

甲型流感病毒“赣科”75-2 (H_3N_2) 结构多肽的组成*

江西医学院
江西省医学科学研究所 放射免疫协作组

1961年 Hoyle 和 Davies 用经乙醚裂解的甲型流感病毒进行分离,发现了三种病毒多肽:血凝素(简称 HA)、核蛋白(简称 NP)、内膜蛋白(简称 MP)^[1]。HA 在还原性条件下裂解成两种多肽——血凝素重链(简称 HA1)和血凝素轻链(简称 HA2)。不久 NO 11 等又先后发现了有活性的神经氨酸酶(简称 NA)^[2-4]。随着十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(简称 SDS—PAGE)技术的发展,近十年来已有许多学者分别用不同毒株分离出了七种结构多肽^[5-12],它们是: HA1、HA2、NA、MP、NP 和 P 蛋白——P₁、P₂。这七种多肽的分子量分别为 25000—94000 道尔顿^[9,10]。1976 年 Mary 等采用梯度板状 SDS—PAGE 方法,从 PR8 等毒株中又分离出了另一种 P 蛋白——P₃^[13]。这样甲型流感病毒的某些毒株含有八种病毒结构多肽。

直至目前,对我国曾流行的流感病毒的结构多肽的分析研究,尚未见报道。为了开展这一工作,我们对 1975 年在我省分离的甲型流感病毒“赣科”75-2 (H_3N_2) 的结构多肽组成进行了分析。

材料和方法

一、病毒株

甲型流感病毒“赣科”75-2(H_3N_2) 毒株,接种于 10 日龄鸡胚尿囊腔。该毒株的 HA 不能被 SDS 引起变性,而 NA 则在 SDS 作用下发生变性。

二、病毒提纯

用鸡红细胞吸附释放方法从鸡胚尿囊液中分离浓缩病毒,再经 Sephadex G-200 凝胶柱层析纯化。

三、病毒的裂解和醋酸纤维膜电泳

病毒样品混悬于 pH 7.2 0.01M 磷酸缓冲生理盐水(简称 PBS)中,每毫升含 1.5—2.5 毫克病毒蛋白,加入 SDS,最终浓度为 2%(重量/体积),室温裂解。醋酸纤维膜电泳方法按文献[14,15]。醋酸纤维膜是浙江省黄岩县曙光化工厂出品。

四、SDS—PAGE^[16]

病毒样品混悬于 pH 7.2 0.01M 磷酸缓冲液中(简称 PB),每毫升含 1 毫克病毒蛋白。分

* 参加本项工作的有江西省医学科学研究所生化研究室和江西省医学院原于医学教研组。

别加入 SDS、尿素和 β -巯基乙醇, 最终浓度分别为 1%、5M 和 2%, 充分混合, 100℃ 加热 2 分钟。用 7.5% 分离胶制成 0.6×15 厘米凝胶柱。电泳液为 0.1% SDS—0.01M 乙二胺四乙酸—pH 7.2 0.05 M PB。电流 10 毫安/管, 电压 80 伏左右, 电泳时间约 6 小时。剥取凝胶用固定液 (甲醇:水:冰醋酸=5:5:1) 浸泡过夜。用 0.25% 考马斯亮蓝 R250 水溶液 (简称 Coom.) 染色 3 小时。7% 醋酸液反复洗脱。

丙烯酰胺是广州化学试剂厂出品, 双丙烯酰胺是比利时 (bruxelles, r. c. b.) 产。

五、凝胶糖蛋白染色

用过碘酸—Schiff 试剂染色 (简称 PAS 染色)^[17]。

六、电泳回收凝胶内多肽

参照莽克强等介绍的方法^[18]。

结果和讨论

一、病毒结构多肽的组成

按上述方法裂解和分离甲型流感病毒“赣

科” 75-2 (H_3N_2), 在凝胶柱上可见八条染色区带 (图 1A)。如改用聚乙二醇从鸡胚尿囊液中分离病毒, 而其它实验过程完全相同, 则仅有七条染色区带。由此分析图 1A 中原凝胶柱最上端的那条染色区带可能是在用鸡红细胞分离病毒时有混杂的微量红细胞膜的缘故。1971 年 Skehel 等曾提到在病毒制备过程中有未被去掉的细胞膜成份, 致使在电泳图中出现外加的区带^[16]。图中其它七条染色区带则是病毒结构多肽。经 PAS 染色证明区带 3、4、6 三条均为糖多肽 (图 1B)。

