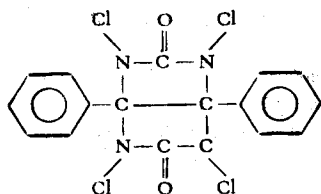


甲型流感病毒的固相碘化标记及放射免疫沉淀

王 莉 徐又农 林 乔 王懋梁

(湖北省医学科学院, 武汉)

IODOGEN 是近年来发展起来的一种固相¹²⁵碘化标记试剂, 其化学名称是 1, 3, 4, 6-四氯-3 α , 6 α -二苯基甘(代)联脲 (1, 3, 4, 6-Tetrachloro-3 α , 6 α -diphenylglycouril), 结构式是



1978 年 Fraker 和 Speck 首先介绍用 IODOGEN 对蛋白质和细胞膜进行¹²⁵碘标记^[1]。IODOGEN 不溶于水, 故可以固相形式参与蛋白质的碘化过程。以后相继报告用 IODOGEN 碘标记大肠杆菌核糖体蛋白质^[2]、家兔网织细胞核糖体蛋白质^[2]、仙台病毒^[3]、人生长激素和促甲状腺素^[4]、人红细胞和组织培养的细胞^[5]、大鼠纤维蛋白原^[6]和人纤维蛋白质等。

本文介绍利用 IODOGEN ¹²⁵碘标记方法标记经去污剂 Sarkosyl NL-97 裂解的甲型流感病毒及用单克隆抗体进行放射免疫沉淀。

材 料 和 方 法

一、IODOGEN 固相的制备 IODOGEN (PIERCE Chemical Co.) 1 毫克, 溶于 1 毫升氯仿中, 取 10 微升加入 12×75 毫米玻璃试管中, 室温下在通风橱内用氮气流将溶剂挥发, 待彻底干燥后即可用于标记。

二、流感病毒的裂解 纯化的甲型流感病毒 X-31 (H3N2) 50 微克, 悬浮于 100 微升 STE (pH 8.0) 中, 加入 25 微升 10% Sarkosyl

NL-97, 37℃ 温育 15 分钟。

三、碘化反应 用 STE (0.15 M 氯化钠、10 mM Tris、1mM EDTA, pH 8.0) 充分洗涤已制备好的 IODOGEN 固相反应管, 以除去管壁上附着不牢固的 IODOGEN。将已裂解的病毒悬液加到管内, 随即加入 ¹²⁵I-碘化钠 0.5 毫居里 (110 毫居里/毫升), 室温下反应 30 分钟, 间或轻轻震荡试管, 以增加病毒和 ¹²⁵I-碘化钠与固相 IODOGEN 的接触机会。吸出管内全部液体, 则反应自行终止。以葡聚糖凝胶 G 50 柱层析除去未标记游离碘。标记病毒的放射比活性可达 3—10 毫居里/毫克蛋白。

四、放射免疫沉淀 在 1.5 毫升塑料离心管内加入抗流感病毒单克隆抗体 (小鼠腹水液, 抗体含量约为 1—5 毫克/毫升) 10 微升, 再加入 ¹²⁵碘标记的流感病毒 50 微升, 37℃ 下温育 1 小时后加入兔抗鼠 IgG 血清 50 微升, 再在室温下温育 1 小时。加入含 0.05% NP40 的 STE (pH 8.0) 1 毫升, 4,000 转/分离心 20 分钟, 倾去上清。

在沉淀物中加入洗涤液 (含 0.05% NP40、0.1% SDS 的 STE 溶液) 1 毫升, 经充分混合后再以 4,000 转/分离心 5 分钟。重复洗涤二次。经洗涤后的沉淀物溶于 100 微升电泳样品液 (2% SDS、50 mM Tris、4 M 尿素、10% 甘油) 中。样品在 56℃ 温育 15 分钟、100℃ 水浴中煮沸 3 至 5 分钟。每孔上样 50 微升, 常规 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完毕后, 用 7.5% 醋酸固定凝胶中蛋白质区带, 复以冷冻保鲜膜或在凝胶干燥器上干燥后, 进行放射自显影。

结果与讨论

IODOGEN 125 碘标记法非常简便、有效。碘化反应可在 0—37℃ 下进行,可用 pH 5.5—6.0 的各种缓冲体系。反应不受去污剂、变性条件或酶抑制剂的影响。样品从反应管取出后反应即终止。样品可直接进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。因此非常适合于病毒的体外标记。IODOGEN 固相管一次可制备多个,并能在室温下长期保存。

在 SDS 或 Sarkosyl NL-97 等变性剂存在下,IODOGEN 仍能有效地标记各种蛋白质和多肽,所获得的放射比活性不亚于、甚至高于氯胺 T 法^[5]。本研究表明,经 Sarkosyl NL97 裂解的流感病毒各多肽仍能有效地保留抗原活性,故可与血清抗体或单克隆抗体进行放射免疫沉淀。本研究应用抗甲型流感病毒 X-31 的神经氨酸酶的单克隆抗体与 IODOGEN 标记的裂解的 X-31 病毒进行放射免疫沉淀,获得良好结果(图 1,见封三)。

IODOGEN 固相标记法为病毒多肽等蛋白质的放射性碘标记提供了一种简便、有效的方法。由于 Sarkosyl NL-97 裂解的病毒多肽经 IODOGEN 固相法碘标记后仍有抗原活性,因此非常适合进行放射免疫沉淀的 SDS-PAGE 放射自显影,以适用于确定各种血清抗体和单克隆抗体的作用特异性。本文以流感病毒为模型,显然也适用于其它病毒及蛋白质的 125 碘标记以及放射免疫沉淀分析。

参考文献

- [1] Fraker, P. J. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80, 849, 1978.
- [2] Tolan, D. R. et al.: *Anal Biochem.*, 103, 101, 1980.
- [3] Markwell, M. A. K. et al.: *J. Virol.*, 33, 152, 1980.
- [4] Salacinski, P. et al.: *J. Endocrinol.*, 81, 131, 1979.
- [5] Markwell, M. A. K. et al.: *Biochemistry*, 17, 4807, 1978.
- [6] Nieuwenhuizen, W. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 97, 49, 1980.
- [7] Knight, L. C. et al.: *J. Labelled Comp. Radiopharm.*, 18, 50, 1981.

