

马立克氏病病毒 meq 基因功能研究 *

Function Analysis of Marek's Disease Virus meq Gene

韦 平 崔治中** L. F. Lee***
Wei Ping Cui Zhizhong L. F. Lee

(广西大学动物科技学院 南宁市大学路100号 530005)

(Coll. of Animal Sci. and Tech., Guangxi Univ., 100 Daxuelu, Nanning, Guangxi, 530005, China)

摘要 从马立克氏病病毒(MDV)不同致病型毒株 meq 基因序列、meq 基因产物及其细胞内表达特性和 meq 蛋白生物学功能的研究探讨马立克氏病病毒致瘤基因 meq 功能。完成了648A、CVI988/Rispens、814、广西地方毒株 G2、N、0093、0095、0297、0304共9个 MDV 毒株 meq 基因的序列测定。MDV 不同致病型毒株的 meq 基因序列相对比较保守,它们相互间核苷酸和氨基酸序列的同源性均很高;与所有7个致瘤的 MDV 毒株相比,在2个 MDV-1弱毒疫苗 CVI988/Rispens 株和814株发现有二个特征性位点突变;此外,还在其 ORF 中首次发现含15个氨基酸残基(EELCAQLCSTPPPI)的2个重复和含6个氨基酸残基(PPICTP)的4个重复,全分布在 MEQ 蛋白 C-端的转录激活域内。MEQ 蛋白的表达仅局限于感染细胞的核内,而且随感染时间增加,具有从核质向核仁和核膜转移趋向;Western Blotting 和免疫沉淀试验证实重组杆状病毒感染细胞裂解物中有大小约为60 kD 的特异带。利用表达的 MEQ 蛋白产物免疫 BALB/c 小鼠,获得的杂交瘤细胞被克隆并与 MDV 感染的鸡胚成纤维细胞(CEF)做免疫荧光试验(FA),获得4株稳定产生抗 MEQ 蛋白单克隆抗体(McAb)的杂交瘤细胞,其中3G12E6单克隆抗体能够检测到 MDV 致瘤株感染的 CEF 及自然 MD 肿瘤细胞中表达的 meq 基因产物,而 CVI988/Rispens 感染的细胞则未检测到。发现细胞内表达的 meq 基因产物可明显促进 MDV GA 株对外培养细胞的感染及增殖。研究表明,meq 基因在感染细胞内的表达水平是 MDV 增殖和致病、致瘤的分子基础。

关键词 马立克氏病病毒 致瘤基因/meq 基因 转录激活因子 序列比较 杆状病毒/昆虫细胞表达系统 RCAS 载体 单克隆抗体 功能分析

中图分类号 S852.16/65;Q78

Abstract The function of meq gene of Marek's Disease Virus (MDV) was characterization of analysed by the DNA sequences comparison of different strains of MDV, characterization of gene product and its expressions within the cells and biological function of MEQ. Genes of viruses 648A, CVI988/Rispens, 814 and local strains such as G2, N, 0093, 0095, 0297, 0304 were amplified in the whole opening reading frame (ORF) by polymerase chain reaction (PCR) technique. Two site mutations were found in CVI988/Rispens and 814, as two interesting types of repeat sequence, a 15-amino-acid (EELCAQLCSTPPPI) with 2 repeats and a 6-amino-acid (PPICTP) with 4 repeats located in the C-terminal of the gene, were found in all the MDVs. The insect SF9 cells infected with the recombinant baculovirus and the cell extractions were detected by the immunofluorescence (IF), Western blotting and the immunoprecipitation, respectively. It was found that meq gene was highly expressed in the nuclei of the SF9 cells and the expression quantity and the IF staining patterns differed in different time of post-infection (PI). The Western blotting and immunoprecipitation test showed there were specific bands around 60 kD. The MEQ protein extracted from the infected SF9 cell was immunized into BALB/c mice and the immunized spleen cells were collected and fused with the tumor cell line SP2/0 via PEG-1000 in vitro. The hybridoma cells were cloned and screened for the ability of anti-MEQ McAb secretion by immunofluorescence assay (FA) with the MDV GA infected chicken embryo fibroblast (CEF). Four McAbs were developed and detected to reveal the expression of meq gene in the CEF infected with oncogenic MDVs and naturally occurred MD tumor cells by FA and immunohistochemistry technique respectively, but not

2002-07-22 收稿, 2002-09-05 修回。

* 国家自然科学基金项目(39860055, 39870008); 广西自然科学基金项目(桂科自981101)资助。

** 山东农业大学 山东泰安 271018 (Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong, 271018, China)。

*** Avian Diseases and Oncology Laboratory, USDA, East Lansing, MI 48823, USA.

to reveal that of the CEF and the cells of visceral organ infected with CVI988/Rispens. The expression of meq gene within the cells could enhance the infection and replication of GA and then resulted in the increase of virus plaques. The results showed that the findings lead to form a hypothesis that the expression activity of the meq gene might be the molecular basis for the replication and the subsequent pathogenicity and oncogenicity of MDV.

Key words Marek's disease virus, oncogene/meq, transactivator, comparison of sequence, baculovirus/insect cell system, RCAS vector, monoclonal antibody, function analysis

马立克氏病 (Marek's Disease, MD) 是由马立克氏病病毒 (Marek's Disease Virus, MDV) 引起的一种鸡的恶性淋巴瘤肿瘤性疾病。1907年首先由匈牙利病理学家 Jozef Marek 氏^[1]报道因单核细胞在外周神经及脊柱神经根的浸润而导致公鸡的神经肿大和瘫痪。1961年,在英国科学家 Biggs^[1]的倡导下,开始使用马立克氏病这一名称。20世纪70年代以来,尽管广泛地使用了各种疫苗(单价、二价或多价苗),但在全世界范围内,MD 仍是养禽业经济上的一个主要的威胁。世界各国均把 MD 视为养鸡业最重要的疾病之一^[1]。

MDV 是一群细胞结合性的疱疹病毒科的成员,其嗜淋巴的特性与 γ -疱疹病毒相似,而其分子结构和基因组成与 α -疱疹病毒相似,可分成3种血清型,即致瘤性的血清1型 MDV (MDV-1),它是 MDV 群的原型病毒,一些致弱的疫苗株也属于此型;另2个型是非致瘤性疱疹病毒,其中血清2型 (MDV-2) 是从鸡分离的病毒,血清3型 (MDV-3) 是从火鸡分离的火鸡疱疹病毒 (HVT)^[2]。

