

I 型马立克氏病毒 38kD 磷蛋白与 II 和 III 型病毒间的交叉免疫反应

秦爱建 崔治中 段玉友

(江苏农学院畜牧兽医系 扬州 225001)

摘 要 由致病性 I 型马立克氏病毒(MDV)特异性的单克隆抗体 H₁₀制备亲和层析柱,从感染重组杆状病毒 BP38 I 的昆虫细胞系 Sf9 细胞中提纯 MDV 的 pp38 基因表达产物,以此免疫小鼠制备抗血清,测定其与不同型 MDV 毒株感染的鸡胚成纤维细胞免疫反应性,同时也用不同型 MDV 毒株(HVT, Z4)制备的抗血清和自然感染发病鸡血清分别与感染重组病毒的 Sf9 细胞进行免疫交叉反应。试验结果表明,完整的 I 型 MDV 来源的 pp38 基因产物与所试 I 型 Z4 株和 II 型 HVT Fc126 毒株在抗原性上有显著交叉反应。这一结果表明,在 II 型和 III 型 MDV 毒株中可能存在着 pp38 的类似物。

关键词 马立克氏病毒,重组 38kD 磷蛋白

马立克氏病毒(MDV)是引起鸡的一种高度传染性的淋巴细胞瘤的病原,主要以引起 T 淋巴细胞瘤和外周神经损害为特征^[1,2]。Schat, Nakajima 等证明,仅血清型 I 型 MDV 能造成鸡的淋巴细胞肿瘤,而 I 型特异性的 MDV38kD 磷蛋白(pp38)复合体是迄今为止在 MDV 诱发的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^[2-5],为此推测它与肿瘤发生相关。由于从 I 型 MDV 中识别 pp38 复合体的单抗在荧光抗体染色试验中,仅与致病性 I 型 MDV 感染的细胞反应,而与 II 和 III 型病毒呈阴性反应,长期以来,一直认为 pp38 是 I 型病毒特异性的^[5-6]。本试验用亲和层析法从昆虫细胞中提纯重组 pp38 基因表达产物并以此免疫小鼠,制得的抗血清与不同型 MDV 感染的鸡胚成纤维细胞作交叉免疫荧光分析,并以不同型 MDV 的抗血清与能表达重组 pp38 的 Sf9 细胞作荧光抗体试验,证明了 pp38 基因重组产物也能与所试不同型 MDV 发生交叉反应。

1 材料和方法

1.1 病毒

能表达 MDVpp38 的重组杆状病毒 BP38 I,由我们过去构建和筛选到的^[8,9]在其感染的昆虫细胞系 Sf9 细胞中,重组 pp38 也能像天然产物一样磷基化^[10],MDV 的 I 型 GA 株, I 型 Z4 株和 II 型 HVT-FC126 株由本院传染病教研室提供。

1.2 昆虫细胞系 Sf9 细胞的培养及其感染

• 国家自然科学基金和江苏省教委基金资助项目。

本文于 1993 年 10 月 21 日收到。

Sf9细胞培养于 Grace's 培养基中,培养24小时后待细胞几乎长成单层时,以1:200稀释的 BP38 I 种毒 (Grace's 培养基稀释,约含 10^5 /ml 个空斑单位的重组病毒) 接种,使每个细胞最后的感染量约为10个重组病毒,继续培养4—5天,收集细胞培养物备用。

1.3 亲和层析柱的制备及纯化

载体颗粒为 Sepharose-4B-CNBr (Pharmacia 公司产品),联接抗体为 I 型 MDV 特异性单克隆抗体 H₁₉^[5],载体与抗体的交联,按商品说明书进行。

