



关于病毒的纯化与保存



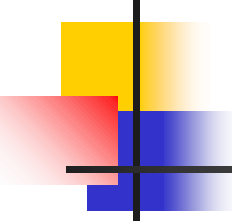
病毒纯化目的(了解)

- 为了了解病毒的结构、传染与免疫、遗传与变异等性质，常常需要高纯度的病毒



病毒纯化原理(熟悉)

- 利用物理或化学的方法尽可能地去除宿主细胞中的组分，将病毒从其宿主细胞内提纯出来，在纯化过程中保持病毒的**生物活性**和**感染性**。



病毒纯化的一般原则(熟悉)

■ 1、释放病毒到胞外

1.1 容易释放病毒(培养液/尿囊液)

1.2 不容易释放病毒(细胞破碎)

■ 2、去除细胞碎块

低速离心，以2000~6000r/min离心30~40分钟，可除去90%以上的细胞碎片和杂质

■ 3、病毒悬液浓缩



细胞破碎方法(熟悉)

- 超声破碎：密集的小气泡迅速炸裂，破坏细胞
- 高压匀浆：机械切割力
- 高速珠磨：玻璃小珠、石英砂、氧化铝等研磨剂
- 酶溶法：溶菌酶、蛋白酶、葡聚糖酶
- 化学渗透：渗透压改变使细胞破裂
- 反复冻融：形成冰晶，使细胞膨胀破裂

病毒纯化方法

聚乙二醇(PEG)浓缩法

- PEG是环氧乙烷和水缩合而成的水溶性非离子聚合物，无毒、无刺激性。
- 平均分子量不同，性质也有差异。分子量200~600者常温下是无色无臭粘稠液体，分子量在600以上者就逐渐变为半固体状、蜡状固体。
- 随着分子量的增大，其吸湿能力相应降低。

不同分子量PEG性质比较

规格	外观 (25℃)	色泽 Pt-Co	羟值 mgKOH/g	分子量	凝固点 ℃	水份 (%)	PH值 (1% 水溶液)
PEG-200	无色透明液体	≤20	510-623	180-220	-	≤1.0	5.0~7.0
PEG-300	无色透明液体	≤20	340-416	270-330	-	≤1.0	5.0~7.0
PEG-400	无色透明液体	≤20	255-312	360-440	4~10	≤1.0	5.0~7.0
PEG-600	无色透明液体	≤20	170-208	540-660	20~25	≤1.0	5.0~7.0
PEG-800	乳白色膏状物	≤30	127-156	720-880	26~32	≤1.0	5.0~7.0
PEG-1000	乳白色膏状物	≤40	102-125	900-1100	38~41	≤1.0	5.0~7.0
PEG-1500	乳白色固状物	≤40	68-83	1350-1650	43~46	≤1.0	5.0~7.0
PEG-2000	乳白色固状物	≤50	51-63	1800-2200	48~50	≤1.0	5.0~7.0
PEG-3000	乳白色固状物	≤50	34-42	2700-3300	51~53	≤1.0	5.0~7.0
PEG-4000	乳白色固状物	≤50	26-32	3600-4400	53~54	≤1.0	5.0~7.0
PEG-6000	乳白色固状物	≤50	17.5-20	5500-7000	54~60	≤1.0	5.0~7.0
PEG-8000	乳白色固状物	≤50	12-16	7200-8800	55~63	≤1.0	5.0~7.0





聚乙二醇(PEG)浓缩法(掌握)

- 分子量2000~6000的PEG用于病毒浓缩
- PEG可使病毒颗粒形成多聚体，较低离心力即可沉淀
- (1) 直接加入法
病毒悬液量少时候使用此法；
病毒悬液中加入8%-10%的PEG

聚乙二醇(PEG)浓缩法(掌握)

