

236-283

第14卷第3期  
1999年9月中国病毒学  
VIROLOGICA SINICAVol. 14 No. 3  
Sep. 1999非洲猪瘟病毒 j5R 膜蛋白的  
电脑预测和实验证实\*

孙怀昌

(扬州大学畜牧兽医学院动医系, 扬州 225009)

Linda K. Dixon R. M. E Parkhouse

(Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Surrey GU24 0NF, UK)

Q 83 J. 43  
S 852.65-1

**摘要** 蛋白多肽二级结构的电脑预测表明,非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)j5R 阅读框编码 12.9 kDa 膜蛋白。该蛋白的 C 末端含有一个潜在抗原决定簇,针对其合成肽的抗体能在 ASFV 感染细胞和病毒颗粒中检测到 23 或 25 kDa(取决于不同毒株)特异蛋白。免疫荧光试验显示, j5R 蛋白主要位于感染细胞的病毒复制部位。油水两相分离和细胞分级分离试验结果证明 j5R 蛋白是膜相关蛋白。

**关键词** 非洲猪瘟病毒, j5R 阅读框, 膜蛋白

病毒膜蛋白是激发机体产生免疫应答或参与病毒装配的重要蛋白质。这些蛋白质借助其跨膜片段的疏水性质,将其多肽链导向脂质单位膜,因此常存在于有囊膜病毒或其感染细胞的表面。前者与病毒吸附、介导细胞膜融合或穿透细胞、参与病毒感染早期过程密切相关,针对这些病毒蛋白的抗体对阻止病毒感染扩散起着至关重要的作用。后者具有表面和外部抗原的强免疫原性质,常常是激发机体免疫应答,尤其是细胞毒性 T 淋巴细胞的有效抗原<sup>[1]</sup>。经电脑预测, ASFV j5R 阅读框编码由 111 个氨基酸组成的膜蛋白。本文报道该蛋白的表达与鉴定。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

用于蛋白多肽二级结构分析的 GCG 程序购于美国威斯康星大学。除另有说明外,所有化学药品均来自 Sigma 公司。分子生物学试剂,包括限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、连接酶、强化化学荧光蛋白转印杂交(Enhanced Chemiluminescent Western Blot, ECL Western Blot)试剂等,分别购自德国 Boehringer Mannheim、美国 Promega 及英国 Amersha 公司。所有细胞、病毒、血清等均由英国动物健康研究所提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 蛋白多肽的二级结构分析

先将 ASFV(Malawi LIL 20/1)j5R 阅读框的核苷酸序列<sup>[2]</sup>转译成氨基酸序列,然后用 Peptidestructure 程

收稿日期:1998-05-25,修回日期:1998-06-18

\* 本课题由英国生物技术及生物科学研究院和农业部资助

序预测其抗原性(antigenicity)、弹性度(flexibility)、亲水性(hydrophilicity)及表面概率(surface probability);用 Sigcleave 程序预测其蛋白水解部位;用 Motifs 程序预测其潜在氨基酸功能区。

### 1.2.2 多肽合成和抗体制备

根据电脑预测,j5R 蛋白的第 86~103 个氨基酸具有较高的抗原指数,为潜在的抗原决定簇(图 1)。根据此决定簇序列,用固相法<sup>[3]</sup>合成由 17 个氨基酸(亮-赖-谷-丙-谷-天冬酰胺-赖-酪-色-色-谷氨酰胺-天冬酰胺-酪-天冬-脯-酪-丝氨酸)组成的多肽。

将 500  $\mu\text{g}$  合成肽溶于 750  $\mu\text{L}$  PBS 中,与等体积佛氏完全佐剂混匀后分 5 点(1 点肌肉,4 点皮下)注射一只新西兰白兔。注射后第 21 和 42 天,每只兔用 1/2 剂量与不完全佐剂混合的合成肽加强免疫。第 64 天时,免疫兔的 ELISA 滴度仍不很高,遂用 500  $\mu\text{g}$  合成肽再次加强免疫。3 周后采血,分离血清。兔抗合成肽免疫球蛋白用 ProtOn 亲和柱按厂家(Multiple Peptide system)说明提纯。