在世界家禽业中,MD 的危害具有如下2个主要特征:(1) MDV 的毒力越来越强。在过去几十年中 MDV 的毒力发生了变化,由1970s 的强毒株 (vMDV),到1980s 的超强毒株 (vvMDV),再到1990s 的特超强毒株 (vv+MDV)。分别突破同期使用的 HVT、HVT+SB1 等疫苗的保护。最近,在欧美一些鸡场还出现能突破目前最好的疫苗株 CVI988 的保护的毒株。MDV 毒力增强的另一个表现是其宿主的扩大,由最初的鸡、鹌鹑、山鸡,到1996年以后在一些国家陆续遭受严重危害的火鸡^[3~5]。(2) MD 的发病形式多样,危害严重。临床上 MD 的表现主要有内脏与外周神经淋巴增生、神经中枢病变综合征、血管综合征、淋巴退化综合征等形式。它除了引起病禽死亡、尸体废弃和生产性能下降等方面的直接损失外,还由于导致患禽的免疫抑制,使机体对各种病原的抵抗力下降及对各种疫苗免疫的应答降低,致使机体并发或继发多种疾病,造成更大的损失^[6]。

目前,控制 MD 主要包括3个方面:疫苗接种、遗传抗性和生物安全^[7]。疫苗接种仍是现在和可见的将

来中预防和控制 MD 的中心策略。目前使用的疫苗主要有单价苗、二价苗和三价苗。这些疫苗存在3个不足:其一,疫苗接种虽可防止肿瘤发生,但不能阻止强毒感染、复制和排毒。目前并没有一种所谓“消毒疫苗”;其二,免疫雏鸡需7~14 d 方可产生很好的保护力,其间被野毒感染后即导致疫苗的保护率下降;其三,目前的任何一种疫苗并不能对所有的强毒株均提供完全的保护,而且许多情况下多种因素均可降低疫苗的保护力,导致 MD 散在暴发。因此,在寻找更有效的所谓“超级疫苗”的同时(目前看来还显得较为遥远),加强、加深对 MDV 致病、致瘤机制的研究将有助于我们从根本上有效地控制 MD 提供更多有用的依据。

目前已有许多对 MDV 基因组上70~80个特异基因或区域进行生物学功能的研究,但至今仅有46个病毒特异性的多肽通过对 MDV 或 HVT 感染细胞的提取物进行免疫沉淀试验得到鉴定,而其中仅有少数在抗原上或功能上是重要的^[8~10]。可将它们归成三大类,即(1)致瘤相关基因:132-bpr 序列、meq 和 pp38;(2)糖蛋白基因:gB、gC、gD、gE、gH、gI、gK、gL 和 gp82;(3)其他基因:除上述两类之外的基因^[2]。对重要基因生物学功能的研究,将帮助我们揭开 MDV 致病、致瘤作用的机制,并为更有效地控制 MD 提供理论依据。

由于 MDV 导致的肿瘤具有潜伏期短(感染后3周)和多克隆性,因此,有理由推测 MDV 自身可能具有致瘤基因。在目前3个可能的致瘤相关基因132-bpr、pp38、meq 中,meq 与132-bpr 基因是 MDV-1 所特有,132-bpr 的拷贝数与毒株的致弱程度有关^[11,12],pp38 被证实可引起机体的免疫抑制^[13]。由于 meq 基因具有 N-端的亮氨酸拉链结构及 C-端的富含脯氨酸的转录激活域等符合 jon/fos 转录激活基因家族的结构特征,因此,人们视它为 MDV 的致瘤基因^[14]。

虽然对 meq 基因及其 MEQ 蛋白的研究已取得了上述的成果,但目前还存在如下重要问题尚未解决:(1)既然 meq 是一个属于 jon/fos 转录激活基因家族的致瘤基因,那么同属 MDV-1 的致瘤株(如

GA、648A等)与弱毒疫苗株(如CVI988、814等)在 meq 基因的分子结构上有什么差别,这种差别与其功能存在怎样的关系;(2)由于基因的功能(活性)与其表达的水平有正相关,那么MDV的致瘤毒株与弱毒疫苗株之间在 meq 基因的表达水平上是否存在差别呢;(3) meq 基因的表达产物-MEQ蛋白对MDV的增殖是否有影响,有怎样的影响。这些问题的阐明,将有助于对 meq 基因及其产物 MEQ 蛋白的生物学功能的了解,从而对最终阐明MDV致病、致瘤的机制以及有效控制 MD 都将具有重要的意义。

1 马立克氏病病毒不同致病型 meq 基因的比较研究

1.1 材料与方法

1.1.1 MDV 毒株

vv+MDV: 648A 株; vvMDV: G2和 N 株; 广西野毒株: 0093、0095、0297和0304, 从临床 MD 阳性病例的肿瘤组织获得; mMDV: CVI988/Rispens 株和814株。共9个病毒株。

1.1.2 meq 基因的扩增及产物的测序

按韦平等^[15]设计的引物及反应条件, 利用上述各个毒株的基因组 DNA 进行整个 meq 基因的开放阅读框(ORF)的扩增, PCR 产物的大小约为1.1 kb。分别交由大连宝生物工程有限公司和上海生工生物工程技术服务有限公司进行 DNA 序列测定。每个毒株均取3次不同 PCR 反应的3份产物分别进行测序, 以避免因 PCR 反应本身造成的序列错误。

1.1.3 DNA 序列的比较分析

利用 DNASTar (DNASTAR Inc., Madison, WI) 和 Blast (NCBI) 软件对各个样品的 DNA 序列进行比较分析, 而且对根据其 DNA 序列推测的氨基酸序列也进行比较分析。属 vvMDV 的 GA 株 meq 基因的 DNA 和氨基酸的序列源于 GenBank 公布的数据(检索号为 HSMMDVECOQ)。

1.2 结果与分析

1.2.1 首次完成9个 MDV 毒株 meq 基因序列测定

本次研究首次完成了648A、CVI988/Rispens、814、广西地方毒株 G2、N、0093、0095、0297、0304 共9个 MDV 毒株 meq 基因的序列测定, 所有强毒株 meq 基因的 ORF 均为1020 bp, 而2个弱毒疫苗株的为1017 bp, 与 S-I.Lee 等^[16]报道在弱毒疫苗株 CVI988/C、CVI988/R6和 JM 株(vvMDV) meq 基因的 ORF 中发现1个 178 bp 的插入序列的结果不一致。我们将测序结果发送给 GenBank, 各毒株的检索号为: 0093、AF493550; 814、AF493551; 0095、

AF493552; 0297、AF493553; 0304、AF493554; CVI988/Rispens、AF493555; G2、AF493556; N、AF493557; 648A、AF493558。

