

# 马立克氏病毒感染的鸡肝脏肿瘤中热应激蛋白108含量的增高及其基因序列分析和表达的研究\*

李燕<sup>1,2</sup> 孟颂东<sup>1</sup> 陈溥言<sup>2</sup> 高福<sup>1,3</sup> 田波<sup>1\*\*</sup>

1. 中国科学院微生物研究所, 北京 100080;

2. 南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京 210095;

3. Clinic Medical School of Oxford University, Headington OX3 9D, UK

**摘要** 从马立克氏病毒(MDV)引起的鸡肿瘤肝脏组织中纯化热应激蛋白(hsp)108, 蛋白浓度测定结果显示, MDV感染后的鸡肝脏 hsp108 蛋白含量明显升高, 约为正常鸡肝脏 hsp108 的4倍, 发现鸡肝脏组织中 hsp108 含量在发生肿瘤后显著升高. 经酸释放得到与 hsp108 结合的多肽, 高压液相层析后没有发现 MDV 特异性多肽; 对 hsp108 进行了基因序列分析, MDV 感染引发的鸡肿瘤肝脏组织的 hsp108 与正常鸡肝脏组织的 hsp108 氨基酸完全相同, 没有发生变异; 克隆了鸡肝脏 hsp108 基因, 将其在大肠杆菌中表达, 纯化后与一个已知的乙肝病毒抗原表位进行体外组装, 结果显示重组 hsp108 蛋白可以和乙肝病毒抗原表位在体外特异性结合, 具有多肽结合活性.

**关键词** 马立克氏病毒 Hsp108 纯化 基因克隆与表达 结合特性

马立克氏病毒(MDV)是疱疹病毒科的一种细胞结合性肿瘤病毒, 严重危害养鸡业的发展, 近年来该病毒毒力呈增强趋势. MDV 在比较医学上具有广泛的生物学意义. 它是第一个被证实具有致肿瘤作用的疱疹病毒, 且马立克氏病(MD)也是第一个经使用疫苗可预防的肿瘤性疾病, 它是研究病毒性肿瘤特别是疱疹病毒肿瘤的理想实验模型<sup>[1]</sup>.

鸡热应激蛋白(hsp)108 是热应激蛋白家族的一个成员, 是哺乳动物 gp96 的同系物. Gp96 作为一种分子伴侣可结合细胞中的肽库. 研究发现, 当病毒感染或肿瘤发生时, gp96 能够与抗原肽结合, 然后将抗原肽呈递给 MHC I 类分子, 进而激活特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)和记忆性 T 细胞, 从而引发机体的细胞免疫反应<sup>[2]</sup>. 我们实验室从乙肝病毒引发的肝癌患者的肿瘤组织中分离到了与 gp96 结合的乙肝病毒核心抗原肽<sup>[3]</sup>. 这一发现使得研制新型的 gp96-抗原肽复合物疫苗治疗乙肝病毒引发的疾病成为可能. 而同样的方法也应该适用于其他病毒性疾病或肿瘤病. 另据 Blachere 等<sup>[4]</sup>报道,

gp96-多肽复合物也可在体外进行组装, 而且它所引发的免疫反应机制同体内产生的复合物免疫原性是一致的.

鸡热应激蛋白 hsp108 是哺乳动物 gp96 的同系物, 它作为一种转铁蛋白的受体得到了较为深入的研究<sup>[5-8]</sup>, 但该蛋白在免疫原性方面的作用还未见报道. 近年来 gp96 的一些激动人心的发现使得我们对鸡的 hsp108 产生了兴趣. 由于 MDV 是研究肿瘤的一个动物模型, 我们对 MDV 感染后的鸡 hsp108 进行了研究.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

健康 SPF 鸡由北京市农林科学院畜牧兽医研究所马立克氏病研究室提供; 用京-1 株 MDV 人工感染 1 日龄 SPF 雏鸡, 从 2 个月内因 MD 特异死亡的鸡获得肿瘤肝脏组织.

