

免疫亲和层析法分离鸡补体 C3d 蛋白研究

马雪云¹, 韩建秋², 高淑霞¹, 牛钟相¹

(1 山东农业大学 动物科技学院, 山东 泰安 271018;

2 山东省枣庄市 园林管理处, 山东 枣庄 277102)

[摘要] 利用抗鸡 C3 21 肽抗体制备免疫亲和层析柱, 对鸡补体 C3d 进行了分离, 并采用间接酶联免疫吸附实验(间接 ELISA), 对洗脱液中的 C3d 组分进行了检测, 以 SDS-PAGE 电泳方法对分离到的 C3d 进行了检测。结果表明, 利用亲和柱层析能够分离得到纯度较高的 C3d 蛋白, 为鸡血清中 C3d 的提取纯化提供了较为简便的方法。

[关键词] 鸡补体 C3d; 免疫亲和层析; 间接 ELISA

[中图分类号] S858.312.5⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)05-0055-04

补体 C3d 是 C3 的最终裂解片段, 其保留有 C3 的分子内硫酯键, 可共价结合到可溶性抗原上而形成 C3d-抗原复合物, 与抗原一起分别与 B 细胞上的 BCR(抗原识别受体)和 CD21(补体识别受体)交联, CD21 通过 B 细胞膜上的 CD19 活化细胞内的酪氨酸蛋白激酶^[1-2], 使 C3d 发挥强有力的分子佐剂作用, 促使 B 细胞的活化增值, 实现补体在机体先天性免疫和获得性免疫中的桥梁作用。

生产实践证明, 大肠杆菌、沙门氏菌等细菌性疫苗对鸡体的免疫保护效果较差; 笔者试验研究发现(待发表), 鸡体内补体 C3 的含量及活性较哺乳动物的低, 且从体外补充一定量的 C3 后, 可明显提高细菌性疫苗的免疫效果, 表明 C3 具有免疫增强的佐剂功能。因此, 分离纯化鸡补体 C3d 并将其作为免疫佐剂添加于疫苗中, 对增强家禽疫苗的免疫效果具有重要意义。因此, 本研究采用免疫亲和层析法分离了鸡补体 C3d 蛋白, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

CNBr-activated sepharose 4B Fast Flow, 购自 Pharmacia 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 购自联星实业有限公司; TMB、EGTA、弗氏完全佐剂, 均购自 Sigma 公司; 96 孔酶标板、10 cm×2 cm 层析柱和 PMSF 均购自北京鼎国生物工程公

司; 牛血清白蛋白, 购自上海伯奥生物科技有限公司; 亮氨酸, 购自 Amiresco 公司; SPF 鸡血清, 由山东家禽研究所 SPF 鸡场提供; 中国白兔, 由山东省米歇尔生物制品公司提供。

1.2 方 法

1.2.1 抗鸡 C3 21 肽抗体的制备 依照鸡 C3 α 链羧基端的序列^[3], 合成 C3¹²⁷²⁻¹²⁹² 21 肽, 色普纯度 90%, 由北京中科亚光生物工程公司完成。此 21 肽用新蒸戊二醛与牛血清白蛋白连接成为免疫原^[4], 用于免疫家兔制备兔抗鸡 C3 21 肽抗血清。

1.2.2 抗鸡 C3 21 肽抗体 IgG 的提取 取兔抗鸡 C3 21 肽血清 20 mL, 加入 20 mL pH 7.4 的 PBS, 充分混匀后滴加饱和硫酸铵 40 mL, 使饱和度达到 50%, 充分搅拌, 沉淀。过夜后以 4 000 r/min 离心 20 min, 弃上清; 将沉淀溶于 20 mL PBS 溶液中, 滴加饱和硫酸铵, 使饱和度达 20%; 沉淀后 4 000 r/min 离心 20 min, 弃沉淀; 上清中再滴加饱和硫酸铵使饱和度达 33%, 搅拌沉淀后 4 000 r/min 离心 20 min, 将沉淀用少量 pH 7.4 的 PBS 溶解, 透析除盐即得抗 C3 21 肽 IgG, -20℃ 保存备用。

1.2.3 亲和层析柱的制备 按 Pharmacia 公司提供的说明书, 将 2 g CNBr-activated sepharose 4B Fast Flow 用 400 mL 10 mmol/L 的 HCl 溶胀并洗涤, 然后缓缓加入层析柱中, 保持流出口开放, 胶自然沉降; 将兔抗 C3d 21 肽 IgG 用 0.22 μ m 的细菌滤

[收稿日期] 2005-09-05

[基金项目] 山东财政支持项目(SDGP2004-54-O)