1.2.2 不同致病型毒株 meq 基因序列的差异

DNA 序列及其推导的氨基酸序列比较表明, MDV-1不同型的 meq 基因序列相对比较保守, 它们相互间核苷酸的同源性很高(97.5%~99.8%)。国际上首次发现并报道了2个疫苗毒株 CVI988/Rispens 和814有意义的2个特征性差别: 一是它们均缺失 meq 基因 ORF 中第575~577位的3个碱基(CAC), 而属致瘤株的 GA 株(vvMDV)、648A(vv+MDV)、广西2个野毒株 N 株和 G2株(vvMDV)在这个位点则完全保持不变。随后, 我们对4个广西 MD 阳性病例的肿瘤病料中获得的 MDV 基因组 DNA 进行 meq 基因扩增、测序时, 也获得相同的结果; 二是它们的第71位氨基酸也由强毒株的丙氨酸(A)变成了丝氨酸(S), 这仅因一碱基突变所致。分别见图1和图2。

1.2.3 转录激活域内两类氨基酸重复结构的发现

MEQ 蛋白分子中, 在 C-端的转录激活域内发现了6个氨基酸残基 PPICTP 的4个重复与15个氨基酸残基 EELCAQLCSTPPPI 的2个重复(见图2), 这2种结构可能与基因的转录激活及调控病毒 DNA 复制的功能有关。

2 meq 基因产物鉴定及其细胞内表达特征的研究

研究和阐明 meq 基因产物生物学功能的主要障碍之一是难以获得足够数量内源性的基因蛋白。为了解决这一难题, 我们选择杆状病毒/昆虫细胞这一真核细胞表达系统来产生 MEQ 蛋白。杆状病毒表达载体是源于苜蓿银纹夜蛾核多角体病病毒 (autograph californica nucleopolyhedrosis virus, AcNPV) 的核酸并经基因改造发展而成的, 已切除了核多角体蛋白基因, 外源基因则可克隆到这一位置, 在保留的强有力的多角体启动子 P_{PHI} 的作用下, 重组病毒在感染宿主细胞——草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 的卵巢细胞系 SF9 后, 外源基因可得到大量表达。除此之外, 由于这是在较高级的真核细胞内进行的, 蛋白质翻译后还发生了许多修饰、加工等过程, 这对于重组蛋白完整的生物学功能而言是必需的, 因而使其在抗原性、免疫原性及功能性上与原蛋白相似^[17]。

2.1 材料与方法

2.1.1 构建重组杆状病毒

按照韦平等^[17]的方法先构建重组杆状病毒转移载体, 然后再与线性化的 AcNPV (Bac-N-Blue™)

DNA 共转染于 SF9 细胞。最后取上清 (称转染病毒种子) 做病毒蚀斑试验, 并对插入基因进行 PCR 分析和 DNA 测序的验证。克隆化的重组病毒株按韦平等^[17]的方法分别制备 P-1、P-2 和 P-3 种子液。

2.1.2 利用重组杆状病毒在昆虫细胞系表达 MEQ

利用 P-3 种子液以 5 MOI (multiplicity of infection, 即每个细胞感染病毒粒子的数量) 的量接种 27℃ 摇瓶培养的 SF9 细胞。同时设野生型 (WT) 杆

状病毒和细胞空白 2 个对照。分别在接种后 (PI) 24、48、72、96、120h 各吸取细胞培养物于 4℃ 离心 (800 ×g) 10m, 收获沉淀细胞作 meq 基因细胞内表达特征及 MEQ 蛋白的鉴定。

2.1.3 MEQ 蛋白在 SF9 细胞内表达的观察

按韦平等^[17]的方法分别取沉淀细胞作抹片, 固定后用重组痘病毒表达的 MEQ 制备的单抗 23B46^[18]作间接免疫荧光试验 (IFA), 在荧光显微镜

GA. seq: A..... G..	: 240
648A. seq: A..... G..	: 240
N. seq:	: 240
G2. seq:	: 240
0093. seq:	: 240
0095. seq:	: 240
0297. seq:	: 240
0304. seq:	: 240
814. seq: T..... G..	: 240
CVI988. seq: T..... G..	: 240
AGGAGGAGAAACAGAAGCTGGAAAGGAGGAGAAAAAGGAATCGTGACGCCCTCGGAGAAGACGCAGGGAGCAGACGTAC		
GA. seq:	: 320
648A. seq:	: 320
N. seq:	: 320
G2. seq:	: 320
0093. seq:	: 320
0095. seq:	: 320
0297. seq:	: 320
0304. seq:	: 320
814. seq:	: 320
CVI988. seq:	: 320
TATGTAGACAAACTCCATGAAGCATGTGAAGAGCTGCAGAGGGCCAATGAACACCTACGTAAGGAAATTCGAGATCTAAG		
GA. seq: T.....	: 400
648A. seq: T.....	: 400
N. seq:	: 400
G2. seq:	: 400
0093. seq:	: 400
0095. seq:	: 400
0297. seq:	: 400
0304. seq:	: 400
814. seq:	: 400
CVI988. seq: T.....	: 400
GACTGAGTGCACGTCCCTGCGTGACAGTTGGCTTGTCATGAGCCAGTTTGCCTATGGCGGTACCCCTAACGGTGACCC		
GA. seq:	: 480
648A. seq: G..... A.....	: 480
N. seq:	: 480
G2. seq:	: 480
0093. seq: G.....	: 480
0095. seq:	: 480
0297. seq: G.....	: 480
0304. seq: G.....	: 480
814. seq: A.....	: 480
CVI988. seq:	: 480
TTGGACTGCTTACCACCCCGCACGATCCCGTTCCCTGAACCTCCCATTTGCACTCCTCCACCTCCCTCACCGGATGAACCT		
GA. seq:	: 560
648A. seq: G..... G..... G..... G.....	: 560
N. seq: G.....	: 560
G2. seq:	: 560
0093. seq: G.....	: 560
0095. seq: G.....	: 560
0297. seq: G.....	: 560
0304. seq: G.....	: 560
814. seq:	: 560
CVI988. seq:	: 560
AACGCTCCACATTGCTCCGGTCCCAACCTCCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATACGGAGGAACCTTTGCGCCACGCT		
GA. seq:	: 640
648A. seq:	: 640
N. seq:	: 640
G2. seq:	: 640
0093. seq:	: 640
0095. seq:	: 640
0297. seq:	: 640
0304. seq: T..... T..... T.....	: 640
814. seq:	: 640
CVI988. seq:	: 640
CTGCTCGACCCACCACTCCCATCTCTACTCCCATATTATCTACGCTCCGGGCTTCCCCCTCCAACCTCCTATCT		

```

GA. seq: ..... C ..... :720
648A. seq: ..... :720
N. seq: ..... :720
G2. seq: ..... :720
0093. seq: ..... :720
0095. seq: ..... :720
0297. seq: ..... :720
0304. seq: ..... :720
814. seq: ..... C ..... :720
CVI988. seq: ..... C ..... :720
GTACCCCGCTCCTCCCGATGCGGAGGAGCITTTGCGCCAGCTCTGCTCGACCCACCACCTCCCATCTGTACTCCCAT

GA. seq: ..... A ..... :800
648A. seq: ..... :800
N. seq: ..... :800
G2. seq: ..... :800
0093. seq: ..... C ..... :800
0095. seq: ..... C ..... :800
0297. seq: ..... :800
0304. seq: ..... T ..... C ..... :800
814. seq: ..... :800
CVI988. seq: ..... :800
TCCCTCTTCTGCCCTCCCAGCCTCCATCTCCGGAGGGCATCTTCCCTGCATTGTGTCTTACCGAGCCGTGTACCC

GA. seq: ..... :880
648A. seq: ..... C ..... :880
N. seq: ..... :880
G2. seq: ..... :880
0093. seq: ..... :880
0095. seq: ..... :880
0297. seq: ..... :880
0304. seq: ..... :880
814. seq: ..... :880
CVI988. seq: ..... :880
TCCATGCGCCGGGACGGTTACGCTCAGCTTTGTCTGTTGGCCAGGCTCCCTTTTTACCCCATCTCCCCACATCCGG

GA. seq: ..... :960
648A. seq: ..... :960
N. seq: ..... :960
G2. seq: ..... :960
0093. seq: ..... :960
0095. seq: ..... :960
0297. seq: ..... :960
0304. seq: ..... :960
814. seq: ..... :960
CVI988. seq: ..... :960
CTCCGGAGCCGGAGAGGCTTTATGCTCGTCTTACCGAGGATCCCGAACAGGATTCCTTGTATTCCGGCCAGATTTATATT

GA. seq : ..... : 1020
648A. seq : ..... : 1020
N. seq : ..... : 1020
G2. seq : ..... : 1020
0093. seq : ..... : 1020
0095. seq : ..... : 1020
0297. seq : ..... : 1020
0304. seq : ..... : 1020
814. seq : ..... : 1017
CVI988. SEQ : ..... T ..... : 1017
CAGTTTCCCTCGGATACTCAGTCTACGGTCTGGTGGTTCCAGGTGACGGGAGACCCCTGA

