

# 甲型流感病毒内膜蛋白性质的研究

胡镇球 吴根秀 李外苟

(江西医学院核医学教研室)

陈章林 杨荣鉴 邓水生 江紫生 胡起 胡桂珍

(江西省医学科学研究所病毒生化研究室)

近几年来,国外有些学者对流感病毒内膜蛋白(Membrane 或 Matrix protein 简称 MP)的性质进行了研究。他们认为 MP 是甲型和乙型流感病毒的主要内部结构多肽之一,属非糖多肽。其在流感病毒颗粒中的含量最多,约占

33%<sup>[1,2]</sup>;分子量最小,甲型流感病毒 MP 约为 25,000 道尔顿<sup>[1]</sup>,乙型流感病毒 MP 约为 27,000 道尔顿<sup>[2]</sup>,其抗原决定簇对热非常稳定,在 1% SDS 或 1% SDS-0.1%  $\beta$  巯基乙醇中煮沸 2 分钟,其免疫活性仍不受影响<sup>[3,4]</sup>。MP 还具有型

的特异性<sup>[5]</sup>。

我们在前文<sup>[6]</sup>也证明从赣科 75-2 病毒颗粒分离提纯的 MP 具有分子量小 (为 25700 道尔顿) 易于在琼脂中扩散; 有免疫原性, 可以免疫动物产生抗体; 煮沸 2 分钟抗原性不变, 是病毒颗粒中含量最高的一种非糖多肽。本文报道用免疫学及放射性同位素示踪技术对赣科 75-2 株内膜蛋白进行研究, 所获得的一些其他特性尚未见到文献报道。

## 材料和方法

### (一) 材料

甲型流感病毒赣科 75-2 ( $H_3N_2$ ) 混悬液由本室制备; 乳过氧化物酶 (Lpo) 由上海第一医学院生化教研室制备, 批号 80.5, 蛋白含量 5mg/ml, 比度 ( $A_{412}/A_{280}$ ) > 0.80;  $Na^{131}I$  由北京 401 所生产; FM<sub>1</sub> 株流感病毒及 X<sub>7</sub> 株流感病毒由中国医学科学院病毒学研究所馈赠。

### (二) 方法

1. MP 的分离提纯和抗血清的制备: 按文献<sup>[6,7]</sup>方法进行。

2. 免疫双向扩散试验: 将流感病毒颗粒用 1% SDS 37℃ 处理 30 分钟, 使裂解成能在琼脂凝胶中扩散的各种多肽抗原组份。病毒裂解液及分离提纯的 MP 均经 100℃ 2 分钟处理, 抗血清经 56℃ 30 分钟灭活, 在 1% 琼脂板中 (用 0.05M pH7.4 PBS 含 0.1%  $NaN_3$  配制) 加样后置湿盒中 37℃ 自然扩散。观察 24—48 小时的结果。

3. 乳过氧化物酶 (Lpo) 促碘化法标记 MP: 参照 Marchalonis 氏<sup>[8]</sup>及 Thorell 和 Johansson 氏<sup>[9]</sup>法进行, 简述如下: 在 10×75mm 圆底试管中 (内放有塑料管封裹的铁搅拌蕊) 依次加入: MP 10 $\mu$ l (15 $\mu$ g); 0.2M pH7.4 PBS 20 $\mu$ l; Lpo 10 $\mu$ l (500ng);  $Na^{131}I$  90 $\mu$ l (1mCi);  $H_2O_2$  (30% A.R) 5 $\mu$ l (145 ng) 在 22℃ 电磁搅拌反应 5 分钟; 再加一次  $H_2O_2$  5 $\mu$ l, 继续搅拌反应 5 分钟。然后加入含 0.1%  $NaN_3$  的 0.05M PBS 0.25ml 中止反应。反应液过 1×15cm Sephadex G-50 柱分离  $^{131}I$ -MP, 淋洗液为 0.05M

pH7.4 PBS, 流速 0.5ml/min, 按 1ml/每管, 连续收集 30 管, 用  $\gamma$  计数器测量各管的相对放射性。将标记蛋白峰各管混合, 加少许保护蛋白, 4℃ 贮存备用。