[作者简介] 马雪云(1969-), 女, 山东兖州人, 副教授, 在读博士, 主要从事兽医微生物学与免疫学研究。

[通讯作者] 牛钟相(1953-), 男, 山东诸城人, 教授, 博士生导师, 主要从事兽医微生物与免疫学研究。E-mail: zxnium@sdau.edu.cn

器过滤后加入柱中,然后用 0.1 mol/L 的 NaHCO_3 (含 pH 8.3, 0.5 mol/L NaCl) 充分透析;经充分偶联后,冲洗至流出液 OD_{280} 为 0,再用 200 mL 0.1 mol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液充分洗柱,以封闭胶上未偶联的活化位点;用 3 倍体积 pH 8.0, 含 0.5 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 和 3 倍体积 0.1 mol/L 的乙酸盐缓冲液 (pH 4.0, 含 0.5 mol/L NaCl) 循环洗涤层析柱,进行 3 个循环。

1.2.4 样品的制备 参考文献[5]的方法,取 SPF 鸡血清 10 mL, 37 °C 水浴 4 d, 加入等体积质量分数 22% 的 PEG 溶液混合后 4 °C 搅拌 3 h, 4 000 r/min 离心 30 min, 取上清备用。

1.2.5 样品的亲和层析 取 10 mL 样品用 0.1 mol/L NaHCO_3 (pH 8.3, 含 0.5 mol/L NaCl) 充分透析,过 0.22 μm 细菌滤器后少量多次上柱,出口流速 6~8 滴/min;用 0.1 mol/L NaHCO_3 (pH 8.3, 含 0.5 mol/L NaCl) 清洗层析柱,用洁净试管承接洗脱液,每管收集 2 mL,测 OD_{280} ,直到洗脱液的 OD_{280} 为 0。再用 0.1 mol/L 氨基乙酸-HCl 缓冲液 (pH 2.8) 洗脱,出口流速 1 mL/min,用含 1 mL 0.1 mol/L NaHCO_3 (pH 8.0) 的洁净试管收集洗脱液,每管收集 1 mL,共收集 10 管。

1.2.6 洗脱液中补体 C3d 的检测 以 SPF 鸡血浆

作为阳性对照,25 g/L 白明胶作为阴性对照,按文献[6]的步骤进行。以 1.2.5 中收集到洗脱液包被 ELISA 板,每孔 100 μL 包被过夜,洗涤液为 pH 7.4 的 PBST,兔抗鸡 21 肽血清按 1:10 稀释,每孔 100 μL ,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 按 1:800 稀释,每孔 100 μL ,底物液为 TMB- H_2O_2 ,每孔 100 μL ;终止液为 2 mol/L H_2SO_4 ,每孔 50 μL 。20 min 内在酶标仪上读取 450 nm 处的 OD 值,每管洗脱液进行 2 个重复,以“阴性对照平均 OD 值 \times 2”作为判断阳性值的下限。

1.2.7 C3d 纯度 采用 SDS-PAGE 法。将 1.2.6 中 ELISA 检测为阳性的管合并,PEG 浓缩至 $\text{OD}_{280} = 2.5$,用 100 g/L 分离胶进行电泳。

2 结果与分析

2.1 洗脱液中的 C3d 分析

由表 1 可知,将 SPF 鸡的老化血清过亲和层析柱,用 0.1 mol/L 氨基乙酸-HCl 缓冲液 (pH 2.8) 洗脱后,获得了 8 管(每管 1 mL) C3d 为阳性的洗脱液,其中 1 管的 $\text{OD}_{280\text{nm}}$ 值达到 0.205,说明抗鸡 C3 21 肽抗体与 C3d 具有较强的亲和力,因而利用亲和层析柱的方法,可以从 SPF 鸡血清中分离得到 C3d。

表 1 亲和层析流出液中的 C3d 分析

Table 1 Analysis of C3d in the elution from the affinity chromatography

样品 Sample	OD 值 OD value		均值 Mean value	结果 Result
	1	2		
空白对照 Blank	0.010	0.015		
阴性对照 Negative	0.033	0.030	0.032	
阳性对照 Positive	0.199	0.213	0.206	+
第 1 管 First	0.038	0.042	0.040	-
第 2 管 Second	0.130	0.013 4	0.132	+
第 3 管 Third	0.156	0.150	0.153	+
第 4 管 Forth	0.174	0.182	0.178	+
第 5 管 Fifth	0.188	0.222	0.205	+
第 6 管 Sixth	0.160	0.156	0.158	+
第 7 管 Seventh	0.158	0.138	0.148	+
第 8 管 Eighth	0.132	0.132	0.132	+
第 9 管 Ninth	0.054	0.057	0.056	-
第 10 管 Tenth	0.045	0.043	0.044	-

注: +, 阳性; -, 阴性。

Note: +, Positive; -, Negative.