■ (2) 液体浓缩法

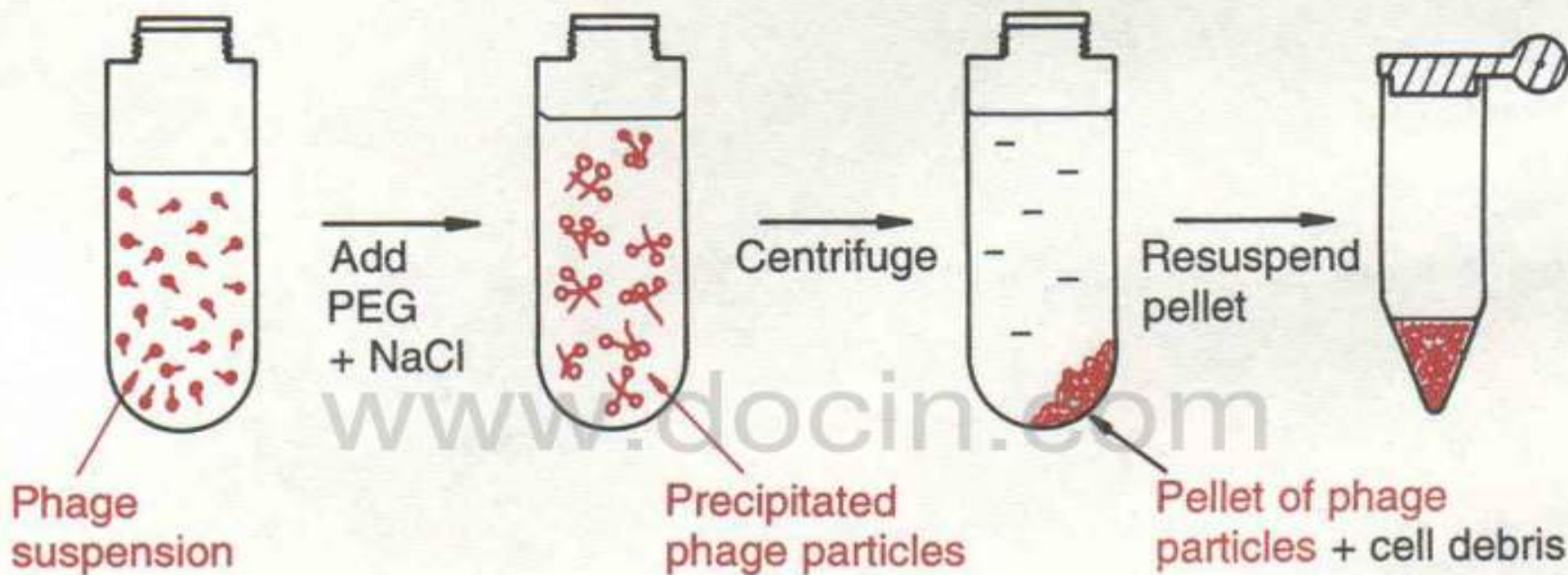


Figure 3.19 Collection of phage particles by polyethylene glycol(PEG) precipitation



聚乙二醇(PEG)浓缩法(掌握)

- (3) 固体浓缩法

将PEG固体覆盖于装有病毒悬液的透析袋上，进行浓缩。

透析袋孔径大小



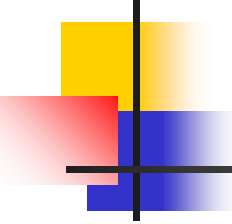
超过滤法(熟悉)

- 原理：利用超滤膜将水、盐及小分子滤过，将大分子或病毒等颗粒截留。
- 超滤膜孔径要比病毒颗粒小
- 只能去除比病毒小的细胞碎块



吸附法(熟悉)

- 原理：病毒颗粒表面离子与吸附剂有亲和性，病毒吸附之后，使用适当的条件将病毒洗脱下来。
- 吸附剂必须具备的特点：
 - 较大的表面积和吸附能力；
 - 较高的吸附选择性；
 - 便于洗脱；
 - 性质稳定；



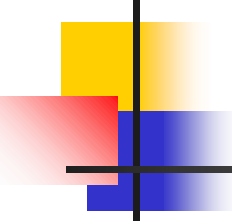
凝胶吸附法-磷酸钙凝胶

- 常用的凝胶，由0.5 mol/L CaCl_2 和0.5 mol/L Na_2HPO_4 溶液混合制备凝胶状沉淀物，用0.001 mol/L磷酸盐缓冲液悬浮，置于4°C 4~5天，使之充分沉淀后应用。



凝胶吸附法-氢氧化锌凝胶

- 是由7 mol/L氨水与0.1 mol/L醋酸锌溶液滴加混合(pH8.5)制备，在制备后数小时内较稳定。
- 方法：将水泡性口炎病毒悬液与氢氧化锌凝胶混合，使它们形成复合体后沉淀，然后用0.08mol/L EDTA(pH8.5)解离回收病毒。🔥



凝胶吸附法-焦磷酸镁凝胶

- 是由0.1 mol/L焦磷酸钠和0.1 mol/L MgCl_2 ，以2: 10(体积)比例在室温中缓慢滴加混合而获得的较稳定的焦磷酸镁凝胶。
- 将牛痘病毒悬液同此凝胶混合，使病毒吸附于凝胶，然后用0.1 mol/L盐水洗2次，最后用0.3 mol/L枸橼酸钠溶液解离病毒，将病毒较好地回收于水相中。

红细胞吸附法(熟悉)

- 用于某些与红细胞吸附的病毒的浓缩
- 选择适宜的动物红细胞：鸡红细胞
- 基本步骤：
 - 1) 1%-3%的红细胞与病毒悬液混合，2) 吸附1h以上；
 - 2) 1000 r/min 离心10分钟，沉淀吸附病毒的红细胞，弃上清，生理盐水洗涤2次；
 - 3) 用1/50原体积的磷酸缓冲液重悬红细胞沉淀，在37保温2-3h；
 - 4) 1000 r/min 离心10分钟，上清即是浓缩的病毒悬液。



