

免疫印迹法检测牛海绵状脑病和羊瘙痒病

李运敏¹ 田 波^{1*} 张宝云² 董小平²

¹(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

²(中国预防医学科学院病毒学研究所,北京 100052)

摘 要 用大肠杆菌表达的牛朊病毒正常成熟蛋白(BoPrP^C)免疫新西兰白兔,获得了与朊病毒蛋白(PrP)反应的抗体 T1。根据致病型朊病毒(PrP^{Sc})能抵抗蛋白酶消化的特性,用蛋白酶 K 消化脑组织提取物,以抗体 T1 进行免疫印迹反应,结果表明从接种羊瘙痒病病毒 263K 的金黄地鼠脑组织提取物内检测到抗蛋白酶 K 消化的致病型 PrP^{Sc},而正常金黄地鼠脑组织中没有抗蛋白酶消化的蛋白。以我国正常牛羊为材料,制备其脑组织提取物,用上述方法和抗体 T1 进行检测,结果没有发现抗蛋白酶 K 的任何蛋白存在,说明没有牛海绵状脑病和羊瘙痒病存在。用 1A8 抗体也获得了同样的结果。这些结果表明可以用自制的抗血清检测牛海绵状脑病和羊瘙痒病,防止其传入我国。

关键词 牛海绵状脑病,羊瘙痒病,抗体,免疫印迹

中图分类号 Q58.104 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)05-0494-04

自 1986 年英国发生牛海绵状脑病(BSE,俗称疯牛病)以来,经过十几年此病已遍及整个欧洲,并有向全世界蔓延的趋势。牛海绵状脑病是由于饲料中添加了牛羊的肉骨粉,将羊瘙痒病(Scrapie)病原传染给牛,使之发生疯牛病^[1]。最近有证据表明 BSE 能传染给人,引起新型克雅氏病(nvCJD)^[1-3]。因此,要加强对 BSE 和 Scrapie 的监测,以防止含有羊瘙痒病和牛海绵状脑病的制品进入市场。BSE 和 Scrapie 等朊病毒病是由染色体朊病毒(PrP^C)基因编码的 PrP^C蛋白,结构发生变化后形成致病型朊病毒(PrP^{Sc})而引起的。PrP^C和 PrP^{Sc}在氨基酸序列上完全一致,仅在三维结构上不同^[4]。PrP^{Sc}在标准条件下能部分地抵抗蛋白酶 K 消化^[5],而 PrP 则被蛋白酶完全消化。所以用抗体检测用蛋白酶消化过的样品,如果有 PrP^{Sc}蛋白的存在就可以确诊朊病毒病^[6]。组织切片上的免疫细胞组织化学和脑匀浆的免疫印迹已经用来诊断疯牛病^[6,7]。

我国曾于 1983 年在从英国引进的绵羊中发现羊瘙痒病,因及时采取措施消灭了该病,没有造成传播^[8]。病牛病目前为止我国还没有报道。面对疯牛病肆虐世界的危机,我们应当加强海关检疫防止疯牛病和羊瘙痒病传入我国。鉴于我国还没有方便、

快速、准确的检测方法,为此我们用表达的重组蛋白免疫新西兰白兔得到了抗体 T1,经与 James Hope 博士惠赠的抗体 1A8 比较,可以用于检测疯牛病和羊瘙痒病。

1 材料与方 法

1.1 试剂

HRP 标记的羊抗兔 IgG(美国 Santa Cruz 公司),蛋白酶 K(Merk),硝酸纤维素膜(Amersham),Super-signal West Pico Trail Kit(Pierce),Nonidet P-40(Fluka)脱氧胆酸钠(OXOID),英国 James Hope 博士惠赠的兔抗 PrP 抗体 1A8,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 抗体的制备

重组牛朊病毒成熟蛋白(BoPrP^C)按文献[9]中的方法进行表达、纯化。纯化的 BoPrP^C溶解于磷酸盐缓冲液(PBS)中,浓度为 1 mg/mL。4 只新西兰白兔(体重 2~4 kg)购自中国兽药研究所实验动物中心。取 1 mL 弗氏完全佐剂加到 1 mL 溶于 PBS 的纯化 BoPrP^C中,使之乳化,0.5 mL/只皮下注射进行初次免疫。2 周后,将 BoPrP^C蛋白与弗氏不完全佐剂等体积混合乳化,肌肉注射进行加强免疫。2 周后再进行 1 次加强免疫。用 ELISA 监测抗血清的效价。

