

腮腺炎病毒的多肽及其在感染细胞中的合成

李雁春 吴柏桦

(武汉大学病毒学及分子生物学系, 武汉)

以差异离心和蔗糖密度梯度离心法提纯了在鸡胚尿囊腔中繁殖的腮腺炎病毒粒子。并用 SDS-PAGE 分析病毒粒子的结构多肽, 发现其结构多肽为 11 种, 分子量在 35K 到 72K 之间。同时还检测到 HN 蛋白的多聚体和 F 蛋白的大亚基 F1。将腮腺炎病毒分别感染 HeLa、Vero 和 CE 细胞, 比较这三种细胞对 ME 株腮腺炎病毒的敏感性, 发现 CE 细胞是 ME 株的敏感宿主。用 [³⁵S] 蛋氨酸标记病毒感染的 CE 细胞, 以 SDS-PAGE 及放射自显影法检测到腮腺炎病毒在宿主细胞中合成了至少 8 种多肽, 分子量在 26.5K 到 94K 之间。对这些多肽在细胞中不同时期合成情况进行了研究。还用脉冲追踪 (Pulsechase) 技术在感染细胞中发现了 F0 到 F 这一转译后加工 (Posttranslational procession) 现象。此外也研究了放线菌素 D 和高浓度氯化钠对细胞蛋白质合成的抑制作用。

关键词 腮腺炎病毒; 多肽生物合成

腮腺炎病毒 (Mumps virus) 是一种副粘病毒, 其基因组为 50S 负链 RNA^[1]。许多作者对腮腺炎病毒的结构多肽进行了大量研究。但是由于实验条件不同, 所报道的结构多肽的数目和分子量都有所差异^[2-7, 10, 29]。两种多肽被检定为糖蛋白。其中一种具有神经氨酸酶活性, 另一种具有溶血活性, 分别命名为 HN 和 F 蛋白^[3-7, 11]。此外, 从个别毒株中还检出分子量较小的第三种糖蛋白, 并推测其为宿主细胞肌动蛋白衍生而来^[9]。

脉冲追踪试验发现腮腺炎 F 蛋白存在转译后加工 (Posttranslational procession) 过程。F0 为前体蛋白, 加工切割后为 F 蛋白, 而 F 蛋白由 F1 及 F2 以二硫键联结而成。在还原状态下分离为 F1 及 F2^[5, 6, 8, 9, 12, 14]。而 F0 蛋白的转译后加工与副粘病毒的融合特性及感染活性密切相关^[13, 15-17]。

在感染腮腺炎病毒的细胞中还发现 2—3 种小分子量的病毒特异性的非结构

多肽, 其肽图谱与一种结构多肽密切相关, 而脉冲追踪试验又证明不是它的裂解产物。因此推测其为同一基因编码^[6, 7, 9]。

一些研究者对腮腺炎病毒蛋白质合成的时序 (Time course) 进行了研究, 所得结果在各种蛋白质合成的速率和出现的先后有差异^[5, 7]。

腮腺炎病毒不但可以引起腮腺炎, 而且可以导致脑膜炎、心肌炎等多种严重疾病^[18]。因此有必要对它的分子生物学, 特别是细胞内的生物合成过程进行深入研究。本实验的目的在于研究病毒粒子中的结构多肽的种类及其分子量; 研究病毒特异性多肽在宿主细胞中的合成。

材料和方法

(一) 主要化学试剂及同位素

丙烯酰胺; N,N'-亚甲基双丙烯酰胺; 水杨酸钠; L-[³⁵S] 蛋氨酸 (0.74mCi/ml 于 20m mol

本文于 1987 年 6 月 15 日收到。

醋酸钾溶液中),来源于中国医学科学院放射医学研究所。

(二) 培养基及血清

Eagle's MEM 干粉及 Eagle's 无蛋氨酸干粉培养基购于中国科学院生物物理研究所;新生小牛血清购于武汉扬子江生化试剂厂。

(三) 病毒

腮腺炎病毒 ME 株为卫生部武汉生物制品所林放涛教授赠。在使用过程中病毒在鸡胚中不断传代,以保证毒株处于活化状态。

(四) 细胞

HeLa 细胞及 Vero 细胞系均来源于湖北省医科学院。此两种细胞用含 8% 小牛血清的 Eagle 基本培养基 37℃ 培养。鸡胚(CE)原代细胞取于 9 日令来亨鸡胚,经 0.25% 胰蛋白酶消化而成。此细胞以含 3% 小牛血清的 Eagle 基本培养基于 37℃ 培养。