试剂及仪器: ConA Sepharose 4B, Sephadex G25, 20QE 阴离子柱, C2/C18 2. 1/10 反向层析

2002-12-31 收稿, 2003-03-05 收修改稿

\* 国家重点基础研究发展规划项目资助(批准号: G1999011902)

\*\* 联系人, E-mail: tianpo@sun.im.ac.cn

柱, Chelating Sepharose™ Fast Flow 及 Glutathione Sepharose™ 4B 均为 Pharmacia Biotech 公司产品;  $\alpha$ -葡萄糖苷酸钠及 TFA 为 Sigma 公司产品; anti-gp96/grp94 单克隆抗体为 NeoMarkers 公司产品; HRP 标记的 sheep-anti-mouse 二抗为 Vector 公司产品; 蛋白测定试剂盒为 Bio-Rad 公司产品; 10 ku 超滤浓缩管为 Gelman 公司产品; AKTA explorer 为 Pharmacia Biotech 公司产品; BioCAD perfusion chromatography system 为 Perkin-Elmer 公司产品; Polytron 匀浆器为 VWRCN 公司产品; Trizol 试剂为 GIBCO 公司产品; RT-PCR 试剂盒及 pMD18-T 载体均为 TaKaRa 公司产品; ExTaq, 限制性内切酶, T4 连接酶为大连 TaKaRa 公司; IPTG 为上海 Sangon 公司; DNA 回收试剂盒为博大公司产品; pET30a(+) 及 pGEX-6p-1 载体为本室保存; 荧光素标记的乙肝病毒核心抗原九肽(SYVNTNMGL) 由赛百胜公司合成。

根据文献[8]设计引物 1, 用于克隆 hsp108 基因; 设计引物 2 和引物 3, 分别用于将 hsp108 亚克隆到 pET30a(+) 及 pGEX-6p-1 载体上进行蛋白表达, 这两个重组蛋白都不含 hsp108 的信号肽区。

引物 1: P1 (5' 引物) AATTCTAGACTCAGCA-TCAGCAGGCC

P2 (3' 引物) AATCTCGAGAGTGCAG-GACAGTAGGTGA

引物 2: P3 (5' 引物) TTACCCGGGTGAGGAGGTG-GATGTGGAT (*Sma* I)

P4 (3' 引物) CCCTCGAGTTACAGT-GCGTCTTTTAC (*Xho* I)

引物 3: P5 (5' 引物) GTCATATGGAGGAGGTG-GATGTGGAT (*Nde* I)

P6 (3' 引物) CCCTCGAGCAGTTCGTC-TTTTACATC (*Xho* I)

## 1.2 方法

**1.2.1 Hsp108 的纯化及 Western-blot 分析** 根据我们已发表的提取方法<sup>[9]</sup>略加改变。取 -70℃ 保存的 MDV 感染引发的 SPF 鸡肿瘤肝脏组织 80 g, 加入 4 倍体积低渗缓冲液 (30 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.0) 及 1 mmol/L PMSF 试剂, 至冰浴中用 Polytron 匀浆器匀浆至 95% 以上肝细胞破碎。14 000 r/min 离心 30 min (4℃) 除去细胞碎片及其他杂质, 100 000 g 90 min (4℃) 超速离心。上清用 50% ~ 70% 的饱和

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀, 沉淀用 Tris-HCl 缓冲液 (20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 2 mmol/L 无水 CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L PMSF, pH 7.2) 溶解后过 ConA Sepharose 亲和层析柱 (4℃)。结合的糖蛋白用 10% 的  $\alpha$ -葡萄糖苷酸钠洗脱。收集洗脱液, 用不含 Mg<sup>2+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 的低盐 Tris-HCl 缓冲液 (20 mmol/L Tris, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA) 经 Sephadex G25 分子筛将其 NaCl 浓度换为 200 mmol/L, 在 AKTA 层析系统上过 20 QE 阴离子柱。结合的蛋白先用 300 mmol/L NaCl 洗脱, 然后梯度洗脱直至 NaCl 浓度为 1000 mmol/L。每 1 mL 收集 1 次, 收集液经 SDS-PAGE 电泳并银染检测。

取适量纯化样品经 SDS-PAGE 电泳后 67 V 3 h 转移至硝酸纤维素膜 (NC 膜)。转印后的 NC 膜用含 5% 脱脂奶的 PBS 封闭过夜, 然后用 1:400 稀释的 anti-gp96/grp94 单克隆抗体室温包被 4 h, 1:1000 倍稀释的 HRP 标记的羊抗鼠二抗室温反应 2 h, 显色。

**1.2.2 Hsp108 含量测定及其结合多肽的释放与分离** 纯化的样品合并后加入 2 mmol/L PMSF, 用 10 ku 超滤管浓缩 (5000 g, 4℃), 用 Bio-Rad 试剂盒按说明书测定蛋白含量。按此方法分别测定健康鸡肝脏 hsp108 蛋白含量以及 MDV 感染引发的肿瘤肝脏组织中 hsp108 蛋白含量各 3 个样品, 分别重复 2 次, 取平均值。

