

免疫亲和层析纯化类猪圆环病毒 P1

温立斌¹ 何孔旺¹ 解建平¹ 杨浩² 周建新² 金全胜² 王玉然²

(1. 江苏省农业科学院 兽医研究所 农业部兽用生物制品工程技术重点实验室 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014; 2. 河北省动物卫生监督所 河北 石家庄 050081)

摘要: 通过免疫亲和层析对类猪圆环病毒因子 P1 纯化进行了研究。采用环氧活化及 NHS 活化的琼脂糖凝胶, 与兔抗 P1 表位肽抗体偶联, 对 P1 进行了免疫亲和吸附, 通过电镜技术证实获得了纯化病毒。结果表明, 免疫亲和层析是有效的 P1 病毒纯化方法。

关键词: 类猪圆环病毒因子 P1; 纯化; 免疫亲和层析

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)增刊-0397-03

Purification of Porcine Circovirus-like Agent P1 with Immuno-affinity Chromatography

WEN Li-bin¹, HE Kong-wang¹, XIE Jian-ping¹, YANG Hao²,
ZHOU Jian-xin², JIN Quan-sheng², WANG Yu-ran²

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture, National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China; 2. Hebei Animal Health Inspection, Shijiazhuang 050081, China)

Abstract: This study deals mainly with porcine circovirus-like agent P1 antigen purified by immuno-affinity chromatography. The purified P1 virus, which came from elution buffers from adsorption column coupled anti-P1 epitope-containing peptide antibody to either Epoxy-activated agarose or NHS-activated agarose, was confirmed by transmission electron microscopic observations. The study suggests that purified P1 antigen by immuno-affinity chromatography is an effective way.

Key words: Porcine circovirus-like agent P1; Purification; Immuno-affinity chromatography

类猪圆环病毒 P1 基因组为单股、环状 DNA, 全长为 648 个核苷酸, 大部分核苷酸序列与引起猪圆环病毒相关疾病 (PCVAD) 的猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 的高度同源^[1-3]。在 PCVAD 中, 临床最常见的是猪断奶后多系统衰竭综合征 (PMWS), 其于 1991 年首次发生在加拿大, 主要发生于 5~12 周龄的断奶仔猪, 以临床出现进行性消瘦、皮肤苍白、呼吸困难等症状为特征, 体表淋巴结, 特别是腹股沟浅淋巴结肿大^[4-6]。PMWS 已成为当今危害我国乃至世界养猪生产的重要免疫抑制性疫病之一^[7-8]。PCV2 分类地位属于圆环病毒科成员, 是迄今发现的一种最小的动物病毒。多数研究表明, 单独用

PCV2 感染很难复制出典型的 PMWS 临床症状, 不同的 PCV2 基因型、共感染、免疫刺激、猪的品种及日龄等因素在促发 PMWS 发生中起重要作用。我们在送检疑似 PMWS 的血清样品中, 不仅证实 PCV2 具有多种基因型^[9], 而且还存在类猪圆环病毒 P1。前期研究表明, 构建的 P1 基因组的双拷贝串联分子克隆在体外和体内具有感染性, 表现为可在转染的 PK15 细胞中形成胞浆和胞核包涵体; 感染猪在临床上出现类似 PMWS 症状, 即部分感染猪出现消瘦和贫血等现象^[10-13]。流行病学调查结果表明, 该因子在我国猪群中已有相当范围的感染^[14]。本试验主要对 P1 分子克隆转染细胞获得的

收稿日期: 2013-07-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272574); 江苏省农业科技自主创新资金项目 (CX(11)2060)

作者简介: 温立斌 (1967-), 男, 河北宣化人, 研究员, 博士, 主要从事动物分子病毒学与免疫学研究。

拯救毒,通过免疫亲和层析技术进行了形态学研究。

1 材料和方法

1.1 分子克隆和细胞

P1 双拷贝串联的分子克隆及其表位肽抗体均由江苏省农业科学院兽医所人兽共患病研究室保存,构建及制备方法参见文献[10,15]。无 PCV1、PCV2 和支原体污染的 PK-15 细胞由江苏省农业科学院兽医所人兽共患病研究室传代、保存。

