

甲型流感病毒核糖核蛋白的提纯及其部分理化性质的研究

林 乔 张 鑫* 张 丽** 严家新 王懋梁

(湖北省医学科学院病毒研究室, 武昌)

用 Triton x-100 和 DOC 裂解、Sephadex G200 柱层析和密度梯度超离心方法, 首次从流感病毒感染的鸡胚尿囊膜中提纯了甲型流感病毒 RNP。经蛋白质和核酸含量测定、补体结合试验、免疫双扩散及 SDS-PAGE 鉴定, 所提纯的 RNP 与从病毒中提取的 RNP 相同。并测出粤防 77-38 毒株 RNP 的等电点为 4.6, 沉降系数为 56.1 S。

关键词 甲型流感病毒; 核糖核蛋白; 提纯

甲型流感病毒颗粒表面有血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 二种抗原, 其内部有膜蛋白 (MP) 和核糖核蛋白 (RNP), 后者由流感病毒 RNA 与多聚酶、核蛋白 (NP) 结合在一起所组成^[1]。NP 是流感病毒的型特异性抗原, 实验动物和人受流感病毒感染后常出现抗 NP 抗体^[2], 免疫荧光研究已在病毒感染的细胞质膜 (plasma membrane) 的外表面检出 NP^[3]。近年来发现 NP 也逐渐发生变异, 说明抗 NP 抗体也有一定的生物学作用^[4]。因此 RNP 的提纯对于甲型流感的免疫学诊断、流感的流行病学及流感病毒的遗传和变异等研究有重要的意义。1971 年 Pons 等报告用 NP40 和去氧胆酸钠 (DOC) 裂解受流感病毒感染的体外培养的鸡胚成纤维细胞, 再用平衡密度梯度离心法提纯 RNP^[5]。国内 1977 年郭元吉等报道了用硫酸铵盐析法从感染的鸡胚尿囊膜中提取流感病毒 RNP, 但仍含有表面抗原 NA 及膜蛋白 MP^[6]。本文报道用 Triton x-100 和 DOC 裂解、Sephadex G 200 柱层析及不连续速率密度梯度离心法从流感病毒感染的鸡胚尿囊膜中提纯大量的流感病毒 RNP, 并对甲型流感病毒

国内代表株之一的粤防 77-38 (H3N2) 的 RNP 的部分理化性质进行了研究。

材料和方法

(一) 接种病毒及鸡胚绒毛尿囊膜的处理

甲型流感病毒粤防 77-38 (H3N2) 毒株, 按常规接种于 10 日龄鸡胚尿囊腔, 33℃ 孵育 48h 后收取尿囊液 HA 滴度在 1:320 以上的鸡胚绒毛尿囊膜, 用生理盐水漂洗干净, 再用 RSB 缓冲液 (0.01 M Tris-HCl, pH 7.2; 0.01 M NaCl; 1.5 mM MgCl₂) 洗涤 2 次, 倾去洗液。将尿囊膜剪成小块, 在 -20℃ 冷冻, 37℃ 融解。在冰浴中匀浆后, 再重复冻融一次。每毫升匀浆加入 0.2ml 的 2% Triton x-100 与 5% DOC 混合液, 37℃ 温育 10 min。在 4℃ 下以 4,000 rpm 离心 10 min, 取上清。在搅拌下缓缓滴加 1/2 体积的 0.2M 醋酸盐缓冲液 (pH 4.5), 置 4℃ 静置 2h 后, 再以 4,000 rpm 离心 10min, 取沉淀悬浮于 3 倍体积的 STEU 缓冲液 (0.01M Tris-HCl pH 7.2, 1M 尿素, 0.1 M NaCl, 1mM EDTA) 中, 然后对此缓冲液透析过夜。次日以 4,000rpm 离心 20 min, 取上清, 浓缩到 3—4 ml。

本文于 1982 年 8 月 24 日收到。

* 武汉大学生物系 78 届毕业生;