### 1.2.3 病毒纯化和病毒蛋白抽提

用 Percoll 梯度离心法从 ASFV(Uganda 株)感染细胞上清中提纯细胞外病毒按 Carrascosa 法<sup>[4]</sup>进行。

将 100  $\mu\text{L}$  纯化病毒置于离心浓缩管(Centricon-100)中,向管中加入 10% N-Octyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (NOG)至最终浓度为 0.1%,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h 后离心(3000 r/min, Denley BR 401 低温离心机)分离病毒颗粒和洗脱蛋白,收集下管中的抽提蛋白,病毒再分别用 0.25%、0.5% 和 1.0% NOG 按上述方法抽提一次。抽提蛋白和抽提后的病毒用兔抗 j5R 合成肽抗体进行 ECL Western Blot 分析。

### 1.2.4 病毒感染细胞

猪骨髓细胞培养按发表的方法<sup>[5]</sup>制备。向长成单层的 10 mL 细胞管中加入 0.5 mL Malawi LIL 20/1 ASFV 病毒液,继续培养至出现明显血吸附现象(约 48 h)时倾去培养液,并向培养管中加入 0.5 mL 细胞裂解缓冲液(50 mmol/L Tris HCl, pH8.0, 120 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% NP40),裂解细胞保存于 -70  $^{\circ}\text{C}$  备用。

### 1.2.5 ECL Western blot

10% SDS-PAGE 按常规方法进行。电泳后,用 Western Blotter 按厂家说明将蛋白转印到 Immobilon-P 膜上(0.8~1.0 mA/cm<sup>2</sup> 膜,25~30 min)。蛋白杂交按常规方法进行,封闭液为含 10% 犊牛血清和 0.1% Tween 20 的 PBS,第一抗体为兔抗 j5R 合成肽 Ig,第二抗体为辣根过氧化物酶标记的葡萄球菌 A 蛋白,用 ECL Western Blotting Detection Reagents 按厂家说明显示杂交信号。

### 1.2.6 免疫荧光

BSC40 细胞培养于 Lab-Tek 细胞培养仓内。待细胞接近单层时,用 Uganda ASFV 感染细胞(37  $^{\circ}\text{C}$ , 2 h)。于感染后不同时间倾去培养液,并用 PBS 洗涤后进行免疫荧光染色。表面染色直接用活细胞或经 4% 副甲醛固定(室温 30 min)的细胞进行;细胞内染色的细胞先用冷却甲醇固定 5 min,然后按常规方法染色。第一抗体为兔抗 j5R 合成肽 Ig,第二抗体为 FITC 标记的羊抗兔 IgG。

### 1.2.7 两相分离

按 Bordier 的两相分离试验法<sup>[6]</sup>,用 Triton X-114 抽提纯化 ASFV 颗粒膜蛋白。

### 1.2.8 细胞分级分离(fractionation)

细胞分级分离按 Chatis 和 Morrison 的方法<sup>[7]</sup>进行。感染细胞为 IBRS 2 细胞,毒株为 Uganda 株,阳性对照为 35s 标记的水疱性口炎病毒(Vesicular stomatitis virus, VSV)感染的 IBRS 2 细胞。

## 2 结果

### 2.1 蛋白多肽的二级结构分析

ASFV(Malawi LIL 20/1)的 j5R 阅读框位于该病毒基因组 Sal I 酶消化后的 J 片段,由病

毒基因组的正链编码,阅读方向朝向基因组的右端。该阅读框由 333 bp 组成,编码由 111 个氨基酸组成的 12.9 kDa 蛋白质<sup>[2]</sup>。

