

## 狂犬病毒核蛋白(NP)的纯化及其免疫原性的研究

苏焱, 王继麟\*, 杨想平, 薛红刚, 朱家鸿

(武汉生物制品研究所基因工程室, 湖北武汉 430060)

### Study on Purification and Immunogenicity of Rabies Virus Nucleoprotein

SU Yan, WANG Ji-lin, YANG Xiang-ping\*, XUE Hong-gang, ZHU Jia-hong

(Wuhan Institute of Biological Products, Wuhan, 430060, China)

**Abstract:** In order to establish the optimum condition for purification of the nucleoprotein(NP) of rabies virus by immunoaffinity chromatography, the efficient and non-denaturative eluents(Mg-el) was obtained by using ELISA elution model; furthermore, it didn't damage the activity of NP. Two kind of NPs, expressed by recombinant vaccinia virus (rVac-N) and recombinant baculovirus (BRN), were purified by a Sepharose CL 4B column and a 2C12-Sepharose 4B column. By Western-blot and SDS-PAGE, high purity and good antigenical intact NPs were identified. The purified ribonucleoprotein (RNP) of rabies virus 5aG strain was also obtained. After immunized with NP and RNP, mice developed a strong anti-nucleoprotein response and were protected against a lethal challenge of rabies virus CVS strain. There were not difference been observed among the mice immunized with different purified protein. These data indicate that the NPs are antigenical and immunogenic comparable to the authentic rabies RNP and therefore present a potential source of an effective, safe and economical subunit vaccine.

**Key word:** Rabies virus nucleoprotein; Gel Filtration Chromatography; Immunoaffinity Chromatography.

**摘要:**对重组痘苗病毒和重组杆状病毒表达的狂犬病毒 NP 及原代地鼠肾细胞培养的狂犬病毒核衣壳蛋白(RNP), 先经 Sepharose CL 4B 分子筛柱初步提纯, 再以抗狂犬病毒 NP McAB 2C12-Sepharose 4B 亲和层析柱纯化分离, 经 ELISA, SDS-PAGE 电泳和 Western-Blot 分析证实, 获得了高纯度和免疫反应性的 NP 和 RNP。以相同剂量的纯化蛋白免疫小鼠, RNP 和两种重组 NP 均可诱生特异的抗 NP 抗体, 三种蛋白间无明显差异; 狂犬病毒 CVS 株攻击保护实验结果显示, 三种蛋白免疫的小鼠存活率约为 50%; 两种重组 NP 的免疫反应性和免疫原性与天然狂犬病毒 RNP 相似。

**关键词:**亲和层析; 分子筛层析; 狂犬病毒核蛋白

**中图分类号:**S852.655 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5125(2001)01-0064-04

狂犬病毒(Rabies virus, RV)是单链,不分节段的负链 RNA 病毒,其基因组编码 NP、M1P、M2P、GP、LP 等五种结构蛋白<sup>[1]</sup>。其中 NP、M1P 和 LP 与病毒 RNA 一起形成核衣壳(RNP)复合物。GP

是唯一能诱生中和抗体的蛋白,在保护性免疫中起主要作用,但在各型之间变异较大;与 GP 相比, NP 的稳定性高,在固定毒株和野毒株之间变异较小。有研究表明,除了 GP 外, NP 对小鼠的 RV 外周攻

收稿日期:1999-12-23, 修回日期:2000-02-21

作者简介:苏焱(1973-),男,硕士,研究方向为分子免疫学和分子病毒学。

\* 通讯作者:王继麟(1959-),男,副研究员,研究方向为分子免疫学和分子病毒学。For correspondence

击亦有保护作用,它可以诱生 T 细胞免疫并激活 B 细胞产生抗体<sup>[2-3]</sup>。然而,目前对 NP 的研究远远少于 GP。本试验通过分子筛层析和亲和层析对 RV5aG 株 RNP, 重组痘苗病毒(rVac-N)和重组杆状病毒(BRN)表达的 RV NP 进行了纯化。对纯化产物的特异性和纯度进行鉴定,并对三种纯化蛋白的免疫原性和免疫保护作用进行了比较。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒与细胞

感染 RV 的原代地鼠肾细胞由本所狂苗生产车间提供;表达 RV-NP 和 RV-GP 的重组痘苗病毒(rVac-N 和 rVac-G)由本室构建;表达 RV-NP 的重组杆状病毒(BRN)由美国堪萨斯州立大学付振芳博士惠赠;昆虫细胞 SF9 由上海生化所提供;原代鸡胚成纤维细胞(CEF),用 9~10 日龄鸡胚按常规方法制备;RV-CVS 株由中国生物制品检定所提供。

### 1.2 单抗

抗 RV-NP 单克隆抗体(McAb)2C12 株、抗 RV-GP McAb 5C2 株以及 HRP 标记 2C12 株和 5C2 株 McAb 由本室徐葛林副教授提供。

