

传染性法氏囊病病毒 VP₂蛋白 B细胞 抗原表位免疫小鼠试验

肖治军¹, 张改平¹, 杨汉春², 杨艳艳¹, 赵东¹, 李学伍¹,
邓瑞广¹, 柴书军¹, 邢广旭¹, 杨继飞¹

(1 河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点实验室, 河南省动物免疫学重点实验室
河南 郑州 450002 2 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094)

摘要: 为检测 I 型 IBDV VP₂蛋白线性 B细胞抗原表位肽 P₁₄和 P₅的免疫原性, 将人工合成并纯化的 P₁₄和 P₅分别与牛血清白蛋白 (BSA)和卵清白蛋白 (OVA)偶联; 将与 BSA偶联的 P₁₄和 P₅分别免疫 BALB/c小鼠, 然后以 OVA偶联的 P₁₄和 P₅作为间接酶联免疫吸附试验抗原, 分别测定免疫鼠血清中抗相应多肽的抗体。结果显示, 免疫小鼠产生了抗 P₁₄和 P₅的抗体, 抗体持续期达 21周。表明 P₁₄和 P₅具有免疫原性。

关键词: IBDV VP₂蛋白; 合成肽; 抗原表位; 免疫

中图分类号: S852.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2010)02-0233-03

Mice Immunization with the B-cell Epitopes on the VP₂ Protein of Infectious Bursal Disease Virus

XIAO Zhi-jun, ZHANG Gai-ping, YANG Han-chun, YANG Yan-yan, ZHAO Dong, LI Xue-wu,
DENG Rui-guang, CHAI Shu-jun, XING Guang-xu, YANG Ji-fei

(1. Key Laboratory of Animal Immunology of the Ministry of Agriculture, Henan Provincial Key
Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China
2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The peptides of the linear B-cell epitopes P₁₄ and P₅ on the VP₂ protein of infectious bursal disease virus (IBDV) were synthesized and purified, then were conjugated to carrier protein BSA or OVA respectively. The BSA-conjugated P₁₄ and P₅ were inoculated into the BALB/c mice respectively. The OVA-conjugated P₁₄ was used as the antigen to detect the anti-P₁₄ antibody in the serum of the immunized mice and so was the OVA-conjugated P₅. The results showed that the P₁₄ and P₅ after the conjugation to BSA stimulated the production of the anti-P₁₄ and anti-P₅ antibody respectively and that the antibodies lasted for twenty-one weeks. It indicated the immunogenicity of the P₁₄ and P₅.

Key words: IBDV VP₂ protein; B-cell epitope; Peptide synthesis; Immunization

抗原表位 (Epitope) 又称抗原决定簇 (Antigenic determinant), 是抗原分子表面具有免疫活性的特殊立体构型或化学基团, 分为 T细胞表位和 B细胞表位; B细胞表位是被 B细胞抗原受体和抗体分子识别的表位, 也称抗体表位, 分构象表位和顺序 (线性) 表位; 抗原表位决定着抗原与抗体发生特异性结合的能力^[1]。传染性法氏囊病病毒 (Infectious

bursal disease virus, IBDV) 分 2 个血清型, I 型和 II 型病毒的抗原相关性小于 10%, 但含有共同抗原成分, IBDV 的结构蛋白 VP₂和 VP₃都含有群特异性抗原表位, 但只有 VP₂蛋白含有型特异性抗原表位^[2]。I 型 IBDV VP₂蛋白至少存在 2 个构象性和线性抗原表位^[3], VP₂蛋白的第 2 个亲水区 (314 ~ 324 位氨基酸序列) 是与抗 IBDV 中和性单克隆抗

收稿日期: 2009-06-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30400323)

