

马立克氏病病毒 Md11 株 pp24 基因的原核表达*

姜世金¹, 崔治中^{1**}, 丁家波¹, 孟珊珊¹, 杨汉春²

(1. 山东农业大学动科院, 山东泰安, 271018; 2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

Prokaryotic Expression of pp24 Gene of Md11 Strain of Marek's Disease Virus

JIANG Shi-jin¹, CUI Zhi-zhong^{1**}, DING Jia-bo¹, MENG Shan-shan, YANG Han-chun²

(1. Animal Science and Technology College, Shandong Agricultural University, Shandong, Taian 271018, China; 2. College of Veterinary Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: pp24 gene was amplified from genomic DNA of Marek's disease viruses (MDV) Md11 strain by polymerase chain reaction (PCR) and then cloned into pGEX-6P-1 according to the right open reading frame (ORF). The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 strain for expression with the induction of IPTG. SDS-PAGE and Western-blotting with goat-anti-GST antibody validated the expression of GST-pp24 fusion protein. The expressed specific band was excised from the gel and injected into four-week-old mice 3 times, then the antiserum was collected from the mice and used for IFA with Chicken Embryonic Fibroblasts (CEF) infected by MDV Md11, CVI988 and GA strains respectively. The positive staining was found in the MDV plaques, which shows that the fusion protein of pp24 *in vitro* expressed has some epitopes of natural pp24.

Key words: Marek's disease virus; pp24; Prokaryotic expression

摘要: 通过 PCR 方法扩增 MDV Md11 株 pp24 基因的完整 ORF, 按正确的阅读框架将其克隆入原核表达载体 pGEX-6P-1 中, 重组质粒转化 BL21 宿主菌后, 经 IPTG 诱导表达。诱导菌体裂解物经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后, 用山羊抗 GST 抗体进行 Western-blotting 试验, 结果确证了 GST-pp24 融合蛋白的表达。将表达产物从凝胶中回收, 免疫 4 周龄小白鼠, 3 次免疫后, 采血分离血清。所得抗 GST-pp24 多克隆抗血清分别与 GA 株、Md11 株和 CVI988 株 MDV 感染的鸡胚成纤维细胞 (CEF) 进行间接免疫荧光试验 (IFA), 结果表明大肠杆菌表达的 pp24 融合蛋白至少保留了部分天然 pp24 蛋白的抗原性。

关键词: 马立克氏病病毒; pp24; 原核表达

中图分类号: Q78; S852

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2004)04-0369-04

鸡马立克氏病 (Marek's Disease, MD) 是由鸡马立克氏病病毒 (Marek's disease virus, MDV) 引起的鸡的一种高度接触传染性肿瘤病, 以感染鸡的淋巴组织的增生和肿瘤形成为特征, 在未经免疫的鸡群中引起非常高的发病率和死亡率。作为一种致肿瘤性非常强的疱疹病毒, MDV 是能用实验方法证明具有致瘤性的第一个疱疹病毒, 用非致病性的 HVT 或致弱的 MDV 株作为疫苗, 可以成功地预防 MD 的发生, 使之成为世界上第一个用疫苗预防肿瘤的

成功例子, 并且 MD 也是目前为止唯一的一种可用疫苗成功预防的病毒性肿瘤病, 因而在比较医学上, 它是研究病毒性肿瘤的发生和预防机制的理想动物模型。

pp38 基因是 I 型 MDV 所特有的, 在哺乳动物疱疹病毒中至今未发现它的同源产物, 被认为是 MDV 的三个致肿瘤相关基因之一^[1]。pp24 基因与 pp38 基因密切相关, 二者的前 195 个碱基完全一致^[2]。已有试验表明, pp38 基因的编码蛋白对鸡的免疫机

收稿日期: 2004-01-12, 修回日期: 2004-03-16

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30070544)

作者简介: 姜世金 (1971-), 男, 山东莱阳籍, 副教授, 博士, 研究方向为动物免疫学与病毒分子生物学。

** 通讯作者。Corresponding author. Tel: 0538-8241560, E-mail: cuizz@sdau.edu.cn.

能有一定的抑制作用^[3],但目前对于 PP24 的生物学活性尚不清楚。本研究在 pGEX 载体中对 MDV 超强毒参考株 Md11 株的 *pp24* 基因的完整 ORF 进行了克隆和 GST-*pp24* 融合蛋白的诱导表达,并以表达产物为抗原制备抗血清,对原核表达产物的抗原性进行了检测,为研究 PP24 和 PP38 蛋白的相互作用以及研究 PP24 的生物学活性奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

