

(400),晶体大小从几微米到几十微米不等<sup>[4]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] Rubel M, Pszonicka M, Palczewska W. J. Mater. Sci., 1985, **20**:3639; 1986, **21**:241.  
 [2] Ning Yuantao, Yang Zhengfen, Zhao Huaizhi. Platinum Metals Rev., 1996, **40**(2):1.  
 [3] Yang Zhengfen, Ning Yuantao, Zhao Huaizhi. J. Alloys and Compounds, 1995, **218**:51.  
 [4] Ning Yuantao, Yang Zhengfen, Zhao Huaizhi. Platinum Metals Rev., 1995, **39**(1):9.

## RESEARCH ON SURFACE STRUCTURE OF CATALYST AND CATCHMENT ALLOYS USED IN NITRIC ACID INDUSTRY

Ning Yuantao

(Kunming Institute of Precious Metals, Kunming 650221)

**Key words** Pt-Pd-Rh catalyst alloy, Pd-Ni catchment alloy, surface chemical states, structure reconstruction

## 马立克病病毒糖蛋白在感染和 抗感染中的作用

崔治中 秦爱建 段玉友 李毅 陆长明

(扬州大学农学院动物医学系, 扬州 225009)

**[关键词]** 马立克病病毒, 重组糖蛋白, 细胞粘附, 保护性免疫

鸡马立克病病毒(MDV)是疱疹病毒科的一种细胞结合性致肿瘤病毒。过去,根据其致病性,将其归类于 $\gamma$ -疱疹病毒,但分子生物学研究表明,其基因组DNA结构与 $\alpha$ -疱疹病毒类的单纯疱疹病毒(HSV)更为类似。MDV有三个血清型:致病性I型MDV,从健康鸡群分离到的无致病性II型MDV,及III型火鸡疱疹病毒(HVT)。

马立克病(MD)是危害养鸡业的一个严重问题。在60年代末70年代初,由于MD,美国每年损失几千万只鸡,占总饲养量的1%左右。1971年起开始使用HVT作为疫苗,显著地减少了MD引起的经济损失。但在连续几年使用HVT疫苗后,其免疫效果下降,MD发病率

获国家自然科学基金资助项目。  
 本文于1996年7月11日收到。

又上升。80年代以后,又采用了改进的二价苗,但其良好的免疫效果也只维持了三四年。近年来,美国一些地区及其它一些国家的MD又呈上升趋势。在我国,随着养鸡业的规模越来越大,MD的危害性也日趋严重。由于我国交通条件比较差,大多数鸡场只能采用免疫效果较差的冻干苗,而不便选用免疫效果较好但必须在液氮中保存和运送的细胞结合苗,使该病的控制问题变得更难以解决。日益发展的我国养禽业迫切期望通过现代分子生物学研究技术,研制出效果更好而又方便的新型抗MD疫苗。

深入研究MDV在比较医学上也有广泛的生物学意义。MDV是第一个能用试验直接证明具有致肿瘤作用的疱疹病毒,MD是第一个也可能是目前唯一的一个已广泛使用疫苗有效预防的肿瘤性病毒病。MDV还有许多特性,使它可作为研究病毒性肿瘤特别是疱疹病毒性肿瘤的理想实验模型。如,它很容易在天然宿主鸡人工诱发肿瘤,已具备致肿瘤性程度差别很大的不同的毒株,已具备对MDV有抵抗力或特别易感的且主要组织相容性复合物(MHC)遗传位点已清楚的不同品系的近交系鸡,已有许多MDV诱发的传代细胞系细胞供研究用等。

