

# 甲型流感病毒内膜蛋白的分离提纯

杨荣鉴 陈章林 江紫生

邓水生 胡起 胡桂珍

(江西省医学科学研究所病毒生化研究室,南昌)

胡镇球 吴根秀

(江西医学院原子医学教研室,南昌)

甲型流感病毒内膜蛋白(MP)是该病毒分子量最小(21000—28000道尔顿);含量最丰富(占病毒蛋白总量33—50%)的一种非糖多肽<sup>[1-3]</sup>,具有型特征<sup>[1]</sup>,每个病毒颗粒大约有3000个分子的MP<sup>[2]</sup>,等电点为pH 4.6<sup>[4]</sup>,用电镜观察病毒颗粒,MP紧贴在病毒外壳脂质脂质的里面,包围着核蛋白<sup>[3]</sup>。此外,另一显著的特点是对热稳定,当加热100℃ 2分钟后仍保持其抗原活性,而病毒的其它多肽则发生了不可逆的变性<sup>[5]</sup>。最近,Zvonarjev还发现MP能影响流感病毒转录酶的活性<sup>[5]</sup>。

1973年Gregoriades<sup>[6]</sup>首先用酸性氯仿-甲醇抽提方法提纯了MP<sup>[4]</sup>,以后Oxford<sup>[7]</sup>等用醋酸纤维薄膜电泳(CAME)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)<sup>[3]</sup>,以及Laver等<sup>[6]</sup>用去氧胆酸铵沉淀加超速离心方法,均分别获得了纯的MP。直至目前,国内尚未有这方面的报道。我们为了建立流感病毒MP的放射免疫方法,研究药物对流感病毒的作用。采取了SDS-PAGE方法分离提纯甲型流感病毒“赣科”75-2(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>)的MP。

## 材料和方 法

### 一、病毒

甲型流感病毒“赣科”75-2(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>)株(以下简称“75-2”)。

用鸡胚尿囊法增殖病毒,经鸡红细胞吸附释放法分离浓缩,并通过Sephadex G-200凝胶柱层析纯化。纯化的病毒混悬于pH 7.2、0.01M磷酸盐生理盐水缓冲液(PBS)中,每毫升约

含1毫克病毒蛋白。加入SDS(最终浓度1%),37℃裂解30分钟。

### 二、抗MP血清的制备

参照Skehel等<sup>[2]</sup>用CAME的方法制备MP抗原,经鉴定达到PAGE纯。

分离的MP去除SDS后,用福氏完全佐剂或不完全佐剂配制成抗原乳剂,每毫升含MP 89.5微克。

取家兔免疫,每只免疫三次,每次抗原乳剂的用量为1毫升(第1、2次免疫用完全佐剂配制,第3次用不完全佐剂),每次间隔2周。第1次免疫,分别注射于4只足的各趾间,第二次于背部皮内多点注射;第3次注射后肢跗窝淋巴结。末次免疫后的第4周,从颈动脉放血,血清内加入叠氮钠(最终浓度1%),2毫升分装,冰冻干燥,低温保存。

### 三、SDS-PAGE 分离提纯 MP

1. MP分离:参照Oxford等<sup>[3]</sup>方法。

分离胶:15%单体母液(丙烯酰胺15克,亚甲基双丙烯酰胺0.4克,加水至100毫升):0.2% SDS—0.02M 乙二胺四乙酸—pH7.2 0.05M 磷酸盐缓冲液:β-二甲基氨基丙腈:10%过硫酸铵 = 15:14.5:0.125:0.375 (体积/体积)

凝胶柱:取0.6×15厘米玻璃管和分离胶制成。

加样:SDS裂解的病毒液(约1毫克病毒蛋白/毫升)1毫升、蔗糖150毫克和0.04%溴酚蓝50微升,充分混合。每支凝胶柱加此混合液约0.1毫升。

电泳:电泳液为0.1% SDS—0.01M 乙二

胺四乙酸—pH7.2 0.05M 磷酸盐缓冲液, 电压 80 伏, 电流 10 毫安/柱左右。当溴酚蓝指示剂前沿到达柱底端时, 停止电泳。电泳时间约 5 小时半左右。

染色: 凝胶柱剥脱后, 取其中一支浸泡于蛋白固定液(甲醇:水:冰乙酸=5:5:1, 体积/体积), 过夜, 然后用 0.25% 考马斯亮蓝 R-250 水溶液浸泡 3 小时, 继之用 7% 乙酸液反复洗脱, 直至凝胶上呈现清晰的蓝色多肽区带。其余凝胶均置冰箱, 待切胶用。

切胶: 首先按下式求出未染色凝胶 MP 的位置。

未染色凝胶 MP 前沿移动距离(厘米)

— 未染色凝胶长度(厘米) × 染色凝胶 MP 区带前沿移动距离(厘米)/染色凝胶长度(厘米)

