

## 2种纯化流感病毒方法的比较研究

曹 康<sup>1</sup>, 张卫东<sup>2</sup>, 施桥发<sup>1</sup>, 李 虹<sup>1</sup>, 蒋中华<sup>1</sup>, 李明远<sup>1</sup>

(1. 四川大学华西医学中心基础与法医学院微生物学教研室, 四川 成都 610041;

2. 河北医科大学基础医学院病原生物学教研室, 河北 石家庄 050017)

**【摘要】** 目的 比较2种纯化浓缩鸡胚尿囊液中流感病毒方法。方法 将流感病毒鸡胚尿囊液分别采用蔗糖密度梯度离心法(sucrose-density-gradient-centrifugation, SDGC)和红细胞吸附释放法(absorption and release-RBC, AR-RBC)进行纯化, 收集纯化病毒测定血凝效价, 比较2种纯化方法。结果 SDGC法纯化病毒可在30%和45%蔗糖层面交界处的区带中检测到流感病毒, 血凝效价为1:2 560; 用AR-RBC法纯化病毒过程中用新鲜鸡红细胞出现了溶血现象, 而用甲醛处理过的鸡红细胞则无此现象, 血凝效价均为1:2 560。结论 与SDGC法纯化病毒比较, AR-RBC法是一种经济实用、操作简便并有较高纯化效率的方法, 尤以甲醛处理过的鸡红细胞纯化效果最好。

**【主题词】** 流感病毒 A 型; 人; 离心法; 梯密度; 红细胞吸附释放法; 鸡胚

**【中图分类号】** R373.13 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-3205(2005)03-0179-03

### COMPARISON OF TWO METHODS FOR PURIFICATION OF INFLUENZA A VIRUS

CAO Kang<sup>1</sup>, ZHANG Wei-dong<sup>2</sup>, SHI Qiao-fa<sup>1</sup>, LI Hong<sup>1</sup>, JIANG Zhong-hua<sup>1</sup>, LI Ming-yuan<sup>1</sup>

(1. Department of Microbiology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine,

Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Pathobiology, the School of Basic Medical Sciences, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**ABSTRACT: Objective** To compare two methods for purification of influenza A virus in allantoic fluid of embryonic egg. **Methods** Influenza virus in allantoic fluid of embryonic egg was purified using two methods which are sucrose-density-gradient-centrifugation(SDGC) method and absorption and release-RBC (AR-RBC) method. The hemagglutination titers of two purified viruses were tested to compare two purification methods. **Results** Using SDGC method, influenza virus was detected in the strand of 30%—45% and the hemagglutination titer was 1:2 560. Using AR-RBC method, the haemolytic phenomenon occurred in fresh cock's red blood cells but did not happen in red blood cells treated by formaldehyde. The hemagglutination titers about 1:2 560 were observed in both methods. **Conclusion** Compared with SDGC, AR-RBC, especially using red blood cells treated by formaldehyde, is an efficient, economical and available method.

**MeSH:** influenza A virus, human; centrifugation, density gradient; absorption and release-RBC; chick embryo

流感病毒是一种常见的呼吸道传播病毒, 鸡胚培养和细胞培养是其实验室常用的培养方法。鸡胚培养具有病毒产量高, 操作简便, 经济实用等优点,

因此鸡胚培养是实验室培养流感病毒最常用的方法。然而从鸡胚中收集的病毒液存在纯度较低的问题, 且常有鸡胚蛋白混杂, 严重限制了其应用并对实验结果产生不利影响, 所以鸡胚病毒液的浓缩纯化是制备流感疫苗及开展流感病毒的生物学特性、免疫学特性及分子生物学等研究的前提和基础。目前纯化病毒的方法主要有沉淀法、离心法和透析法等, 其中超速离心法是应用最广泛的一种方法。超速离

[收稿日期] 2004-02-16; [修回日期] 2004-11-06

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39970830)

