

网络出版时间:2012-09-25 10:07

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120925.1007.020.html>

大眼鲈鱼真皮肿瘤病毒(WDSV)辅助 基因 *orfA* 和 *orfC* 多抗的制备及初步应用

李 铎, 徐 坤, 王亮亮, 周 罡, 麻丽霞, 张智英

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 【目的】制备大眼鲈鱼真皮肿瘤病毒(WDSV)辅助基因 *orfA* 和 *orfC* 的多克隆抗体,并用其检测酵母和肿瘤细胞中目的蛋白的表达。【方法】以 WDSV 基因组序列为模板,PCR 扩增 WDSV *orfA* 和 *orfC* 基因,分别构建其原核表达载体,转化 Rosseta(DE3)感受态细胞,经 IPTG 诱导表达并纯化重组蛋白后,采用皮下多点注射结合耳静脉加强免疫的方法免疫新西兰白兔,制备抗 *orfA* 和抗 *orfC* 的多克隆抗体,用 Western blot 法检测抗体的特异性。用制备的多克隆抗体检测 *orfA* 和 *orfC* 融合蛋白在酵母和 HeLa299、SPC-A-1 肿瘤细胞中的表达。【结果】PCR 扩增获得了 WDSV *orfA* 和 *orfC* 基因。成功构建了 *orfA* 和 *orfC* 基因的原核表达载体并进行了诱导表达,*orfA* 和 *orfC* 重组融合蛋白以包涵体形式存在;采用皮下注射结合耳静脉加强免疫有效地提高了抗体效价,成功制备得到了兔抗 *orfA* 和兔抗 *orfC* 血清,抗体效价达 $1:8\,000\sim 1:10\,000$;通过 Western blot 法,利用上述抗血清分别检测到了原核表达的目的蛋白及酵母和肿瘤细胞中表达的目的蛋白。【结论】制备得到的抗 *orfA* 和抗 *orfC* 多克隆抗体具有很好的特异性,能够用于原核表达、酵母和肿瘤细胞中表达的目的蛋白的 Western blot 检测。

[关键词] 大眼鲈鱼真皮肿瘤病毒;*orfA* 基因;*orfC* 基因;原核表达;多克隆抗体

[中图分类号] S865.3⁺37.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2012)10-0023-08

Preparation and preliminary application of polyclonal antibodies of walleye dermal sarcoma virus(WDSV)accessory genes *orfA* and *orfC*

LI Duo, XU Kun, WANG Liang-liang, ZHOU Gang, MA Li-xia, ZHANG Zhi-ying

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The study was done to prepare polyclonal antibodies of walleye dermal sarcoma virus(WDSV)accessory genes *orfA* and *orfC* and to analyze the *orfA* and *orfC* proteins expressed in yeast and mammalian cells. 【Method】In this research, the WDSV genes *orfA* and *orfC* were amplified from walleye dermal sarcoma virus complete genome and cloned into pET32a(+) to construct the prokaryotic expression vectors. Subsequently, Rosseta(DE3)competent cells were transformed with the constructed expression vectors, and the *orfA* and *orfC* recombinant proteins were prepared by induction with IPTG and purified by washing with 2 mol/L and 4 mol/L urea solution, successively. The purified proteins were used to immunize New Zealand rabbits using the method of hypodermic injection coupled with ear vein booster immunization. The specificities of the polyclonal antibodies prepared were checked by Western blot analysis. Subsequently, the anti-*orfA* and anti-*orfC* rabbit serums were preliminarily applied to confirm the ex-

[收稿日期] 2012-02-22

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30870119)

[作者简介] 李 铎(1989—),男,湖北襄阳人,在读硕士,主要从事抗体制备及转基因动物研究。

[通信作者] 张智英(1958—),男,陕西兴平人,教授,博士生导师,主要从事动物基因组学、动物病毒及其在癌症治疗中的应用研究。

pression of *orfA* and *orfC* proteins in yeast and tumor cells. 【Result】 The prokaryotic expression vectors of *orfA* and *orfC* were constructed and the expression was induced successfully. The *orfA* and *orfC* recombinant fusion proteins were in the form of inclusion bodies. The method of hypodermic injection coupled with era vein booster immunization improved the antibody titers effectively. The expressions of *orfA* and *orfC* proteins in yeast and tumor cells were checked successfully with the anti-*orfA* and anti-*orfC* rabbit serums. 【Conclusion】 The results showed that the polyclonal antibodies were prepared with high specificity and could be used in Western blot analysis for the expression of the target proteins in bacteria, yeast and mammalian cells.

Key words: Walleye dermal sarcoma virus(WDSV); *orfA*; *orfC*; prokaryotic expression; polyclonal antibody

大眼鲈(Walleye)属鲈形目, 鲈科, 鲈属, 原产于北美洲东部。大眼鲈鱼真皮肿瘤(Walleye dermal sarcoma, WDS)是由大眼鲈鱼真皮肿瘤病毒(Walleye dermal sarcoma virus, WDSV)引起的, 该肿瘤在秋季开始生长, 冬季保持稳定的水平, 春季萎缩, 夏季基本消失^[1-5]。这种季节性生长和萎缩的WDS, 为研究肿瘤的自然萎缩提供了一个独特的生物学模型。WDSV 是一种逆转录病毒, 兼具肿瘤病毒和慢病毒的特征, 在其基因组中除了病毒所需的基本结构基因外, 还有 3 个辅助基因, 分别被命名为 *orfA*、*orfB* 和 *orfC*^[6-7]。Quackenbush 等^[7]比较了不同 WDS 组织中 WDSV 辅助基因的表达量, 结果发现, 萎缩期 WDS 中辅助基因的表达量是生长期的 100 多倍, 表明辅助基因在肿瘤萎缩过程中起着极其重要的作用。

