

国内几株流感病毒膜蛋白的¹²⁵I 标记肽图分析

林 乔 严家新 王懋梁

(湖北省医学科学院病毒研究所, 武汉)

流感的流行主要与流感病毒表面抗原的变异有关, 但要完全弄清流感病毒的起源和变异规律, 也离不开对其各种非表面抗原的研究, 特别是这两方面的比较研究^[1]。流感病毒的膜蛋白(MP)是其分子量最小、含量最丰富的内部结构蛋白, 具有型特异的抗原性。一般认为MP非常稳定, 不发生抗原变异^[2]。近来发现, 编码MP的核苷酸序列也发生了一定的变化^[3], 因而其氨基酸序列也必然会发生一些改变。这些改变有可能用肽图比较分析揭示出来。但常规的肽图分析方法所需样品量较大(mg量级)^[4], 难于推广应用。1977年Elder等^[5]发表了对聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离的蛋白质直接在凝胶上用放射性碘进行标记, 然后进行肽图分析的方法, 使检测的灵敏度提高到只需 μg 量级的样品, 并使操作步骤大为简化。

对MP样品的制备比较容易, 国内外已有不少报道^[2, 6]。本文主要报道, 参照Elder等^[5]的方法, 完全采用国产的试剂和仪器, 对国内分

离的几株流感病毒MP进行的肽图比较分析。

材 料 和 方 法

(一) 病毒株

甲₁型流感病毒 A/PR/8/34; 甲₂型流感病毒甲/张 57-4; 甲₃型流感病毒: 甲/鄂防 75-8、甲/粤防 77-38、甲/汉防 83-15、甲/猪/鄂科 82-199 (本室从猪咽部分离和鉴定); 乙型流感病毒乙/湘防 71-2。

按常规方法将病毒接种于10日龄鸡胚尿囊腔, 按Skchel等^[7]的方法增殖和纯化病毒。纯化病毒液的蛋白含量约为0.3 mg/ml。

(二) SDS-PAGE 分离提纯MP

采用Laemmli^[8]的不连续缓冲系统进行垂直平板电泳。分离胶浓度10%, 浓缩胶浓度3%, 凝胶厚1 mm。用于病毒结构多肽比较鉴

武汉大学生物系84届毕业生李兴强参加部分工作, 本室罗群明、冯玲玲及本院电镜和超离心室梁培劲、张丽等同志曾予大力支持, 一并致谢。

定的样品处理液最终含 0.0625 M Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 5% β -巯基乙醇, 1% 蔗糖和 0.001% 溴酚蓝。用于制备 MP 的样品液则略去还原剂 β -巯基乙醇^[2], 其余成份相同。

(三) MP 的 ¹²⁵I 标记

参照 Elder 等^[9]的方法, 将经考马斯亮蓝染色的凝胶上含 MP 的小片切下, 漂洗、烘干后, 依次加入下列试剂进行 ¹²⁵I 标记。磷酸缓冲液 (0.5M, pH 7.5) 20 μ l, Na¹²⁵I (45mci/ml, 北京原子能研究所产品) 10 μ l, 氯胺 T (3mg/ml) 15 μ l。在约 25 $^{\circ}$ C 条件下反应 30—45 分钟, 再加入偏重亚硫酸钠 (1mg/ml) 0.5ml 终止反应。15 分钟后, 将凝胶小片移入特制塑料多孔小吊篮中, 再依次放入盛有 10% 甲醇洗液的一排试管中, 至洗液与凝胶 γ 射线强度的比值 < 0.03。标记的凝胶小片于 40—50 $^{\circ}$ C 烘干。

(四) 标记 MP 的酶解

参照 Dimmock 等^[9]和 Whittaker 等^[10]的联合酶解法, 将溶于 0.05 M NH₄HCO₃ 缓冲液 (pH8.0), 浓度分别为 100 μ g/ml 和 50 μ g/ml 的胰蛋白酶(上海生物化学研究所重结晶产品)和糜蛋白酶(上海生物药厂产品)的混合液 0.5 ml 加入盛有标记凝胶的试管中, 37 $^{\circ}$ C 酶解 16 小时, 上清液取出冻干。

(五) MP 酶解肽段的分离

采用国产微晶纤维素薄膜 (20 \times 20 cm, 0.12mm 厚; 浙江黄岩人民化工厂产品), 基本上按张国娣等^[4]介绍的方法。酶解冻干样品溶于 10—20 μ l pH4.4 电泳缓冲液, 每次上样 1—2 μ l (约 1×10^6 cpm)。电泳-层析结束后再次将膜烘干, 用 X 光底片曝光 1—2 天进行放射自显影。