[作者简介] 曹康(1976—), 男, 湖北石首人, 四川大学华西医学中心硕士研究生, 从事分子病毒学研究。

心法可分为等密度梯度离心法和平衡密度梯度离心法,较常使用的梯度材料有蔗糖、甘油、氯化铯和重水等<sup>[1]</sup>。氯化铯主要用于平衡密度梯度离心法,其价格昂贵、成本较高;蔗糖则用于等密度梯度离心法,因其溶于水,对核酸和蛋白质无不良影响,应用较为普遍。流感病毒包膜上镶嵌着3种膜蛋白,分别为血凝素(hemagglutinin, HA)、神经氨酸酶(neuraminidase, NA)和基质蛋白M2。HA以三聚体的形式存在于双层类脂膜上,可与特异性含唾液酸的受体结合,凝集多种动物的红细胞<sup>[2]</sup>。根据流感病毒的这一特性可以使用红细胞吸附释放法来浓缩纯化流感病毒,该方法简单方便,浓缩效率较高,流感病毒损失较少,是一种浓缩纯化流感病毒较好的方法<sup>[3]</sup>。本文分别使用了蔗糖密度梯度离心法(sucrose-density-gradient-centrifugation, SDGC)和红细胞吸附释放法(absorption and release-RBC, AR-RBC)浓缩纯化流感病毒,并将2种方法进行比较,结果发现2种纯化病毒效果都较好,但AR-RBC操作更简便、病毒丢失量少、经济实用、便于推广。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料:**人流感病毒株A/PR/8/34(H1N1)由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所国家流感中心提供,经复苏稀释后待用。无特定病原(specific pathogen free, SPF)鸡胚由四川大学华西医学中心实验动物中心提供。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 鸡胚培养流感病毒:**取39℃孵化的9日龄SPF鸡胚,每个鸡胚接种流感病毒稀释液0.2 mL。继续孵化48 h后收取鸡胚尿囊液并测血凝效价。

**1.2.2 SDGC浓缩纯化流感病毒:**取血凝效价1:2 560的流感病毒鸡胚尿囊液50 mL,2 000 r/min离心30 min,去沉渣。然后30 000 r/min超速离心1 h,弃去上清(另外收集该上清液测血凝效价),在残留沉淀物中加入0.5 mL pH 7.2的PBS,充分混匀,4℃过夜。在离心管中依次加入2 mL 60%、4 mL 45%、4 mL 30%蔗糖溶液形成密度梯度,将样品平铺于最上层,20 000 r/min离心1 h。离心后用注射器各层面取样进行血凝效价检测。

### 1.2.3 AR-RBC浓缩纯化流感病毒

**1.2.3.1 新鲜鸡红细胞浓缩纯化流感病毒:**取血凝效价为1:2 560的流感病毒鸡胚尿囊液15 mL,2 000 r/min离心30 min后去沉渣,收集上清液。取300 μL 50%新鲜鸡红细胞加入该上清液中,混匀,置4℃下40 min。1 500 r/min离心10 min后

弃去上清(另外收集该上清液测血凝效价)。残留沉淀物中加入500 μL生理盐水,37℃水浴4 h,20 min振摇1次,最后1 500 r/min离心10 min后收取上清并检测血凝效价。

**1.2.3.2 甲醛处理的红细胞浓缩纯化流感病毒:**取1 mL 50%新鲜鸡红细胞加入1 mL 36%甲醛,充分混匀。置4℃48 h,3 h混匀1次。2 000 r/min离心10 min后弃去上清,剩余沉淀物中加入10 mL生理盐水混匀,2 000 r/min离心10 min弃去上清,然后加入10 mL生理盐水进行第2次洗涤,如此洗涤6次。洗涤完毕,加500 μL生理盐水配成50%甲醛处理过的鸡红细胞悬液。

取600 μL以上步骤配好的鸡红细胞悬液代替300 μL新鲜鸡红细胞作AR-RBC浓缩纯化流感病毒,操作同前。

## 2 结 果

**2.1 SDGC:**以30 000 r/min超速离心后弃去的上清液测定的血凝效价为1:1 280。在30%与45%蔗糖层面交界处出现乳白色条带,取样约0.5 mL,测血凝效价为1:2 560;而45%蔗糖与60%蔗糖层面中未出现肉眼可见的条带,抽出的该层样品无血凝反应。

### 2.2 AR-RBC

**2.2.1 新鲜鸡红细胞纯化流感病毒:**在纯化过程弃去的上清液略带红色,检测不到血凝效价;最后收集到的纯化病毒液颜色不清亮,呈红色,出现溶血现象,血凝效价为1:2 560。

**2.2.2 甲醛处理的鸡红细胞纯化的流感病毒:**在纯化过程弃去的上清液颜色清亮,同样检测不到血凝效价;最后收集到的纯化病毒液清亮,无溶血现象,血凝效价为1:2 560。

## 3 讨 论

病毒的纯化一直是病毒学研究的一个难点,密度梯度离心是病毒纯化最常使用的方法<sup>[4~6]</sup>。SDGC以其成本低、对核酸和蛋白质无损伤作用等特性成为目前病毒纯化较普遍使用的方法<sup>[4~9]</sup>。SDGC的原理是即将分离的样品放入准备好的用不同密度组成的梯度液的表面或底部,通过离心,样品中的各组分便会按照各自的特性在密度梯度液中形成有层次的样品区带,从而达到分离样品的目的<sup>[1]</sup>。该方法精密度较高,使用该方法如果密度梯度选择恰当可以收到比较满意的效果,但是该方法操作过程比较繁琐,需要特殊仪器设备—超速离心机。鸡