### 1.3 其他

CNBr 活化的 Sepharose 4B、Sepharose CL 4B 购自 Pharmacia 公司,健康昆明小鼠和受精鸡胚由本所动物中心提供。

### 1.4 细胞培养及病毒制备

常规方法制备 CEF 和培养 SF9 细胞待基本成片,分别感染 rVac-N、rVac-G 和 BRN,前者于 37℃ 培养 2 d,后者于 27℃ 培养 4 d,收获细胞。10 mmol/L PBS(pH7.2)洗三次,冰浴超声处理 30 s(50% 最大功率)后,5 000 r/min 离心 30 min,收上清-20℃ 冻存备用。5aG 株 RV 感染的地鼠肾原代细胞及正常 CEF 细胞和正常 SF9 细胞同法处理。正常细胞处理液为阴性对照抗原。

### 1.5 分子筛层析纯化蛋白及纯化产物的鉴定

选用 Sepharose CL 4B 柱(柱长 60 cm、内径 30 mm、柱床体积 135 cm<sup>3</sup>、流速 2.5 mL/min,洗脱液 50 mmol/L PBS, pH7.2)在 FPLC 系统上分别对三种感染病毒的细胞处理液进行分离纯化,分峰收集产物。夹心 ELISA 测各收集峰的 NP 和 GP 滴度。-20℃ 冻存。

### 1.6 亲和层析纯化蛋白及纯化产物的鉴定<sup>[4]</sup>

1.6.1 将 2C12 株 McAb 偶联于 CNBr 活化的

Sepharose 4B,制成 2C12-Sepharose 免疫亲和层析柱,以 50 mmol/L PBS(pH7.2)平衡后,分别将分子筛层析后 NP 滴度最高的收集峰样品,以 0.5 mL/min 流速上样,4℃ 循环过夜。层析柱用 50 mmol/L PBS(pH7.2)冲洗未结合的抗原和杂蛋白至平衡液 280 nm 的吸光度 A 值 < 0.05。用洗脱缓冲液 3 mol/L MgCl<sub>2</sub> 0.075 mol/L NaOH/Hepes 25% 乙二醇(pH 7.2)以 0.5 mL/min 流速洗脱,收集活性峰。置于透析袋中以 50 mmol/L PBS(pH7.4)透析过夜,用 PEG 20 000 浓缩,分装后置 -70℃ 冷冻备用。

1.6.2 SDS-PAGE 和 Western-Blot 选用 10% 分离胶和 6% 浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳,经考马斯亮蓝染色或转移到硝酸纤维素膜,对亲和层析产物进行特异性和纯度鉴定<sup>[5]</sup>。

1.6.3 夹心 ELISA 测纯化产物中的 GP 活性

### 1.7 动物试验

将 10~12 g 雄性昆明小鼠分为 6 组,1 至 3 组按 10 μg/只,剂量分别皮下注射三种纯化蛋白,7 d 后同样剂量加强。第 4 组以 RNP 初免,7 d 后以 RV-GP 加强,第 5 组仅于第 7 天以 GP 免疫,第 6 组以 RV-GP 初免,7 d 后 GP 加强,第 7 组为正常对照。以上各组 RNP 剂量均为 10 μg/只/次,GP 剂量为 5 × 10<sup>5</sup> pfu/只/次。1 至 3 组免后 2、3、4、5、6、7 周眼眶采血,每次每组三只,混合血清。以纯化的 rVac-NP 包板,间接 ELISA 测抗 N 抗体滴度。

1、4~6 组小鼠免后 21 d 以 0.3 mL 10 IMLD<sub>50</sub> CVS 株狂犬病毒鼠脑悬液肌肉攻击。第 4 天起观察并记录发病死亡情况,至 14 d。

## 2 结果

### 2.1 分子筛层析对病毒抗原的纯化和纯化产物的鉴定

应用 Sepharose CL4B 和 FPLC 系统对三种感染病毒的细胞处理液纯化,三种细胞处理液均有 3 个明显的收集峰,以夹心 ELISA 检测各峰 NP 和 GP (表 1)。结果表明峰 1、6、9 NP 活性最高,但峰 1 含有 GP,峰 3GP 含量最高。

