

13-17

1675(3)

不同感染状态下 EB 病毒核抗原亚型表达的研究

詹德进*

(广州医学院化学致癌研究所, 广州 510182)

陈剑经

(中山医科大学肿瘤研究所, 广州 510060)

R373.9

A

提要 本实验用免疫印迹法纯化的抗 EBNA 亚型抗体, 结合显微荧光分光光度检测技术, 检测在不同感染状态下, 三种亚型 EBNA 抗原在细胞中的表达程度。结果表明, 处于潜伏感染状态下的 Raji 细胞 EBNA-1 表达量较大, 经巴豆油和正丁酸诱导进入钝挫感染状态后 EBNA-1 表达减少, 而 EBNA-2 的表达增强。B₉₅₋₁ 细胞也有相似的趋势, 表明 EB 病毒的激活可能与不同 EBNA 亚型表达量的改变有关。

关键词 EB 病毒核抗原, 免疫印迹, 抗体纯化, 抗原定量 抗体, 提纯;

早期的研究显示^[1], EBV 潜伏性感染细胞(如 Raji 细胞), 在诱癌剂佛波酯(TPA)和化学诱导剂正丁酸的作用下, 可进入钝挫感染状态, 细胞在早期抗原表达的同时, 伴有核抗原(EBNA)表达量的变化。最近的研究表明^[2], TPA 通过诱导细胞合成抗 EBNA-1 蛋白, 使 EBV 激活, 进入产病毒循环。本实验利用免疫印迹法纯化制备的抗 EBNA 亚型抗体, 结合显微荧光分光光度定量技术, 检测在不同感染状态下, 细胞中三种亚型 EBNA 抗原的表达程度, 以了解 EBNA 亚型与 EBV 激活之间的关系。

材料与方方法

- 1 细胞** Raji, P, HR-1 细胞和 B₉₅₋₁ 细胞均带有 EBV 基因, CNE2 细胞不带有 EBV 基因, 4 株细胞均用含 10% 小牛血清的 1640 培养基培养。EBV 的激活是在细胞培养 24 小时后, 培养基内加入终浓度为 400 μ g/ml 巴豆油和 4mmol/L 正丁酸, 再培养 48 小时后收获。
- 2 血清** 抗 EBNA 阳性血清的抗 EBNA 滴度 1:640, 阴性对照血清的抗 EBNA 滴度为 <1:5。
- 3 免疫印迹及抗 EBNA 亚型抗体的制备** 正常培养的 Raji 细胞收获后, 参照 Strnad^[3] 和 Rhode^[4] 的方法制备电泳样品。电泳采用 SDS-PAGE, 分离胶浓度为 7.5%。制备电泳的上样量为相当于 8×10^7 个 Raji 细胞的样品。电泳后, 用电印迹法把蛋白质转印到硝酸纤维素膜(NC 膜)上, 经封闭液(含 6% 脱脂牛奶, 1% SDS 的磷酸缓冲液)封闭 15', 在 NC 膜的一侧垂直切下约 1cm 宽的长条, 与抗 EBNA 阳性血清作间接免疫荧光反应。第二抗体为 FITC 标记的羊抗人 IgG 抗体。在中短波紫外线照射下观察反应结果。以此确定了各种 EBNA 亚型的分布位置后, 把余下 NC 膜中含同一亚型 EBNA 的区段水平切下。这些 NC 膜与抗 EBNA 阳性血清 37 $^{\circ}$ C 孵育 30' 后, 用酸性洗脱液(0.1mol/L 甘氨酸-HCl, pH2.2, 20mmol/L MgAc, 50mmol/L KCl, 1% 脱脂牛奶)把吸附的抗体从 NC 膜上洗脱下来, 立即用 1N NaOH 中和至 pH7.0~7.5, 经低温真空干燥浓缩。

本文于 1993 年 1 月 11 日收到, 8 月 16 日修回

* 现在通讯地址: Dr. Zhan Dejin, HFT-110, National Center for Toxicological Research, 3900 NCTR drive, Jefferson, AR. 72079 U. S. A