** 本院超离心室工作人员。

(二) 葡聚糖凝胶 Sephadex G 200 柱层析

葡聚糖凝胶 Sephadex G 200 (瑞典, Pharmacia) 层析柱 $2.5 \times 60 \text{cm}$, 先经 0.05M PB 平衡。加入经以上处理的浓缩的鸡胚绒毛尿囊膜粗提液 2ml , 用 0.05M PB 洗脱, 流速 15ml/h 。90ml 后开始收集, 每管 3ml , 共收 54 管, 测 $A_{280 \text{nm}}$ 值及 HA 滴度。合并第一峰洗脱液, 浓缩到 2ml 。

(三) 不连续蔗糖密度梯度超离心

采用 MSE 75 型超速离心机, $3 \times 25 \text{ml}$ 荡平式转头。蔗糖 STEU 的浓度为 5% 、 10% 、 15% 和 20% , 每一浓度 5ml , 再铺加样品 0.7ml 于蔗糖密度梯度上, 10°C $65,000 \times g$ 离心 3.5h 。取出密度相当于 1.059g/cm^3 的组分, 对 0.01M PB 透析 48h , 再浓缩到 $1-2 \text{ml}$, 即为纯化的流感病毒 RNP。

(四) 蛋白质和 RNA 含量的测定

蛋白质含量以牛血清白蛋白(生化试剂, 上海牛奶公司综合厂)为标准, 用 Lowry 氏法测定。RNA 含量以酵母 RNA (生化试剂, 上海生化所) 为标准, 用苔黑酚法测定。

(五) 免疫双扩散

中央孔为提纯的 RNP, 浓度为 0.67mg 蛋白/ ml , 加入 SDS 至终浓度为 1% , 37°C 温育 30min 。外周孔 1、3、4 分别为抗甲型流感病毒 RNP 血清、抗 A/英国/77 (H3N2) 血清及抗甲型流感病毒 MP 血清(以上血清系英国 J. S. Oxford 博士赠与), 孔 2 为抗粤防 77-38 RNP 血清。 37°C 温育 24h 。

(六) 高浓度尿素 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用连续系统, 凝胶浓度 7.5% , 长度为 $0.5 \times 8 \text{cm}$, 含尿素 5M 。样品为提纯的甲型流感病毒 $40 \mu\text{l}$ (1mg 蛋白/ ml) 和提纯的 RNP ($370 \mu\text{g}$ 蛋白/ ml), 加 SDS、 β -巯基乙醇和尿素分别至终浓度为 1% 、 2% 和 8M , 100°C 温育 3min 。电极缓冲液为 1mM EDTA- 0.25% SDS- 0.01M PB, 25V 电泳 16h 。

(七) 等电聚焦电泳

5% 丙烯酰胺 3ml , 两性电解质 Ampholine 0.5ml (瑞典 LKB, pI 3.5—10), 0.004% 核黄素 2.5ml , 流感病毒 RNP $30 \mu\text{g}$, 混合后倒入 $0.5 \times 8 \text{cm}$ 玻管, 紫外光下聚合 20min 。电泳槽正极为

5% 磷酸, 负极为 2% NaOH 溶液。 1.5mA , 电泳 5h 。电泳毕, 一根凝胶切成等长 8 段, 浸入 0.5ml 蒸馏水中过夜, 次日测定溶液 pH 值。另一根凝胶用 12% 三氯醋酸浸泡 24h 后, 用考马斯亮蓝 G 250 染色, 7% 醋酸脱色。

(八) 分析超离心

用 MSE Centriscan 75 离心机, 流感病毒 RNP 的蛋白浓度为 0.67mg/ml , 先对 STEU 缓冲液透析过夜, 离心前加 10% Triton x-100 至终浓度为 1% 。离心温度 20°C , 采用 Schlieren 光学系统, 刀口角度 60° , 转速达 $15,000 \text{rpm}$ 时开始扫描。扫描时间间隔 5min , 共扫描 5 次, 计算各峰的沉降系数。

(九) 补体结合试验

抗体为抗甲型流感病毒 RNP 抗体 ($1:8$ 稀释), 抗原为提纯的 RNP (蛋白含量 0.67mg/ml), 按文献[7]进行。

(十) 抗甲型流感病毒 RNP 抗血清的制备

提纯的甲型流感病毒 RNP $200 \mu\text{g/ml}$, 加等量福氏完全佐剂免疫兔一只, 分多点注射于四肢肌肉、足垫, 隔 2 周重复注射一次, 共免疫 3 次。末次免疫后 9 天放血。