Kilbourne 等指出, 甲型流感病毒各毒株结构多肽的组成数目、来源和电泳图基本一致^[19]。“赣科” 75-2 (H_3N_2) 毒株的结构多肽电泳图与 Skehel 等所报道的甲型流感病毒 (AO/BEL/42) 株的七种结构多肽电泳图也基本一致^[16]。凝胶

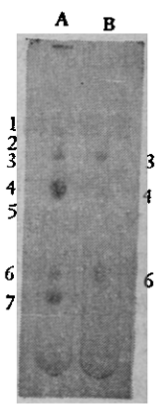


图 1 甲型流感病毒“赣科” 75-2 (H_3N_2) SDS—PAGE 多肽图
A: 用 Coom. 染色
B: 用 PAS 染色

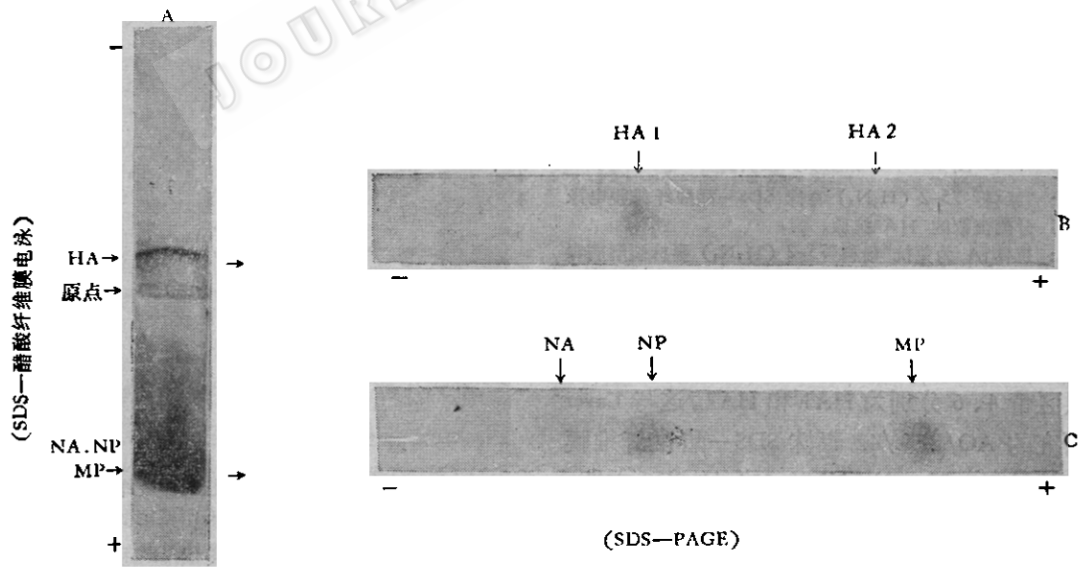


图 2 甲型流感病毒“赣科” 75-2 (H_3N_2) 结构多肽
A: SDS—醋酸纤维素膜电泳多肽图。
B: 阴极端醋酸纤维素膜洗脱液 SDS—PAGE 多肽图。
C: 阳极端醋酸纤维素膜洗脱液 SDS—PAGE 多肽图。

柱上的多肽自上而下依次为 P1、P2、NA、HA1、NP、HA2、MP, 其中 HA1、HA2 和 NA 为糖蛋白。

二、病毒结构多肽的鉴定

用 SDS—醋酸纤维膜电泳分离“赣科”75-2 (H₃N₂) 毒株结构多肽,其阴极端呈现一条清晰的蛋白染色区带,PAS 染色阳性;而阳极端染色甚浓,但区带分离不清(图 2A)。

