

M SB1 细胞上M ATSA 的分离鉴定及纯化^{*}

穆 杨¹, 张彦明¹, 童德文¹, 王玉东², 李 崴², 李玉清², 郑增忍²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 农业部动物检疫所, 山东 青岛 266032)

[摘 要] 将培养收获的M SB1 细胞用磷酸盐缓冲液洗涤3次后, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$, 然后每毫升细胞悬液加2 U 木瓜蛋白酶和 1mmol/L 的L-胱氨酸溶液0.1 mL, 混匀后37℃作用1 h 以分离M SB1 细胞表面M ATSA。对木瓜蛋白酶处理前后的M SB1 细胞进行间接荧光抗体染色以检测M ATSA 的分离情况。获得的M ATSA 粗提物经超滤浓缩和Sephadex G-75 凝胶纯化后, 用SDS-PAGE 检测纯化的结果。试验结果表明, 从M SB1 细胞表面分离到M ATSA, 经电泳获得了纯化的M ATSA, 其相对分子质量约为35 ku。结果为M ATSA 单克隆抗体的制备及其相关的研究奠定了基础。

[关键词] M SB1; 马立克病肿瘤相关表面抗原; M ATSA 的分离与纯化

[中图分类号] S852.65+9.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)12-0001-05

马立克病(Marek's Disease, MD)是由鸡马立克病病毒(Marek's Disease Virus, MDV)引起的一种鸡高度接触性肿瘤病。1907年, 匈牙利病理学家Joseph Marek^[1]首先报道此病, 1969年, 在英国科学家Biggs的倡导下, 开始使用马立克病这一名称^[2]。马立克病肿瘤相关表面抗原(Marek's disease tumor-associated surface antigen, M ATSA)是MD肿瘤细胞和MD成淋巴细胞系细胞表面存在的特异性抗原^[3], Ross^[4]指出, M ATSA 是细胞转化的标志。MD淋巴瘤细胞表面和不同的成淋巴细胞系细胞表面的M ATSA 与组织相容性抗原和胚胎抗原无关, MDV感染鸡体内M ATSA 的出现可以刺激机体产生对MD免疫非常重要的抗肿瘤免疫应答。M ATSA 在禽淋巴细胞性白血病(lymphocytic leukemia, LL)和禽网状内皮组织增殖病(Avian reticuloendotheliosis, ARE)的淋巴瘤细胞上均不表达^[5]。因此, M ATSA 可用于MD的鉴别诊断。

从用高度吸收的抗血清做的间接免疫荧光试验获得的数据^[6]来看, 仅5%~30%的MD肿瘤细胞上存在M ATSA, 而几乎100%的MD成淋巴细胞系细胞上存在M ATSA。MD肿瘤细胞上M ATSA 的分离鉴定已有报道^[7], 但MD成淋巴细胞系细胞上M ATSA 的研究尚未见报道。M SB1 细胞是已经建系的一种MD成淋巴细胞系细胞, 本试验对M SB1

细胞上M ATSA 的分离、纯化进行了研究, 以为M ATSA 及其相关的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 M SB1 细胞 由山东农业大学崔治中教授惠赠。

1.1.2 主要试剂 DMEM (高糖) 干粉为GIBCO公司产品; 优级胎牛血清(FBS)、PAA、可溶性两性霉素B、TMB 和L-胱氨酸为Sigma 公司产品; 木瓜蛋白酶(6000 U/mg)、羊抗兔 IgG-FITC 和羊抗兔 IgG-HRP 为SABC 公司产品; Sephadex G-75(分离范围3000~7000)为Pharmacia 公司产品; 蛋白质Marker 为Promega 公司产品; 凝胶过滤缓冲液(0.1 mol/L pH 7.2 PBS, 用前进行脱气处理)。

1.1.3 主要仪器设备 超净工作台为江苏安泰集团产品; 二氧化碳培养箱为Thermo 公司产品; PL 5241型超纯水仪为PALL 公司产品; 倒置显微镜为Olympus 公司产品; 高速冷冻离心机为Backman 公司产品; 层析柱($1.6\text{ cm} \times 100\text{ cm}$)和AKTA™自动核酸蛋白层析仪均为A. P. 公司产品; 生物成像系统为美国UV P 公司产品; 电子天平为瑞士普利赛斯公司产品; 全自动酶标仪为芬兰勃勃公司产品;

