

单纯疱疹病毒2型3万道尔顿 结构蛋白的纯化及其特性研究

秦克锋 汪美先 姜绍淳 马文煜

(第四军医大学微生物学教研室, 西安)

提 要

用抗HSV-2型特异性单克隆抗体CH-A9与Sepharose 4B偶联制备免疫吸附柱,以亲和层析的方法,从HSV-2感染的BHK细胞膜上纯化了一种HSV-2特异的结构蛋白(VP30)。实验表明,该结构蛋白的主要特性有:第一,分子量为30,000道尔顿;第二,具有HSV-2型特异性;第三,可在小鼠体内诱发中和抗体。

单纯疱疹病毒(HSV)是一种引起人类多种疾病的常见病原体,分为1型(HSV-1)和2型(HSV-2)。HSV是DNA病毒,含衣壳及在感染细胞膜出芽时获得的囊膜^[1]。囊膜含病毒特异的糖蛋白。根据HSV糖蛋白在SDS-PAGE上分子量递减的情况,分别称为gC(MW 130,000)、gB(MW 126,000)、gA(MW 119,000)、gE(MW 66,000)和gD(MW 62,000)^[2,3]。一般认为,gC主要含型特异性抗原决定簇^[2]、gB与gA主要含型共同性决定簇^[4]、gD与gE既含型特异性也含型共同性决定簇^[5,3]。为了进一步探求HSV-2结构蛋白的特点,寻找亚单位疫苗的抗原组分,本文用单克隆抗体(McAb)作亲和层析,纯化HSV-2结构蛋白,并研究了其生化和免疫特性。

材料与方 法

病毒 HSV-1 SM44株引自北京生物制品所; HSV-2 Sav株引自成都生物制品所。

细胞 BHK 21 C13细胞系引自军事医学科学院五所。

抗体 抗HSV-2型特异性McAb CH-A9和CM-D3^[6]、抗HSV型共同性McAb 1A12、2C5、2D11^[7]、抗肾综合征出血热病毒McAb G4^[8]及SP2/0骨髓瘤细胞系腹水和上清均由本室制备。鼠抗HSV-1与鼠抗HSV-2血清由本室制备

ELISA测定McAb CH-A9的特异性 按文献^[9]进行

HSV抗原片制作与间接免疫荧光染色法 在75ml细胞培养瓶中放入1.5×0.5cm载玻片,使BHK细胞在其上长成单层,感染HSV-1或HSV-2,待病变出全(Ⅲ~Ⅳ),

本稿1986年3月1日收到

18—24小时)后,将玻片取出,分别作固定片免疫荧光染色和活细胞膜免疫荧光染色,荧光镜检。

HSV感染BHK细胞可溶性膜蛋白的提取 HSV-1或HSV-2感染BHK细胞可溶性膜蛋白及正常BHK细胞可溶性膜蛋白对照按文献^[10]制备。

McAb免疫吸附柱的制备与亲和层析 3g CNBr活化的Sepharose 4B(Pharmacia Fine Chemicals)按说明书抽洗后,与McAb CH-A9腹水 γ 球蛋白94mg偶联制备免疫吸附柱。HSV-2感染BHK细胞可溶性膜蛋白150mg与免疫吸附柱在4℃下结合过夜。先用pH8.0 0.1M Tris-HCl缓冲液充分淋洗去未结合的非特异性蛋白,再用pH8.0 0.3mol/L硫氰酸钾(KCNS)洗脱,每3ml收集一管;测每管洗脱液的OD_{280nm}值。收集峰管,对pH8.0 0.01mol/L PBS透析除去KCNS,测蛋白含量,浓缩至约1ml。HSV-1感染BHK细胞可溶性膜蛋白及正常BHK细胞可溶性膜蛋白对照同法作亲和层析。

ELISA鉴定洗脱物的特异性 将HSV-2感染BHK细胞可溶性膜蛋白亲和层析洗脱物(以下简称层析洗脱物)用pH9.6 0.05mol/L碳酸盐缓冲液作1:10稀释,包被聚苯乙烯40孔微培板(天津产),分别加入McAb腹水、上清或鼠抗HSV血清,按常规ELISA法进行。

