

肾病综合征出血热病毒 (HFRSV) 的细胞内放射性标记

江紫生 陈章林 彭 民 易向民 戴志芳 刘红梅

(江西省医学科学研究所病毒生化研究室, 南昌)

刘佩芹 陈瑞琪 万秋华

(江西医学院微生物教研室, 南昌)

Radiolabeling of HFRSV in Infected Cells

Jiang Zi-sheng Chen Zhang-lin Pen Min Yi Xiang-min
Dai Zhi-fang Liu Hong-mei

(Department of Viral Biochemistry, Institute of Jiangxi Medical
Sciences, Nanchang,)

Liu Pei-qin Chen Rui-qi Wan Qiu-hua

(Department of Microbiology, Jiangxi Medical College,
Nanchang,)

Lee于1978年在南朝鲜分离到肾病综合征出血热病毒——Hantaan病毒后,我国病毒学者对HFRSV的分离、流行病学、血清学以及病毒形态学做了大量工作^[1-4]。近几年来国外用Hantaan病毒研究生化特征。研究病毒生化需要纯的病毒,针对HFRSV在细胞内复制周期较长,病毒产量低,我们用³H—氨基酸对HFRSV进行细胞内标记,初步探索感染对细胞蛋白质合成的影响、标记的适当条件和标记HFRSV在病毒蛋白研究上的应用,现将结果报告如下:

材料与方 法

病毒 Hantaan70—118, 陈株^[5], 接种乳鼠, 取鼠脑制成毒液, 经Vero E6细胞传1代, 收获的细胞冻解在维持液中作为种子毒液, 分别测定TCID₅₀为10⁻⁷和10⁻⁸。C94^[6]株, 一直在Vero E₆细胞传代, TCID₅₀为10⁻⁴, 种子毒液使用前均存放-70℃备用。

细胞培养和病毒感染 Vero E₆细胞的生长液成分含Eagle's MEM, 10%灭活小牛血清, 青霉素、链霉素、庆大霉素含量依次是100μ、100μg、20μ/ml, pH7.4~7.6, 维持液仅降低小牛血清为2%, 其余成分均与生长液相同。细胞培养瓶是38cm²(容量

本工作承安徽省医学科学研究所倪大石主任大力支持, 将此致谢。

100ml), 加生长液或维持液10ml, 细胞传代用0.25%胰蛋白酶(Difco 1:250)、0.02%EDTA消化。

病毒感染是挑选生长致密、形态完好的单层细胞, 倒掉生长液, 加入种子病毒液1ml, 37℃吸附30—60分钟后, 加足维持液至10ml, 每日或隔天更换新鲜维持液, 37℃继续培养。

病毒的放射性标记 感染病毒之单层细胞, 在感染后第6天, 用³H—氨基酸配制的标记维持液替换原来维持液。标记维持液成分:³H—Met、³H—Tyr、³H—Arg三种混合氨基酸(14.2μci/ml), 20% Eagle's MEM, 2%透析的小牛血清, 80%特别配制的Eagle's MEM(缺上述三种³H—氨基酸), 配制平衡标记维持液, 每瓶细胞加入7ml, 总放射性100μci。标记后次日日起, 逐日加入特别配制之5倍浓缩Eagle's液, 0.5—1ml/每瓶细胞, 直至标记到第5天为止(即感染后第11天)。收集标记维持液及刮下细胞, 前者3000r/m30分钟, 除去沉淀物; 刮下的细胞, 混悬适量PBS溶液中, 离心洗3次, -30℃反复冻融3次后, 超声波粉碎2分钟, 12000r/m离心15分钟, 收集上清液。维持液及细胞上清液, 分别作为细胞外内提取病毒材料。

免疫亲和层析提纯细胞内外的HFRSV 从肾病综合征出血热患者恢复期血清提取IgG与溴化氰活化的Sephrose 4B(Pharmacia)偶联(按产品说明书的方法进行), 装柱, 柱床15ml, 先以PBS—0.02%NaN₃平衡, 含有HFRSV的细胞和维持液样品, 分别在4℃以3ml/h流过亲和层析柱, 然后用PBS—0.1%NP—40 500ml通过柱洗掉未结合的蛋白质, 与IgG结合的病毒用0.1mol/L、pH11的碳酸盐缓冲液洗脱(流速5ml/h), 2ml/管收集洗脱液, 用4mol/LHCl中和至pH7.4, 用ELISA法测定病毒抗原滴度, 将阳性各管合并、浓缩, 置-30℃待用。

