

## 抗 I 型马立克氏病毒 *sof2* 蛋白的多克隆抗体制备及其特异性鉴定

崔宁<sup>1</sup>, 苏帅<sup>1</sup>, 李久庆<sup>2</sup>, 赵鹏<sup>1</sup>, 李延鹏<sup>3</sup>, 丁家波<sup>4</sup>, 崔治中<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018

<sup>2</sup> 滕州市畜牧兽医局, 滕州 277500

<sup>3</sup> 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100081

<sup>4</sup> 中国兽医药品监察所, 北京 100081

**摘要:** 【目的】制备高效价鼠和兔抗 I 型马立克氏病毒 (Marek's disease virus, MDV) *sof2* 蛋白的多克隆抗体并对其特异性进行鉴定。【方法】以 I 型 MDV GX0101 为模板, 利用 PCR 扩增 *sof2* 基因, 分别克隆进原核表达载体 pET-28a(+) 和 pET-32a(+) 中, 转化大肠杆菌 BL21 (Rosetta), 经异丙基硫代- $\beta$ -D 半乳糖苷 (IPTG) 诱导后进行融合蛋白的表达和纯化。用纯化的融合目的蛋白常规免疫 6–8 周龄 Balb/c 小鼠和成年新西兰大白兔, 制备抗 *sof2* 蛋白的多克隆抗体。用 Western blot 和间接免疫荧光试验鉴定多克隆抗体的特异性。【结果】I 型 MDV 的 *sof2* 基因在原核表达载体中能够正确表达, 免疫小鼠和兔后能获得与 *sof2* 蛋白发生特异性反应的高效价的多克隆抗体。【结论】制备的抗 *sof2* 蛋白的多克隆抗体能够特异的鉴定 MDV *sof2* 基因缺失株, 有效的区分 MDV 疫苗株 HVT (FC-426) 与 I 型 MDV 毒株, 用于临床 MDV 野毒的分离鉴定。

**关键词:** I 型马立克氏病毒, *sof2* 基因, 多克隆抗体, Western blot, 间接免疫荧光

**中图分类号:** R37    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2013) 03-0284-09

马立克氏病是由马立克氏病毒 (Marek's disease virus, MDV) 引起的鸡的淋巴细胞增生性疾病, 可以通过空气、鸡只的接触互相传播, 引起未经免疫鸡的大量死亡<sup>[1]</sup>。MDV 属于  $\alpha$  疱疹病毒, 分为 3 个血清型, 一般认为血清 I 型病毒有致病性, 可引起 T 细胞淋巴瘤及其它病变<sup>[2]</sup>。血清 II 型与 III 型病毒分别分离自鸡与火鸡体内, 没有致病性<sup>[3–4]</sup>。虽然 3 个血清型基因组结构相似, 都是由线性双股 DNA 组成, 但是基因组成上差别很大<sup>[5–12]</sup>。其中 *sof2* 基因仅存在于 I 型 MDV 基因中, 长 540 bp, 编码

179 个氨基酸的蛋白, 与人巨细胞病毒的 US22 基因以及人疱疹病毒的 6 *EPLF3* 基因同源<sup>[13–14]</sup>, 对于它在 MDV 基因中的功能至今不明确<sup>[15]</sup>。

Isfort<sup>[16–17]</sup> 等人在被不产生细胞病变的 REV 污染的 CEF 上对 MDV 长期连续性传代的过程中, 产生了两种病毒间基因组的重组毒 RM1, 即 REV 的 LTR 序列整合进 MDV 的基因组中 *sof2* 基因的上游, 重组毒 RM1 致病性减弱, 同时认为 REV-LTR 作为一种启动子或者增强子, 可能促使 *sof2* 基因大量转录, 因为当时没有针对 *sof2* 的抗体所以未能证

基金项目: 国家自然科学基金 (31072149)

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

作者简介: 崔宁 (1989–), 女, 山东日照人, 硕士研究生, 主要从事动物分子病毒学研究。E-mail: cnydia@163.com

收稿日期: 2012-09-24; 修回日期: 2012-11-09

实<sup>[18]</sup>。

2011年, Taejoong Kim 等利用 RedET 重组技术将 RM1 中的 REV-LTR 序列按照 RM1 基因组中整合位点插入 rMd5BAC 中, 拯救了含有 REV-LTR 序列的重组病毒 rMd5-RM1-LTR。由于 REV-LTR 的插入, rMd5 致病性减弱, 同时证实促使 *sorf2* 基因大量转录, 但依然没能证实 *sorf2* 基因在 MDV 基因组的功能<sup>[15]</sup>。

2001年, 我们实验室从中国广西省分离到一株自然重组进 REV-LTR 的重组马立克氏病毒 GX0101, 与 rMd5 相比, 虽然毒力较弱, 但具有较强的横向传播能力<sup>[19-20]</sup>。2012年, 通过全基因组测序, 我们发现唯一的 REV-LTR 序列插入在 MDV 基因组的 *sorf1* 基因中, 紧靠 *sorf2* 基因。因此 *sorf2* 是 REV-LTR 启动激活影响最大的基因<sup>[21]</sup>。当我们敲除掉 REV-LTR 后, GX0101 对 SPF 鸡的横向传播能力减弱, 致病性增强<sup>[22-23]</sup>。由此我们不禁想到, 位于 REV-LTR 后的 *sorf2* 基因对于 MDV 致病性以及横向传播能力的影响, 以及自然重组的 REV-LTR 对其后 *sorf2* 基因的影响。