收稿日期:2001-03-21,修回日期:2001-06-19。

基金项目:农业部“948”项目资助(982078)。

* 通讯作者。 Tel:86-10-62554247; Fax:86-10-62554247; E-mail: tienpo@sun.im.ac.cn

1.3 样品采集

羊瘙痒病 263K 朊病毒接种的金黄地鼠及正常的金黄地鼠在中国预防医学科学院病毒学研究所形态室饲养,采集发病地鼠的脑以及正常对照鼠的脑, -70℃保存待检。从屠宰厂新鲜采集正常牛、羊脑, -70℃保存待检。

1.4 样品处理

脑组织的处理按文献[10]进行。以预冷的裂解液(10 mmol/L Tris-HCl pH7.4, 100 mmol/L NaCl, 0.5% NP-40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 10 mmol/L EDTA)将 1g 脑组织制成 10% 的匀浆, 3000 r/min 离心 5 min 以除去细胞碎片。上清液里加入 50 μg/mL 的蛋白酶 K, 37℃ 消化 1 h, 立即加入 5 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)终止反应。

1.5 免疫印迹分析

免疫印迹分析按文献[6,10]略有修改进行。所有的脑组织匀浆液都与 SDS-载样缓冲液 1:1 混合, 置于沸水浴中 5 min, 上样于 15% SDS-PAGE 来进行分离。电泳结束后, 用 Mini Trans-Blot (Bio-RAD) 在 4℃、100 V 条件下转移 1 h, 将蛋白转移到硝酸纤维素膜上。用含 5% 脱脂奶粉 PBS 溶液室温封闭 1 h。将自制的抗体 T1 用封闭液按 1:200 稀释, 1A8 抗体按 1:1000 稀释, 将膜置于其中室温作用 2 h, 随后与按 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 反应 1 h, 最后用 Supersignal West Pico Trail Kit 显示印迹结果。

2 结果

2.1 BoPrP^C 和 OvPrP^C 的抗体

用大肠杆菌表达的 BoPrP^C 免疫新西兰白兔, 用纯化的蛋白作为抗原包被 ELISA 板, 通过 ELISA 监测血清的抗体效价, 结果表明经过 3 次免疫, 抗血清的 ELISA 效价达 1:10000 以上。采血分离血清, 得到抗朊病毒蛋白的抗体 T1, 但该抗体不能区分细胞型的朊蛋白(PrP^C)和致病型的朊病毒蛋白(PrP^{SC})。

2.2 OvPrP^{SC} 的免疫印迹

自制的兔抗 BoPrP^C 抗体 T1 的免疫印迹结果显示接种羊瘙痒病朊病毒 263K 的金黄地鼠脑组织匀浆中存在 3 条蛋白带, 分子量在 30~35 kD 之间; 经过蛋白酶消化后, 蛋白分子量变小, 约为 27~30 kD。而正常的金黄地鼠的脑组织经蛋白酶 K 消化后未见任何与抗体反应的蛋白存在(图 1A)。用 1A8 对同样的样品进行免疫印迹反应, 结果与自制的抗体 T1 的实验结果相同(图 1B)。

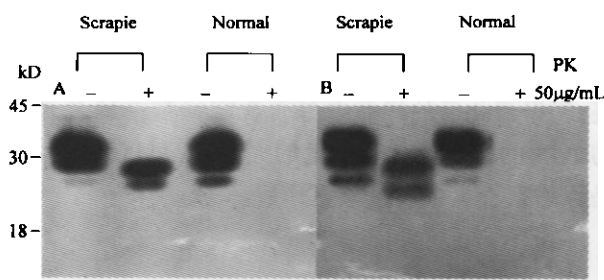


图 1 羊瘙痒病因子感染的金黄地鼠及正常地鼠脑组织的免疫印迹检测

Fig.1 Western blot of samples from the scrapie-infected golden hamster and control animal

A. Rabbits anti-BoPrP^C antibody T1; B. 1A8 antibody

2.3 BoPrP^C 及 OvPrP^C 的免疫印迹

正常牛、羊的脑组织各 3 份, 匀浆后用蛋白酶 K 消化, 免疫印迹的结果显示消化前牛羊脑组织中有 BoPrP^C 及 OvPrP^C 存在, 消化后的样品中没有任何抗蛋白酶 K 的蛋白存在, 说明 BoPrP^C 及 OvPrP^C 在这种条件下被蛋白酶 K 完全消化了。自制的抗体 T1 和 1A8 的结果相同(图 2A, B)。

