

提纯 CVB1 的方法学改进和 CVB1 的灭活^①

陈国俊¹ 刘焯霖¹ 张成¹ 陈元² 方丹云² 吴金浪³

(中山医科大学 1 附属第一医院神经科 2 微生物学教研室 3 电镜室; 广州, 510080)

摘要 目的: 研究聚乙二醇沉淀和蔗糖梯度离心法提纯柯萨奇病毒 B1(CVB1)的效率, 并采用 β -丙内酯(BPL)将其灭活, 观察 BPL 的灭活效果。方法: ①聚乙二醇沉淀法将病毒悬液初步浓缩; ②在 10%~50% (m/V) 蔗糖梯度中上样, 低温超速离心; ③电镜观察并做病毒活性测定; ④BPL 对病毒进行灭活, 测定残存毒力。结果: ①病毒在 50% (m/V) 蔗糖处有一吸收峰, 并被电镜证实; ②BPL 灭活病毒彻底, 灭活后病毒稀释 $10^2 \sim 10^{10}$ 倍接种细胞未见病变。结论: CVB1 经聚乙二醇沉淀和蔗糖梯度超速离心后收获率高, BPL 灭活彻底, 保证了进一步实验的成功。

关键词 柯萨奇病毒 B 组/分离和提纯; 丙内酯; 离心法; 梯密度; 病毒灭活

中图分类号 R 373.23

Improved Method for CVB1 Purification and Its Inactivation

Chen Guojun¹ Liu Zhuolin¹ Zhang Cheng¹ Chen Yuan² Fang Danyun² Wu Jinglang³

(1 Department of Neurology, First Affiliated Hospital 2 Department of Microbiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou, 510080)

Abstract Objective: To study an improved method of Coxsackie virus B1 (CVB1) purification with polyethylene glycol (PEG) sedimentation followed by sucrose ultracentrifugation, and to study the effect of virus inactivation by β -propiolactone (BPL). **Methods:** ① Virus suspension was concentrated primarily by PEG. ② Samples were layered onto 10%~50% sucrose gradient and purified by ultracentrifugation. ③ Viruses were identified under electronic microscope, and the toxicity was measured as well. ④ Viruses were inactivated by BPL and the toxicity measured again. **Results:** ① CVB1 showed a peak value of A_{260} in 50% sucrose gradient, which was approved by electronic microscope. ② CVB1 were thoroughly inactivated by β -propiolactone, cytopathology was not seen even when viruses were diluted from 10^2 to 10^{10} times. **Conclusions:** ① Highly purified CVB1 after PEG sedimentation and sucrose ultracentrifugation was obtained. ② Inactivation of CVB1 by BPL was complete, which guarantee the successfulness for further studies.

Subject headings Coxsackie viruses B/isolation & purification; propiolactone; centrifugation; density gradient; virus inactivation

Coxsackie 病毒 B1 (CVB1) 是一种小而无囊膜的单链正股 RNA 病毒, 直径为 28 nm, 属于小 RNA 科肠道病毒属。新生儿和婴儿感染此类病毒可引起胰腺炎、无菌性脑膜炎和致死性热性惊厥等。而成人感染可无症状。该病毒的持续感染被认为是心肌炎、扩张性心肌病、自身免疫性肌炎和慢性疲劳综合征的病因^[1, 2]。现已将 CVB1 用来制备稳定的实验性

肌炎模型。病毒 RNA 的持续存在反应了病毒嗜性。病毒感染后可在小鼠心肌、骨骼肌、脑、脊髓中检测到阳性, 而其它组织中如肝、肾、脾等组织则为阴性^[3]。在肌细胞的基因转移中, 曾有灭活腺病毒 (AV) 促进基因转移的报道, 但 AV 对肌肉无特异性亲和力, 靶向不够明确。CVB1 的嗜肌肉特性为靶向于肌细胞的基因转移提供了良好的应用前景。

CVB1 对 HeLa 细胞(宫颈癌细胞)和 vero 细胞(绿猴肾细胞)具有高度亲和力,能在细胞中迅速繁殖。因此,这两种细胞常被用来研究 CVB1 的受体和病毒提纯^[4]。文献报道的提纯方法都是用氯化铯(cesium chloride, CsCl)超速离心法,但 CsCl 对 CVB1 外壳的结构和功能有一定影响,使提纯后病毒对细胞的感染能力下降甚至消失^[5]。因此,我们报道采用比较温和的水溶性大分子蔗糖进行梯度超速离心,再将提纯后的病毒采用 BPL 进行灭活的方法,为进一步的基因转移研究打下基础。

