

## • 基础实验研究论著 •

## 肠道病毒 71 型的快速纯化及其鉴定\*

胡小云, 朱冰<sup>△</sup>, 王长兵, 邝璐, 肖密丝

(广州医学院附属广州市妇女儿童医疗中心实验室 510120)

**摘要:**目的 建立一种简单、快速有效的从细胞培养物中纯化肠道病毒 71(EV71)的方法。方法 EV71 病毒在恒河猴肾细胞(LLC-MK2)中增殖后,将获得的细胞培养物经反复冻融、聚乙二醇 6000 沉淀、超速离心、氯化铯垫层超速离心的方法纯化病毒。用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、免疫印迹(Western blot)和透射电镜(TEM)的方法对纯化病毒进行鉴定,并测定其感染性的滴度及回收率。结果 SDS-PAGE 显示出 3 个条带,相对分子质量分别为  $3.6 \times 10^3$ 、 $3 \times 10^3$  和  $2.6 \times 10^3$  与 EV71 的 VP1、VP2 和 VP3 相符合。Western blot 证实为 EV71 特异性条带。经磷酸钨酸负染后电镜观察,能看到典型病毒颗粒。采用终浓度为 10% 的聚乙二醇 6000 沉淀后的病毒的感染性回收率为 82.0%,再经氯化铯垫层超速离心后浓缩病毒的感染性回收率为 29.0%。**结论** 聚乙二醇 6000 沉淀结合氯化铯垫层超速离心的方法比氯化铯密度梯度区带离心方法更简便,易于操作,并且比单独聚乙二醇 6000 沉淀有更高的纯度,是一种简便、有效的病毒纯化方法。

**关键词:**肠道病毒 71 型; 病毒纯化; 超速离心

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.08.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)08-0897-02

## Rapid purification and identification of Eenterovirus 71\*

Hu Xiaoyun, Zhu Bing<sup>△</sup>, Wang Changbing, Kuang Lu, Xiao Misi

(Central Laboratory, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou Guangdong 510120, China)

**Abstract:** **Objective** To establish a simple, rapid and effective method to purify Enterovirus 71(EV71) from cell culture. **Methods** EV71, propagated in rhesus renal cells(LLC-MK2 cells) were purified by precipitating with polyethylene glycol(PEG)6000, differential centrifugation and ultracentrifugation with cesium chloride(CsCl) cushion. The purified virus samples were further identified by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE), Western blot and transmission electron microscope(TEM). **Results** SDS-PAGE showed three protein straps with relative molecular weights of  $3.6 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^3$  and  $2.6 \times 10^3$  respectively, which were according with the VP1, VP2 and VP3 of EV71 and could be confirmed by Western blot. The typical virus particle could be observed with TEM. Infectivity recovery of virus samples, precipitated by PEG-6000 with final concentration of 10% was 82.0%, and that of the final purified virus samples was 29.0%. **Conclusion** New method, constructed in this research, could be more convenient and easier than CsCl density gradient centrifugation and might get higher purity of virus than PEG-6000 precipitation alone.

**Key words:** Enterovirus 71; virus purification; ultracentrifugation

肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)是引起儿童手足口病(hand-foot-and-mouth disease, HFMD)暴发流行的主要病原之一,感染严重者还能引起无菌性脑炎、脑膜脑炎、脑干脑炎、脊髓灰质炎性麻痹、心肌炎和肺水肿等多种与神经系统相关的疾病<sup>[1]</sup>。自首次从婴儿粪便标本中分离到 EV71 病毒以来,全世界很多国家均有 EV71 流行情况的报道<sup>[2-4]</sup>。2008 年以来,中国安徽、山东、北京和广东等地也相继暴发了 EV71 病毒感染所致的儿童手足口病,因此备受人们关注<sup>[5-6]</sup>。本实验在参照和改进传统的病毒纯化方法的基础上,采用聚乙二醇 6000 浓缩病毒并结合氯化铯垫层超速离心的方法对 EV71 病毒进行纯化,并且用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、免疫印迹(Western blot)和透射电镜(TEM)的方法对纯化病毒进行鉴定,为下一步病毒研究及应用提供支持。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 恒河猴肾细胞(LLC-MK2)、RD 细胞由本实验室保存,肠道病毒 71 型广州株 EvGz06 病毒为本实验室分