```

图1 各MDV-1毒株 meq 基因 DNA 序列 (160~1020nt) 的比较

Fig. 1 The comparison of DNA sequences (160~1020nt) of meq gene from different strains of MDV-1

观察不同感染阶段 MEQ 蛋白在 SF9 细胞内的表达特征, 并拍照。

2.1.4 MEQ 蛋白的鉴定

取高度表达 meq 基因的 SF9 细胞分别进行 Western Blot 试验和免疫沉淀试验^[17]。

2.1.5 MEQ 蛋白的单克隆抗体 (McAb) 的制备

将收获的细胞反复冻融3次后作为免疫用抗原, 按刘秀梵等的方法^[19]进行 MEQ 蛋白的单克隆抗体 (McAb) 的制备。

2.1.6 单克隆抗体的初步应用

用制备的抗 MEQ 蛋白 McAb 分别进行 MDV 不

同致病型毒株, 包括致瘤性的 GA、RB1B 和非致瘤性的 CVI988/Rispens 株感染细胞的 IFA 以及临床 MD 肿瘤样品冰冻切片的免疫酶组化染色检测^[20], 以进行其分泌抗 MEQ McAb 能力的筛选及鉴定制备的 McAb 的功能。

2.2 结果与分析

2.2.1 重组杆状病毒的克隆与验证

通过蚀斑试验 (图3)、插入基因的 PCR 分析 (图4) 和插入 DNA 测序的验证, 成功地获得了携带 meq 基因完整 ORF 序列的重组杆状病毒 rBlubac4-meq 的克隆。随后制备的重组杆状病毒 P-3 种子液经蚀斑试

GA. seq:K..D.	:81
648A. seq:K..D.	:81
N. seq:	:81
G2. seq:	:81
0093. seq:	:81
0095. seq:	:81
0297. seq:	:81
0304. seq:	:81
814. seq:S..D.	:81
CVI988. seq:S..D.	:81
MSQEPEPGAMPYSPADDPSPDLDSLGLSTSRKKRKRSHDIPNSPSKHPPFDGLSEEEKQLERRRKRNRDAARRRRREQTYT		
71		
GA. seq:V.....	:162
648A. seq:V..R.....Q.....	:162
N. seq:	:162
G2. seq:	:162
0093. seq:A.....	:162
0095. seq:	:162
0297. seq:A.....	:162
0304. seq:A.....	:162
814. seq:	:162
CVI988. seq:V.....	:162
VDKLHEACEELQRANEHLRKEIRDLRTECTSLRAQLACHEPVCPMAVPLTVTLGLLTTPHDPVPEPPICTP		
PPPSDEPNA		
GA. seq:P.....P.....	:243
648A. seq:	..W...A..A.....	:243
N. seq:	:243
G2. seq:P.....	:243
0093. seq:L.....	:242
0095. seq:T.....	:243
0297. seq:	:243
0304. seq:	:243
814. seq:P.....P.....	:243
CVI988. seq:P.....P.....	:243
PHCSGSQPPICTP		
RPPDTEELCAQLCSTPPPIISTPHIIYAPGPSPLQPPICTPAPPDAEELCAQLCSTPPPIICTP		
PHSLF		
194		
GA. seq:	:324
648A. seq:P.....	:324
N. seq:	:324
G2. seq:	:324
0093. seq:	:323
0095. seq:	:324
0297. seq:	AL...S.....	:324
0304. seq:	:324
814. seq:	:324
CVI988. seq:	:324
CPPQPPSPEGIFPALCPVTEPCTPPSPGTVYAQLCPVQGAPLFTSPPHPAPEPERLYARLTEDPEQDSLYSGQIYIQFPS		
GA. seq:	:339
648A. seq:	:339
N. seq:	:339
G2. seq:	:339
0093. seq:	:338
0095. seq:	:339
0297. seq:	:339
0304. seq:	:339
814. seq:	:338
CVI988. seq:	..I.....	:338
DTQSTVWWFPGDGRP		

图2 各MDV-1毒株 meq 基因氨基酸序列比较

Fig. 2 The comparison of amino acid sequences of MEQ proteins from different strains MDV-1
带框的序列分别为两种重复的结构。The letters blocked are the repeat sequences

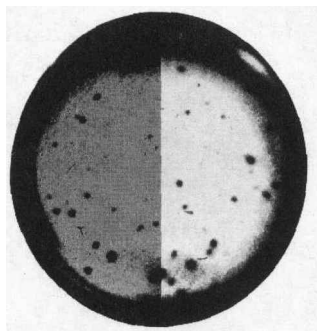


图3 转染后获得的重组病毒克隆 (蓝斑)