### 4. 免疫双向扩散放射自显影

用 0.05M pH7.5 PBS 配制 1% 琼脂。加热溶解后倒板, 待凝结后打梅花孔。中心孔加 65 $\mu$ g MP/45 $\mu$ l 及  $^{131}I$ -MP 约 20,000cpm/5 $\mu$ l, 外围孔加一系列稀释的抗 MP 血清各 50 $\mu$ l, 置湿盒中 37℃ 自然扩散 24 小时, 再用含 0.1%  $NaN_3$  的生理盐水漂洗二天。放 37℃ 温箱中过夜使成干膜。然后在暗室中叠加 X 光胶片曝光过夜。

5. MP 放射火箭电泳自显影: 参照孙宗堂等<sup>[10]</sup>法结合我室经验进行。条件为 1% 琼脂板 (用 0.025M pH8.6 巴比妥缓冲液配制) 中含抗 MP 血清 (最终稀释度 1:100); 在琼脂板一端打一排 5mm 的加样孔。用微滴管分别加入不同浓度的 MP 标准品或样品, 每孔均加 10,000cpm/5 $\mu$ l  $^{131}I$ -MP, 在巴比妥缓冲液中进行电泳; 电压 2—3V/cm, 电泳 2—5 小时; 红外线灯下干燥, 暗室中叠加 X 光片曝光过夜。

## 结果和讨论

### (一) 赣科 75-2 株病毒颗粒的 MP 与其他甲型流感病毒颗粒的 MP 有同质性

免疫双向扩散试验显示了, 经 100℃ 处理 2 分钟的纯化 MP 和相同处理的赣科 75-2 株病毒颗粒裂解液, FM<sub>1</sub> 株病毒 (系一种甲型流感病毒  $H_1N_1$ ) 及 X<sub>7</sub> 株病毒 (系一种重组的甲型流感病毒  $H_3N_2$ ) 颗粒裂解液均可与兔抗赣科 75-2MP 血清产生免疫沉淀线。这种特异的沉淀线彼此互相吻合 (见图 1)。因为在病毒结构多肽中只有 MP 的抗原决定簇对热稳定而其他所有结构多肽的抗原性在 1% SDS 中煮沸 2 分钟都会发生不可逆性的变化, 由此证明分离所得的 MP 与母体病毒颗粒及其他甲型流感病毒颗粒中的耐热性抗原 MP 具有同质性。鉴于国内外学者都公认流感病毒多肽中的 MP 和核蛋白均具有型的特征, 故可认为本试验从一个侧面进一步证明赣科 75-2 株流感病毒是属于甲型。如

果加用乙型流感病毒作参比试验,将有可能建立一种较补体结合法更为简易的鉴定流感病毒型别的方法。

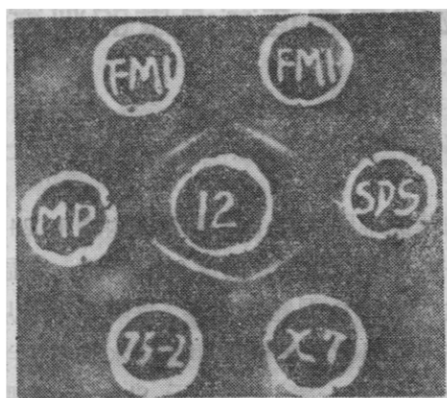


图1 双向免疫扩散试验

中央孔: 12<sup>#</sup> 兔抗 MP 血清  
外围孔: MP 为提纯的膜蛋白; 75-2 为赣科 75-2 流感病毒, FM<sub>1</sub> 及 X<sub>7</sub> 为二株甲型流感病毒(均经 1% SDS 100℃ 处理 2 分钟)。