* [收稿日期] 2006-05-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30371067); 霍英东教育基金项目(91033)

[作者简介] 穆 杨(1974-), 女, 陕西眉县人, 讲师, 博士, 主要从事免疫学研究。E-mail: muyang@nwuaf.edu.cn

[通讯作者] 童德文(1967-), 男, 安徽太湖人, 副教授, 博士, 主要从事动物毒理学和动物病理学研究。E-mail: tdw8888@sina.com

ELISA板为Nunc公司产品。

1.2 MSB1细胞的培养

1.2.1 MSB1细胞生长液的配制 以DMEM作为基础培养基,加入体积分数10% FBS, 500 U/mL的青霉素, 500 $\mu\text{g/mL}$ 的链霉素, 2 $\mu\text{g/mL}$ 的两性霉素B, 调整pH为7.4。

1.2.2 MSB1细胞的培养 以生长液悬浮细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数5% CO_2 条件下培养。

1.2.3 MSB1细胞的传代 待细胞长满细胞瓶90%以上时, 进行传代。无菌操作下轻拍细胞瓶的侧壁, 使细胞脱落, 然后将细胞悬液转入10 mL玻璃离心管中, 800 r/min离心10 min, 轻轻弃去上清, 将细胞沉淀用40 mL新鲜的生长液轻轻悬浮后, 分装入25 mL细胞瓶中, 每瓶10 mL进行传代, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 条件下培养。

1.2.4 MSB1细胞的收获 待细胞长满细胞瓶90%以上时, 收获。无菌操作下轻拍细胞瓶的侧壁, 使细胞脱落, 然后将细胞悬液转入50 mL塑料离心管中, 1 000 r/min离心10 min, 轻轻弃去上清, 沉淀细胞用0.01 mol/L pH 7.2的PBS液洗3次后用于提取MATSA。

1.3 MATSA的提取

参考Schat等^[8]和Dandapat等^[9]的方法并加以改进。将用PBS液洗过的MSB1用PBS悬浮, 计数后用PBS液, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$, 每毫升细胞悬液加木瓜蛋白酶2 U, 1 mmol/L的L-胱氨酸溶液0.1 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用1 h, 4 000 r/min离心10 min, 收集上清。将上清液装入透析袋中用生理盐水透析, 每3 h换1次透析液, 过夜后将透析袋中的液体装入超滤离心管中, 4 000 g (Heraeus, 角转头)离心30 min, 收集浓缩液即为粗提的MATSA, -60 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.4 MATSA的鉴定

1.4.1 间接荧光抗体染色^[10] 对木瓜蛋白酶处理前后的MSB1做间接荧光抗体染色, 一抗为制备的兔血清, 二抗为FITC标记的羊抗兔IgG。

1.4.2 间接ELISA法 以提取的MATSA为抗原包被ELISA板, 一抗为兔血清, 二抗为羊抗兔IgG-HRP, 底物为TMB, 做间接ELISA鉴定。

1.5 MATSA蛋白浓度测定

将分次提取的MATSA粗提液合并, 混匀, 做适当稀释后在紫外分光光度计上测OD₂₆₀和OD₂₈₀, 按以下公式计算蛋白质浓度。

蛋白质浓度(mg/mL) = $1.45 \times \text{OD}_{280} - 0.74 \times \text{OD}_{260}$

1.6 MATSA的纯化^[11]

1.6.1 凝胶的溶胀 称取15 g Sephadex G-75于500 mL烧杯中, 加225 mL洗脱缓冲液, 在室温下溶胀48 h以上, 期间反复倾去细颗粒, 直至液相不再混浊为止, 然后在沸水浴中溶胀3 h, 装柱前对凝胶进行脱气处理。

1.6.2 装柱 在无直接光照、无空气对流处垂直安装层析柱, 在层析柱的上端安装流动相接头, 在距柱上端约2 cm处作一记号。关闭层析柱的出水口, 向层析柱中加入洗脱缓冲液, 然后打开出水口, 待缓冲液剩余量约为柱体积的1/3时关闭出水口, 然后将溶胀后的凝胶浓浆液通过流动相接头缓慢倾入柱中, 待凝胶沉积高度约为1~2 cm时, 打开出水口, 流速为2 mL/min, 凝胶面上升至记号处时装柱完毕, 装柱过程中凝胶不能分层。柱高90 cm, 柱体积180 mL。

