

## 轮状病毒 RNA 基因图谱变异分析

张 建 琼 孟 继 鸿 林 陵

R373.2

(南京铁道医学院微生物学教研室, 南京 210009)

## 提 要

用聚丙烯酰胺凝胶电泳法对轮状病毒 (RV) 标准株进行 RNA 基因图谱分析, 发现人轮状病毒 (HRV) Wa 株在 MA104 细胞上连续传 5 代后, 其 RNA 基因图谱由原来的 4:2:3:2 模式变为 4:3:3:2 模式。继续分别在 CV-1、MA104 细胞上传代后, 基因图谱进一步演变为 4:3:4:2 模式。经比较电泳、病毒空斑纯化, 初步证实 RVWa 有变异性存在, 目前尚未见 RV 标准株变异的报告, 有待进一步研究。同时对多个 RV 标准株及 1989 年南京市婴幼儿秋季腹泻的 RV 流行株进行基因图谱分析, 发现不同的人 RV 及牛 RV 标准株有不同的基因图谱; 不同实验室来源的同一标准株有不同的基因图谱。此外, 尚证实 HRV 是 1989 年南京市婴幼儿秋季腹泻的主要病源, 总检出率 45.1%, 电泳长型为流行优势株 89.2%。本文尚对 RV RNA 基因图谱变异的原因及意义进行了讨论。

**关键词:** 轮状病毒 聚丙烯酰胺凝胶电泳 基因图谱分析 变异分析

轮状病毒 (RV) 基因组由 11 个双股 RNA 片段组成, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 可将各片段分开而呈现 RV 特有的基因图谱。但其变异图型极多, 从临床标本检测的 RV, 可根据某些 RNA 片段泳动距离的不同分出相当多的差异电泳型, 也有少数的 RV 基因结构多于或少于 11 条核酸带。变异的原因引起各国学者的广泛关注和研究<sup>[1-6]</sup>, 但目前尚无突破性进展。本文对 RV 标准株及流行株 RNA 基因图谱的变异做了初步的探讨, 现报告如下:

## 材 料 与 方 法

- 一、RV 标准株: 从浙江、上海、北京、合肥等地引进轮状病毒标准株 Wa、Yo、Ito、Hochi、ST、SA-11 和 UK, 冻存于 -70℃ 备用。
- 二、粪便标本: 1989 年 10 月至 12 月, 从南京铁道医学院附院儿科, 收集急性腹泻门诊及住院患儿粪便标本 184 份, -70℃ 冻存。试验前冻融后用 PBS 制成 20% 悬液。
- 三、细胞: MA104 细胞 (江苏省农科院惠赠)、CV-1 细胞 (安徽省医学科学院惠赠)。均用含 10% 小牛血清的 Eagle MEM 常规传代培养, 形成单层后使用。

本文于 1991 年 3 月 11 日收到, 4 月 4 日修回。

**四、RV RNA 提取、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 及银染色:** 主要参考 Herring 和王思智<sup>[6]</sup>介绍的方法进行。取 RV 细胞培养物上清或 20% 粪样上清 100 $\mu$ l, 加 4% SDS-0.2mol/L 醋酸缓冲液 50 $\mu$ l 振荡混匀后再加 150 $\mu$ l 3:2 (V/V) 酚-氯仿混合液, 振荡、离心后取上清即病毒核酸。采用垂直板状聚丙烯酰胺凝胶不连续电泳, 分离胶为 10% (pH8.8), 浓缩胶为 3% (pH 6.8), 30mA 恒电流, 室温泳动 4 小时, 电泳后取下胶板用 5% 醋酸-10% 乙醇固定 10 分钟, 0.011mol/L 硝酸银染色 10 分钟, 0.75mol/L NaOH、0.1mol/L 甲醛液显色 10~20 分钟, 观察结果, 照相记录。

**五、RV 增殖:** 病毒以终浓度为 10 $\mu$ g/ml 胰蛋白酶 37 $^{\circ}$ C 处理 30 分钟后, 接种于 MA104 或 CV-1 以 Hank's 液洗过的单层细胞, 37 $^{\circ}$ C 吸附 30 分钟, 再加维持液 (含胰蛋白酶 1 $\mu$ g/ml) 旋转培养, 待 CPE 达 III~IV 时收获, 冻融 3 次, 低速离心后, 取上清液分装, -70 $^{\circ}$ C 保存。

**六、空斑纯化试验:** 参照文献<sup>[7]</sup>, 取 24 孔平底有盖组织培养板, 接种 MA104 细胞悬液 0.5ml/孔 (约  $3 \times 10^5$  细胞), 置 CO<sub>2</sub> 培养箱 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 小时, 长成单层后弃去液体, 以 Hank's 液洗涤细胞单层 2 次, 接种以 10 $\mu$ g/ml 胰蛋白酶处理后系列稀释的 RV 悬液 0.1ml/孔, 37 $^{\circ}$ C 吸附 30 分钟后吸尽接种液, 加入凝胶覆盖物 0.6ml/孔 (内含胰蛋白酶 3 $\mu$ g/孔), 37 $^{\circ}$ C 反置孵育 5 天后, 再加含中性红凝胶 0.25ml/孔, 继续孵育 1 天观察结果。在出现肉眼可见空斑之最高稀释度孔内挑取大小、形态不同的空斑, 分别置入含 0.45ml 培养液的青霉素瓶内, 冻融 3 次后, 在 CV-1 细胞上常规增殖。

