

## 腮腺炎病毒核衣壳的分离、纯化及其核酸分子量的计算

郜金荣 周晓峰 王智勇 吴柏桦

(武汉大学病毒学及分子生物学系, 武汉)

腮腺炎病毒是一种副粘病毒, 它能引起人的呼吸道、唾液腺、性腺、胰腺及中神经系统的急性发炎<sup>[1,2]</sup>。1935年 Johnson 和 Goodpasture 确定流行性腮腺炎的病原体是滤过性因子<sup>[3]</sup>。Contell 进一步证明腮腺炎病毒属于副粘病毒<sup>[4]</sup>。近年来, 对于该病毒的蛋白质研究较多, Jensik 等<sup>[5-10]</sup>及吴柏桦等<sup>[11]</sup>对腮腺炎的不同株的结构多肽进行了研究。

有关腮腺炎病毒核酸的研究较少, 国内还未见报道。James 和 Kingsbury<sup>[12]</sup>测定了腮腺炎病毒的基因组为 50 S RNA。

从在猴肾细胞 (vero cell) 或在鸡胚成纤维细胞 (CEF cell) 中繁殖的病毒粒子提取核酸, 除 50 S RNA 外还有 4S、18S 和 28S, 这些很象细胞 RNA<sup>[13]</sup>。而从细胞内核衣壳中可以得到高产量的核酸, 且很少含有小分子的 RNA<sup>[13]</sup>。从病毒粒子中提取的核酸量仅仅为从核衣壳中提取的 2—4%。

对副粘病毒中其他成员如麻疹病毒、SV5、NDV 等病毒核酸的研究已有报道, 但对腮腺炎病毒核酸的研究极少报道。本文报道从感染细胞内制备腮腺炎病毒核衣壳, 经蔗糖密度梯度离心纯化, 电镜观察, 测量核衣壳长度, 计算其核酸分子量。

### 材料和方法

#### (一) 材料

腮腺炎病毒 Enders 株种毒由卫生部武汉生物制品研究所疫苗室提供。

10 日龄鸡胚。

Hanks、Pucks 液, 小牛血清、双抗 (10000 u/ml), 水解乳蛋白。

PBS (磷酸盐缓冲液) pH 7.2。

ET 缓冲液 (0.01 mol/L 的 Tris · HCl, pH 7.4; 0.001 mol/L 的 EDTA)。

SET 缓冲液 (0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L Tris · HCl pH 7.4; 0.001 mol/L 的 EDTA)。

NP 40。

#### (二) 方法

1. 病毒: 7 日龄鸡胚以腮腺炎病毒尿囊腔接种, 36—37°C 培养 5 天, 4°C 过夜, 收获尿液及羊水, 测血凝效价为 320—640, -12°C 贮存, 同时作无菌实验。

2. 细胞: 参考 James 等<sup>[12]</sup>的制备方法, 稍有修改, 用小牛血清代替马血清。

3. 感染: 将血凝效价换算成 EID<sub>50</sub> 单位, 在 5 ml 培养液长成致密单层细胞中, 接种血凝效价为 320 的尿液 0.3 ml, 即接种量为 0.5 EID<sub>50</sub>/细胞。37°C 吸附一小时, 倾去病毒液, 加 5 ml 乳液液 (Hank's 含 0.5% 的水解乳蛋白)、小牛血清终浓度为 1%, 37°C 培养。

4. 病毒核衣壳制备: 感染 72 小时后, 倾去维持液, 用 PBS (pH 7.0) 洗两次, 细胞用 PBS 悬浮, 3,000 r/min 离心 20 分钟, 用 ET 悬浮成 2 × 10<sup>7</sup> 细胞/ml, 冰浴摇动 15 分钟, 加入 NP 40 使终浓度为 1%, 冰浴继续摇动 15 分钟, 破碎细胞, 4,000 r/min 离心 20 分钟除去细胞核, 上清样品铺在 20—70% 蔗糖梯度顶部, RPS 40 T 转头 36,000 转 4°C 离心 4 小时, 出现三条带。分部收集, -12°C 保存, 用磷钨酸负染, 电镜观察, 拍照。