为了检测 MDV 自然重组病毒 GX0101 中 REV-LTR 对 *sorf2* 蛋白表达的影响, 以及进一步研究致病性的 I 型 MDV 的 *sorf2* 基因的功能, 我们制备了抗 I 型 MDV *sorf2* 蛋白的多克隆抗体。在整个试验过程中, 我们比较了不同载体表达的 *sorf2* 融合目的蛋白对不同种属动物的免疫原性。同时所制备高效价多克隆抗体能够有效的区分 MDV 野毒和 MDV 疫苗 HVT (FC-126), 具有良好的特异性, 为临床上 MDV 野毒的分离和鉴定提供了帮助。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 SPF 鸡和 MDV 毒株:** 9-10 日龄 SPF 鸡胚购自济南斯帕法斯家禽有限公司, MDV GX0101 的感染性克隆 GX0101-BAC<sup>[24]</sup>、缺失 *sorf2* 基因的 GX0101  $\Delta$  *sorf2* 病毒、GA、rMd5、RB1B、BJ0201、SD0301 毒株由本实验室保存<sup>[21]</sup>。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 试验所用原核表达载体 pET-32a (+)、pET-28a (+) 均购自 Novagen, 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 及抗兔 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, His 标签的镍柱蛋白纯化试剂盒购自 GenScript Corporation; 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 *sorf2* 基因的 PCR 扩增与回收

参照 GX0101 全基因 (GenBank no. JX844666) 测序中 *sorf2* 基因的序列, 设计引物如下: 上游引物, *sorf2*-forward: 5'-TATGGATCCATGCAGCGCCAAACC GGA-3', 其中 5' 端设计含有 BamH I 酶切位点 (下划线部分); 下游引物, *sorf2*-Reverse: 5'-AGAGTC GACCAGCCCC TAATGTACTAC-3', 其中 5' 端设计含有 Sal I 酶切位点 (下划线部分)。以传染性克隆 GX0101-BAC 的 DNA 为模板, PCR 扩增出 540bp 的 *sorf2* 基因, 并用 DNA 纯化回收试剂盒回收目的基因。

### 1.3 表达 *sorf2* 基因重组质粒的构建

分别用限制性内切酶 BamH I 和 Sal I 双酶切 *sorf2* 基因 PCR 扩增产物与原核表达载体 pET-32a (+)、pET-28a (+), 经琼脂糖凝胶电泳, 回收, T4 连接酶 22℃ 过夜连接, 转化进大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。挑取单个克隆, 摇菌, 提取质粒酶切鉴定, 并送上海生工测序。构建成功的阳性表达重组质粒分别命名为 pET-32a-*sorf2*、pET-28a-*sorf2*。

### 1.4 融合目的蛋白的诱导表达、纯化及鉴定

将上述重组质粒转化表达性的 BL21 (Rosetta) 宿主菌, 挑菌 37℃ 培养至  $OD_{600} = 0.6 - 0.8$  时, 加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L, 30℃ 诱导 4h 后分别取出 2mL 菌液, 离心收集菌体并超声波破碎, 12% SDS-PAGE 电泳检测 *sorf2* 融合目的蛋白的表达并分析可溶性。

收集诱导表达量最大时的菌液 300 mL, 离心收集菌体, 超声波破碎, 离心收集上清, 用针对 His 标签的镍柱蛋白纯化试剂盒进行纯化, 纯化后经 12% SDS-PAGE 电泳鉴定分析。

纯化的融合目的蛋白经 12% SDS-PAGE 分离后, 电转移至 PVDF 膜上, 以鸡的 I 型 MDV GX0101 阳性血清为一抗, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗鸡 IgG 作为二抗, 进行 Western blot 分析, 以空载体转化菌的诱导表达产物作为空白对照。

### 1.5 抗 *sorf2* 蛋白多克隆抗体的制备

将纯化的融合目的蛋白经紫外分光光度计定量

后,分别免疫 Balb/c 小鼠和新西兰大白兔,免疫方法如下:以每只 100 $\mu$ g 融合目的蛋白的剂量加入等体积的弗氏完全佐剂乳化,颈部皮下多点注射 6-8 周龄 Balb/c 小鼠。同时以每只 1mg 融合目的蛋白的剂量颈部皮下多点注射健康的新西兰大白兔。以后每隔两周用等体积弗氏不完全佐剂乳化,进行第二、三次免疫,免疫方式与剂量同首次,其中 3 只未免疫融合目的蛋白的 Balb/c 小鼠和 2 只健康的新西兰大白兔作为阴性对照。第三次免疫后 10 d,心脏采血致死,析出的血清置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

### 1.6 间接免疫荧光 (IFA) 鉴定多克隆抗体的特异性

分别将 MDV GX0101 和 GX0101 $\Delta$ sorf2 接种于长满单层 CEF 细胞的 6 孔板中,继续培养 4-6 d,直到 6 孔板中 CEF 细胞出现明显的 MDV 蚀斑时,去掉上清液,用 PBS 洗涤 1 遍,加入冰冷的丙酮/乙醇 (V/V = 3/2) 固定 10 min,然后再用 PBS 洗涤 1 遍,置空气中自然干燥。在接种 GX0101 和 GX0101 $\Delta$ sorf2 病毒的孔中分别加入不同稀释倍数的抗 sorf2 蛋白的鼠多克隆抗体和兔多克隆抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min, PBS 洗 3 次;分别对应加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (二抗) 和羊抗兔 IgG 抗体 (二抗),37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min, PBS 洗 3 次后,每孔加 50  $\mu$ L 甘油/PBS (1:1) 溶液,置荧光显微镜下观察。

### 1.7 Western blot 鉴定多克隆抗体的特异性

分别将 MDV GX0101 和 GX0101 $\Delta$ sorf2 接种 CEF 细胞,待细胞出现明显的 MDV 特有的蚀斑时,裂解进行 Western blot 分析鉴定。一抗为 1:1 000 倍稀释的抗 pp38 蛋白的 H19 单克隆抗体<sup>[25]</sup> 和 1:500 倍稀释的抗 sorf2 蛋白的鼠多克隆抗体,二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (1:5 000 倍),DAB 溶液显色。兔多克隆抗体特异性的鉴定方法:一抗为 1:1 000 倍稀释的抗 sorf2 蛋白的兔多克隆抗体,二抗为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1:5 000 倍),DAB 溶液显色。