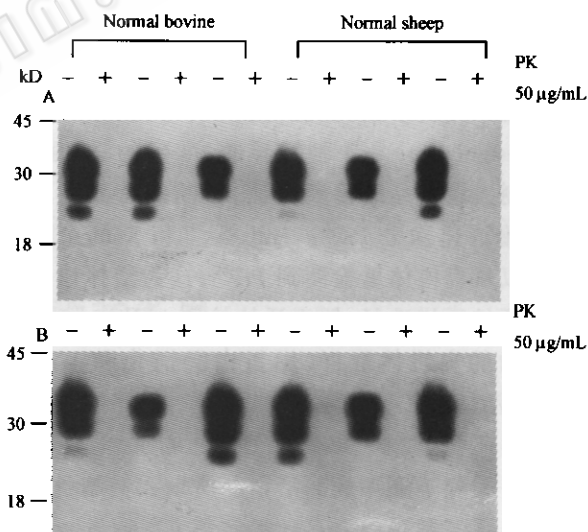


图 2 用抗体 T1 和 1A8 免疫印迹检测正常牛羊脑组织

Fig.2 Western blot of sample from normal bovine and sheep with the antibody T1 and 1A8

A. Rabbits anti-BoPrP^C antibody T1; B. 1A8 antibody

2.4 致病型朊病毒蛋白 PrP^C 的特点

用蛋白酶消化时 N-端的 60~70 个氨基酸被切除, 其余部分能抵抗蛋白酶的消化, 结果导致蛋白分子量变小——从 30~35 kD 减少到 27~30 kD^[2]。因此, 如果一个动物的脑匀浆经蛋白酶处理后, 仍存在 27~30 kD 的朊病毒蛋白核心片段(PrP₂₇₋₃₀), 就

认为这个动物感染了朊病毒^[6]。通过用蛋白酶 K 消化脑组织匀浆,再与自制的抗体 T1 进行免疫印迹,根据消化后的样品中是否含有抗蛋白酶 K 消化的 PrP^{Sc}的存在及其分子量的大小,就可以判定动物是否感染了疯牛病或羊瘙痒病。

3 讨 论

朊病毒病的诊断方法很多,包括朊病毒的生物学测定法、组织病理学检查、PrP^{Sc}的免疫学检测(细胞免疫化学染色、免疫印迹、组织印迹、ELISA)、瘙痒病相关纤维检查和 PrP 基因分析^[4]。其中 PrP^{Sc}的检测是 TSE 的特异诊断方法,已被 WTO 的 TSE 专家会议确认。它不仅可用于死后的组织病理学检查,还可用于活体检测(脑、扁桃体)作生前诊断。但是目前所得到的抗体多数都不能区分 PrP^C和 PrP^{Sc},诊断的特异性取决于抗蛋白酶消化后朊病毒蛋白核心片段(PrP₂₇₋₃₀)的存在。因此用 ELISA 法检测 TSE 需要对样品进行复杂的处理^[11,12],不适合在基层使用。Oesch 等已经制备了一种特异识别 PrP^{Sc}的单克隆抗体 15B3,这种抗体针对的是空间抗原表位,不能用于 western blot 检测^[12],但到目前为止还没有其用于 ELISA 检测的报道。病理学诊断和免疫细胞组织化学只能用于死后诊断,而且需要较长时间。而免疫印迹(Western blot)是一种特异的、准确的、快速的,可以检测大量样品的诊断方法,诊断的特异性取决于蛋白酶消化除去 PrP^C。Hill 等^[10]和 Keulen 等^[14]报道可以从扁桃体里检测到 PrP^{Sc},这为活体诊断提供了方便的采样途径,便于活体检测。因此,可以从待检动物的扁桃体取样,用蛋白酶消化和 Western blot 进行活体检测。

我国还没有抗 BoPrP 及 OvPrP 的抗体,不利于监测疯牛病和羊瘙痒病的疫情。所以我们制备了兔抗正常牛朊病毒蛋白 BoPrP^C的抗体 T1,经过与羊瘙痒病朊病毒 263K 接种的金黄地鼠和正常地鼠的脑组织检测,表明有很好的特异性,能从感染鼠的脑组织内检测到抗蛋白酶 K 的 PrP^{Sc},而正常地鼠的脑组织经蛋白酶 K 消化后没有任何抗性蛋白存在。对正常牛羊的脑组织检测的结果表明脑内没有抗蛋白酶 K 的蛋白。与 1A8 抗体的免疫印迹结果完全一样。说明该抗体 T1 可以用于诊断疯牛病和羊瘙痒病,并且可以通过检测扁桃体进行活体诊断。有望

