

腮腺炎病毒的结构多肽——分子量的电泳测定

吴柏桦 郜金荣 张珈敏
刘智勇 梁 勇 程惟丽 杨亚雄
(武汉大学病毒学系, 武汉)

腮腺炎病毒感染鸡胚后收集尿液和羊水, 通过差异离心和蔗糖密度梯度离心提纯病毒。经 SDS-PAGE 分离, 以铬银染色法结合溴化乙锭和考马斯亮兰染色, 发现病毒含有 13 种结构多肽, 分子量分别为 79, 74, 70, 65, 61, 59, 56, 53, 50, 45, 41, 34 和 31×10^3 d。

关键词 腮腺炎病毒; 结构多肽

1953 年 Johson 和 Goodpasture 确定流行性腮腺炎的病原是滤过性因子。Contell^[1] 基于腮腺炎病毒的形态, 对乙醚的敏感性, 血凝作用, 溶血作用, 病毒粒子表面存在神经胺酶以及与其它付粘病毒如新城疫病毒, 仙台病毒, 猴病毒 5 等具有血清学交叉反应而将腮腺炎病毒归于付粘病毒。此后 Jensik 等^[2]、Örvell^[3]、McCarthy 等^[4]、Rima 等^[5]、Naruse 等^[6]、Herrler 等^[7] 对鸡胚、鸡胚细胞及 Vero 细胞中培养的 Jo Ann 株、Anders 株和 Urabe 株等不同毒株腮腺炎病毒的多肽进行了研究。作者们的研究结果虽然不乏基本相符者, 但也有许多明显不一致的结果。本文报道鸡胚培养的 ME 株腮腺炎病毒, 经差异离心及密度梯度离心提纯后, SDS-PAGE 分离, 铬银染色结合溴化乙锭染色及考马斯亮兰染色分析结构多肽的结果。

材料和方法

(一) 病毒

ME 株腮腺炎病毒引自武汉生物制品研究所, 毒种接种到 7 日令鸡胚尿囊腔中增殖, 孵育 5 天后收获尿囊液及羊水, 测血凝效价后, -10°C 保存。

(二) 病毒粒子的提纯

腮腺炎病毒感染的鸡胚尿囊液及羊水 (血凝效价为 800), 经 4000rpm 30 分钟低速离心, 除去尿囊液中的细胞碎片等, 上清液经 100,000g 超离心 2 小时, 其沉淀以 PBS (磷酸缓冲液) pH7.2 缓冲液悬浮, 共作两轮差速离心, 第二次超离心的沉淀用 TSV (0.01M Tris · HCl pH7.4, 0.1M NaCl, 0.001M EDTA) 悬浮。

将差速离心初步提纯的病毒再进行两次蔗糖梯度纯化。第一次梯度为 30—60% 蔗糖, 铺加样品后以 100,000g 离心 4 小时, 在约 50% 浓度的地方形成一条乳白色带。收集病毒带, 铺于 10—60% 蔗糖梯度上进行梯度离心, 经 100,000g 离心 6 小时, 取 51% 蔗糖处的病毒区带, 置 -10°C 冰箱中备用。

(三) 电泳

采取 Leammli^[8] 建立的 SDS-PAGE 系统, 浓缩胶 5%, 分离胶 10%, 垂直板式电泳。样品处理液含有 4% SDS, 10% β -巯基乙醇, 20% 甘油, 0.02% 溴酚兰, 病毒样品在电泳前加入等体积的样品处理液, 在沸水浴中处理 5 分钟, 每孔加 10—20 μl 样品, 开始电泳时电压 150—200 伏, 待溴酚兰带进入分离胶后, 以 100V 电泳 3—4 小时, 或 60V 电泳 6—8 小时, 至溴酚兰带走至凝胶