### 1.8 多克隆抗体对 I 型 MDV 毒株和疫苗株 HVT (FC-126) 的区分鉴定

将实验室保存的不同毒力的 I 型 MDV 参考毒株:GA、rMd5、RB1B、BJ0201、SD0301 和 MDV 疫苗株 HVT (FC-126) 分别接种 CEF 细胞,待 CEF 细胞出现明显的 MDV 蚀斑时,进行 IFA 验证 (方法同 1.6)。

### 1.9 多克隆抗体与 MDV 特异性单抗 BA4 对临床样品的诊断比较

对来自不同地方疑似感染 MDV 的 30 只病鸡,无菌采集抗凝血,离心,收集含有白细胞的上层血浆接种到已经长成单层 CEF 的 6 孔板中,盲传 3 代,观察细胞有无 MDV 特有的蚀斑出现。将出现 MDV 特有蚀斑的细胞消化接种 12 孔板,分别用 MDV 特异性单抗 BA4<sup>[26]</sup> 和制备的高效价鼠和兔多克隆抗体进行间接免疫荧光试验诊断比较。

## 2 结果

### 2.1 I 型 MDV sorf2 基因的 PCR 扩增

以 GX0101-BAC 质粒为模板,经过 PCR 扩增获得了与预期大小相符的 540 bp 的目的条带。PCR 和双酶切鉴定结果均显示重组表达质粒 pET-32a-sorf2、pET-28a-sorf2 构建正确,测序结果证实,目的基因大小及阅读框均正确 (图略)。

### 2.2 sorf2 融合目的蛋白的表达纯化及分析鉴定

经 12% SDS-PAGE 电泳分析,重组质粒 pET-32a-sorf2 的转化菌诱导表达出一条相对分子质量约为 37 kDa 的目的条带,并在 IPTG 诱导 3 h 时表达量最大;重组质粒 pET-28a-sorf2 的转化菌诱导表达出一条相对分子质量约为 26 kDa 的目的条带,并在 IPTG 诱导 5 h 时表达量最大 (图 1)。

收集融合目的蛋白表达量最大时的重组菌体超声波破碎,去除非目的蛋白,得到了纯化的融合目的蛋白 (图 2-A)。

Western blot 试验显示,融合目的蛋白可与鸡的 GX0101 阳性血清发生反应,分别在相对分子质量约为 37 kDa 和 26 kDa 处出现特异的反应条带,而空载体转化菌的诱导表达产物未见此条带 (图 2-B),进一步验证了表达蛋白的正确性和反应原性。

### 2.3 间接免疫荧光 (IFA) 鉴定高效价多克隆抗体特异性

间接免疫荧光 (IFA) 结果显示,pET-28a-sorf2、pET-32a-sorf2 重组菌诱导表达的 sorf2 融合目的蛋白免疫小鼠,制备的多克隆抗体分别 1:200、1:100 倍稀释能够与 GX0101 发生特异性反应发出亮绿色荧光,与敲除掉 sorf2 基因的 MDV 重组毒 GX0101  $\Delta$ sorf2 不发生反应。阴性对照小鼠的血清与 GX0101 以及 GX0101  $\Delta$ sorf2 都不发生反应。因此,

所制备的鼠多克隆抗体能够特异的结合 MDV *sorf2* 蛋白, 并且免疫 pET-28a-*sorf2* 重组菌诱导表达的 *sorf2* 融合目的蛋白明显高于免疫 pET-32a-*sorf2* 重

组菌诱导表达的融合目的蛋白诱导产生的多克隆抗体效价 (图 3)。

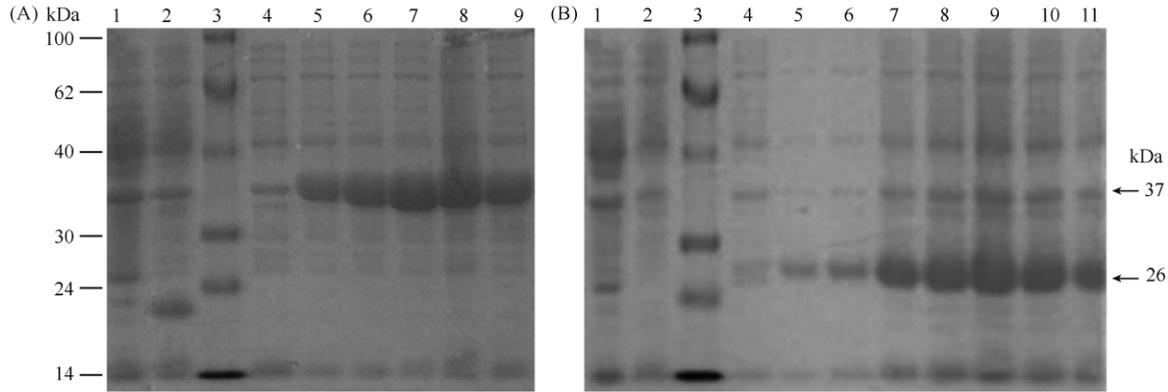


图 1 不同诱导时间表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of expressive products in different induction time. A: 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-32a-*sorf2*; 5-9: Whole cell protein from induced E coli. BL21 (Rosetta) cells containing recombinant plasmid pET-32a-*sorf2* after 1、2、3、4、5h (37kDa); B: 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-28a (+); 3: Protein Molecular Weight Marker (low); 4: Whole cell protein from non-induced E coli. BL21 (Rosetta) cells containing recombinant plasmid pET-28a-*sorf2*; 5-11: Whole cell protein from induced E coli. BL21 (Rosetta) cells containing recombinant plasmid pET-28a-*sorf2* after 1、2、3、4、5、6、7h (26kDa).

