

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(1):134-140; 4 January 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

禽白血病 A 亚群病毒 gp85 的单因子血清制备及其特异性鉴定

张恒, 李传龙, 杨明, 崔治中*

山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018

摘要:【目的】为了研究出一种能够针对 A 亚群禽白血病的快速特异性诊断试剂。【方法】将 A 亚群禽白血病病毒 (ALV-A) SDAU09E1 株接种于 DF1 细胞上, 以感染细胞 DNA 为模板, 通过 PCR 方法扩增出 1023 bp 的 ALV-A-gp85 基因。将其正确阅读框插入表达载体 PET-32a(+) 中, 实现在 BL21 (Rosetta) 宿主菌中表达。将纯化的融合蛋白常规免疫小鼠, 制备得抗血清。【结果】实验成功获得 52.8 kDa 的重组融合蛋白, 且具有良好的免疫原性。间接免疫荧光试验 (IFA) 表明该血清可与 ALV-A 和 ALV-B 反应, 但不与 ALV-J 反应。【结论】该实验首次在国内外研制出能用于鉴别性检测经典的 A/B 亚群 ALV 的单因子血清, 可与 ALV-J 特异性单抗互补作用于外源性 ALV 感染的鉴别性诊断。我国鸡群同时受经典的 ALV-A/B 和新出现的 ALV-J 困扰, 鉴别诊断非常必要, 研究这种试剂具有较高的实用价值。

关键词: A 亚群禽白血病病毒, gp85 基因, 表达, IFA, 单因子血清

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)01-0134-07

禽白血病病毒 (Avian Leukosis Viruses, ALVs) 是反转录病毒科 α 反转录病毒属的成员之一。20 世纪 60 年代, 在鸡群中发现了 5 个亚群的 ALV, 其中 A、B、C 和 D 亚群是外源性的。E 亚群主要以前病毒的形式存在, 是内源性的。其中 A、B 亚群是鸡群中较常见的 ALV, 而 C、D 亚群较少见。由于采取了严格的切断垂直传播和将未感染的后代隔离饲养的净化措施, 从 1987 年以后发达国家的大型种鸡公司中就已经宣布将外源性鸡白血病病毒净化了^[1-4]。但美国不久前报道了从马立克氏病疫苗中分离到了 ALV-A^[5-7], 而我国长期使用从国外进口祖代鸡和进口疫苗, 并且从来没有对 ALV 采取过净化措施, 因此, 我国的鸡群中可能已经存在 A 亚群禽白血病。近几年对 ALV 感染的血清学调查证明了 ALV-A 感染的普遍性, 并且从中国的鸡群中分离到了

ALV-A^[8-9,14], 证实了中国鸡群中 A 亚群禽白血病的存在。

利用商业化的对于 ALV 群特异性抗原 p27 的试剂盒, 在 DF1 细胞培养上可检测外源性 ALV 感染的存在, 但不能鉴别是经典型 ALV 还是 J 亚型 ALV。J 亚群禽白血病单克隆抗体 JE9 只能特异性地检测出 J 亚群禽白血病病毒 (ALV-J) 感染^[11], 却无法检测出经典的 A、B、C、D 亚群 ALV。因此, 单用单抗 JE9 往往漏检了一些 p27 抗原检测阳性的 A-D 亚群的经典 ALV。目前确定 ALV 各亚群的依据主要有血清病毒中和试验、病毒干扰试验和囊膜糖蛋白基因序列比较的结果^[12-13], 通过囊膜糖蛋白基因序列比较的结果比较繁琐, 血清中和试验和病毒干扰试验还需要 ALV 不同亚群的参考毒株及血清作为对照而限制了应用^[10]。

基金项目: 山东省 2008-2009 年农业重大应用技术创新课题及国家农业公益性行业科研专项经费项目 (200803019)

* 通信作者。Tel: +86-538-8241560; Fax: +86-538-8241419; E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

作者简介: 张恒 (1987-), 男, 山东新泰人, 硕士研究生, 主要从事动物分子病毒学研究。E-mail: zhangheng1987710@163.com