### 结果与讨论

1. 中带电镜观察: 蔗糖浓度为 62.5%, 电镜下可见大量线状螺旋对称核衣壳(图 1-A)。用

本文于 1986 年 7 月 27 日收到。

武汉大学病毒学及分子生物学系电镜室赵克斌老师、测试中心的张启林同志提供电镜照片, 病毒学教研室的刘子夜老师给予支持, 武汉生物制品研究所钟绍基同志提供毒种, 一并致谢。

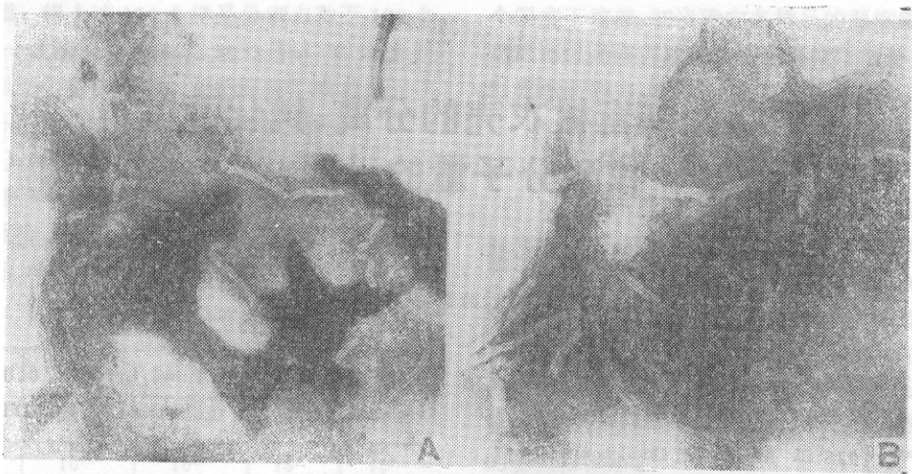


图1 分离的细胞内核衣壳电镜照片

A. 放大 40,000 倍 B. 存放一个月后,放大 48,000 倍

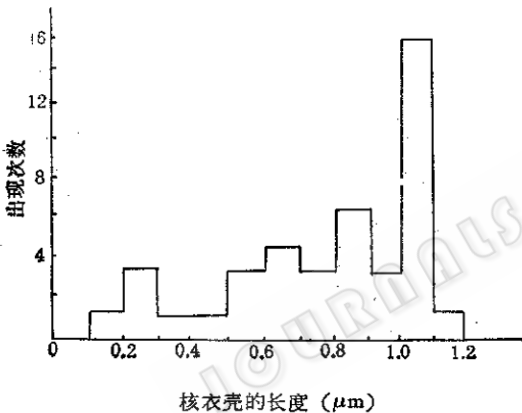


图2 核衣壳长度分布

上述方法可制备高产量的核衣壳。电镜照片除核衣壳外,背底干净,且 62.5% 的蔗糖密度为 1.30,与腮腺炎病毒核衣壳的密度<sup>[13]</sup>一致,说明制备的核衣壳的纯度是可靠的。

2. 根据 T. Nakai 等<sup>[14]</sup>的方法,随机测量 40 个核衣壳的长度,分布情况如图 2。

长度在 1.00—1.10 μm 出现的机率最大,取平均值为 1.05 μm 作为核衣壳的长度。核衣壳的半径为 90 Å<sup>[15]</sup>,核苷酸的平均分子量为 320 dalton,病毒核酸分子量计算如下:

$$\begin{aligned}
 MW &= \frac{1.05 \times 10^4 \text{ \AA}}{55 \text{ \AA}} \times \sqrt{(2 \times 3.14 \times 90)^2 + 55^2} \\
 &\quad \times \frac{320}{3.4} \\
 &= 190 \times 567.8 \times 94 = 8 \times 10^6 \text{ dalton}
 \end{aligned}$$

核衣壳的长度为 1.05 μm,这与 Schluedberg<sup>[16]</sup>报道的其他副粘病毒如麻疹病毒核衣壳长度为 1.06—1.15 μm、SV 5 的为 1.02 μm、NDV 的为 1.06 μm 接近。计算的核酸分子量为  $8 \times 10^6$  dalton,也与其它副粘病毒如 NDV 的接近<sup>[14]</sup>。

