

# 基孔肯雅病毒浓缩提纯及多肽抗原研究

韩云程 黄祥瑞 杨佩英

王玉萍\* 郭湘林<sup>△</sup> 黄志尚

(军事医学科学院微生物流行病所病毒室,北京)

**摘要** 采用聚乙二醇(PEG 6000)沉淀法(粗提)和蔗糖密度梯度速率区带离心(精提)浓缩纯化基孔肯雅病毒获得满意效果。以 SDS-PAGE 和免疫印迹法分析基孔肯雅病毒结构蛋白的组成及抗原性。结果证实:基孔肯雅病毒含有三种结构蛋白(E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>和C),另一种病毒特异性蛋白E<sub>3</sub>与完整毒粒无结构上的联系;病毒粗提样品与精提样品的免疫印迹结果基本一致,尽管在 SDS-PAGE 图谱上二者相差甚大,因而就某些研究或应用目的而言,病毒的纯化程序可简化。文中初步探讨了以基孔肯雅病毒包膜糖蛋白为特异性抗原用于流行病学调查和临床免疫诊断的可能性。

**关键词** 基孔肯雅病毒;病毒浓缩提纯;多肽抗原分析;免疫印迹

近来已有报告<sup>[1]</sup>指出, A 属披膜病毒在我国可能有广泛分布,并在人群中引起疾病流行。基孔肯雅(Chikungunya, CHIK)病毒是披膜病毒科 A 病毒属的一个成员,引起的基孔肯雅热与登革热相似。本文在建立病毒浓缩提纯方法的基础上,应用 SDS-PAGE 和免疫印迹技

术初步分析了 CHIK 病毒结构蛋白的构成及其抗原性,并试图寻找有诊断价值的单个蛋白组分,以利于本病毒及 A 病毒属的流行病学调查和临床病人的免疫诊断。

\* 大连卫生检疫所

<sup>△</sup> 陕西省榆林地区畜牧兽医研究所

## 材 料 和 方 法

### (一) 病毒株

CHIK 病毒 (Ross 株) 由本室毒种组提供, 其第八代乳鼠脑 10% 悬液的滴度为  $2.0-2.5 \times 10^8$  PFU/ml。

### (二) 细胞及病毒的增殖

原代鸡胚纤维母细胞, 以含 5% 灭活小牛血清的水解乳蛋白作为生长液,  $37^\circ\text{C}$  培养 24 小时, 或致密单层后, 接种  $10^{-4}$  稀释的鼠脑病毒悬液, 加维持液 (Eagle's 液 + 0.1% BSA) 于  $37^\circ\text{C}$  培养 16 小时, 收取病毒组织培养液 (TCF)。

### (三) 病毒感染性滴定和蛋白含量测定

采用空斑法。在生长于 30ml 扁瓶内的单层鸡胚细胞上接种 0.25ml 不同稀释度病毒液,  $37^\circ\text{C}$  吸附 1 小时, 将琼脂复盖液 (2% 琼脂液加等量含 6% 小牛血清的 Eagle's 液, pH7.6) 5ml 加于扁瓶中, 放  $37^\circ\text{C}$  培养 24 小时后观察记录结果, 在观察前 4 小时加 0.2ml 中性红溶液 (1:500)。蛋白含量测定是在经去氧胆酸钠、高氯酸处理后以 Folin-酚法进行<sup>[2]</sup>。

### (四) 病毒的浓缩提纯<sup>[3]</sup>

病毒组织培养液, 经 6000r/min 离心 20 分钟 ( $4^\circ\text{C}$ ), 取上清缓慢加入 PEG 6000 浓溶液, 使其终浓度为 7.5%, 调 pH 至 7.5,  $4^\circ\text{C}$  过夜。经 9000r/min 离心 30 分钟, 弃上清, 以 STE (0.01mol EDTA, 0.13mol NaCl, 0.05mol Tris, pH7.8) 缓冲液悬浮沉淀, 充分混匀, 即为粗提样品 (P)。将 P 铺加于蔗糖密度梯度 (15—30%, W/W), 25000r/min 离心 120 分钟, 分部收集, 收取病毒峰即为精提样品 (SB)。