结果和讨论

(一) MP 的分离提纯

图 1 以甲/粤防 77-38 为例表示流感病毒在 SDS-PAGE 系统中的电泳图谱。

将图 1 与其它流感病毒在该系统中的标准电泳图谱^[2,5,7]进行比较, 可以确定各个结构多肽的位置。从图中可见, HA 在还原条件下能断裂成 HA₁ 和 HA₂ 两部分, 产生的 HA₂ 分子

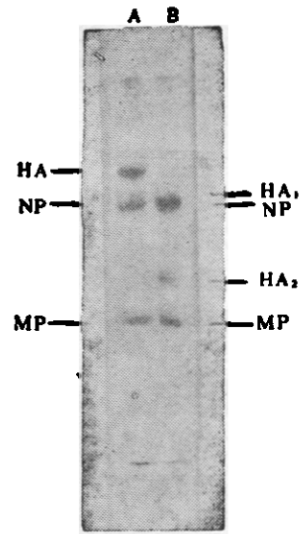


图 1 甲/粤防 77-38 流感病毒在 SDS-PAGE 系统中的电泳图谱

A. 非还原条件下 B. 还原条件下

量与 MP 较接近, 容易污染 MP; 而在非还原条件下, MP 与 HA 及其它多肽间的分子量相差很大, 电泳后形成的区带相距很远。因此, 利用非还原条件下的 SDS-PAGE 可以得到含较纯 MP 的凝胶小片, 供 ¹²⁵I 标记和肽图分析之用。这与 Oxford 等^[2]采用非还原条件下的 SDS-PAGE 系统制备 MP 的结果是一致的。

(二) MP 的 ¹²⁵I 标记和联合酶解的效率

与 Elder 等^[9]的标记条件相比, ¹²⁵I 的剂量稍有增加, 同时相应增加了氧化剂的用量, 结果得到的标记样品的放射性强度也有提高, 一般为 $20-30 \times 10^6$ cpm。

商品胰蛋白酶中常混有少量糜蛋白酶, 不易去除干净。但并不影响胰蛋白酶的酶解。我们参照 Dimmock 等^[9]和 Whittaker 等^[10]的联合酶解法, 采用国内同批生产的胰蛋白酶和糜蛋白酶进行联合酶解。根据 γ 射线强度计算, 凝胶中的 MP 约有 70—75% 能经酶解转入溶液中。用这种酶解样品制作的肽图有很好的重复性。