收稿日期: 2010-07-13; **修回日期:** 2010-08-12

我们利用本实验室已分离到的 ALV-A SDAU09E1 株作为实验毒,以分离到的其它 ALV-A SDAU09C1 株^[14]与 SDAU09C3 株^[19]、ALV-B SDAU09C2 株^[10]以及 ALV-J NX0101 株^[15-16]和 HN0001 株^[17]各参考毒株作为对照毒,研制一种能够通过间接免疫荧光技术(IFA)针对 A 亚群禽白血病的快速诊断试剂,由于 ALV-env 基因编码的囊膜糖蛋白包括囊膜表面蛋白(SU)gp85 和穿膜蛋白(TM)gp37,而 ALV 的亚群特异性是由囊膜表面蛋白(SU)gp85 的抗原性所决定的^[1-2],因此,我们利用已分离到的 ALV-A SDAU09E1 株的 env-gp85 基因试图研制出一种能够对针对 A 亚群禽白血病的单因子血清,以期在 ALV-A 的鉴别诊断中得到应用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒来源: A 亚群禽白血病病毒 SDAU09E1 株是由本实验室从山东某地方品系鸡种蛋中分离并鉴定的。将此病毒接种 DF1 细胞系培养 8 天,利用 ELISA 禽白血病抗原检测试剂盒检测细胞上清,禽白血病群特异性抗原 p27 阳性者(S/P > 0.2),提取细胞 DNA。

1.1.2 主要试剂和仪器: 本研究用到的 PET-32a(+)表达性载体购自 Novagen,表达性大肠杆菌 BL21(Rosetta)宿主菌由山东农业大学泰山学者实验室惠赠,昆明白小鼠购自山东泰邦生物制品公司,SPF 鸡胚购自济南斯帕法斯家禽有限公司;分光光度法测蛋白浓度用试剂购自 TIANGEN 公司,弗氏完全佐剂和 FITC 标记的抗鼠 IgG 购自 SIGMA 公司,IPTG(dioxane free)和蛋白质分子量标准(低)宝生物工程(大连)有限公司产品,BamH I 酶和 Not I 酶购自 Fermentas,DL2000 DNA Marker 和 DL15000 DNA Marker 购自北京全式金生物技术有限公司,His 标签的镍柱蛋白纯化试剂盒购自 GenScript Corporation,ELISA 禽白血病抗原检测试剂盒 IDEXX 公司产品;分光光度计购自 SHIMADZU,超声波破碎仪购自宁波新芝生物科技股份有限公司,二氧化碳培养箱 Heal Force 产品。

1.2 目的基因的 PCR 扩增与纯化回收

根据 A 亚群禽白血病 SDAU09E1 株 env-gp85 基因序列与表达性载体 PET-32a(+)的多克隆酶切位点,利用 DNASTar 软件设计 ALV-A-gp85 的特异

性引物 gp85-F: TATGGATCCGATGTCCACTTACTCGAGCA 加入了 BamH I 酶切位点; gp85-R: ATAGCGGCCGCGACGCTTTCGTCTACGTCTTA 加入了 Not I 酶切位点。利用此特异性引物经 PCR 从提取的细胞 DNA 中扩增出 1023 bp 的 gp85 目的基因,并用 DNA 纯化回收试剂盒回收目的基因。

1.3 表达重组质粒 PET-SDAU09E1-gp85 的构建

利用 BamH I 和 Not I 双酶,将回收的 gp85 目的基因与表达性载体 PET-32a(+)分别同时于 37℃ 水浴锅酶切 2 h,经琼脂糖凝胶电泳,回收 gp85 目的基因,并将酶切后的 gp85 目的基因连接到 PET-32a(+)表达性载体,成功构建表达重组质粒命名为 PET-SDAU09E1-gp85。然后将重组质粒一方面转化克隆性大肠杆菌 DH5 α ,挑取单个克隆,摇菌,提取质粒酶切鉴定,并送上海生工测序;另一方面转化表达性大肠杆菌 BL21(Rosetta)宿主菌,挑取单个克隆,摇菌,测序,并进行诱导表达。

1.4 重组融合蛋白 trxA-His-S-gp85-His 的表达

将测序结果正确的单个克隆重组质粒 PET-SDAU09E1-gp85 转化的表达性 BL21(Rosetta)宿主菌,接种于 4 mL 含有氨苄青霉素(100 mg/L)的 LB 细菌培养基(Trypone 10 g/L, Yeast Extract 5 g/L, NaCl 10 g/L, PH7.0),37℃ 振荡培养过夜,次日取出 0.5 mL 培养物接种于 60 mL 的 LB 培养基中,37℃ 振荡培养 2.5 h 后,菌液摇至半透明半浑浊状态,吸光光度法测得 $OD_{600} = 0.6 - 0.8$,在诱导前先取 10 mL 作为诱导前对照,并将振荡温度变为 30℃ 加 IPTG(终浓度为 1.0 mmol/L)诱导,分别在诱导 1、2、3、4、5 h 时间点上收集 10 mL 菌液,以诱导未转化 PET-32a(+)载体的菌液作为空白对照,以诱导转化 PET-32a(+)载体的菌液作为空载体对照。将诱导表达的菌液取出,离心弃上清,再用 0.5 mL 1 × PBS 重悬菌体,超声波裂解破碎细菌后,按 1:1 加 2 × 上样 Buffer 煮沸 10 min,离心取上清,上清用 12% SDS-PAGE 电泳鉴定分析。

