

试用滤膜电泳提纯流行性出血热病毒 114 株

高又新 戴天力 杨占秋

(湖北医学院病毒所, 武汉 430071)

提 要

用自制火棉胶滤膜对流行性出血热病毒 114 株进行快速电泳纯化, 其技术原理, 是以电场力作为趋动力, 推动破碎处理后的病毒感染细胞悬液, 经一组孔径大小不同的火棉胶滤膜分级拦截作用后, 使病毒与其它成分分离从而达到纯化的目的。其制备和操作方法简单、适用、提纯效果好, 并能保持病毒原有的一切生物特性, 为病毒的深入研究工作提供了有利条件。有推广开发价值。

关键词 滤膜电泳, 出血热病毒

流行性出血热病毒 (EHFV) 的纯化, 是对其病毒进行深入研究的基本条件和关键环节, 也是棘手问题之一。随着超离心及亲和层

析技术的运用, 使这个问题已基本解决。但对尚不具备条件的实验室, 或者即使已具备条件的实验室, 也并不排斥使用一种更简便、更经

生成量就会增加。当加入 $5\mu\text{g/ml}$ SOD 时, 可使 H_2O_2 生成平均增加 31.97% (表 2)。利用外源性 SOD, 可以判定抑制 H_2O_2 生成的物质是否影响了歧化过程。若抑制歧化过程减少 H_2O_2 生成, 外源性 SOD 的加入就可降低或取消这种抑制作用。

表 2 外源性 SOD 对 H_2O_2 生成的影响 ($n=5$)

	-SOD	+SOD
生成的 H_2O_2 ($\mu\text{mol/L}$)	3.69 ± 0.52	4.87 ± 0.32
增加率(%)		31.97

6. 几种维甲类化合物对 TPA 刺激大鼠 PMNs 生成 H_2O_2 的影响

由图 6 结果可见, R8605 从 10^{-7} — 10^{-4} mol/L 都不同程度地抑制 TPA 刺激 PMNs 生成 H_2O_2 , 呈明显的浓度依赖性; RII 在一定浓度下 (10^{-4} 和 10^{-5} mol/L) 可抑制 H_2O_2 生成, 但无明显量效关系; 而 R8921 仅在 10^{-4} mol/L 有抑制作用, 在其它浓度下则无效。目前我们已用小鼠二阶段皮肤促癌模型证实了 R8605 的抗促癌作用。

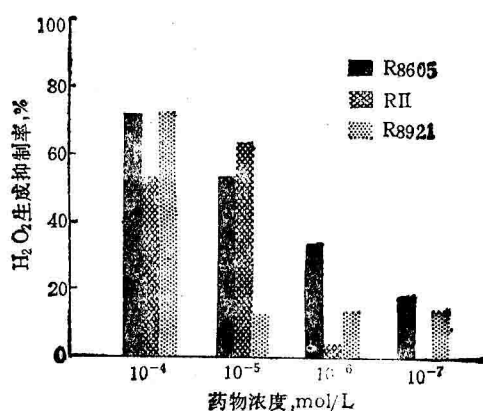


图 6 几种维甲类化合物对 TPA 刺激大鼠 PMNs 生成 H_2O_2 的影响

参 考 文 献

- 1 Goldstein B D et al. *Cancer Letter*, 1981; **11**:257
- 2 Frenkel K et al. *Carcinogenesis*, 1987; **8**:1207
- 3 Frenkel K et al. *Carcinogenesis*, 1987; **8**:455
- 4 Kensler T W et al. *Cancer Res*, 1981; **41**:216
- 5 Taniguchi K et al. *Biochem Pharmacol*, 1984; **33**:3165
- 6 Pick E et al. *J Immunol Methods*, 1980; **38**:161

[本文于 1990 年 6 月 4 日收到, 7 月 30 日修回]

济、更完善的提纯方法。为此,我们研制出一种自制火棉胶滤膜电泳提纯法,应用于 EHFV114 株提纯。其原理是利用电场力作为动力,趋动破碎后病毒感染细胞悬液,经过不同孔径火棉胶滤膜 ($0.45\mu\text{m} \rightarrow 0.20\mu\text{m} \rightarrow 0.08\mu\text{m}$) 分级拦截作用后,使得 EHFV (EHFV 大小为 $100-180\text{nm}$) 与其它成分分离,从而达到纯化的目的。

材料与方 法

一、EHFV114株的增殖及感染细胞的处理

按常规^[1]将 EHFV114 株接种到单层非洲绿猴肾细胞上 (Vero-E6) 持续培养 11—14 天,经单克隆抗体 A25-1 (McAb-A25-1) 荧光检测 (IFA) 90% 以上含阳性颗粒后,去上清,再加少许 Tris-甘氨酸电极缓冲液,反复冻融 3 次,以破碎细胞粗样品存留待用。