本文于 1984 年 10 月 9 日收到。

卫生部武汉生物制品所疫室林放涛, 钟绍基同志赠给病毒。本系秦浚川, 林栖凤同志和我们进行了有益的讨论, 胡远扬同志制备电镜照片, 汪红同志繁殖病毒, 一并致谢。本实验为教育部科研经费所支持。

边缘时停止电泳。

(四) 染色

电泳后的胶经 50% 甲醇-10% 乙酸固定 30 分钟以上,然后采用以下三种方法进行染色,1. 络银染色:参照张向明^[9]改进的络银染色法,为了使背景明亮,清洁,适当延长 $K_2Cr_2O_7-HNO_3$ 以及 $AgNO_3$ 作用后的水洗时间。凝胶板在透射光上观察和拍照;2. 考马斯亮兰染色:电泳后的凝胶经过至少 30 分钟的固定以后,再在 10% 乙醇-5% 乙酸中浸三遍,每遍 10 分钟,不时振荡,然后将凝胶浸在 0.25% 考马斯亮兰 R250 溶液中(45% 甲醇-0.25% R250)染色 2—4 小时,以 7.5% 乙酸-5% 甲醇脱色,约需 6—8 小时,至背景很浅、蛋白带清晰为止。凝胶板在透射光上观察,加橙色滤光片拍照;3. 溴化乙锭染色:参照 Maniatis^[10] 描述的方法,经溴化乙锭染色的凝胶,在 1mM $MgSO_4$ 溶液中浸泡 1 小时,减低背景的荧光,加红色滤光片拍照。

(五) 病毒多肽的分子量测定

用作病毒多肽分子量测定的标准蛋白有:牛血清白蛋白(MW 68,000),辣根过氧化物酶(MW 40,000),胰蛋白酶(MW 23,000),RNase(MW 12,600),细胞色素 C(MW 11,700)。

将已知分子量的标准蛋白与经处理后的病毒样品在同一胶板中电泳,染色后以标准蛋白分子量的对数($\lg MW$)为纵坐标,相对迁移率为横坐标做出标准曲线。根据病毒多肽的相对迁移率找到

曲线上对应的 $\lg MW$, 算出病毒多肽的分子量。

结果及讨论

1. 收获的鸡胚尿液羊水,其血凝效价为 800 血凝单位。差异离心时超速离心的上清液无血凝效价,说明在 100,000 g 的离心力下经 2 小时离心病毒全部沉降到管底。蔗糖梯度离心形成乳白色区带(图 1)。分部收集后经阿贝折射仪测定此区带蔗糖浓度为 51%,此浓度的密度与腮腺炎病毒的密度 $1.2323g/cm^3$ 吻合;血凝试验时 $10\mu l$ 纯化病毒即达强阳性;电镜检查病毒粒子基本完整(图 2),无细胞碎片或细胞器。为了进一步证明提纯的病毒材料中可能混杂有尿囊液和羊水水中的某些成分,将病毒与未感染病毒的正常尿液和羊水同时电泳,未发现有同样的蛋白带(图 3),说明本实验用病毒材料的纯度是可靠的。

2. 病毒经 SDS-PAGE 分离后,络银染色,在透射光上可检出 22 条着色带(图 4)。络银染色是极其敏感的蛋白质染色法,比考马斯亮兰灵敏 100 倍以上,可与放射标记蛋白质的放射自显影相媲美,在电泳凝胶中它可检出 ng 量的蛋白质^[9]。但是

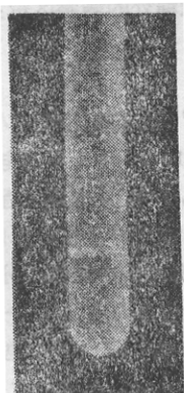


图 1 腮腺炎病毒形成的区带(在 100,000g 离心力下,在蔗糖梯度中)

Fig. 1 The mumps virus forms a band (in sucrose gradient under 100,000g centrifugal force)