ELISA法检测病毒抗原滴度 用HFRSV病人恢复期血清提取之IgG, 作为包被抗体。辣根过氧化物酶标记兔抗HFRSV IgG, 按夹心法^[6]进行检测。用酶标光度计, 测定样品在490nm吸收值(OD), 判断标准以OD值大于正常对照的2倍以上为阳性, 并用倍比稀释度测定病毒抗原滴度。

放射性测量 用液体闪烁仪(FJ—2101型 二六二厂或Beckman), 测量样品放射性(cpm)。

结 语 与 讨 论

一、放射性标记的正常细胞和感染细胞的对比关系:

我们用相同的放射性标记条件, 对同一细胞株的正常细胞和HFRSV感染细胞进行标记。结果从表1表明, 正常细胞和感染细胞两组标记率为11:1, 由此可见病毒对细胞蛋白合成最终抑制90.1%, 可以理解HFRSV感染细胞后, 由于长周期的复制过程, 因此对细胞蛋白的合成抑制是逐步缓慢发展的。

二、感染细胞中病毒蛋白和细胞蛋白两者放射性标记比率:

用三株病毒, 经4次感染Vero E₆细胞, 进行相同条件的放射性标记试验, 就表2所示说明, 病毒和细胞两者放射性标记比例的平均值是近似1%。根据结果分析, 我们

表1 正常细胞和感染细胞放射性标记率的比较

Table 1 Comparison of radiolabeled rate between normal cells and infected cells

分组 Group	样品数 Sample number	加入放射性 Added radio-activity ($\mu\text{ci}/\text{PFC}$)	细胞内放射性 Cellular radio-activity ($\mu\text{ci}/\text{PFC}$)	标记率 Labeled rate (%)	抑制率 Rate of inhibition* (%)
正常细胞 normal cell	5	100	3.55	3.55	90.7
感染细胞 infected cell	8	100	0.33	0.33	

*细胞内蛋白质合成抑制率

Rate of inhibition of cellular protein synthesis

PFC=每瓶细胞

PFC=per flask cell

认为可能是HFRSV感染细胞早期抑制部分细胞或对细胞蛋白的合成不完全关闭, 所以细胞蛋白的放射性标记很高, 不同批次试验的病毒和感染细胞放射性标记之比有一定差异, 这与病毒力和细胞质量等因素有关。

表2 病毒与细胞两者放射性标记比例

Table 2 Proportion of radiolabeling for viruses and cells

试验次数 Test No.	病毒 V ^a (cpm $\times 10^4$)	感染细胞 IC ^b (cpm $\times 10^6$)	病毒/感染细胞 V/IC (%)	平均率 Average (%)
1	1.39	4.20	0.3	0.9
2	11.12	18.44	0.6	
3	34.37	15.22	2.2	
4	9.55	17.70	0.5	

a. 细胞内外病毒放射性

a. Radioactivity of intracellular and extracellular viruses

b. 感染细胞放射性

b. Radioactivity of infected cells

三、放射性标记的细胞内外病毒量的差别:

从表3表明, 细胞外放射性标记的病毒比细胞内高1—4倍以上, 并可观察到病毒总标记率(细胞内外相加之和)的增高, 主要是细胞外放射性标记病毒的增多, 也就是病毒在细胞内复制后释放量增多的结果。根据试验结果推论, 细胞感染初期仍可合成蛋白, 维持较长生命时间, 有利于HFRSV在细胞内长周期大量复制和释放, 故感染细胞的维持液作为提取病毒^[7,8]的主要来源, 是有其实用价值的。

四、病毒感染滴度在细胞内放射性标记中的重要性:

种子毒液TCID₅₀的对数值大, 则感染后的ELISA检测抗原滴度高和被标记病毒的放射性强, 反之便降低和减弱, 三者成正比关系(表4)。由此不仅证实感染滴度对HFRSV