浓缩后的样品中加入 10% 三氟乙酸 (TFA) 至终浓度为 0.2%, 冰浴 15 min, 超滤收集与 hsp108 结合的多肽。冻干后用 100  $\mu$ L 反向层析液 A (2% 的乙腈中含 0.065% 的 TFA) 溶解, 在 BioCAD 高压液相色谱仪上过 C2/C18 2.1/10 反向层析柱, 用 0 ~ 65% 反向层析液 B (100% 的乙腈中含 0.05% 的 TFA) 线性梯度洗脱分离多肽。

**1.2.3 Hsp108 基因扩增及多态性分析** 取 0.1 g 健康 SPF 鸡肝脏组织于液氮中研碎, 加入 Trizol 试剂, 提取肝脏总 RNA。以 OligodT 为引物进行反转录。使用特异性引物 1 (P1 和 P2) 扩增 hsp108 基因。同样方法得到 MDV 感染引发的 SPF 鸡肿瘤肝脏组织 hsp108 基因。回收特异条带, 与 pMD18-T 载体连接, 进行序列测定及分析。

**1.2.4 鸡 hsp108 基因的表达纯化及抗原肽结合试验** 分别使用引物 2 和引物 3 得到了带有特定酶切位点的健康 SPF 鸡肝脏 hsp108 基因, 经酶切、连

接、转化后分别克隆至 pGEX-6p-1 及 pET30a(+) 载体上进行融合和非融合表达. 表达产物经超声裂解, 分别用 Glutathione Sepharose<sup>TM</sup> 4B 及 Chelating Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow 柱纯化. SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色.

参照文献方法<sup>[10,11]</sup>将荧光素标记的乙肝病毒核心抗原九肽与融合及非融合重组蛋白以 1:100 的比例在终体积 100  $\mu$ L 的低盐结合缓冲液(20 mmol/L HEPES/Na<sup>+</sup>, pH 7.8, 20 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 120 mmol/L KCl)中进行结合. 25  $^{\circ}$ C 作用 10 min, 50  $^{\circ}$ C 加热 15 min, 然后置于室温中大约 3 h. 用 10 ku 超滤管进行超滤, 充分洗去未结合的荧光素标记的多肽. 使用共聚焦显微镜, 480 nm 蓝光激发, 520 nm 绿光观察 hsp108-多肽结合情况. 使用完全相同的方法处理未加蛋白的荧光素标记多肽作为本底对照, 同时用牛血清白蛋白(BSA)与荧光素标记多肽结合作为阴性对照.

## 2 结果

### 2.1 Hsp108 的纯化及 Western-blot 分析

经超速离心, 硫酸沉淀及亲和层析后除去大部分杂质, 最后使用阴离子交换, hsp108 在 400~600 mmol/L 浓度的 NaCl 时被洗脱下来(图 1), 得到纯化的鸡 hsp108 蛋白, 分子质量约 108 ku. 银染结果显示, 纯度在 95% 以上(图 2).

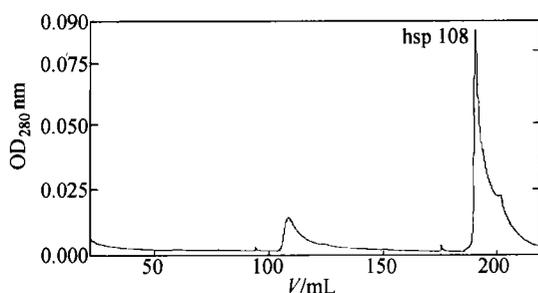


图 1 20 QE 阴离子交换柱分离纯化肝脏组织中 hsp108 蛋白层析图

纯化的 hsp108 蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转移至 NC 膜, 使用鼠源的抗人 gp96 单克隆抗体及 HRP 标记的羊抗鼠二抗与 hsp108 蛋白相互作用, 显色后在相应的位置出现特异性条带(图 2). 证明鸡的 hsp108 蛋白可以与人的 gp96 单抗结合, 说明它们具有相类似的功能区.

