

甲型流感病毒多肽放射免疫测定的研究

I. 应用 Sephadex G-200 凝胶柱层析提纯甲型流感病毒

江西医学院
江西省医学科学研究所 放射免疫协作组
(南昌)

鸡胚尿囊液中所含的甲型流感病毒经鸡红细胞吸附洗脱法部分纯化后,用蒸馏水透析沉淀浓缩,再通过 Sephadex G-200 凝胶柱层析纯化。提纯的流感病毒经电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,以及对其结构多肽组成的分析和分离提纯,证明其纯度符合生物化学和免疫化学研究的要求。

流感病毒多肽的放射免疫测定,需要纯的流感病毒来分离提取纯的病毒多肽。目前,国外采用不同方法提纯流感病毒,先把鸡胚尿囊液或组织培养液中的流感病毒部分纯化和浓缩,最后用蔗糖密度梯度离心^[1-4]。我们用鸡红细胞吸附洗脱法^[5]部份纯化鸡胚尿囊液中所含的流感病毒,再经蒸馏水透析沉淀浓缩后,用 Sephadex G-200 凝胶柱层析代替蔗糖密度梯度离心纯化流感病毒,获得了良好结果。

材料与 方法

(一) 流感病毒的增殖培养

所用毒株为甲型流感病毒焊科 75-2(H₃N₂)。病毒的增殖用鸡胚尿囊法^[6]。将硫柳汞加到收集的鸡胚尿囊液中,使其最终浓度为 0.01%,置 4℃ 冰箱备用。

(二) 流感病毒的提纯

按 Laver 法^[5]。在 4℃ 用鸡红细胞吸附鸡胚尿囊液中所含的流感病毒,然后于 37℃ 将病毒洗脱于生理盐水中。洗脱液置 4℃ 冰箱对蒸馏水透析过夜,4000 转/分离心 20 分钟,沉淀悬浮于小量 0.05M、pH 7.4 磷酸缓冲液-0.15 M NaCl 中(简称 PBS,内含 0.01% 硫柳汞),充分摇荡,4000 转

/分离心 20 分钟,上清液即为部分纯化浓缩的流感病毒混悬液,于 4℃ 冰箱备用。

Sephadex G-200 凝胶柱层析按我室方法。将瑞典 Pharmacia 出品的 Sephadex G-200 干胶加入 PBS 中,用煮沸法溶胀,浮选法除去细胶粒后装柱(3×50 厘米),柱床体积 180 毫升。凝胶柱用 5 倍体积的 PBS 平衡。样品临用前 4000 转/分离心 20 分钟,取上清液上柱,每次加样 3—5 毫升。样品上柱后用 PBS 洗脱,流速 15—20 毫升/小时,每管收集 5 毫升,在 280 毫微米波长测定洗脱曲线,并用血凝滴度测定流感病毒洗脱峰。收集病毒洗脱液,即为提纯的流感病毒混悬液。

(三) 蛋白质的放射性标记

参照 Greenwood 的氯胺 T 法^[4],用 131-碘标记红细胞洗脱液中的流感病毒颗粒和可溶性蛋白质,再经 Sephadex G-200 凝胶柱层析制取放射性标记的流感病毒混悬液。

(四) 流感病毒混悬液纯度的鉴定

电镜观察流感病毒悬液中病毒的形态,并检查是否存在细胞碎片等颗粒性不纯物;聚丙烯酰胺凝胶电泳检测可溶性蛋白质。

本文于 1978 年 11 月 4 日收到。

江西省医学科学研究所生化研究室和江西省医学院原子医学教研组参加本项工作。中国医学科学院电镜室协助电镜观察。

聚丙烯酰胺凝胶电泳：用6%分离胶制成0.6×9厘米的凝胶柱。电泳液为0.025 M、pH 9.0 硼砂缓冲液，电流4毫安/管，电泳一小时左右。在此条件下，鸡胚尿囊液、血清及红细胞中所含的可溶性蛋白都可进入凝胶内，而流感病毒则被阻滞于凝胶表面。用0.5%考马氏蓝染色。将凝胶柱分段横切成5毫米，置井型闪烁计数器内测量标记蛋白质的放射性。

(五) 病毒的裂解和 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

病毒混悬于0.01 M、pH7.2 磷酸缓冲液，每毫升含1毫克病毒蛋白，加入十二烷基硫酸钠(SDS)、尿素和β-巯基乙醇，使其最终浓度分别为1%，5 M 和2%，充分混和，100℃加热2分钟。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳按 Skehel 等方法^[7]进行。