Fig. 3 The recombinant clones (blue colonies) resulted from transfection

验, 计算到其浓度为 1×10^8 个 PFU/ml, 浓度相当高, 可供蛋白表达研究之用。

2.2.2 MEQ 蛋白在 SF9 细胞内的表达特征

荧光显微镜观察的结果发现, 构建的重组杆状病毒在 SF9 细胞上表达的 MEQ 蛋白可被 23B46 单抗所识别; 染色仅局限在细胞核内, 而且在 PI 24h~PI 72h 期间, 产物表现出由核质向核膜、核仁转移的现象 (见图5)。在用制备的 3G12E6 单抗对 MDV 致瘤株感染的 CEF 及自然 MD 肿瘤组织的细胞进行检测时, 也发现特异性的染色仅局限于细胞核, 包括核质均匀着色和核膜着色两种类型 (见图8)。我们认为这

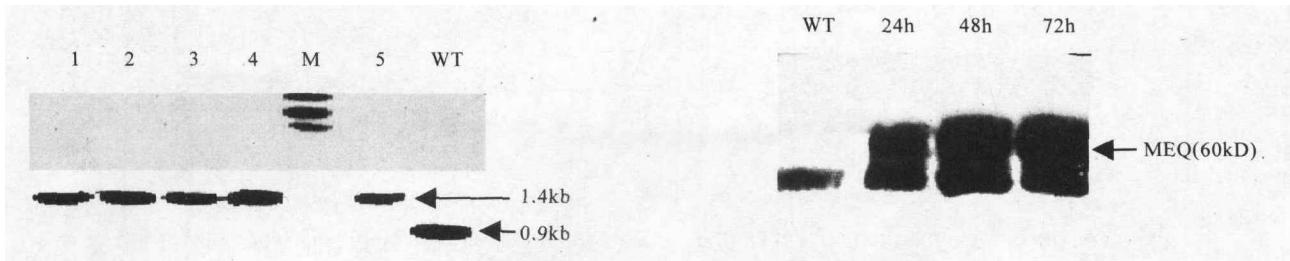


图4 应用 PCR 技术鉴定阳性蚀斑克隆

Fig. 4 The confirmation of positive clones by PCR (1~5为阳性克隆, M为标准 marker, WT为阴性克隆。1~5 were positive clones, M was standard marker, WT was negative clone.)

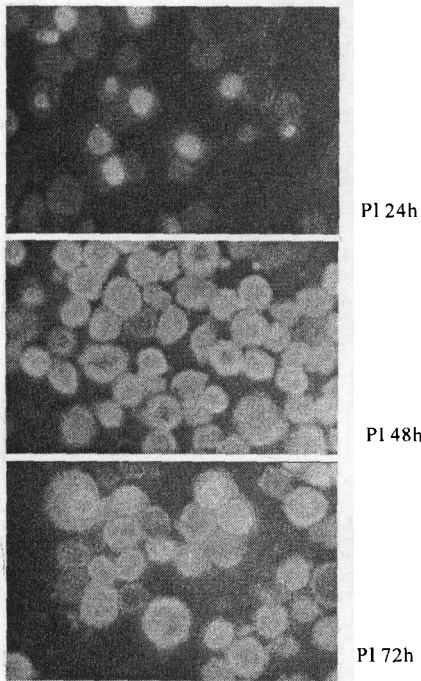


图5 不同感染时间 MEQ 蛋白在细胞内的表达特征

Fig. 5 The expression characters of MEQ in cells in different hours of post-infection

与 MEQ 作为核内调控蛋白的性质和功能密切相关。
2.2.3 MEQ 蛋白的鉴定

用杆状病毒/昆虫细胞表达系统产生的 MEQ 蛋白, 经 Western Blotting 和免疫沉淀试验检测^[17], 均发现有大小约为 60 kD 的特异带(图6、图7)(以已知大小为 60 kD 的 MDV gB 蛋白为内参照物)。证明杆状病毒/昆虫细胞系统用于表达外源基因可行有效。

2.2.4 MEQ 蛋白 McAb 的初步鉴定与应用

获得了4株稳定产生抗 MEQ 蛋白 McAb 的杂交瘤细胞^[20], 其中的3G12E6能够检测到 MDV 致瘤株感染的鸡胚成纤维细胞(CEF)及自然 MD 肿瘤组织的细胞(见图8之 a, b)中表达的 meq 基因产物, 但与弱毒疫苗株 CVI988/Rispens 感染的 CEF 和免疫的正常鸡的组织(见图8之 c)所做的相同试验, 则未观察到类似的特异性荧光和酶染色。我们认为这是因为 meq 基因在致瘤株中的表达水平远远高于非

图6 用 Western Blotting 鉴定 SF9 细胞不同时间表达的 MEQ 蛋白

Fig. 6 Western Blotting of MEQ expressed in SF9 cells in different hours of post-infection

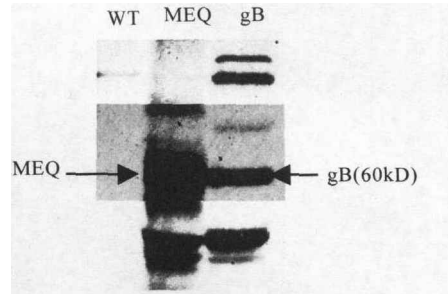


图7 用免疫沉淀试验鉴定 SF9 细胞表达的 MEQ 蛋白
Fig. 7 The immunoprecipitation of MEQ expressed in SF9 cells

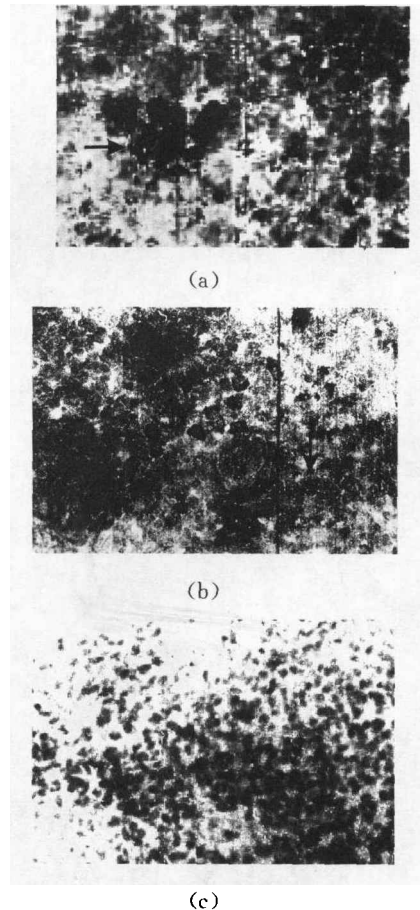


图8 应用单抗对自然肿瘤组织 (a、b) 和正常肝组织 (c) 进行免疫组化试验的结果

Fig. 8 The immunohistochemistry of natural MD tumor tissues (a, b) and normal tissue (c) with McAb (图中箭头所指是呈阳性酶染色的细胞, positive cells were indicated with arrows)