1.5 重组菌菌体裂解物的纯化与 SDS-PAGE

经 1.4 中 SDS-PAGE 电泳分析,诱导表达量最大时的菌液 50 mL 收集于 50 mL 离心管中,4000 × g 离心 10 min,弃上清。用 PBS(PH7.2)重悬沉淀(7.5 mL PBS/1 mL 沉淀),超声重悬液,工作时间 1 s,间隙时间 3 s,全程时间 12 min,总共 180 次。12000 × g 离心 10 min,收集包涵体沉淀,弃上清,用

Buffer B (GenScript Corporation) 溶解包涵体 (7.5 mL Buffer B/1 mL 沉淀), 室温下孵育 30 - 60 min, 12000 × g 离心 30 min, 弃沉淀, 留上清。将上清用针对 His 标签的镍柱蛋白纯化试剂盒进行纯化, 最后的洗脱液转移至半透膜中 4℃ 透析复性 48 h。然后将透析好的溶液, 用 12% SDS-PAGE 电泳鉴定分析。

1.6 纯化蛋白定量与单因子血清的制备

将纯化好的 A 亚群禽白血病 gp85 目的蛋白用分光光度法定量 (0.83 g/L) 加等量的弗氏完全佐剂, 颈部皮下注射 7 只 6 周龄昆明白小鼠, 每只 0.2 mL (约 83 μg/只), 14 d 后用含弗氏不完全佐剂的 gp85 抗原背部皮下第 2 次免疫, 0.2 mL/只, 再经 14 d 后第 3 次免疫 (方法同第 2 次), 其中 3 只未免疫抗原的昆明白小鼠作为阴性对照组。第 3 次免疫后 10 d, 心脏采血致死, 析出的血清置 -20℃ 保存。

1.7 间接免疫荧光 (IFA) 鉴定单因子血清

将 A 亚群禽白血病病毒 SDAU09E1 株接种经 ELISA 抗原检测 p27 阴性的已长成 70% - 80% 单层的 SPF 鸡胚制备的鸡胚成纤维细胞 (CEF) 上, 维持 5 d 后用 0.25% 胰酶消化后转移至 24 孔细胞培养板, 继续培养 7 - 10 d。取细胞上清, 经 ELISA 抗原检测试剂盒检测禽白血病群特异性抗原 p27, 阳性者 (S/P > 0.2), 弃去上清液, 用 1 × PBS 洗一遍, 丙酮:乙醇 (6:4) 固定液固定 8 min, 1 × PBS 洗 3 遍, 将小鼠血清分别用 1 × PBS 按 1:50、1:100、1:200、1:500 作 4 个稀释度加到固定好的 CEF 上 37℃ 孵育 45 min, 1 × PBS 洗 3 遍, 再加 1:150 稀释的 FITC 标记的抗鼠 IgG 37℃ 孵育 45 min, 1 × PBS 洗 3 次, 24 孔板中每个孔加一滴 50% 的甘油, 在荧光显微镜下观察实验结果。

1.8 单因子血清对其它已知 ALV-A、ALV-B 与 ALV-J 区分鉴定

利用针对 A 亚群禽白血病病毒 SDAU09E1 株制备的单因子血清, 通过间接免疫荧光技术 (IFA) 对本实验室分离到的其他 A 亚群禽白血病病毒 (ALV-A) SDAU09C1 株、SDAU09C3 株、B 亚群禽白血病病毒 (ALV-B) SDAU09C2 株与外源性的 J 亚群禽白血病病毒 (ALV-J) NX0101 株和 HN0001 株进行区分鉴定。

1.9 单因子血清对临床样品的诊断

对临床上 31 份疑似鸡白血病引发的肿瘤组织 (肝脏或脾脏) 加 PBS 低温下研磨, 组织悬液离心后经 0.22 μm 滤器过滤, 滤液接种长成单层的 CEF 细