I 型 MDV 超强毒参考株 Md11 株、强毒参考株 GA 株和疫苗毒 CVI988 株由美国农业部禽病与肿瘤研究所提供;大肠杆菌 BL21 菌株,由山东省畜禽疫病防制工程技术研究中心提供;原核表达载体 pGEX-6P-1,购自 Pharmacia 公司。山羊抗 GST 抗体,驴抗山羊 IgG 酶标抗体, DAB 等购自 Pharmacia 公司;T₄DNA 连接酶、PCR 反应用试剂、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I、IPTG 及 DL2000 和 DL15000 Marker 等均购自大连 TaKaRa 生物工程公司;FITC-Anti-Mouse-Ab,购自 GIBCO 公司。BALB/C 品系小白鼠,4~6 周龄,购自山东大学医学院实验动物中心。

1.2 Md11 株 MDV 的增殖与基因组 DNA 的提取

将 Md11 株 MDV 接种鸡胚成纤维细胞(CEF),待出现大量蚀斑后,按常规方法提取组织 DNA。

1.3 PCR 扩增 *pp24* 基因

以上述组织 DNA 为模板,按常规体系进行 PCR 扩增,程序为 95℃1min,50℃1min,72℃1min,进行 30 个循环,72℃延伸 10min 后置 4℃保存。所用引物 P1 位于 *pp24* 基因的+1~+19 碱基,引物 P2 位于 *pp24* 基因的+510~+493 碱基,具体引物序列为:

P1:5' -AATGGATCCATGGAATTCGAAGCAGAAC-3'
P2:5' -CAGGTCGACTGCAATGGTGAATAGACG-3'

1.4 重组质粒的构建及阳性克隆筛选鉴定

将 *pp24* 基因的 PCR 扩增产物与原核表达载体 pGEX-6P-1 分别进行 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切,回收所需片段,用 T₄DNA Ligase 对插入目的片断与载体进行连接,将连接产物转化 BL21 菌株感受态细胞,提取质粒,用 *Bam*H I 和 *Sal* I 进行双酶切筛选阳性克隆,并将阳性克隆进行 DNA 序列测定。

1.5 重组质粒 pGEX-*pp24* 的诱导表达

用接种环钩取单个克隆的重组质粒 pGEX-*pp24* 转化的 BL21 大肠杆菌,接种于 5ml 含有 100μg/mL Amp 的 2×YTA 培养基中,37℃振荡培养过夜,次日

取出过夜培养物,取 50μL 分别接种于含有 5mL 含有 Amp 的 2×YTA 培养基的试管中,37℃振荡培养至 2h 向试管中加入 IPTG 至终浓度为 1.0mmol/L,继续于 37℃振荡培养各诱导 6h 后,取出培养物。同时,按照上述同样的方法诱导表达 pGEX-6P-1 空载体转化的 BL21 大肠杆菌,作为阴性对照。

1.6 重组菌菌体裂解物的凝胶电泳

按常规方法制备 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,将按常规方法处理好的蛋白质样品(包括非重组 pGEX-6P-1 载体质粒转化菌,及未经 IPTG 诱导的重组载体质粒转化菌)取 20μL 上样,用 Bio-RAD 公司 Mini-PROTEAN II Electrophoresis cell 电泳装置,120V,2h.电泳完毕后,取下凝胶,考马斯亮兰 R-250 染色 2h,脱色液脱色 2h。

1.7 重组菌菌体裂解物的 Western-blotting

为了检测所表达的 GST 与 *pp24* 的融合蛋白,取 1.6 SDS-PAGE 电泳后的凝胶,不经染色,直接用 Bio-RAD 公司 Mini Trans-Blot Electrophoretic cell 转印装置,将其转印于 NC 膜上,并用山羊抗 GST 抗体和驴抗山羊 IgG 酶标抗体进行 Western-blotting 检测。

1.8 抗 GST-PP24 多克隆血清的制备

将大量制备的重组菌菌体裂解上清,进行 SDS-PAGE,经染色后,参照标准蛋白分子量 Marker 的大小,切下大小相当的特异蛋白条带,将其冻干并碾成粉末。将碾碎的粉末与 1×PBS 等体积混和后,取 0.2mL(约 20μg 抗原)腹腔和背部皮下注射 2 只健康小鼠。每隔两周免疫一次,第 3 次免疫后 10d 采血,析出血清置 -20℃保存备用。