### (五) 免疫血清和酶标抗体制备

以 CHIK 病毒乳鼠脑悬液免疫新西兰家兔, 经耳缘静脉免疫三针, 间隔 7 天, 末针后 7 天放血, 分离血清。以同样方法制备正常乳鼠脑组织免疫血清。采用改良的过碘酸钠法制备辣根过氧化物酶 (HRP, Sigma 产品) 标记的羊抗兔 IgG。

### (六) SDS-PAGE 及免疫印迹<sup>[4]</sup>

SDS-PAGE 的分离胶为 4—20% 梯度胶, 浓缩胶为 4%。样品缓冲液为 0.05mol Tris-HCl (pH8.0), 含终浓度 2% SDS, 2% 2-巯基乙醇, 8% 甘油和 0.005% 溴酚蓝。样品于  $65^\circ\text{C}$  加热 15 分钟。凝胶染色采用银染法。转移电泳缓冲液为 0.025mol Tris, 0.192mol 甘氨酸和 20% 甲醇 (V/V), 冰浴下 (或流动水冷却) 电泳 5—7 小时 (7.5V/cm), 硝酸纤维素膜 (NC, 北京化工学校产品,  $0.45\mu$ ) 浸入阻断缓冲液 (0.01mol PBS, pH7.2, 含 2% BSA, 0.03% Tween 20 和 0.2% Triton X-100),  $37^\circ\text{C}$  1 小时, 经洗液 (0.01mol PBS, pH7.2, 含 0.03% Tween 20) 洗 3 次, 每次 10 分钟; 加病毒免疫血清 (以洗液 1:200 稀释)  $4^\circ\text{C}$  过夜, 洗涤同上; 加酶标抗体 (以洗液 1:400 稀释),  $37^\circ\text{C}$  1 小时, 洗涤同上; 浸入底物溶液 (0.05% 二氨基联苯胺, 以 0.01mol PBS 配制, 含 0.03%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 待显色满意后, 用蒸馏水冲洗。

## 结 果

### (一) CHIK 病毒浓缩提纯效果

我们用 PEG 沉淀和蔗糖密度梯度速率区带离心浓缩纯化了三批 CHIK 病毒组织培养液 (TCF)。以感染性滴度 (PFU) 表示病毒含量, 比活性 (PFU/mg 蛋白) 反映病毒制剂的相对纯度。三次试验结果综合于表 1。由表 1 可以看出, PEG 沉淀法不仅是一种简便有效的浓缩病毒液方法 (体积浓缩 120 倍, PFU 回收 44%), 同时也有部分纯化作用 (比 TCF 样品约纯化 32 倍)。蔗糖密度梯度离心可以把 P 样品中绝大部分杂蛋白与病毒颗粒有效区别开来, 因此得到高纯度病毒制剂 SB (比 TCF 样品约纯化 159 倍), 其负染色电镜照片可见形态清晰、典型, 直径为 50—70nm 的有膜球状病毒颗粒。

### (二) CHIK 病毒结构蛋白 SDS-PAGE 分析 (图版 1-1)

从图版 1-1 结果看出, CHIK 病毒 SB 样品显示三条带, 而正常细胞培养物 SB 样品在相应位置上未显带, 证明这三条带是病毒特异

表1 CHIK 病毒浓缩提纯效果

样品	体积 (ml)	滴度 (PFU×10 <sup>4</sup> /ml)	回收率 (%)	蛋白含量 (mg/ml)	比活性 (PFU×10 <sup>4</sup> /mg 蛋白)	纯化倍数 (纯化后比活性/纯化前比活性)
TCF	241	3.1		1.24	1.24	
P	2	164	44	2.47	68	32
SB	4.5	67	40	0.16	398	159