用 Prosrch 和 Tfasta 程序分别查询 Swissprot (Version 28.0) 和 EMBL 数据库,未发现与之同源的氨基酸序列。查询 Prosite 数据库(数据库号 00201) 1 个潜在糖基化部位(第 65 个残基)和 4 个磷酸化部位(图 1)。Topolnstruct 分析表明 ASFV jSR 蛋白的 N-末端氨基酸 1~20 和 25~40 个残基的疏水值较高,为潜在膜蛋白,为膜蛋白<sup>[2]</sup>。

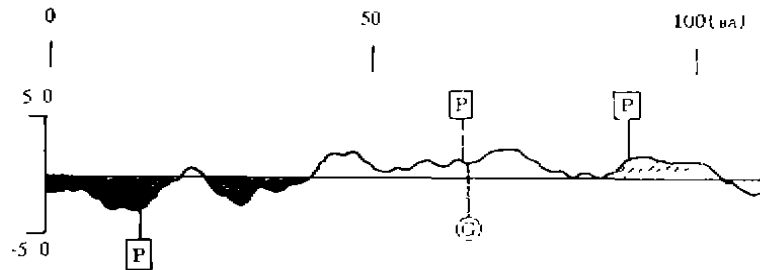


图 1 ASFV jSR 蛋白多肽的 2 级结构分析。纵向上代表氨基酸(100 个残基前, < 0), 纵轴数字代表氨基酸残基疏水性, 黑色区域代表潜在的膜蛋白跨膜区, 阴影区域代表用于制备 jSR 合成肽的潜在抗原决定簇, P 代表磷酸化部位, G 代表 N-交联的糖基化部位。

Fig. 1 Secondary structure analysis of ASFV jSR polypeptide. The y-axis represents hydrophobicity ( $> 0$ ), and x-axis represents amino acid residues, darker areas indicate potential transmembrane domains, shaded areas the potential antigenic determinant used to make the jSR synthetic peptide, P represents phosphorylation sites, and G N-linked glycosylation sites, respectively.

## 2.2 jSR 蛋白在病毒感染细胞中的表达与定位

用亲和层析纯化的兔抗 jSR 合成肽的抗体,对 ASFV Malawi LIL 20/1 株感染 48 h 后的猪骨髓细胞进行 ECL Western blot 分析显示, jSR 阅读框 C 端序列特异抗体能在病毒感染细胞中检测到分子量为 23 kDa 的特异蛋白,而正常兔血清不能显示此蛋白,正常猪骨髓细胞中也无此蛋白(图 2)。

以兔抗 jSR 合成肽 Ig 为抗体,在感染后 4~16 h 进行的免疫荧光试验结果显示 jSR 蛋白的细胞表面染色为阴性,但从感染后 10 h 起,细胞内染色转为阳性。jSR 蛋白主要位于靠近细胞核周围的病毒复制部位(图 3)。

## 2.3 jSR 蛋白在细胞外病毒粒子中的表达和定位

将 Percoll 梯度离心法从 Uganda 毒株感染的 BRS-2 细胞培养上清中提纯的细胞外病毒蛋白转印到醋酸纤维素膜上,用兔抗 jSR 合成肽抗体进行 ECL Western blot 分析。结果表明, jSR 阅读框 C 端序列特异抗体能在纯化的病毒中检测到 25 kDa 蛋白,而正常兔血清不能显示此蛋白(图 4)。

为了进一步证实上述 25 kDa 蛋白为病毒结构蛋白,依次用 0.1%、0.25%、0.5% 和 1.0% NOG 洗涤纯化的细胞外病毒,然后以兔抗 jSR 合成肽 Ig 为抗体进行 ECL Western blot 分析,结果表明, jSR 蛋白不在低浓度(0.1%) NOG 即能洗脱的非特异性吸附蛋白或病毒外膜蛋白之列,需 0.5% 的 NOG 才能从病毒颗粒上洗脱下来(图 4)。