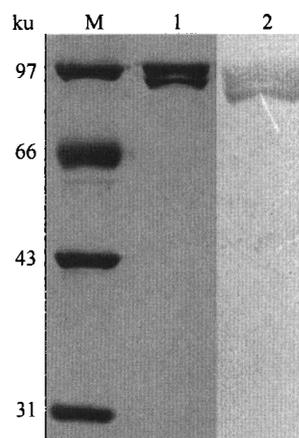


图 2 纯化的肝脏组织中 hsp108 电泳图及其 Western-blot  
M. 蛋白分子标志; 1, 20QE 阴离子层析后纯化的 hsp108 蛋白;  
2, Western-blot 结果

### 2.2 Hsp108 含量测定及其结合肽的分离

使用 Bio-Rad 试剂盒测定蛋白含量, 表 1 为测定的 3 个样品的蛋白含量值. 其中 MDV 感染引发的鸡肿瘤肝脏组织中 hsp108 含量平均为 66.0  $\mu$ g/g 肝脏组织, 健康 SPF 鸡肝脏组织中 hsp108 的含量平均为 17.2  $\mu$ g/g 肝脏组织, 显示出病毒感染及肿瘤发生时, 鸡肝脏中 hsp108 表达量明显升高(升高约 4 倍). 图 3 为离子交换层析梯度洗脱收集样品的检测, 可以看到肿瘤组织中的 hsp108 条带明显变宽, 说明鸡肝脏组织中 hsp108 含量在发生肿瘤后显著升高.

表 1 健康 SPF 鸡和被 MDV 感染后肝脏组织中 hsp108 蛋白含量测定

肝脏组织	Hsp108 含量( $\mu$ g/g 肝脏组织)		
健康鸡肝脏组织	15.1	22.7	13.8
MDV 感染引发的肿瘤肝脏组织	60.6	66.2	71.2
Hsp108 百分比/%	401.3	291.6	515.9

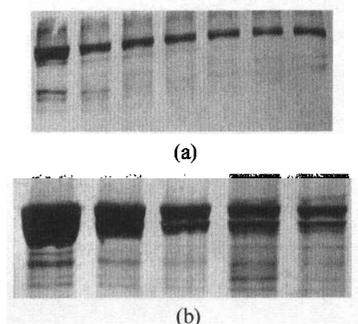


图 3 离子交换梯度洗脱样品的 SDS-PAGE 检测  
(a) 正常鸡肝脏中 hsp108; (b) MDV 感染后鸡肿瘤肝脏中 hsp108

经 C2/C18 柱反向高压液相层析分离得到与 hsp108 结合的多肽, 如图 4. 多肽谱线中各个肽的含量及氨基酸组成与人 gp96 结合的多肽明显不同<sup>[2]</sup>.

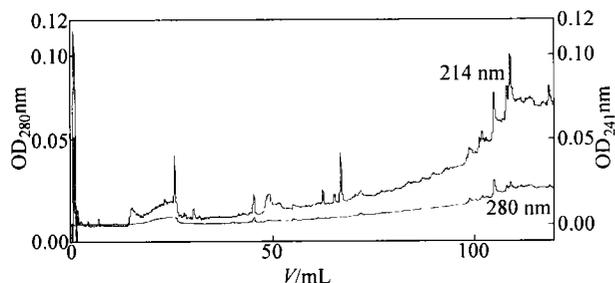


图 4 C2/C18 2.1/10 反向 HPLC 分离鸡肝脏 hsp108 结合多肽层析图

### 2.3 Hsp108 基因序列分析

以鸡肝脏组织总 RNA 为模板, 使用特异性引物, 经 RT-PCR 分别得到目的基因 hsp108, 大小约 2450 bp, 为完整的基因片段.

多序列比较发现, 健康 SPF 鸡肝脏组织 hsp108 序列与 MDV 感染引发的 SPF 鸡肿瘤肝脏组织 hsp108 氨基酸序列没有发现任何变异. 而健康 SPF 鸡肝脏组织 hsp108 氨基酸与其输卵管 hsp108<sup>[8]</sup> 有一个氨基酸变化, 在 307 位, 肝脏中为天冬氨酸(D), 而在输卵管中则为天冬酰胺(N), 两者仅一个酰胺基不同.

### 2.4 Hsp108 的表达及纯化

Hsp108 基因克隆到 pGEX-6p-1 及 pET30a(+) 载体中经 IPTG 诱导后表达, 表达产物都是可溶的, 产量大约占整个大肠杆菌表达总产量的 5%, 大小分别为 116 ku 和 91 ku. 经 Glutathione Sepharose<sup>TM</sup> 4B 及 Chelating Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow 亲和层析, 得到纯化的两种重组蛋白(图 5).

