

# 应用亲和层析法提纯 鸡马立克氏病病毒 pp38 基因重组产物

秦爱建 崔治中

(江苏农学院畜禽病原微生物研究室, 扬州 225001)

**摘要** 利用鸡马立克氏病病毒 (MDV) I 型特异单克隆抗体 H<sub>1</sub> 致敏 Sepharose 4B-CNBr, 从感染重组病毒 BP38 I 的昆虫细胞中提纯鸡马立克氏病病毒 pp38 基因重组产物, 获得良好效果。提纯的蛋白质在 SDS-PAGE 中表现出一条分子量约为 38kDa 的蛋白质条带, 在免疫印迹试验中该蛋白质条带也能被单克隆抗体 H<sub>1</sub> 识别。利用该提纯的重组 pp38 免疫小鼠, 所制备的小鼠抗血清在免疫荧光染色试验中不仅能与感染重组病毒的昆虫细胞 Sf9 反应, 也能和 I 型 MDV 型感染的鸡胚成纤维细胞反应。

**关键词** pp38 基因产物, 亲和层析提纯, 马立克氏病毒

马立克氏病是由鸡马立克氏病病毒 (MDV) 引起的一种淋巴细胞增生性传染病。国内外对 MDV 作了广泛而深入的研究<sup>(1-6)</sup>。到目前为止, I 型特异性的 MDV 38kDa 磷蛋白 (pp38) 复合体是在 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<sup>(2,4)</sup>, 为此推测它与肿瘤发生相关。不久前我们已将 MDVpp38 基因整合进杆状病毒并成功地在昆虫细胞中表达<sup>(7)</sup>, 而且还证明了该基因产物也能像在自然宿主中那样磷基化<sup>(8)</sup>。本研究则进一步用亲和层析法从昆虫细胞中提纯重组 pp38 基因表达产物, 以供进一步研究其生物学功能。

## 1 材料与方 法

### 1.1 种毒

表达 MDV pp38 基因的重组杆状病毒为 BP38 I<sup>(7)</sup>, MDV I 型 GA 毒株由本院传染病教研组提供。

### 1.2 昆虫细胞系 Sf9 细胞的培养与重组杆状病毒接种

Sf9 细胞培养于 Grace's 培养基中 (含 15% 犊牛血清, 0.035% NaHCO<sub>3</sub>, 乳清蛋白水解液和 yeastolate 各 0.33%, 青、链霉素各 100u/ml), 于 28℃ 温箱中培养。待细胞几乎长成单层时, 以 1:200 稀释的种毒 (Grace's 培养基稀释, 约含 10<sup>5</sup>/ml 个重组病毒) 接种, 使每个细胞的感染量约为 10 个重组病毒, 继续培养 4—5 天, 收集细胞培养物。

### 1.3 亲和层析柱的制备

基本程序按商品说明进行, 主要程序是: 首先将 0.5g Sepharose 4B-CNBr (Pharmacia 产品) 置 100ml 1mmol/L HCl 中漂洗 30 分钟, 然后以 0.1mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH8.3)

(内含 0.5mol/L NaCl) 溶液洗涤 1 次, 并与以 0.1mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH8.3) 适当稀释的单克隆抗体  $\text{H}_{19}$  (93) 腹水 (0.5ml) 混合, 于 37℃ 作用 2 小时, 使抗体吸附到活化的 Sepharose 4B 颗粒上, 再以 Tris-HCl (pH8.0) 洗脱未结合的抗体, 最后用 0.1mol/L NaAc-HAc 与 0.5mol/L NaCl 混合液 (pH4.0) 和 0.1mol/L Tris-HCl 与 0.5mol/L NaCl 混合液 (pH8.0) 分别轮流洗涤 3 次, 封闭未结合的活性基团, 4℃ 保存备用。

#### 1.4 不同 pH 值对洗脱的影响

将已制备的亲和柱用 0.01mol/L PBS (pH7.4) 洗涤后, 以培养的细胞上清液或超声波破碎的细胞培养物离心后上样, 以每小时 2—5ml 的流速通过柱, 再以 PBS 洗涤除去未结合的杂蛋白, 同时以核酸蛋白检测仪检测在 280nm 的透光率, 待杂蛋白洗去基线平稳后, 再以 0.1mol/L NaAc-HAc (pH2.8) 或 0.1mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH10.8) 洗脱, 收集洗脱峰, 并以 PEG6000 透析浓缩, 在紫外分光光度计上测定  $\text{OD}_{260}$  和  $\text{OD}_{280}$  之值并计算蛋白质含量, 然后测其抗原特异性及其纯度。