4 抗补体免疫荧光反应及显微荧光定量测定(简称 ACIF-MSP) 参照 Ernberg 的方法进行^[1],经甲醇固定的细胞涂片与不同的抗 EBNA 亚型纯化抗体作 ACIF 反应,阴性对照用磷酸缓冲液(PBS)代替抗体。补体源来自新鲜输血员血清(抗 EBNA 滴度 $<1:2$),加 5 倍体积的 10%葡萄球菌蛋白(SPA)菌体,在冰浴中振荡 1 小时,再以 4000 转/分离心去沉淀后,即为已去除大部分 IgG 的补体源^[2]。第二抗体为 FITC 标记兔抗人补体 C₃ 抗体。ACIF 反应后,在 OPTON-03 型显微荧光分光光度计下测量细胞核的荧光强度。滤光片系统为 BP 400~440nm,FT 460nm,LP 470nm,物镜为 40 倍,测光靶选 0.32。测量程序为 CYFLAN TO3(细胞荧光分析程序),测量过程及数据处理由计算机控制。每批实验随机检测 50 个细胞,每个细胞测量 20 次,取其平均值。以细胞核检测值减去无细胞的背景非特异性荧光检测值为实际检测结果。每个项目重复 3~5 次实验,合并重复实验的结果,并用 IBM-AT 微机进行统计方差分析。

结 果

1 用免疫印迹法检测 EBNA 亚型

作免疫印迹的 Raji 细胞的全细胞蛋白样品和阴性对照血清作间接免疫荧光反应的 NC 膜均未见明显的免疫荧光条带。而与阳性血清反应的 NC 膜,可见约 8~9 条免疫荧光条带(图 1),其分布范围与有早期抗原、壳粒原表达的 B₉₅₋₈ 细胞的免疫印迹结果不同。依据国外多个实验室所报道的实验结果^[6],本实验检测出 Raji 细胞所表达的 EBNA 亚型分别为 EBNA-1 (70kD)、EBNA-2 (84kD) 和 EBNA-3 (130kD)。

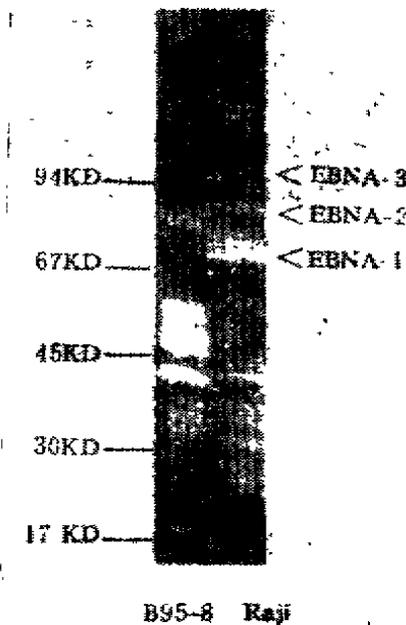


图 1 Raji 和 B95-8 细胞经免疫印迹后,与抗 EBNA 阳性血清作间接免疫荧光反应的结果

Fig. 1 The results of indirect immunofluorescence reaction of Raji and B95-8 cell with anti-EBNA positive sera after immunoblotting

图左的数字为标准蛋白分子量,箭头所指为各亚型 EBNA 抗原区带
The numbers on left show the molecular weights of standard protein, arrows indicate antigen bands of various subtype of EBNA.

2 纯化抗体的稀释曲线

用免疫印迹法制备的人抗 EBNA-1、抗 EBNA-2、抗 EBNA-3 及用不含有 EBNA 抗原的 NC 膜同时作纯化制备的纯化对照,在不同稀释度下,与 Raji 细胞作 ACIF-MSP 检测,得出它们的稀释曲线(图 2)。结果显示,三种抗 EBNA 亚型纯化抗体(原液)的 ACIF-MSP 测量值明显高于阴性对照组($P < 0.001$),经稀释 4~8 倍后,其测量值接近阴性对照组。而纯化对照组(原液)的测量值与阴性对照无显著差异($P > 0.05$)。提示三种纯化抗体内确实含有抗 EBNA 抗体。由于纯化抗体的浓度较低,它们的稀释曲线未能见到饱和区段。