(五) 病毒粒子增殖

将效价为 1:160 的腮腺炎病毒 0.2ml 接种到 7—9 日龄的鸡胚尿囊腔中。接种后的鸡胚于 35℃ 孵育 5 天,置 4℃ 过夜,收获尿囊液。血凝效价在 1:320—1:640 之间。

(六) 病毒粒子的纯化

主要参照 Jensik^[1] 方法进行。经两次差异离心和两次蔗糖梯度纯化病毒粒子。

(七) 病毒对细胞的感染

在 37℃ 培养的 HeLa、Vero 和 CE 细胞长成致密单层后,用 Puck's 液(pH7.0)洗涤二次,然后接种病毒(效价 1:320)。50ml 瓶接种量为 0.5ml,20ml 瓶接种量为 0.2ml。接种后的细胞于 35℃ 吸附 1h,然后加入含 2% 小牛血清的 Eagle's MEM 培养基于 35℃ 培养。

为证实病毒在细胞中复制,在感染后期(40—70h, p. i.)用血球吸附试验进行检测^[1,2]。

(八) 感染细胞的标记^[1,2]

在病毒感染细胞后一定时间,弃去培养液,以 Puck's 液洗涤细胞 2 次,加入含 [³⁵S]-蛋氨酸($10\mu\text{Ci}/\text{ml}$)的无蛋氨酸 Eagle's 培养基,35℃ 标记 1h,弃去放射性培养基,立即用 Loading buffer (R)[0.0625mol Trit-HCl (pH6.8), 2% SDS, 5% 萘基乙醇, 10% 甘油, 0.02% 溴酚兰]裂解细胞^[3,4],4℃ 保存以备电泳。

为了降低放射自显影的本底,采用 Saborio^[5] 和 Nuss^[6] 建立的高渗盐浓度培养液和 Peluso^[7] 放线菌素 D 处理细胞。

在进行脉冲追踪(Pulse-Chase)^[8-11]标记时,先用含 $20\mu\text{Ci}/\text{ml}$ [³⁵S]-蛋氨酸的无蛋氨酸 Eagle's 培养液于 35℃ 将感染细胞脉冲标记 15min,然后弃去同位素培养基,以 Puck's 液洗涤二次,再加入普通 Eagle's MEM 培养液追踪一定时间,然后将细胞用 Loading buffer (R) 裂解。

(九) SDS-PAGE

主要参照 Laemmli^[12] 建立的系统进行。电泳前,将制备的 TSV-病毒悬液以 1:8 比例与 Loading buffer (R) 或 Loading buffer (NR, 无巯基乙醇)混合,沸水中处理 3min。

(十) 凝胶染色

参照 Andrew^[13] 方法进行。

(十一) 凝胶的放射自显影

参照 Chamberlain^[14] 和 Luskey^[15] 建立的方法进行曝光及预曝光处理。

(十二) 电泳凝胶扫描

染色后的凝胶,以 UV-24 型紫外可见分光光度计于 560nm 进行扫描。

(十三) 病毒蛋白质分子量的测定

参照 Weber^[16] 及 Dunker^[17] 方法进行。标准蛋白样品产于 Bio-Rad 厂。

实验结果

(一) 病毒粒子纯化

从接种病毒的鸡胚中收获尿囊液,经两次差异离心后,所得沉淀以少量 TSV 缓冲液悬浮,连续进行两次蔗糖密度梯度离心,离心结束后,在接近管底部(约 50% 蔗糖浓度区)有一银灰色窄带。将此带收集后进行血凝试验,效价大于 1:1280。电镜观察可见病毒粒不含杂质,与以前结果^[2,9]相似。