3. James<sup>[12]</sup>等报道用马血清培养细胞比小牛血清好,认为小牛血清会干扰病毒核衣壳的形成,我们用小牛血清没有发现干扰现象,得到了满意的结果。

根据一个血凝单位相当于  $10^{-4}$  EID<sub>50</sub><sup>[17]</sup>,计算出每瓶细胞 (5 ml) 接种血凝效价 320 的病毒尿液 0.3 ml,实验证明这种接种量是可行的。

另外,用 ET 配制的蔗糖 (62.5%), -12°C 保存病毒核衣壳,一月后电镜下见到的核衣壳无明显变化 (图 1-B),说明保存方法可靠,可能是 ET (pH 7.2) 的缓冲液以及高浓度的蔗糖对核衣壳有保护作用。

## 参 考 文 献

- [1] Azumi, P. H.: *Journal of the American Medical Association*, 207: 509—512, 1969.
- [2] Bang, H. C. & J. Bang: *Acta Medica Scandinavica*, 113: 487—505, 1943.
- [3] Johnson, C. D. & E. W. Goodpasture: *Amer. Jour. Hyg.*, 21(1): 46—57, 1935.
- [4] Contell, K.: *Adv. Virus Res.*, 8: 123—164, 1961.
- [5] Jensik, S. T.: *J. Virol.*, 17: 363—373, 1976.
- [6] Örvell, C.: *J. Gen. Virol.*, 41: 527—539, 1978.

- [7] McCarthy, M. et al.: *J. Gen. Virol.*, 46: 15—27, 1980.
- [8] Rima, B. K. et al.: *J. Gen. Virol.*, 46: 501—505, 1980.
- [9] Naruse, H. et al.: *Virology*, 112: 119—130, 1981.
- [10] Herrler, G. et al.: *Virology*, 119: 430—438, 1982.
- [11] 吴柏桦等: *微生物学报*, 25(4): 313—316, 1985.
- [12] James, L. & D. W. Kingsbury: *J. Virol.*, 8: 161—173, 1971.
- [13] McCarthy, M.: *J. Gen. Virol.*, 58: 205—209, 1982.
- [14] Nakai, T. et al.: *Virology*, 36: 50—67, 1969.
- [15] 戴华生: *新实验病毒学*, 中国学术出版社, p. 813, 1983。
- [16] Schluenderberg, A.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 42: 1012—1015, 1971.
- [17] 中国医学科学院流行病学防治研究所: *常见病毒病实验技术*, 科学出版社, 北京, p. 260, 1978。

(上接第96页)

续表

编号	项目名称	姓名	专业职务	单位名称	起止年月
0102	一株脊椎动物细小病毒复制特性的研究	罗 经	副研究员	中国科学院武汉病毒所	1988.01—1989.12
0106	柞蚕传染性软化病毒病的研究	胡远扬	讲师	武汉大学	1988.05—1989.05
0108	家禽病毒快速检测技术基础的研究	欧守杼	教授	华南农业大学	1988.01—1990.12
0120	香石竹斑驳病毒衣壳蛋白基因在寄主体内的表达及抗病性	于嘉林		北京农业大学	1988.01—1990.12
0121	溶原转换性噬菌体的研究: 转换性状基因的分离和克隆	司稚东	研究员	中国科学院上海植物生理研究所	1988.01—1989.12
0122	植物病原菌毒素及其在抗病选种上的应用研究	章元寿	副教授	南京农业大学	1988.01—1990.12
0126	三类昆虫病毒对脊椎动物的比较毒理学研究	杨志荣	讲师	四川大学	1988.01—1990.12

注: 个别项目如有变动, 以国家自然科学基金委的正式通知为准。

由于学科的相互交叉渗透, 尚有一些微生物学的项目被归入生物化学、分子生物学、遗传学及医学等范畴, 将分别公布于相应的学报中。此外, 有少数课题作为与高技术有关的新概念和新构思课题, 将报请有关专项经费资助, 未在表中列出。

国家自然科学基金委员会生物科学部

齐书莹 高文淑