浓度为 3 μmol/L 的两种重组蛋白在低盐溶液中经加热及自然冷却过程分别与荧光素标记的乙肝病毒核心抗原九肽结合, 充分洗去未结合的多肽, 共聚焦显微镜下可见绿色荧光. 融合蛋白和非融合蛋白的荧光强度未见明显差异. BSA 与多肽的结合产物在荧光显微镜下也出现一些微弱荧光, 说明 BSA 可以和多肽进行非特异结合, 但强度要弱得多, 见图 6.

## 3 讨论

通过超速离心、硫氨沉淀、亲和层析及离子交换等几个步骤, 从 MDV 感染引发的鸡肿瘤肝脏组织中提取出了 hsp108, 纯度在 95% 以上. 由于该蛋

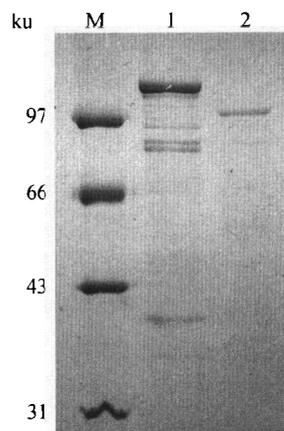


图 5 纯化的重组蛋白

M, 标准蛋白分子质量; 1, 纯化后的融合蛋白; 2, 纯化后的非融合蛋白

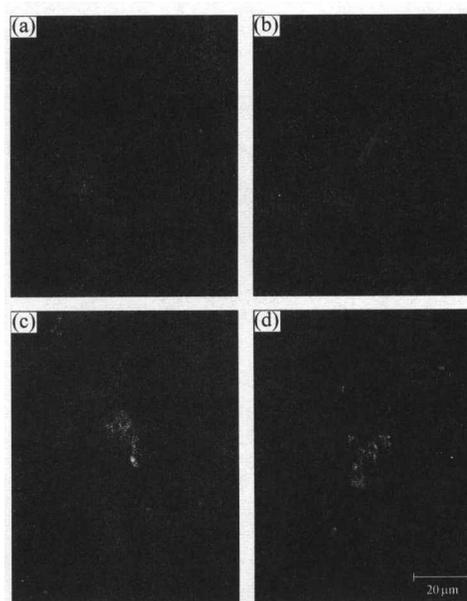


图 6 重组蛋白与荧光素标记的乙肝病毒核心抗原肽结合实验

(a) 荧光素标记的乙肝病毒核心抗原肽; (b) BSA; (c) 融合蛋白; (d) 非融合蛋白

白极易降解, 所以整个提取过程应始终于冰上或 4℃ 进行, 而且要始终加入一定量的 PMSF. 在本实验中遵循了这样的原则, 故提取的蛋白极少降解, 纯度较高. Srivastava<sup>[9]</sup> 在 1997 年曾报道过哺乳动物包括人和鼠的 gp96 蛋白的特性, 他发现这种蛋白不同于其他蛋白之处在于, 纯化的 gp96 蛋白常呈现为一组 2, 3, 4 或者甚至 5 条极为靠近的条带, 分子质量在 94~110 ku 之间. 这种不均一性的结构基础目前还不很清楚, 但可以肯定这不是蛋白质降解的结果, 也不是不同糖基化造成的, 而可

能是由于特异的磷酸化造成或是特异的构象,也可能是与 gp96 结合的不同抗原肽造成的. 本实验中鸡肝脏中的 hsp108 也都显示出这种情况. 但大肠杆菌表达的重组 hsp108 只有一条带和一些低分子量的条带, 显然重组的 hsp108 与组织中提取的 hsp108 同样易被降解. 图 1 中用 300 mmol/L NaCl 可将一部分杂质去除, 然后从 300~1000 mmol/L 梯度洗脱. 可以发现, 从梯度的一开始 hsp108 即被洗脱, 到 400~600 mmol/L 时达到最大. 实验过程中还发现 hsp108 不宜冻干保存. 作者曾将纯化后的蛋白冻干成粉末后经电泳检测发现绝大部分的蛋白损失掉, 只剩余约 20% 的量. 故经离子交换后的纯化蛋白最好直接保存于 -70℃ 备用. 另外, 该蛋白在浓缩后也极易降解, 加入蛋白酶抑制剂 PMSF 也没有明显抑制效果. 因此在浓缩后应尽快使用.