(二) 病毒粒子的 SDS-PAGE

TSV-病毒粒子悬液,分别以 Loading buffer (R) 及 Loading buffer (NR) 处理后,进行 SDS-PAGE 分析。由图 1 所

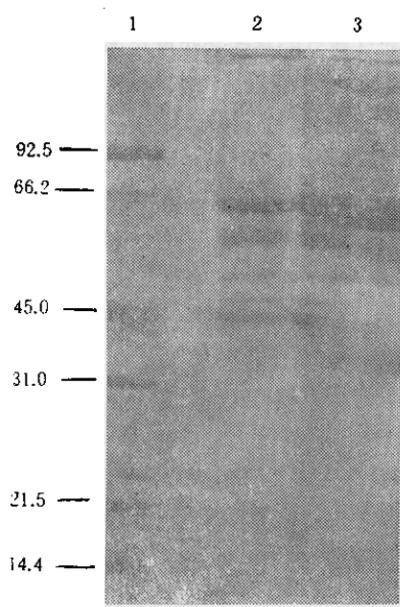


图1 腺炎病毒粒子的 SDS-PAGE 图谱

1.标准蛋白, 数字示分子量 $\times 10^3$ d; 2.病毒粒子, 疏基乙醇处理; 3.病毒粒子, 未经疏基乙醇处理

Fig. 1 SDS-PAGE pattern of mumps virion

Lane 1, Standard protein molecular weight $\times 10^3$; Lane 2, virion, treated with mercaptoethanol; Lane 3, Virion, not treated with mercaptoethanol.

示, 在还原条件下电泳, 腺炎病毒粒子有

11 种结构多肽(分别以 VP1—VP11 表示)。其中前 8 种为主要结构多肽, 分子量在 90Kd 到 31Kd 之间。在非还原条件下电泳, 腺炎病毒粒子有 12 种结构多肽(分别以 NVP1—NVP12 表示)。由电泳图谱还可以看到, 由于还原处理, NVP1、NVP2 和 NVP5 的量减少或消失后, VP1、VP8 出现。而 NVP4 与 VP2, NVP5 与 VP3, NVP6 与 VP4, NVP7 与 VP5, NVP8 与 VP6 以及 NVP9 与 VP7 在还原和非还原条件下却一一保持对应关系。

(三) 病毒粒子多肽分子量测定

以标准蛋白分子量的对数值为纵坐标, 以这些蛋白的相对泳动率(R_f)为横坐标作图, 得一标准曲线。分别计算 VP1—VP11 和 NVP1—NVP12 的 R_f 值, 借助于标准曲线求出各自的分子量(表 1)。腺炎病毒粒子结构多肽的分子量大约在 35kd 到 110kd 之间。

(四) 病毒对细胞的感染及 HeLa, Vero 和 CE 细胞对病毒敏感性的比较

将病毒感染的鸡胚尿囊液(效价 1:

表1 腺炎病毒粒子结构多肽的分子量

Table 1 Molecular weight of mumps virus structural polypeptides

巯基乙醇处理 Treated with mercaptoethanol			未经巯基乙醇处理 Not treated with mercaptoethanol		
多肽 Polypeptide	R_f	$MW \times 10^3$ d	多肽 Polypeptide	R_f	$MW \times 10^3$ d
VP1	0.23	72	NVP1	0.03	110
VP2	0.27	66	NVP2	0.13	90
VP3	0.29	64	NVP3	0.21	76
VP4	0.32	60	NVP4	0.27	66
VP5	0.38	53	NVP5	0.29	64
VP6	0.40	51	NVP6	0.32	60
VP7	0.44	47	NVP7	0.38	53
VP8	0.48	43	NVP8	0.40	51
VP9	0.53	39	NVP9	0.44	47
VP10	0.54	38	NVP10	0.51	41
VP11	0.58	35	NVP11	0.54	38
			NVP12	0.58	35

