

轮状病毒生物学性状的研究

郭进林 吴惠联 韩文清 孟红 张凤竹

(山东省医学科学院基础医学研究所, 济南)

李德荣 黄祥瑞 黄志尚

(中国军事医学科学院五所, 北京)

提 要

对最常应用的3个轮状病毒(RV)标准株(人的Wa株, 牛的NCDV株, 猴的SA₁₁株)进行了形态学、培养特性及理化性质的比较观察与检测。它们在MA₁₀₄细胞上的培养特性基本相同, 在电镜下呈现RV特有的形态结构, RNA电泳图具有典型的电泳带分布模式4、2、3、2规律, 各项理化性质亦与文献报道一致。表明RV的细胞适应株的生物学性状有相当高的稳定性。

人与动物RV的若干细胞适应株已应用于RV感染的各种研究中^[1-3]。我们对其中最广泛应用的3个标准株进行了形态学、培养特性及理化性质的观察与检测, 以比较其生物学性状的差异, 并检查其经长期实验室传代后的稳定性。

材 料 与 方 法

一、病毒株: 人RV之Wa株, 与牛RV之NCDV株, 为中国医学科学院医学生物学研究所惠赠, 猴RV之SA₁₁株, 为中国预防医学中心卫生研究所惠赠。3株病毒均用MA₁₀₄细胞传代, 冻存于-50℃备用。

二、MA₁₀₄细胞(恒河猴胚肾传代细胞系): 引自上海第一医学院附属儿童医院病毒室。用含10%新生牛血清的Eagle MEM常规传代培养, 形成单层细胞时使用。

三、3株RV在MA₁₀₄细胞上的培养特性: 将病毒液用含胰蛋白酶(Difco)20μg/ml的MEM液于37℃下作用30分钟(或不作此处理), 接种于MA₁₀₄细胞, 维持液用1μg/ml胰蛋白酶的MEM液, 37℃静置培养, 分别于不同培养时间观察出现CPE情况。

四、形态学观察: 出现CPE的细胞培养物按常规^[4]制超薄切片, 电镜观察。将RV培养上清液进行常规滴膜负染, 或作免疫电镜观察^[5]。

五、病毒滴定: 按常规方法^[6]在16孔塑料培养板的MA₁₀₄单层细胞培养上滴定病毒的感染滴度(维持液为含1μg/ml胰蛋白酶的Eagle MEM)。

本文于1986年11月5日收到

六、对温度的敏感性试验: 在MA₁₀₄细胞培养传代的3株RV, 均于CPE³⁺时收获。于4℃下分别放置24、48、72小时, 室温(22℃)下8、16、24小时, 37℃下4、8、16小时, 56℃下10、60、90分钟。然后作10⁻¹~10⁻⁸稀释, 接种于16孔培养板的MA₁₀₄单层细胞, 接种量0.1ml/孔, 每孔中加入含1μg/ml胰蛋白酶的MEM维持液0.9ml。于5%CO₂温箱中37℃培养。

七、耐酸性试验: 将各株病毒于pH3.0、5.0、7.0、8.5、10.0的条件下作用1小时, 同上法接种16孔的MA₁₀₄细胞。

八、乙醚氯仿及胰蛋白酶灭活试验: 将各株病毒分别用20%乙醚, 5%氯仿, 于室温(22℃)作用1小时; 用0.25%胰蛋白酶于37℃作用2、4、8、16小时。同前法接种MA₁₀₄细胞。

九、过滤试验: 病毒悬液用加压法通过0.3μ与0.15μ微孔滤膜过滤, 滤液按常规传代法接种于MA₁₀₄细胞。

以上五—九项, 均于37℃培养观察CPE。

十、病毒RNA电泳分析: 按常规方法^[7]由病毒悬液中直接提取RNA, 用10%聚丙烯酰胺垂直板型凝胶电泳, 胶厚1.5mm, 电极缓冲液为Tris—甘氨酸缓冲液, 在28mA恒流条件下4℃电泳8小时, 电泳后用硝酸银染色, 进行RNA基因图型分析。

十一、病毒浮力密度测定: 病毒液经浓缩提纯后, 进行CsCl等密度离心(Beckman 80Ti角度转头, 50000r/m, 20℃, 24小时), 分部收集后, 测各管折射率, 据下式计算病毒粒子的浮力密度^[8]: 浮力密度₂₅₀ = 10.2402n_D²⁵⁰ - 12.6483。