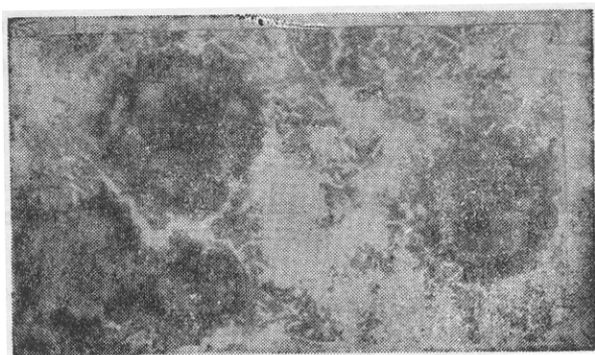


图 2 提纯的腮腺炎病毒粒子的电镜照片

Fig. 2 Electron micrograph of purified mumps virus particles

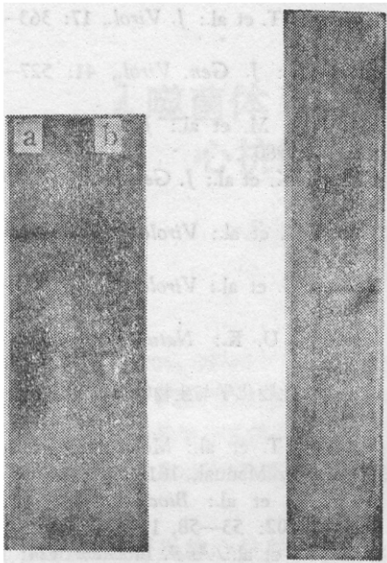


图3 SDS-PAGE
分离后铬银染色
a. 正常鸡胚尿囊液
b. 提纯的腮腺炎病毒

Fig. 3 Silver-Chromium staining bands after SDS-PAGE a. uninfected allantoic fluid b. purified mumps virus

图4 腮腺炎病毒
SDS-PAGE 分
离后铬银染色

Fig. 4 Silver-Chromium staining bands of mumps virus after SDS-PAGE

它不仅可以使蛋白质着色,而且也可以检出凝胶中 ng 量的核酸,其对核酸的敏感性超过一般用于核酸的染料^[11]。Berry 等^[12]证实凝胶中铬银染色可检出 0.03ng/mm² 的双链 RNA,其敏感性是溴化乙锭的 10—30 倍。Whitton 等^[13]进一步证实凝胶中病毒的单链或双链 DNA 或 RNA 对铬银染色有相似的敏感性。他们认为铬银染色将成为病毒结构和功能研究以及鉴定和诊断的重要工具。

考虑到铬银染色可以使核酸着色,因此用核酸专一性染料溴化乙锭和蛋白质专一性染料考马斯亮兰染色电泳后的胶,结果溴化乙锭染出 9 条带(图 6);考马斯亮兰显现 13 条带(图 5)。各带分别对应于铬银染 22 条带之一的相对迁移率。

腮腺炎病毒基因组为不分段的 50—55S 单链 RNA。因其分子量大,电泳时不可能进入 10% 的分离胶。提纯的病毒粒子,排除了细胞 DNA 污染的可能;电泳样品处理液中的 SDS 和 100℃ 5 分钟处理避免了 RNA 的降解。因此目前我们所观察到的 9 条核酸带不可能是污染,而很可能是 East 等^[14]所观察到的病毒粒子内所包涵的互补于亲代 RNA 分子的 RNA 片段。

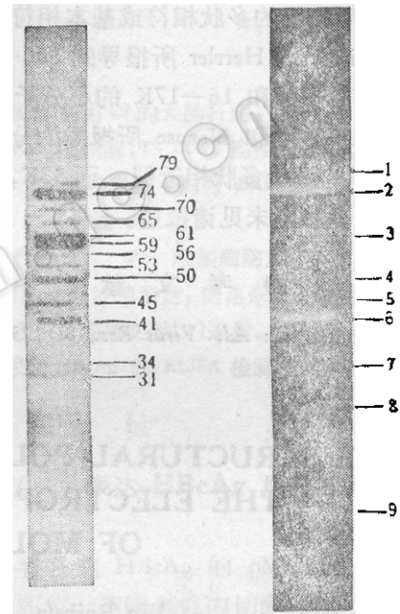


图5 腮腺炎病毒
SDS-PAGE 分离后
考马斯亮兰染色(右
侧数字 $\times 10^3$ 为其
分子量)