胞, 同时用 ALV-A SDAU09E1 毒株接种 CEF 做阳性对照, 没有接种该病毒的正常 CEF 作为阴性对照, 以上所有 CEF 细胞在接毒前经 ELISA 检测 ALV-p27 呈阴性。培养 7 - 10 d 后, 经 ELISA 检测细胞上清中的 p27, 阳性者 (S/P > 0.2), 将细胞消化, 一部分接种 24 孔板进行 IFA; 另一部分细胞提取 DNA 进行 PCR, 以扩增 ALV-A-gp85 基因特异性条带, 对 IFA 结果进行验证。

2 结果

2.1 ALV-A SDAU09E1 株 gp85 基因的 PCR 扩增

PCR 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后, 在凝胶成像系统下观察, 可见 1000 bp 多的清晰条带, 与预计的 DNA 目的片段 (1023 bp) 大小相符, 并显示出很高的特异性。

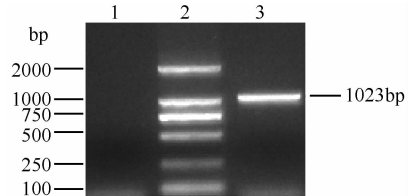


图 1 ALV-A-gp85 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of ALV-A-gp85 gene. 1: Negative control; 2: DL2000 Marker; 3: ALV-A-gp85.

2.2 表达重组质粒 PET-SDAU09E1-gp85 的双酶切鉴定

将构建好的表达重组质粒 PET-SDAU09E1-gp85 用 *Bam*H I 和 *Not* I 进行双酶切, 然后经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分析, 可见在 1000 bp 和 5900 bp 处 2 条清晰的条带。

2.3 表达重组质粒 PET-SDAU09E1-gp85 中 gp85 目的基因的核酸序列测定

对经酶切鉴定的阳性克隆进行测序, 并与已知的基因序列相比较, 结果表明插入的目的基因完全正确, 克隆过程中无碱基突变、缺失或插入现象发生。

2.4 不同诱导时间重组质粒 PET-SDAU09E1-gp85 转化菌裂解物的 SDS-PAGE

经分析发现, 与非重组载体 PET-32a (+) 转化菌超声裂解物相比, 重组质粒 PET-SDAU09E1-gp85 的转化菌诱导表达出一条相对分子质量为 52.8 kDa 的目的条带 (相当于 ALV-A 囊膜 gp85 蛋白与 PET-32a (+) 融合蛋白的相对分子质量), 并在诱导 4 h

时表达量达到最大, 而转化重组质粒 PET-SDAU09E1-gp85 未诱导的和未转化表达性载体、转化非重组载体 PET-32a(+) 经诱导的表达性菌均未表达出目的条带(图 3)。

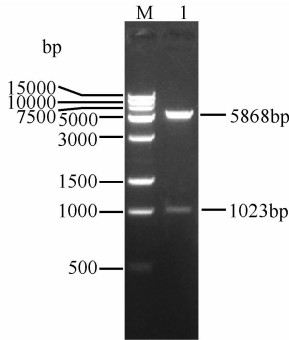


图 2 重组质粒 PET-SDAU09E1-gp85 的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by restriction endonuclease cleavage. M. DL15000 Marker; 1. Recombinant plasmid digested by *Bam*HI/*Not*I; PET-32a(+) (5868bp) and ALV-A-gp85 gene (1023 bp).

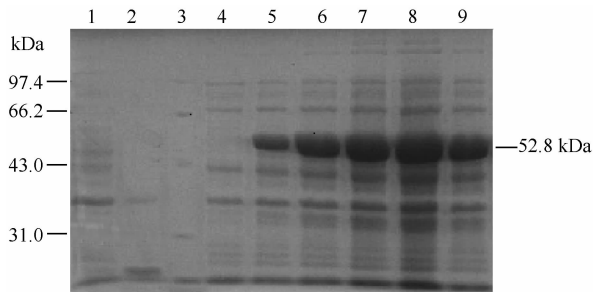


图 3 不同诱导时间表达产物的 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressive products in different induction time. 1: Whole cell protein from IPTG-induced *E. coli*. BL21 (Rosetta) cells; 2: Whole cell protein from IPTG-induced *E. coli*. BL21 (Rosetta) cells containing PET-32a(+); 3: Protein Molecular Weight Marker (Low); 4: Whole cell protein from non-induced *E. coli*. BL21 (Rosetta) cells containing recombinant plasmid PET-SDAU09E1-gp85; 5-9: Whole cell protein from IPTG-induced *E. coli*. BL21 (Rosetta) cells containing recombinant plasmid PET-SDAU09E1-gp85 after 1, 2, 3, 4, 5h (52.8 kDa).