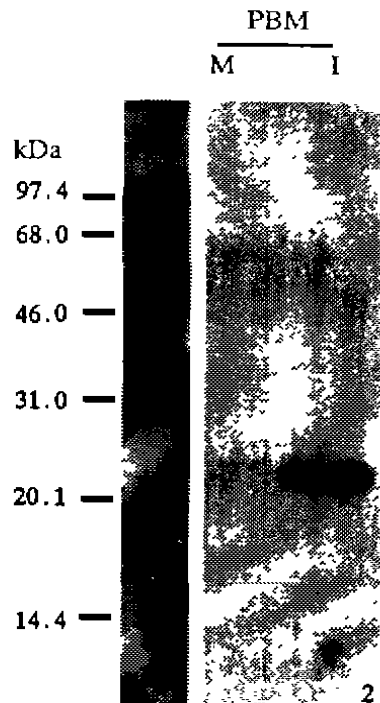


图2 病毒感染细胞的 ECL Western blot 分析。未感染 (Mock-infected, M) 和 Malawi LIL20/1 病毒感染 (Infected, I) 的猪骨髓细胞 (Porcine bone marrow cells, PBM) 经 10% SDS-PAGE 分离后, 用兔抗 jSR 合成肽抗体测定细胞中的 jSR 蛋白。

Fig. 2 ECL Western blotting analysis of ASFV-infected cells. Mock-infected (M) and Malawi LIL20/1 ASFV infected (I) pig bone marrow cells (PBM) were separated by 10% SDS-PAGE, followed by ECL Western blotting using rabbit anti-jSR peptide Ig as the antibody.

#### 2.4 jSR 蛋白与病毒及其感染细胞膜性结构的关系

纯化的细胞外病毒经 3 次 Triton X-114 抽提后, 取每次抽提的无机相 (水相) 和有机相 (油相) 进行电泳, 以兔抗 jSR 合成肽的 Ig 为抗体进行 ECL Western blot 分析, 同时用针对 ASFV 72 kDa 结构蛋白的单抗作为非膜蛋白对照<sup>[9]</sup>, 用针对 ASFV 编码的 Ubiquitin 抗体为膜蛋白阳性对照<sup>[10]</sup>。结果显示, 和已知的膜蛋白 Ubiquitin 一样, jSR 蛋白存在于两相分离后的有机相中 (图 5)。

用氮气爆破法破碎 Uganda ASFV 感染 16 h 后的 IBRS 2 细胞, 用 8% 蔗糖梯度离心法进行细胞分级分离。分离后的水溶性和膜性蛋白经 SDS-PAGE 分离后, 用兔抗 jSR 合成肽 Ig 为抗体进行 ECL Western blot 分析。试验中, 用针对 VSV G 蛋白的单抗作为膜蛋白阳性抗体对照<sup>[7]</sup>。结果表明, jSR 蛋白存在于病毒感染细胞的膜性结构中 (图 6)。

### 3 讨论

蛋白多肽的二级结构电脑分析结果表明, ASFV (Malawi LIL 20/1 株) 的 jSR 阅读框编码由 111 个氨基酸组成的 12.9 kDa 蛋白质, 其 C 末端具有一个潜在的抗原决定簇 (图 1)。兔抗 jSR 合成肽的特异抗体能在细胞外病毒 (Uganda 株) 和病毒感染细胞中测到分子量为 23 或 25 kDa 的蛋白, 而正常兔血清不能显示该蛋白的存在, 说明 jSR 合成肽特异抗体测到的蛋白为 ASFV 特异蛋白。病毒颗粒和感染细胞中 jSR 蛋白分子量的差异, 与所用病毒之毒株不同有关, 详细资料另文发表。值得一提的是, jSR 蛋白的实际分子量 (23 或 25 kDa) 约是其理论计算



图3 ASFV感染细胞的免疫荧光分析。Uganda毒株感染16h后的IBRS2细胞用兔抗j5R合成肽抗体显示j5R病毒蛋白的存在。该蛋白先散在于细胞核周围(见照片中间之细胞),然后向病毒装配部位(照片中的白色区域)集中(放大倍数100·)。

Fig.3 Immunofluorescence showing intracellular staining of the j5R protein. IBRS2 cells were infected with Uganda ASFV strain, harvested at 16 h post-infection and stained with rabbit anti-j5R peptide Ig followed by FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG ( $\times 100$ ). The protein was detected as multiple small perinuclear foci (in the middle of the picture) and localized in the virus assembly sites (white areas).