致瘤株的表达水平所致。这进一步证实先前认为它是细胞核的转录激活因子^[21~22]和具有调控病毒 DNA 复制的功能^[23]的假设。

这也意味着此单抗可用于 MDV 强、弱毒株的鉴别以及临床 MD 肿瘤的诊断。据我们所知,这是第一个具有此功能的单抗。

3 meq 基因生物学功能的初步研究

在 meq 基因的产物生物学功能的研究中,难题之一就是无法使基因的产物象 MDV 自然感染时一样的表达并定位于细胞核内。为了解决此难题,我们应用反转录病毒载体进行研究。反转录病毒转染载体质粒 (retrovirus competent A subgroup, RCAS),是一个 12 000 bp 的大质粒,它是将禽白血病病毒 (avian leucosis virus, ALV) A 亚群的前病毒 DNA 克隆到 pBR322 质粒中构成的。源于 ALV 的 DNA 包括 gag (编码病毒 5 种核心蛋白) 基因、pol (编码病毒反转录酶和整合酶) 基因和 env (编码病毒外膜蛋白) 基因以及在上述基因两侧的、序列相同的长末端重复序列 (long terminal repeats, LTRs)。LTRs 含有启动和增强子序列,控制前病毒 DNA 转录为 RNA。该质粒带有 1 个独特的限制性内切酶 Cla I 位点,外源基因可通过此位点克隆到载体质粒中。当将该质粒转染到 CEF 的细胞系时,RCAS 内的 LTRs 启动子序列可被细胞的 RNA 聚合酶所识别,以前病毒 DNA 为模板转录出 mRNA,随即在细胞内组装成完整的具传染性的病毒。病毒游离到细胞外后,可进一步感染其它细胞。同时,前病毒 DNA 可整合到宿主细胞的染色体 DNA 之中,进而得以转录和表达^[24]。

通过构建重组反转录病毒 rRCAS-meq,使 meq 基因能在 MDV 自然宿主细胞系 CEF 系 DF1 上较高水平的表达,而且象 MDV 自然感染时一样表达并定位于细胞核内^[24]。这就使我们对 meq 基因表达后对 MDV 在细胞内感染和繁殖的影响的研究成为可能。然后,应用重组反转录病毒 rRCAS-meq 感染 DF1,然后再用 vMDV 参考株 GA 感染细胞,待出现病毒斑后进行黑斑试验 (black plaque assay, BPA),以确定细胞内表达的 meq 基因产物对 GA 株感染细胞以及细胞内增殖的影响,为研究 meq 基因及其产物的生物学功能提供有用的资料。

3.1 材料与方法

3.1.1 重组转染载体质粒 RCAS-meq 的构建

通过 PCR 技术,以 MDV EcoQ 片段 (2.5 kb) 为模板,在 meq 基因 ORF 5' 末端和 3' 末端各设计 1 个 PCR 引物,它们分别带有 1 个限制性内切酶 Cla I 的

酶切位点及几个保护碱基。常规条件下进行 PCR。然后用内切酶 Cla I 将 PCR 产物多余的末端碱基切去,同时用同种酶将 RCAS 打开,然后用 T4 噬菌体 DNA 连接酶将 meq 基因重组到 RCAS 的 Cla I 位点中^[24]。

按常规的方法将重组的 Δ RCAS-meq 转染载体质粒转化到用氯化钙制备的大肠杆菌 TG1 感受态细胞中,用 QIAGEN 质粒提取试剂盒并按其提纯方法提取质粒 DNA;获得的重组 Δ RCAS-meq 质粒,需经过 DNA 碱基序列测定来确定 meq 基因插入方向的正确性。采用磷酸钙共沉淀法将重组的 Δ RCAS-meq 转染 DF1 细胞^[24]。

3.1.2 重组反转录病毒的相对滴度及感染细胞中 MEQ 蛋白的检测

DF1 细胞在转染后 (post-transfection, PT) 的 3 d、5 d、7 d、9 d,分别收集其培养上清,并用 PT 5d 的培养上清感染新的 DF1 细胞。在感染后 (post-infection, PI) 的 1~8 d 内,每天分别收集其上清,用 ELISA 测定 ALV p27 蛋白的含量 (OD 值) 并以它作为重组病毒的相对滴度的指标,方法及其主要步骤按文献 [24] 的方法进行。以 MEQ 单抗 23B46^[18],采用间接免疫荧光技术检测 MEQ 蛋白在转染和感染的 DF1 细胞中的表达情况。

3.1.3 黑斑试验

在制备好的 DF1 细胞单层 (细胞长满皿底的 80% 时) 上,先接种重组病毒 rRCAS-meq (病毒相对滴度为 0.39 的 ELISA OD 值),并设立未接种对照组;12 h 后再接种 GA 株 (按 100 个 PFU/皿的理论值),置 37 C、5% CO₂ 培养箱继续培养^[25]。

按 R F Silva 博士实验室建立的方法^[25]进行黑斑试验,以确定 meq 基因的表达对 GA 株病毒斑数量的影响。

3.2 结果与分析

3.2.1 重组反转录病毒 rRCAS-meq 的成功构建

通过对重组质粒用内切酶 Cla I 消化、插入片段的 DNA 碱基进行测序验证,确定获得的重组质粒中 meq 基因插入的方向 (与 ALV 载体基因的转录方向一致) 和序列都正确;对转染和感染 DF1 细胞及其细胞培养上清分别作免疫荧光试验和 ELISA 检测的结果表明,成功获得重组反转录病毒 rRCAS-meq,并证实它能在 MDV 自然宿主细胞系 DF1 上较高水平的表达源于 GA 株的 meq 基因。这为研究 MEQ 蛋白的生物学功能奠定了良好的基础。本研究成功建立的能将外源基因导入细胞内并使之得以表达的 RCAS 系统,将为基因功能研究提供一种新的、有效的模式。

3.2.2 重组反转录病毒 rRCAS-meq 在转染和感染 DF1 细胞中的增值及 meq 基因的表达情况

本研究用的磷酸钙转染法方便易行, 转染效率高、成本低, 而且对细胞的损伤小(低于 Lipofectamine 法和电穿孔法, 结果未发表于此)。重组质粒 Δ RCAS-meq 转染 DF1 细胞后, 细胞培养上清释放的游离病毒的滴度在第 5 天即达到较高的水平, 直至第 9 天一直变化不大。因此, 收集重组病毒时应最早在 PT 5d, 最迟不超过 PT 9d (见表 1)。

表 1 转染后细胞中 MEQ 蛋白的表达及培养上清中游离病毒的相对滴度

Table 1 The MEQ expression within the cells and the virus relative titres in the supernatant of different days of PT