2.5 重组菌菌体裂解物纯化后 SDS-PAGE 鉴定

将诱导 4 h 表达量最大时的重组菌菌体收集后超声破碎, 纯化, 去除了多余的杂带, 得到了重组融合目的蛋白(图 4)。

2.6 间接免疫荧光(IFA)鉴定单因子血清结果

间接免疫荧光(IFA)结果显示, 未免疫纯化目的蛋白的阴性对照小白鼠采集的血清作一抗检测感染 A 亚群禽白血病病毒 SDAU09E1 株的 CEF 阳性细胞未出现荧光(图 5-A)。而 3 次免疫纯化后 gp85 目的蛋白的小白

鼠血清作一抗则检测出了感染 A 亚群禽白血病病毒 SDAU09E1 株的 CEF 阳性细胞, 阳性细胞的细胞质被染成绿色, 而细胞核不被染色为黑色, 并且小鼠血清在用 $1 \times \text{PBS } 1:100$ 倍稀释后效果较好(图 5-B)。

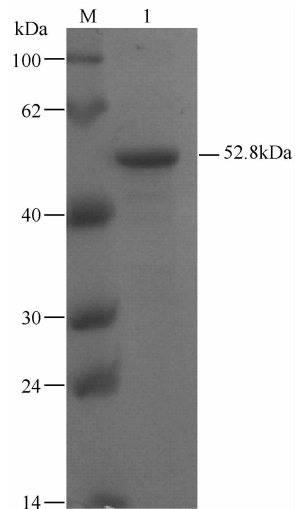


图 4 重组菌菌体裂解物纯化后 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 4 SDS-PAGE identification for purification of recombinant bacterial lysate. M. Protein Molecular Weight Marker (Low); 1. Purification product of recombinant fusion protein (52.8 kDa).

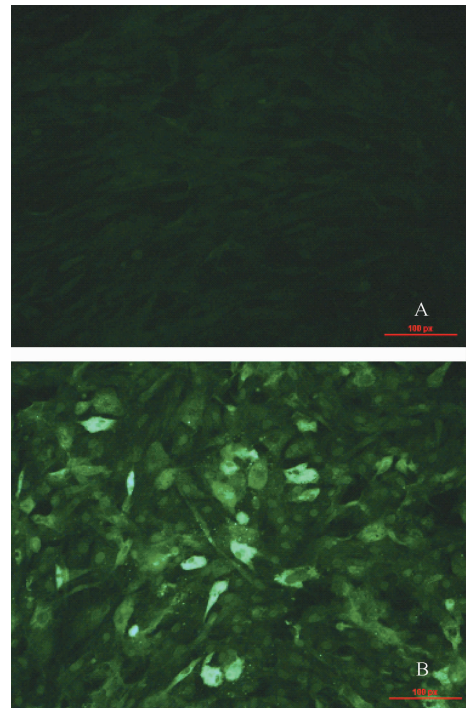


图 5 ALV-A SDAU09E1 株感染的 CEF 对单因子血清的鉴定

Fig. 5 Identification of mono-specific serum by ALV-A SDAU09E1 strain infected CEF. A: Negative control; B: ALV-A SDAU09E1 strain infected CEF.

2.7 单因子血清对其他 ALV-A、ALV-B 与 ALV-J 的鉴定结果

该制备的鼠抗鸡单因子血清能够检测出 A 亚群禽白血病病毒 (ALV-A) SDAU09C1 株 (图 6-B) 与 SDAU09C3 株 (图 6-D) 感染的 CEF 阳性细胞和 B 亚

群禽白血病病毒 (ALV-B) SDAU09C2 株感染的 CEF 阳性细胞 (图 6-C), 而不能与 J 亚群白血病病毒 (ALV-J) NX0101 株 (图 6-E) 和 HN0001 株 (图 6-F) 感染的 CEF 阳性细胞发生反应, 未免疫纯化目的蛋白的阴性对照小鼠血清未出现荧光 (图 6-A)。