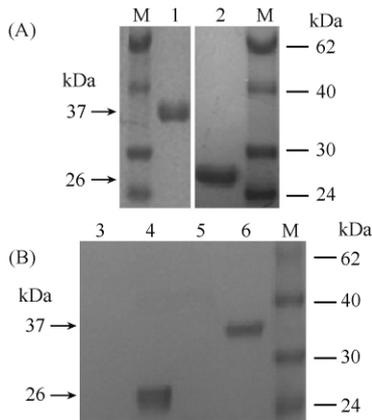


图 2 融合目的蛋白纯化后的 SDS-PAGE 鉴定 (A) 及 Western blot 分析 (B)

Fig. 2 SDS-PAGE identification (A) and Western blotting (B) for purification of fusion protein. M : Protein Molecular Weight Marker (Low); 1、6: pET-32a-*sorf2* transformant induced with IPTG; 2、4: pET-28a-*sorf2* transformant induced with IPTG; 3、pET-28a (+) transformant induced with IPTG; 5、pET-32a (+) transformant induced with IPTG. .

同时, 免疫 pET-28a-*sorf2* 重组菌诱导表达的 *sorf2* 融合目的蛋白, 制备的兔多克隆抗体 1: 600 倍稀释能够与 GX0101 发生特异性反应发出亮绿色荧

光, 与 GX0101  $\Delta$  *sorf2* 不发生反应; 而免疫 pET-32a-*sorf2* 重组菌诱导表达的融合目的蛋白, 3 免后采集兔子血清, 不能与 GX0101 特异性结合, 没有亮绿色荧光。采集的阴性对照新西兰兔血清与 GX0101 以及 GX0101  $\Delta$  *sorf2* 都不发生反应。因此, 免疫 pET-28a-*sorf2* 重组菌诱导表达的 *sorf2* 融合目的蛋白制备的兔多克隆抗体能够特异的结合 MDV *sorf2* 蛋白, 但是免疫 pET-32a-*sorf2* 重组菌诱导表达的 *sorf2* 融合目的蛋白不能有效地刺激兔产生针对 *sorf2* 蛋白的多克隆抗体 (图 4)。

2.4 Western blot 鉴定高效价多克隆抗体的特异性

Western blot 试验结果显示, 以鼠多克隆抗体和针对 MDV pp38 基因的单克隆抗体 H19 作为一抗, 在 GX0101 和 GX0101  $\Delta$  *sorf2* 的蛋白泳道, 出现了约 38 kDa 的特异的蛋白条带 (pp38 蛋白); 同时在 GX0101 蛋白泳道中出现了约 20 kDa 的特异的蛋白条带 (*sorf2* 蛋白), 但 GX0101  $\Delta$  *sorf2* 蛋白泳道中没有该特异的蛋白条带, 表明鼠多克隆抗体仅与 GX0101 的 *sorf2* 蛋白结合, 具有良好的特异性 (图 5-A、B)。同样, 以兔多克隆抗体作为一抗, 只在

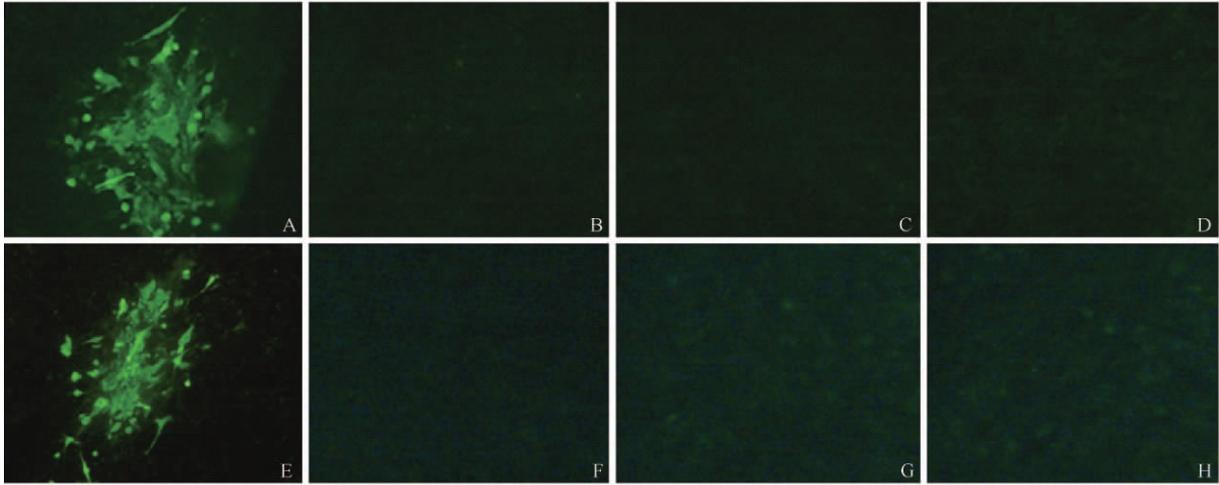


图3 间接免疫荧光鉴定鼠多克隆抗体的特异性

Fig.3 IFA for specific identification of polyclonal antibodies of mice. A, B, E, F: CEF infected with GX0101; C, D, G, H: CEF infected with GX0101  $\Delta$  sorf2; A, C: polyclonal antibodies of mice (pET-28a-sorf2); E, G: polyclonal antibodies of mice (pET-32a-sorf2); B, D, F, H: serum of negative control mice.