离培养;RPMI 1640 培养基、胎牛血清为 Gibco 公司产品;聚乙二醇 6000、CsCl 为 Sigma 公司产品;ECL 试剂盒为 Pierce 产品;Western blot 试剂为 Biomiga 公司产品;BCA 蛋白定量试剂盒为武汉博士德产品;Optimal L-90K 超速离心机为 Beckman 公司产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 病毒培养** 将 LLC-MK2 培养在含 10% 的胎牛血清 RPMI 1640 中,待长成单层后,用无血清 RPMI 1640 洗涤两次。加 EV71 病毒液 37 °C 吸附 1 h。再加入含 2% 胎牛血清的 RPMI 1640 维持液中,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育,待细胞完全病变时获取。

**1.2.2 病毒纯化** 将收获的病毒液反复冻融 3 次,8 000 r/min 离心 30 min,离心半径 8 cm,收集上清液,缓慢加入固体聚乙二醇 6000 使其终浓度为 10% 或加入硫酸铵至 50% 的饱和度,均匀搅拌 60 min 后 4 °C 放置过夜。10 000 r/min 离心 60 min,离心半径 8 cm,去掉上清液,用 10 μmol/L 的 PBS 溶液重

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(30972630);广东省自然科学基金项目(10151012001000002)。△ 通讯作者,E-mail:zhubing0327@yahoo.com.cn。

悬沉淀。12 000 r/min 离心 30 min, 离心半径 8 cm, 弃去沉淀, 收集上清液。在离心管底部缓慢加入 4 mL 密度为 1.2 g/mL 氯化铯垫层, 再将上述制备好的上清液缓慢地铺加于氯化铯垫层上, 38 000 r/min, 4 °C 超速离心 5 h。离心结束后取出离心管, 弃去上清液, 用适量的 10 μmol/L 的 PBS 溶液重悬沉淀。

**1.2.3 病毒感染性测定及蛋白定量** 待检样品 10 倍系列稀释后, 接种到 96 孔板上的 RD 细胞单层, 连续 7 d 观察细胞病变, 按 Muench-Reed 法计算感染性滴度即半数细胞感染 (TCID<sub>50</sub>)。蛋白定量 (BCA 法) 按照试剂说明书进行操作。

**1.2.4 SDS-PAGE 和 Western blot** 采用 10% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝 R250 染色, 测定病毒蛋白相对分子质量并鉴定其纯度, 并将分离胶转印在硝酸纤维膜上。硝酸纤维膜经 5% 脱脂牛奶封闭过夜后, 加入抗 EV71 病毒 VP1 的单克隆抗体, 室温保存 2 h, 洗膜 3 次。加二抗 (辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体), 室温置 2 h, 洗膜 3 次, ECL 底物发光 A、B 显色液按 1:1 比例混合后加入膜上反应 3 min, 然后压片、曝光、显影并定影。