1 材料与方 法

参照 Novoty^[4] 和 Mapoles^[6] 报道的方法加以修改。

1.1 病毒的接种和收获

预先将 vero 细胞用含有胰酶和 EDTA 的消化液 0.25%(m/V)的胰酶和 0.02 mol/L EDTA 按 $V/V=1/3$ 的比例混合] 消化,传代培养至总体积为 250 mL。取病毒液(中国预防医学科学院毒种室)1:100 稀释并接种细胞,用含 2%(m/V)小牛血清的 RPMI 1640 液(维持液)置 37 °C 培养箱吸附 1 h,取出换完全培养液,继续培养至细胞出现 100% 病变时取出,置 -40 °C 冻存。反复冻融 3 次后,3 000 $g \times 20$ min 离心,收集至 500 mL 的烧瓶内。

1.2 聚乙二醇沉淀

加入含有 1.25 mol/L NaCl 的浓度为 50% (m/V)的聚乙二醇(PEG, 相对分子质量为 6 000),使 PEG 终浓度为 6% (m/V),4 °C 下置磁力搅拌器上搅拌过夜。10 000 $g \times (30 \sim 60)$ min 离心,收集沉淀。将沉淀重悬于 40 mL PBS 中,5 000 $g \times 30$ min 离心以去除细胞碎片和大相对分子质量杂质。取上清。

1.3 NP-40 进一步裂解细胞和释放病毒

取上清在 4 °C 以 150 000 $g \times 2$ h 离心,取沉淀重悬于含 0.15% (V/V) NP-40 的 PBS 5 mL 中,4 °C 过夜,再匀浆化,5 000 $g \times 30$ min 离心以去除不溶性杂质。取上清。

1.4 蔗糖梯度离心

取上清加样,置于 10% ~ 50% 蔗糖(本文蔗糖浓度皆为 m/V)不连续梯度液顶端(每个梯度

2 mL,共 10 mL,制备梯度时加样应缓慢,尽量防止梯度层之间相互渗透),加样量为 1 mL/离心管。160 000 $g \times 2$ h 离心,分部收集,每管 2 mL。测 A_{260} 值,注意应用相应浓度的蔗糖做对照管。根据以下公式对病毒定量: $1.0 A_{260} = 9.4 \times 10^{15}$ 病毒颗粒/ $L^{[7]}$ 。

1.5 去除蔗糖

将 30% (m/V)以上的蔗糖液及管底沉淀(用 PBS 悬浮后吸出)分别加于装有 10 mL PBS 的离心管中,150 000 $g \times 60$ min 离心,用 20 μ L HEPES 缓冲液回收沉淀。必要时重复一次。

1.6 电镜观察病毒形态

取回收样品各 2 μ L 送检(尽量不含蔗糖),将加有病毒液的铜网倒置于 1% ~ 3% (m/V)的磷钨酸盐水上负染 10 min,烘干,在电镜下放大 10 万 ~ 15 万倍寻找和观察病毒。

1.7 TCID₅₀(组织培养半数感染量)观察细胞毒力

取病毒液 10 μ L 稀释 $10^2 \sim 10^{10}$ 倍,置 96 孔板 vero 细胞中,每 4 孔细胞为 1 个稀释度,每孔加入 0.2 mL 病毒液,用维持液在 37 °C 1 h,无血清 RPMI 1640 液洗涤 3 次后加入维持液。16 ~ 24 h 后,96 孔细胞中 50% 病变孔的病毒稀释倍数即为 TCID₅₀ 值。

1.8 β -丙酮内酯(BPL)灭活

根据姜述德^[8]等的报道加以修改。取 BPL 原液用 PBS 稀释成 10% (V/V)的浓度,再加入病毒液中,使终浓度为 2% (V/V),置 4 °C 冰箱 24 h,取出敞开管盖在 37 °C 中孵育 2 h。取样品 10 μ L 按步骤 1.7 再做 TCID₅₀ 观察细胞毒力,同时做电镜形态观察。加 40% 体积甘油, -80 °C 保存。

2 结 果

2.1 各蔗糖梯度的相应 A_{260} 值和浮密度

超速离心后各蔗糖梯度和管底沉淀经 HEPES 悬浮和再离心后所得 A_{260} 和浮密度见表 1。 A_{260} 在 50% 浓度处有一吸收峰,并经电镜和细胞病变证实为 CVB1,病毒集中在 40%、50% 的蔗糖和管底沉淀内,而 10% 蔗糖内的物质经电镜观察为直径大小不等的圆形颗粒样物质,不是病毒,可能是细胞内的一些细胞器,它们的浮密度介于 1.081 ~ 1.127 之间,而 CVB1 在蔗糖中浮密度为 1.230。因而通过蔗糖梯度成功地将病毒与细胞器分离。混合各管所得,测最终的 A_{260} 为 0.85,根据公式 $1.0 A_{260} =$