1.2 主要试剂及仪器

Lipofectamine™ 2000 转染试剂为 Invitrogen 产品;病毒基因组提取试剂盒为北京天恩泽基因科技有限公司产品(柱式病毒 DNAout);Epoxy 活化琼脂糖凝胶和 Pro-sep SPE 色谱柱为国家生化工程技术研究中心产品;NHS 活化琼脂糖凝胶 4FF 为北京韦氏博慧色谱科技有限公司产品;Eppendorf BioPhotometer;H7500 电子显微镜(Hitachi 公司产品)。

1.3 类猪圆环病毒 P1 的拯救和粗提

将 PK-15 细胞传入 6 孔细胞培养板,待细胞密度达到 85% 细胞融合时,按转染试剂说明进行 P1 双拷贝串联分子克隆的转染,培养 72 h 后收获 P1 拯救毒,冻融 3 次后,首先进行差速离心进行粗提,即通过 3 000 r/min 30 min 以及 10 000 r/min 30 min 离心,去除较大的宿主细胞碎片及杂质。

1.4 P1 IgG-Epoxy 活化琼脂糖凝胶柱制备

按厂商使用说明进行,主要步骤有清洗、偶联、封闭和再清洗等。具体为:首先用 10~20 倍胶体积的去离子水冲洗保存于 50% DMSO 的环氧活化胶,除去 DMSO,抽干;其次取溶于 10 mL 0.1 mol/L NaHCO_3 (pH 值 9.0) 的 P1 IgG 100 mg,加入到抽干的活化胶中,在摇床上振荡,37 °C 偶联 12~24 h;再次加入 30 mL 1 mol/L 乙醇胺溶液进行封闭。反应温度恒定在 37 °C,搅拌速度 120 r/min,反应时间 4 h。反应停止后将料液转移到砂芯漏斗中抽干,用去离子水清洗;最后将偶联 P1 IgG 的介质依次用 5 倍的去离子水、0.1 mol/L 含 0.5 mol/L NaCl 的乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 值 4.0)、去离子水、0.1 mol/L 含 0.5 mol/L NaCl 的硼酸-四硼酸钠缓冲液(pH 值 8.0)和去离子水充分洗涤后,抽干。装柱,柱大小为 1.0 cm × 6 cm,装柱量为 5 mL。

1.5 P1 IgG-NHS 活化琼脂糖凝胶柱制备

按厂商使用说明进行,略有不同。具体为:首先用 10~15 倍胶体积的 1 mmol/L HCl 冲洗保存于 100% 异丙醇的 NHS 活化胶,除去异丙醇;其次取溶于 10 mL 0.2 mol/L NaHCO_3 , 0.5 mol/L NaCl pH 值

8.3 的 P1 IgG 100 mg,加入到活化胶中,室温偶联 2~4 h 或 4 °C 过夜;再次用 0.5 mol/L 乙醇胺,0.5 mol/L NaCl (pH 值 8.3) 封闭数小时;最后用高 pH 值和低 pH 值缓冲液轮流清洗 3~6 次,高 pH 值缓冲液为 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 值 8~9),低 pH 值缓冲液为 0.1 mol/L 乙酸,0.5 mol/L NaCl (pH 4~5)。装柱同 1.4。

1.6 免疫亲和层析纯化 P1 病毒

类猪圆环病毒 P1 粗提品 1 mL,分别加入上述已平衡好、基线稳定的凝胶柱上,4 °C 循环过夜,用 0.1 mol/L pH 值 7.4 PBS 平衡缓冲液洗柱,至流出液 $\text{OD}_{280} < 0.02$ 。然后用 0.1 mol/L pH 值 2.6 甘氨酸-HCl 缓冲液解离吸附柱,收集洗脱液,0.5 mL/管,合并活性峰各管,用聚乙二醇(PEG6000)浓缩后,置透析袋透析过夜。