1.9 抗 GST-PP24 融合蛋白抗体的特异性检验

将 MDV 超强毒株 Md11、强毒株 GA 及弱毒株 CVI988 感染在 96 孔板长成单层的 CEF,待出现明显病毒蚀斑时,用丙酮/乙醇(3:2)固定,同时以未感染病毒的 CEF 板作对照,将制备的血清及未免疫小鼠的血清作 1:10,1:50,1:100 的梯度稀释,按照常规方法进行 IFA,在荧光显微镜下观察,并拍照记录实验结果。

2 结果

2.1 MDV *pp24* 基因的 PCR 扩增结果

将 *pp24* 基因的 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果在 0.5kb 左右出现一条亮带,且引物二聚体条带量很小,证明所进行的 PCR 扩增产物是所要的目的片段(见图 1)。

2.2 pGEX-*pp24* 重组质粒的筛选和酶切鉴定

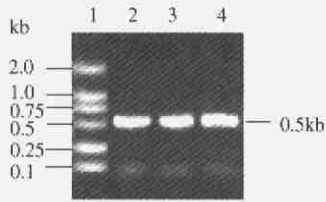


图1 PCR 扩增 MDV Md11 株 *pp24* 基因

Fig.1 Special amplified PCR *pp24* gene result of Md11 stain
1, DL2000 Marker; 2-4, Amplified product of *pp24* of Md11 stain.

将经过 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切的可疑阳性克隆产物进行琼脂糖凝胶电泳, 结果出现 5.0kb 和 0.5kb 两条带 (见图 2), 表明插入载体中的片段与 PCR 扩增产物大小一致, 所选质粒为阳性克隆命名为 pGEX-*pp24*。将重组质粒的测序结果与已发表的 BC-1 株的 *pp24* 基因序列相比较, 结果二者完全一致, 而且阅读框正确。

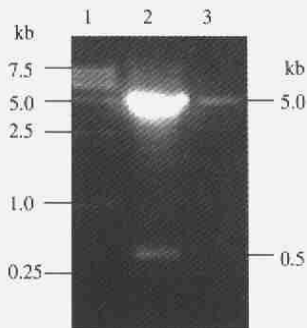


图2 pGEX-*pp24* 重组质粒插入片断酶切鉴定

Fig. 2 Identification of the inserts in recombinant plasmids
1, DL15000 Marker; 2, pGEX-*pp24*/*Bam*H I+*Sal* I; 3, pGEX-6P-1/*Bam*H I+*Sal* I

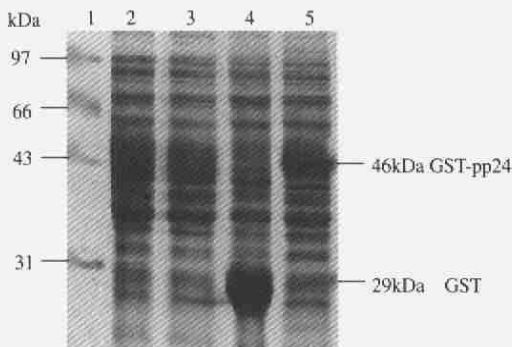


图3 重组菌体裂解产物的凝胶电泳

Fig. 3 Recombinant *pp24* gene expression product in SDS-PAGE

1, Standard protein molecular weight marker; 2, Lysate of pGEX-*pp24* without IPTG inducing; 3, Lysate of pGEX-6P-1 without IPTG inducing; 4, Lysate of pGEX-6P-1 with IPTG inducing; 5, Lysate of pGEX-*pp24* with IPTG inducing.

2.3 重组菌体裂解物的凝胶电泳结果

取重组菌裂解产物进行 SDS-PAGE, 考马斯亮

兰 R₂₅₀ 染色, 同时作非重组 pGEX-6P-1 质粒菌的培养物对照。结果表明: 重组菌体裂解物可在分子量 46kDa 处看到一条特异的蛋白条带, 与预期大小的融合蛋白一致。而非重组的 pGEX-6P-1 质粒菌培养物样品中, 在与理论值一致的 29kDa 处出现明显条带, 其它非经 IPTG 诱导的质粒菌未出现明显表达条带 (见图 3)。