9.4×10¹⁵病毒颗粒/L, 得250 mL原液中所收获的病毒总量为6.4×10¹²颗粒。

表1 各蔗糖梯度的相应浮密度和A₂₆₀值

Table 1 Correspondent floating densities and A₂₆₀ values of different sucrose gradients

Sucrose gradient (m/V)	Floating density	A ₂₆₀
10%	1.038	0.25
20%	1.081	0.01
30%	1.127	0.02
40%	1.176	0.43
50%	1.230	0.94
sediment		0.12

2.2 灭活前后细胞病变

病毒经BPL灭活前TCID₅₀显示在10¹⁰稀释孔内出现半数细胞病变, 即TCID₅₀为4。细胞病变表现为细胞光泽消失, 变圆, 脱壁并悬浮于培养液内, 见图1。病毒经BPL灭活后接种细胞, 在最大稀释倍数时亦未见细胞病变, 细胞光泽好, 形态规则, 说明BPL灭活病毒彻底, 方法可靠, 见图2。

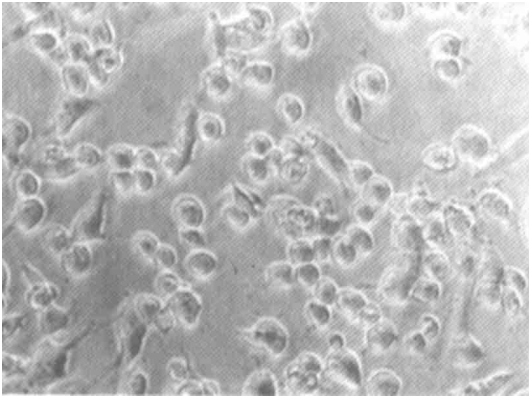


图1 病毒灭活前的细胞病变

Fig. 1 Cytopathologies before virus inactivation (×20)



图2 病毒灭活后的细胞病变

Fig. 2 Cytopathologies after virus inactivation (×20)

2.3 电镜观察病毒形态

电镜结果与所测A₂₆₀结果一致, 在40%、50%浓度的蔗糖和管底沉淀内可见形态一致、大小规则、放大倍数与病毒大小一致的病毒颗粒, 在50%蔗糖液中病毒密度最高。BPL灭活前后病毒形态无明显变化, 详见图3和图4。灭活前可见病毒内深染RNA, 灭活后则病毒中心透亮度增加。这些说明BPL灭活CVB1稳定可靠并符合要求。

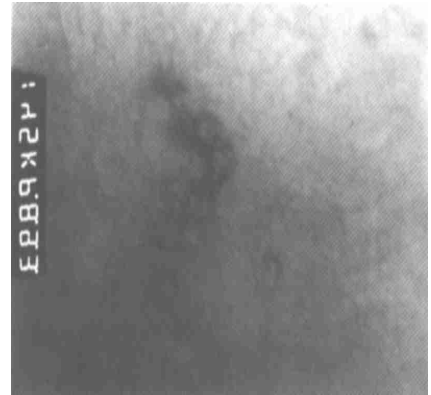


图3 病毒灭活前的形态

Fig. 3 Viruses shapes before inactivation (×150 000)

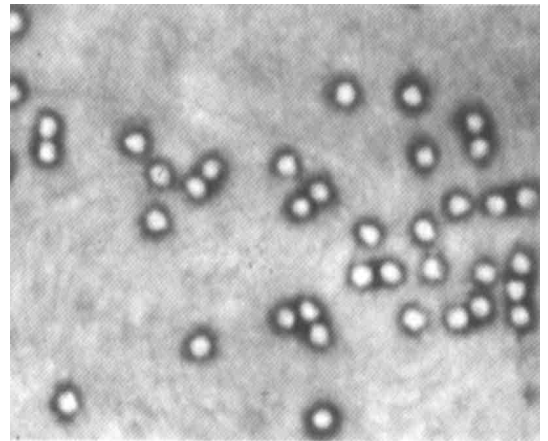


图4 病毒灭活后的形态

Fig. 4 Viruses shapes after inactivation (×100 000)

3 讨论

3.1 本实验的操作原理

CVB1感染细胞后, 经过分裂繁殖并引起细胞病变, 部分病毒释放到细胞外, 但仍有部分病毒存留在细胞内, 反复冻融的目的是破坏细胞完整性, 从而使尽量多的病毒释放到细胞外。这样经过低速离心后大部分病毒随着细胞碎块沉降于管底。