结 果

(一) 流感病毒 RNP 的提纯

1. 葡聚糖凝胶 Sephadex G 200 柱层析: 经 Tritonx-100 和 DOC 裂解的鸡胚尿囊膜粗提液通过 Sephadex G 200 柱层

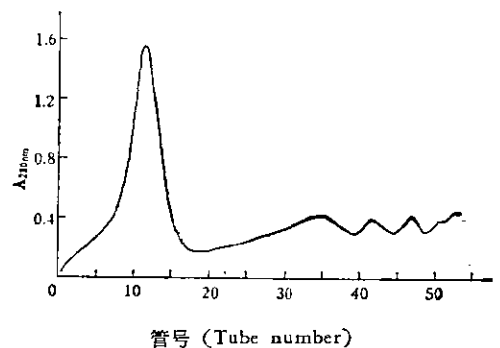


图 1 RNP 粗提液的 Sephadex G 200 柱层析
Fig. 1 Sephadex G 200 column chromatography of influenza virus RNP extracts.

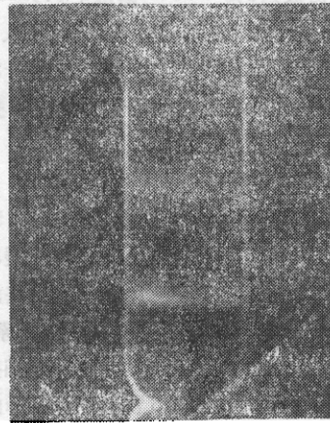


图 2 Sephadex G 200 柱层析第一洗脱峰的不连续蔗糖密度梯度超离心

Fig. 2 Discontinuous density gradient centrifugation of the first peak of Sephadex G 200 column chromatography.

析,洗脱后出现 6 个蛋白峰(图 1)。其中第 1 洗脱峰的体积,约等于该柱的外水体积,因流感病毒 RNP 分子量大于 Sephadex G 200 分离蛋白质的工作范围上限,故应出现于第一洗脱峰中。合并第一峰洗脱液,测 HA 为阴性($<1:10$)。

2. 不连续密度梯度超离心: 第 1 洗脱峰浓缩后,经不连续蔗糖密度梯度超离心,样品被分为 5 层(图 2),取密度相当于 1.059 g/cm^3 的第四层,即为提纯的流感病毒 RNP。

(二) 流感病毒 RNP 的鉴定

1. 回收量: 测定回收的流感病毒 RNP 的蛋白质及 RNA 含量表明(表 1),尿囊液 HA 滴度达 $1:320$ 以上时,每个尿囊膜可回收流感病毒 RNP 蛋白质 $8.5-11.2 \mu\text{g}$,测定 RNA 占全部 RNP 的含量约为 10.15% ,与文献[8]报告相符。

2. 补体结合试验 所提纯的流感病毒 RNP 补体结合试验效价为 $1:128$,证实其确为流感病毒 RNP。

3. 免疫双扩散: 孔 1、2 与中央孔形成的沉淀线位于抗原抗体孔间,略向抗原孔弯曲,并且完全吻合。中央孔与孔 3、4 间未

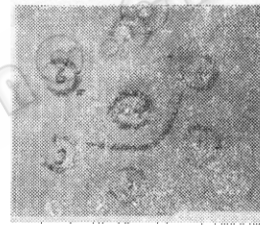


图 3 提纯的流感病毒 RNP 的免疫双扩散
Fig. 3 IDD of purified influenza virus RNP

中央孔: 提纯 RNP; 孔 1: 抗 RNP 标准血清; 孔 2: 制备的免抗 RNP 血清; 孔 3: 抗 MP 标准血清; 孔 4: 抗 A/England/77 (H3N2) 标准血清; 孔 5、6: 空白。考马斯亮蓝 G 250 染色, 7% 醋酸脱色。

Well 1: Anti RNP (reference Sera), 2: anti RNP (prepared Sera); 3: anti MP (reference sera); 4: anti A/England/77 (H3N2).