作者简介: 肖治军 (1964-) 男, 湖南郴州人, 副研究员, 博士, 主要从事畜禽疫病免疫诊断和防治研究。

体相结合的关键位点^[4]。王选年等^[5]的研究表明, IBDV VP2蛋白的第 197~209位和第 329~337位氨基酸序列特异结合抗 IBDV的单克隆抗体;肖治军等^[6]的研究显示, VP2蛋白的第 189~205位和第 312~326位氨基酸序列均可阻断 IBDV与抗 IBDV单抗的结合反应。上述研究着重检验了线性 B细胞抗原表位与抗体结合反应的特性,而未检测其刺激机体产生抗体的特性。鉴此,进行本试验,以期为 IBDV多肽抗体试剂或疫苗的研发提供基础。

1 材料和方法

1.1 供试动物

6周龄 BALB/c小鼠及其饲料购自郑州大学实验动物中心。

1.2 主要试剂和器材

羊抗鼠 IgG-HRP系华美公司产品。3,3',5,5'-四甲基联苯胺、过氧化氢尿素和福氏完全佐剂, sigma产品。BSA、OVA和 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC), Pierce公司产品。健康猪血清,河南省动物免疫学重点实验室保存。Symphony固相多肽合成仪, Protein Technology公司;液质联用仪, WATERS公司;550型酶标读数仪, BIO-RAD公司;96孔塑料酶标板,深圳金灿华实业公司。

1.3 多肽合成

可阻断 IBDV与抗 IBDV单抗结合反应的 VP2蛋白线性 B细胞抗原表位肽 P5(189 LDPKM-VAICDSSDRPRV205)和 P14(312 MTSKSGGQAG-DQMS326)^[5],按 Symphony说明书中的 Fmoc多肽合成程序自动合成。合成的多肽经脱盐、反相液相层析柱分离纯化(纯度 $\geq 90\%$),冻干保存。用质谱仪测定纯化肽 P14和 P5的分子量,均与理论分子量相符合。

1.4 合成肽与载体蛋白的偶联与鉴定

按 Pierce公司 EDC偶联试剂盒介绍的偶联法,将纯化肽 P14分别与 BSA和 OVA偶联, P5分别与 BSA和 OVA偶联,设 BSA与 EDC的空白偶联对照。以透析法分离多肽偶联物, SDS-PAGE电泳鉴定多肽偶联情况^[7]。

1.5 小鼠免疫与抗表位多肽抗体的 ELISA检测

取 1份 P14-BSA和 P5-BSA偶联物分别与 3份福氏完全佐剂混合搅拌成油乳剂苗,每种多肽油苗经颈背部皮下注射 3只小鼠,每鼠只注射 1次约含 $100\mu\text{g}$ BSA的油苗剂量(以紫外吸收法测定蛋白含量,下同)。小鼠免疫后间隔采血分离血清,分别以 P14-OVA和 P5-OVA偶联物为间接 ELISA抗

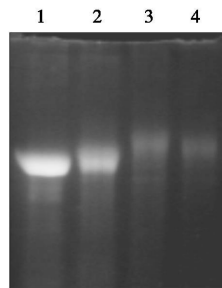
原,参考文献[7]的方法稍微改动,具体方法如下。

经过预备试验,选择以包被液将 OVA及其偶联多肽均配成 OVA蛋白含量 $5\mu\text{g/mL}$ 的溶液,包被 96孔酶标板($100\mu\text{L/孔}$, 37°C 3 h);以 PBST液洗涤酶标板孔 3次, 3 min 1次,加封闭液封闭($200\mu\text{L/孔}$, 37°C 3 h);洗涤 3次并甩净孔内残留液,依次加入倍比稀释的免疫鼠血清溶液(起始稀释度 1:200), $50\mu\text{L/孔}$, 37°C 60 min 洗涤,加入用封闭液配制的 1:1000羊抗鼠 IgG-HRP溶液, $50\mu\text{L/孔}$, 37°C 60 min 洗涤,等量加入 3号液和 4号液,共 $80\mu\text{L/孔}$,室温显色 10 min加入 2 mol/L H_2SO_4 液, $50\mu\text{L/孔}$,用酶标仪测定 OD_{450} 值。试验设空白载体 OVA对照、未接种油苗的正常小鼠血清对照(1:200)和 PBST对照。ELISA效价判定方法:多肽-OVA偶联物和空白载体 OVA检测免疫鼠血清液的 OD_{450} 值是检测正常鼠血清液的 OD_{450} 值的 3倍,判为阳性,否则判为阴性;但多肽-OVA偶联物和空白载体 OVA检测正常鼠血清液的 OD_{450} 值应小于检测 PBST OD_{450} 值的 2倍。