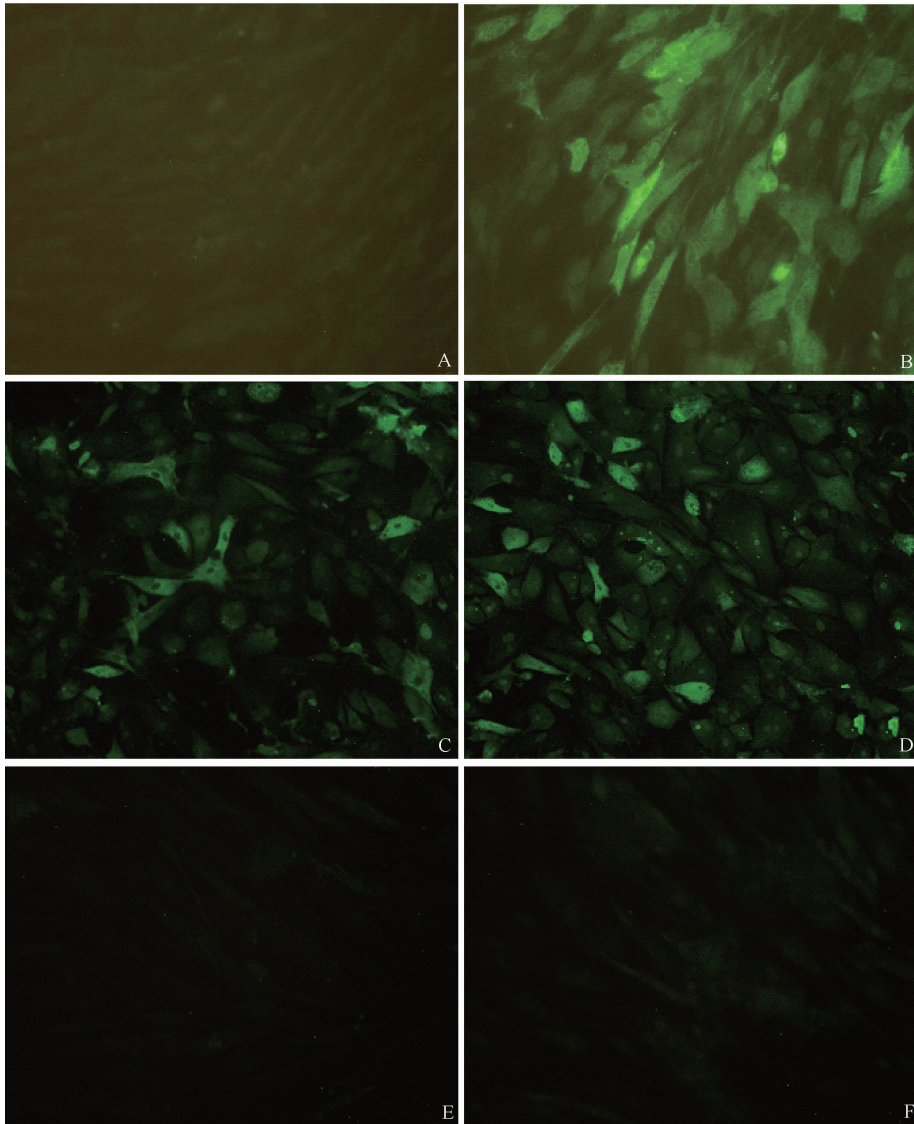


图 6 不同亚群 ALV 对单因子血清的特异性鉴定 (200 ×)

Fig. 6 Specific identification of mono-specific serum by different subgroups ALV (200 ×). A: Negative control; B: ALV-A SDAU09C1 strain infected CEF; C: ALV-B SDAU09C2 strain infected CEF; D: ALV-A SDAU09C3 strain infected CEF; E: ALV-J NX0101 strain infected CEF; F: ALV-J HN0001 strain infected CEF.

2.8 单因子血清对临床样品的诊断结果

通过 IFA 对临床 31 份肿瘤组织样品 (ELISA 检测 ALV-p27 阳性) 进行检测, 结果检测到了 11 份肝脾肿大特别明显的肿瘤组织中含有 ALV-A 或 ALV-B 的感染, 并用 PCR 对此结果进行了验证, 证明了单

因子血清检测的准确性。

3 讨论

虽然刘公平等在 2001 年将 A 亚群禽白血病病毒 RAV-1 株 gp85 片段表达, 但未能显示其免疫原

性,更没有制备相应的单因子血清^[18]。本研究再次将 A 亚群禽白血病病毒 SDAU09E1 株 env-gp85 目的基因克隆到表达性载体 PET-32a(+) 构建了表达重组质粒 PET-SDAU09E1-gp85,并转化表达性 *E. coli*. BL21(Rosetta) 宿主菌获得了能稳定表达 trxA-His-S-gp85-His 融合蛋白的菌液。又进一步通过免疫小白鼠,在国内外首次制备出单因子血清,在 IFA 实验中证明,该单因子血清可特异性的识别在 CEF 细胞培养复制的经典 A、B 亚群外源性 ALV 感染的存在,而与 J 亚群 ALV 不发生反应(图 6),从而与现有的 J 亚群 ALV 特异的单抗 JE9^[11]起到了相互补充的作用。