WDSV 辅助基因 *orfA* 位于 *env* 基因的下游, 编码 297 个氨基酸残基, 其表达产物 *orfA* 定位于细胞核^[8], 因其 N 端含有一个 Cyclin box 并与细胞周期蛋白具有一定的同源性, 故也被称为逆转录病毒周期蛋白(Retroviral-Cyclin, Rv-Cyclin)^[9]。目前, 对 WDSV 辅助基因 *orfA* 的功能仍存在争议^[10-18], 但 *orfA* 能够抑制 WDSV 启动子转录活性^[14-15]的观点已经被广泛接受, 因此目前公认 *orfA* 具有调控 WDSV 基因和细胞内其他基因表达的功能。表达 *orfA* 的转基因鼠伤口处表现出癌变特征^[16]; 而在转基因斑马鱼中表达 *orfA* 则能抑制致癌物质引起的肝癌的发生^[17-18]。因此, *orfA* 可能是一个潜在的肿瘤相关基因, 但对其生物学功能有待深入研究。

关于 WDSV 辅助基因 *orfB* 和 *orfC* 的研究相对较少。*orfB* 位于 *orfA* 基因的下游, 编码 306 个氨基酸残基。*orfB* 表达产物定位于细胞质膜, 能与 RACK1(Receptor for Activated C Kinase 1)相互作用, 促进细胞增殖, 增强细胞的生存能力^[19]。*orfC*

位于 *gag* 基因的上游, 编码 119 个氨基酸残基。Nudson 等^[20]研究发现, *orfC* 基因在萎缩期肿瘤中的表达量远高于生长期肿瘤; *orfC* 在细胞中的表达产物主要分布在细胞质和线粒体内, 细胞呈现凋亡特征, 推测 *orfC* 可能参与细胞凋亡的线粒体途径。

综上所述, 笔者认为 WDSV 辅助基因的表达与 WDS 的发生和自然萎缩调控有关, 尤其是 *orfA* 和 *orfC* 基因, 其很可能参与了 WDS 萎缩的调控过程, 但这有待进一步研究。本试验制备了鱼类逆转录病毒 WDSV 辅助基因蛋白 *orfA* 和 *orfC* 的多克隆抗体, 旨在为进一步研究 *orfA* 和 *orfC* 基因在肿瘤萎缩过程中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

免疫用新西兰白兔, 购自西北农林科技大学种兔场。酵母双杂交诱饵表达载体 pGBKT7-*orfA* 和 pGBKT7-*orfC*, 重组腺病毒 Ad-CK、Ad-*orfA* 和 Ad-*orfC*, 大肠杆菌菌株 DH5 α 和 Rosseta(DE3), 酵母菌株 AH109, WDSV 基因组全长克隆载体 pWDSV, 原核表达载体 pET32a(+) 及酵母表达载体 pGBKT7, 均由西北农林科技大学动物科技学院动物基因组学实验室保存。HeLa229 宫颈癌细胞、SPC-A-1 肺腺癌细胞, 均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, 经实验室传代冻存; 试验用 DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶, 购自 NEB 公司; Easy Taq DNA 聚合酶、Trans2K Plus DNA Marker、ProteinRuler II 蛋白 Marker 和 EasySee Western Marker, 购自全式金生物技术有限公司。胶回收试剂盒, 购自威格拉斯生物技术有限公司; 质粒小提试剂盒, 购自 Omega 公司。弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、细胞培养用试剂, 购自 Sigma 公司。RIPA 裂解缓冲液, 购自普利莱基因技术有限

公司。一步法快速 WB(HRP)试剂盒(兔),购自康为世纪公司。Western blot 用 PVDF 膜、ECL 显色液,购自 Millipore 公司。异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG),购自 Promega 公司。其他试剂均为分析纯或更高级别试剂。

1.2 WDSV *orfA* 和 *orfC* 基因原核表达载体的构建

根据 GenBank 中 WDSV 基因组序列(GenBank 登录号:AF033822.1),分别设计辅助基因 *orfA*、*orfC* 的 PCR 引物,引物由上海博尚生物技术有限公司合成,其序列如表 1 所示。

表 1 WDSV *orfA* 和 *orfC* 基因的 PCR 引物

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')
orfA-F	GCGAATTCGTCATGGATATCCCTGTAGAG
orfA-R	CGCCTCGAGTTATCCTATTGGATCGACGAC
orfC-F	CCCAGATCTAGTCATGGCTTGGTATCATCAG
orfC-R	ATCCTCGAGTTAGTTTGTAGCCAAAT

注:orfA-F 引物序列中下划线部分为 *EcoR* I 酶切位点;orfA-R 和 orfC-R 引物序列中下划线部分为 *Xho* I 酶切位点;orfC-F 引物序列中下划线部分为 *Bgl* II 酶切位点。

Note:The underlined sequence in orfA-F primer is restriction site of *EcoR* I ; the underlined sequence in orfA-R and orfC-R primer are restriction site of *Xho* I ; the underlined sequence in orfC-F primer is restriction site of *Bgl* II .