2 结果与分析

2.1 合成肽与 BSA的偶联结果

P14-BSA和 P5-BSA偶联物经 SDS-PAGE电泳(图 1)。分子量最大的偶联物 P5-BSA泳速最慢;泳速第 2慢的是分子量第 2大的偶联物 P14-BSA;泳速最快的是空白载体 BSA。结果表明,多肽 P14和 P5已连接到载体蛋白 BSA分子上。



1. 载体蛋白 BSA 2. 载体蛋白 BSA+EDC
3. 偶联物 P5-BSA 4. 偶联物 P14-BSA
1. Carrier BSA 2. Carrier BSA+EDC
3. conjugate BSA-P5 4. Conjugate BSA-P14

图 1 多肽-BSA偶联物的 SDS-PAGE电泳结果

Fig. 1 SDS-PAGE identification of P14-BSA and P5-BSA conjugation

2.2 免疫鼠血清中抗表位多肽抗体的 ELISA检测结果

以 P14-OVA检测 P14-BSA免疫鼠血清和以 P5-OVA检测 P5-BSA免疫鼠血清的平均抗体效价结果见图 2。由图 2可见,依据本研究 ELISA效价

判断方法, P14、P5分别刺激小鼠产生了抗相应多肽的抗体, 而且抗体持续期达到 21 周; 即 1 次多肽油苗注射接种 21 周后, 平均 1: 300 倍稀释的鼠血清 (P5) 和 1: 400 倍稀释的鼠血清 (P14) 多肽抗体检测结果仍为阳性。依据本研究 ELISA 效价判断方法, 表 1 结果具体显示, 空载体 OVA 与接种 P14 和

P5 油苗的阳性鼠血清、与未接种油苗的正常阴性鼠血清和 PBS 空白对照均呈阴性反应; 而 P14-OVA 和 P5-OVA 与接种 P14 和 P5 油苗的阳性鼠血清呈阳性反应, 与未接种油苗的正常阴性鼠血清和 PBS 空白对照均呈阴性反应; 这表明测定结果是特异的。

表 1 OVA 及其多肽偶联物检测不同稀释度免疫鼠血清的 ELISA OD₄₅₀ 值
Tab 1 The OD₄₅₀ values of different mice sera dilutions detected by P14-OVA and OVA

检测抗原 Detection antigens	免疫后时间 / 周 Time after immunization	不同稀释度免疫鼠血清的 OD ₄₅₀ 值 The OD ₄₅₀ values of different sera dilutions					正常鼠血清 Negative serum 1: 200	PBS 对照 PBS control
		1: 200	1: 400	1: 800	1: 1 600	1: 3 200		
OVA-P14	4	2.862	2.142	1.115	0.535	0.294	0.190	0.132
	8	2.502	1.853	1.169	0.645	0.352	0.237	0.171
	18	1.117	0.652	0.470	0.283	0.176	0.178	0.119
	21	1.244	0.684	0.493	0.297	0.193	0.210	0.138
OVA	4	0.122	0.137	0.107	0.092	0.096	0.153	0.092
	8	0.139	0.146	0.131	0.127	0.115	0.193	0.133
	18	0.236	0.180	0.123	0.105	0.097	0.149	0.078
	21	0.311	0.256	0.177	0.134	0.108	0.163	0.094
OVA-P5	4	1.861	1.681	1.035	0.502	0.306	0.202	0.154
	18	0.882	0.510	0.294	0.207	0.187	0.211	0.144
	21	0.877	0.500	0.269	0.212	0.174	0.235	0.173
OVA	4	0.259	0.184	0.148	0.111	0.118	0.166	0.093
	18	0.248	0.160	0.135	0.097	0.086	0.168	0.087
	21	0.214	0.159	0.142	0.120	0.101	0.190	0.108