2.4 重组菌裂解物的 Western-blotting 结果

将 SDS-PAGE 电泳后的凝胶进行转印, 利用 GST 抗体, 进行 Western-blotting 试验。结果在重组菌裂解样品中, 确定了 46kD 的蛋白条带为含 GST 的 *pp24* 融合蛋白带 (见图 4)。

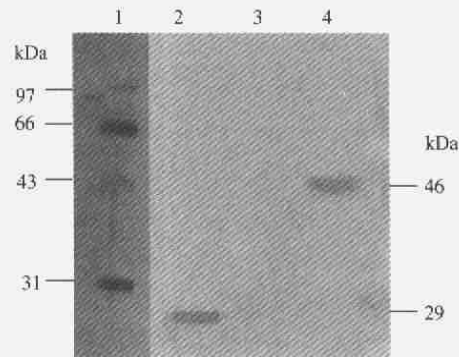


图4 Western-blotting 分析重组 *pp24* 基因产物

Fig. 4 Western-blotting analysis of recombinant *pp24* gene expression product with anti-GST antibody

1, Standard protein molecular weight marker; 2, Lysate of pGEX-6P-1 with IPTG inducing; 3, Lysate of pGEX-*pp24* without IPTG inducing; 4, Lysate of pGEX-*pp24* with IPTG inducing.

2.5 抗 GST-PP24 融合蛋白抗体的特异性

用 *pp24* 融合蛋白免疫小鼠制备的抗血清, 作 1:10, 1:50, 1:100 的稀释, 与 Md11 株、GA 株及 CVI 988 株 MDV 感染的 CEF 单层进行间接免疫荧光试验。三种稀释度的抗血清均能与三种不同毒株感染的 96 孔板发生阳性反应, 而且呈细胞浆染色 (见图 5A、B、C); 而制备的血清检测未感染病毒的 CEF 则无特异荧光出现 (见图 5D), 表明表达的 PP24 融合蛋白具有 MDV PP24 的抗原特异性。

3 讨论

马立克氏病是由 MDV 引起的高度接触传染性肿瘤病, 所有致肿瘤的 MDV 均属于血清 I 型。*pp38* 基因是由崔治中教授在世界上首次完成克隆测序的^[4,5], 是与 I 型 MDV 致肿瘤相关的三个基因之一, 其编码的 38kDa 磷蛋白 (PP38) 在肿瘤和细胞系中的表达存在差异, 而 I 型 MDV 特异性的 PP38 复

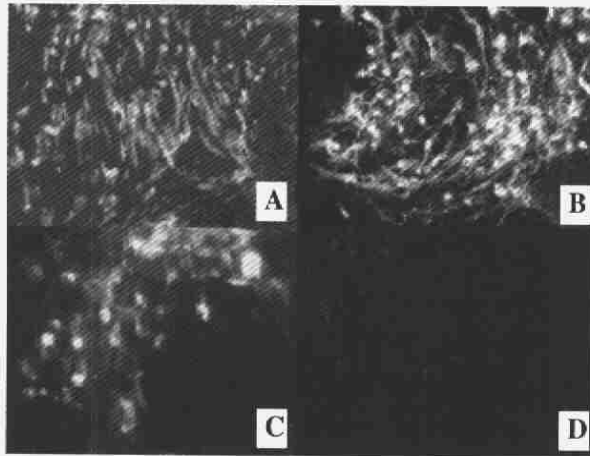


图 5 鼠抗 GST-PP24 血清与 CEF 的 IFA 检测结果

Fig. 5 Mouse-Anti-GST-PP24 sera react with CEF in IFA

A, Mouse-Anti-GST-PP24 sera can react with CEF infected with Md11 strain in IFA (show positive); B, Mouse-Anti-GST-pp24 sera can react with CEF infected with GA strain in IFA (show positive); C, Mouse-Anti-GST-pp24 sera can react with CEF infected with CVI988 strain in IFA (show positive); D, Mouse-Anti-GST-pp24 sera can't react with CEF uninfected with MDV in IFA (show negative).