以 WDSV 基因组全长克隆载体 pWDSV 为模板,根据 Easy Taq DNA Polymerase 说明书,PCR 扩增 *orfA*、*orfC* 基因片段,PCR 反应体系为 50 μL,反应条件为:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 30 s,52 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物经 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测后,*orfA* 用 *EcoR* I /*Xho* I 双酶切,*orfC* 用 *Bgl* II /*Xho* I 双酶切,胶回收纯化目的片段,分别将其定向克隆到表达载体 pET32a(+)中,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,涂 LB/Amp 平板,挑取 pET32a-*orfA*、pET32a-*orfC* 阳性克隆在 LB/Amp 液体培养基中培养 8 h。根据 E. Z. N. A.™ Plasmid Mini Kit I 说明书提取质粒 pET32a-*orfA* 和 pET32a-*orfC*,分别经 *EcoR* I /*Xho* I 和 *Bgl* II /*Xho* I 双酶切鉴定后,阳性质粒送华大基因公司进行测序分析。

1.3 WDSV *orfA* 和 *orfC* 融合蛋白的诱导表达与纯化

用 pET32a-*orfA*、pET32a-*orfC* 重组原核表达载体分别转化 Rosseta (DE3) 感受态细胞,涂

LB/Amp 平板筛选阳性克隆。将筛选的阳性克隆接种于 2 mL 的 LB/Amp 液体培养基中,37 ℃摇菌过夜后以 1 : 100 的比例(体积比)接种于 2 mL 新鲜的 LB/Amp 液体培养基中,摇菌至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,37 ℃诱导表达 3~4 h,收集菌液,备用。将收集的菌液于 4 ℃条件下 12 000 r/min 离心 2 min,菌体沉淀用 PBS 溶液重悬,冰浴超声波破碎 30 min(破碎 5 s,间歇 5 s)后,于 4 ℃下 12 000 r/min 离心 2 min,分别收集上清及沉淀,以未诱导的菌体破碎液为对照,进行 SDS-PAGE 电泳检测,初步确定融合蛋白的存在形式。

取阳性克隆菌液以 1 : 100 的比例(体积比)接种 100 mL 新鲜的 LB/Amp 液体培养基,摇菌至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时,加 IPTG 诱导,大量制备 *orfA*、*orfC* 融合蛋白。收集菌体,超声波破碎后离心,弃除上清,用 PBS 溶液重悬沉淀,依次用 2 和 4 mol/L 的尿素各洗涤 1 次,最后用 8 mol/L 的尿素溶解,装入生物半透膜透析袋中,依次置于 6,4 和 2 mol/L 的尿素溶液中透析纯化,最后置 PBS 溶液中透析去除蛋白溶液中的尿素。采用核酸蛋白检测仪检测纯化后溶液中的蛋白含量,SDS-PAGE 电泳检测蛋白的纯化效果。

1.4 WDSV *orfA* 和 *orfC* 融合蛋白多克隆抗体的制备

将上述纯化得到的 *orfA*、*orfC* 重组融合蛋白分别进行 SDS-PAGE 电泳,用预冷的 0.5 mol/L KCl 溶液染色^[21]后,切下目的条带,于预冷的研钵中液氮研磨成粉末后用灭菌的 PBS 溶液溶解,加等体积的弗氏完全佐剂充分乳化后,皮下多点注射免疫新西兰白兔,剂量为 0.3 mg/只。试兔免疫前耳静脉采血 2 mL,制备阴性血清作为对照,备用。首次免疫后 2 周,用同样剂量的抗原与弗氏不完全佐剂充分乳化后进行加强免疫(二免),之后每隔 1 周加强免疫 1 次,共免疫 2 次,免疫剂量和途径同二免。末次皮下注射免疫 4 d 后,耳静脉采血 2 mL,制备抗血清,ELISA 法检查抗体效价。为了提高抗体效价,在末次皮下注射免疫 7 d 后,耳静脉注射纯化蛋白溶液加强免疫^[22],每天 1 次,连续 3 次,每次剂量为 0.3 mg/只。末次耳静脉注射免疫 4 d 后,耳静脉采血 2 mL,制备抗血清,采用 ELISA 法检测抗体效价;7 d 后,心脏采血 50 mL,分离抗血清。

ELISA 法检测抗体效价时,先用 10 μg/mL 纯化后的 *orfA*、*orfC* 重组融合蛋白溶液包被 96 孔酶

标板,每孔 100 μ L,以免疫前的兔血清作为阴性对照,进行 ELISA 检测,一抗为梯度稀释的兔抗血清,二抗为羊抗兔 IgG 酶标抗体,用 TMB 进行显色反应,用酶标仪于 450 nm 处检测吸光值(OD₄₅₀)。

1.5 WDSV orfA 和 orfC 融合蛋白多克隆抗体特异性的 Western blot 检测

以未诱导的菌体破碎液为对照,取纯化后的 orfA、orfC 重组融合蛋白分别进行 SDS-PAGE 电泳,冰上 60 V 转膜 2 h,使用一步法快速 WB(HRP)试剂盒(兔)按其操作说明进行 Western blot 检测,一抗为 1 : 1 000 倍稀释的末次耳静脉注射免疫 4 d 后的兔抗血清,采用 ECL 法显色。试验以免疫前的兔血清作为阴性对照。