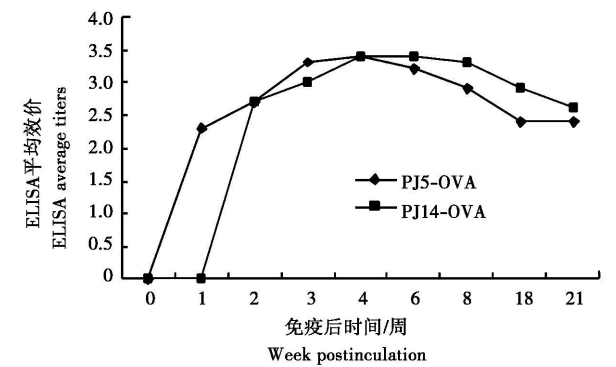


图 2 P14OVA 和 P5-OVA 检测相应多肽免疫鼠血清的抗体水平结果

Fig 2 Anti-P14 or 5 antibody titers in vaccinated mice sera detected by P14-OVA and P5-OVA respectively

3 讨论

至今仍缺乏理想的方法来鉴定蛋白质抗原表位肽的免疫学特性或功能。通常需要与载体偶联成分子量更大或空间结构更丰富的物质, 方好应用。EDC 偶联法是种简便的偶联方法。多肽 P5 和 P14 分子量小, 分别约为 1.9 kDa 和 1.5 kDa, 应用 EDC 偶联法与载体 BSA 连接成大分子后, 刺激机体产生了多肽抗体。

本试验分别以 P5-BSA 和 P14-BSA 偶联物免疫小鼠, 然后以 P5-OVA 和 P14-OVA 偶联物检测免疫小鼠血清中抗相应多肽的抗体, 目的是避免小鼠血清中抗 BSA 抗体对测定结果的非特异性影响。BALB/

c 小鼠免疫试验结果显示, 应用 P5-BSA 或 P14-BSA 偶联物的油佐剂苗, 1 次注射接种小鼠后即可刺激小鼠产生抗相应多肽的抗体, 且抗体持续期长达 21 周。多肽的免疫应答反应明显, 可能与使用 BSA 的偶联物和福氏佐剂有关。结果表明, BALB/c 小鼠可用来制备抗 BVD 多肽的异源单因子血清或单克隆抗体, 或作为检验 BVD 多肽疫苗免疫应答的动物模型。P5 和 P14 与载体偶联后能否刺激鸡体产生抗多肽抗体, 以及这种抗体能否用来检测自然病毒或防御病毒的入侵, 均有待进一步试验。

参考文献:

[1] 杨汉春. 动物免疫学 [M]. 第 2 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 14—16.
[2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 578—587.
[3] Yamaguchi T, Iwata K, Kobayashi M, et al. Epitope mapping of capsid proteins VP2 and VP3 of infectious bursal disease virus [J]. Archives of Virology 1996; 141: 1493—1507.
[4] Heine H G, Haritou M, Failla P, et al. Sequence analysis and expression of the host protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strains [J]. J Gen Virol 1991; 72: 1835—1843.
[5] Wang X N, Zhang G P, Zhou J Y, et al. Identification of neutralizing epitopes on the VP2 protein of infectious bursal disease virus by phage displayed heptapeptide library screening and synthetic peptide mapping [J]. Viral Immunology 2005; 18(3): 549—557.
[6] 肖治军, 张改平, 杨汉春, 等. 抗鸡传染性法氏囊病病毒单克隆抗体识别的抗原表位分析 [J]. 河南农业科学, 2006(11): 105—109.
[7] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 71—352.