对于大多数疱疹病毒来说,病毒的各种囊膜糖蛋白在识别、粘附和感染易感细胞中的作用都已研究得比较清楚。但由于MDV在细胞培养中严格的细胞结合性,这不仅给MDV的经典研究带来很大的难度,也使MDV致病过程的分子生物学研究比其它疱疹病毒落后了好多年。如同其它疱疹病毒一样,MDV基因组上也有多种糖蛋白基因,通过对MDV基因组DNA的随机DNA测序结果与其它疱疹病毒不同糖蛋白基因的比较,MDV的gB,gC,gD,gE,gH,gI,gK和gL基因,也都被鉴定和克隆出来,它们在氨基酸序列上与其它疱疹病毒有着很高的同源性。但对它们在感染细胞中的表达状态及在感染中的作用仍很不清楚。深入研究MDV的糖蛋白在感染和抗感染中作用的分子生物学基础,不仅有益于我们进一步理解MDV这一特殊的细胞结合性致肿瘤病毒的发病机制,也将有助于我们将基因工程技术用于改进对MD的防控措施。

近五六年来的,在国家自然科学基金的资助下,我们在试图追踪国际先进水平的同时,也力图有所创新。根据国外已报道的MDV糖蛋白B抗原基因序列及其在基因组DNA上的定位<sup>[9]</sup>,我们从MDV强毒GA株感染的鸡胚成纤维细胞(CEF)的基因组DNA文库中,在国内首先得到了MDV的囊膜糖蛋白B抗原(gB)的完整基因<sup>[10]</sup>,并成功地以杆状病毒为载体在昆虫细胞中以非融合蛋白的形式表达了gB基因<sup>[11]</sup>。用<sup>35</sup>S-蛋氨酸标记的表达产物作免疫沉淀反应,并结合应用不同的糖苷酶或糖基化抑制剂分析表明,在昆虫Sf9细胞中表达的重组MDVgB,在分子量大小及糖基化位点和程度上与天然MDVgB非常类似,只有轻微差异,因此有可能用来研究该gB的生物学活性。

对于研究细胞结合性的MDV糖蛋白来说,单克隆抗体显得特别有价值。十多年来,国内外都是依靠美国农业部禽病和肿瘤学研究所研制<sup>[8]</sup>和惠赠的单抗液。如果只依靠惠赠,一方面在数量上受到限制,另一方面这些单抗本身的抗原特异性谱还不完全。我们用能表达MDVgB的重组杆状病毒感染的Sf9细胞裂解物免疫小鼠制备杂交瘤细胞,以MDV感染的CEF为筛选抗原,很容易得到了一株I型MDVgB特异性单抗BA4及另一株与所有3个型MDVgB呈交叉反应的单抗BD8,填补了国际上已有的抗MDVgB单抗中抗原特异性谱的不足<sup>[12]</sup>。BA4是世界上已报道的单抗中第一株能区别I型和II型MDVgB的单抗,它可以用来研究MDV糖蛋白分子上不同结构域或氨基酸簇与其型特异性或功能间的关系。用抗MDVgB的单克隆

抗体做成的免疫亲和层析柱, 从感染的 Sf9 细胞裂解物中提纯出重组 MDVgB, 将提纯物经 SDS-PAGE 并将凝胶染色后作薄层扫描, 可显示出 MDVgB 的分子量为 100 kD、60 kD 和 49 kD 的三个峰, 其纯度可达 60%<sup>[5]</sup>。这种 gB 的提纯样品将有利于深入研究它的生物学活性。