进一步分析发现, A 亚群禽白血病病毒 SDAU09E1 株 env 基因编码的囊膜表面蛋白(SU)gp85 总共 341 个氨基酸,上面有多个抗原表位,是病毒抗原的主要成分。但实验结果显示,囊膜表面蛋白(SU)gp85 的抗原性与其在体内细胞中的糖基化并没有太多联系,为进一步制备 A 亚群禽白血病的单克隆抗体奠定了基础。由于该 A 亚群禽白血病病毒 SDAU09E1 毒株与已发表的经典 B、C、D、E 禽白血病各亚群的 gp85 氨基酸序列之间同源性高达 78.3% - 84.9%^[8],很有可能制备的该单因子血清很难将 A 亚群禽白血病与其他的 B - E 各亚群进行区分,而与 J 亚群禽白血病各参考株之间的 gp85 氨基酸序列同源性平均只有 38.4%^[8],这就构成了将经典的 A、B 亚群与新的 J 亚群相互鉴别的基础。实验结果初步证明了,制备的针对 A 亚群禽白血病病毒的单因子血清能够与 B 亚群禽白血病病毒发生反应,而不能与 J 亚群禽白血病病毒发生反应。但能否与外源性 C、D 亚群禽白血病病毒进行区分,还有待于我们今后进一步分离到这类病毒后,才能深入研究。但是由于到目前为止,C 和 D 亚群 ALV 在国内外都还很少发现于临床病例,除了实验室细胞样品中发现外,还没有肿瘤病料样品中检出这二个亚群的报道。

利用在大肠杆菌中表达的重组蛋白,已能大量制备该单因子血清,这可以进一步用于对临床上的 A、B 亚群禽白血病进行快速诊断。与以往的 PCR 和克隆测序诊断方法相比,利用该单因子血清通过 IFA 检测更方便、更准确;与国外 IDEXX 公司生产的 ALV-Ab 抗体检测试剂盒只能检测血清抗体相比,该单因子血清能够特异性地检测 ALV-A 和 ALV-B 病

毒的感染;与 J 亚群单克隆抗体相比,该单因子血清能够弥补 J 亚群单克隆抗体不能检出经典禽白血病病毒 A、B 亚群带来的不足。在将该单因子血清制备条件进一步优化后,将有可能研制出用于检测 ALV-A 与 ALV-B 的商业化诊断试剂盒,用于鸡群禽白血病的流行病学研究及防控和净化。

参考文献

- [1] Payne LN, Fadly AM. Leukosis / Sarcoma group. Calnek BW, et al. Diseases of Poultry. Ames, USA: Iowa State University Press, 1997, 414-416.
- [2] Payne LN. HPRS-103: a retrovirus strikes back. The emergence of subgroup J avian leukosis virus. *Avian Pathology*, 1998, 27: S36-S45.
- [3] Spencer JL, Crittenden LB, Burmester BR, Okazaki W, Witter RL. Lymphoid Leukosis; Interrelations among virus infections in hens, eggs, embryos and chickens. *Avian Diseases*, 1977, 21: 331-345.
- [4] Spencer JL. Progress towards eradication of lymphoid leucosis viruses-a review. *Avian Pathology*, 1984, 13: 599-619.
- [5] Silva RF, Fadly AM, Taylor SP. Development of a polymerase chain reaction to differentiate avian leukosis virus(ALV) subgroup; detection of an ALV contaminant in commercial Marek's disease vaccines. *Avian Diseases*, 2007, 51: 663-667.
- [6] Zavala G, Cheng S. Detection and characterization of avian leukosis virus in Marek's disease vaccines. *Avian Diseases*, 2006, 50: 209-215.
- [7] Barbosa T, Zavala G, Cheng S. Molecular characterization of three recombinant isolate of avian leukosis virus obtained from contaminated Marek's disease vaccines. *Avian Diseases*, 2008, 52: 245-252.
- [8] 朱美真, 吴玉宝, 崔治中. 山东地方品系鸡中一株 ALV-A 的分离鉴定. *中国动物传染病学报 (Chinese Journal of Animal Infectious Diseases)*, 2009, 17(4): 31-35.
- [9] 乔彦华, 王永强, 庞平, 金铮, 陈福勇. A 亚群禽白血病病毒 QC6281 株的分离与 gp85 基因的序列分析. *中国兽医杂志 (Chinese Journal of Veterinary Medicine)*, 2009, 44(12): 9-11.
- [10] 赵冬敏, 张青禅, 崔治中. 芦花鸡中 B 亚群禽白血病病毒的分离与鉴定. *病毒学报 (Chinese Journal of Virology)*, 2010(1): 53-57.
- [11] 秦爱建, 崔治中, LEE LUCY, FADLY ALY. 抗 J 亚群禽白血病病毒囊膜糖蛋白特异性单克隆抗体的研制及其特性. *畜牧兽医学报 (Chinese Journal of Animal and*