表3 细胞内外放射性标记病毒的数量差别

Table 3 Quantitative difference for intracellular and extracellular virions

试验次数 Test No	细胞外* Extra (dpm × 10 ⁵ PFC)	细胞内φ Intra (dpm × 10 ⁵ PFC)	细胞外/细胞内 Extra/Intra
1	3.81	1.80	2.1 : 1
2	10.99	6.95	1.6 : 1
3	37.58	8.62	4.4 : 1
4	7.40	3.58	2.0 : 1

Extra=细胞外病毒
* Extra=extracellular virion
Intra=细胞内病毒
φ Intra=intracellular virion

量的增殖是个关键。且对细胞内放射性标记病毒，亦具有相同的重要性，当标记率较高时，标记病毒的比放射性可达 13.4×10^4 dpm/100抗原滴度（表5），可适用于病毒蛋白分析，对HFRSV的分子生物学研究提供有利条件。

表4 种子病毒的感染性和放射性标记病毒的关系

Table 4 The relationship between the infectivity titre of seed viruses and radiolabeling of virions

病毒株 Virus strain	种子病毒感染滴度 Infectivity titre of seed virus (log TCID ₅₀ /ml)	上清抗原滴度 Antigen titre of supernatant	病毒放射性 Radioactivity of virion (cpm × 10 ⁴ PFC)
C94	10 ⁻⁴	1 : 4	1.36
Chen	10 ⁻⁶	1 : 32	2.22
Hantaan	10 ⁻⁷	1 : 128	5.68

表5 标记病毒的比放射性

Table 5 Specific activity of labeled viruses

抗原滴度 Antigen titre	dpm/ml	(抗原滴度) dpm/100(Antigen titre)
128	15.4×10^4	12×10^4
256	22.9×10^4	8.9×10^4
128	17.1×10^4	13.4×10^4
64	6.5×10^4	10.2×10^4

参 考 文 献

- 〔1〕宋干等, 1982, 中国医学科学院学报, 4(2): 73
〔2〕严玉辰等, 1982, 中国医学科学院学报, 4(2): 67
〔3〕倪大石, 1983, 中华医学杂志, 63(2): 65.
〔4〕洪涛等, 1983, 中微生物学和免疫学杂志, 3(2): 63.
〔5〕刘佩芹等, 1984, 江西医学院学报, 24(3): 1.
〔6〕廖化新等, 1985, 中华传染病杂志, 3(2): 110.
〔7〕Luanne H.E. et al., 1984, *J. Gen. virol.* 65, 1285—1293.
〔8〕Connie S.S. et al., 1983, *J. Infect. Dis.* 148(2): 1005—1012

乙肝病毒 DNA 检测药盒在汉通过鉴定

The Appraisal of the Detecting Kit of Hepatitis B

Virus DNA has Passed

乙肝病毒 (HBV) 引起的乙型肝炎是人们普遍关注的传染病, 目前一般采用血清学方法进行临床检测。中国科学院武汉病毒研究所分子病毒室用 $\alpha^{32}\text{P}$ -d CTP 标记克隆化的 HBV DNA 片段作分子杂交探针, 制备检测药盒, 研究 HBV DNA 在人血清、体液和组织中存在的状态。以 HBV DNA 作为传染性的指标比血清学方法更为直接可靠。该药盒不需特殊试剂和设备, 能在一般科研、医疗、卫生和防疫等部门应用。两年来, 经湖北、湖南、江西、浙江、广东、河南和上海等省市三十多家医疗研究单位试用, 均取得满意的结果, 其敏感度和特异性较目前临床上应用的方法要高。

1987年12月28日, 由中国科学院武汉分院主持召开了“乙肝病毒 DNA 检测药盒鉴定会”。与会专家们在对药盒的研制及应用情况进行认真审议后一致认为: 乙肝病毒 DNA 检测药盒使用方便, 结果容易判断, 其敏感性和特异性高。该药盒的研制成功, 为乙肝的诊断、预防和疗效考核提供了有力的检测工具, 具有显著的社会效益和经济效益, 值得推广应用。

(丁清泉 柯丽华)