Fig. 5 Coomassie brilliant blue staining bands of mumps virus after SDS-PAGE (number on right side $\times 10^3$ is MW of indicated band)

图6 腮腺炎病毒
SDS-PAGE 分离后
EB 染色

Fig. 6 Ethidium bromide staining bands of mumps virus after SDS-PAGE

本实验所检出的腮腺炎病毒结构多肽为 13 种,超过前述作者所检出的多肽种

数^[2-7]。可能前述作者只列举了主要的多肽而略去了次要的多肽。腮腺炎病毒基因组的信息容量可编码约 20 个平均为 330 个氨基酸的多肽。因此足够为 13 个结构多肽以及若干非结构多肽编码。

3. 本实验所检出的 ME 株腮腺炎病毒 13 种结构多肽, 其分子量分别为 79, 74, 70, 65, 61, 59, 56, 53, 50, 45, 41, 34 和 31×10^3 d, 其中 79K, 74K, 70K, 65K, 61K, 56K, 45K, 41K 分别与 Jensik, Örvell, McCarthy, Rima, Naruse, Herrler 的实验所检出的多肽相符或基本相符。未发现 Rima 和 Herrler 所报导的 180—200 K 的大分子量和 16—17K 的小分子量多肽。31K 多肽和 Naruse 所报导的分子量为 30K 的微量多肽相近似。而 53K, 50K 和 34K 多肽则未见诸报道。

参 考 文 献

[1] Contell, K.: *Adv. Virus Res.*, 8: 123—164,

1961.
[2] Jensik, S. T. et al.: *J. Virol.*, 17: 363—373, 1976.
[3] Örvell, C.: *J. Gen. Virol.*, 41: 527—539, 1978.
[4] McCarthy, M. et al.: *J. Gen. Virol.*, 46: 15—27, 1980.
[5] Rima, B. K. et al.: *J. Gen. Virol.*, 46: 501—505, 1980.
[6] Naruse, H. et al.: *Virology*, 112: 119—130, 1981.
[7] Herrler, G. et al.: *Virology*, 119: 430—438, 1982.
[8] Leammli, U. K.: *Nature*, 227: 680—685, 1970.
[9] 张向明: 生物化学与生物物理进展, 3: 63—64, 1983.
[10] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 161—162, CSH, 1982.
[11] Laura, L. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 102: 53—58, 1981.
[12] Berry, M. et al.: *Anal. Biochem.* 124: 180—184, 1982.
[13] Whitton, K. L. et al.: *J. Virol. Methods*, 7: 185—198, 1983.
[14] East, J. L.: *J. Virol.*, 8: 161—173, 1971.

THE STRUCTURAL POLYPEPTIDES OF MUMPS VIRUS— THE ELECTROPHORESIS DETERMINATION OF MOLECULAR WEIGHT

Wu Baihua Gao Jinrong Zhang Jiamin

Liu Zhiyong Liang Yong Chen Weili Yang Yaxiong

(Department of Virology, Wuhan University, Wuhan)

Mumps viruses were propagated in allantic sac of chicken embryos. The virus containing allantic and amniotic fluids were harvested after inoculation for 5 days. Virus was purified by differential centrifugation and sucrose gradient centrifugation. The purified virions were analysed by SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis. It was found that mumps virion

composed of 13 structural polypeptides with molecular weight of 79, 74, 70, 65, 61, 59, 56, 53, 50, 45, 41, 34. and 31×10^3 d respectively.

Key words

Mumps virus; Structural polypeptide