在将重组 MDVgB 产物与鸡外周血白血球混合后, 用抗 gB 的单抗作间接免疫荧光试验 (IFA) 发现, 重组 MDVgB 能粘附于 2%—3% 外周血白血球表面<sup>[6]</sup>。这是国际上首次直接用实验证明: MDV 的糖蛋白 B 抗原在 MDV 识别、粘附和感染易感细胞时起着重要作用, 即在鸡的白细胞表面存在着 MDV 糖蛋白 B 的受体。用在 Sf9 细胞中表达的 MDVgB 的重组产物免疫 SPF 鸡后作人工接种 MDV 强毒的动物实验表明, 经重组 MDVgB 免疫的鸡, 在人工接种 MDV 强毒株后一个月内, 能免于 MDV 感染引起的急性死亡。重组 gB 免疫组中 15 只鸡无一死亡, 而对照组 16 只中死亡 6 只 ( $p < 0.01$ )。但 MDVgB 重组产物的免疫接种, 对人工攻毒后 1 个月的慢性死亡率及肿瘤发生率的影响不大<sup>[3,6]</sup>。最近, 日本的研究机构也报道了类似的结果<sup>[10]</sup>。这些都证明了重组 MDVgB 确能诱发抗感染免疫反应。为此, 最近我们与中国农科院镇江蚕业研究所及中国科学院上海生化所合作, 以家蚕杆状病毒为载体在家蚕体内表达了 MDV 的 gB 基因。对 SDS-PAGE 的凝胶染色后直接观察并作薄层扫描表明, 经抗 gB 单抗作免疫印迹反应证实的特异蛋白带的表达量每毫升蚕淋巴液可达 1 mg, 与最初在 Sf9 细胞中的表达量相比, 提高了约 20 倍, 这大大地提高了将其用作基因工程亚单位疫苗的实际可能性。

对其它疱疹病毒, 糖蛋白 D (gD) 抗原在病毒识别、粘附和感染易感靶细胞过程中起着非常重要的作用。但是, MDV 在呈细胞结合性感染 CEF 后却不表达 gD, 虽然在 MDV 感染并康复的鸡体内能检出抗 gD 抗体。人们猜测, MDV 在鸡体内感染某种细胞后是能表达 gD 抗原的, 它很可能是在能产生具有接触传染性 MDV 病毒颗粒的羽囊上皮细胞中; 因而也推测, MDV 在 CEF 上的严格的细胞结合性可能就和 MDV 在感染的 CEF 内不能表达该 gD 抗原相关。为了验证这一推论的正确性, 我们还用 PCR 技术扩增和克隆了 MDV 的 gD 基因<sup>[4]</sup>, 现正试图以鸡反转录病毒为载体在 CEF 中表达 MDV 的 gD 抗原, 以观察在 CEF 中用异源表达系统表达的 gD 能否帮助 MDV 从感染的 CEF 中释放出来。

以上研究结果不仅有助于从理论上进一步阐明 MDV 感染易感细胞的分子生物学基础, 也对养禽业有着潜在的应用价值。我们的研究结果已证明, gB 能识别和粘附于 MDV 的靶细胞鸡白细胞表面, 以及重组 gB 能诱发保护性免疫反应, 这表明 gB 确实可作为抗 MDV 感染基因工程疫苗的有效目的基因。我们克隆到的 MDVgB 基因已提供给国内正在研究病毒载体的几个单位, 用作研制基因工程疫苗的靶基因; 我们还正在测试在昆虫细胞中特别是在蚕体中表达的重组 gB 用作抗 MD 的亚单位疫苗的可能性; 并试图用不同的活病毒载体 (如禽痘病毒、HVT 或禽腺病毒) 表达 gB 基因, 希望其中会有一种或二种不同类型基因工程疫苗及其组合, 能为鸡群提供比国内外现有的常规疫苗更好的保护效果。实际上, 本研究得到的 I 型 MDVgB 特异性单抗 BA4, 既可用于现有的常规 I 型 MDV 弱毒苗 CVI988 株生产过程中的检测, 更可用于筛选和检测用 III 型 HVT 为载体表达 I 型 MDVgB 的基因工程疫苗。

对于饲养高度密集的养鸡业来说, 有效地预防和控制 MD 这类传染病, 不能仅仅依靠疫苗, 还必须考虑到不断地抗病育种。本研究得到的在昆虫细胞中表达的 MDV 重组 gB, 能粘附于鸡外周血中一部分淋巴细胞。我们也正在研究鸡的不同个体或品系中能被 gB 粘附的淋