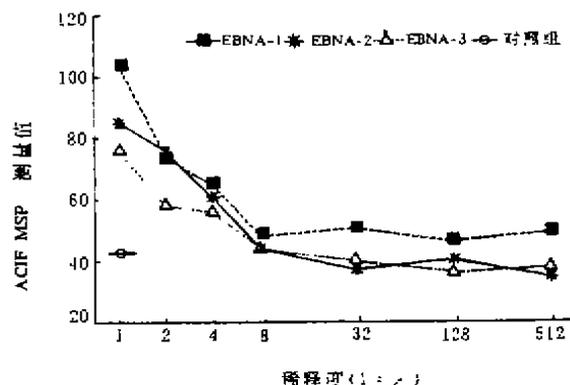


图 2 抗 EBNA 亚型纯化抗体的稀释曲线

Fig. 2 The dilution curves of three kinds of purified antibody of EBNA

3 细胞核 EBNA 的 ACIF-MSP 定量检测

用三种抗 EBNA 亚型纯化抗体, 分别与经过或没有经过巴豆油和/或正丁酸诱导的 Raji、B₉₅₋₈、P₃HR-1 和 CNE2 细胞涂片作 ACIF-MSP 测定。结果显示(图 3), 处于产病毒感染状态下的 B₉₅₋₈、P₃HR-1 细胞 EBNA-3 的表达量较大。而处于潜伏感染状态下的 Raji 细胞则 EBNA-1 的表达量较大。经巴豆油和正丁酸诱导进入钝挫感染状态的 Raji 细胞 EBNA-1 表达明显减少, 而 EBNA-2 的表达增高 ($P < 0.01$)。B₉₅₋₈ 和 P₃HR-1 细胞经巴豆油和正丁酸诱导后, 也可见相似的趋势 (P₃HR-1 细胞无 EBNA-2 表达)。单独用巴豆油处理 Raji 细胞, 即可使 EBNA-1 表达降低, 而 EBNA-2 表达增强则是巴豆油和正丁酸共同作用的结果。EBNA-3 经巴豆油和/或正丁酸诱导前后在不同细胞株的表达量的变化, 尚未发现明显的规律性。三种 EBNA 亚型表达量的变化之间也未见有相关性。三种抗 EBNA 亚型纯化抗体与没有携带 EBV 基因的 CNE2 细胞反应结果与阴性对照组相似 ($P > 0.05$)。

讨 论

本实验用免疫印迹法制备的抗体, 具有抗 EBNA 的特异性, 它们只与携带 EBV 基因、并有 EBNA 表达的细胞株反应, 和 EBV 阴性的细胞株 (如 CNE2) 不起免疫荧光反应。由于纯化抗体的浓度较低, 其原液的稀释曲线仍未达到饱和状态, 故 ACIF-MFP 检测值并不易确切地反映该抗原在细胞内的实际表达量, 但在相同的反应和检测条件下, 可比较同一抗原在不同细胞中表达量的差异。

本实验表明, 处于潜伏感染状态的 Raji 细胞 EBNA-1 表达量较高, 这与其维持 EBV-DNA 游离状态的作用有关。经过巴豆油或/和正丁酸诱导后, EBNA-1 的表达量明显降低, 这可能是促使 EBV 从潜伏感染状态进入复制状态的主要因素。巴豆油中含有 TPA, 最近 Wen 的实验^[2]表明 TPA 能诱导细胞产生抗 EBNA-1 蛋白, 该蛋白与 EBNA-1 竞争 EBV-DNA BamHI-C 片段上的 OriP 位点, 使 EBV 由潜伏感染状态进入复制状态。本实验用巴豆油和正丁酸诱导 Raji 和