表 1 提纯的流感病毒 RNP 中蛋白质和 RNA 的含量

Table 1 The content of proteins and RNA of purified influenza virus RNP

实验 Experiment	尿囊膜数 number of allantoic membrane	尿囊液 HA 滴度 HA titer of allantoic fluid	蛋白质含量 content of proteins (mg)		RNA 浓度 concentration of RNA (mg/ml)	RNA/RNP %
			含量/膜 content/ membrane	总量 total mg/ml		
1	95	1:320	0.0085	0.81 0.27	0.034	11.1
2	150	1:320	0.0097	1.46 0.73	0.078	9.65
3	120	1:640	0.0112	1.34 0.67	0.072	9.7
平均值 Average						10.15

出现沉淀线,说明提纯的 RNP 抗原不含流感病毒表面抗原,也不含膜蛋白(图 3)。

4. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳: 提纯的 RNP 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳被分为 3 条区带, 其位置分别与甲型流感病毒粤防 77-38 的 P₁、P₂、NP 一致, 不含有其它多肽(图 4)

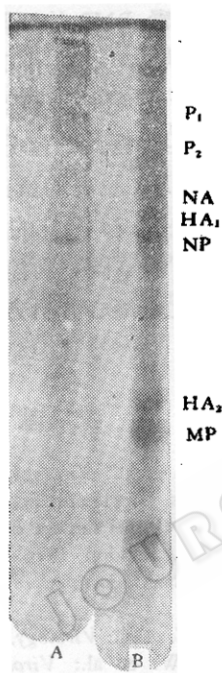


图 4 提纯的流感病毒 RNP 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 4 SDS-polycrylamide gel electrophoresis of purified influenza virus RNP

考马斯亮蓝 G-250 染色, 7% 醋酸脱色。

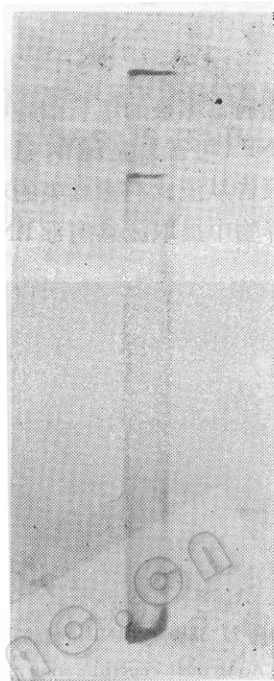
A: RNP, B. 流感病毒

Stained by Coomassie blue G-250, destained by 7% acetic acid

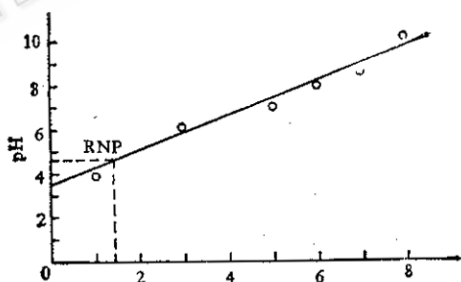
A. RNP, B. Influenza virus

(三) 粤防 77-38 病毒 RNP 的部分理化性质

1. 等电点: 甲型流感病毒粤防 77-38 株 RNP 经等电聚焦电泳后出现一条区带(图 5A), 参照对照凝胶电泳后的 pH 值,



(A)



(B)

凝胶距离 length of gel (cm)

图 5 流感病毒 RNP 的等电聚焦电泳

Fig. 5 Isoelectric focusing of influenza virus RNP

(A) RNP 的电泳位置, 考马斯亮蓝 G-250 染色, 7% 醋酸脱色; (B) RNP 的 pH 测定。

(A) Position of RNA; (B) pH measurement of RNP.

测出 RNP 的 pH 值为 4.6(图 5B)。

2. 粤防 77-38 病毒 RNP 的沉降系数测定: 经 1% Triton x-100 处理的 RNP 在沉降过程中出现二个沉降峰 I、II, 其沉降系数分别为 7.8S 和 56.1S(图 6)。

讨 论

从流感病毒感染的组织细胞中提取流感病毒 RNP 可省去提纯病毒的步骤, Pons^[5] 曾报告从流感病毒感染的鸡胚成纤维细胞培养物中提取流感病毒 RNP, 但是