结 果

一、在MA₁₀₄细胞上的培养特性: NCDV和SA₁₁于接种后培养至约8小时, Wa株约24小时, 开始出现CPE。先是细胞界面变得不清晰, 随后细胞变圆、聚集或发生融合, 感染细胞内颗粒增多, 折光性减弱, 接着细胞溶解。NCDV和SA₁₁达CPE⁴⁺时约需24小时, Wa约需2天。NCDV和SA₁₁在接种前用胰蛋白酶处理与否, 对CPE的出现时间无明显影响; Wa必须经胰蛋白酶处理后再接种细胞, 否则即使培养3天以上, 也不出现或仅有轻微CPE(图1)。

二、形态学观察: 电镜下观察感染细胞的超薄切片, 可见到存在于细胞浆中的病毒粒子具有RV特有的形态。不同发育阶段的病毒及其前体物质大量聚集在一起, 构成成团的毒浆(包涵体)。病毒培养上清液的负染标本, 可见到具双层或单层衣壳的实心或空心病毒颗粒, 内层衣壳围绕核心成放射状排列, 均呈现RV特有的形态结构。免疫电镜可见到明显的抗原抗体复合物凝集颗粒呈晶格排列, 颗粒之间以抗体桥连接。(图2)

三、病毒滴定: NCDV、SA₁₁和Wa株的滴度分别为8.5, 8.2和3.8。

四、对温度的敏感性: 它们对温度的敏感性略同。在4℃72小时; 室温(22℃)24小时, 37℃16小时, 56℃10分钟均可耐受。56℃30分钟以上始灭活。在同样温度时间下, Wa比NCDV和SA₁₁滴度降低得快。