1.6 酵母和肿瘤细胞中 orfA 和 orfC 蛋白表达的检测

将 orfA、orfC 基因的酵母双杂交诱饵表达载体 pGBKT7-orfA、pGBKT7-orfC 及其母载体 pGBKT7 分别转化酵母菌株 AH109,涂无色氨酸的 SD 平板,30 $^{\circ}$ C 培养 3 d,挑取阳性克隆分别接种于 5 mL 无色氨酸的 SD 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C 震荡培养 24 h,收集菌液,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 2 min。菌体沉淀用 PBS 溶液重悬,冰浴超声波破碎 30 min (破碎 5 s,间歇 5 s)。以转化 pGBKT7 的 AH109 为对照,对菌体破碎液进行 SDS-PAGE 电泳,分别以最终制备的兔抗 orfA 血清和兔抗 orfC 血清为一

抗,用 Western blot 法检测 orfA 和 orfC 融合蛋白的表达情况。

以没有插入 orfA、orfC 基因片段的重组腺病毒 Ad-CK 为对照,用 orfA、orfC 基因的重组腺病毒 Ad-orfA 和 Ad-orfC 分别感染宫颈癌细胞 He-La229 和肺腺癌细胞 SPC-A-1,感染后 36~48 h 收集细胞,经 RIPA 裂解缓冲液裂解后收集上清液,分别以最终制备的兔抗 orfA 血清和兔抗 orfC 血清为一抗,用 Western blot 法检测 orfA 和 orfC 蛋白的表达情况。

2 结果与分析

2.1 WDSV orfA 和 orfC 基因的 PCR 扩增

PCR 扩增出了 WDSV 约 900 bp 的 orfA 目的基因片段和约 380 bp 的 orfC 目的基因片段(图 1)。

2.2 pET32a-orfA、pET32a-orfC 的双酶切鉴定及测序分析

pET32a-orfA 阳性质粒经 *Eco*R I / *Xho* I 双酶切鉴定,获得了 5 874 bp 的载体片段和 895 bp 的 orfA 基因片段(图 2),与预期结果一致。pET32a-orfC 阳性质粒经 *Bgl* II / *Xho* I 双酶切鉴定,获得了 5 817 bp 的载体片段和 373 bp 的 orfC 基因片段(图 2),与预期结果一致。测序分析结果显示,orfA 和 orfC 基因序列均无突变。

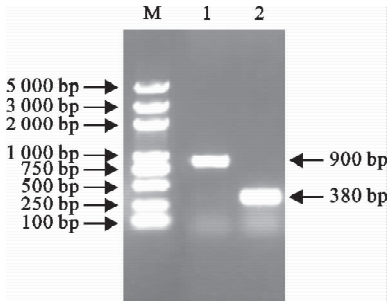


图 1 WDSV orfA 和 orfC 基因的 PCR 扩增

M. Trans2K Plus DNA Marker;1. orfA 基因的 PCR 扩增产物;2. orfC 基因的 PCR 扩增产物

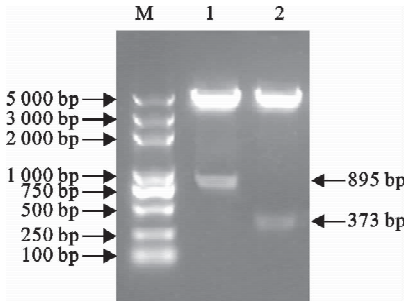


图 2 重组质粒 pET32a-orfA 和 pET32a-orfC 的双酶切鉴定

M. Trans2K Plus DNA Marker;1. pET32a-orfA 经 *Eco*R I / *Xho* I 双酶切的产物;2. pET32a-orfC 经 *Bgl* II / *Xho* I 双酶切的产物

Fig.1 PCR product of WDSV orfA and orfC genes

M. Trans2K Plus DNA Marker; 1. PCR product of orfA gene; 2. PCR product of orfC gene

Fig.2 Double digestion of recombinant plasmids

pET32a-orfA and pET32a-orfC

M. Trans2K Plus DNA Marker; 1. pET32a-orfA digested by *Eco*R I / *Xho* I ; 2. pET32a-orfC digested by *Bgl* II / *Xho* I

2.3 WDSV orfA 和 orfC 基因的原核表达与目的蛋白的纯化

SDS-PAGE 电泳结果显示,通过诱导表达在菌体破碎后的沉淀中获得了约 51 ku 的 orfA 融合蛋

白和约 31 ku 的 orfC 融合蛋白,而破碎后上清和未诱导的菌体破碎液中均未检测到明显的目的条带(图 3),说明目的蛋白诱导表达成功,并且是以包涵体的形式存在。

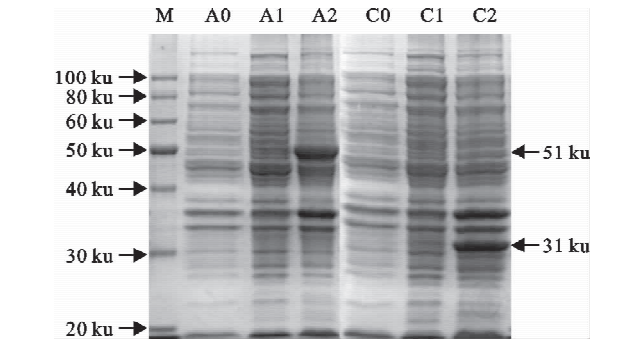


图 3 WDSV *orfA* 和 *orfC* 重组蛋白的原核表达
M. ProteinRuler II 蛋白 Marker; A0. 未诱导的转化 pET32a-*orfA* 重组菌破碎液; A1. IPTG 诱导的转化 pET32a-*orfA* 重组菌破碎后上清液; A2. IPTG 诱导的转化 pET32a-*orfA* 重组菌破碎后沉淀; C0. 未诱导的转化 pET32a-*orfC* 重组菌破碎液; C1. IPTG 诱导的转化 pET32a-*orfC* 重组菌破碎后上清液; C2. IPTG 诱导的转化 pET32a-*orfC* 重组菌破碎后沉淀
Fig. 3 Prokaryotic expression of *orfA* and *orfC* recombinant proteins