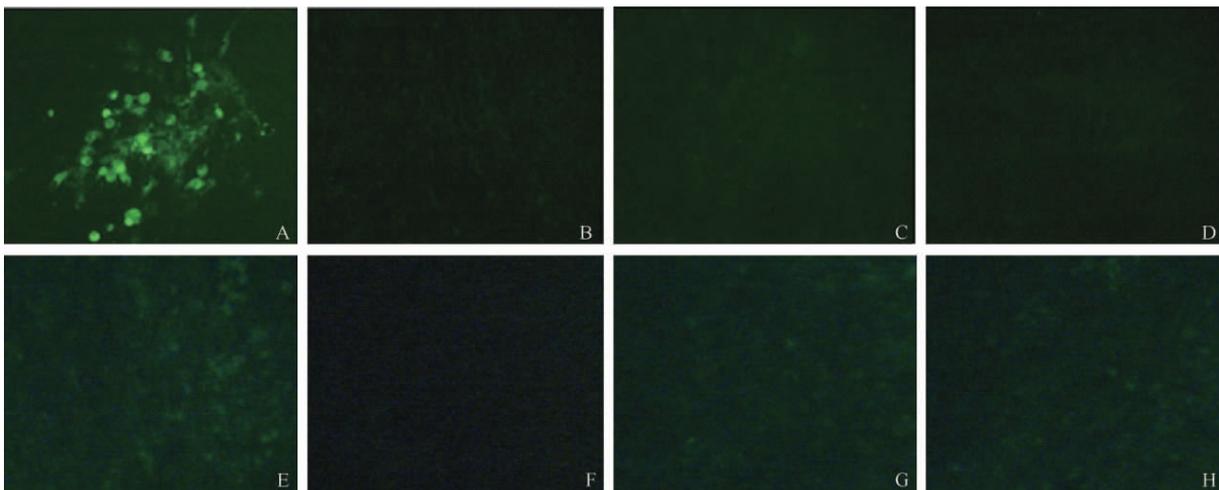


图4 间接免疫荧光鉴定兔多克隆抗体的特异性

Fig.4 IFA for specific identification of polyclonal antibodies of rabbit. A, B, E, F: CEF infected with GX0101; C, D, G, H: CEF infected with GX0101  $\Delta$  sorf2; A, C: polyclonal antibodies of rabbit (pET-28a-sorf2); E, G: polyclonal antibodies of rabbit (pET-32a-sorf2); B, D, F, H: serum of negative control rabbit.

GX0101 蛋白泳道中出现了约 20 kDa 的特异的蛋白条带 (sorf2 蛋白), GX0101  $\Delta$  sorf2 蛋白泳道中没有该特异的蛋白条带, 表明兔多克隆抗体仅与 GX0101 的 sorf2 蛋白结合, 具有良好的特异性 (图 5-C)。

## 2.5 多克隆抗体对 MDV 疫苗株 HVT(FC-126) 的区分鉴定

间接免疫荧光 (IFA) 结果显示, 针对 MDV gB 基因的特异性单抗 BD8<sup>[26]</sup> 作为阳性对照能够与 I 型 MDV 毒株和 MDV 疫苗株 HVT(FC-126) 反应, 发

出特异性荧光 (图 6-C), 空白 CEF 作为阴性对照没有特异性荧光。制备的鼠和兔的多克隆抗体能与各种不同毒力的 I 型 MDV 毒株: GA、rMd5、RB1B、BJ0201、SD0301 反应, 发出特异性荧光; 与 MDV 疫苗株 HVT(FC-126) 不反应, 无特异性荧光 (图 6-A、B), 因此所制备的多克隆抗体能够用来特异的区分 I 型 MDV 和 MDV 疫苗株 HVT(FC-126)。

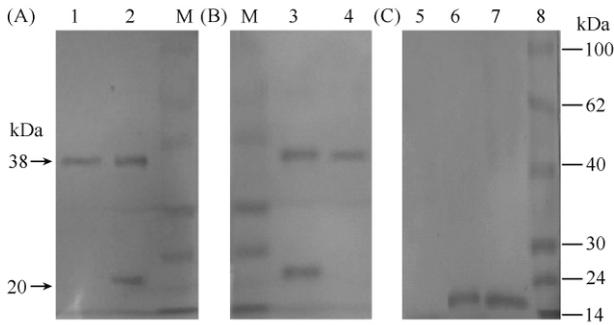


图 5 多克隆抗体特异性的 Western blot 鉴定

Fig. 5 Specific identification of polyclonal antibodies by Western blotting. A: polyclonal antibodies of mice (pET-28a-sorf2); B: polyclonal antibodies of mice (pET-32a-sorf2); C: polyclonal antibodies of rabbit (pET-28a-sorf2); 1, 4, 5: GX0101  $\Delta$ sorf2 protein; 2, 3, 6, 7: GX0101 protein.

### 2.6 多克隆抗体与 MDV 单克隆抗体 BA4 对临床样品的检测比较

来自不同地方的 30 只疑似感染 MDV 的病鸡中, 盲传 3 代有 10 只鸡的血浆能够分离到 MDV, 在细胞上产生可眼观的 MDV 特有的蚀斑, 通过间接免疫荧光 (IFA) 检测, 鼠和兔的多克隆抗体与 MDV 单克隆抗体 BA4 检测结果一致, 特异性荧光明显, 很容易辨别。