[本文于 1986 年 4 月 25 日收到]

(上接第 69 页)

象的每个单个图形。即使这些图形含有某些缺损或噪声,模型仍能回想出一幅完整的图形,并能消除其中的噪声和补足其中的缺损。此外,围绕这次大会还先后举行了三个卫星讨论会,其主题分别为:“哺乳动物和鸟类脑的声音——听觉的整合”、“发育和分子神经生物学”以及“高等动物和人的记忆与学习”。

Bullock 教授殷切希望中国从事有关神经行为学领域的科学家,能有更多的人成为该学会的会员。三年后将举办第二届国际学术会议,那时可能会有更多的中国科学家应邀去出席,以加强国际间的学术交往。

(清华大学生物科学与技术系基浩然)

《甲型流感病毒的固相碘化标记及放射免疫沉淀》的图

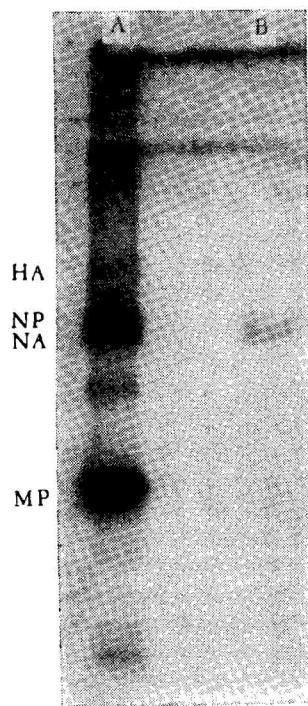


图 1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳放射自显影
A 示¹²⁵I标记的流感病毒多肽, B 示相应抗体的免疫沉淀

《凝胶中³H,¹⁴C和³⁵S同位素测定的快速荧光自显影方法》的图

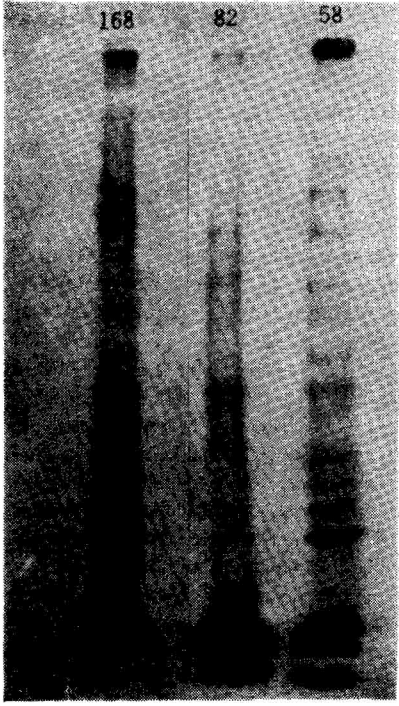


图 4 运用本文标准方法的荧光自显影实例
对数生长期的枯草杆菌,加入³H-丝氨酸(5μCi/ml细胞)标记30分钟,提取蛋白质作 SDS-PAGE. 自显影三天结果. 168 为野生型 82 及 58 为核糖体蛋白基因突变株。

《介绍一种高效,简便的 cDNA 合成方法》的图

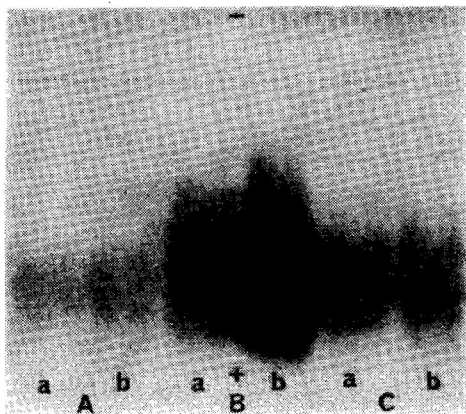


图 3 碱性琼脂糖电泳、放射自显影图谱
示不同浓度 RNaseH 对 cDNA 第二链链长的影响。A、B、C 的 RNaseH 浓度分别为 0.42u, 0.58u 和 0.75u(参看图2)。a 和 b 分别表示在不同 RNaseH 浓度下反应 2 小时和反应 16 小时。

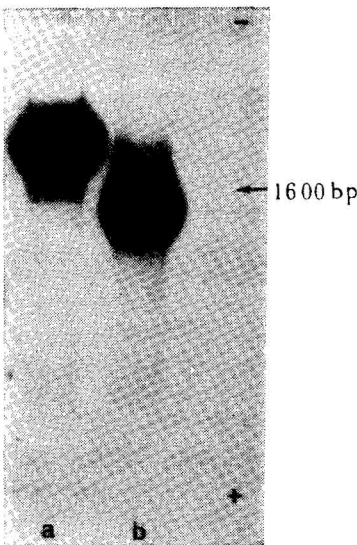


图 4 琼脂糖电泳、放射自显影图谱
示大肠杆菌 DNA 连接酶对 cDNA 链长的影响。
a. 加 *E.coli* DNA 连接酶(反应过夜); b. 未加 DNA 连接酶。