- Veterinary Science*), 2001, 32 :556-562.
- [12] Fadly AM, Nair V. Leukosis/Sarcoma Group. // Saif YM, Fadly AM, Glison JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE. Disease of poultry. 12 ed. Ames, USA; Iowa State University Press, 2008; 514-568.
- [13] Dorner AJ, Stoye JP, Coffin JM. Molecular basis of host range variation in avian retroviruses. *Journal of Virology*, 1985, 53(1) :32-39.
- [14] Qing-chan ZHANG, Dong-min ZHAO, Hui-jun GUO, Zhizhong Cui. Isolation and Identification of a Subgroup A Avian Leukosis Virus from Imported Meat-type Grandparent Chickens. *Virologica Sinica*, 2010, 25(2) :130-136.
- [15] 崔治中, 杜岩, 张志. 我国肉用型鸡群中 J 亚群白血病流行现状的调查. 中国预防兽医学报 (*Chinese Journal of Veterinary Preventive Medicine*), 2002, 24 :292-294.
- [16] Cui ZZ, Du Y, Zhang Z, Silva RF. Comparison of Chinese field strains of avian leukosis subgroup J viruses with prototype strain HPRS-103 and United States strains. *Avian Diseases*, 2003, 47 :1321-1330.
- [17] 张志, 崔治中, 赵宏坤. 我国 2000 - 2001 年 J 亚群禽白血病病毒分离株 gp85 基因的序列比较. 中国兽医学报 (*Chinese Journal of Veterinary Science*), 2003, 23(1) :25-27.
- [18] 刘公平, 赵振芬, 刘福安. A 亚群禽白血病病毒囊膜基因 gp85 片段在大肠杆菌中的表达. 中国病毒学 (*Virologica Sinica*), 2001, 16(3) :257-260.
- [19] 张青禅. A 亚群禽白血病病毒不同分离株的基因组和生物学特性比较. 山东农业大学博士学位论文 (*Shandong Agricultural University PhD thesis*), 2010.

Mono-specific serum preparation and specificity of gp85 gene of subgroup A Avian Leukosis Virus

Heng Zhang, Chuanlong Li, Ming Yang, Zhizhong Cui *

Animal Science and Technology College, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

Abstract: [**Objective**] In order to get a rapid specific diagnostic reagent for subgroup A Avian Leukosis Virus detection. [**Methods**] The Avian Leukosis Virus Subgroup A (ALV-A) SDAU09E1 strain was inoculated into DF1 cells, an ALV-A-gp85 DNA fragment of 1023bp was amplified from infected cells and inserted into PET-32a(+) plasmid at the location between restriction endonucleases *Bam*H I and *Not* I sites. The recombinant plasmid PET-SDAU09E1-gp85 was transformed into *E. coli* BL21 (Rosetta) for gp85 gene expression. Then we used the purified recombinant fusion protein to immunize 6 weeks old Kunming white mice, and the antiserum were prepared. [**Results**] The recombinant ALV-A gp85 fusion protein with a molecular weight of 52.8kDa demonstrated a good antigenicity. Mono-specific serum produced by vaccinated mice came out reactive with subgroups A and B ALV (ALV-A and ALV-B but not subgroup J ALV) by the indirect immunofluorescence (IFA) method. [**Conclusion**] This was the first time to demonstrate a mono-specific antiserum specific to ALV-A and ALV-B, it could be used for differential diagnosis of exogenous ALV infections in CEF cultures when in complement with ALV-J specific monoclonal antibodies. Chickens in our country are now distressed by both classic ALV-A/B and emerging ALV-J, making differential diagnosis necessary, so studying this reagent has high practical value.

Keywords: ALV-A, Gp85 gene, Expression, IFA, Mono-specific serum

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Major Application Technology Innovation Project on Agriculture of Shandong Province During 2007 - 2008 and the Ministry of Agriculture Nonprofit Industry Research and Special Funding Project (200803019)

* Corresponding author. Tel: +86-538-8241560; E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

Received: 13 July 2010 / Revised: 12 August 2010