1.4 免疫转印试验

按 Goding 方法进行^[11]。

1.5 重组 pp38基因表达产物小鼠抗血清的制备

以等量提纯并浓缩的重组 pp38与完全福氏佐剂 (Sigma 公司产品) 混匀,腹腔注射免疫 ICR 小白鼠 (SPF 级),每只60 μ g,两周后以等量提纯的基因表达产物与不完全佐剂混匀,腹腔注射,每只100 μ g,4周后再进行第3次加强免疫每只140 μ g 尾静脉和腹腔注射,8天后采血分离血清, -20℃冻存备用。

1.6 鸡胚和鸭胚成纤维细胞培养及 MDV 感染

按常规方法进行^[12]。

1.7 间接荧光抗体染色 (IFA)

将上述接种培养3—4天的成纤维细胞或感染重组病毒的 Sf9细胞取出后弃去培养上清液,再以0.01mol/L PBS (pH 7.4) 洗涤一次,然后用冷丙酮与乙醇 (6:4) 固定10—15分钟。弃去固定液,使其自然干燥,再以 PBS 洗涤2—3次作 IFA 检测用。IFA 按常规法进行,主要步骤是:将不同血清分别加入细胞培养板各孔中,37℃水浴30—45分钟, PBS 洗涤3—5次,再加入兔抗鸡 IgG 或羊抗小鼠 IgG 荧光抗体 (Sigma) 37℃水浴30—45分钟,同样洗涤后,各孔加入50%甘油 PBS,然后翻转细胞板荧光显微镜下检查。同时设 SPF 正常鸡血清或小鼠血清及 H₁₉单抗作对照。

2 结果

2.1 纯化的 pp38的纯度

收集亲和层析的洗脱峰,以0.1mol/L HCl 调整 pH 至7.0左右后,以 PEG6000浓缩20—30倍,然后作为样品,取25 μ l 加等量样品缓冲液,在100℃煮沸5分钟后加入各槽中做 SDS—PAGE。结果表明,在纯化的槽中仅出现一条明显的蛋白带,分子量约38kD。经薄层扫描测定,纯度为78.8%以上。而在感染和非感染的 Sf9细胞溶解物中出现很多条蛋白带 (图1)。经 Westernblot 试验,用 I 型 MDV 特异的单克隆抗体 H₁₉和碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体作用,以 NBT 为底物显色,可见到纯化的 pp38蛋白质槽中出现一条明显的分子量约为38kD 的蛋白带,说明所提纯的 pp38纯度很好,并且仍然保留其原有的抗原性。

2.2 抗重组 pp38小鼠血清与不同型 MDV 之间的反应性

为了解 pp38与不同血清型 MDV 之间有无相关性,利用所制得的小鼠抗重组 pp38血清与不同型 MDV 感染的鸡胚成纤维细胞进行免疫荧光染色。试验结果发现,所制备的血清与所试的三个型 MDV 感染的细胞均发生反应 (表1和图2),这表明了重组 pp38在抗原

结构上与其它型的 MDV 存在共同的或相似的抗原结合位点。

2.3 不同血清型 MDV 抗血清与感染重组杆状病毒的 Sf9细胞的反应性

将不同稀释度的抗不同型 MDV 抗血清分别与感染了重组杆状病毒的 Sf9细胞作用, 通过荧光抗体染色证明, 不仅 I 型 MDV 抗血清能与其反应, 而且 II 型和 III 型病毒的抗血清也能与它反应, 细胞呈现明显的亮绿色荧光, 只是抗体效价有所区别 (表1)。对照 SPF 鸡血清及 Sf9正常细胞均无荧光, 为阴性。