检测项目 Detection	FA 阳性细胞 FA positive cells (%)	ELISA OD 值 OD value
3 d PT	1~3	0.090
5 d PT	10~20	0.311
7 d PT	20~30	0.342
9 d PT	20	0.301

ELISA 结果和判定标准: OD 值 < 0.1 为阴性, 0.1 < OD 值 < 0.2 为可疑, OD 值 \geq 0.2 为阳性。

Criteria for ELISA: negative OD < 0.1; suspicious 0.1 < OD < 0.2; positive OD \geq 0.2

为了确定 DF1 在转染及感染后是否表达 MEQ 以及表达的水平, 我们利用 MEQ 的单抗通过间接免疫荧光试验进行检测。结果(表 1)表明, 经磷酸钙法在 PT 3 d 即有少量(1%~3%)细胞表达 MEQ 蛋白, 至 PT 7 d 阳性细胞数达到最高值(20%~30%); 而用重组病毒感染的 DF1 细胞, 在感染后的 PI 2d 开始有细胞表达 MEQ 蛋白, 至 PI 4~5d 时达到最高值(50%~60%), 见表 2。这为研究 MEQ 蛋白的生物学功能奠定了良好的基础。与本研究在其它细胞类型所观察到的情况一样, 反转录病毒表达的 MDV meq 基因产物定位在细胞核内(包括核质和核仁), 这与他人的研究报道^[22,26]一致。进一步证实了 MEQ 属于转录激活因子的一种细胞核及核仁蛋白的理论。

3.2.3 meq 基因的表达对 MDV GA 株在体外增殖的影响

两次分别进行的重复性试验均对细胞皿的病毒斑进行了计数, 发现在 GA 株感染前接种重组反转录病毒的细胞皿, GA 产生的病毒斑(即黑斑)数均明显比未接种重组反转录病毒细胞皿多(43/33, 45/30)。详见表 3。

这表明, 细胞内表达的 meq 基因产物可促进 GA

株于体外培养细胞中的感染与增殖, 导致 MDV 的病毒斑数显著增多。在我们另一项研究中也发现, meq 基因在致瘤株中的表达水平远远高于非致瘤株的表达水平^[20]。这就为证实先前认为 meq 基因是 MDV 的转录激活因子^[22]并具有调控病毒 DNA 复制^[23]功能的理论提供了证据。美国 R. Morgan 博士的研究小组也曾发现, 缺少了 meq 基因的 MDV 突变株因增殖能力不佳, 在用作疫苗时未能提供好的保护力^[27]。这与本研究的结果相吻合。

表 2 重组病毒感染后细胞中 MEQ 蛋白的表达及上清中病毒的相对滴度

Table 2 The MEQ expression within the cells and the virus relative titres in the supernatant of different days of PI

检测项目 Detection	FA 阳性细胞 FA positive cells (%)	ELISA OD 值 OD value
1 d	—	—
2 d	3~5	—
3 d PT	20	0.112
4 d PT	50~60	0.223
5 d PT	50~60	0.392
6 d PT	30	0.388
7 d PT	30	0.391
8 d PT	20	0.302

ELISA 结果和判定标准: OD 值 < 0.1 为阴性, 0.1 < OD 值 < 0.2 为可疑, OD 值 \geq 0.2 为阳性

Criteria for ELISA: negative OD < 0.1; suspicious 0.1 < OD < 0.2; positive OD \geq 0.2

表 3 GA 株感染后表达与不表达 meq 基因的细胞所产生的病毒黑斑数

Table 3 The black plaque numbers of the cells with expression and non-expression of MEQ

试验 Exp.	不表达 meq 基因的细胞 MEQ non-expressed cells	表达 meq 基因的细胞 MEQ expressed cells
1	33* (11+13+9)	43 (13+16+14)
2	30 (10+12+8)	45 (15+17+13)

* 为 3 个细胞皿病毒黑斑计数之总和。Total number of 3 discs.

根据本研究的结果, 我们认为 meq 基因在宿主细胞内的表达水平是 MDV 繁殖, 进而能致病、致瘤的分子基础。因为, 病毒的毒力或致病力与其对细胞的感染与增殖能力是成正相关的。当然, 最终的结论还有待于进一步取更多 MDV 毒株(强、弱毒)做试验来验证。

4 结论

(1) MDV 不同致病型毒株的 meq 基因序列相对

比较保守,它们相互间核苷酸和氨基酸序列的同源性均很高;与所有7个致瘤的MDV毒株相比,在2个MDV-1弱毒疫苗CVI988/Rispens株和814株首次发现2个特征性的位点突变。

(2) 通过构建重组杆状病毒,使meq基因在昆虫细胞系SF9上获得高水平的表达;通过Western Blotting和免疫沉淀试验,首次确定了MEQ蛋白产物的大小约为60 kD。利用MEQ蛋白产物免疫BALB/c小鼠,获得4株稳定产生抗MEQ蛋白McAb的杂交瘤细胞,利用其中的3G12E6单克隆抗体通过间接免疫荧光试验和免疫酶组化技术,首次发现MDV致瘤株GA、RB1B感染的CEF及自然MD肿瘤细胞中均有meq基因产物的表达,而弱毒疫苗株CVI988/Rispens感染的细胞则未检测到。

(3) 构建重组反转录病毒并应用其所进行的基因表达产物对GA株感染、增殖影响的研究中,首次发现细胞内表达的meq基因产物可明显促进MDV GA株对体外培养细胞的感染及增殖。本研究还证实反转录病毒载体RCAS系统是基因功能研究的一种有效的模式。

致谢

本项目的研究分别得到广西大学养禽与禽病研究所的李康然教授、龙进学同学、磨美兰老师,广西区兽医研究所的蒋玉雯研究员,扬州大学生物工程实验室秦爱建教授、金文杰和刘岳龙老师,美国农业部禽病与肿瘤研究所的R F Silva博士等的大力支持与帮助,在此深表谢意!