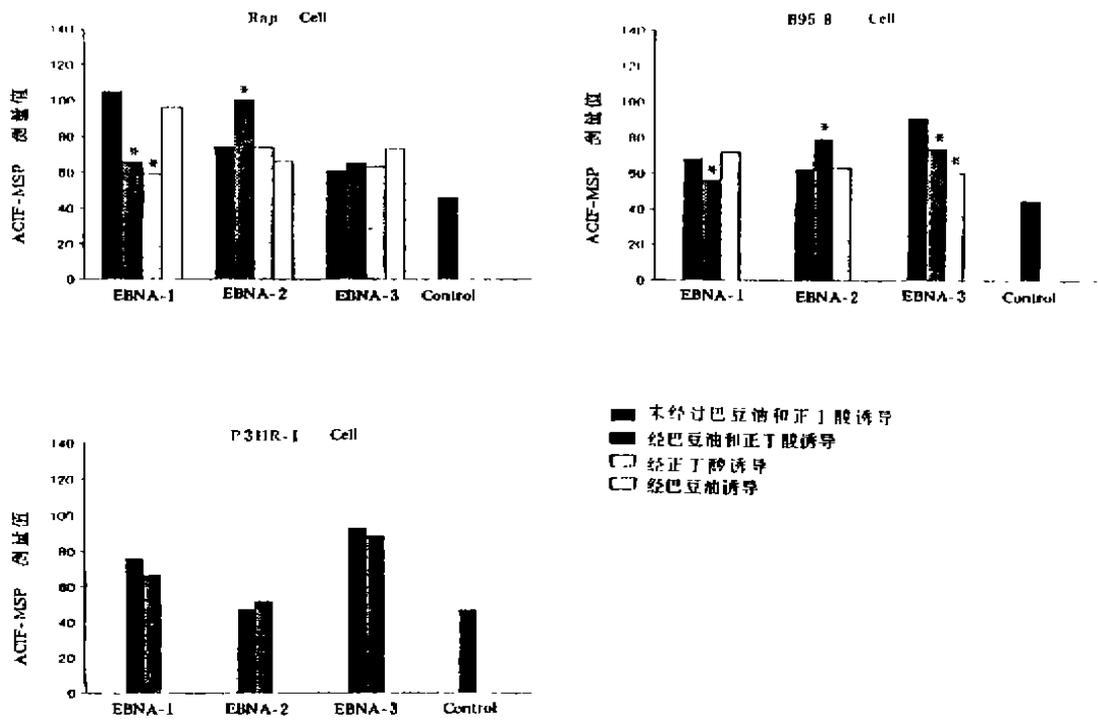


图3 经过巴豆油或/和正丁酸诱导的 Raji, B95.8和 P₃HR-1 细胞亚型 EBNA 表达量的变化
* 表示诱导前后 EBNA 表达量变化有显著差异 (P < 0.01)

Fig. 3 The variation of EBNA's expression before and after induction by croton oil and/or n-Butyrate

B_{95.8}细胞,还观察到 EBNA-2 的表达显著增高。EBNA-2 现在被认为是 EBV 转化人类 B 淋巴细胞的关键因素^[7]。P₃HR-1 和 Daudi 型 EBV 就是因为缺失编码 EBNA-2 的基因而失去转化 B 细胞的能力。巴豆油和正丁酸有促进 EBV 对人类 B 淋巴细胞的转化作用,这可能与巴豆油和正丁酸能诱导 EBNA-2 的表达增高有关。EBNA-3 在产病毒状态的细胞中表达量较大,是否与产病毒循环有关尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Ernberg I, Andersson-Anvret M, and Klein G. Relationship between the amount of Epstein-Barr virus determined nuclear antigen/cell and the number of EBV-DNA copies. *Nature*, 1977;266:269
- 2 Long-thung Wen, Akiko Tanaka, Meihan Nonoyama. Induction of anti EBNA-1 protein by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Ac etate treatment of human lymphoblastoid cells. *J Virol*, 1989;68:3315
- 3 Strnad B C, Schuster T C, Hopkins R F, et al. Identification of an Epstein-Barr virus nuclear antigen by fluorocimmuno electrophoresis and radioimmuno-electrophoresis. *J Virol*, 1981;38:997
- 4 Rhodes G, Rumpold H, Kurki P, et al. Autoantibodies in infectious mononucleosis have specificity for the glycine-alanine repeat- ing region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen. *J Exp Med*, 1987;165:1026
- 5 戴华生. 新实验病毒学. 中国学术出版社. 1983:306
- 6 黄平. Epstein-Barr 病毒核抗原的研究进展. *癌症*, 1990;9(4):330

- 7 Skare J, Farley J, Strominger J L, *et al.* Transformation by Epstein-Barr virus requires DNA sequence in the region of BamHI-Y and-H fragments. *J Virol*, 1985,55:286

Study on Expression of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigens in Various Infected States of Cells

Zhan Dejin* Chen Jianjing**

* (*Institute for Chemical Carcinogenesis, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182*)

** (*Cancer Institute, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060*)

By microspectrophotometer quantitation, the expressing level of three kinds of EBNA_s were detected with anti-EBNA antibodies purified from human serum by Western blotting method. The results showed that EBNA-1 expressed greatly in latently infected Raji cell. When they were got into abortedly infected state treated with croton oil and n-Butyrate, the expression level of EBNA-1 decreased and that of EBNA-2 increased. B₉₅₋₃ cell had a similar variation. It suggests that the activation of EB virus might associated with the expression level of EBNA_s.

Key words Epstein-Barr virus nuclear antigen(EBNA), Immunoblotting, Antibody purification, Antigen quantitation