分子量(12.9 kDa)的两倍,其原因可能由该蛋白跨膜区 $\alpha$ -螺旋结构之间相互作用形成的二聚体或该蛋白在凝胶上的异常移行(含有较多酸碱性氨基酸)所致,而与该基因定序错误、多肽链的糖基化或因二硫键形成的二聚体无关<sup>[11]</sup>。

Western blot 结果显示,j5R 蛋白存在于细胞外病毒颗粒上,但据此不能得出 j5R 蛋白是 ASFV 结构蛋白的结论,尚有病毒颗粒的非特异性吸附蛋白之可能。为排除这种可能性,作者先用不同浓度的 NOG 洗涤纯化的病毒粒子,然后用 Western blot 测定洗脱液的病毒蛋白。其理论依据是,NOG 是作用缓和的非离子去污剂,对病毒粒子蛋白具有洗脱作用,在一定浓度范围内,浓度愈高,洗脱作用愈强,据此不仅可以区别病毒结构蛋白和非特异性吸附蛋白,还可以了解蛋白在病毒粒子中的相对位置,据报道,0.1% NOG 即能洗脱 ASFV 病毒颗粒的非特异

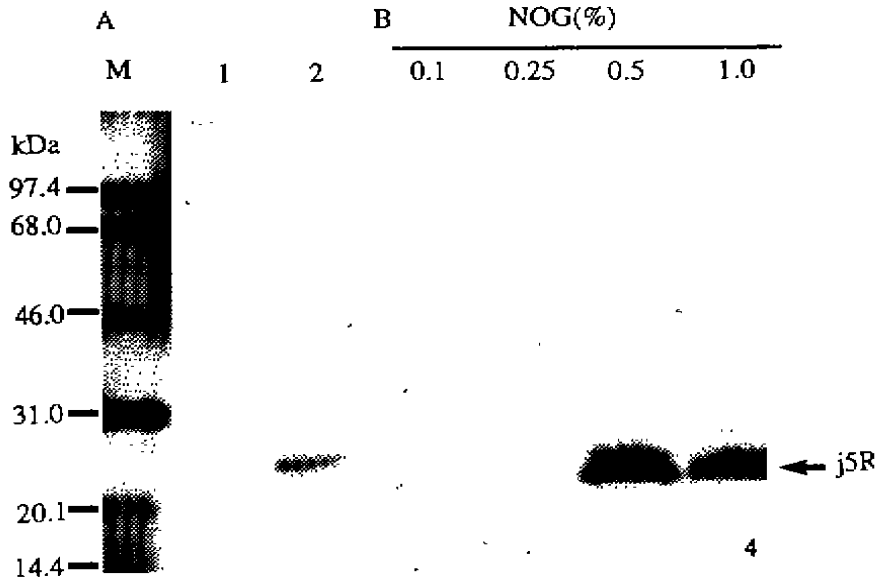


图 4 纯化 ASFV 颗粒的 ECL Western blot 分析。A. 两轮 Percoll 梯度离心纯化的细胞外有囊膜病毒经 10% SDS-PAGE 分离后,用正常兔血清(1)或兔抗 j5R 合成肽抗体显示 j5R 蛋白的存在。B. 纯化病毒分别用不同浓度的 NOG 抽提后,用同样抗体显示洗脱液中的 j5R 蛋白。

Fig.4 ECL Western blotting analysis of purified ASFV particles. A. Extracellular enveloped virus particles purified by 2 cycles of Percoll gradient centrifugation were separated by 10% SDS-PAGE for Western blotting with normal rabbit serum (1) or rabbit anti-j5R peptide Ig (2). B. The purified virus was extracted sequentially with different concentrations of NOG, followed by Western blotting using rabbit anti-j5R peptide Ig as the antibody.