2.2 C3d 纯度鉴定和分子质量确定

从 SPF 鸡血清中分离出的 C3d 蛋白经 100 g/L SDS-PAGE 电泳,显示出单一的 1 条条带(图 1、图 2),说明分离出的 C3d 是单肽链蛋白。根据标准蛋

白推测,其分子质量大约为 35 ku,说明以兔抗鸡 C3 21 肽 IgG 制备的亲和层析柱纯化 SPF 鸡血清中的 C3d 是可行的。

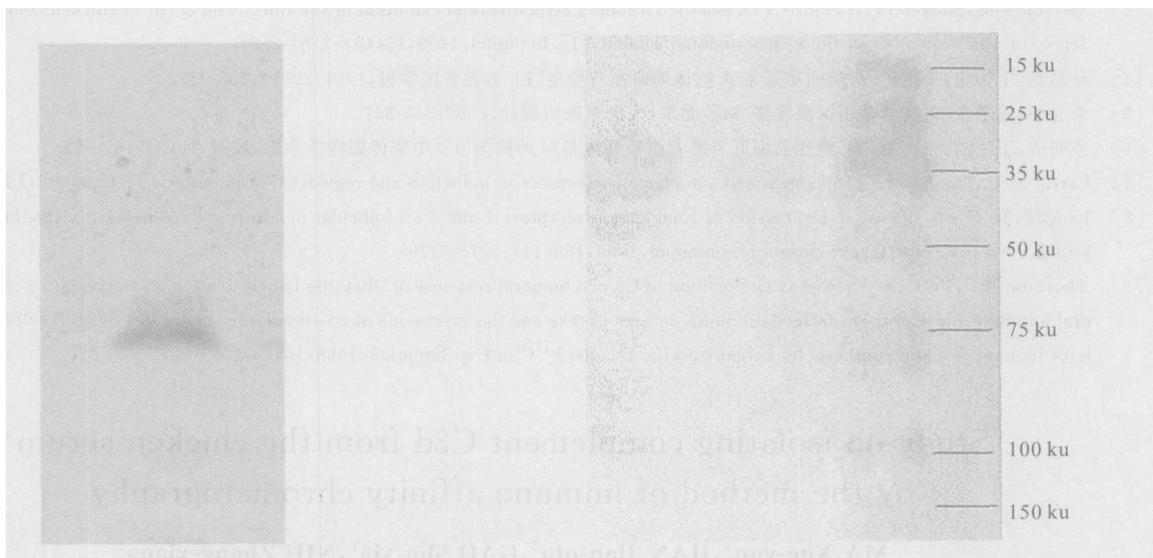


图 1 非变性 C3d 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱
Fig. 1 Non-degeneration PAGE electrophoresis

3 讨论

C3d 肽段是 C3 蛋白裂解的最终片段,是补体系统活化的标志,只有补体系统活化后在动物体液中才有 C3d 的产生。若直接取 SPF 鸡血清上样,并不能有效地分离到 C3d,只有将血清老化以后,C3 才能充分完全裂解得到 C3d。因此,本研究在 SPF 鸡血清过亲和层析柱前,将其在 37℃ 条件下老化 4 d,使其中的补体 C3 蛋白完全裂解以释放 C3d 肽段。

C3⁷⁴¹⁻⁷⁶¹ 是 C3 α 链 N 端 21 肽,亦是 C3d 的重要组分,由于此段肽的抗原性较强,且在 ELISA 反应中抗此 21 肽抗体对 C3d 较为敏感^[3],因此本研究中选取此 21 肽与牛血清白蛋白连接制备抗原免疫家兔,用于制备抗此 21 肽的抗体并分离抗体中的 IgG,使之交联到 CNBr 活化的 Sepharose-4B 上,从而较为有效地提取老化血清中的 C3d。

动物机体中 B 细胞和滤泡树突状细胞(FDC)上均存在 C3d 受体(CR2/CD21),若将 C3d 与某抗原连接制备成复合抗原,则 C3d 可发挥免疫佐剂的作用。将某抗原与机体免疫效应细胞连接,同时突破

图 2 变性 C3d 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 2 Degeneration SDS-PAGE electrophoresis