1.6.3 平衡 装柱完毕后, 将凝胶柱与层析仪连接好, 用至少2倍柱床体积的洗脱缓冲液洗涤凝胶柱(流速为1.5 mL/min), 以使其稳定, 平衡至电导率、紫外吸收均稳定。

1.6.4 上样与洗脱 凝胶柱平衡好后, 待平衡液流至柱床表面以下1~2 mm时(注意不能流干), 关闭出口, 用加样枪加入2 mL样品, 然后打开出口, 使样品渗入凝胶内, 用少量的洗脱液洗表面1~2次(应尽可能小的稀释样品)。当样品快流干时, 加洗脱液至柱床表面以上2~5 cm处, 接上恒压洗脱瓶开始层析, 流速为1.5 mL/min, 按照280 nm紫外吸收曲线分峰收集, 标记, -60 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.7 收集峰蛋白质的SDS-PAGE分析

积层胶50 g/L, 分离胶120 g/L, 上样量20 μL , 具体方法参照文献[12]。

2 结果与分析

2.1 MSB1的培养

MSB1细胞是鸡的肿瘤细胞系, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 条件下培养时, 细胞生长良好, 呈半贴壁或不贴壁状态, 倍增时间较短, 一般36~48 h倍增一代。在低倍镜下观察, 细胞呈圆形, 透亮, 折光性差(图1A)。中倍镜下, 可见细胞呈圆形, 大小稍有差别, 折光性较差, 细胞呈半贴壁状态, 轻轻晃动细胞瓶时有些细胞会悬浮(图1B, C, D)。

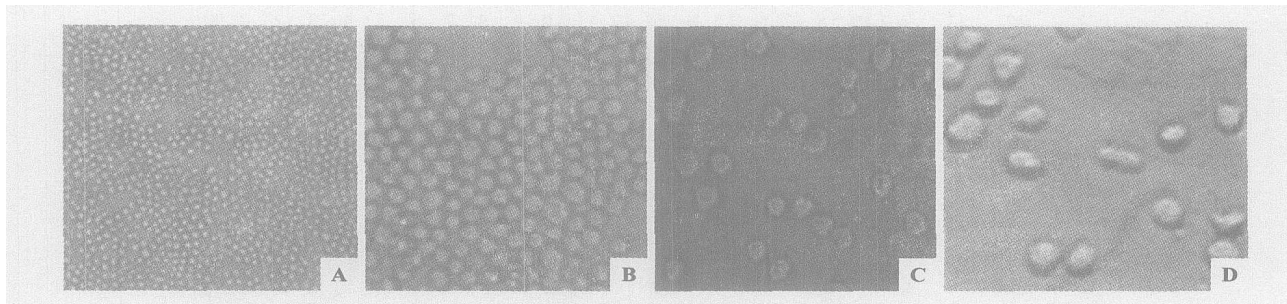


图1 培养不同时间的MSB1 细胞

A. 培养24 h ($\times 40$); B. 培养24 h ($\times 100$); C. 培养2 h ($\times 100$); D. 刚接种 ($\times 200$)

Fig 1 MSB1 cells cultured at different time

A. Cultured 24 h ($\times 40$); B. Cultured 24 h ($\times 100$); C. Cultured 2 h ($\times 100$); D. Just passaged ($\times 200$)