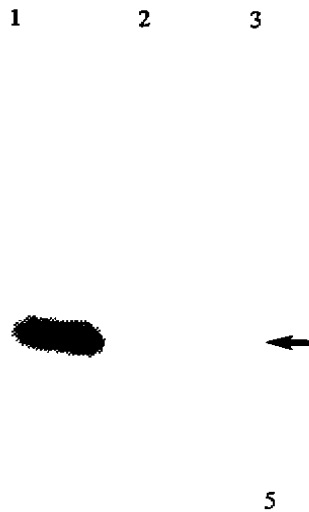


图 5 ASFV 的两相分离试验。Percoll 梯度离心纯化的细胞外有囊膜病毒依次用 1.0% (1), 0.5% (2) 和 2.0% Triton X-114 抽提后,用兔抗 j5R 合成肽 Ig 为抗体,用 ECL Western blot 法测定油相(1 和 2)及水相(3)中的 j5R 蛋白。

Fig.5 Phase separation of membrane proteins. The extracellular enveloped ASFV particles purified by Percoll gradient centrifugation were sequentially extracted with 1.0% (1), 0.5% (2) and 2.0% Triton X-114 and the existence of the j5R protein in the detergent phases (1 and 2) or aqueous phase was demonstrated by Western blotting using rabbit anti-j5R peptide Ig as the antibody.

吸附蛋白或暴露于病毒颗粒表面的外膜蛋白<sup>[8]</sup>。从本试验结果来看,j5R 蛋白需 0.5% NOG 才能从病毒粒子上洗脱下来,说明该蛋白不仅是病毒结构蛋白,而且位于病毒粒子的较深层。



图6 ASFV感染细胞的分级分离试验。Uganda毒株感染的IBRS2细胞经匀浆化后,用8%蔗糖梯度离心法分离细胞内膜性囊泡,然后以兔抗jSR合成肽Ig为抗体,以ECL Western kit测定经1.2% Triton X-100和12.2%蛋白酶K处理前(1)及处理后(2)的膜性囊泡中的jSR蛋白。

Fig 6 Fractionation of ASFV-infected cells. IBRS2 cells infected with Uganda ASFV strain were homogenized and the vesicles were obtained by 8% sucrose gradient centrifugation. The existence of jSR protein in the vesicles before (1) and after (2) treatment with 1.2% Triton X-100 and 12.2% proteinase K was demonstrated by Western blotting using rabbit anti-jSR peptide Ig as the antibody.

所有膜蛋白均含有1个或多个约有20个疏水氨基酸组成的跨膜片段(即跨膜区),此跨膜片段与信号肽的核心区(即h区)相似,能与信号识别颗粒结合,从而将新生肽链导入内质网<sup>[12]</sup>。目前已有预测膜蛋白的电脑程序,而且准确率很高<sup>[13]</sup>。用此类程序对jSR蛋白进行预测结果显示,jSR蛋白的第1~20和25~40个残基的疏水值很高,为两个相邻的潜在跨膜区(图1),提示jSR蛋白很可能是膜蛋白。在用纯化病毒颗粒进行的两相分离试验中,jSR存在于两相分离后的有机相中,符合膜蛋白的特点,证明该蛋白是膜相关蛋白。

膜蛋白由位于粗面内质网表面的所谓膜性核糖体合成,在转译同时,新生肽链转位进入内质网,并在此初步折叠和加工修饰后,进入高尔基体作进一步加工修饰,最后包裹在膜性囊泡(vesicle)内运往细胞浆膜或其他膜性亚细胞结构<sup>[14]</sup>。因此,膜蛋白在合成、折叠、加工修饰,直至到达最后目的地的整个过程中,都处于细胞的膜性结构中,这为用细胞分级分离法(fractionation)鉴定膜蛋白提供了理论依据。从试验结果来看,jSR蛋白存在于ASFV感染细胞分级分离后的膜性结构中,进一步证明它是膜蛋白。