巴细胞的百分比是否与它们对 MDV 的易感性有关, 进而考虑能否用其作为抗病育种过程中的选择性标志。利用这一糖蛋白基因, 还正在尝试以精子为 DNA 载体的方法建立 MDVgB 的转基因鸡。用经与 MDVgB 基因质粒 pGB181 DNA 共孵化的精液人工输精后孵出了 110 只第一代鸡 ( $F_0$ ), 在出壳后即采血提取全基因组 DNA, 以 pGB181 质粒 DNA 为探针作斑点分子杂交检测, 有 40 只显示阳性, 有 2 只表现显著的畸型。取阳性  $F_0$  公鸡与非转基因鸡母鸡交配, 在 116 只  $F_1$  后代中, 72 只呈阳性。虽然 gB 基因是否真正整合进鸡的基因组尚待进一步证明, 但转基因鸡的后代似乎已表现出对 MDV 感染抵抗力提高的趋势。当将 50 只  $F_1$  鸡, 在出壳后立即采血并随后人工接种强毒 MDV。在攻毒后一个月内, 斑点杂交阳性和阴性的 MD 死亡率分别是 5/20 和 15/30 ( $p < 0.1$ ), 在攻毒后两个月内分别是 10/20 和 24/30 ( $p < 0.05$ ), 似乎 gB 基因转基因鸡对于 MDV 有一定的抵抗力。

### 参 考 文 献

- [1] 崔治中, 段玉友. 马立克病病毒糖蛋白 B 抗原基因克隆的酶切分析. 江苏农学院学报, 1992, 13 (2): 1—5.
- [2] 李毅, 崔治中, 随德新等. 以杆状病毒为载体在昆虫细胞中表达鸡马立克病病毒糖蛋白 B 抗原基因. 病毒学报, 1994, 10 (1): 24—32.
- [3] 崔治中, 秦爱建, 段玉友等. 马立克病病毒三个蛋白质基因的鉴定、克隆和表达及基因产物的生物学活性. 见: 生物技术农业应用——全国生物技术农业应用学术讨论会论文集, 中国科学技术协会学会部编, 北京, 1995, 5, 188—192.
- [4] 段玉友, 崔治中, 殷震. 用 PCR 扩增和克隆马立克氏病病毒糖蛋白 D 基因. 中国病毒学, 1996, 11 (2): 176—182.
- [5] 陆长明, 崔治中, 秦爱建等. 亲和层析法提纯马立克病病毒 gB 基因重组产物. 江苏农学院学报, 1996, 17 (2): 25—27.
- [6] 秦爱建, 崔治中, 段玉友等. 马立克病病毒重组糖蛋白 B 抗原对鸡外周血白细胞的粘附作用及其抗感染免疫反应. 中国兽医学报, 1996, 16 (5): 424—427.
- [7] 陆长明, 崔治中, 秦爱建等. 1 型马立克病病毒糖蛋白 B 抗原特异性的单克隆抗体. 中国兽医学报, 1996.
- [8] Lee L F, Liu X, Witter R L. Monoclonal antibodies with specificity for three different serotypes of Marek's disease viruses in chickens. J. Immunology, 1983, 130 (2): 1003—1006.
- [9] Ross L J N, Sanderson M, Scott S D et al. Nucleotide sequence and characterization of the Marek's disease virus homologue of glycoprotein B of herpes simplex virus. J. Gen. Virol., 1989, 70: 1789—1804.
- [10] Jang H K, Kitazawa T, Ono M et al. Protection studies against Marek's disease using baculovirus-expressed glycoproteins B and C of Marek's disease virus type 1. Avian Pathology, 1996, 25: 5—24.

## THE BIOLOGICAL ROLES OF MAREK'S DISEASE VIRUS GLYCOPROTEINS IN INFECTION AND PROTECTIVE IMMUNITY

Cui Zhizhong    Qin Aijian    Duan Yuyou    Li Yi    Lu Changming

(Dept. of Veterinary Medicine, Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

**Key words** Marek's disease virus, recombinant glycoprotein, cell adhesion, protective immunity