### 2.2 免疫亲和层析纯化病毒抗原

应用 C2A2-Sepharose 4B 免疫亲和层析柱,分别对三种分子筛层析分离纯化 NP 活性最高的收集峰进行纯化,均得一单窄的洗脱峰。

### 2.3 对纯化产物的纯度和特异性鉴定

纯化的 rVac-NP 和 BRN-NP 经 SDS-PAGE 分

表1 分子筛层析纯化产物的NP/GP活性

Table 1 The activity of NP/GP purified by the Sepharose CL 4B column

收集峰 sample	NP 稀释(1:) NP eluents		GP 稀释(1:) GP eluents	
	16	64	16	64
1	0.921	0.64	0.28	0.22
2	0.35	0.21	0.47	0.37
3	0.31	0.18	0.58	0.39
4	0.14	0.14		
5	0.31	0.25		
6	0.97	0.66		
7	0.11	0.09		
8	0.28	0.20		
9	0.85	0.54		
NC1	0.02	0.01	0.12	0.09
NC2	0.01	0.01		
NC3	0.01	0.05		
PC1	1.15	0.86	0.84	0.62
PC2	1.07	0.72		
PC3	0.96	0.51		

1, Mean A490nm of the parallel wells; NC1, 1% BSA; NC2, CEF cell lysate; NC3, SF9 cell lysate; PC1, 5aG strain rabies infected BHK cell; PC2, rVac-N infected CEF cell; PC3, BRN infected SF9 cell.

析,结果仅显一分子量约为 50 kD 左右的蛋白条带,与狂犬病毒 NP 分子量大小一致<sup>[1]</sup>,结果见图 1。纯化的重组蛋白经 Western-Blot 证明为 NP,结果见图 2。

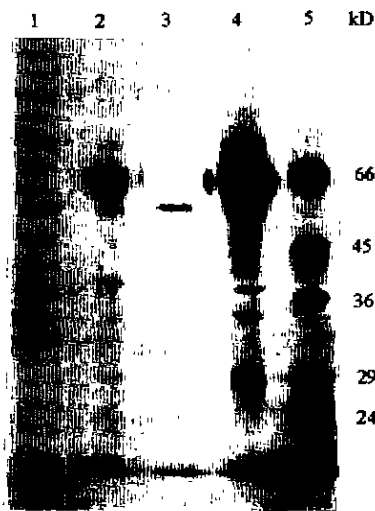


图1 SDS-PAGE 检测纯化产物纯度

Fig 1 Purified NP detected by SDS-PAGE

1, Purified rVac-NP; 2, rVac infected CEF cell lysate; 3, Purified BR-NP; 4, BRN infected SF9 cell lysate; 5, Molecular weight standard.

以 ELISA 检测纯化的 RNP 中残留的 GP,结果见表 2,纯化 RNP 不含有 GP 成分。

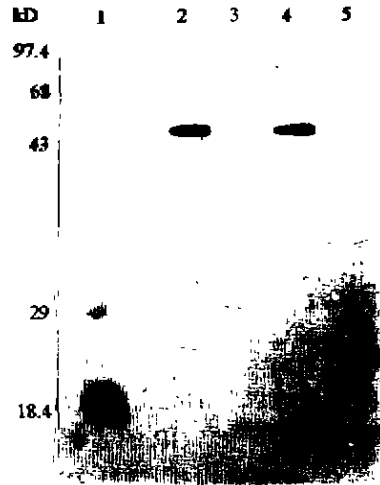


图2 Western-blot 检测纯化 NP

Fig. 2 NP detected by Western-blot

1, Molecular weight standard; 2, Purified rVac-NP; 3, CEF cell lysate; 4, Purified BR-NP; 5, SF9 cell lysate

2.4 小鼠血清特异的抗-NP 抗体检测

间接 ELISA 对血清抗-NP 抗体的检测结果见表 3。相同量的三种 NP/RNP 免疫小鼠所诱生的抗 NP 抗体水平接近,均在第 3,4 周达到峰值,免后 5 周开始下降。结果经 Fisher's 精确检验,在  $\alpha = 0.05$  水平,三者间无显著性差异。

表2 ELISA 检测纯化 RNP 的残留 GP

Table 2 The GP activity of purified RNP

样品 sample	抗原稀释度 antigen eluents	
	2 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>
纯化蛋白(RNP)	0.08 <sup>*</sup>	0.06
NC	0.05	0.07
PC	0.94	0.67

\* Mean A490nm of the parallel wells; NC, 1% BSA; PC, 5aG strain rabies infected BHK cell.

表3 三种 NP/RNP 诱生小鼠特异性抗 NP IgG 抗体动态观察

Table 3 The levels of special anti-NP IgG antibody in mice serum

抗原 antigen	免疫时间(周) weeks					
	2	3	4	5	6	7
RV-RNP	1.71 <sup>*</sup>	2.70	2.91	2.31	1.15	0.65
rVac-NP	1.69	2.36	2.42	1.97	1.02	0.49
BRN-NP	1.73	2.51	2.17	1.54	1.08	0.55