葡聚糖柱层析法(熟悉)

- 葡聚糖凝胶是指由葡聚糖与其它交联剂交联而成的凝胶。
- 最常见的是Sephadex 系列，主要型号是G-10 ~ G-200，后面的数字是凝胶的吸水率(单位是 mL / g 干胶)乘以10。如Sephadex G-50，表示吸水率是5mL/g 干胶。



葡聚糖柱层析法(熟悉)

- **Sephadex** 的亲水性很好，在水中极易膨胀，不同型号的**Sephadex** 的吸水率不同，它们的孔穴大小和分离范围也不同。数字越大的，排阻极限越大，分离范围也越大。

G-25 分离范围 **1000-5000** 适用于脱盐、肽与其它小分子的分离；

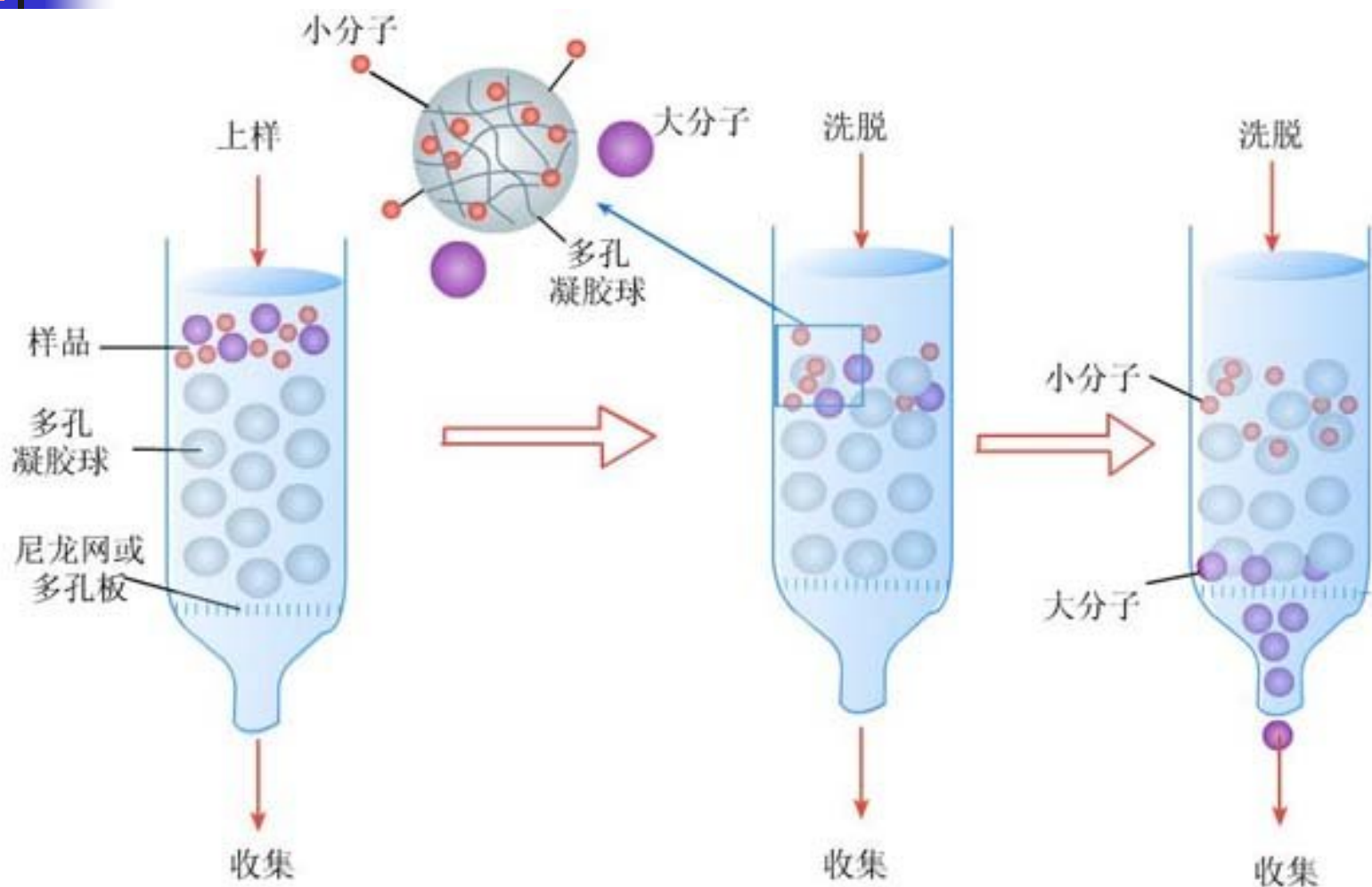
G-200 分离范围 **5000-600000** 适用于蛋白分离纯化、分子量测定、平衡常数测定。