## 3 讨论

迄今为止, 已经有十几株不同血清型的 MDV 全基因组进行了测序, 不同血清型间 MDV 基因组构成有很大差别, 即便人们普遍关注的有致病性的

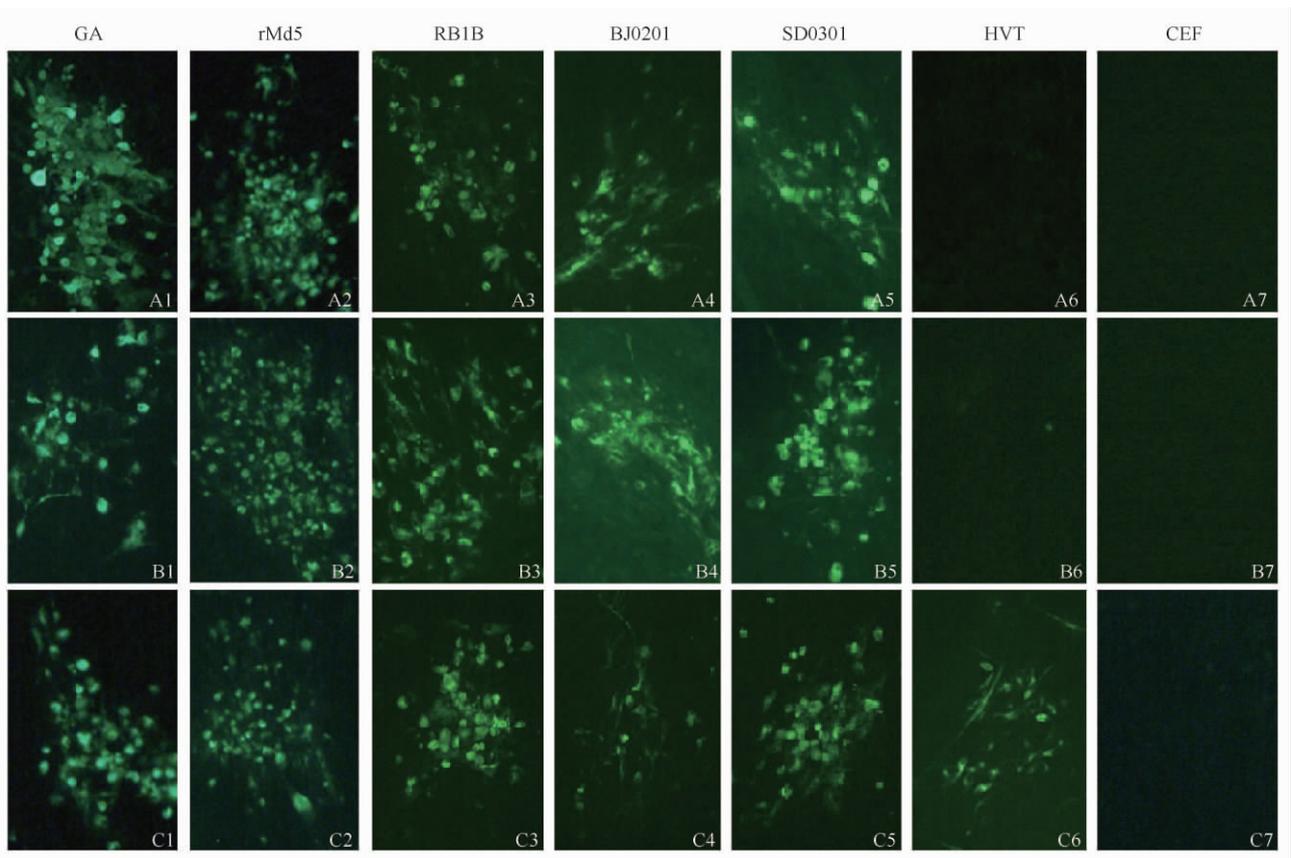


图 6 多克隆抗体对 MDV 疫苗 HVT (FC-126) 的区分鉴定

Fig. 6 Differentiation and identification of polyclonal antibodies to HVT (FC-126). A: Polyclonal antibodies of mouse; B: Polyclonal antibodies of rabbit; C: Positive control: McAb BD8 +. 1: CEF infected with GA; 2: CEF infected with rMd5; 3: CEF infected with RB1B; 4: CEF infected with BJ0201; 5: CEF infected with SD0301; 6: CEF infected with HVT (FC-126); 7: Negative control.

I 型 MDV 在基因组组成上也存在很大差别<sup>[5-12]</sup>, 但是位于 I 型 MDV 基因组短独特区 (unique short region, US) 的 *sorf2* 基因却具有高度的保守性。虽然

在超强毒 rMd5 基因组中同时存在另一长度较小的 *sorf2* 基因 (约 360 bp), 但是其与完整的 *sorf2* 基因具有很高的同源性。近年来, 随着重组 MDV 在基

因工程疫苗中的应用<sup>[27-28]</sup>,人们普遍关注 REV-LTR 对 MDV 在致病性和横向传播能力方面的影响,不断有人将 RM1 中重组的 REV-LTR 完整插入 CVI988/Rispens、Md5 中,虽然降低了 Md5 致病性<sup>[14,29]</sup>,但是在鸡体内都不能稳定存在。与它们不同的是,自然重组 MDV GX0101 的 REV-LTR 插入位点相比更靠近 *sorf2* 基因(约 983bp),并且在鸡体内能够稳定存在,使得其具有很高的横向传播能力<sup>[22]</sup>。显然,在 REV-LTR 插入位点与 *sorf2* 基因间没有其它与致病性以及横向传播能力有关的基因,因此研究 *sorf2* 基因功能具有一定意义<sup>[21]</sup>。抗 *sorf2* 蛋白多克隆抗体的制备为进一步研究 *sorf2* 基因功能以及重组病毒中 *sorf2* 基因的表达奠定了基础。

本试验制备的抗 *sorf2* 蛋白的多克隆抗体能够识别所有的 I 型 MDV 毒株,不能与 MDV 疫苗株 HVT(FC-126)发生反应,具有良好的特异性。因此在临床上能够有效的检测 I 型 MDV 毒株,用于 MDV 野毒的分离和鉴定。

间接免疫荧光结果显示,当缺失 GX0101 的 *sorf2* 基因后,针对 *sorf2* 蛋白的多克隆抗体不与其发生反应,反之与 GX0101 能产生特异性的荧光,证明所制备的多克隆抗体具有良好的特异性,能够用来区分 GX0101 和缺失 *sorf2* 基因的 GX0101  $\Delta$  *sorf2*。通过 Western blot 检测,在 GX0101 蛋白泳道中出现了约 20kDa 的特异的蛋白条带(*sorf2* 蛋白),而 GX0101  $\Delta$  *sorf2* 蛋白泳道中没有该特异的蛋白条带,表明制备的鼠和兔多克隆抗体仅与 GX0101 的 *sorf2* 蛋白这一种蛋白结合,并且具有良好的特异性。