#### 1.5 Dot-ELISA 检测纯化的重组 pp38

纯化的重组 pp38 以 dot-ELISA 进行检测, 按常规程序进行。单抗为 1:100  $\text{H}_{19}$ , 酶标抗体为 1:7000 碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG, NBT 显色。

#### 1.6 免疫转印试验

按 Goding 方法进行<sup>[9]</sup>。应用连续系统, 样品胶 4%, 分离胶 7.5—15% 梯度, 120V 电泳 5—6 小时, 电泳完毕后用考马斯亮蓝染色。重组 pp38 经 SDS-PAGE 电泳后, 在 0.1A 电流下转移至硝酸纤维膜上, 转移后的纤维膜用 2% blocking reagent (digoxigenin 试剂) 封闭, 然后同 dot-ELISA 检测和显色。

#### 1.7 抗重组 pp38 基因表达产物小鼠和雏鸡血清的制备

以完全福氏佐剂 (Sigma 公司产品) 与等量提纯并浓缩的 pp38 混匀, 腹腔注射免疫 ICR 小白鼠 (SPF 级), 每只免疫蛋白量为 60 $\mu\text{g}$ , 两周后以不完全佐剂与等量提纯的基因表达产物混匀, 腹腔注射, 每只 100 $\mu\text{g}$ , 4 周后再进行第三次加强免疫每只 120 $\mu\text{g}$ , 注射后 8 天采血, 分离血清并与感染或未感染重组病毒的 Sf9 细胞以及感染了 I 型 MDV 的鸡胚成纤维细胞反应, 步骤与文献 [7] 相同。

采用同样的方法 3 次免疫 SPF 雏鸡, 制备抗重组 pp38 鸡血清。

## 2 结 果

### 2.1 单抗致敏 Sepharose 4B-CNBr 的效果

按上述步骤单抗致敏 Sepharose 4B-CNBr 效果较好, Sepharose 4B-CNBr 活化的颗粒以 1mmol/L HCl 再活化, 不同作用时间影响抗体的结合, 其中以 30 分钟洗涤后结合率较高, 0.5ml 腹水含蛋白质 16mg 可以结合 7.4mg, 结合率为 44%, 而经 1 小时其结合率下降为 25%。

### 2.2 亲和柱对重组 pp38 的纯化效果

以破碎离心之细胞培养物上样进行亲和纯化, 结果出现两个主峰 (图 1), 第一峰为杂蛋白峰, 在 dot-ELISA 试验中不能检出, 第二峰为纯化的重组 pp38, 经 dot-ELISA 鉴定, 可以与 MDV I 型特异单抗  $\text{H}_{19}$  出现强阳性反应, 以 10—15ml/h 的流速加样, 该亲和

柱所结合抗原量较少，用 0.1mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH10.8) 洗脱时仅见一小峰，dot-ELISA 反应中阳性较弱。而以 2—5ml 流速上样时抗原结合量较高，同样洗脱液洗脱时可出现一个较高的峰，dot-ELISA 中呈现明显的强阳性反应；在洗脱时如果改用 0.1mol/L NaAc-HAc (pH2.8)，基本不能洗脱结合的抗原，在 dot-ELISA 中基本见不到阳性反应，证明对重组 pp38 提纯时要求较高的 pH 洗脱液。

**2.3 培养物中的重组 pp38 含量**

用培养上清液或培养物加样进行亲和层析，均能获得较纯的重组 pp38 峰，每毫升的培养物经上述提纯可获约 35μg 的重组 pp38 蛋白。

**2.4 纯化的重组 pp38 的纯度及抗原性**

经上述亲和层析，将洗脱峰收集并以 0.1mol/L HCl 将 pH 调至 7.0 后，以 PEG6000 透析浓缩 20—30 倍，然后作为样品，取 25μl 加等量样品缓冲液，在 100℃ 煮沸 5 分钟后加入各槽中按 Goding 方法进行 SDS-PAGE 电泳。结果在纯化的槽中出现一明显的蛋白条带，分子量约 38kDa，经透射线性薄层扫描(狭缝 1.2×1.2mm, λ<sub>550nm</sub>)测定其纯度为 78.2% (图 2)，而在分子量约为 73kDa 处也出现了一个小峰，约占 21.8%，而未经提纯的相应的感染和非感染的 Sf9 细胞中则出现很多条蛋白带(图 3a)，经 Western blot 免疫转移印迹电泳可见到纯化样品槽中出现一条明显的 38kDa 蛋白质带，另外在分子量约 73kDa 处也出现一弱的反应带，而与其相对应的未提纯的细胞培养物和 MDV 强毒感染细胞培养中基本不显现明显的反应带(图 3b)。说明所提纯的重组 pp38 纯度较好，并且仍然保留其原有的抗原性。