2.2 MATSA 的鉴定

2.2.1 间接荧光抗体染色 间接荧光抗体染色结果见图2。从图2可以看出,木瓜蛋白酶处理前,

MSB1 细胞表面的荧光亮度很强,用木瓜蛋白酶处理后,MSB1 细胞表面的荧光亮度明显减弱,表明从MSB1 细胞表面分离到MATSA。

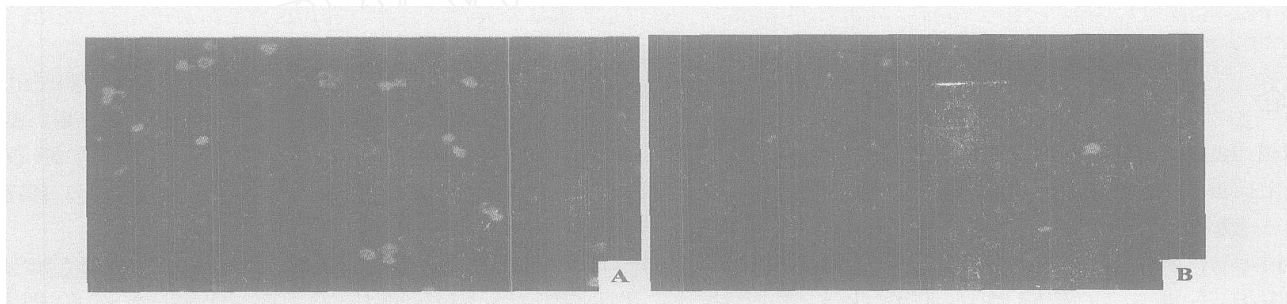


图2 木瓜蛋白酶处理前后MSB1 细胞间接荧光抗体染色结果

A. 处理前; B. 处理后

Fig 2 IFA of MSB1 cells before and after treatment by papain

A. Before treatment; B. After treatment

2.2.2 间接ELISA 以提取的MATSA 包被ELISA 板,稀释到1:400时,P/N 仍大于2:1,说明MATSA 粗提液中含有目的蛋白MATSA。

2.3 粗提的MATSA 蛋白浓度测定

根据紫外分光光度计测定的结果,计算粗提的MATSA 蛋白质浓度为10.64 mg/mL。

2.4 MATSA 的纯化

从图3可以看出,共得到3个色谱峰,其中峰1为主要的目的峰。样品在Sephadex G-75 凝胶柱上层析,主要的目的峰从55 mL 开始出现,110 mL 时出完。

2.5 纯化MATSA 蛋白质的SDS-PAGE 分析

将收集的各组分进行SDS-PAGE 分析,结果见图4。由图4可知,图4A 和图4B 均在约35 ku 处出现了条带,表明获得了纯化的MATSA。

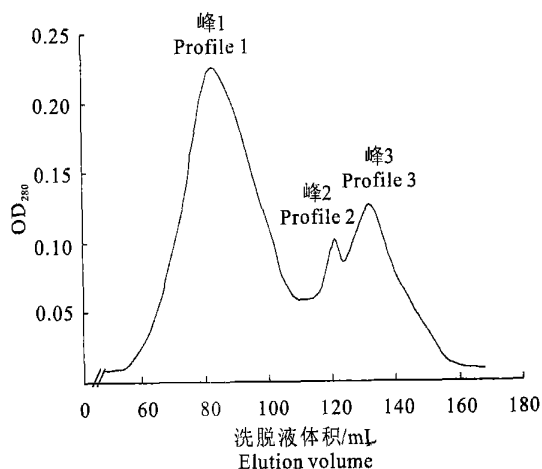


图3 MATSA Sephadex G-75 凝胶过滤的洗脱曲线

Fig 3 Elution curve of MATSA through Sephadex G-75 gel filtration

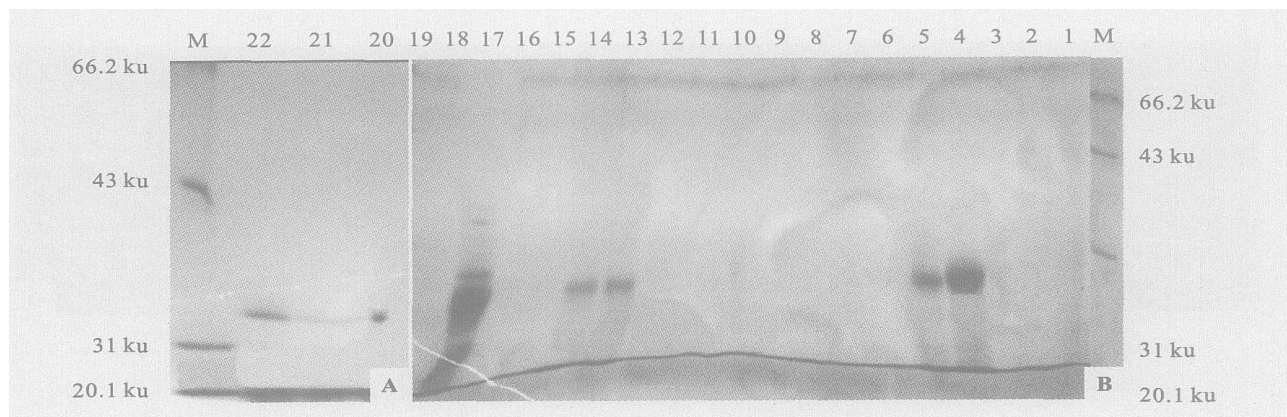


图4 纯化MATSA 的SDS-PAGE 结果

A. 洗脱峰峰顶组分; B. 洗脱峰多组分; M. Marker; 1~ 6 洗脱峰1 的组分; 7~ 11 洗脱峰2 的组分; 12~ 16 洗脱峰3 的组分; 17 未纯化的MATSA; 18~ 19 PBS 对照; 20~ 22 分别为洗脱峰1, 2, 3 峰顶组分