M. ProteinRuler II Protein Marker; A0. Whole cell lysate of uninduced rosetta transformed with pET32a-*orfA*;
A1. Supernatant after sonication of IPTG induced rosetta transformed with pET32a-*orfA*; A2. Sediment after sonication of IPTG induced rosetta transformed with pET32a-*orfA*;
C0. Whole cell lysate of uninduced rosetta transformed with pET32a-*orfC*; C1. Supernatant after sonication of IPTG induced rosetta transformed with pET32a-*orfC*; C2. Sediment after sonication of IPTG induced rosetta transformed with pET32a-*orfC*

在较低浓度的尿素溶液中,大部分菌体杂蛋白能够溶解而包涵体不易溶解。本试验 pET32a-*orfA* 和 pET32a-*orfC* 表达产物经用 2 和 4 mol/L 的尿素透析后,一定程度地纯化了诱导表达的融合蛋白(图 4),最终纯化后沉淀中大部分蛋白均是目的蛋白,电泳条带位置稍微靠后,这可能与上样溶液的 pH 值以及溶液中所含离子不同有关。

2.4 WDSV *orfA* 和 *orfC* 融合蛋白多克隆抗体的制备及其 Western blot 检测

末次皮下注射免疫 4 d 后,ELISA 检测多克隆抗体效价并不理想;末次耳静脉注射免疫 4 d 后进行 ELISA 检测,效价得到明显提高,达 1 : 8 000 ~ 1 : 10 000,但仍显偏低,分析其原因,一方面在免疫兔子时,抗原为没有切除 Trx 和 His 标签的融合蛋白,可能导致产生部分非目的蛋白的特异性抗体;另一方面免疫前的阴性兔血清中含有各种不同的自然产生的抗体,而经尿素透析纯化后的包涵体蛋白中仍含有一定量的菌体杂蛋白,进而导致阴性对照中也出现了较强的免疫反应。

Western blot 检测结果显示,用 1 : 1 000 稀释的末次耳静脉注射免疫 4 d 后的兔抗血清能够分别特异性地检测到约 51 ku 的 *orfA* 融合蛋白和约 31 ku 的 *orfC* 融合蛋白,而用免疫前的阴性血清则不能检测到目的蛋白(图 5),说明抗 *orfA* 和抗 *orfC* 多克隆抗体制备成功,并具有很好的特异性。

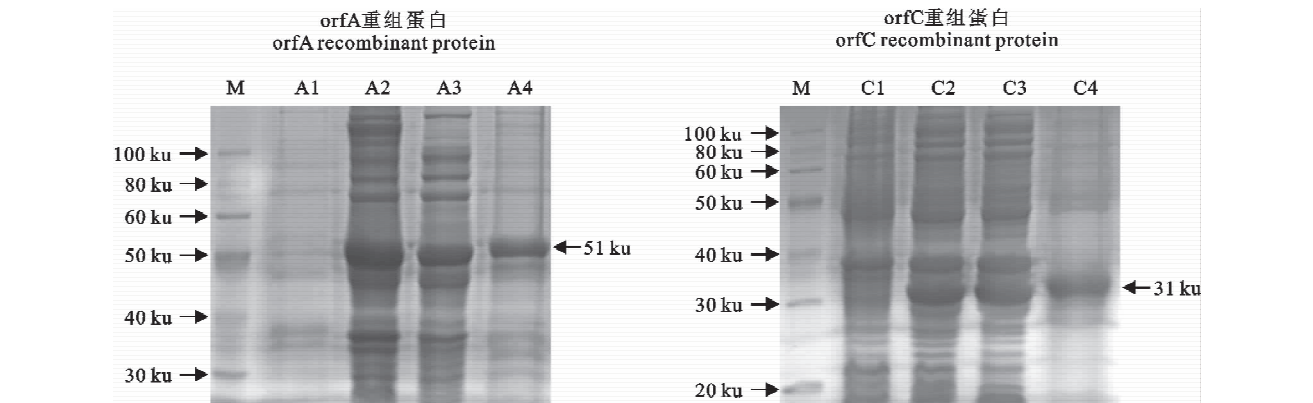


图 4 WDSV *orfA* 和 *orfC* 重组蛋白的纯化
M. ProteinRuler II 蛋白 Marker; A1、A2. 分别为 IPTG 诱导的转化 pET32a-*orfA* 重组菌破碎后的上清液和沉淀; A3、A4. 分别为经 2 mol/L 及经 2 和 4 mol/L 尿素溶液透析后的转化 pET32a-*orfA* 重组菌的破碎后沉淀; C1、C2. 分别为 IPTG 诱导的转化 pET32a-*orfC* 重组菌破碎后的上清液和沉淀; C3、C4. 分别为经 2 mol/L 及经 2 和 4 mol/L 尿素溶液透析后的转化 pET32a-*orfC* 重组菌的破碎后沉淀