醋酸纤维膜阴极端区带部位(未染色)的洗脱液血凝阳性;与兔抗“赣科”75-2(H₃N₂) 毒株裂解病毒和病毒颗粒血清作免疫双扩散实验,均出现一条 HA 特有的免疫沉淀线(图 3);用 SDS—PAGE 法在还原条件下分离出二条区带(图 2B),其部位与完整病毒 SDS—PAGE 多肽

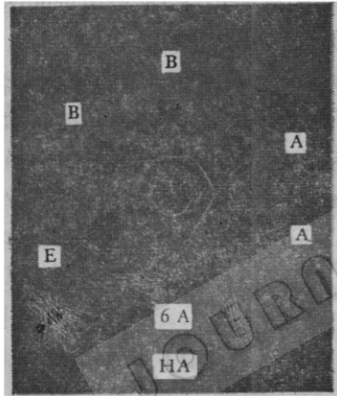


图 3 HA 琼脂双扩散试验

中心孔:“赣科”75-2 (H₃N₂) 毒株 SDS—醋酸纤维膜电泳分离提取的 HA 抗原。
周围孔: 抗体[A 为兔抗“赣科”75-2 (H₃N₂) 毒株裂解病毒血清。B 和 E 为兔抗“赣科”75-2 (H₃N₂) 毒株病毒颗粒血清, 6A 为正常兔血清]

图区带 4、6 相当, 而且 PAS 染色阳性(图 4), 所以区带 4、6 分别为 HA1 和 HA2。这与 Laver 等研究的 AO/BEL/42 毒株 SDS—醋酸纤维膜电泳的结果一致, 该毒株的 HA 抗 SDS 变性, HA 带阳电荷, 向阴极泳动^[15]。这与文献报道结果一致^[20,21]。

醋酸纤维膜阳极端的洗脱液血凝反应阴性。用 SDS—PAGE 法分离出三条区带(图 2c)。Laver 和 Valentine 用醋酸纤维膜分离甲型流感

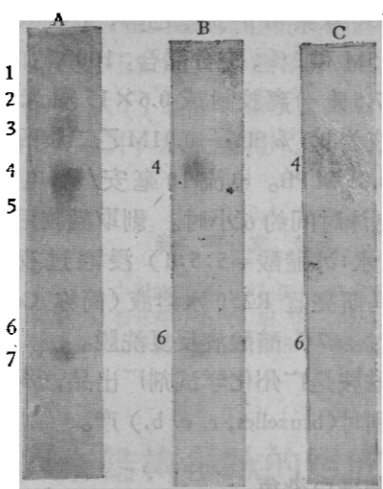


图 4 甲型流感病毒“赣科”75-2 (H₃N₂) HA SDS—PAGE 鉴定

A: 本株完整病毒 SDS—PAGE 多肽图
B、C: 本株 SDS—醋酸纤维膜电泳阴极端醋酸纤维膜洗脱液 SDS—PAGE 多肽图
(A,B: 用 Coom 染色, C: 用 PAS 染色)

病毒结构多肽,业已证明,当所用毒株的 HA 抗 SDS 变性而 NA 被 SDS 所变性时, NA、NP、MP 均向阳极泳动^[15]。本实验中所用毒株的 HA 对 SDS 的反应与 Laver 和 Valentine 所用毒株相同,所以 NA、NP、MP 也必须均向阳极泳动,因此凝胶柱上的三条蛋白染色区带分别为