PEG 的作用是在 NaCl 的存在条件下,与病毒颗粒发生可逆性结合使之进一步浓缩,使体积仍然过大的病毒悬液进一步集中。进一步差速离心后的上清就含有包括 PEG 在内的大部分病毒。NP-40 是一种细胞裂解剂,低浓度 NP-40 的作用是使不易破碎的细胞裂解,保证病毒被最大限度地提取和纯化,以达到高度利用的目的。经过上述步骤,感染细胞后的病毒绝大部分被浓缩,但细胞内的一些细胞器如核糖体、微粒体、线粒体、内质网片段以及可溶性蛋白质仍存留在病毒悬液中。为了在以后的试验中尽可能地避免其它因素的干扰带来的误差,有必要采取进一步的纯化措施。CsCl 是一种重金属盐,与病毒长时间离心有可能引起蛋白外壳的分解,破坏病毒结构的完整性,铯离子还可穿过病毒外壳进入病毒内部,置换病毒内的 K^+ 使之溢出细胞外。研究发现^[9],一个病毒颗粒可以进入铯离子的最大量是 7 500 个,使病毒浮密度从 1.34 增加到 1.45。而蔗糖是一种中性分子,不引起蛋白分解,避免了高盐浓度对病毒颗粒的破坏。尽管 CVB1 在蔗糖溶液中与大部分亚细胞颗粒的浮密度相似,但它们的沉降系数差别较大,因此可以通过速度区带离心法将其分离。

3.2 蔗糖梯度也能高度纯化病毒

本研究发现,可溶性蛋白和另一类干扰物质可能存在于 10% 的蔗糖内,另外一些散发存在于 20%~30% 区带内,而大部分病毒密集存在于 50% 区带内,且电镜显示基本没有亚细胞成分性颗粒和蛋白。因此,本研究证明蔗糖区带离心法也能象 CsCl 一样将病毒高度纯化。本研究还发现,同一病毒颗粒在不同介质内,其浮密度不一样。CVB1 在 CsCl 中浮密度为 1.34,而在蔗糖中是 1.23。该数据的获得为 CVB 乃至其它小 RNA 病毒的提纯中,确定相应的介质浓度和离心参数提供了实验依据。本研究在 250 mL 病毒悬液中提取出的病毒浓度亦是相当高的,总量达到 6.4×10^{12} 颗粒。本实验既不破坏病毒又将病毒进行了高度纯化。

3.3 BPL 灭活病毒的特点

用 BPL 灭活病毒的原理与制备病毒疫苗是一

样的。本实验所采用的方法是根据制备 CVB3 疫苗而来的,BPL 能穿透病毒粒子并作用于核酸使病毒失活,但不破坏病毒外壳。尽管有作者发现 BPL 在灭活过程中有一拖尾现象,但继续处理 24 h 后,活病毒就不能再被测出。BPL 水溶液不稳定,37 °C 下 2 h 完全水解,也省却了去除 BPL 的麻烦。本实验中,经 BPL 灭活的 CVB1 接种于 vero 细胞后,对细胞的致病作用完全消失,与文献报道一致,且电镜证实灭活后的病毒形态保持完整,完全达到预期目的。

参 考 文 献

- 1 Woodruff J F. Viral myocarditis: a review. *Am J Pathol*, 1980, 101(8): 425
- 2 Weller A H, Simpson K, Herzum M, *et al*. Coxsackie virus B3 induced myocarditis: virus receptor antibodies modulate myocarditis. *J Immunol*, 1989, 143(3): 1843
- 3 Tam P E, Schmidt A M, Ytterberg S R, *et al*. Duration of virus persistence and its relationship to inflammation in the chronic phase of Coxsackie virus B1-induced murine polymyositis. *J Lab Clin Med*, 1994, 123(11): 346
- 4 Novoty J, Avobodova J, Ransnas L A, *et al*. A method for the preparation of purified antigens of Coxsackie B3 virus from a large volume of cell culture supernatant. *Acta Virol*, 1992, 36(7): 483
- 5 Wetz K, Willingmann P, Habemehl K O, *et al*. Dense particles and slow sedimenting particles produced by ultraviolet irradiation of poliovirus. *J Gen Virol*, 1983, 64(5): 1263
- 6 Mapoles J E, Kahn D I, Crowell P L, *et al*. Purification of a HeLa cell receptor for group B Coxsackie virus. *J Virol*, 1985, 55(4): 560
- 7 Fields B N, Knipe D M. *Fundamental Virology*. 2nd ed. New York: Raven Press Ltd, 1990. 335
- 8 姜述德, Pye D. β -丙内酯灭活脊髓灰质炎病毒. *中华微生物与免疫学杂志*, 1985, 5(2): 92
- 9 Mapoles J E, Andergg J W. Properties of poliovirus propagated on medium containing cesium chloride. Implication for picornaviral structure. *Virology*, 1978, 90(7): 103

(1999-03-01 收稿 1999-07-08 修回)