Fig. 4 Purification of OrfA and OrfC recombinant proteins
M. ProteinRuler II Protein Marker; A1, A2. Supernatant and sediment after sonication of IPTG induced rosetta transformed with pET32a-*orfA* respectively; A3, A4. Sediment of induced rosetta transformed with pET32a-*orfA* after washing with 2 mol/L and 2 and 4 mol/L urea solution respectively; C1, C2. Supernatant and sediment after sonication of IPTG induced rosetta transformed with pET32a-*orfC* respectively; C3, C4. Sediment of induced rosetta transformed with pET32a-*orfC* after washing with 2 mol/L and 2 and 4 mol/L urea solution respectively

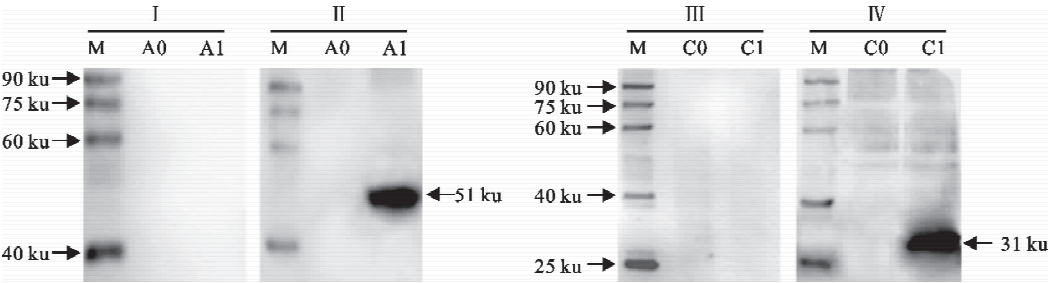


图 5 WDSV *orfA* 和 *orfC* 融合蛋白多克隆抗体特异性的 Western blot 检测

I. 免疫 *orfA* 重组蛋白前兔血清的 Western blot 结果; II. 兔抗 *orfA* 重组蛋白兔血清的 Western blot 结果; III. 免疫 *orfC* 重组蛋白前兔血清的 Western blot 结果; IV. 兔抗 *orfC* 重组蛋白兔血清的 Western blot 结果; M. EasySee Western Marker; A0. 未诱导的转化 pET32a-*orfA* 重组菌破碎液; A1. 纯化的 *orfA* 重组蛋白; C0. 未诱导的转化 pET32a-*orfC* 重组菌破碎液; C1. 纯化的 *orfC* 重组蛋白

Fig. 5 Western blot analysis of the specificity of the prepared polyclonal antibodies

I. Western blot using rabbit serum before immunization with *orfA* recombinant protein; II. Western blot with anti-*orfA* rabbit serum; III. Western blot using rabbit serum before immunization with *orfC* recombinant protein; IV. Western blot with anti-*orfC* rabbit serum; M. EasySee Western Marker; A0. Whole cell lysate of uninduced rosseta transformed with pET32a-*orfA*; A1. Purified *orfA* recombinant protein; C0. Whole cell lysate of uninduced rosseta transformed with pET32a-*orfC*; C1. Purified *orfC* recombinant protein

2.5 酵母和肿瘤细胞中 *orfA* 和 *orfC* 蛋白表达的检测

应用最终制备的兔抗 *orfA* 血清和兔抗 *orfC* 血清分别成功检测到了酵母 AH109 中约 54 ku 的 *orfA* 和约 36 ku 的 *orfC* 融合蛋白的表达(图 6);同时,在 Ad-*orfA*、Ad-*orfC* 分别感染的 HeLa229 细胞和 SPC-A-1 细胞中也均检测到了约 34 ku 的 *orfA* 和 15 ku 的 *orfC* 蛋白的表达(图 7)。结果表明,上述所制备的抗体能够满足进一步研究的需要,为 WDSV 辅助基因 *orfA* 和 *orfC* 的相关研究奠定了基础。

相关,尤其是 *orfA* 和 *orfC* 很可能直接参与了 WDS 的萎缩过程,对其生物学功能的深入研究具有重要意义。目前,关于辅助基因 *orfA* 的功能尚存在争议,而针对 *orfB* 和 *orfC* 基因的研究很有限;另外,对这 3 个辅助蛋白尚无特异性的抗体,使得蛋白水平的相关研究受到了很大程度的限制。多克隆抗体具有制备简单、周期相对较短、滴度高等优点,能够满足 ELISA、Western blot、免疫组化等试验研究对抗体的要求,在基因功能研究中得到了广泛的应用^[22-24]。本试验构建了 WDSV 辅助基因 *orfA* 和 *orfC* 的原核表达载体,并成功进行了诱导表达。大量诱导表达重组蛋白后,本试验首先尝试使用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化 *orfA* 和 *orfC* 重组蛋白,但是由于 pH、蛋白结构等多种因素的影响,纯化效果并不理想。为了简化蛋白纯化过程,笔者利用在低浓度的尿素溶液中菌体杂蛋白能够溶解而包涵体不易溶解的特点,分别使用 2 和 4 mol/L 的尿素溶液透析包涵体沉淀,一定程度上纯化了重组蛋白。纯化后的重组蛋白中仍含有少量的菌体杂蛋白,因此笔者采用了 KCl 染色后切胶免疫的方法制备抗体。可能由于皮下注射免疫时,胶和蛋白的吸收效果较差,第 4 次皮下注射免疫 4 d 后,ELISA 检测多克隆抗体效价并不理想;在 4 次皮下注射免疫后,笔者进一步采用了耳静脉注射法加强免疫,成功提高了抗体效价。静脉免疫法能够有效地刺激机体免疫系统,提高抗体效价,缩短抗体制备周期,但因其可能增强动物机体的免疫耐受力^[25]而未能得到重视和广泛应用。本研究结合常规的皮下多点注射免疫