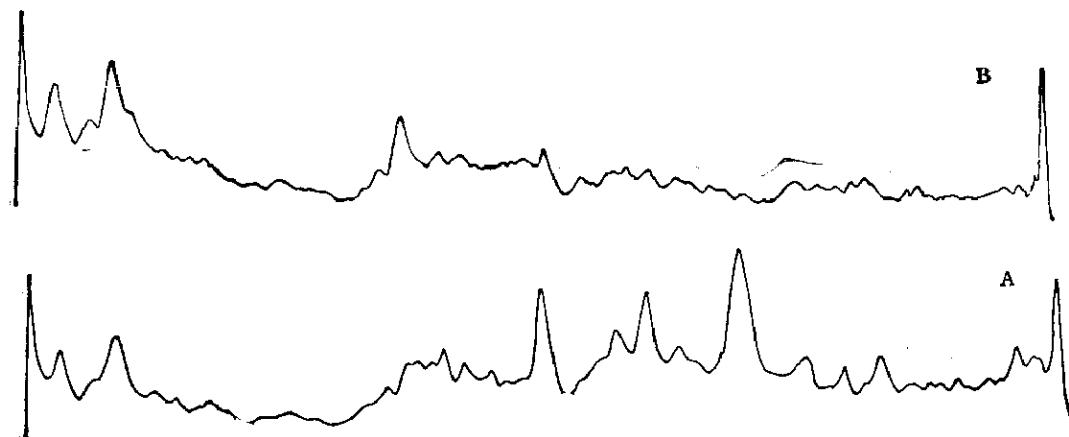


图 2 腮腺炎病毒感染的 CE 细胞 (A) 和正常 CE 细胞 (B) 的 SDS-PAGE 扫描图

Fig. 2 Densimeter scanning of autoradiogram of mumps virus infected
CE cells (A) and normal CE cells (B)

320) 及正常鸡胚尿囊液同时感染致密生长的 Hela, Vero 和 CE 细胞。59h 后进行血球吸附试验。结果只有 CE 细胞感染病毒有完全的血球吸附, Hela 和 Vero 细胞感染病毒只有部份血球吸附, 对照的 CE 细胞及正常鸡胚尿囊液接种的各种细胞都完全不吸附血球。

为了进一步比较 Hela、Vero 和 CE 细胞对腮腺炎病毒的敏感性, 将病毒感染的这些细胞, 60h 后的细胞培养液分别对 Hela、Vero 和 CE 细胞进行感染, 然后进行血球吸附实验。结果只有感染病毒的 CE 细胞的培养液所感染的 CE 细胞有完全的血球吸附。

将病毒感染的 CE 细胞和未感染病毒的 CE 细胞进行 SDS-PAGE, 将电泳图谱扫描(图 2), 证明感染病毒的 CE 细胞产生了特异性的病毒多肽。

以上结果说明, 在本实验条件下 ME 株腮腺炎病毒对 CE 细胞较适应, 而对 Hela 和 Vero 细胞适应较差。因此, 在进行蛋白质生物合成研究时, 选择 CE 细胞作为病毒的宿主。

(五) 病毒感染的 CE 细胞中的病毒

表 2 腮腺炎病毒感染 CE 细胞中病毒特异
多肽的分子量

Table 2 Molecular weight of virus specific
polypeptides in CE cells infected with
mumps virus

多肽 Polypeptide	R _t	MW × 10 ³ d
CVP1	0.17	94
CVP2	0.28	74
CVP3	0.29	72
CVP4	0.38	60
CVP5	0.44	52
CVP6	0.49	47
CVP7	0.60	37
CVP8	0.75	26.5