**1.2.5 电镜观察** 将纯化样品滴在经碳化处理的铜网上, 几分钟后用滤纸吸去多余样品, 置于磷钨酸溶液中染色, 1 min 后取出, 吸去多余染液, 干燥后电镜观察。

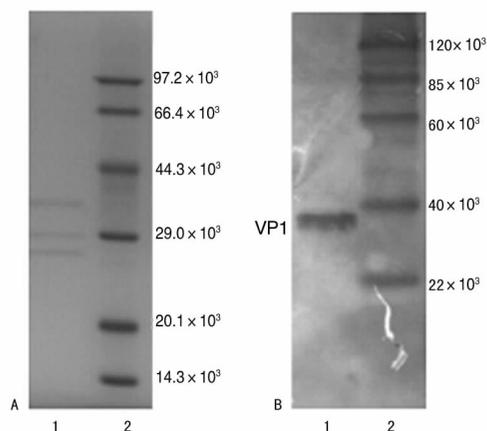
**2 结 果**

**2.1 EV71 病毒纯化结果** 见表 1。

表 1 从细胞培养物中提纯 EV71 病毒结果

样品	体积 (mL)	病毒滴度 (TCID <sub>50</sub> /mL)	蛋白浓度 (mg/mL)	感染性回收率 (%)
病毒培养上清液	130	1.70×10 <sup>7</sup>	1.96	100
聚乙二醇沉淀	13	1.40×10 <sup>8</sup>	0.49	82
硫酸铵沉淀	13	1.30×10 <sup>8</sup>	2.18	76
氯化铯垫层超速离心后沉淀	0.5	1.26×10 <sup>9</sup>	0.064	29

**2.2 SDS-PAGE 和 Western blot** SDS-PAGE 结果显示出 3 个条带, 相对分子质量分别为 3.4×10<sup>3</sup>、3×10<sup>3</sup> 和 2.6×10<sup>3</sup> 与 EV71 的 VP1、VP2 和 VP3 相符合<sup>[7]</sup>。Western blot 可见 EV71 的特异性蛋白条带 VP1。见图 1。



A: 纯化病毒样品 SDS-PAGE 结果; A1: 纯化病毒样品; A2: 蛋白标记物。B: Western blot 结果; B1: 纯化病毒样品; B2: Western blot 标记物。

图 1 纯化病毒样品 SDS-PAGE 和 Western blot 的检测结果

**2.3 电镜观察** 纯化后的样品进行电镜观察, 在显微镜放大

倍数 2~10 万倍时能看到病毒颗粒。该病毒主要为球形, 大小比较均一, 多数直径为 27 nm, 符合典型的 EV71 的特征。见图 2、3。

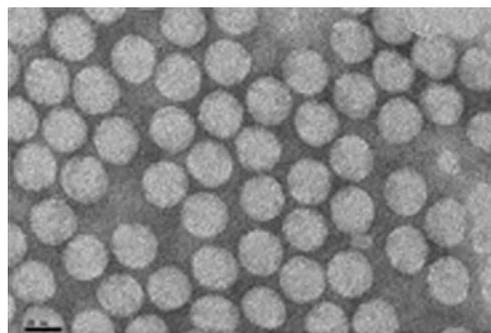


图 2 EV71 的透射电镜图 ×100 000

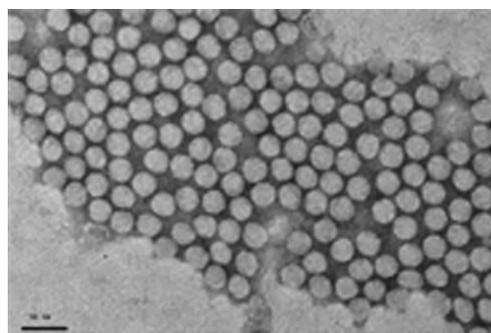


图 3 EV71 的透射电镜图 ×50 000

**3 讨 论**

EV71 是小 RNA 病毒科肠道病毒属成员, 病毒颗粒为二十面体立体对称的球形结构, 无包膜和突起, 直径大约在 24~30 nm。基因组由 7 400 多个核苷酸构成, 属单股正链 RNA 病毒<sup>[8]</sup>。由于 EV71 多位点基因作用决定其毒力, 加之复杂的宿主因素, 使得确定病毒毒力及致病机制相当困难。病毒与宿主之间相互作用是今后的研究重点之一<sup>[9]</sup>。能否获得高纯度的病毒样品非常重要, 其效果可直接决定后续研究的成败。本实验采用了超速离心法去除细胞碎片、聚乙二醇沉淀法浓缩病毒和氯化铯垫层超速离心法纯化 EV71, 取得较好的效果。