Fig 4 SDS-PAGE detection of purified MATSA

A. Fractions of crest of peak 1, 2 and 3; B. Fractions of profiles 1, 2 and 3; M. Marker; 1- 6 Fractions of profile 1; 7- 11. Fractions of profile 2; 12- 16 Fractions of profile 3; 17. Unpurified MATSA; 18- 19 PBS; 20 Fraction of profile 1; 21. Fraction of profile 2; 22 Fraction of profile 3

3 讨 论

1) M SB1 细胞是从MD 肿瘤组织中获得的1 株MD 成淋巴细胞系细胞, 从理论上讲, 其培养条件应该符合一般淋巴系肿瘤细胞的培养条件, 但在本试验培养过程中发现, 用1640 和M 199 做基础培养基培养均生长不佳。后来借鉴山东农业大学崔治中教授的方法, 改用DM EM 做基础培养基, 加入进口的胎牛血清, 效果很好。

2) MATSA 是MD 肿瘤细胞和MD 成淋巴细胞系细胞表面存在的特异性抗原, 免疫学研究表明, MATSA 是一种肿瘤相关抗原, 与MDV 诱导产生的生产性感染细胞中的抗原无关。从用高度吸收的抗血清间接免疫荧光试验获得的数据看, 仅5%~ 30% 的MD 肿瘤细胞上存在MATSA, 而几乎100% 的MD 成淋巴细胞系细胞上存在MATSA^[6], 穆杨^[7]等研究了MD 肿瘤细胞上MATSA 的分离与鉴定, 发现从MD 肿瘤细胞上获得的MATSA 含量很低, 而且肿瘤组织中其他的组织成分对后续的纯化工作影响较大, 而M SB1 细胞是从MD 肿瘤组织中获得的一株MD 成淋巴细胞系细胞, 因此本研究中作者以M SB1 细胞为材料分离并纯化了MATSA, 从结果来看, 效果不错。

3) Suzuki 等^[13]指出, 可以用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶等酶从MDCC-M SB1 细胞或其他来源于MD 淋巴瘤细胞系的细胞上溶解或消化有免疫活性的MATSA。Schat 等^[8]指出, 用木瓜蛋白酶可以从细胞表面分离MATSA, 而不影响细胞壁的通透性。本

试验用木瓜蛋白酶从M SB1 细胞表面分离MATSA, 以提取物做间接ELISA, 抗原在1 400 稀释后, P/N 仍大于2 1, 表明从M SB1 细胞表面分离到MATSA。

4) 蛋白质纯化是蛋白质研究中经常遇到的难题之一, 蛋白质纯化的方法很多, 本试验根据MATSA 的分离过程和前人的研究结果, 对粗分离的MATSA 先进行透析, 以除去其中的盐分和可能混入的小分子蛋白, 然后超滤浓缩, 并进一步除去可能混入的小分子蛋白, 然后采用Sephadex G-75 凝胶过滤, 最后获得了纯化的MATSA。

5) 不同文献中报道的MATSA 相对分子质量相差较大, Horie 等^[14]用单克隆抗体2B9 和兔抗MATSA 血清检测MDCC-M SB1-clb. 18 细胞上MATSA 的相对分子质量为70 ku; Ross^[4]用兔抗MATSA 血清从M SB1 细胞提取物中经免疫沉淀获得的MATSA 相对分子质量为40 ku; Dandapat 等^[9]报道的MD 淋巴瘤细胞上最具保护性作用的MATSA 相对分子质量为13~ 14 ku。Ikuta 等^[15]认为, MD 淋巴瘤细胞表面的MATSA 与MD 成淋巴细胞系细胞表面的MATSA 是相关的, 但血清学特性不一致。Higashihara 等^[16]认为, M SB1 细胞上的MATSA 的抗原性可以分为2 种: 一种决定簇对不同的成淋巴细胞系细胞或MD 瘤细胞而言是普遍存在的; 另一种决定簇对肿瘤细胞或成淋巴细胞系细胞而言是特异的。Horie 等^[14]认为, 他们检测到MATSA 可能是MDCC-M SB1-clb. 18 细胞特异性的, 而Ross 等^[4]检测到的MATSA 可能是不同细胞