特异性多肽

在病毒感染的 CE 细胞的后期 (50h, p. i) 以 [³⁵S] 蛋氨酸对感染细胞进行标记 1h, 以 Loading buffer (R) 裂解细胞, 进行 SDS-PAGE 分析, 以检测感染细胞中病毒特异性多肽。结果至少有 8 种多肽, 分别以 CVP1-CVP8 表示。在 CVP6 位置处, 一条细胞多肽与它的泳动率几乎相等。但比较这两条带的浓度, 发现 CVP6 带的放射性强度要大得多。可以肯定, 在 CVP6 带中既有细胞成份也有病毒成份。以标准

蛋白样品与放射标记的细胞样品一起电泳，电泳凝胶干燥曝光后，再将此胶以0.1%的考马斯亮兰染色，以标准蛋白样品图谱作标准曲线，以此求出CVP1—CVP8各条多肽的分子量（见表2）。

（六）病毒多肽在感染细胞中的合成

在病毒感染细胞后的40h时间里，每隔5h对感染细胞进行同位素标记。标记1h后取样进行SDS-PAGE分析。病毒感染细胞后多肽合成的时序为：最早出现的

病毒多肽是CVP7(5h.p.i.)，15h可检测到CVP2、CVP4、CVP5，20h.p.i.可检测到CVP8，以上为早期多肽。而CVP3和CVP6在25h.p.i.以后才出现，为晚期多肽。到25—30h.p.i.病毒多肽已全部合成。在CVP7出现时细胞中还没有病毒合成。

（七）高浓度氯化钠和放线菌素D对感染细胞中蛋白质合成的影响

在细胞培养液中分别加入100mmol NaCl或5 μ g/ml放线菌素D，用来培养标记的病毒感染的CE细胞。在这种条件下细胞标记1h，裂解后进行SDS-PAGE分



图3 高渗盐浓度和放线菌素D对感染细胞中蛋白质合成的影响

1. 感染细胞经5 μ g/ml放线菌素D处理；2. 感染细胞经210mmol NaCl处理；3. 未经处理的感染细胞；4. 正常细胞。

Fig. 3 Effect of hypertonic salt concentration and actinomycin D on protein synthesis in infected cells

Lane 1, infected cells treated with 5 μ g/ml actinomycin D; Lane 2, infected cells treated with 210 mmol NaCl; Lane 3, no treated infected cells; Lane 4, normal cells.

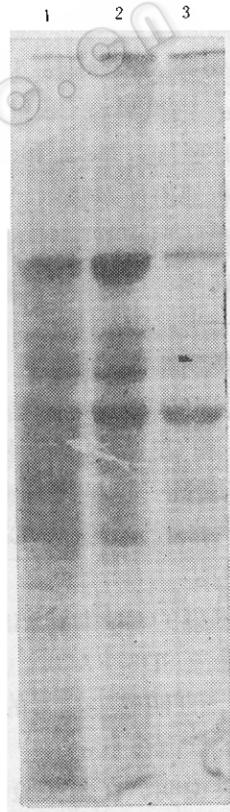


图4 病毒感染的CE细胞的脉冲追踪实验
1.不追踪；2.追踪30min；3.追踪120min

Fig. 4 Pulse-Chase experiment of virion in fected CE cells
Lane 1, no chase; Lane 2, chase for 30 min; Lane 3, chase for 120 min.

析,图谱见图3。经高浓度 NaCl 或放线菌素 D 处理,细胞的本底大大降低了,即细胞蛋白质的合成被抑制。但病毒蛋白质合成受影响很小。与未处理的感染细胞相比,病毒多肽除 CVP6 外,带的强度几乎未减小。

(八) 病毒感染细胞的脉冲追踪 (Pulse-Chase) 试验

在病毒感染 CE 细胞后 40h,以含 [³⁵S] 蛋氨酸 20 μCi/ml 的培养液标记细胞 15min,然后以正常培养液进行追踪 0.5h 和 2h。细胞经 Loading buffer (R) 裂解处理后进行 SDS-PAGE 分析,结果见图 4。感染细胞标记 15min 后,病毒多肽已全部显示出来。追踪 30min 后,多肽图谱不变。但追踪至 2h, CVP3 消失而 CVP6 浓度增强。这说明 CVP3 与 CVP6 有着密切关系。