病毒的浓缩方法主要有超速离心沉淀法、硫酸铵沉淀法和聚乙二醇沉淀法等<sup>[10]</sup>。表 1 提示, 硫酸铵沉淀法虽然与聚乙二醇法的病毒回收率相当, 但其沉淀后的蛋白浓度 (2.18 mg/mL) 明显高于聚乙二醇法 (0.49 mg/mL), 结果表明聚乙二醇 6000 能够选择性地沉淀病毒, 从而除去大量的杂质蛋白, 起到初步纯化的作用。

氯化铯密度梯度离心法虽然纯化精度较高, 但费时费力, 不易操作, 难以用于经常性提纯的使用, 而且后期需要透析除去氯化铯, 难免造成病毒的丢失。EV71 的氯化铯浮力密度为 1.34 g/mL, 本组在以前的实验中运用 EV71 的氯化铯密度梯度离心的方法后测得病毒条带层密度为 (1.28~1.34) g/mL。因此, 根据实验结果本组采用了在离心管底部铺上一层密度为 1.2 g/mL 的氯化铯垫层的方法进行纯化, 超速离心后直接获取底部的病毒沉淀, 省略了透析去除氯化铯的环节。在此过程中, 氯化铯垫层可将小于该介质密度的物质滤除, 从而起到纯化的作用。这样既简化了操作, 节约了时间和成本, 又提高了病毒的回收率、浓度及纯度。

经过聚乙二醇 6000 沉淀、氯化铯垫层超 (下转第 905 页)

后血糖,男 404 例,女 495 例,平均年龄 52 岁。FPG 平均值 5.48 mmol/L。口服 75 g 无水葡萄糖 2 h 后血糖平均值为 5.96 mmol/L。926 例中正常糖耐量检出 646 例,占 69.76%;FPG 受损检出 72 例,占 7.78%;糖耐量受损检出 117 例,占 12.63%;新检出糖尿病 18 例,占 1.94%,加上已确认的 27 例糖尿病患者,糖尿病患病率则为 4.86%。

### 3 讨 论

**3.1** 泰州市高港区最大特色为开发区面积最大,故本组分析中开发区人口最多。本组调查高血糖检出率为 17.11%,糖耐量受损为 12.63%,糖尿病患病率 4.86%,均高于盛正妍等<sup>[2]</sup>的调查结果。分析原因:一是近十几年经济高速发展,导致该区生活水平大幅提升;二是本组调查采用分层整户抽样,糖尿病有家族史较高。根据去年底高港区人口调查显示总人口约 26 万人,结合本组调查估算该区高血糖者约为 44 486 例,糖耐量受损者约为 328 380 例,糖尿病患者约为 12 636 例。说明该区糖尿病患者及潜在患病者形势严峻。

**3.2** 本组发现大于 40 岁后 FPG 均值都较高,与晏文强等<sup>[3]</sup>调查一致。其中 51~60 岁组均值最高,为 5.80 mmol/L,0~20 岁组均值最低,为 4.91 mmol/L。高血糖检出率同样也是大于 40 岁后检出率较高,占全部高血糖的 84.85%,与人群 FPG 水平保持一致。与 Sacks 等<sup>[4]</sup>报道的一致。21~30 岁组高血糖检出率为 13.92%,虽没有 40 岁后人群高,但在小于 40 岁的人群中是最高的,表明 21~30 岁组人群将来患糖尿病的概率会增大。

**3.3** 口服 75 g 无水葡萄糖 2 h 后血糖测定结合 FPG 分析,FPG 51~60 岁组最高,其次是 61~70 岁组。糖尿病和 IGT 患病率提示,IGT 患病率自 50 岁后明显升高,且随年龄增长 IGT 患病率升高;糖尿病患病率同样也是 40 岁后呈较高趋势与 FPG 均值和高血糖检出率一致。施志农和陈健康<sup>[5]</sup>研究显示 IFG 阶段患者已经存在血脂代谢异常,因此在对 IFG 定期监测血糖的同时也要定期监测血脂,尽早对血糖、血脂水平进