在试验研究中,我们比较了不同载体,不同种属对多克隆抗体制备的影响。发现分别用 pET-28a(+),pET-32a(+ )构建的重组菌最大诱导表达量除诱导时间外并没有明显的不同。免疫新西兰大白兔和 Balb/c 小鼠后发现,3 次免疫 pET-28a-*sorf2* 重组菌诱导产生的融合目的蛋白,兔和鼠都能产生较高效价的多克隆抗体(间接免疫荧光分别 1:600 倍和 1:200 倍稀释),并且能维持较长时间。3 次免疫 pET-32a-*sorf2* 重组菌诱导产生的融合目的蛋白,鼠同样能产生较高效价的多克隆抗体(间接免疫荧光 1:100 倍稀释),而兔子 3 免后并没有检测到特异性的多克隆抗体(免疫用蛋白与 Balb/c 小鼠一样)。说明免疫原性是相对某些种类的动物机体而言的,有些物质能诱导某些动物产生免疫应答,但对另外

的动物则不能引起免疫应答,而且种属差异性特别大。

针对 *sorf2* 蛋白的多克隆抗体在临床上能够有效地检测 MDV,虽然在抗体效价上不及 I 型 MDV 单克隆抗体 BA4,但是具有相同的检测效果,而且制备简便、成本低廉、具有多个与抗原决定簇结合的部位。

## 参考文献

- [1] Witter RL. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Disease*, 1997, 41 (1): 149-163.
- [2] Witter RL, Schat KA. Marek's Disease in Diseases of Poultry. Iowa: Iowa State University Press/Ames, 2003.
- [3] Rispens BH, van Vloten H, Mastebroek N, Maas HJ, Schat KA. Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI 988) and its use in laboratory vaccination trials. *Avian Disease*, 1972, 16 (1): 108-125.
- [4] Schat KA, Calnek BW. Characterization of an apparently nononcogenic Marek's disease virus. *Journal of the national cancer institute*, 1978, 60 (5): 1075-1082.
- [5] Lee LF, Wu P, Sui D, Ren D, Kamil J, Kung HJ, Witter RL. The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 2000, 97 (11): 6091-6096.
- [6] Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Rock DL, Kutish GF. The genome of a very virulent Marek's disease virus. *Journal of Virology*, 2000, 74 (17): 7980-7988.
- [7] Spatz SJ, Zhao Y, Petherbridge L, Smith LP, Baigent SJ, Nair V. Comparative sequence analysis of a highly oncogenic but horizontal spread-defective clone of Marek's disease virus. *Virus Genes*, 2007, 35 (3): 753-766.
- [8] Spatz SJ, Petherbridge L, Zhao Y, Nair V. Comparative full-length sequence analysis of oncogenic and vaccine (Rispens) strains of Marek's disease virus. *Journal of General Virology*, 2007, 88 (4): 1080-1096.
- [9] Spatz SJ, Rue C, Schumacher D, Osterrieder N. Clustering of mutations within the inverted repeat regions of a serially passaged attenuated gallid herpesvirus type 2 strain. *Virus Genes*, 2008, 37 (1): 69-80.
- [10] Spatz SJ, Smith LP, Baigent SJ, Petherbridge L, Nair V. Genotypic characterization of two bacterial artificial chromosome clones derived from a single DNA source of