讨 论

比较在还原和非还原条件下病毒粒子多肽的电泳图谱,发现一个有趣的现象:NVP1、NVP2 和 NVP5 的减少或消失,伴随着 VP1 和 VP8 的出现。即 NVP1、NVP2 和 NVP5 经裂解二硫键的巯基乙醇处理后产生了 VP1 和 VP8。与 Orvell^[3]、Jensik^[2] 和 McCarthy^[4] 等人的结果比较,有很多相似之处,其中对应 VP1 处为糖蛋白 HN,而对应 NVP5 处为糖蛋白 F。从图谱中量(如峰高)和位置关系考虑,NVP1、NVP2 与 VP1, VP5 与 VP8 关系较为对应。Merz^[9] 证明腮腺炎病毒 HN 蛋白可呈二聚体和四聚体,但经还原剂处理后多聚体 HN 变为单体形式。一些作者^[5-9] 发现腮腺炎病毒的 F 蛋白是由二硫键维系的两个亚基组成。因此可以设想: VP1 为 HN 蛋白, NVP1 和/或 NVP2 为 VP1 的二聚体形式,而 NVP5 为 F 蛋白, VP8 为

它裂解后的较大亚基 F1。微量的 VP3 是 NVP5 没有被全部裂解的结果。

从腮腺炎病毒感染的和未感染的 CE 细胞的 SDS-PAGE 图谱中发现正常细胞中有一条带与 CVP6 相对应。经分析认为 CVP6 为病毒特异多肽。理由是 (A) CVP6 的放射强度比其对应的细胞蛋白带大,在病毒感染的后期,病毒已基本上控制了细胞的蛋白质合成机器,故细胞中的 [³⁵S] 蛋氨酸主要被病毒多肽摄取。(B) 细胞经高浓度 NaCl 和放线菌素 D 处理后,其蛋白质合成立即关闭。但病毒仍能利用细胞中现存的蛋白质合成机器进行其蛋白质的合成^[21-23]。所以经高浓度 NaCl 和放线菌素处理的感染细胞在短时间内合成的主要是病毒特异性多肽。由图 3 可以看到,感染细胞经 NaCl 和放线菌素 D 处理后病毒多肽放射性强度几乎没有减小,唯有 CVP6 带强度有明显减弱,这说明 CVP6 带中的细胞成分消失,而显示病毒成分。

一些作者^[5,6,8,9] 的研究表明,腮腺炎病毒在感染细胞中存在着 F0 到 F1 + F2 这一转译后加工过程。本实验也发现类似现象(图 4)。感染细胞经脉冲追踪 120min 后,CVP3 消失伴随着 CVP6 的增加。这说明 CVP3 与 CVP6 的关系很可能为 F0 → F1 + F2 的转译后加工过程。由此推断,CVP3 为 F0 前体蛋白而 CVP6 为 F 蛋白的大亚基 F1。

这一推断与前面讨论的 NVP5(F) 与 VP8(F1) 的关系相互验证(NVP5 在病毒粒子上,已经由 F0 → F, F0 与 F 的分子量相近)。由图谱上看,NVP5 与 VP8、CVP3 与 CVP6 的相对位置相似,每对多肽之间分子量的差异也相近,而且 NVP5 与 CVP3, VP8 与 CVP6 的 R_f 值相等。

图 3 与 Rima 的结果^[6]比较,也可以发现 CVP3 与 F0 的位置相对应。由相对

位置还可以推测, CVP2 可能为 NP 蛋白, CVP7、CVP8 可能分别为 P、M 蛋白。

Naruse^[5] 和 Herrler^[7] 在研究感染细胞中病毒多肽合成的时序时, 得出的结果差异较大。本实验的结果与 Naruse 的近似。即 CVP7(对应于 P45) 出现最早(5h. p. i.), 且合成的速率基本上保持恒定, 其次出现的是 CVP2(对应于 P73, 15h. p. i.)。而且都是在 25h. p. i. 检测到所有的病毒特异多肽。