**2.5 抗重组 pp38 基因产物小鼠和雏鸡血清的免疫反应性**

利用纯化的重组 pp38 基因产物免疫小鼠，可刺激机体产生抗体，在免疫荧光试验中，所制备的抗血清能与感染重组病毒的 Sf9 细胞发生反应，效价达 1：640，而相对应的未

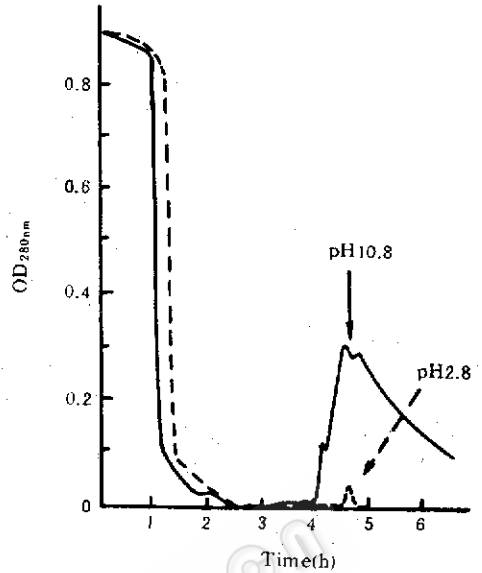


图 1 亲和层析纯化马立克氏病病毒重组 pp38 的洗脱峰

Fig. 1 Affinity purification elution peak of recombinant pp38 of MDV by Mab H<sub>19</sub> coupled chromatography

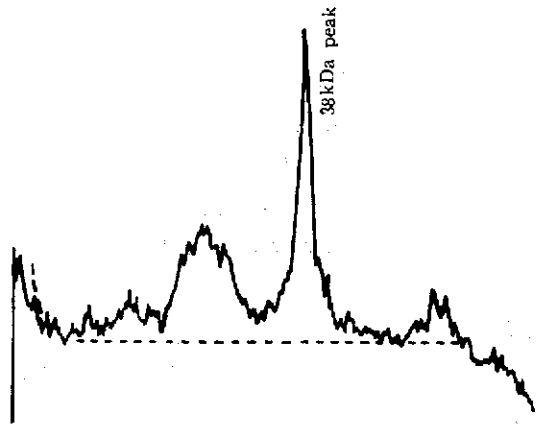


图 2 纯化了重组 pp38 经 SDS-PAGE 电泳后薄层扫描结果

Fig. 2 Thin layer scan of the purified recombinant pp38 after SDS-PAGE

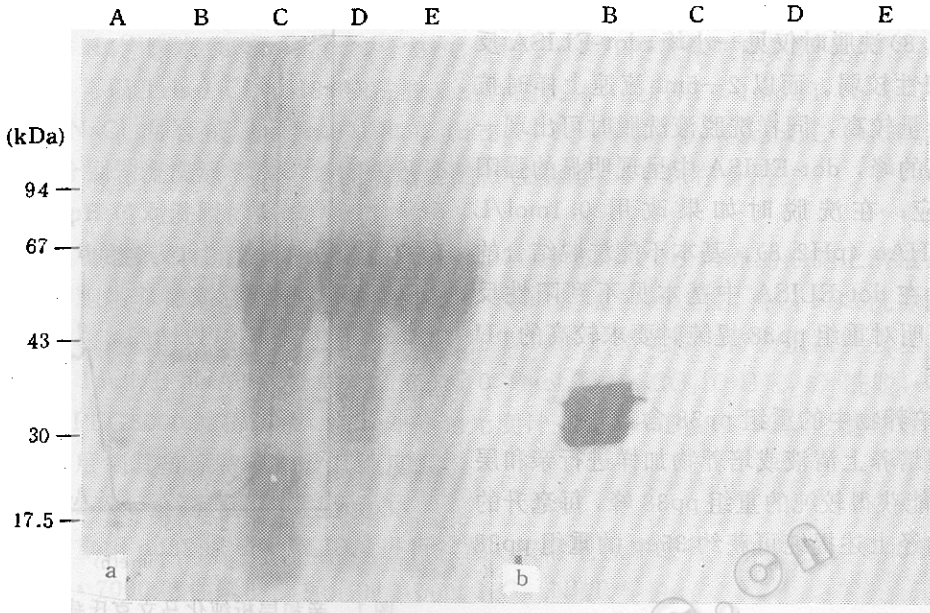


图 3 纯化的重组 pp38 的电泳及转移免疫印迹反应

Fig. 3 SDS-PAGE and Western blot of the purified recombinant pp38

(3a). Coomassie brilliant blue stain of purified recombinant pp38 after SDS-PAGE (3b). Result of Western blot of B, C, D, E respectively