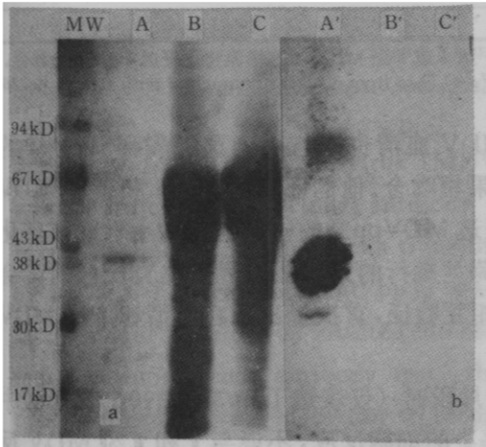


图1 纯化的 pp38的 SDS-PAGE 和免疫印迹分析

MW: 标准蛋白分子量; A. 纯化了的 pp38; B. 感染重组病毒的 Sf9细胞; C. 正常的 Sf9细胞 (SDS-PAGE 后经考马斯蓝染色结果); A', B' 和 C' 分别为相应 A, B 和 C 样品的免疫印迹反应结果。

Fig. 1 SDS-PAGE and immunoblot of the purified pp38 preparation MW. Protein standard molecular weight markers; A. Purified pp38; B. Sf9 cells infected with recombinant baculovirus BP38 I; C. normal Sf9 cells, (Coomassie blue stained gel after SDS-PAGE); A', B' and C' were immunoblot results of samples A, B and C respectively.



图2 抗重组 pp38鼠血清与 HVT 感染的鸡胚成纤维细胞的荧光染色结果 (200×)

Fig. 2 Fluorescence antibody reaction of serotype II Fc-126 strain-infected CEF with mouse sera against the recombinant pp38

2.4 单抗 H₁₉与 Z4及 HVT Fc126株病毒的反应情况

根据上述结果, II 型 MDV 的 Z4株及 III 型 HVT Fc126株的抗血清能与 pp38基因产物呈阳性反应, 这两株种毒中是否混有 I 型 MDV, 为此我们利用感染了 Z4和 HVT Fc126株的鸡胚成纤维细胞进行荧光染色, 它们不能与 I 型特异单抗 H₁₉反应, 因此, 这两株种毒中不含有 I 型 MDV 强毒。

3 讨论

本试验采用 Sepharose 4B-CNBr 与 I 型 MDV 特异性单抗 H₁₉联接, 制备了亲和层析柱, 从感染重组杆状病毒的昆虫细胞 Sf9中提取了重组 pp38, 用它所制备的小鼠免疫血清与不同型的 MDV 株进行交叉反应, 证明重组 pp38能与 II 型 Z4株和 III 型 HVT Fc126毒

表1 重组 pp38和不同型 MDV 间的血清学交叉反应

Table 1 Serological cross-reactivities between recombinant pp38 and different serotypes of MDV

毒株/血清 strain/sera	鸡血清 Chicken sera			抗 pp38鼠血清 Anti-pp38 mouse sera	
	MDV (I) ^a	Z4 (I) ^b	HVT (III) ^b	SPF	
GA-CEF	1: 4096	≥1024	≥1024	-	1: 128
Z4-CEF	1: 512	≥1024	1024	-	1: 64
HVT-CEF	1: 512	≥1024	≥1024	-	1: 64
P38 I-Sf9	1: 1280	1: 160	1: 80	-	1: 640
Sf9	-	-	-	-	-

注: a. 自然发病并有典型的 MDV 肿瘤病鸡的血清; b. 以 I 或 II 型 MDV 细胞培养物免疫成年 SPF 鸡制得。

Note: a. Sera from chickens naturally infected with MDV; b. Sera from chickens immunized with strains Fc126 or Z4-infected CEF.

株发生交叉反应。用 SPF 鸡制得的抗不同型 MDV 血清也能与感染重组病毒 BP38 I 的 Sf9 细胞发生反应。这一结果与 Uni⁽¹³⁾报道的结果相吻合。他们证明经 I、II 和 III 型 MDV 免疫的鸡 T 淋巴细胞,在细胞免疫中,均与能表达 MDVpp38 的网状内皮增生性病毒转化的 T 淋巴细胞系发生细胞免疫反应。1992 年在荷兰举行的第四届国际马立克氏病讨论会上,我们报道了初步结果⁽¹⁰⁾并于与 Uni 的结果相互验证,首次提出了在 II 型和 III 型 MDV 中存在着 pp38 类似物的推测。