参考文献

- 1 Witter R L. Current and future strategies for control of Marek's disease. In: Avian Tumor Virus Symposium. by A M Fadly et al. (eds). Madison: Omnipress, WI, USA, 42~47.
- 2 Calnek B W, Witter R L. Neoplastic Diseases/Marek's Disease. In: B W Calnek et al. (eds). Diseases of Poultry (10th ed.), Ames: Iowa State University Press, Iowa, USA. 1999. 369~413.
- 3 Gaudry D. Aerosols (WVPA Newsletter), 1997. 9.
- 4 Davidson I, Weisman Y, Perl S et al. Differential diagnosis of avian tumor by PCR report of MDV-1 infection in turkey. In: Silva R R et al. (eds). Current Research on Marek's Disease, Pennsylvania: AAAP Inc, USA, 1996, 311~316.
- 5 Malkinson M et al. Vet Rec, 1996, 139: 504.
- 6 韦平, 丁家波. 家禽病毒性免疫抑制性疾病及其防制策略. 中国家禽(学报版), 2001, 23(22): 182~185.
- 7 韦平. 马立克氏病研究的最新进展. 广西农业生物科学, 2000, 19(2): 110~115.
- 8 Ikuta K, Nishi Y, Kato S et al. Immunoprecipitation of Marek's disease virus-specific polypeptides with chicken antibodies purified by affinity chromatography. Virology, 1981, 114: 277~281.
- 9 Van Zaane D, Brinkhol J M A, Westenbrink F et al. Molecular biological characterization of Marek's disease virus I Identification of virus specific polypeptides in infected cells. Virology, 1982, 121: 116~132.
- 10 Van Zaane D, Brinkhol J M A, Westenbrink F et al. Molecular biological characterization of Marek's disease virus II Differentiation of various MDV and HVT strains. Virology, 1982, 121: 133~146.
- 11 Kanamori A, Nakajima K, Ikuta K et al. Copy number of tandem direct repeats within the inverted repeats of Marek's disease virus DNA. Biken J. 1986, 29: 83~89.
- 12 Ross N, Milne B. Manipulation of the genomes of MDV and HVT. In: Kato S et al. (eds). Advances in Marek's Disease Research. Osaka: Japanese Association in Marek's Disease, Japan, 1989. 43~49.
- 13 Cui Z, Lee L F. Construction of a recombinant CVI 988 strain expressing virulent epitope on 38 kD phosphorylated protein of Marek's disease virus. In: XIth International congress of the World Veterinary Poultry Association. Budapest: Hungary Branch of the WVPA, 1997.
- 14 Liu J L, Lee L F, Ye Y et al. Nucleolar and nuclear localization properties of a herpesvirus bZIP oncoprotein MEQ. J Virol, 1997, 71(4): 3188~3196.
- 15 韦平, 崔治中. 马立克氏病病毒不同致病型meq基因的比较研究. 中国预防兽医学报, 2002, 24(2): 88~92.
- 16 Lee S I, Ohashi K, Takagi M et al. Insertion of a 178-bp sequence into the meq gene of Marek's disease virus serotype 1. In: K A Schat et al. (eds). Current progress on Marek's disease research, Pennsylvania: AAAP Inc, USA. 2001. 289~294.
- 17 韦平, Lee L F. 应用杆状病毒载体在昆虫细胞表达马立克氏病毒meq基因. 中国兽医学报, 2000, 20(3): 211~215.
- 18 Liu J L, Lee L F, Ye Y et al. Nucleolar and nuclear localization properties of a herpesvirus bZIP oncoprotein MEQ. J Virol, 1997, 71(4): 3188~3196.
- 19 刘秀梵, 焦新安. 杂交瘤技术. 见: 刘秀梵主编. 单克隆抗体在农业上的应用. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1994. 11~50.
- 20 韦平, 崔治中, 龙进学等. 马立克氏病病毒MEQ蛋白单克隆抗体的制备及应用研究. 广西大学学报(自然科学版), 2002, 27(1): 5~9.
- 21 Qian Z, Brunovski P, Rauscher F J et al. Novel DNA

binding Specificities of a Putative Herpesvirus bZIP Oncoprotein. *J Virol*, 1995, 60: 4037~4044.

22 Qian Z, Brunovski P, Rauscher F J et al. The transactivation activity of Meq Marek's disease virus bZIP protein persistently expressed in latently infected transformed T cells. *J Virol*, 1996, 70(10): 7161~7170.

23 Kung H J, Lee L F, Liu J L et al. A comparative study of blip protein in ontogeny herpesviruses; MEQ and K bZIP. In: Current progress on Marek's disease research, Pennsylvania: AAAP Inc, USA, 2001. 141~148.

24 韦平, Lee L F. 利用重组反转录病毒表达马立克氏病毒 meq 基因. *中国兽医学报*, 1999, 19(2): 105~108.

25 韦平, Lee L F. 马立克氏病毒 MEQ 蛋白对 MDV 增

殖影响的研究. *广西农业生物科学*, 2002, 21(1): 12~15.

26 Jones D, Lee L F, Liu J L et al. Marek's disease virus encodes a basic-Leucine Zipper gene resembling the fos/jun oncogenes that is highly expressed in lymphoblastoid tumors. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1992, 89: 4042~4046.

27 Witter R L. Marek's disease vaccine past, present and future (chicken vs virus-A battle of the centuries), In: Schat K A et al. (eds). Current progress on Marek's disease research, Pennsylvania: AAAP, Inc, USA, 2001, 1~9.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第46页 Continue from page 46)

度的影响,随着温度不断升高,沉积速度逐渐加快。这是因为温度升高,增强了还原剂 $H_2PO_2^-$ 中 P-H 键的活性,同时 Ni^{2+} 从络合剂中分离出来的速度也不断增加。化学镀氧化还原反应的可逆性是很差的(有大量氢气生成),所以温度上升时,更多表现为正向反应速度增加,即沉积速度加快。但是,当温度达到 100℃ 以上时,镀液已很不稳定,容易变成均相反应生成大量的 Ni-P 黑色沉淀,并有大量气体生成。另外在高温时,镀片基体表面的催化质量会变得很差,也将影响镀速。可供选择的适宜温度为 90℃。

3 结论

(1) 本次试验得出最佳工艺条件为: 钼酸钠浓度 0.2 g/L; 络合剂浓度 45 g/L; pH 值为 9; 温度 90℃。

(2) MoO_4^{2-} 对沉积有阻碍作用,这和钼元素的沉积消耗了大量 [H] 有关,此外还与 MoO_4^{2-} 对 P-H 键影响有关。

(3) 镀层沉积速度不宜过高,否则会导致镀液稳定性下降,甚至发生自分解。

参考文献

1 李青. 非晶态镀层发展趋势. *化工腐蚀与防护*, 1996, 18(2): 98.

2 Ronad N, Duncan. Electroless nickel alternative to chromium coatings. *Metal Progress*, 1985, 127(7): 31~36.

3 Lwamatsu K. Ternary and Quaternary electroless nickel alloys. *Metal Finish*, 1989, 87(5): 25~27.

4 闫洪. 现代化学镀镍和复合镀技术. 北京: 国防工业出版社, 1998.

5 姜晓霞, 沈伟. 化学镀理论与实践. 北京: 国防工业出版社, 2000.

6 张翼, 范洪富等. 化学镀非晶态 Ni-Mo-P 合金析出机理研究. *电镀与环保*, 1995, 15(3): 18~19.

7 Wang Ling Ling. Electroless deposition of Fe-Mo-W-B amorphous alloys. *Part Metals*, 2000, (11): 12~15.

(责任编辑: 邓大玉)