五、耐酸试验: 能耐受pH3.0和pH10.0, 但在pH3.0时作用1小时, 滴度有明显降

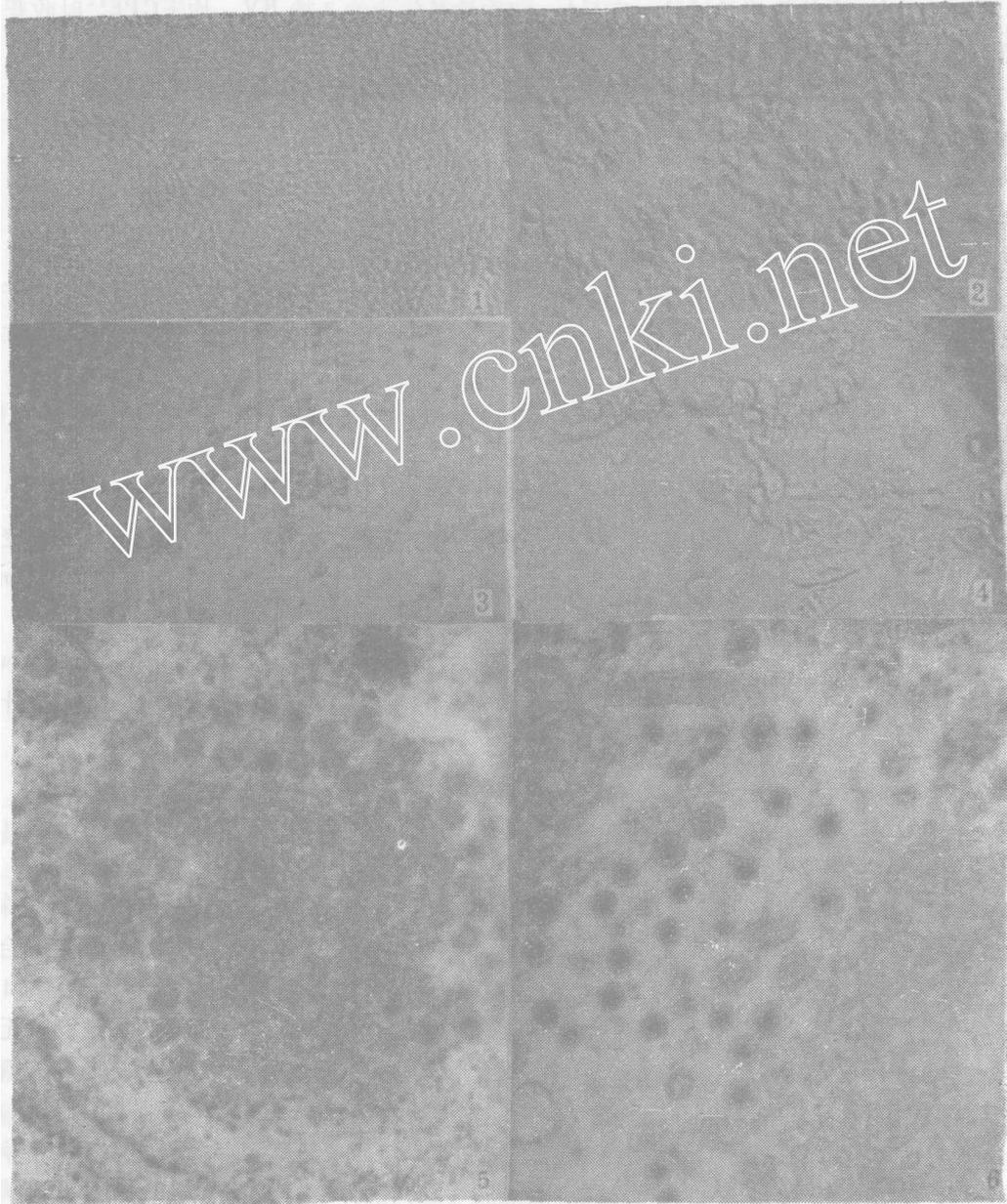
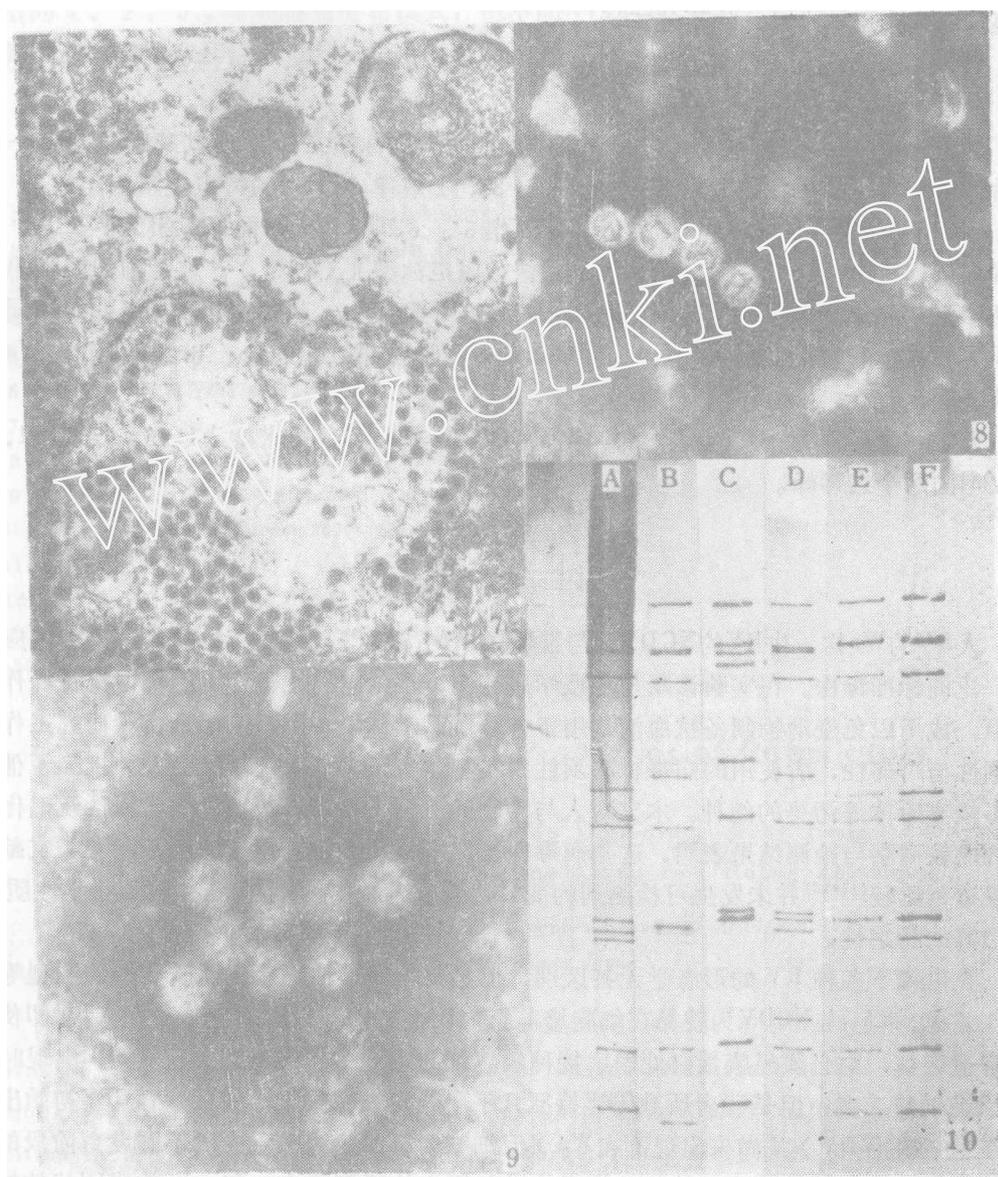