Whittaker 等^[10]还认为, 进行肽图分析时, 某些较大肽段中个别氨基酸的改变可能不足以影响电泳迁移率而被检出; 某些较大肽段还可

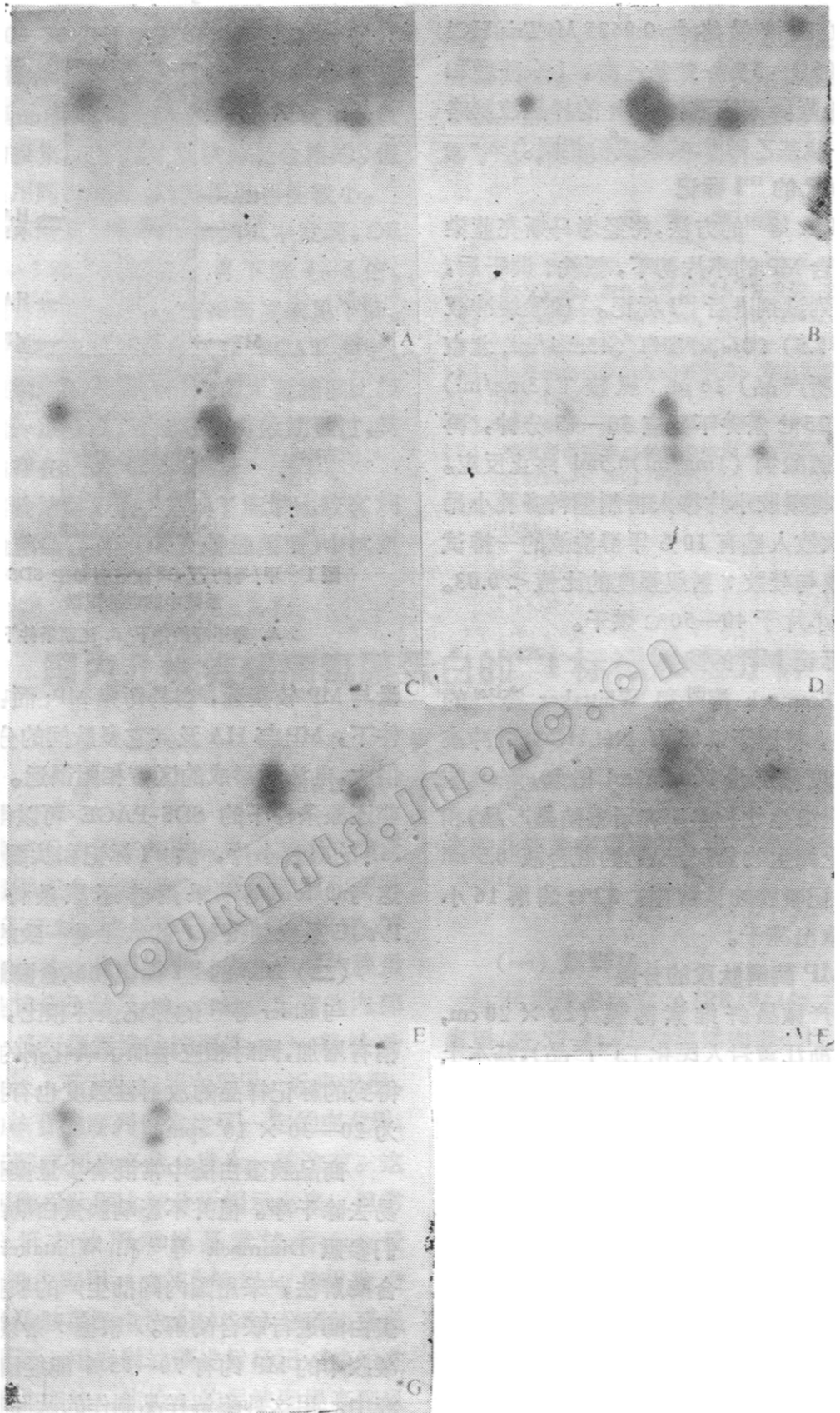


图2 7株流感病毒MP的¹²⁵I标记抗原图

- | | |
|---------------|------------------|
| A. A/PR/8/34 | E. 甲/汉防 83-15 |
| B. 甲/张 57-4 | F. 甲/猪/鄂科 82-199 |
| C. 甲/鄂防 75-8 | G. 乙/湘防 71-2 |
| D. 甲/粤防 77-38 | |

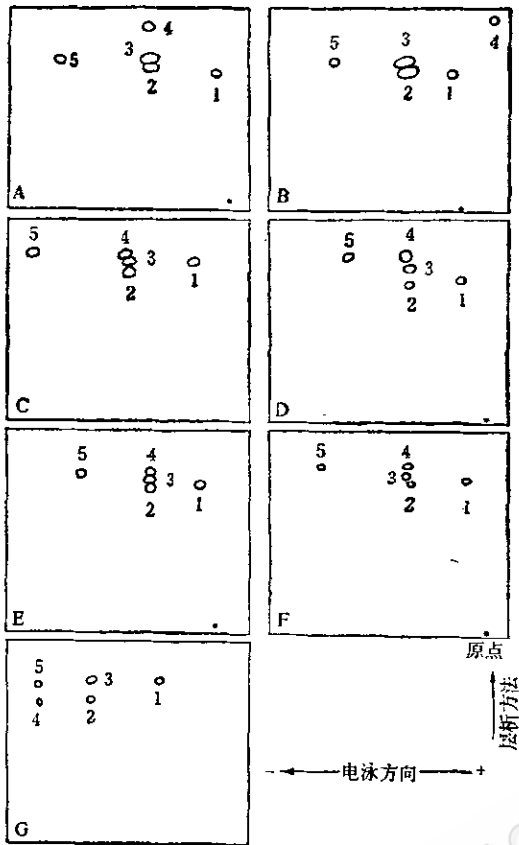


图2 示意图

能形成沉淀。采用联合酶解法则可获得较小肽段。

(三) 不同毒株 MP 的 ^{125}I 标记肽图比较分析

图2为7株流感病毒 MP 的 ^{125}I 标记肽图，每张图中均有5个清晰的斑点。根据图中各斑点在第一相的相对电泳迁移率 (R_m) 和在第二相的层析比移率 (R_f) 的比较可见：

1. 甲₁亚型内(图2-C—F)各毒株的 MP 肽图都很相似。仔细比较，粤防 77-38 (图2-D) 似较特殊，与图2-C-E-F 相比，图2-D 中 2,3,4 号斑点相互间隔较明显，5号斑点的电泳迁移率 (R_m) 也较低；而甲/猪/鄂科 82-199 (图2-F) 则与甲/汉防 83-15 (图2-E) 更相似，仅3号斑点略有区别。

2. 在甲型病毒的不同亚型之间，甲₁与甲₂亚型病毒的 MP 肽图较相似(图2-A-B)，仅4

号斑点的位置明显不同。

3. 甲₁与甲₂亚型病毒的 MP 肽图相比，1、2、5号斑点基本相同，3号斑点略有区别，4号斑点则差别很大。甲₂与甲₁亚型病毒的 MP 肽图相比也是这种情况。

4. 乙型病毒的 MP 肽图虽然也是5个斑点，但与甲型病毒的 MP 肽图区别很大，全部斑点都更偏向电泳负极一侧，斑点的布局也不相同。这与 MP 抗原具有型特异性的血清学鉴定结果^[2]是一致的。