尽管 gp96 和 hsp108 分子量及氨基酸数目(分别为 802 和 795)上都存在着差异, 但 Western-blot 结果显示, 鸡的 hsp108 可以与人的 gp96 单克隆抗体结合, 说明两者在抗原结构上有很大相似之处. 推测 hsp108 很可能具有和哺乳动物类似的抗原呈递功能, 尽管鸡的 MHC 分子和哺乳动物存在差异<sup>[12]</sup>. 另一个与 gp96 相似之处是 hsp108 也能与细胞中的多肽结合, 因此对该蛋白结合多肽的释放及分离也为进一步分离鉴定 MDV 抗原肽及自体免疫实验奠定了基础. 本实验对健康及 MDV 感染引发的肿瘤肝脏组织中的 hsp108 蛋白含量进行了测定, 结果显示, 肿瘤组织中的蛋白含量较正常组织中明显升高. 推测当病毒感染或肿瘤发生时 hsp108 可能同哺乳动物 gp96 一样能够引发病毒特异性或肿瘤特异性免疫反应. 由于我们的实验中未发现 MDV 特异性抗原肽, 很可能肝脏中的 hsp108 参与了这一过程.

为保证序列结果的正确无误, 同一 RNA 模板在完全相同的条件下分别两次进行 RT-PCR 及克隆测序, 两次结果完全相同. 基因序列分析结果显示, hsp108 基因极为保守, 且发生肿瘤的 SPF 鸡肝脏组织 hsp108 氨基酸没有发生任何变化. 即使不同的组织器官如肝脏组织与输卵管的 hsp108 也只有一个氨基酸不同, 而且两者之间仅相差一个酰胺基. 这种高度保守性可在同种内相互使用, 无论细胞的 MHC 单倍型如何, HSPs 均能结合全部肽谱, 这样从一个特定的单倍型细胞分离的 hsp-多肽复合物可以对其他单倍型个体进行免疫, 从而克服了由于 MHC 多型性而造成的肿瘤疫苗无法在患者群体中通用的缺陷.

将 hsp108 基因导入大肠杆菌中进行表达, Western blot 结果显示, 融合及非融合重组蛋白都能够被鼠源的抗人 gp96 单克隆抗体识别, 说明大肠杆菌表达并不影响该蛋白活性. 我们选择了荧光素标记的一个九肽(SYVNTNMGL, 位于乙肝病毒核心抗原的 88~96 位上), 该九肽已在一定的温度、盐浓度以及一定的蛋白:肽浓度比条件下进行结合实验. 结果证实, 两种重组的 hsp108 蛋白都可以与乙肝病毒抗原九肽特异结合, 融合和非融合蛋白与抗原肽的结合能力没有明显差异. 由此可以说, 鸡 hsp108 具有与抗原肽特异结合的特性, 这就使得下一步设计 hsp108-MDV 多肽复合物新型疫苗的思路有了理论基础.

### 参 考 文 献

- 1 崔治中. 马立克氏病毒感染与致肿瘤作用的分子生物学. 中国兽医学报, 1995, 15: 306
- 2 Thomas J F, et al. Isolation of an immunodominant viral peptide that is endogenously bound to the stress protein GP96/GRP94. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 6135
- 3 Meng S D, et al. HBV-specific peptide associated with heat shock protein gp96. The Lancet, 2001, 357: 528
- 4 Blachere N E, et al. Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted *in vitro*, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. J Exp Med, 1997, 186: 1315
- 5 Poola I, et al. The estrogen-inducible transferrin receptor-like membrane glycoprotein is related to stress-related proteins. J Biol Chem, 1994, 269: 21762
- 6 Cho S S, et al. An immunohistochemical localization of transferrin binding protein in the chicken respiratory tract. Arch Histol Cytol, 1996, 59: 369
- 7 Cho S S, et al. Distribution of transferrin binding protein immunoreactivity in the chicken central and peripheral nervous systems. J Comp Neurol, 1997, 382: 260
- 8 Kulomaa M S, et al. Amino acid sequence of a chicken heat shock protein derived from the complementary DNA nucleotide sequence. Biochemistry, 1986, 25: 6244
- 9 Song-Dong Meng, et al. Three-step purification of gp96 from human liver tumor tissues suitable for isolation of gp96-bound peptides. J Immunol Meth, 2002, 264: 29
- 10 Srin S, et al. Molecular Mechanisms of peptide loading by the tumor rejection antigen/heat shock chaperone gp96 (GRP94). J Bio Chem, 1999, 274: 12023
- 11 Nora L, et al. Biophysical analysis of the endoplasmic reticulum-resident chaperone/heat shock protein gp96/GRP94 and its complex with peptide antigen. Biochemistry, 2001, 40: 1483
- 12 Jim K, et al. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. Nature, 1999, 401: 923