图 轮状病毒生物学性状的研究

Plate Studies of the biological properties of rotaviruses

1. 正常MA₁₀₄细胞; 2. 感染Wa株48小时的CPE; 3. 感染NCDV株24小时的CPE; 4. 感染SA₁₁株16小时的CPE; 5. 感染Wa株8小时(×50,000), 毒浆中可见细颗粒纤维丝及发育阶段不同的毒粒; 6. 感染NCDV 16小时(×60,000), 右下可见管状结构的毒浆。
1. Normal MA₁₀₄ Cells. 2. CPE of MA₁₀₄ Cells 48hrs after infection by Wa strain. 3. CPE of MA₁₀₄ Cells 24hrs after infection by NCDV. 4. CPE of MA₁₀₄ Cells 16hrs after infectign by SA₁₁ strain. 5. 8hrs after infection by Wa straiu. (×50,000), fine fibre and virus particles in different developmental stages were seen in viral plasma, 6. 16hrs after infection by NCDV strain (×60,000), the tubular structure of viral plasma was seen in the right lower quadrant,



7.感染 SA₁₁ 株 16 小时 (CPE³⁺) (×28,000); 8.培养上清液中的 Wa 株病毒粒子 (×100,000); 9 SA₁₁ 株培养上清的免疫电镜, 病毒粒之间可见抗体桥 (×100,000); 10. 轮状病毒 RNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图 (A. Wa 株, B. NCDV 株, C. SA₁₁ 株, D-F. 患儿粪便中的 HRV.).
7. 16hrs after infection by SA₁₁. (CPE³⁺) (×28,000). 8. Viral particles of Wa strain in the supernatant fluid (×100,000). 9. IEM image showing virions of SA₁₁ strain in the supernatant fluid, the antibody bridges were seen between two virus particles. 10. Polyacrylamide gel electrophoresis of rotavirus RNA. (A. Wa strain, B. NCDV strain, C. SA₁₁ strain, D-F. HRV in faeces of young children with diarrhea.)

低。

六、乙醚、氯仿与胰蛋白酶灭活试验: 用 20% 乙醚或 5% 氯仿作用 1 小时, 或 0.25

%胰蛋白酶作用16小时,均不能灭活。

七、滤过试验:3株RV均容易通过 0.3μ 与 0.15μ 滤膜,滤后感染滴度无明显降低。

八、病毒RNA电泳分析:3个RV标准株的核酸电泳结果如图。其基因组的11个核酸片段均有典型的电泳带分布模式4、2、3、2规律。Wa株的特点是基因组的第一组1、2间距较大,2、3相距较近,第二组5、6间距较大,而第三组之7、8、9相靠很近,第四组1011分开较远,泳动较快,属电泳型II(长型)。自我国胃肠炎患儿粪便中提取的流行株RV的核酸电泳图有长型、短型之分,其长型与Wa者基本相同。NCDV与SA₁₁虽也属长型,但其第一组的2、3、4及第二组的5、6之间距均与Wa的有所不同。

九、病毒的浮力密度测定:经CsCl等密度梯度离心,获得密度为 1.36mg/ml 和 1.38mg/ml 的两个病毒峰。

讨 论

人RV的Wa株,牛RV的NCDV株与猴RV的SA₁₁株,是在RV感染的各种研究中应用最广泛的标准毒株。在实验诊断与免疫学研究中,常用它们代替RV的地方流行株作为抗原,或用以免疫动物制备抗血清,用于各种血清学试验^[9,10]。为保证实验研究工作的准确性与可靠性,所使用的病毒株必须性状典型,有正常的生理活性,并为排除了他种病毒或支原体等污染的纯种。本文对人与动物的三种RV的形态学、培养特性及理化性质的比较观察与检测结果表明,这些病毒株虽然经长期实验室传代,病毒特性与文献初始报道相比较^[11,12]并未发生可检测到的变异,看来各种RV细胞适应株的生物学性质有相当高的稳定性。

