1, 2: 阴性对照; 3: *env* 基因片段。

图 1 PCR 扩增 A 亚群禽白血病病毒 *env* 基因

Fig.1 PCR results of avian leukosis virus subgroup A *env* gene

### 2.2 酶切鉴定重组质粒 pGEM-T Easy-*envA*

提取重组质粒 pGEM-T Easy-*envA*, *Bam* H I 酶和 *Sal* I 酶酶切后, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳。结果 (图 2) 显示, 目的条带约 1 660 bp, 大小与预期相符, 将测序结果正确的质粒命名为 pGEM-T Easy-*envA*。

### 2.3 酶切鉴定重组转移载体 pFastBac1-*envA*

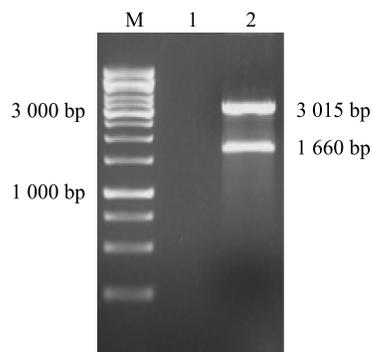
提取重组质粒, *Bam* H I 酶和 *Sal* I 酶酶切后, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳。结果 (图 3) 显示, 目的条带约 1 660 bp, 大小与预期相符, 表明重组转移载体 pFastBac1-*envA* 构建成功。

### 2.4 PCR 鉴定重组穿梭质粒 rBacmid-*envA*

利用 *env* 基因上游引物和 M13 下游引物对 rBacmid-*envA* 进行 PCR 鉴定。1% 琼脂糖凝胶电泳结果 (图 4) 显示, 扩增片段大小约 2 300 bp, 与预期大小一致, 表明 *env* 基因成功插入 Bacmid。

### 2.5 间接免疫荧光试验 (IFA) 鉴定重组杆状病毒 rBV-*envA*

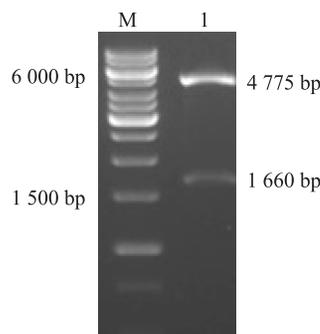
重组杆状病毒 rBV-*envA* 感染 Sf9 细胞 96 h 后,



M: 1 000 bp DNA marker; 1: 阴性对照; 2: pGEM-T Easy-*envA*。

图 2 酶切鉴定重组质粒 pGEM-T Easy-*envA*

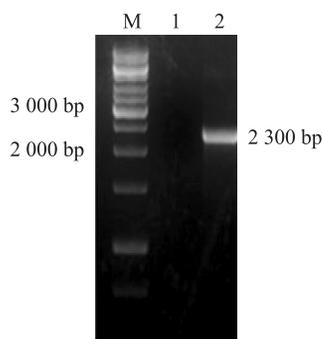
Fig.2 Identification of recombinant plasmid pGEM-T Easy-*envA* by digestion



M: 1 000 bp DNA marker; 1: 重组质粒 pFastBac1-*envA*。

图 3 酶切鉴定重组转移载体 pFastBac1-*envA*

Fig.3 Identification of recombinant transfer vector pFastBac1-*envA* by digestion



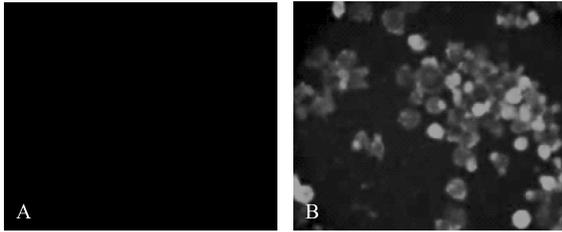
M: 1 000 bp DNA marker; 1: 阴性对照; 2: rBacmid-*envA*。

图 4 PCR 鉴定重组穿梭质粒 rBacmid-*envA*

Fig.4 Identification of recombinant shuttle plasmid rBacmid-*envA* by PCR

通过 IFA 鉴定重组蛋白在 Sf9 细胞中的表达。结果 (图 5) 显示, 重组病毒感染的 Sf9 细胞出现特异性

亮绿色荧光,而野生型杆状病毒感染细胞未产生特异性荧光,表明重组杆状病毒 rBV-*envA* 在 Sf9 细胞中得到良好表达。



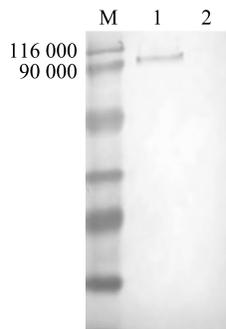
A:野生杆状病毒感染的 Sf9 细胞;B:重组杆状病毒感染的 Sf9 细胞。

图 5 间接免疫荧光试验 (IFA) 鉴定重组杆状病毒 rBV-*envA*

Fig.5 Identification of recombinant baculovirus rBV-*envA* by indirect immunofluorescence assay (IFA)

## 2.6 Western blot 鉴定重组杆状病毒 rBV-*envA*

以抗 ALV-A 多抗血清为一抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,进行 Western blot 鉴定。结果(图 6)显示,重组杆状病毒感染的 Sf9 细胞在约 90 000 处出现特异蛋白条带,与预期大小相符,而野生型杆状病毒感染的 Sf9 细胞无特异条带,说明表达蛋白具有特异性。