1.7 PCR 鉴定及电镜观察

将 PEG 浓缩前、后的样品,用柱式病毒 DNAout 试剂盒提取 DNA,进行 PCR,所用引物及扩增参数具体见文献[14]。此外,将上述样品,用微量移液器吸取滴于蜡板上,用覆膜的载网向下浮在液滴上,数分钟后用干净滤纸从网边吸去液体,稍干后用 2% 磷钨酸染液染色 1 min,用滤纸吸去染液,投射电镜下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 Epoxy 活化及 NHS 活化的琼脂糖凝胶与抗 P1 抗体的偶联率

通过加入抗 P1 抗体的量,以及偶联后清洗液中抗体的量,可计算出 Epoxy 活化及 NHS 活化的琼脂糖凝胶与抗 P1 抗体的偶联率分别为 82% 和 75%,可应用于病毒纯化研究。

2.2 电镜观察

结果表明,环氧活化及 NHS 活化的琼脂糖凝胶都可用于 P1 病毒的纯化研究,通过免疫亲和层析纯化的 P1 结果 PCR 鉴定可发现目的条带,通过测序进一步获得了证实。纯化的病毒在 PEG 浓缩前,电镜下观察到的病毒粒子较少,一个视野中常呈单个散在或 2~3 个出现,杂质较少,背景干净。病毒粒子为球形、无囊膜,直径约为 25 nm(图 1);通过 PEG 浓缩后,电镜下可观察到较多的 P1 病毒粒子,呈多个聚集状态(图 2)。

3 讨论

生物分子间存在很多特异性的相互作用,它们之间专一而可逆的结合力就称为亲和力。亲和层析

就是通过将具有亲和力的 2 个分子中一个作为配体,共价结合固定在不溶性基质上,利用分子间亲和力的特异性和可逆性,对另一个分子进行分离纯化。其中,利用抗原、抗体之间高特异的亲和力而进行分离的亲和层析就是免疫亲和层析。

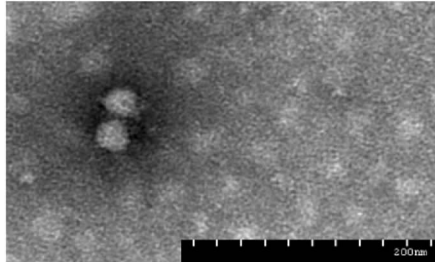


图 1 免疫亲和层析提纯的 P1 病毒电镜观察结果(浓缩前)

Fig. 1 The morphology analysis of porcine circovirus-like agent P1 purified by immuno-affinity chromatography using TEM(Non-concentrated by PEG precipitation)

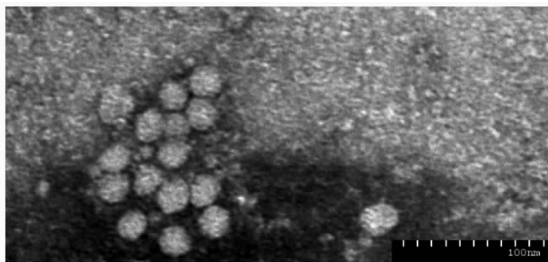


图 2 免疫亲和层析提纯的 P1 病毒电镜观察结果(浓缩后)

Fig. 2 The morphology analysis of porcine circovirus-like agent P1 purified by immuno-affinity chromatography using TEM(Concentrated by PEG precipitation)

目前较为成熟且常用的基质为多糖基质,尤其是琼脂糖,常用的活化方法有除传统的溴化氢活化外,还有环氧乙烷基活化、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化等。溴化氰活化的基质可以在温和的条件下与配体结合,缺点是溴化氰活化法的基质和配体偶联后通常会带一定的正电荷,从而使基质可能有阴离子离子交换作用,增大了非特异性吸附,影响亲和层析的分辨率。另外溴化氰活化的基质与配体结合不够稳定,尤其是当与小配体结合时,可能会出现配体脱落现象。另外溴化氰有剧毒、易挥发,所以操作不便。环氧活化方法的优点是活化后不引入电荷基团,而且配体与基质结合紧密,便于在亲和层析中使用较强烈的洗脱手段,它的缺点是用环氧乙烷活化的基质在与配体偶联时需要碱性条件,pH 值为 9~13,温度为 20~40 °C。这样的条件对于一些比较敏感的配体可能不适用。NHS 活化的基质也可以在 pH 值 7~8 等温和条件下,偶联高浓度带氨基的各种配基。它可提供空间臂,因此特别适合固定小蛋白或肽。