## (二) MP 分子具有自聚合的特性

在作免疫双向扩散试验时,我们发现经 1% SDS 37℃ 处理 30 分钟的 MP 会产生更加明显的免疫沉淀反应。推测可能是 MP 在没有裂解剂的情况下会自动聚合成大分子,而这种大分子不能在 1% 琼脂胶网眼中扩散,只有裂解后能扩散的单个 MP 分子增多,从而使沉淀线清晰明显。为了证明这一推测,我们设计了如下免疫双向扩散对比试验:一组反应先将 MP 用 1% SDS 37℃ 30 分钟裂解;另一组反应应用同批 MP 但不作任何处理,其余条件完全相同,结果前者免疫沉淀线出现快,10 余小时就产生了明显的靠近抗血清孔的特征性沉淀线,孔中不留任何痕迹;而另一组观察至第五天仍只有模糊沉淀线,孔中残留有不能在琼脂中扩散的白色沉淀物。经向此孔加入 1% SDS 后,24 小时便出现了明显的具有 MP 扩散特征的免疫沉淀线,而且此沉淀线与另一新加抗 MP 血清孔所产生的沉淀线相吻合。孔内原来残留的白色沉淀物消失。这试验初步证明了 MP 具有自聚合的特性。我们用其他方法也证明 MP 具有这种性质<sup>[11]</sup>。

## (三) 用放射性碘标记的 MP 仍有免疫活性,可用放射火箭电泳自显影法定量

采用乳过氧化物酶促碘化标记法获得了具有放射性标记的 MP, 将其作免疫双向扩散放射自显影试验,显示出单一的放射自显影沉淀线,证明标记的 MP 仍具有抗原活性。用放射火箭电泳自显影术,也显示标记的 MP 可以掺入免疫沉淀的“晶格”中,形成特异的火箭形放射自显影沉淀峰(见图 2)。此沉淀峰的高度在

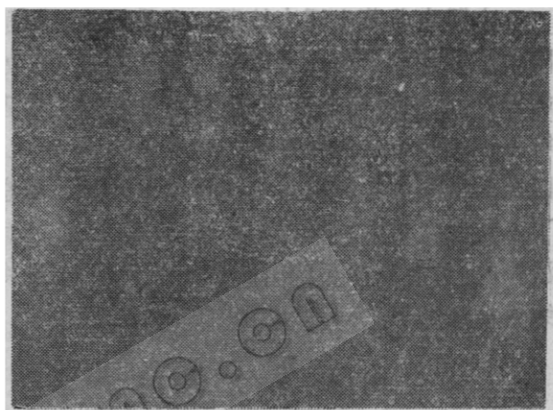


图2 膜蛋白放射火箭电泳自显影  
琼脂孔中自左至右: 正常兔血清 7、5、3、1、0.5、0.1 μg MP, 板中抗 MP 血清 1:500, 每孔加 <sup>125</sup>I-MP 10,000cpm, 曝光 40 小时。

1 μg/孔的浓度以上是随 MP 含量增加而增加。上述试验证明可以用放射火箭电泳自显影方法对 MP 定量检测。以上性质的发现可能对流感病毒的分型、诊断和抗病毒药物的作用机制及药物筛选等研究有所裨益,并可能导致灵敏、快速和简便测试方法的建立。

## 参 考 文 献

- [1] Skehel, J. J. and Schild, G. C.: *Virology*, **44**: 396, 1971.
- [2] Oxford, J. S.: *J. Virol.*, **12**: 827, 1973.
- [3] Oxford, J. S. and Schild, G. C.: *Virology*, **74**: 394, 1976.
- [4] Gregoriades, A.: *Virology*, **54**: 369, 1973.
- [5] Oxford, J. S. and Schild, G. C.: *Negative strand Viruses* (ed. by Mahy, B. W. J. et al.) p. 611, Academic Press, London, 1975.
- [6] 杨荣鉴等: 微生物通报, **8**(5): 220, 1981.
- [7] 江西医学院、江西省医学科学研究所: 微生物学通报, **6**(5): 34, 1979.
- [8] Marchalonis, J. J.: *Biochem. J.*, **113**: 259, 1969.
- [9] Thorell, J. I. and Johansson, B. G.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **251**: 363, 1971.

- 【10】 中国医学科学院肿瘤研究所免疫室: 肿瘤防治研究, 1: 12, 1975.**
- 【11】 杨荣鉴等: 中华微生物学和免疫学杂志, 2(6): 360, 1982.**