系上普遍存在的 MATSA。本试验提取的 MATSA 与 Ross 等报道的一致。经纯化后电泳显示, 相对分子质量约为 35 ku, 与

[参考文献]

- [1] Marek J. Multiple nerve nentzuendung (Polyneuritis) bei huehnern[J]. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 1907, 15: 417-421.
- [2] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 1051-1066.
- [3] Witter R L, Stephens E A, Shama J M, et al. Demonstration of a tumor-associated surface antigen in Marek's disease[J]. J Immunol, 1975, 115: 177-183.
- [4] Ross L J. Characterization of an antigen associated with the Marek's disease lymphoblastoid cell line M SB1[J]. J Gen Virol, 1982, 60: 375-380.
- [5] Nuann U, Witter R L. Differential diagnosis of lymphoid leucosis and Marek's disease by tumor-associated criteria[J]. Avian Dis, 1979, 23: 417-433.
- [6] Murthy K K, Calnek B W. Pathogenesis of Marek's disease: early appearance of Marek's disease tumor-associated surface antigen in infected chicken[J]. J Nat Cancer Inst, 1978, 61(3): 849-854.
- [7] 穆 杨, 王玉东, 张彦明, 等. 马立克氏病肿瘤细胞表面抗原的提取与鉴定[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 48-50.
- [8] Schat K A, Murthy K K. *In vitro* cytotoxicity against Marek's disease lymphoblastoid cell lines after enzymatic removal of Marek's disease tumor-associated surface antigen[J]. J Virol, 1980, 34(1): 130-135.
- [9] Dandapat S, Pradhan H K, Mohanty G C. Antitumor antibodies to Marek's disease tumor-associated surface antigen in protection against Marek's disease[J]. Vet Immunol Immunopathol, 1994, 40: 353-366.
- [10] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998: 414-426.
- [11] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 212-230.
- [12] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 1999: 1713-1721.
- [13] Suzuki K, Mikami T, Onuma M, et al. Properties of Marek's disease tumor-associated surface antigen of M SB-1 cells[J]. Zentralbl Vet-erinmed B, 1981, 28(9-10): 684-92.
- [14] Horie M, Ohashi K, Kodama H, et al. Analysis of Marek's disease tumor-associated surface antigen on MDCC-M SB1-clone 18 cells[J]. Int J Cancer, 1991, 47(2): 238-243.
- [15] Ikuta K, Ueda S, Kato S, et al. Isolation of monoclonal antibodies reactive with Marek's disease tumor-associated surface antigen (MATSA) [J]. Biogen, 1984, 27(4): 183-188.
- [16] Higashihara T, Mikami T, Ohashi K, et al. Monoclonal antibodies against Marek's disease tumor-associated surface antigen[J]. Jpn J Vet Sci, 1984, 46: 649-658.

Separation and identification and purification of Marek's disease tumor-associated surface antigen on M SB1 cells

M U Yang¹, ZHANG Yan-ming¹, TONG De-wen¹, WANG Yu-dong²,

L I Wei², L I Yu-qing², ZHENG Zeng-ren²

(1 College of Animal Sci-Tech, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 National Animal Quarantine Institute, MOA, Qingdao, Shandong 266032, China)

Abstract M SB1 cells were harvested and washed three times with phosphate buffer saline, and then the concentration was regulated to be $2 \times 10^6/\text{mL}$. 2 IU papain and 1 mmol/L L-cystine 0.1 mL to 2×10^6 M SB1 cells were added and then incubated 1h in 37 °C. Normal M SB1 and M SB1 treated with papain were detected with indirect fluorescent antibody assay to indicate whether MATSA was removed from M SB1 cells. Crude extract of MATSA was concentrated and purified using ultrafiltration and gel filtration of Sephadex G-75. SDS-PAGE detected purification result detected which proved that MATSA had been removed from MBS1 cells by indirect fluorescent antibody assay. Detection of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis indicated that MATSA had been separated and purified. The molecular weight of purified MATSA was about 35 ku.

Key words: M SB1; marek's disease tumor-associated surface antigen; separation and purification of MATSA