本研究考虑到 P1 病毒的具体特性,同时应用

了环氧活化和 NHS 活化的琼脂糖来进行病毒的纯化,结果表明,两者都可应用于病毒 P1 的纯化,只不过是前者操作较繁琐。

影响免疫亲和层析纯化效果最关键的因素是抗原与抗体的亲和力,以及抗原抗体结合是否容易发生解离。而抗体对相应抗原的亲和力是免疫亲和层析法遇到的最麻烦的问题,高亲和力的抗体能很快完成对大部分抗原的有效结合,低亲和力的抗体则即使在高浓度时也不能结合溶液中的全部抗原。虽然使用多克隆抗体可识别同一抗原上的多个表位,增强抗原抗体结合的亲和力,但是在洗脱抗原时,是比较困难的,通常需要较强烈的洗脱条件。如果最终的目的是纯化保持原来特性的蛋白,最好选择结合一个表位或一个短肽序列的抗体。本研究通过对 P1 表位肽抗体对基质的偶联,成功地对 P1 进行了纯化。

参考文献:

- [1] 温立斌,何孔旺,杨汉春. 一株类猪圆环病毒 2 型因子 P1 的全基因组序列测定与分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(2): 411-416.
- [2] Wen L B, He K W, Yu Z Y, *et al.* Complete genome sequence of a novel porcine circovirus-like agent[J]. J Virol 2012, 86(1): 639.
- [3] 温立斌,何孔旺,倪艳秀,等. 类猪圆环病毒因子 P1 核酸链型和极性的研究[J]. 华北农学报, 2012, 27(3): 120-122.
- [4] Allan G, Meehan B, Todd D, *et al.* Novel porcine circovirus from pigs with wasting disease syndrome[J]. Vet Rec, 1998, 142(17): 467-468.
- [5] Meehan B M, McNeilly F, Todd D, *et al.* Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs[J]. J Gen Virol, 1998, 79: 2171-2179.
- [6] Allan G M, Ellis J A. Porcine circoviruses: a review[J]. J Vet Diagn Invest 2000, 12: 3-14.
- [7] Segales J, Allan G M, Domingo M. Porcine circovirus diseases[J]. Anim Health Res Rev 2005, 6: 119-142.
- [8] 杨汉春. 猪免疫抑制性疾病的流行特点与控制对策[J]. 中国畜牧兽医, 2004, 31(5): 41-43.
- [9] Wen L, Guo X, Yang H. Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China[J]. Vet Microbiol 2005, 110: 141-146.
- [10] 温立斌,何孔旺,杨汉春. 类猪圆环病毒 2 型因子 P1 与 P2 株全长基因组 DNA 分子克隆的构建[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(6): 579-582.
- [11] 温立斌,何孔旺,杨汉春. P1 因子分子克隆的体外感染性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(7): 941-944.
- [12] 温立斌,何孔旺,杨汉春,等. 类猪圆环病毒因子 P1 感染对猪红细胞的影响[J]. 内蒙古农业科技, 2009(2): 46-48.
- [13] Wen L, He K, Xiao Q, *et al.* A novel porcine circovirus-like agent P1 is associated with wasting syndromes in pigs[J]. PLoS ONE 2012, 7(8): e41565.
- [14] Wen L B, He K W, Yang H C, *et al.* Prevalence of porcine circovirus-like agent P1 in Jiangsu, China[J]. Virol J 2011, 8: 543-547.
- [15] 温立斌,何孔旺,杨汉春,等. 类猪圆环病毒因子 P1 结构蛋白表位肽抗体的制备及应用[J]. 华北农学报, 2011, 26(5): 83-86.