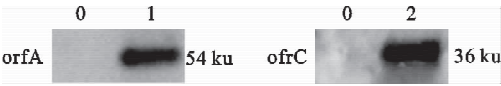


图 6 酵母菌株 AH109 中 *orfA*、*orfC* 融合蛋白表达的 Western blot 检测

0. 转化 pGBKT7 的 AH109 酵母菌破碎液;1. 转化 pGBKT7-*orfA* 的 AH109 酵母菌破碎液;2. 转化 pGBKT7-*orfC* 的 AH109 酵母菌破碎液

Fig. 6 Western blot analysis for OrfA and OrfC fusion proteins expressed in AH109

0. Lysate of AH109 transformed with pGBKT7; 1. Lysate of AH109 transformed with pGBKT7-*orfA*; 2. Lysate of AH109 transformed with pGBKT7-*orfC*

3 讨 论

季节性生长和萎缩的 WDS 为肿瘤萎缩的机理研究提供了一个独特的生物学模型。WDSV 辅助基因的表达与 WDS 的发生和自然萎缩的调控密切

和耳静脉连续加强免疫的方法,成功制备了 *orfA* 和 *orfC* 的多克隆抗体,为以后其他蛋白多克隆抗体的快速制备提供了借鉴和参考。Western blot 检测表明,上述制备的多克隆抗体具有很好的特异性,能与原核表达及酵母和肿瘤细胞中表达的目的蛋白发生特异性免疫反应。

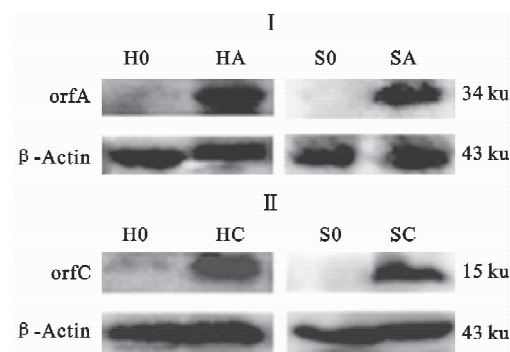


图 7 肿瘤细胞中 *orfA*、*orfC* 蛋白表达的 Western blot 检测
I. 兔抗 *orfA* 血清的 Western blot 结果; II. 兔抗 *orfC* 血清的 Western blot 结果; H0. 感染重组腺病毒 Ad-CK 的 HeLa229 细胞裂解液; HA. 感染重组腺病毒 Ad-*orfA* 的 HeLa229 细胞裂解液; HC. 感染重组腺病毒 Ad-*orfC* 的 HeLa229 细胞裂解液; S0. 感染重组腺病毒 Ad-CK 的 SPC-A-1 细胞裂解液; SA. 感染重组腺病毒 Ad-*orfA* 的 SPC-A-1 细胞裂解液; SC. 感染重组腺病毒 Ad-*orfC* 的 SPC-A-1 细胞裂解液
Fig. 7 Western blot analysis for *orfA* and *orfC* proteins expressed in tumor cells

I. Western blot with anti-*orfA* rabbit serum; II. Western blot with anti-*orfC* rabbit serum; H0. Lysate of HeLa229 cells infected with recombinant adenovirus Ad-CK; HA. Lysate of HeLa229 cells infected with recombinant adenovirus Ad-*orfA*; HC. Lysate of HeLa229 cells infected with recombinant adenovirus Ad-*orfC*; S0. Lysate of SPC-A-1 cells infected with recombinant adenovirus Ad-CK; SA. Lysate of SPC-A-1 cells infected with recombinant adenovirus Ad-*orfA*; SC. Lysate of SPC-A-1 cells infected with recombinant adenovirus Ad-*orfC*

总之,本研究成功进行了 WDSV 辅助基因 *orfA* 和 *orfC* 的原核表达,结合皮下多点注射免疫和耳静脉加强免疫的方法,制备了抗 *orfA* 和抗 *orfC* 的多克隆抗体,并初步应用于酵母和肿瘤细胞中目的蛋白的检测,为进一步研究 WDSV 辅助基因的功能及其在肿瘤萎缩中的作用奠定了基础。

[参考文献]

[1] Bowser P R, Wolfe M J, Forney J L, et al. Seasonal prevalence of skin tumors from walleye(*Stizostedion vitreum*) from Oneida lake [J]. J Wildl Dis, 1988, 24(2): 292-298.
[2] Bowser P R, Wooster G A. Regression of dermal sarcoma in a adult walleyes [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1991, 3