参 考 文 献

- [1] East, J. L. et al.: *J. Virology*, **46**: 83—88, 1971.
- [2] Lensik, S. C. et al.: *J. Virology*, **17**: 363—373, 1976.
- [3] Orvell, C.: *J. Virology*, **41**: 527—539, 1978.
- [4] McCarthy, M. et al.: *J. Gen. Virology*, **46**: 15—27, 1980.
- [5] Naruse, H. et al.: *Virology*, **112**: 119—130, 1981.
- [6] Rima, B. K. et al.: *J. Gen. Virology*, **46**: 501—505, 1980.
- [7] Herrler, G. et al.: *Virology*, **110**: 430—438, 1982.
- [8] Herrler, G. et al.: *J. Virology*, **47**: 354—362, 1983.
- [9] Merz, D. C. et al.: *J. Gen. Virology*, **64**: 1457—1467, 1983.
- [10] Huppertz, H. I. et al.: *Medical Microbiol. Immunol.*, **163**: 251—259, 1977.
- [11] Orvell, C.: *J. Gen. Virology*, **41**: 517—526, 1987.
- [12] Scheid, A. et al.: *Virology*, **57**: 475—490, 1974.
- [13] Scheid, A. et al.: *Virology*, **69**: 265—277, 1976.
- [14] Scheid, A. et al.: *Virology*, **80**: 54—66, 1977.
- [15] Nagai, Y. et al.: *Virology*, **72**: 494—508, 1976.
- [16] Nagai, Y. et al.; *J. Gen. Virol.*, **45**: 263—274, 1979.
- [17] Madansky, C. H. et al.: *J. Virol.*, **40**: 691—702, 1981.
- [18] Tsurudome, M. et al.: *Archives of Virol.*, **81**: 13—24, 1984.
- [19] Shelov, A. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **97**: 802—809, 1958.
- [20] Laemmli, U. K.: *Nature*, **227**: 680—685, 1970.
- [21] Saborio, L. J. et al.: *J. Mol. Biol.*, **85**: 195—221, 1974.
- [22] Nuss, D. L. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**: 1258—1262, 1975.
- [23] Peluso, R. W. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**: 6120—6124, 1978.
- [24] Andrew, A. T.: *Electrophoresis*, Oxford University Press, P. 25—29, 1981.
- [25] Chamberlain, P. L.: *Analytic Biochemistry*, **98**: 132—135, 1979.
- [26] Laskey, R. A. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **56**: 335—341, 1975.
- [27] Weber, K. et al.: *J. biol. Chem.*, **244**: 4406, 1969.
- [28] Dunker, A. K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**: 5074, 1969.
- [29] 吴柏祚等: *微生物学报*, **25**: 313—316, 1985。

THE POLYPEPTIDES OF MUMPS VIRUS AND THEIR SYNTHESIS IN INFECTED CHICK EMBRYO CELLS

Li Yanchun Wu Bohua

(Department of Virology and Molecular Biology, Wuhan University, Wuhan)

Strain ME of mumps grown in chick amniotic cavity and purified by differential centrifugation combined with sucrose gradient centrifugation. The structural polypeptides of purified virion were analyzed by SDS polyarylamide gel electrophoresis. Eleven polypeptides were found. Their molecular weight were between 35K—72K dalton. In addition polymers of HN protein and F1 the large subunit of F protein were detected. HeLa, Vero and CE cells were infected with ME strain of mumps virus. The CE cell reveals the most sensitive host cell. CE cell infected with mumps virus and labeled with [³⁵S] -

Met, SDS-PAGE and examined by autoradiography. It was found at least eight polypeptides were synthesis in host cells and their molecular weight were between 26.5K to 94K dalton. The time course of the synthesis of polypeptides in the cells were studies. Pulse-Chase experiments demonstrated the posttranslational procession of Fo→F.

Key words

Mumps Virus; Bio-synthesis of polypeptides