机体对抗原免疫应答中 MHC 的限制,即一部分抗原不经过 APC(抗原提呈细胞)细胞的处理和 TH(辅助性 T 细胞)细胞的协助,而可直接刺激 B 细胞产生抗体,从而促进某抗原(或疫苗)的免疫效果;另外,C3d 与抗原连接能够促使抗原在淋巴滤泡中的定位并促进生发中心的生成^[7];并且,C3d 与 FDC 细胞上的 CD21 形成的复合物,可使抗原滞留在 FDC 细胞中,增强了二者之间及抗原与生发中心中 B 细胞的相互作用,并可以此提供细胞信号并阻止 B 细胞的凋亡。这些细胞机制除促进 B 细胞成熟和分化为产生抗体的细胞外,还可增强 B 细胞的记忆功能,增加记忆性 B 细胞的数量,使得机体对抗原具有较长时间和较强的免疫反应。Fang 等^[8]研究指出,FDC 细胞上缺乏 CR2 的小鼠,其对抗原的免疫反应性较差。Thornton 等^[9]研究指出,当抗原通过 C3d 与 B 细胞上的 CR 结合后,CR 可促进抗原特异性 B 细胞内的抗体合成。这些研究均证明了 C3d 的免疫增强作用。因此,本研究为开发、利用 C3d 作为新型免疫佐剂提供了技术保证,为提高鸡细菌性疫苗的免疫效果提供了新途径。

[参考文献]

- [1] Sarrias M R, Franchini S, Canziani G, et al. Kinetic analysis of the interaction of complement receptor 2 (CR2, CD21) with its ligands C3d, iC3b, and the EBV glycoprotein gp350/220[J]. Immunol, 2001, 167(3): 1490-1499.
- [2] Bouillie S, Barel M, Frade R. Signaling through the EBV/C3d receptor (CR2, CD21) in human B lymphocyte: activation of phosphatidylinositol 3-kinase via a CD19-independent path way[J]. Immunol, 1999, 162(1): 136-143.

- [3] Mavroidis M, Sunyer J O, Lambris J D. Isolation, primary structure, and evolution of the third component of chicken complement and evidence for a new member of the α_2 -macroglobulin family[J]. *Immunol*, 1995, 154(5): 2164-2174.
- [4] 孙惠兰, 牛钟相, 朱瑞良. 抗赭曲霉毒素 A 抗体的研制与鉴定[J]. *畜牧兽医学报*, 1991, 22(1): 235-237.
- [5] 朱立平, 陈学青. 免疫学常用试验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 352-357.
- [6] 童明庆, 丁洁, 张旭, 等. 慢性乙型肝炎患者血浆补体 C3d 的检测[J]. *中华传染病学杂志*, 1997, 15(3): 161-162.
- [7] Carrol M C. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity[J]. *Immunol*, 1998, 18: 545-568.
- [8] Fang T, Xu C, Fu Y X, et al. Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response[J]. *Immunol*, 1998, 160(11): 5273-5279.
- [9] Thornton B P, Vetvicka V, Ross G D. Function of C3 in a humoral response: iC3b/C3dg bound to an immune complex generated with natural antibody and a primary antigen promotes antigen uptake and the expression of co-stimulatory molecules by all B cells, but only stimulates immunoglobulin synthesis by antigen-specific B cells[J]. *Clin Exp Immunol*, 1996, 104(3): 531-537.

Study on isolating complement C3d from the chicken serum by the method of immuno affinity chromatography

MA Xue-yun¹, HAN Jian-qiu², GAO Shu-xia¹, NIU Zhong-xiang¹

(1 College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China;

2 Zaozhuang Garde Manage Bureau Shandong Province, Zaozhuang, Shandong 277102, China)

Abstract: Using the antibody of 21 peptide from the complement C3's α chain of chicken, the affinity chromatography column was fabricated and the complement C3d was isolated. With the method of indirect ELISA, the C3d portion in the solution was tested, and the isolated C3d was examined with the method of SDS-PAGE. It showed that by using the method of affinity chromatography, the pure C3d protein can be obtained. The method provides a simple way to purify the chicken C3d.

Key words: complement C3d; immuno affinity chromatography; indirect ELISA

(上接第 54 页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)05-0050-EA

Clone and genetic variation analysis of *N* gene of nephropathogenic avian infectious bronchitis virus isolates

WANG Jing-yu, DENG Xiao-min, ZHANG Yan-ming, LUO Yan, LI Peng, GUO Kang-kang

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, NorthWest A & F University, Yangling, Shanxi 712100, China)

Abstract: The complete *N* genes of eight avian infectious bronchitis viruses (IBV) isolated from different places of Shaanxi province were amplified by using RT-PCR method. The products were ligated with T-vector separately and the transferred plasmids were obtained respectively. The *N* genes were sequenced in invitrogen cooperation. Sequences were analyzed among the eight isolates in China and the reference strains in GenBank by using DNASTAR software. According to the analyzed results of *N* genes nucleotide, BO1 strain, YL strain, WH strain and YX strain share high identities, while the identities of G strain, BJ strain, WG strain and FF strain are low. The results of deduced amino acid sequences show that the mutation of *N* protein mainly display sporadic point mutation as 46, 48, 50, 75, 78, 189, 223, 236, 237, 298, 301, 350, 366 et al. Mutational site did not show obvious regularity.

Key words: nephrotropic avian infectious bronchitis virus; local isolate strains; *N* gene; sequence analysis; chicken