¹²⁵I标记层析洗脱物 层析洗脱物对pH7.4 0.05mol/L PB-0.14mol/L NaCl透析平衡后,稀释成400 μ g/ml,取20 μ l,用2mCi Na¹²⁵I(北京原子能所)按氯胺T法^[11]标记。标记后样品液经Sephadex G-25层析柱,用pH7.4 0.05mol/L PB-0.14mol/L NaCl洗柱,收集每管1ml,以分离游离¹²⁵I。将各收集管作放射性计数,取蛋白标记峰管为应用液。

[³H]-亮氨酸掺入HSV-2感染的BHK细胞 参照文献^[12]进行,所用[³H]-DL-亮氨酸为上海原子能所出品。

SDS-PAGE与放射(荧光)自显影 丙烯酰胺(广州化学试剂厂)的浓度,分离胶为10%,浓缩胶为3%,作不连续垂直平板电泳。样品加入5倍样品缓冲液(含2.3% SDS, 5% 2-巯基乙醇),100℃水浴3分钟,加入样品孔中电泳。用兔肌肉磷酸化酶B(MW 94,000)、牛血清白蛋白(MW 67,000)卵清蛋白(MW 43,000)、牛心细胞碳酸酐酶(MW 30,000)、胰蛋白酶抑制剂(MW 20,000)及 α -牛乳清蛋白(MW 14,400)、(Bio-Rad Laboratories)作为标准蛋白。0.25%考马斯蓝染色,脱色,干燥,将凝胶片与X光胶片紧贴,-20℃曝光7天,显影,定影。

小鼠的免疫 取雌性BALB/C小鼠16只,其中8只为实验组,另8只为对照组。将亲和层析洗脱物分5次免疫实验组小鼠,前4次每只小鼠每次以10 μ g与完全福氏佐剂(CFA)混合后作皮下多点注射,第5次以20 μ g作腹腔注射,每次注射间隔3周。在作实验组小鼠免疫注射的同时给对照组小鼠注射,前4次用CFA作皮下多点注射,第5次用生理盐水(NS)作腹腔注射。分别于末次注射后第7天和第14天,各取实验组和对照组4只小鼠,取血清作中和试验。

微量组织培养中和试验 参照文献^[13]进行。

结 果

一、McAb CH-A9的特异性

经ELISA和间接荧光染色法鉴定, McAb CH-A9具有抗HSV-2型特异性(表1)。HSV感染BHK细胞膜免疫荧光染色结果表明, McAb CH-A9是针对HSV-2感染BHK细胞膜组分的, 即是针对HSV-2囊膜成分的。

表1 McAb CH-A9的特性
Table 1 Properties of McAb CH-A9

	ELISA	BHK细胞固定 片免疫荧光染色	BHK细胞膜 免疫荧光染色
HSV-1 (SM44)	-	-	-
HSV-2 (Sav)	+*	+	+
正常BHK细胞	ND	-	-

* 效价为 10^{-6} 。

二、免疫吸附柱的洗脱曲线

HSV-2感染BHK细胞膜可溶性蛋白与McAb CH-A9免疫吸附柱, 用pH8.0 0.3mol/L KCNS洗脱, 见一高而窄的蛋白洗脱峰。而HSV-1感染BHK细胞可溶性膜蛋白与正常BHK细胞可溶性膜蛋白在同样条件下的洗脱曲线基本平直(图1)。提示该免疫吸附柱纯化的抗原为HSV-2型特异性抗原。

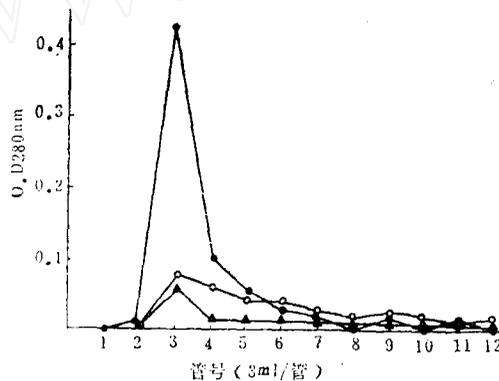


图1. pH8.0 0.3mol/L KCNS洗脱McAb CH-A9免疫吸附柱上结合的抗原

Fig 1 The antigens associated with McAb CH-A9 were eluted from immunoadsorbent column with 0.3mol/L KCNS, pH 8.0