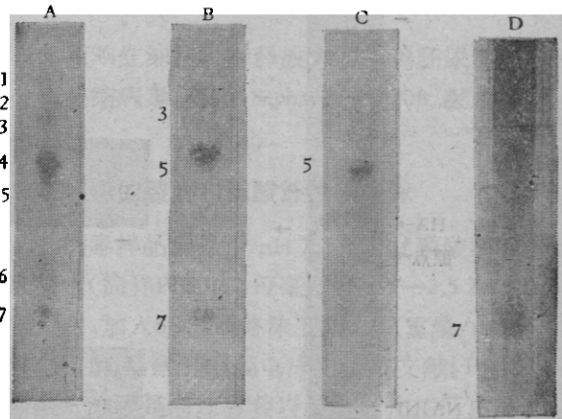


图 5 醋酸纤维膜电泳阳极端醋酸纤维膜洗脱液多肽 SDS—PAGE 鉴定

A: 本株完整病毒 SDS—PAGE 多肽图。
B: 本株完整病毒 SDS—醋酸纤维膜电泳阳极端醋酸纤维膜洗脱液 SDS—PAGE 多肽图。
C: 本株经 SDS—醋酸纤维膜电泳分离和 SDS—PAGE 提纯, 区带 5 回收液 SDS—PAGE 图。
D: 如 C 方法, 区带 7 回收液 SDS—PAGE 图。

NA、NP 和 MP。由于泳动最慢的区带 PAS 染色阳性,其位置相当于完整病毒 SDS—PAGE 多肽图区带 3,其余两条区带则分别相当于区带 5、7,而且 PAS 染色阴性(图 5B)。将后两区带的多肽分别电泳回收,并对回收液再进行 SDS—PAGE 鉴定,结果均仅显现一条区带,其位置仍分别相当于区带 5 和 7(图 5C、D)。因 NA 系糖多肽, NP 与 MP 则为非糖多肽^[16]。MP 分子量比 NP 小,在凝胶中泳动最快。据此可以认定区带 3 为 NA;区带 5 为 NP;而区带 7 为 MP。

我们尚未作多肽分子量测定,但从有关文献提示,区带 1、2 应为 P 蛋白(P₁和 P₂)。因此甲型流感病毒“赣科”75-2(H₃N₂)多肽在上述实验条件下,在凝胶上的位置应如图 6 所示,分别为 P₁、P₂、NA、HA1、HA2、NP、MP。

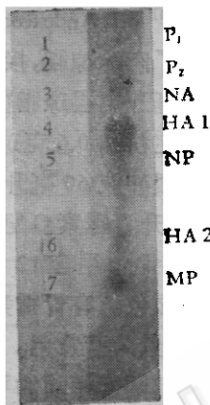


图 6 甲型流感病毒“赣科”75-2(H₃N₂) SDS—PAGE 多肽图 (Coom 染色)

参 考 文 献

- [1] Hoyle, L. & S. P.: *Dovies Virology*, 13: 53, 1961.
- [2] Mayron, L. W. et al.: *Arch. Biochem. Biochys.*, 92: 475, 1961.
- [3] Noll, H. et al.: *Virology*, 18: 154, 1962.
- [4] Reginster, M.: *J. Gen. Microbiol.*, 42: 323, 1966.
- [5] Joss, A. et al.: *J. Virol.*, 4: 816, 1969.
- [6] Pons, M. W. et al.: *Virology*, 38: 68, 1969.
- [7] Taylor, J. M. et al.: *Virology*, 39: 419, 1969.
- [8] Holland, J. J. et al.: *Science*, 167: 202, 1970.
- [9] Compans, R. W. et al.: *Virology*, 42: 880, 1970.
- [10] Schulze, I. T.: *Virology*, 42: 890, 1970.
- [11] Skehel, J. J.: *Virology*, 44: 409, 1971.
- [12] Klenk, H. D. et al.: *Virology*, 47: 579, 1972.
- [13] Mary, B. R. et al.: *Virology*, 76: 122, 1977.
- [14] Laver, W. G.: *J. Mol. Biol.*, 9: 109, 1964.
- [15] Laver, W. G. & R. C. Valentine: *Virology*, 38: 105, 1969.
- [16] Skehel, J. J. & G. C. Schild: *Virology*, 44: 396, 1971.
- [17] Segrest, J. P. et al.: *Methods in Enzymology* (Edit. by Victor Ginsburg), 28(Part B): 56, Academic Press, New York, & London, 1972.
- [18] 莽克强等: 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 51—54 页, 科学出版社, 1975.
- [19] Kilbourne, E. D. et al.: *J. Infect. Dis.*: 125, 447, 1972.
- [20] Webster, R. S. et al.: *Virology*, 48, 433, 1972.
- [21] Downie, J. C. & Laver, W. G.: *Virology*, 51, 259, 1973.