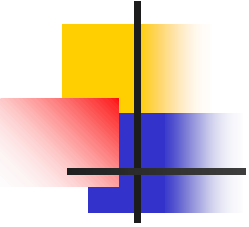


葡聚糖柱层析法

- 将初步浓缩的材料，通过葡聚糖G150或G200柱层析，然后用0.02~0.15 mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.6)洗脱，分部收集，测定280nm波长处的OD值，滴定各部分的效价，将含病毒的各部分相混合，再浓缩，透析之后，即可得到比较纯的病毒。
- Nagano(1989年)用Sephacryls-1000柱层析纯化了鸡传染性支气管炎病毒。

葡聚糖柱层析法







差速离心法(掌握)

- 原理：不同大小和比重的粒子有不同的沉降速度
- 适合分离沉降速度差别较大的粒子
- 适用于从组织培养液、鸡胚尿囊液或经过红细胞吸附-释放的病毒悬液中提纯病毒。
- 优点：能迅速处理大量样品，作为病毒提纯精制的第一步



差速离心法

- 常用方法(熟悉): 以低速(2000-3000 r/min)及中速(10000 r/min)离心20-30分钟去除较大的宿主细胞碎片、污染的细菌及其它较大的杂质, 再选择较高速度离心1-2h使病毒沉淀。



密度梯度离心

- 原理：将样品加在惰性密度梯度介质上进行超速离心，在一定的离心力下把样品颗粒分配到密度梯度介质中相等密度层中，吸出目的颗粒所在的介质层，从而达到分离纯化的目的。
- 常用的介质为氯化铯 CsCl、蔗糖



10%~40%蔗糖密度梯度制备

- 首先配置好不同百分比(w/v)的蔗糖溶液，然后在离心管中先加入浓度最小（10%）的溶液，然后用吸管加入浓度稍大的溶液，注意，加时吸管要插入离心管的底部，缓慢加入，务求界面分明。然后按上法依次分层加入其余各浓度的蔗糖溶液，即可配成蔗糖梯度液。
- 将事先用更低密度蔗糖溶液（小于10%）悬浮的样品轻轻加入10%蔗糖溶液的表面，进行密度梯度离心即可。

梯度混合仪





等密度梯度离心(掌握)

- 原理：与密度梯度法相同，但不制备梯度介质，而是在样品中加入**CsCl**，离心过程中**CsCl**随离心力而下沉，形成连续密度梯度，样品中颗粒随其密度大小而下沉或上浮到相等密度梯层中。
- 每毫升病毒悬液加**1g**的**CsCl**，混匀，**40000g**离心**24-36h**。

病毒蛋白的分离

SDS-PAGE

- PAGE: 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis

以聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质的一种常用电泳技术。



PAGE: 聚丙烯酰胺凝胶电泳

- 聚丙烯酰胺凝胶由单体丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺聚合而成，聚合过程由自由基催化完成。
- 催化聚合的常用方法：化学聚合法。化学聚合以过硫酸铵（APS）为催化剂，以四甲基乙二胺（TEMED）为加速剂。在聚合过程中，TEMED催化过硫酸铵产生自由基，后者引发丙烯酰胺单体聚合，同时甲叉双丙烯酰胺与丙烯酰胺链间产生甲叉键交联，从而形成三维网状结构。



连续与不连续PAGE

PAGE按照缓冲液的pH值和凝胶孔径的差异及有无浓缩效应分为连续系统和不连续系统两大类。

连续系统电泳体系中缓冲液pH值及凝胶浓度相同，带电颗粒在电场作用下，主要靠电荷和分子筛效应。



不连续PAGE

- 不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳是指使用不同孔径和不同缓冲系统的电泳，它由**浓缩胶**和**分离胶**两部分所组成。由于浓缩胶的堆积（浓缩）作用，可使样品在浓缩胶和分离胶的界面上先浓缩成一窄带，然后在一定浓度的凝胶上进行分离。
- 样品颗粒在电场中泳动不仅有电荷效应，分子筛效应，还具有浓缩效应，因而其分离条带清晰度及分辨率均较连续电泳系统佳。



SDS-PAGE

■ SDS：十二烷基磺酸钠

(重点) SDS是阴离子去垢剂，使蛋白质变性解聚，并与蛋白质结合成带强负电荷的复合物，掩盖了蛋白质之间原有电荷的差异，使各种蛋白质的电荷 / 质量比值都相同，因而在聚丙烯酰胺凝胶中电泳时迁移率主要取决于蛋白质分子大小。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/948135053027007002>