二、火棉胶滤膜制作及质控

1. 流程 按 Elford 方法^[2],首先取 Necol 火棉胶配制母液,再按比例分别加入附加剂,目的是分别获得三种孔径的火棉胶滤膜,制膜时火棉胶液应预温,在 22.5°C 条件下操作,湿度控制在 50%,取 20mL 胶液铺在 20cm^2 绝对平放的洁净玻板上,让其静置自然挥发 2h 成膜,透射电镜质检合格后(图 1 见封三),按需要裁成一定大小即成。

2. 制膜 1) 母液配制(100ml):

Necol 火棉胶 40ml

戊醇 10ml

$$\text{无水乙醇} = \frac{40 + 10}{10} \times 1 = 5\text{ml}$$

$$\text{乙醚} = \frac{40 + 10}{10} \times 9 = 45\text{ml}$$

将上述各试剂充分混匀即成(注意应新鲜配

表 1 不同孔径火棉胶滤膜附加剂配方

膜 编 号	附加剂	膜孔直径 (μm)
M_I	0.25%乙酸	0.45
M_{II}	5%甲醇	0.20
M_{III}	20%甲醇	0.08

制)。

2) 制膜使用液配制 (20ml): 以母液作溶剂,附加剂作溶质,分别按表 1 配成相应溶液,定容 20ml,混匀(轻缓操作免生气泡)。

3. 质控 用透射电镜进行质控,1)计算核实孔径;2)检查膜孔大小是否均匀一致。

三、电泳分离提纯

1. 电极缓冲液: 0.025mol/L Tris- 0.019mol/L , 甘氨酸,含 SDS0.1%, pH8:3,

2. 电泳 电泳槽可按图 2 用有机玻璃制作,并按图示装上膜(膜与活动 U 形滑块间涂上适量凡士林密封),通过加压楔块 4 将各活动滑块固定。然后将粗样加入池 C_I , 各池均填满电极液。以 C_{IV} 端接“+”, C_V 端接“-”通电,恒电压 110V 电泳 3—4h。泳毕,再调转电极反向电泳 10min 以松脱附膜病毒。

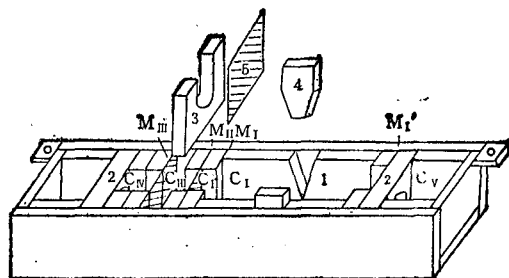


图 2 滤膜电泳提纯槽装置图

1. 活动梯形滑块, 2. 固定拱形块, 3. 活动 U 型滑块, 4. 插楔块。

C: 提纯电泳槽样品池; M: 火棉胶滤膜

四、EHFV114 株纯样鉴定及生物活性检测

测

1. 从 C_{III} 池中取纯样和 C_I 池中取粗样(泳前取好)各 $30\mu\text{l}$ 经 SDS-PAGE 法测电泳带型、分子量^[3],并用 Western-blot 免疫酶法测特异性蛋白^[4]。

2. 另从 C_{III} 池中取纯样,装入透析袋中置 pH7.0, 0.01mol/L PBS 缓冲液中透析,除去盐离子后,重新接种正常 Vero-E6, 11 天后再用 McAb-A25-1 查 IF。

结果与讨论

火棉胶滤膜电泳在提纯 EHFV114 株过程

中,病毒悬液先经膜 M_1 ($\phi_1 = 0.045 \mu\text{m}$), M_{II} ($\phi_2 = 0.20 \mu\text{m}$) 的拦截作用,截留住细胞碎片和细胞器,而病毒、可溶性蛋白、无机离子可通透(M_1 防电渗作用);又经膜 M_{III} ($\phi_3 = 0.08 \mu\text{m}$) 的选择性拦截作用后,滞留病毒,而可溶性蛋白和无机离子仍可通透。这样在 C_{III} 池中就只剩下大量纯的 EHFV 颗粒。

提纯 EHFV 经 SDS-PAGE 测试为三条蛋白区带,其分子量分别为: 20kD, 50kD, 62kD。而提纯前粗样平行对照不下 20 条蛋白区带,与文献报道^[4]一致。再经过 Western-blot 法检测三条区带均为 EHFV 特异性蛋白(见图 3)。