性蛋白。分子量测定结果表明它们分别为 CHIK 病毒包膜糖蛋白 E<sub>1</sub>(58000)、E<sub>2</sub>(50000) 和核衣壳蛋白 C(36000)，此结果与文献[7]报道值基本一致。CHIK 病毒 P 样品除含有病毒特异的三条蛋白带外，尚显示宿主细胞和培养液中的多条杂蛋白带，这恰恰反映了它与 SB 样品在纯度上的差距。

### (三) CHIK 病毒结构蛋白免疫印迹分析 (图版 1-2)

由图版 1-2 所示结果可得出如下初步结论：(1) CHIK 病毒三种结构蛋白均能在硝酸纤维素膜上显示，但由于 E<sub>1</sub> 和 E<sub>2</sub> 分子量相差很小，结构上联系密切，有时不易辨别清楚。(2) 对照组与 E<sub>1</sub> 和 E<sub>2</sub> 不出现反应。(3) CHIK 病毒 P 样品的免疫印迹结果与 SB 样品所见基本一致，但多出一条分子量为 13000 的蛋白带，可能为文献[5]报道的 CHIK 病毒非结构蛋白 E<sub>3</sub>。(4) 由于 SB 样品未显示 E<sub>3</sub>，推测 E<sub>3</sub> 与完整毒粒无结构上的联系，其功能不清。

## 讨 论

进行病毒结构蛋白的分离和抗原性分析历来被认为是一项比较困难的工作。由于涉及到复杂的浓缩提纯，对设备和技术条件的要求较高，一般实验室难于开展。近年来发展起来的免疫印迹技术以其高度的分辨力和特异性为我们提供了一种简便、有效的分析方法。在我们的实验中，尽管粗提制剂与精提制剂相比纯度相差很大，但免疫印迹结果基本一致：均能检出病毒特异性结构蛋白。这个发现指出，在免疫印迹试验中样品的制备过程可以精简，从而使免疫印迹分析在一般实验室开展成为可能。

有些作者报道<sup>[6]</sup>，用免疫印迹法往往不能

检出病毒的全部多肽，其主要原因可能是样品经 SDS 处理，蛋白质的抗原性发生改变。但有的作者<sup>[7]</sup>认为，样品中的 SDS 在电泳转移过程中可以去除，使变性的蛋白抗原复性。我们在病毒免疫印迹实验中，起初在室温下操作。在 7.5V/cm、4—5 小时转移电泳条件下，缓冲液温度达 60—80℃，结果虽然结构蛋白 C 显色清楚，但 E<sub>1</sub> 和 E<sub>2</sub> 浅淡，难于辨认。后来改用冰浴下(或流动水冷却)操作，在相同转移电泳条件下，病毒的三个结构蛋白均能清晰地显现。由此可见，免疫印迹试验虽然比较简单，但实验操作必须严格。造成多肽检出失败的原因是多方面的，除化学性变性作用外，也可能有热变性效应，在操作中应注意防止缓冲液温度过高。

免疫印迹分析用途广泛，在某些传染病(如艾滋病，某些寄生虫病)中已有许多成功的实践，因为在单个蛋白水平上的免疫反应可使诊断结果更为精确。本试验的初步结果表明，CHIK 病毒包膜糖蛋白与阳性血清反应显带清晰，而与对照血清不发生反应，说明其抗原特异性较强，可考虑将其作为特异性诊断蛋白，用于 CHIK 病毒的流行病学调查和临床病人的免疫诊断。

## 参 考 文 献

- [1] 徐普庭等：病毒学报，3(3)：237—241, 1987。
- [2] 丁建华等：微生物学通报，9(6)：269—270, 1982。
- [3] 黄志尚等：中华微生物学和免疫学杂志，1(2)：101—104, 1981。
- [4] Tsang, V. C. W. et al.: *Methods in Enzymology*. Vol. 92, Academic Press, New York, p377—391, 1983.
- [5] Simizu, B. et al.: *J. Virol.*, 51(1):254—258, 1984.
- [6] Mandrell, R. E. et al.: *J. Immunol. Methods*, 67:1—11, 1984.
- [7] Tsang, V. C. W. et al.: *Enzyme-mediated immunoassay*, Plenum, New York, p389—414, 1985.