红细胞表面含有血凝素的受体唾液酸,血凝素可以与之结合并发生凝集,随后在一定的温度条件下流感病毒又可与鸡红细胞分离,因此根据流感病毒的这一特性可以使用 AR-RBC 来纯化流感病毒。本实验在 30 000 r/min 离心 1 h 后丢弃的上清中仍检测到较高效价的流感病毒,说明超速离心并未使病毒完全沉积于管底,因此造成流感病毒的丢失;而利用 AR-RBC 纯化流感病毒却在丢弃的上清液中未检测到流感病毒,说明流感病毒基本上已完全被鸡红细胞所吸附,或仅有少量丢失。进一步比较 2 种方法发现,在使用相同血凝效价的流感病毒鸡胚尿囊液的前提下,AR-RBC 只用 15 mL 鸡胚尿囊液就达到了 SDGC 需用 50 mL 鸡胚尿囊液得到的纯化效果,即获得等量血凝效价的纯化流感病毒,显示出 AR-RBC 可节省病毒鸡胚尿囊液的用量,纯化效率高。但是在 AR-RBC 中存在新鲜鸡红细胞溶血现象;而使用甲醛处理过的鸡红细胞却无溶血现象,建议在使用 AR-RBC 纯化时最好使用甲醛处理过的鸡红细胞。

总之,通过 2 种纯化流感病毒的对比研究,作者认为 AR-RBC 是一种操作简单,易于掌握,而且对设备要求不高,经济实用的纯化流感病毒的方法,值

得推广,特别是使用甲醛处理过的鸡红细胞纯化效果更为理想。

#### 【参考文献】

- [1] 陈复生. 精密分析仪器及应用[M]. 成都:四川科学技术出版社,1988. 371-373.
- [2] 金奇. 分子病毒学[M]. 北京:科学出版社,2001. 633-656.
- [3] 郭元吉,程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术[M]. 北京:三峡出版社,1997. 143-144.
- [4] 陈丽君,王英,胡建华,等. 应用等密度梯度离心法提纯传染性支气管炎病毒[J]. 上海农业学报,1998,14(3): 93-95.
- [5] Lee KC, Lim D, Wong SM, et al. Purification, crystallization and X-ray analysis of hibiscus chlorotic ringspot virus [J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2003, 59(Pt 8): 1481-1483.
- [6] Pyke AT, Phillips DA, Chuan TF, et al. Sucrose density gradient centrifugation and cross-flow filtration methods for the production of arbovirus antigens inactivated by binary ethylenimine[J]. BMC Microbiol, 2004, 144(1):3.
- [7] 龙润乡,侯宗柳,代素萍,等. 快速纯化甲型肝炎病毒及相关性状的检测[J]. 中国公共卫生,2004,20(5): 611-612.
- [8] 王志武,卢日峰,范洪学. 流感病毒的裂解、纯化及抗原性研究[J]. 中国生物制品学杂志,2002,15(3): 159-160.
- [9] 马晓丽,赵晖,毛炳宇,等. 鸡传染性法氏囊病毒的分离、纯化与抗血清的制备[J]. 山东农业科学,1996, 6(1): 40-42.

## 《临床荟萃》2005 年征订启事

《临床荟萃》是国内惟一的临床大内科半月刊杂志,1986 年 1 月创刊,面向国内外公开发行人。本刊特点为信息量大,周期短,内容丰富。主要栏目:论著、临床研究、临床用药、临床检验、中医中药与中西医结合、急救医学、病例讨论、误诊误治、专题笔谈、专家讲座、综述等。并且不定期开设刊授专栏,刊载基层临床医务工作者医学再教育资料。

《临床荟萃》1996 年至 2004 年连续三届被评为全国“内科学类核心期刊”,2001 年被国家科技部、卫生部等五单位确定为“中国生物医学核心期刊”。1998 年获华北地区“十佳期刊(优秀)”奖。2001 年在国家新闻出版总署实施的“精品战略”中,本刊有幸入选“中国期刊方阵—双效期刊”。2000 年加入清华大学主办的“中国学术期刊(光盘版)”,在中国学术期刊(光盘版)检索与评价数据规范执行评优活动中,荣获首届 CAJ-CD 规范执行优秀期刊奖。2003 年入选为“中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊”。2001 年加入“万方数据-数字化期刊群”,并被“中国核心期刊(遴选)数据库”收录。2001 年被中国人民解放军医学图书馆“中文生物医学期刊文献数据库”收录。

本刊为大 16 开 64 页,每月 5 日、20 日出版,每期定价 4.50 元,全年定价 108 元。国际标准连续出版物号:ISSN 1004-583X;国内统一连续出版物号:CN 13-1062/R;邮发代号 18-233,全国各地邮局(所)均可办理订阅手续。编辑部地址:河北省石家庄市中山路 361 号《临床荟萃》编辑部;邮编:050017;电话:(0311)7969649,6266984;E-mail:lchc@hebm. edu. cn;cfnk@hebm. edu. cn。