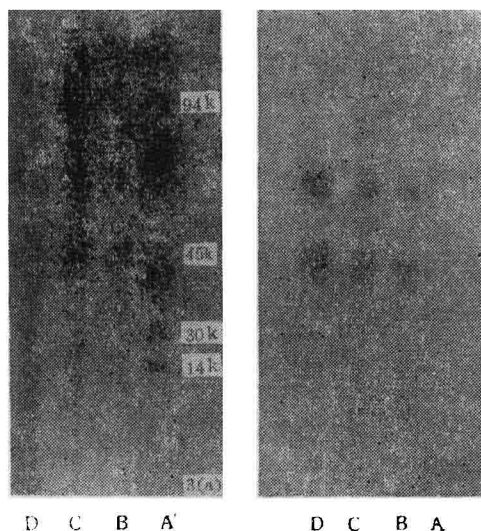


图 3(a) EHFV114 株 SDS-PAGE 电泳图形
3(b) EHFV114 株 Western-blot 转印图形

A: 标准分子量蛋白, B 及 C: EHFV114 株提纯样品,
D: EHFV114 株未提纯样品平行对照

透析除盐的纯病毒在接种正常 Vero-E6 细胞, 11 天后 McAb-A25-1-IF 检查, 仍可出现阳性。

遗憾的是提取的纯样在请兄弟单位协助作电镜负染检查时, 因操作失误, 未得到纯样病毒颗粒的照片, 但从上述 Western-blot 试验和复接种试验等结果, 已间接证明完整病毒一定

存在, 且为纯病毒颗粒。尽管我们仅对 EHFV 114 株的提纯作了初步尝试, 但从理论上讲, 这项技术在其它病毒研究中是可借鉴的; 对某些细菌的分离及蛋白质研究中某些大分子蛋白分离纯化也可供借鉴。

这项新技术应用的关键及应用范围限制在于制膜。火棉胶的纯度及制膜时的外环境非常重要, 我们选用 Necol 火棉胶, 因为它比较纯, 不同批号产品质量比较稳定。外环境选择在较温和的 22.5°C , 相对湿度 50% 时制膜, 因为在这样的条件下滤膜成形比较规范。如果操作熟练后, 即使不用电镜检查复核, 质量上也可保证。

目前国外各类孔径的高质量微孔滤膜很多, 国内则刚开始试生产。使用该法提纯病毒, 不但提纯效果理想, 而且简便、经济、高效, 适合于较大剂量病毒提纯和浓缩(只需增减活动 U 型滑块调整 C_{III} 池容积)。特别值得一提的是应用该法提纯 EHFV 时, 在保存病毒结构完整性方面优于超离心和亲和层析法。经 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测结果证实, 我们的提纯物可显示三条特异蛋白区带。而经超离心法和亲和层析法提纯的 EHFV, 一般只有一条 50kD 核蛋白带。我们推论这大概是 EHFV 在强理化因素作用下, 丢失了包膜上结合较疏松的糖蛋白所致。

参 考 文 献

- 1 高又新, 中国免疫学杂志, 1989; 5 (增刊): 68
- 2 戴华生, 新实验病毒学, 第一版, 江西科技情报所, 上海科技出版社, 1983: 186
- 3 Scnmaljohn C S et al. *J Inf Dis*, 1983; 148: 1005
- 4 Towbin H et al. *Proc natl Acad Sci USA*, 1979; 76: 4350
- 5 Hashimoto K et al. *Studies on characteristics of HFRS virus and Diagnostic Method and Epizootiology of HFRS*, In R Norvegicus Hokkaido, Japan, 1984
- 6 徐志凯. 第四军医大学学报, 1989, 10(4): 221

【本文于 1990 年 6 月 14 日收到, 9 月 21 日修回】

高又新等：“试用滤膜电泳提纯流行性出血热病毒 114 株”一文的附图 1

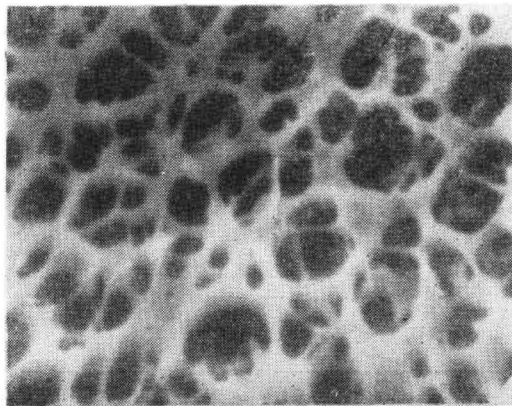


图 1 Necol 火棉胶滤膜电镜结构