行有效干预。

**3.4** 地区分布高血糖检出率以市区最高,其次是开发区,农村高血糖检出率最低。这与地区人群生活水平、对糖尿病存在着知晓率的高低等因素有关。地区分析糖尿病和 IGT 患病率结果显示,糖尿病的患病率随着经济发展和生活水平的提高而上升。

综上所述,该区防治重点应以 40 岁以上人群为主,同时也要对 21~30 岁组人群进行普及糖尿病教育,引导合理的膳食结构,培养良好的生活方式<sup>[6-8]</sup>。地区分析建议该区当前糖尿病防治应以经济较好的市区为重点向开发区辐射直至全区。

### 参考文献

- [1] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:359-363.
- [2] 盛正妍,刘媚,王煜非,等. 上海市市区 9 376 例成人中糖尿病患病率调查研究[J]. 中国糖尿病杂志,2001,9(2):214-217.
- [3] 晏文强,刘国政,蒋从清,等. 湖北省随州地区 2 型糖尿病的流行病学调查研究[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(3):369-370.
- [4] Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus[J]. Clin Chem,2002,48(26):436-447.
- [5] 施志农,陈健康. 糖尿病及空腹血糖受损者血脂水平分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(4):407-408.
- [6] 阮晓楠,邱桦,李锐. 上海市浦东新区某社区 2 型糖尿病患者营养干预效果评价[J]. 中国全科医学,2010,13(1):124-125.
- [7] 阮晓楠,傅东坡,傅华. 浦东新区糖尿病自我管理健康教育项目实施效果评价[J]. 中国全科医学,2009,12(8):1400-1401.
- [8] 姜淑琴. 在社区进行糖尿病健康教育与健康促进的新策略[J]. 中国全科医学,2009,12(8):1558-1559.

(收稿日期:2012-01-13)

(上接第 898 页)

速离心后纯化样品的病毒感染性回收率分别为 82.0% 和 29.0%,回收率较高。在进行 SDS-PAGE 时仅出现 3 个条带,说明纯度很高。并且经 Western blot 证实为病毒特异性条带,电镜下可观察到形态均一的病毒颗粒,表明该方法是一种从感染细胞培养物中分离纯化 EV71 简单、快速有效的方法。

### 参考文献

- [1] Yang TT, Huang LM, Lu CY, et al. Clinical features and factors of unfavorable outcomes for non-polio enterovirus infection of the central nervous system in northern Taiwan, 1994 - 2003 [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2005, 38(6): 417-424.
- [2] Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system [J]. J Infect Dis, 1974, 129(3): 304-309.
- [3] Tseng FC, Huang HC, Chi CY, et al. Epidemiological survey of enterovirus infections occurring in Taiwan between 2000 and 2005: analysis of sentinel physician surveillance data [J]. J Med Virol, 2007, 79(12): 1850-1860.

- [4] Iwai M, Masaki A, Hasegawa S, et al. Genetic changes of coxsackievirus A16 and enterovirus 71 isolated from hand, foot and mouth disease patients in Toyama, Japan between 1981 and 2007 [J]. Jpn J Infect Dis, 2009, 62(4): 254-259.
- [5] 李玉运,朱汝南,钱渊,等. 2007~2008 年肠道病毒 71 型北京地区分离株的 VP4 基因序列分析 [J]. 微生物与感染, 2009, 4(1): 16-21.
- [6] 朱冰,钟家禹,夏慧敏,等. 2008 年广州地区手足口病的病原学研究 [J]. 中华儿科杂志, 2010, 48(2): 127-130.
- [7] 金奇. 医学分子病毒学 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 601-613.
- [8] 李兰娟. 手足口病预防控制指南 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2008: 26-30.
- [9] 朱俊萍,孙立连,卫灿东,等. 肠道病毒 71 型感染前后宿主细胞蛋白组学的二维液相色谱分离和比较 [J]. 病毒学报, 2005, 21(4): 248-252.
- [10] 傅继华. 病毒学实用实验技术 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2001: 90-91.

(收稿日期:2012-03-05)