结果和讨论

(一) Sephadex G-200 凝胶柱层析分离流感病毒的效果

吸附于红细胞上的流感病毒，37℃从

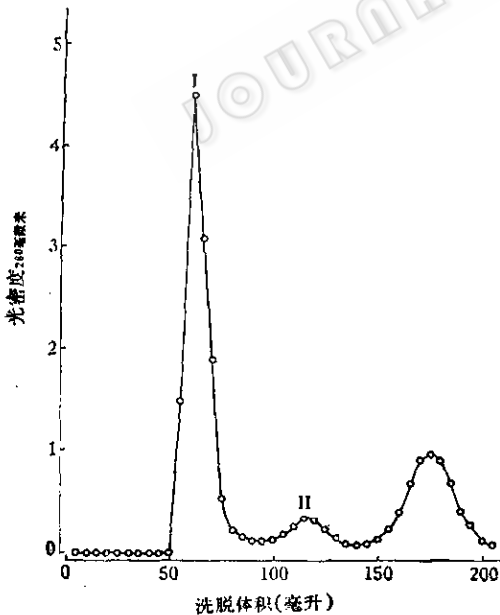


图1 从红细胞洗脱下的流感病毒悬液在 Sephadex G-200 凝胶柱上层析的洗脱曲线
I. 流感病毒洗脱峰, II. 血红蛋白洗脱峰

表1 从流感病毒洗脱峰中回收的流感病毒量

实验次数	洗脱峰病毒量 (HAU×10 ²)	回收的病毒量 (HAU×10 ²)	回收率 (%)
1	1076	1024	95.1
2	935.34	902.4	96.4
3	219.6	204.8	92.8
4	12810	12672	98.9
5	4782	4610	96.4
6	2573	2512	97.5
7	5190	5120	98.6
8	2816	2774	95.3
9	3863	3842	99.4
10	2346	2304	98.2

注：HAU——血凝单位

表2 蒸馏水透析沉淀流感病毒的效果

样品	滴度	透析前血凝滴度	透析后上清液血凝滴度
从 RBC 洗脱下的病毒悬液		5120	(-)
		2560	(-)
		2560	(-)
		2560	(-)
		1280	(-)
纯的病毒悬液		40960	(-)
		20480	(-)
		10240	(-)
		10240	(-)
		5120	(-)

透析置4℃冰箱24小时

细胞表面释放时引起部分溶血，使部分纯化浓缩的流感病毒悬液中含有血红蛋白和其他红细胞蛋白。当此病毒悬液在 Sephadex G-200 凝胶柱上层析时形成流感病毒与血红蛋白两个区带(图版I-1)。从洗脱曲线图可以看出流感病毒洗脱峰与其他蛋白质洗脱峰完全分开，而且病毒洗脱峰比较集中，90%以上的病毒可被回收(表1)。样品经过凝胶柱层析，病毒被稀释，但经蒸馏水透析后能将其沉淀浓缩成所需的浓度(见表2)。

(二) 纯流感病毒悬液的某些物理化学特性

用上述方法提纯的流感病毒悬液呈乳

白色带微绿色萤光,对紫外线的吸收比牛血清白蛋白强烈,其最大吸收在波长 280 毫微米处(图 2)。纯的流感病毒悬液在 4°C 冰箱放置较长时间,发生类似于红细胞沉淀现象,液体分成两层,下层呈流感病毒悬液特有的颜色,上层则为透明溶液,但一经摇动仍能均匀混合,这可能是由于流感病毒颗粒较大(直径 80—120 毫微米),静置时间较长,病毒颗粒会慢慢下沉。但若经反复冻融,则流感病毒沉淀析出,且较难重新悬于 PBS 中。

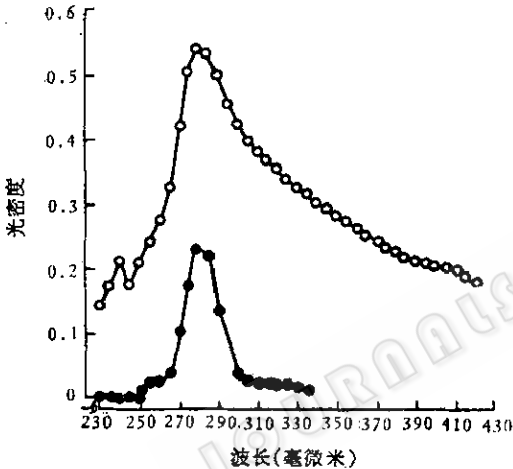


图 2 纯流感病毒悬液与牛血清白蛋白溶液紫外线吸收光谱的比较

○—○ 流感病毒悬液
●—● 牛血清白蛋白溶液

(三) 流感病毒悬液的纯度

纯的流感病毒悬液,经电镜检查,病毒颗粒形态清晰,未见细胞碎片等颗粒状不纯物(图版 I-5, 6)未经 Sephadex G-200 凝胶柱层析的样品,聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱,除在凝胶柱表面的病毒染色带外,在凝胶柱 1 厘米以下还呈现五条蛋白染色区带,而纯的病毒悬液则只见凝胶柱表面的病毒染色带(图版 I-4),放射性标记的流感病毒悬液也只在凝胶顶端出现一放射峰,在 0.5 厘米以下未见可溶性蛋白的放