合体是迄今为止在 MDV 诱发的肿瘤及非生产性肿瘤细胞系中能检出的唯一的一个 MDV 特异性抗原^[6-9], 因此认为其在 I 型 MDV 的致肿瘤过程中发挥重要作用, 但其确切的生物学功能及其致肿瘤作用机制尚不清楚。

在免疫沉淀反应中单抗 H19 可以沉淀 PP38 和另一个 MDV 特异性蛋白 PP24^[10], 但在 PP24 的序列中不存在能为单抗 H19 所识别的决定簇, 而在 Western-blotting 中, 单抗 H19 只识别 PP38 而不识别 PP24^[2, 11]。由此推论, MDV 的 PP38 和 PP24 在天然状况下可能以某种特定的二级结构的形式存在, 且这种特定二级结构决定了 PP38-PP24 复合物完整的生物学活性。

已有研究表明, 以杆状病毒为载体在昆虫细胞中表达的纯化 PP38 蛋白免疫雏鸡可降低鸡体对小白鼠红血球的血球凝集抗体反应, 表明重组 PP38 对雏鸡免疫反应有某种抑制作用^[3], 但对于 PP24 蛋白的生物学功能及其在 MDV 致肿瘤过程中的作用, 至今尚未见报道。

本试验通过基因重组的方法, 将超强毒 MDV Md11 株的 pp24 全基因按正确的阅读框插入到载体 pGEX-6P-1 的多克隆位点处, 经过 IPTG 的诱导, 诱导菌体裂解物经 SDS-PAGE 后, 用山羊抗 GST 抗体进行 Western-blotting 试验, 结果确证了 GST-PP24 融合蛋白的表达。

由于 MDV 是严格的细胞结合型病毒, 为验证表达产物的抗原性, 将重组的 PP24 表达产物免疫小白鼠, 取小鼠血清与 MDV 感染的 CEF 进行 IFA 检测, 结果在 CEF 的胞浆中观察到了较强的荧光反应。这表明, 用大肠杆菌表达的 PP24 蛋白至少保留了部分天然 PP24 蛋白的抗原构象。由于 GST-PP24 融合蛋白可经处理后进行 PP24 的纯化, 这为下一步进行其生物学活性研究奠定了坚实的基础。

参考文献

- [1] Chen X B, Sondermeijer P J, Velicer L F. Identification of a unique Marek's disease virus gene which encodes a 38-kilodalton phosphoprotein and is expressed in both lytically infected cells and latently infected lymphoblastoid tumor cells[J]. *J Virol*, 1992; 66(1): 85-94.
- [2] Zhu G S, Iwata A, Gong M, *et al.* Marek's disease virus type 1-specific phosphorylated protein pp38 and pp24 with common amino acid termini are encoded from the opposite junction regions between the long unique and inverted repeat sequences of viral genome[J]. *Virology*, 1994, 200: 816-820.
- [3] 崔治中, 秦爱建. 马立克病病毒的 38kd 磷蛋白基因重组产物对雏鸡的免疫抑制作用[J]. *畜牧兽医学报*, 1997, 28: 71-76.
- [4] Cui Z Z, Ding Y, and Lee L F. Marek's disease virus gene clones encoding virus-specific phosphorylated polypeptides and serological characterization of fusion proteins[J]. *Virus Genes*, 1990, 3: 309-322.
- [5] Cui Z Z, Lee L F, Liu J L, *et al.* Structural analysis and transcriptional mapping of the Marek's disease virus gene encoding pp38, an antigen associated with transformed cells[J]. *J Virol*, 1991, 65: 6509-6515.
- [6] Schat K A, Chen C-L H, Shek W R, *et al.* Surface antigens on Marek's disease lymphoblastoid tumor cell lines[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1982, 69: 715-720.
- [7] Naito M, Nakajima K, Iwa N, *et al.* Demonstration of a Marek's disease virus-specific antigen in tumour lesions of chickens with Marek's disease using monoclonal antibody against a virus phosphorylated protein[J]. *Avian Pathol*, 1986, 15: 503-510.
- [8] Nakajima K, Ikuta K, Naito M, *et al.* Analysis of Marek's disease virus-specific phosphorylated polypeptides in virus-infected cells and Marek's disease lymphoblastoid cells[J]. *J Gen Virol*, 1987, 68: 1379-1392.
- [9] Lee L F, Liu X, Witter R L. Monoclonal antibodies with specificity for three different serotypes of Marek's disease viruses in chickens[J]. *J Immunol*, 1983, 130: 1003-1006.
- [10] Silva R F, Lee L F. Monoclonal antibody-mediated immunoprecipitation of proteins from cells infected with Marek's disease virus or turkey herpesvirus[J]. *Virology*, 1984, 136(2): 307-320.
- [11] Cui Z Z, Qin A J, Lee L F, *et al.* Construction and characterization of a H19 epitope point mutant of MDV CVI988/Rispens strain[J]. *Acta Virol*, 1999, 43(2-3): 169-173.