M:蛋白 marker;1:重组杆状病毒感染的 Sf9 细胞;2:野生型杆状病毒感染的 Sf9 细胞。

图 6 Western blot 鉴定重组杆状病毒 rBV-*envA*

Fig.6 Identification of recombinant baculovirus rBV-*envA* by western blot

## 3 讨论

杆状病毒表达系统是一个成熟的蛋白表达系统,有真核表达系统蛋白翻译后加工修饰的过程,表达的蛋白具有很好的生物学活性,使其抗原性和生

物学功能非常接近天然病毒蛋白。杆状病毒只能感染昆虫细胞,对哺乳动物和脊椎动物无感染性,因此利用杆状病毒表达系统制备的重组蛋白更具安全性。本研究通过构建杆状病毒表达系统,表达 A 亚群禽白血病病毒 *env* 基因,并最终在 Sf9 细胞中获得表达。IFA 和 Western blot 结果表明,表达的重组蛋白与抗 ALV-A 抗体反应良好,特异性强,与其他亚群禽白血病病毒抗体无交叉反应性,蛋白大小约 90 000,与预期大小相符,为进一步研制诊断试剂盒奠定了良好的基础。

近年来,白血病和血管瘤在中国各类型养鸡场中的发生率不断上升,给中国养殖业造成很大的经济损失,其罪魁祸首除了 ALV-J 之外,还有 ALV-A<sup>[15-16]</sup>。此外,有研究报道,国外市场使用的马立克病毒疫苗被检测出 ALV-A 污染,而国内养鸡场或种鸡公司也有可能使用这些疫苗,从而造成 ALV 感染<sup>[17-18]</sup>。目前尚无针对 A 亚群禽白血病的疫苗产品或药物,只能依赖病原检测和种鸡群净化达到防控和净化目的<sup>[1]</sup>,而通过本研究研制的重组蛋白可为下一步制备针对 *env* 蛋白的单克隆抗体提供免疫原,为进一步研制 A 亚群禽白血病检测试剂盒奠定基础。

## 参考文献:

- [1] SHAO H X, WANG L, SANG J J, et al. Novel avian leukosis viruses from domestic chicken breeds in mainland China[J]. Archives of Virology, 2017, 162(7):2073-2076.
- [2] 孙 鹏,陈孜孟,赵国梁,等. K 亚群禽白血病病毒 gp85 单因子血清的制备及其特异性鉴定[J]. 中国畜牧兽医,2016,43(2):371-376.
- [3] 塞 弗. 禽病学 [M]. 11 版. 北京:中国农业出版社,2005.
- [4] CUI N, SU S, CHEN Z M, et al. Genomic sequence analysis and biological characteristics of a rescued clone of avian leukosis virus strain JS11C1, isolated from indigenous chickens[J]. Journal of General Virology, 2014, 95:2512-2522.
- [5] LI X, LIN W, CHANG S, et al. Isolation, identification and evolution analysis of a novel subgroup of avian leukosis virus isolated from a local Chinese yellow broiler in South China[J]. Archives of Virology, 2016, 161(10): 2717-2725.
- [6] ONO M, TSUKAMOTO K, TANIMURA N, et al. An epizootic of subcutaneous tumors associated with subgroup A avian leukosis/sarcoma virus in young layer chickens[J]. Avian Diseases, 2004, 48(4): 940-946.
- [7] ZHANG Q C, ZHAO D M, GUO H J, et al. Isolation and identification of a subgroup A avian leukosis virus from imported meat-

- type grand-parent chickens[J]. *Virologica Sinica*, 2010, 25(2): 130-136.
- [8] 王培坤,毕玉彧,秦丽莉,等. 三黄鸡临床血管瘤病例中分离出 A 亚群与 J 亚群禽白血病病毒[J]. *动物医学进展*, 2015, 36(3): 13-16.
- [9] 冯敏,谭利强,代曼曼,等. 种禽场 A 亚群禽白血病病原学调查及分离株遗传进化分析[J]. *华南农业大学学报*, 2014, 35(4): 11-15.
- [10] 张恒,李传龙,杨明,等. 禽白血病 A 亚群 gp85 的单因子血清制备及其特异性鉴定[J]. *微生物学报*, 2011, 51(1): 134-140.
- [11] 钱琨,朱钰峰,沈海钰,等. 地方蛋鸡群中 A 亚群禽白血病病毒的分离与全基因组序列分析[J]. *中国兽医科学*, 2011, 41(10): 1005-1010.
- [12] FENG M, DAI M M, LIAO M, et al. Establishment of an avian leukemia virus subgroup A-resistant cell line[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2017, 16(4): 930-936.
- [13] PAYNE L N, NAIR V. The long view: 40 years of avian leukemia research[J]. *Avian Pathology*, 2012, 41(1): 11-19.
- [14] BOVA C A, OLSEN J C, SWANSTROM R. The avian retrovirus *env* gene family: molecular analysis of host range and antigenic variants[J]. *Journal of Virology*, 1988, 62(1): 75-83.
- [15] 魏彦辉,周荣艳,李祥龙,等. 抗 A 亚群禽白血病受体基因在三个鸡群中分布的研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(3): 167-170.
- [16] 梅梅,钱科,唐应华,等. J 亚群禽白血病病毒 SUJ 及兔 *Ig-GFc* 基因在腺病毒表达系统中的融合表达[J]. *江苏农业学报*, 2016, 32(4): 848-853.
- [17] SUN S, CUI Z. Epidemiological and pathological studies of subgroup J avian leukemia virus infections in Chinese local 'yellow' chickens[J]. *Avian Pathology*, 2007, 36(3): 221-226.
- [18] ZAVALA G, CHENG S. Experimental infection with avian leukemia virus isolated from Marek's disease vaccines[J]. *Avian Diseases*, 2006, 50(2): 232-237.

(责任编辑:王妮)