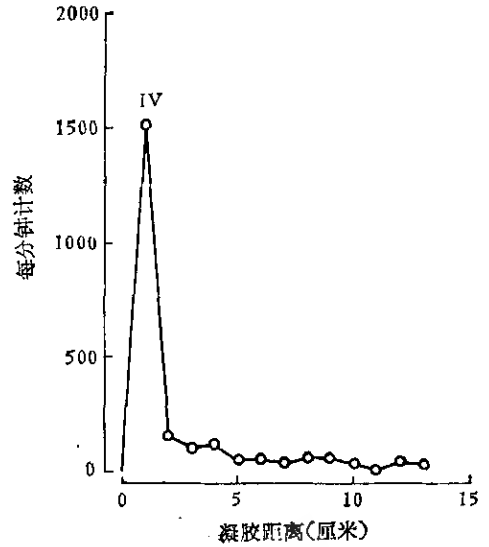


图 3 131-碘标记的流感病毒悬液的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱。IV 为标记的流感病毒的放射性

射峰(图 3),这些结果表明纯的流感病毒悬液中不含可溶性蛋白。

影响流感病毒纯度的主要因素是在病毒悬液中存在细胞的颗粒状不纯物和可溶性蛋白。由于红细胞吸附洗脱法能有效地将鸡胚尿囊液中的流感病毒与细胞的颗粒成份分离开^[1],而 Sephadex G-200 凝胶柱层析则能将部分纯化的流感病毒悬液中的可溶性蛋白质完全除去,因此用红细胞吸附洗脱-Sephadex G-200 凝胶柱层析提纯的流感病毒具有较高的纯度。

我们将红细胞吸附洗脱法制得的部分纯化的流感病毒悬液,分别用 Sephadex G-200 凝胶柱层析和蔗糖密度梯度离心纯化,提纯的流感病毒同时进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,分析其结构多肽的组成,两种方法纯化的流感病毒在凝胶柱上的结构多肽图谱完全相同(图版 I-2)与文献[2]报道的一致。用 Sephadex G-200 凝胶柱层析纯化的流感病毒分离提取的血凝素(HA),在还原的条件下裂解后进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,呈现两条单一的 HA,

和 HA₂ 的染色区带(图版 1-3)。提纯的 HA 与兔抗 HA 血清进行琼脂免疫双扩实验,观察到 HA 特有的沉淀线。从这些生化分析的初步结果看来,用 Sephadex G-200 凝胶柱层析代替蔗糖密度梯度离心纯化甲型流感病毒,其纯度达到生物化学与免疫化学的要求,而且操作简便,不需特殊设备,为流感病毒纯化提供了一个简易有效的方法。

参 考 文 献

[1] Reimer, C. B. et al.: *J. Bacteriol.*, 92:

1271, 1966.

[2] Shehel, John. J. et al.: *Virology*, 44: 396, 1971.

[3] Laver, W. G.: «病毒学基本技术»,中国科学院微生物研究所病毒学基本技术小组译,科学出版社,北京,第 41 页,1976。

[4] Kendal, A. P. et al.: *Virology*, 76: 186, 1977.

[5] 北京协和医院检验科: «病毒实验诊断手册»,人民卫生出版社,北京,第 57 页,1960。

[6] Greenwood, F. C. et al.: *J. Biochem.*, 89: 114, 1963.

STUDIES ON RADIOIMMUNOASSAY FOR THE POLYPEPTIDES OF INFLUENZA VIRUS

I. APPLICATION OF SEPHADEX G-200 GEL CHROMATOGRAPHY TO PURIFICATION OF INFLUENZA VIRUS

The Coordinating Group for Research on RIA of Jiangxi
Medical College and Jiangxi Medical Institute
(Nanchang)

Influenza virus group in the allantois fluids was partially purified by adsorption to and elution from chicken erythrocytes. The virus in the eluate was further concentrated by precipitation followed by dialysis against distilled water. The precipitated virus was resuspended in a small volume of PBS, and then purified by Sephadex G-200 gel chromatography.

The results of electron microscopy and acrylamide gel electrophoresis of these virus preparations and the data on analysis of viral polypeptides separated from these preparations were offered as evidence that the purity of these virus preparations satisfies the requirements of biochemical and immunochemical analysis.