A. Protein molecular weight marker, B. Purified recombinant pp38, C. MDV GA strain infected chicken embryo fibroblast cells lysate, D. Recombinant baculovirus-BP38 I infected Sf9 cells; E. Wild type baculovirus infected Sf9 cells

感染病毒的 Sf9 细胞则不发生反应，同样与 I 型 MDV 病毒感染的鸡胚成纤维细胞也能呈现出强阳性反应，效价为 1 : 128，说明了所提纯的这一重组 pp38 与天然 MDV I 型的 38kDa 磷蛋白在抗原性上完全一致或相似。然而测定免疫鸡的血清抗体结果表明，单纯的重组 pp38 提纯产物免疫后不能产生良好的抗体反应，只有在与佐剂混合后，并以 3 次加强免疫，才能在部分免疫鸡诱发效价仅为 1 : 4 的 FA 抗体。

### 3 讨 论

虽然近 10 年来，MDV 的 pp38 一直被认为是一种与 MDV 所致肿瘤相关的抗原<sup>[2,4]</sup>，但由于 MDV 的细胞结合性，使 pp38 的具体生物学功能的研究一直停滞不前。本试验所制备的由 H<sub>19</sub> 与 Sepharose 4B-CNBr 结合的亲和柱从昆虫细胞中提纯重组 pp38 是一行之有效的方法，为 pp38 的生物学功能的进一步研究打下了良好的基础。试验证明用此方法提纯的 pp38 纯度可达 78.2% 以上，并在免疫印迹电泳中表现了良好的抗原特异性。然而，在分子量约为 73kDa 处亦表现出与 H<sub>19</sub> 单抗的反应，这一结果提示了在感染重组病毒 BP38 I 的昆虫细胞 Sf9 中可能有一定比例的二聚体存在。

我们的试验证明了用亲和层析纯化的重组 pp38 免疫小鼠，可以刺激小鼠产生较高的特异性抗体反应，表明提纯的重组 pp38 能像天然的 pp38 那样表现良好的抗原性。然而

该提纯物对鸡的免疫原性很差, 只能诱发勉强可测的抗体反应。利用提纯的重组 pp38 进一步研究发现, 重组 pp38 对雏鸡有明显的免疫抑制作用<sup>[10,11]</sup>, 这显然是与重组 pp38 不易在鸡诱发免疫反应相吻合的。

### 参 考 文 献

- [1] Churchill A E *et al.* *Nature*, 1969, 221 : 744—747.
- [2] Naito *et al.* *Avian pathol.* 1986, 15 : 503—510.
- [3] Lee L F *et al.* *J Immunol.* 1983, 130 : 1003—1006.
- [4] Nakajima K *et al.* *J Gen Virol.* 1987, 68 : 1379—1392.
- [5] Cui, Z Z *et al.* *J Virol.* 1991, 65 (12) : 6509—6515.
- [6] Cui Z Z *et al.* *Virus gene.* 1990, 3 (4) : 309—322.
- [7] 崔治中等. *中国病毒学*, 1992, 7 (1) : 106—112.
- [8] Cui Z Z and Qin A J *et al.* *Proceeding 19th world's poultry congress, Volume 1, Amsterdam 19—24 september, 1992, pp. 123—126.*
- [9] Goding J W. *Monoclonal antibodies*, 2nd, edited by Academic press Inc. (London) Ltd, 1983, pp. 163—165.
- [10] Cui Z Z and Qin A J. *Proceedings of Xth world veterinary poultry association congress, Sydney, 1993, p. 150.*
- [11] 秦爱建等. *全国免疫学会第二届学术大会论文集*, 南京, 1993, pp. 57—58.

## Purification of Marek's Disease Virus pp38 Expressed in Insect Cells Infected with Recombinant Baculovirus through A Affinity Column

Qin Aijian      Cui Zhizhong

(*Department of Animal Science and Veterinary Medicine,  
Jiangsu Agricultural College, Yangzhou 225001*)

**Abstract** 38kDa phospholyrated protein (pp38) of Marek's disease virus (MDV) expressed in insect cells infected with recombinant baculovirus BP38 I was purified by affinity column which made of Sepharose 4B-CNBr linked with monoclonal antibody H<sub>19</sub> specifically to serotype I MDV. The result of SDS-PAGE showed a main band of 38kDa in the lane added with purified pp38, and this band specifically recognized by monoclonal antibody H<sub>19</sub> in Western blot. The serum from mouse immunized with the purified pp38 reacted only to Sf9 cells infected with recombinant baculovirus BP38 I but not with the wild baculovirus, it also gave titer of 1 : 128 in IFA to MDV-infected chick embryo fibroblast cells. The result indicated that the purification procedure was effective and it would be very useful for investigating the biological function of MDV pp38.

**Key words** Recombinant pp38 gene product, Marek's disease virus, affinity column purification