(2): 147-150.
[3] Bowser P R, Wooster G A, Quackenbush S L, et al. Comparison of fall and spring tumors as inocula for experimental transmission of walleye dermal sarcoma [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1996, 8(1): 78-81.
[4] Martineau D, Renshaw R, Williams J R, et al. A large unintegrated retrovirus DNA species present in a dermal tumor present in a dermal tumor of walleye *Stizostedion vitreum* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1991, 10(3): 153-158.
[5] Martineau D, Bowser P R, Renshaw R R, et al. Molecular characterization of a unique retrovirus associated with a fish tumor [J]. J Virol, 1992, 66(1): 596-599.
[6] Holzschu D L, Martineau D, Fodor S K, et al. Nucleotide sequence and protein analysis of a complex piscine retrovirus, walleye dermal sarcoma virus [J]. J Virol, 1995, 69(9): 5320-5331.
[7] Quackenbush S L, Holzschu D L, Bowser P R, et al. Transcriptional analysis of walleye dermal sarcoma virus(WDSV) [J]. Virology, 1997, 237(1): 107-112.
[8] Rovnak J, Casey J W, Quackenbush S L. Intracellular targeting of walleye dermal sarcoma virus orf A(rv-cyclin) [J]. Virology, 2001, 280(1): 31-40.
[9] LaPierre L A, Casey J W, Holzschu D L. Walleye retroviruses associated with skin tumors and hyperplasias encode cyclin D homologs [J]. J Virol, 1998, 72(11): 8765-8771.
[10] Brewster C D, Birkenheuer C H, Vogt M B, et al. The retroviral cyclin of walleye dermal sarcoma virus binds cyclin-dependent kinases 3 and 8 [J]. Virology, 2011, 409(2): 299-307.
[11] Rovnak J, Hronek B W, Ryan S O, et al. An activation domain within the walleye dermal sarcoma virus retroviral cyclin protein is essential for inhibition of the viral promoter [J]. Virology, 2005, 342(2): 240-251.
[12] Rovnak J, Quackenbush S L. Walleye dermal sarcoma virus retroviral cyclin directly contacts TAF9 [J]. J Virol, 2006, 80(24): 12041-12048.
[13] Quackenbush S L, Linton A, Brewster C D, et al. Walleye dermal sarcoma virus rv-cyclin inhibits NF-kappaB-dependent transcription [J]. Virology, 2009, 386(1): 55-60.
[14] Rovnak J, Quackenbush S L. Walleye dermal sarcoma virus cyclin interacts with components of the mediator complex and the RNA polymerase II holoenzyme [J]. J Virol, 2002, 76(16): 8031-8039.
[15] Zhang Z, Martineau D. Walleye dermal sarcoma virus: orfA N-terminal end inhibits the activity of a reporter gene directed by eukaryotic promoters and has a negative effect on the growth of fish and mammalian cells [J]. J Virol, 1999, 73(10): 8884-8889.
[16] Lairmore M D, Stanley J R, Weber S A, et al. Squamous epithelial proliferation induced by walleye dermal sarcoma retrovirus cyclin in transgenic mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(11): 6114-6119.

[17] Paul T A,Rovnak J,Quackenbush S L,et al. Transgenic expression of walleye dermal sarcoma virus rv-cyclin(orfA) in zebrafish does not result in tissue proliferation [J]. Mar Biotechnol(NY),2011,13(2):142-150.

[18] Zhan H,Spitsbergen J M,Qing W,et al. Transgenic expression of walleye dermal sarcoma virus rv-cyclin gene in zebrafish and its suppressive effect on liver tumor development after carcinogen treatment [J]. Mar Biotechnol(NY),2010,12(6):640-649.

[19] Daniels C C,Rovnak J,Quackenbush S L. Walleye dermal sarcoma virus Orf B functions through receptor for activated C kinase(RACK1)and protein kinase C [J]. Virology,2008,375(2):550-560.

[20] Nudson W A,Rovnak J,Buechner M,et al. Walleye dermal sarcoma virus Orf C is targeted to the mitochondria [J]. J Gen Virol,2003,84(2):375-381.

[21] 杨涵江,辛颖,麻丽霞,等. 鸡 *PLA2* 基因的克隆与原核表达及 *PLA2* 蛋白卵黄抗体的制备 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2011,39(11):48-52.

Yang H J,Xin Y,Ma L X,et al. Cloning and expression of chicken *PLA2* gene and preparation of hen egg yolk immunoglobulin against chicken *PLA2* [J]. Journal of Northwest A & F University:Nat Sci Ed,2011,39(11):48-52. (in Chinese)

[22] 张婷婷,周光现,王昕,等. 人 XIAP 基因多克隆抗体的快速制备方法研究 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2011,39(9):7-12.

Zhang T T,Zhou G X,Wang X,et al. Study on a rapid method for preparation of human XIAP polyclonal antibody [J]. Journal of Northwest A & F University:Nat Sci Ed,2011,39(9):7-12. (in Chinese)

[23] 杜平,尚佑军,马军武,等. FMDV 整联蛋白受体 $\beta 1$ 亚基的克隆及其配体黏附区多抗的制备 [J]. 生物工程学报,2008,24(5):874-880.

Du P,Shang Y J,Ma J W,et al. Cloning of foot-and-mouth disease virus integrin receptor $\beta 1$ subunit and antibody production to its ligand-binding domain [J]. Chin J Biotech,2008,24(5):874-880. (in Chinese)

[24] 江红,郑晓飞,罗瑛,等. 人端粒结合蛋白 TRF1 的克隆、表达和抗体制备 [J]. 生物工程学报,2004,20(1):30-33.

Jiang H,Zheng X F,Luo Y,et al. Cloning and expression of hTRF1 in *Escherichia coli* and preparation of polyclonal antibody [J]. Chin J Biotech,2004,20(1):30-33. (in Chinese)

[25] 李永柏,易岂建,李秋,等. 优选静脉免疫球蛋白剂量治疗川崎病临床与免疫学效应研究 [J]. 中华儿科杂志,1999,37(2):97-100.

Li Y B,Yi Q J,Li Q,et al. Which is the best dosage of intravenous immunoglobulin for treatment of Kawasaki disease;a comparative investigation on clinical and immunologic effects [J]. Chinese Journal of Pediatrics,1999,37(2):97-100. (in Chinese)