根据上式求出的未染色凝胶 MP 前沿移动距离的数值得到 MP 位置, 按未染色凝胶位置的区段(适当增宽 1 厘米)切下, 切成约 0.5 厘米宽的凝胶片, 置冰箱, 待回收 MP 用。

2. 电泳回收 MP: 参照莽克强等介绍的电泳回收多肽的方法<sup>[7]</sup>。

分离胶: 20% 单体母液(丙烯酰胺 19.6 克, 亚甲基双丙烯酰胺 0.4 克, 加水至 100 毫升): 0.5M 三羟甲基氨基甲烷—0.04M 乙二胺四乙酸缓冲液: 蒸馏水:  $\beta$ -二甲基氨基丙腈: 10% 过硫酸铵=7.2:2.4:14:0.1:0.3 (体积/体积)。

回收凝胶柱: 将含有 MP 的凝胶片盛于 1.2 × 15 厘米的玻璃管, 达 6 厘米高度, 再用此配制之分离胶填满空隙, 制成高 10 厘米的凝胶柱, 在其底端套一充满 3 毫升电泳液的透析袋, 进行电泳回收。电泳液为 0.025M pH9.0 硼砂缓冲液。电泳 8 小时, 电泳毕, 取下盛有回收 MP 的透析袋。置于 pH7.2 0.01M PBS 中透析二天(4℃), 继而包埋于 Sephadex G-50 内, 浓缩至所需的体积, 按 Lowry 法<sup>[8]</sup>测蛋白质质量。

## 结果和讨论

### 一、对电泳回收的 MP 进行鉴定

1. PAGE 分析和分子量测定: 按 Skehel 等

分析用 SDS—PAGE 方法<sup>[9]</sup>, 将回收液进行电泳, 结果考马斯亮蓝染色呈现一条染色区带, 其位置相当于“75-2”多肽 SDS—PAGE 图谱的 MP 位置, 糖蛋白染色阴性(图版 I-1)提示仅为一种非糖多肽。取已知标准样品牛血清白蛋白(分子量 68,000 道尔顿)、胰蛋白酶(23,300 道尔顿)、核糖核酸酶(13,700 道尔顿)作为标准样, 对 MP 回收液进行分子量测定<sup>[2,9]</sup>, 结果分子量为 25,700 道尔顿。这些实验结果与有关文献相符<sup>[1,2]</sup>。证实此回收液确是含有 MP, 并达到 PAGE 纯。

2. 双向琼脂扩散试验: 参照 Downie 等<sup>[10]</sup>方法对 MP 回收液进行免疫学检定, 结果见图版 I-2。

由图版 I-2 可见, MP 回收液与周围孔 12 (抗 MP 血清)均出现单一的沉淀线, 邻近孔并相互吻合, 而空白凝胶回收液(孔 B)与抗 MP 血清之间则未见沉淀线, 表明此 MP 回收液与抗 MP 血清的沉淀线是抗原与抗体特异性免疫反应的结果, 而不是凝胶回收液内某种成分的非特异性反应。MP 回收液与抗“75-2”病毒颗粒血清(孔 V)和抗“75-2”血凝素血清(孔 H)都没有沉淀线。已知抗病毒颗粒血清含有抗血凝素和抗神经氨酸酶两种抗体, 所以又提示了 MP 回收液中不含有血凝素和神经氨酸酶。

该图还显示了抗 MP 血清(孔 12)的纯度。该血清仅与 X7、FM1 的 SDS 裂解物(孔 X7, 孔 FM1)(均加热 100℃ 2 分钟, 此时唯独 MP 有抗原活性, 而其它多肽皆失活)呈现单一沉淀线, 而与核蛋白(孔 NP)不发生反应, 这说明此血清含有抗 MP 抗体, 而没有核蛋白抗体。

上述结果表明, 本方法分离提纯的 MP, 纯度可达到 PAGE 纯, 并保持了免疫原活性。

### 参考文献

- [1] Choppin, P. W. et al.: *The Influenza Viruses and Influenza* (ed. by Edwin, D. Kilbourne), Academic Press, New York, 1975, pp. 23—24.
- [2] Skehel, J. J. et al.: *Virology*, 44: 396, 1971.
- [3] Oxford, J. S. et al.: *Virology*, 74: 394, 1976.
- [4] Gregoriades, A.: *Virology*, 54: 369, 1973.

- [ 5 ] Zvonarjev, A. Y. et al.: *J. of Virology*, 33(2): 583, 1980.
- [ 6 ] Laver, W. G. et al.: *Virology*, 70: 105, 1976.
- [ 7 ] 莽克强等: 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 科学出版社, 北京, 1975, 第 51—52 页。
- [ 8 ] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265,

- 1951.
- [ 9 ] Kuehler, R. J.: *Biochemical Methods in cell Culture and Virology*, Dowden, Hutchinson, Ross, Inc., USA, 1977, pp. 281—288.
- [10] Downie, J. C.: *Virology*, 51: 259, 1973.