由于 ^{125}I 只能标记在酪氨酸上^[11]，所以不含酪氨酸的肽段用放射自显影的方法无法显示出来。因而图2所示的实际上只是 MP 分子中含酪氨酸肽段的肽图。

目前文献中已对 A/PR/8/34(H₁N₁)^[12]、A/Udorn/72(H₃N₂)^[3] 和 B/Lec/40^[13] 等3株流感病毒的 MP 基因进行了全核苷酸序列分析。根据核苷酸序列推论出的氨基酸序列表明，这三株病毒的每个 MP 分子中均含有5个酪氨酸，经胰蛋白酶和糜蛋白酶的特异性切割后可产生5条含酪氨酸的肽段。A/PR/8/34 与 A/Udorn/72 相比，这5条肽段中有3条的长度和序列完全相同，另有2条长度相同，但组成有变化。而 B/Lec/40 与 A/PR/8/34(或 A/Udorn/72) 的5条相应肽段没有一条完全相同。

根据上述文献中相同或类似毒株 MP 的序列资料进行的推论与本文所得的结果是基本一致的。本实验证明：流感病毒 MP 的 ^{125}I 标记肽图在甲、乙型病毒之间明显不同；在甲型病毒内的各亚型之间有相同也有不同；在甲₁亚型内不同分离株之间十分相似，但也可以发现某些微小的却又是可重复的区别，说明 MP 的氨基酸组成和序列在亚型内也确实发生了一定的改变，这些改变的生物学意义和流行病学意义还有待进一步研究。

从图2-A—G 的比较还可以看出，不同型和亚型流感病毒 MP 的 ^{125}I 标记肽图分别具有相对稳定的不同特征，在标准化的实验条件下，可以作为型和亚型间的鉴定指标之一。

甲型流感病毒不同亚型间的基因很容易发

生遗传重组^[1]。Brand^[14]对若干株甲₂和甲₃型病毒及其重组株的MP进行¹²⁵I标记肽图分析,发现了能作为遗传标志的特殊肽点。根据这些特殊肽点可以确定重组株MP的来源。Dimmock等^[9]用含³⁵S的蛋氨酸对流感病毒进行标记和肽图分析,结果发现不同毒株的MP肽图有可重复的差别,并且还发现了能作为遗传标志的特殊肽点。

在本实验中,本室分离的甲/猪/鄂科82-199与甲/汉防83-15的MP肽图很相似,而与甲₁、甲₂及乙型病毒的MP肽图有明显区别,说明该毒株的内部结构蛋白MP是属于甲₃亚型。血清学鉴定表明,该毒株的表面抗原属于H₃N₂亚型^[15]。由此证明该毒株的MP基因未与其它亚型病毒发生遗传重组。

总之,用¹²⁵I、³⁵S等同位素标记的方法进行蛋白质的肽图分析,虽然所检出的肽段数目比茚三酮等常规显色法少些,但这类方法仍具有样品用量极少,操作步骤简便,所得结果十分清

晰明确,重复性很好等优点。因而具有一定的实用参考价值。

参 考 文 献

- [1] Palese, P. and J. F. Young: *Science*, **215**: 1468, 1982.
- [2] Oxford, J. S. et al.: *Virology*, **74**: 394, 1976.
- [3] Lamb, R. A. and C. J. Lai: *Virology*, **112**: 746, 1981.
- [4] 张国娣等: 生物化学与生物物理进展, **6**: 64, 1983.
- [5] Eder, J. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252**: 6510, 1977.
- [6] 杨荣鉴等: 微生物学通报, **8**: 220, 1981.
- [7] Skehel, J. J. and G. C. Schild: *Virology*, **44**: 396, 1971.
- [8] Laemmli, U. K.: *Nature*, **227**: 680, 1970.
- [9] Dimmock, N. J. et al.: *Virology*, **103**: 350, 1980.
- [10] Whittaker, R. G. and B. A. Moss: *Anal. Biochem.*, **110**: 56, 1981.
- [11] Krohn, K. A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **490**: 497, 1977.
- [12] Winter, G. and S. Fields: *Nucleic. Acids. Res.*, **8**: 1965, 1980.
- [13] Briedis, D. J. et al.: *Virology*, **116**: 581, 1982.
- [14] Brand, C. M.: *J. Gen. Virol.*, **36**: 385, 1977.
- [15] 田慕贞等: 人畜共患疾病杂志(待发表)。