- HSV-2感染BHK细胞可溶性膜蛋白
- HSV-1感染BHK细胞可溶性膜蛋白
- ▲—▲ 正常BHK细胞可溶性膜蛋白

三、ELISA鉴定层析洗脱物的特异性

ELISA间接法测定表明, 层析洗脱物只与鼠抗HSV-2血清及抗HSV-2型特异性McAb CH-A9反应, 而与鼠抗HSV-1血清、正常鼠血清、另一株抗HSV-2型特异性McAb CM-D3、抗HSV型共同性McAb 1A12、2C5、2D11、抗肾综合征出血热病毒McAb

G4及SP2/0腹水或上清均不反应(表2),提示该层析洗脱物具有HSV-2型特异的抗原性,并具有单一的抗原决定簇。

表2 ELISA间接法测定层析洗脱物的特异性

Table 2 Determination of the specificity of the eluted substance by ELISA

	层析洗脱物
鼠抗HSV-1血清(1:200)	- ¹⁴⁾
鼠抗HSV-2血清(1:200)	+ ¹⁴⁾
正常鼠血清(1:200)	-
CH-A9腹水 ¹¹⁾ (1:100)	+
SP2/0腹水(1:100)	-
CH-A9上清 ¹¹⁾	+
CM-D3上清 ¹¹⁾	-
1A12上清 ¹²⁾	-
2C5上清 ¹²⁾	-
2D11上清 ¹²⁾	-
G4上清 ¹²⁾	-
SP2/0上清	-

- (1) 抗HSV-2型特异性McAb;
- (2) 抗HSV-1型共同性McAb;
- (3) 抗肾综合征出血热病毒McAb;
- (4) OD_{490nm} ≥ 0.15为阳性; OD_{490nm} < 0.1为阴性;

四、HSV-2多肽图谱与层析洗脱物纯度及分子量测定

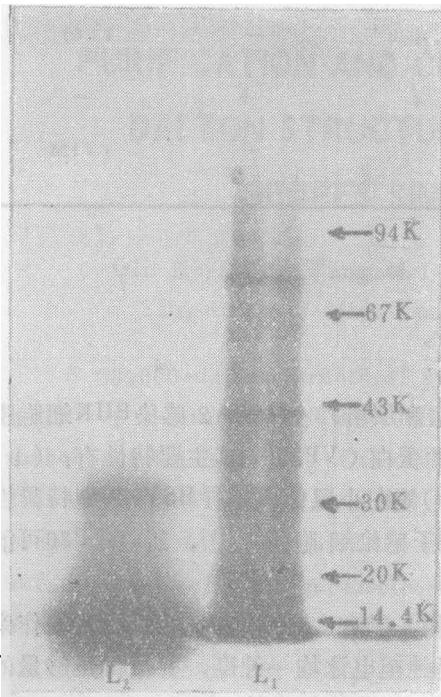


图2 HSV-2多肽图谱与层析洗脱物纯度及分子量测定

Fig 2 Polypeptide map of HSV-2-infected BHK cells and the purity and molecular weight of the eluted substance

- L1 HSV-2感染BHK细胞多肽图谱,³H参入,放射荧光自显影
- L1 (Lane 1): Polypeptide map of HSV-2-infected BHK cells, ³H-labeled, autoradiofluorograph
- L2 ¹²⁵I标记层析洗脱物,放射自显影
- L2(Lane 2): ¹²⁵I-labeled eluted substance, autoradiograph

注:由于曝光时间过长(7天),残留的¹²⁵I在凝胶前沿形成粗带

经 $[^3\text{H}]$ -DL-亮氨酸参入HSV-2感染的BIHK细胞,用细胞裂解液(含2.5%SDS, 5% 2-巯基乙醇)裂解后作SDS-PAGE,放射荧光自显影显示,HSV-2多肽数目为24条(图2照片L1),与文献^[14]报道相近。层析洗脱物用 ^{125}I 标记,经SDS-PAGE后作放射自显影,层析洗脱物为清晰的单一区带(图2照片L2),可认为层析洗脱物为纯品。放射自显影前用考马斯亮蓝染色显示标准蛋白区带,作出分子量曲线,并经计算,层析洗脱物分子量为30,000道尔顿。

五、微量组织培养中和试验

McAb CH-A9腹水对HSV-1无中和作用,对HSV-2的中和效价为1:128;SP2/O腹水对照对HSV-1和HSV-2均无中和作用。在小鼠末次免疫后第7天和第14天取小鼠血清作中和试验,实验组小鼠(注射层析洗脱物和CFA)血清对HSV-2的50%血清中和终点(X)分别为1:55和1:69,而对HSV-1均无中和作用。对照组小鼠(注射CFA和NS)血清对HSV-1和HSV-2均无中和作用(表3)。