- the very virulent gallid herpesvirus-2 strain C12/130. *Journal of General Virology*, 2011, 92 (7): 1500-1507.
- [11] Spatz SJ, Rue CA. Sequence determination of a mildly virulent strain (CU-2) of Gallid herpesvirus type 2 using 454 pyrosequencing. *Virus Genes*, 2008, 36 (3): 479-489.
- [12] Zhang F, Liu C, Zhang Y, Li Z, Liu A, Yan F, Cong F, Cheng Y. Comparative full-length sequence analysis of Marek's disease virus vaccine strain 814. *Archives of Virology*, 2012, 157 (1): 177-183.
- [13] Kashanchi F, Thompson J, Sadaie MR, Doniger J, Duvall J, Brady JN, Rosenthal LJ. Transcriptional activation of minimal HIV-1 promoter by ORF-1 protein expressed from the Sal1-L fragment of human herpesvirus 6. *Virology*, 1994, 201 (1): 95-106.
- [14] Nicholas J, Martin ME. Nucleotide sequence analysis of a 39.5-kilobase-pair region of the genome of human herpesvirus 6 encoding human cytomegalovirus immediate-early gene homologs and transactivating functions. *Journal of Virology*, 1994, 68 (2): 597-610.
- [15] Kim T, Mays J, Fadly A, Silva RF. Artificially inserting a reticuloendotheliosis virus long terminal repeat into a bacterial artificial chromosome clone of Marek's disease virus (MDV) alters expression of nearby MDV genes. *Virus Genes*, 2011, 42 (3): 369-76.
- [16] Isfort R, Jones D, Kost R, Witter R, Kung HJ. Retrovirus insertion into herpesvirus in vitro and in vivo. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 1992, 89 (3): 991-995.
- [17] Isfort R, Witter R, Kung HJ. Retrovirus insertion into herpesvirus. *Trends in Microbiology*, 1994, 2 (5): 174-177.
- [18] Jones D, Brunovskis P, Witter R, Kung HJ. Retroviral Insertional Activation in a Herpesvirus: Transcriptional Activation of US Genes by an Integrated LongTerminal Repeat in a Marek's Disease Virus Clone. *Journal of Virology*, 1996, 70 (4): 2460-2467.
- [19] Zhang Z, Cui Z. Isolation of recombinant field strains of Marek's disease virus integration with reticuloendotheliosis virus genome fragments. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2005, 48 (1): 81-88.
- [20] Cui Z, Zhuang G, Xu X, Sun A, Su S. Molecular and biological characterization of a Marek's disease virus field strain with reticuloendotheliosis virus LTR insert. *Virus Genes*, 2010, 40 (2): 236-243.
- [21] 张志. 我国近年来马立克氏病毒野毒株分子流行病学和生物学特性的研究. 山东农业大学博士学位论文, 2004.
- [22] Sun A, Xu X, Petherbridge L, Zhao Y, Nair V, Cui Z. Functional evaluation of the role of reticuloendotheliosis virus long terminal repeat (LTR) integrated into the genome of a field strain of Marek's disease virus. *Virology*, 2010, 397 (2): 270-276.
- [23] Xu X, Sun A, Cui Y, Cui Z. Comparison of pathogenicity and horizontal transmission ability between recombinant Marek's disease virus field strain with REV-LTR and a very virulent reference strain. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49 (4): 540-543. (in Chinese)
- 许晓云, 孙爱军, 崔言顺, 崔治中. 带有 REV-LTR 片段的马立克氏病毒重组野毒株与超强毒株致病性和横向传播性比较. *微生物学报*, 2009, 49 (4): 0540-0543.
- [24] Sun A, Petherbridge L, Zhao Y, Li Y, Nair V, Cui Z. A BAC clone of MDV strain GX0101 with REV-LTR integration retained its pathogenicity. *Chinese Science Bulletin*, 2009, 54 (11): 1541-1546. (in Chinese)
- 孙爱军, Petherbridge L, Zhao Y, 李延鹏, Nair V, 崔治中. 带有 REV-LTR 片段的 MDV 野毒株 GX0101 BAC 克隆的构建及拯救病毒的致病性分析. *科学通报*, 2009, 54 (11): 1541-1546.
- [25] Lee LF, Liu X, Sharma JM, Nazerian K, Bacon LD. A monoclonal antibody reactive with Marek's disease tumor-associated surface antigen. *Journal of Immunology*, 1983, 130 (2): 1007-11.
- [26] Lu C, Cui Z, Qin A. Monoclonal Antibodies Recognizing Serotype I Specific and Group Common Epitopes on Glucoprotein B Molecule of Marek's disease virus. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 1997, 17 (4): 316-319. (in Chinese)
- 陆长明, 崔治中, 秦爱建, Lee LF. 马立克氏病毒囊膜糖蛋白 B 抗原 I 型特异性和群共同性决定簇的单克隆抗体. *中国兽医学报*, 1997, 17 (4): 316-319.
- [27] Su S, Li Y, Sun A, Zhao P, Ding J, Zhu H, Cui Z. Protective immunity of a meq-deleted Marek's disease virus against very virulent virus challenge in chickens. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50 (3): 380-386. (in Chinese)
- 苏帅, 李延鹏, 孙爱军, 赵鹏, 丁家波, 朱鸿飞, 崔治中. 敲除 meq 的鸡马立克氏病毒强毒株对超强毒的免疫保护作用. *微生物学报*, 2010, 50 (3): 380-386.
- [28] Li Y, Sun A, Su S, Zhao P, Cui Z, Zhu H. Deletion of

the Meq gene significantly decreases immunosuppression in chickens caused by pathogenic Marek's disease virus.

*Virology Journal*, 2011, 5;8:2.

[29] Mays JK, Silva RF, Kim T, Fadly A. Insertion of

reticuloendotheliosis virus long terminal repeat into a bacterial artificial chromosome clone of a very virulent Marek's disease virus alters its pathogenicity. *Avian Pathology*, 2012, 41 (3) : 259-65.

## Preparation and identification of polyclonal antibody to serotype I Marek's disease virus *sorf2* protein

Ning Cui<sup>1</sup>, Shuai Su<sup>1</sup>, Jiuqing Li<sup>2</sup>, Peng Zhao<sup>1</sup>, Yanpeng Li<sup>3</sup>, Jiabo Ding<sup>4</sup>, Zhizhong Cui<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Animal Science and Technology College, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

<sup>2</sup>Tengzhou Bureau of Animal Husbandry and Veterinary, Tengzhou 277500, China

<sup>3</sup>The Institute of Animal Science (IAS), Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Beijing 100081, China

<sup>4</sup>China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

**Abstract:** [Objective] To obtain mice and rabbit polyclonal antibody of serotype I Marek's disease virus (MDV) *sorf2* protein with higher titer and to identify the specificity. [Methods] Using serotype I MDV GX0101 as template, we amplified *sorf2* gene and then cloned it into pET-28a (+) and pET-32a (+) respectively. The recombinant plasmid pET-28a-*sorf2* and pET-32a-*sorf2* was separately transformed into *Escherichia coli* BL21 (Rosetta) competent cell which was induced with isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG). After purification, immuned 6-8 Balb/c mice and adult New Zealand white rabbit with the purified fusion protein and the anti-*sorf2* polyclonal antibody were prepared. The specificity of the serum was detected by Western blot and the indirect immunofluorescence assay (IFA) method. [Results] Serotype I MDV *sorf2* protein was expressed successfully in the recombinant *E. coli*. Mice and rabbit anti-*sorf2* polyclonal antibody with higher titer could react with *sorf2* protein specifically. [Conclusion] The prepared anti-*sorf2* polyclonal antibody could identify MDV *sorf2* gene deletion strain specifically. In addition, it could be used for differential of MDV vaccine poison HVT and serotype I MDV, which was useful for the separation and identification of clinical MDV.

**Keywords:** serotype I Marek's disease virus, *sorf2* gene, polyclonal antibody, Western blot, immunofluorescence assay

(本文责编:王晋芳)