\* Mean A490nm of the parallel wells

2.5 攻击保护实验结果

用三种纯化蛋白免疫小鼠后,以 CVS 株狂犬病毒攻击实验结果见表 4。三种蛋白以 10  $\mu$ g/只剂量

免疫小鼠,对 CVS 病毒攻击均有约 50% 保护率,在  $\alpha=0.05$  水平,与对照组有显著性差异。以 RNP 初免 GP 加强(第 4 组)小鼠存活率高于相应的对照组(第 5 组)。

表 4 免疫小鼠攻击实验结果

Table 4 The result of immunized mice challenged by CVS

组别 group	初免抗原 primer	加强抗原 boost	小鼠数 amount	存活数 survive amount	存活率 % survive rate
1	RV-RNP	RV-RNP	10	5	50
2	rVac-NP	rVac-NP	10	5	50
3	BRN-NP	BRN-NP	10	5	50
4	RV-RNP	RV-GP	10	9	90
5		RV-GP	10	7	70
6	RV-GP	RV-GP	10	10	100
对照			10	0	0

### 3 讨论

本实验以分子筛层析和亲和层析对 5aG 株 RV-RNP、rVac-NP 和 BRN-NP 进行纯化分离,获得了高纯度、高免疫反应性的的纯化蛋白,并对三种 NP 的免疫学特性进行了初步研究,结果表明,三种 NP 在诱生小鼠抗 N 抗体和免疫保护方面无明显差异。

选用分子筛层析分别对三种 NP 进行了初步纯化,5aG 株狂犬病毒 NP 的聚合物 RNP 的分子量较大,最先流出;另两种来源的 NP 为单体,均最后流出。以 2C12-Sephrose 4B 亲和层析柱分别对三种 NP 进行第二次纯化,均得到一个单窄的收集峰。纯化产物的 SDS-PAGE 电泳结果表明,rVac-NP 和 BRN-NP 纯度较高;Western-Blot 结果表明两种纯化蛋白均与抗 NP 的单抗反应,且二者无明显差异。因 RNP 的分子量较大,无法进行 SDS-PAGE 电泳和 Western-Blot 检测,ELISA 表明纯化后的 RNP 已无狂犬病毒 GP 成分。

国内外只有 Fu 以纯化的 BRN-NP 对 NP 的免疫原性和免疫反应性进行分析,其余的研究都使用未经纯化的感染(重组)病毒的细胞裂解液<sup>[6-7]</sup>。本实验在国内外首次对三种纯化的狂犬病毒 NP/RNP 的免疫原性进行比较。动物实验结果显示三

种纯化蛋白均可诱生小鼠特异的抗 NP 抗体,并在第 3、4 周达到峰值,三者之间无明显差异;三种纯化蛋白免疫的小鼠对 CVS 株狂犬病毒攻击均有约 50% 的保护率;结果说明,重组 NP 和天然 RNP 在免疫反应和免疫原性上没有差异;NP/RNP 在免疫保护方面有一定的作用。

众所周知,基因重组技术已日趋成熟,而重组蛋白的安全性是限制其实际应用的一个重要因素。要将基因重组的表达产物和其他的一些生物制品转化成安全有效的产品,关键是蛋白质的纯化,因而基因工程下游技术日益受到重视。液相色谱技术是目前蛋白质纯化的最有效和最常用的方法,本文在这一方面进行了一些有益的尝试,在国内首次获得了纯化的狂犬病毒 NP,为进一步研究 RV-NP 免疫保护机制、致病机理及研制 RV 亚单位疫苗和基因工程疫苗奠定了基础。

致谢:本研究得到法国安万特·巴斯德公司的部分资助,特此致谢。

### 参考文献

- [1] Tordo N, Poch O, Ermine A. Completion of rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the N proteins of the unsegmented negative-strand RNA virus [J]. *Virology*, 1988, 165:565 - 576.
- [2] Donald L, Lodmell J, Esposito LC. Cross-protection of mice against a global spectrum of rabies virus variants [J]. *J Virol*, 1995, 69:4957 - 4962.
- [3] Fujii H, Takita-Sonoda Y, Mifune K. Protective efficacy in mice of post-exposure vaccination with vaccinia virus recombinant expressing either rabies virus glycoprotein or nucleoprotein [J]. *J Gen Virol*, 1994, 75:1339 - 1344.
- [4] 彭秀玲,袁汉英,谢毅.基因工程实验技术[M](第二版),长沙:湖南科学技术出版社,1997.
- [5] 金冬雁,黎孟枫,译.分子克隆实验指南[M](第二版),北京:科学出版社,1992.
- [6] Fu ZF, Dietzschold B, Schumcher CL. Rabies virus nucleoprotein expressed in and purified from insect cell is efficacious as a vaccine [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 2001 - 2005.
- [7] 朱家鸿,王继麟,蔡兵,等.表达狂犬病毒不同蛋白的重组痘苗病毒的免疫原性和致病性[J]. *中国病毒学*, 1996, 11(增刊):5 - 11.