在电镜下各种RV的形态学无甚区别,但是其培养特性、理化性质及核酸图型等都存在差异。SA₁₁与NCDV为较易在细胞培养上传代增殖的动物RV^[13,14],而人RV即使是细胞适应株,也必须经胰蛋白处理后接种敏感细胞才能生长繁殖,并且其CPE出现时间明显晚于前二者;但是三者所致CPE特征几乎无异。当感染8小时后,虽CPE初始出现(在SA₁₁和NCDV)或尚未出现(在Wa)但细胞中已产生为数不少的不同发育阶段的病毒粒子,它们与纤维状或颗粒状的病毒核酸与蛋白质聚集在一起,而构成团状的核周胞浆内包涵体。虽然Wa株的CPE出现得较晚,但在感染细胞后16小时,3株RV均已形成大量病毒粒子,在电镜下难以看出其数量上的差异。

RV对胰蛋白酶有较强的抵抗力^[11]。本实验中3株RV虽经0.25%胰蛋白酶在37℃下作用16小时,而病毒感染滴度未见明显下降。人RV的Wa株,在MA₁₀₄细胞上传代时,病毒必须预先用一定浓度的胰蛋白酶处理,否则难以成功地感染细胞;而作为动物RV的SA₁₁与NCDV则可直接接种细胞培养。胰蛋白酶对RV感染性的影响及其作用机理是一个需深入研究的问题。

对于核酸分子由每个片段组成的病毒,常通过核酸电泳进行分型。3个RV标准株及由患者粪便中提取的流行株,在其RNA的聚丙烯酰胺凝胶电泳图上,基因组片段呈现

典型的 4、2、3、2 电泳带分布模式, 但不同 RV 的每个核酸片段的泳速有所不同, 故其电泳图又各有特点。用此法鉴定病毒的种型简易快速而准确。

参 考 文 献

- [1] Sanekata T, 1982, *J clinic microbiol* 15(1): 148.
- [2] Hoshino Y, 1982, *Infect Immun* 41(1): 159.
- [3] 佐藤邦彦, 1981, ウイルス 31(2): 153.
- [4] 洪涛等, 1980, 《生物医学超微结构与电子显微技术》, 科学出版社.
- [5] 李德荣等, 1982, 中华微生物免疫学杂志, 2(5): 293.
- [6] 中国医科院流行病学研究所, 1978, 《常见病毒病实验技术》, P81, 科学出版社.
- [7] 方肇寅等, 1985, 中国医科学院学报, 7(2): 93.
- [8] K. 哈伯尔, 1976, 《病毒学基本技术》P37, 科学出版社.
- [9] Brade L et al, 1979, *Microbiol Immunol*, 167(955).
- [10] Waytt RG, 1980, *Science* 207(4427): 189.
- [11] Palmer EL et al, 1977, *J Gen Virol* 35: 403.
- [12] Estes MK et al, 1979, *J Gen Virol* 43: 403.
- [13] Urasawa T et al, 1981, *Microbiol immunol* 25(10): 1025.
- [14] Alteudurg I.C. 1980, *J Gen Virol* 43: 75.

Studies of the Biological Properties of Rotaviruses

Cuo Jin-lin Wu Hui-lian Han Wen-qing Meng Hong
Zhang Feng-zhu Li De-rong Huang Xiang-rei Huang Zhi-shang
(Institute of Basic Medical Sciences, Shandong Academy
of Medical Sciences, Jinan)

Some biological properties of three standard strains of rotavirus (Wa strains of human rotavirus, NCDV strain of bovine rotavirus and SA₁₁ strain of monkey rotavirus) were studied. It has been found that cultural characteristics in MA₁₀₄ cell are similar. The characteristic structures of these rotaviruses were revealed under electromicroscope, the RNA patterns had normal regularity of 4, 2, 3, 2 electrophoretic bands, and all of the physical and chemical properties were in accordance with those reported in other papers. These results demonstrate that the biological properties of the three standard strains are stable, and no detectable variation has been found.