用于海关检疫,防止疯牛病和羊瘙痒病传入我国。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Brown P, Will R G, Brodley R *et al.* Bovine Spongiform Encephalopathy and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease: Background, Evolution and Current Concerns. *Emerging Infectious Disease*, 2001, 7(1): 6 ~ 16
- [2] Sweeney T, Kuczus T, McElroy M *et al.* Molecular analysis of Irish sheep scrapie cases. *Journal of General Virology*, 2000, 81: 1621 ~ 1627
- [3] Hill A F, Besbruslais M, Joiner S *et al.* The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 1997, 389: 448 ~ 450
- [4] Prusiner S B. Prion Biology and Disease. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999
- [5] McKinley M P, Bolton D C, Prusiner S B. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell*, 1983, 35: 57 ~ 62
- [6] Schaller O, Fatzer R, Stack M *et al.* Validation of a Western immunoblotting procedure for bovine PrP^{Sc} detection and its use as a rapid surveillance method for diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol*, 1999, 98: 437 ~ 443
- [7] Graber H U, Meyer R K, Fatzer R *et al.* In situ hybridization and immunohistochemistry for prion protein (PrP) in bovine spongiform encephalopathy (BSE). *J V Med*, 1995, 42: 453 ~ 459
- [8] FENG Guang-Ze (冯光泽). *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* (畜牧兽医学报), 1987, 18(2): 114 ~ 119
- [9] WANG Daiwei, YANG Huaiyi, RAO Ziheng *et al.* High-level expression and secondary structure analysis of the bovine mature prion protein. *Chinese Science Bulletin*, 2000, 45: 1312 ~ 1314
- [10] Hill A F., Butterworth R J, Joiner S *et al.* Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet*, 1999, 353: 183 ~ 189
- [11] Meyer R K, Oesch B, Fatzer R *et al.* Detection of Bovine Spongiform Encephalopathy Specific PrP^{Sc} by Treatment with Heat and Guanidine Thiocyanate. *Journal of virology*, 1999, 73: 9386 ~ 9392
- [12] Gratwohl K D, Horiuchi M, Ishiguro N *et al.* Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of PrP^{Sc} in crude tissue extracts from scrapie-affected mice. *Journal of Virological Methods*, 1997, 64: 205 ~ 216
- [13] Korth C, Stierli B, Streit P *et al.* Prion(PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature*, 1997, 390: 74 ~ 77
- [14] Keulen J M, Schreuder B E C, Meeuw R H *et al.* Immunohistochemical Detection of Prion Protein in Lymphoid Tissues of Sheep with Natural Scrapie. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34: 1228 ~ 1231

Diagnosis of Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie by Western blot

LI Yun-Min TIAN Bo*

(*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 10080, China*)

ZHANG Bao-Yun DONG Xiao-Ping

(*Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052, China*)

Abstract The rabbits were immuned with bovine prion protein(BoPrP^C) which was expressed in *E. coli* and anti-PrP^C antibody (T1) was obtained. According to pathological prion protein(PrP^{SC}) was resistant to protease treatment, extracts of brain tissue were digested with proteinase K and detected by western blot with T1 antibody. The results showed that protease-resistant pathological PrP^{SC} was existed in golden hamster brain tissue which was inoculated with scrapie strain 263 K, but no protein existed in normal golden hamster brain homogenates which was detected with T1 antibody. Several bovines and sheep from Beijing were used for diagnosis of Bovine spongiform encephalopathy(BSE) and scrapie, their brain tissue were freshly collected and homogenated. The homogenates were separated on SDS-PAGE and detected by western blot with T1 antibody. The results indicated no protease-resistant protein(PrP^{SC}) existed, this suggested they were not infected by BSE and scrapie. The same results were obtained with 1A8 antibody from England. These results indicated we could detect BSE and scrapie with T1 antibody.

Key words bovine spongiform encephalopathy(BSE), scrapie, diagnosis, Western blot

Received: March 21, 2001

This work was supported by Grant from Ministry of Agriculture "948" project(982078).

* Corresponding author. Tel:86-10-62554247; Fax:86-10-62554247; E-mail: tienpo@sun.im.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>