表3 免疫小鼠血清与McAb CH-A9的中和效价
Table 3 Neutralizing titer of McAb CH-A9 and sera of immunized mice with the eluted substance

末次免疫 后天数	组别	血清份数	50%血清中和终点(\bar{X})	
			HSV-1	HSV-2
7	实验组 (层析洗脱物/CFA)	4	—	1:55
	对照组 (CFA/NS)	4	—	—
14	实验组 (层析洗脱物/CFA)	4	—	1:69
	对照组 (CFA/NS)	4	—	—
	McAb CH-A9*		—	1:128
	SP2/O*		—	—

*腹水,重复二遍。

讨 论

本文用抗HSV-2型特异性McAb CH-A9作亲和层析,在HSV-2感染BHK细胞膜上纯化出一种分子量为30,000的HSV-2特异的蛋白(VP30),其主要特性有:(1)分子量比较小;(2)是HSV-2型特异性抗原;(3)能在小鼠体内诱导HSV-2型特异性中和抗体。由于HSV囊膜蛋白与细胞内膜连接并嵌于感染细胞膜上^[15],所以VP30可能是HSV-2囊膜蛋白。

McAb用作分子探针,以分析病毒的抗原结构,已有广泛的报道。应用McAb作亲和层析,从复杂的混合抗原中,将所需抗原一步提纯至电泳均一纯度,并获得足够量的抗原作免疫学研究之用。因此,该法是纯化单一抗原组分的好方法。

一个分子量较小而具有型特异性的HSV-2结构蛋白,对于HSV两个血清型的区分,可能是有意义的。这一结果提示,HSV-1与HSV-2结构蛋白在组成上有所不同。VP30可在小鼠体内诱发中和抗体,提示其为HSV的中和抗原。因而,继续探讨其生化和免疫特性,对HSV结构蛋白及亚单位疫苗组份的研究,均是有益的。

参 考 文 献

- [1] Roizman, B et al., 1974, in *Comprehensive Virology*, Vol. 3., Plenum Press, NY, p.229.
- [2] Spear, P.G., 1976, *J. Virol.*, 17: 991.
- [3] Bauke, B and Spear, P.G., 1979, *J. Virol.*, 32: 779.
- [4] Eberle, R and Courtney, R.F., 1980, *J. Virol.*, 35: 665.
- [5] Cohen, G.H et al., 1978, *J. Virol.*, 27: 172.
- [6] 高谦等, 1985, 中华微生物学和免疫学杂志, 5: 232.
- [7] 高谦等, 1985, 解放军医学杂志, 10: 91.
- [8] 安献禄等, 1984, 解放军医学杂志, 9: 241.
- [9] 高谦等, 1985, 上海免疫学杂志, 5: 363.
- [10] Svennerholm, B et al., 1984, *J. Clin. Microbiol.*, 19: 235.
- [11] Greenwood, F.C et al., 1963, *Biochem. J.*, 33: 114.
- [12] 王见南等, 1985, 中华微生物学和免疫学杂志, 5: 59.
- [13] 马文煜等, 1984, 第四军医大学学报, 5: 63.
- [14] Marsden, H.S et al., 1978, *J. Virol.*, 28: 624.
- [15] Rager-Zisman, B and Bloom, B.R., 1974, *Nature*, 251: 542.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF 30,000-DALTON STRUCTURAL PROTEIN INDUCED BY HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE-2

Qin Ke-feng, Wang Mei-xian, Jiang Shao-zun, Ma Wen-yu
(Department of Microbiology, 4th Military Medical College, Xian)

A 30,000-dalton structural protein (VP30) on herpes simplex virus type-2 (HSV-2) -infected BHK cell membranes was purified with an immunoadsorbent column consisting of the HSV-2 type-specific monoclonal antibody (McAb) CH-A9 coupled to Sepharose 4B. The Evidence shows that the VP30 has some properties as follows: First, its molecular weight determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) is 30,000. Second, the structural protein is HSV-2 type-specific antigen showed by indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). And third, it can induce HSV-2 type-specific neutralizing antibody in mice.