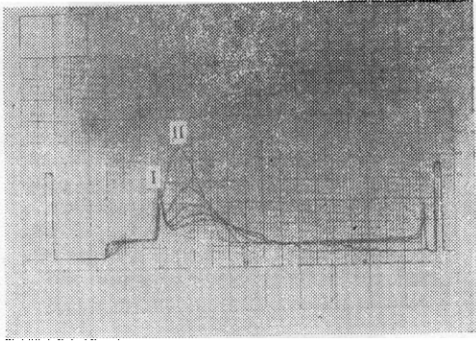


图 6 粤防 77-38 病毒 RNP 的分析超离心
Fig. 6 Analytical centrifugation of A/
Kuang Dong/77/38 RNP

产量少、方法也较复杂。本文介绍从感染的鸡胚尿囊膜中提纯流感病毒 RNP, 收获量较大, 简化了提纯方法, 其纯度可用于流感的多种免疫学诊断及肽图分析。

在制备流感病毒 RNP 粗提物中, 曾比较用 pH 4.5 醋酸缓冲液与饱和硫酸铵二种沉淀法所得到的 RNP 产量, 结果表明前者提取量约比后者高 10 倍。测定流感病毒 RNP 的等电点为 pH 4.6, 进而证实醋酸缓冲液沉淀法是适宜的。

蛋白质和 RNA 含量测定、补体结合试验、免疫双扩散及 SDS-PAGE 等实验均证实所提取的 RNP 与病毒中存在的 RNP 完全相同, 是一种与 RNA 和多聚酶结合

在一起的核蛋白复合体^[8]。

流感病毒 RNP 的等电点尚未见报道, 本文测定的粤防 77-38 株 RNP 的等电点为 4.6, 是否与其它毒株相同, 尚待进一步研究。

Pons 等曾报道^[5], 经 10—35% 甘油梯度 STEU 缓冲液的速率梯度离心, RNP 被分为 48 S、40S 和 34S 3 种组分, Duesberg 等^[9]报告流感病毒 RNP 的沉降系数较高, 为 70S、60S 和 50S。本文用 Triton x-100 处理后进行分析超离心, 仅发现 7.8S 和 56.1 S 二种成分。据此 S 值分析, 7.8S 的成分可能是与 RNA 脱离的蛋白质, 而 56.1 S 的成分是粤防 77-38 毒株的 RNP。RNP 的片段数及其 S 值不同, 可能是由提纯方法、毒株特点及超离心分析方法不同所引起。

参 考 文 献

- [1] Inglis, S. C. et al.: *Virology*, 74: 48, 1976.
- [2] Stuart-Harris, C. H. and Schild, G. C.: *Influenza: the viruses and the diseases*, Edward Arnold. Ltd., London, 1976.
- [3] Virelizier, et al.: *Postgrad Med. J.*, 52: 332, 1976.
- [4] Schild, G. C. et al.: *Virology*, 93: 560, 1979.
- [5] Pons, M. W. et al.: *Virology*, 46: 149, 1971.
- [6] 郭元吉等: 流行病学防治研究, 3: 174, 1977.
- [7] 中国医学科学院流研所: 常见病毒病实验技术, 科学出版社, 北京, 1978, 第39页。
- [8] Kilbourne, D: *The influenza viruses and influenza*, Academic Press, New York, 1975, p. 156.
- [9] Duesberg, P. H. et al.: *J. Mol. Biol.*, 42: 485, 1969.

PURIFICATION AND STUDIES OF SOME PHYSICHEMICAL PROPERTIES OF INFLUENZA A VIRUS RNP

Lin Qiao Zhang Xin Zhang Li Yian Jiabin Wang Mauliang
(*Hubei Academy of Medical Sciences, Wuhan*)

Influenza A virus RNP was purified by Triton X-100 and DOC disruption, Sephadex G200 column chromatography and density gradient centrifugation from allantoic membranes of embryonated eggs infected by influenza A viruses. It has been demonstrated that the purified RNP is identical with the RNP in the virion by protein and RNA content measurements,

complement fixation, double immunodiffusion and SDS-PAGE. The isoelectric point and the sedimentation coefficient of A/Guang Dong/77/38 (H3N2) RNP have been found to be 4.6 and 56.1 S respectively.

Key words

Influenza A virus; RNP; Purification