过去我们用原核细胞系统表达 pp38 的部分片段时(仅表达了 pp38 的 290 个氨基酸中的 160 个),制备的抗血清仅能够与 MDV I 型感染的细胞反应,不能与 II 和 III 型 MDV 反应⁽¹⁴⁾。本研究用 pp38 全基因在真核细胞中的表达产物免疫小鼠制得的血清作 IFA 表明,重组 pp38 鼠血清可与 II 和 III 型 MDV 发生交叉反应。这表明过去表达的部分片段,是 pp38 的致癌性 I 型病毒特异性部分,可能与致癌性有关,而位于特异片段两侧的氨基酸序列则与 II 和 III 型 MDV 的交叉反应有关。

致谢 本试验得到本院传染病教研组的大力支持,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Biggs P M. *Vet Rec*, 1967, **81**: 583—592.
- [2] Schat K A, Calnek B W, Fabricant J. *J Nat Cancer Inst*, 1982, **69**: 715—720.
- [3] Naito S, Nakajima K, Iwa N *et al.* *Avian Pathol*, 1986, **15**: 503—510.
- [4] Nakajima K, Ikuta M, Naito S *et al.* *J Gen Virol*, 1987, **68**: 1379—1392.
- [5] Lee L F, Liu X, Witter R L. *J Immunol*, 1983, **130**: 1003—1006.
- [6] Silva R F, Lee L F. *Virology*, 1984, **136**: 307—320.
- [7] 卡尔尼克 B W (高福等译). 禽病学. 第九版. 北京: 北京农业大学, 1991. 445—454.
- [8] 崔治中, Lee L F. *江苏农学院学报*, 1992, **13** (1): 1—5.
- [9] 崔治中, Lee L F. *中国病毒学*, 1992, **1**: 107—113.
- [10] Cui Z, Qin A, Lee L F. *World's Poultry Congress, Proceedings Vol 1. Amsterdam*, 1992. 123—126.
- [11] Goding J W. *Monoclonal Antibodies*. 2nd ed. London: Academic Press Inc, 1983. 163—165.
- [12] 中国医学科学院流行病学防治研究所. 常见病毒实验技术. 北京: 科学出版社, 1978. 66—82.
- [13] Uni Z, Pratt W D, Schat K A. *World's Poultry Congress, Proceedings Vol 1. Amsterdam*, 1992. 251—253.
- [14] Cui Z, Yan D, Lee L F. *Virus Gene*, 1990, **3** (4): 309—322.

IMMUNOLOGICAL CROSS-REACTION OF SEROTYPE I MAREK'S DISEASE VIRUS 38kD PHOSPHORYLATED PROTEIN WITH SEROTYPE II AND III VIRUSES

Qin Aijian Cui Zhizhong Duan Yuyou

(Department of Animal Science, Jiangsu Agricultural College, Yangzhou 225001)

Abstract Marek's disease virus (MDV) 38kD phosphorylated protein (pp38), which was identified by monoclonal antibody (mAb) H₁₉ specific to pathogenic serotype I of MDV, has been recognized as a transformation-associated antigen specific to serotype I of MDV. The recombinant pp38 was prepared and purified from pp38-expressing recombinant baculovirus infected Sf9 cell lysates through a mAb H₁₉- affinity column. In indirect fluorescence antibody test, the mouse sera against the purified recombinant pp38 not only gave a high titer to serotype I strain GA- infected CEF but also gave a reasonable titers to serotype I strain Z4- and serotype II HVT strain Fc126-infected CEF. In another way, the pp38- expressing recombinant baculovirus infected Sf9 cells reacted with anti-serotype I MDV chicken sera as well as with anti-serotype II and serotype III MDV chicken sera respectively. The results imply that both serotypes I and II of MDV probably contain a homologue to pp38 of serotype I.

Key words Marek's disease virus, Recombinant 38kD phosphorylated protein