**致谢** Drs Wilkinson P J, Hutchings G 和 Williams S 提供病毒株、免疫血清和其他帮助,本院李俊宝副教授仔细阅读此稿,谨致谢忱。

## 参 考 文 献

- 1 Andrew M E, Coupar B E H, Boyd D B. Immunogenicity and antigen presentation. In: M M Binnsed. Re-emerging Bovine Virus. Boca Raton: CRC Press, 207~234
- 2 Inoue I K, Tsuge SRF, Boyd SA *et al*. Nucleotide sequence of a 55 kb region from the right end of the genome of a pathogenic African swine fever virus isolate (Malawi III 20/1). J Gen Virol, 1994, 75:1665~1684
- 3 Merrifield R B, Vizard L D, Boman M G. Synthesis of the antibacterial peptide cecropin A. Biochemistry, 1982, 21:5020~5030
- 4 Carrasosa A I, Del Val M, Santaren J F *et al*. Purification and properties of African swine fever virus. J Virol, 1985, 54: 337~344

- 5 Malmquist W A. Propagation, modification and hemadsorption of ASFV in cell cultures. *Amer J Vet Res*, 1962, 23: 241 ~ 247
- 6 Pridler C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem*, 1981, 256: 41604 ~ 41607
- 7 Chavis P A, Morrison J G. Vesicular stomatitis virus glycoprotein is anchored to intracellular membranes near its carboxyl end and proteolytically cleaved at its amino terminus. *J Virol*, 1979, 29: 3957 ~ 3963
- 8 Sun H, Jacobs S C, Smith G I *et al*. African swine fever virus gene j13L encodes a 25 ~ 27 kDa virion protein with variable numbers of amino acid repeats. *J Gen Virol*, 1995, 76: 1117 ~ 1127
- 9 Cistue C, Tilares F. Expression *in vivo* and *in vitro* of the major structural protein (VP73) of African swine fever virus. *Arch Virol*, 1992, 123: 111 ~ 124
- 10 Gavirto L A, Smith G, Hong W. Ubiquitin is attached to membranes of baculovirus particles by a novel type of phospholipid anchor. *Cell*, 1995, 80: 2301 ~ 2309
- 11 Brookes S M, Sun H, Dixon L K *et al*. Characterization of African swine fever virus proteins j5R and j13L: immunolocalization in virus particles and assembly sites. *J Gen Virol*, (in Press)
- 12 Pugsley A P. Protein targeting. London: Academic Press Inc, 1989
- 13 Von Heijne G. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive rule. *J Mol Biol*, 1992, 225: 487 ~ 494
- 14 Lewin B. Protein localization, In: *Genes VI*. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 1997. 243 ~ 283

## Computer-Based Prediction and Experimental Confirmation of the j5R Membrane Protein of African Swine Fever Virus

Sun Huaichang

(Dept. of Vet. Med., Anim. Sci. and Vet Med. Coll., Yangzhou Univ., Yangzhou 225009)

Linda K Dixon     R. M. E Parkhouse

(Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Surrey GU24 0NF, UK)

**Abstract** The j5R open reading frame (ORF) of African swine fever virus was predicted by computing to encode a 12.9 kDa protein with two successive N-terminal transmembrane domains and one C-terminal antigenic epitope. Antibodies raised against a synthetic peptide derived from the C-terminal epitope detected a specific protein of 23 or 25 kDa (depending on different isolates) in ASFV-infected cells or purified extracellular ASFV virions. Immunofluorescence showed that the j5R protein was mainly located in the virus assembly sites within ASFV-infected cells. Phase separation of purified extracellular ASFV virions and fractionation of ASFV-infected cells demonstrated that the j5R protein was in the detergent phase and membrane fraction, confirming that the j5R protein was membrane-associated.

**Key words** African swine fever virus (ASFV), j5R ORF, Membrane protein