## 结 果

**一、Wa 株在 MA104 细胞及 CV-1 细胞上多次传代后的 RNA 基因图谱** Wa 株在 MA104 细胞上常规传 5 代后做 PAGE, 发现其 RNA 基因有 12 个片段, 呈 4:3:3:2 排列 (简称 WaV12), 与原始 Wa 株比较, 第 5 条核酸带上方多一条核酸带, 但其余核酸带均相同。将 WaV12 继续分别在 MA104、CV-1 细胞上传代, 每代均做 PAGE, 各传至第 4 代及第 2 代时, 其 RNA 基因片段增至 13 条, 呈 4:3:4:2 模式 (简称 WaV13), 与 WaV12 比较, 不仅多出一条核酸带, 而且第一、三组基因片段的排列也不同, WaV13 第一组间距明显短于原始 Wa 及 WaV12。将 WaV13 在 CV-1、MA104 细胞上连续传 6 代, 其基因图谱保持不变。为了证实这种变异, 再将原始 Wa 株 (呈 4:2:3:2 模式) 在 MA104 细胞上常规传代, 每代均做 PAGE, 第 3 代 RNA 基因图谱即呈 WaV12 的 4:3:3:2 改变, 传至第 5 代时 RNA 基因图谱呈 WaV13 的 4:3:4:2 分布。而原始 Wa 株在 CV-1 细胞上传了 5 代, 基因图谱仍保持不变。为了排除污染, 将曾在本实验室增殖过的毒株 SA-11、UK 分别与原始 Wa 株做混合电泳 (1:1), 其电泳图型均与变异株不相同。且 MA104 和 CV-1 细胞的正常冻融液 PAGE 亦呈阴性。将变异株 (WaV13) 做空斑纯化试验, 获得 3 株 RNA 基因图谱不同的克隆株 (均呈 4:2:3:2 模式), 且该 3 株 RV 基因图谱与本实验室保存的所有 RV 标准株的基因图谱均不同; 该 3 株之间及该 3 株与原始 Wa 株的混合电泳图谱亦不同于变异株 WaV13, 见图 1。

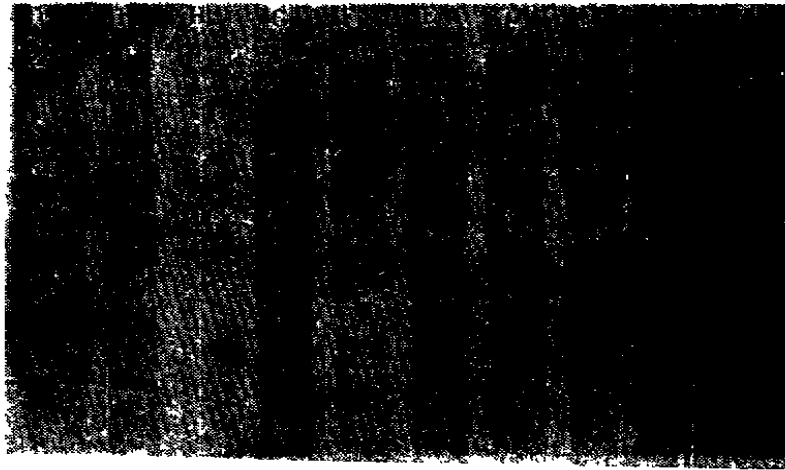


图1 轮状病毒Wa株RNA的PAGE分析

Fig.1 Analysis of RNA of Wa strain of human rotavirus by PAGE

A. Wa B. WaV12 C. WaV13 D. Wa+cloneA+cloneB+cloneC E. cloneA+CloneB+clone C F. cloneA G. clone B H. clone C I. Wa+UK J. Wa+SA-11

## 二、RV 标准株的 RNA 基因图谱

各标准株 RNA 基因图谱见图 2。Ito、Yo、Hochi 和 UK 四株基因图谱完全相同，混合电泳也无差异。但 Yo、Ito、Hochi 和 UK 的血清型不同，其中 Yo 和 Ito 均为第 3 血清型；Hochi 为第 4 血清型；UK 为第 6 血清型。

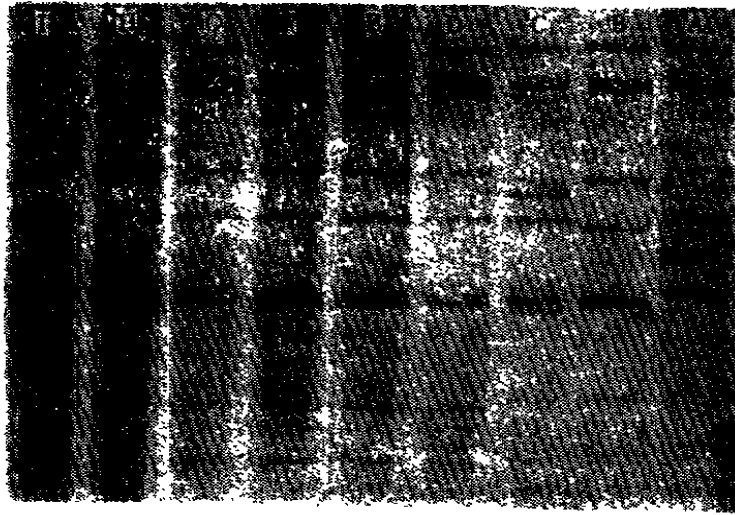


图2 轮状病毒标准株RNA的PAGE分析

Fig.2 Analysis of RNA of several standard strain of rotavirus by PAGE

A. Wa B. SA-11 C. ST D. Ito E. UK F. Yo G. Hochi H. UK+Yo I. Ito+Hochi

## 三、不同实验室来源的同一标准株 RNA 基因图谱

SA-11 分别引自北京和杭州，经 PAGE 电泳，其 RNA 基因图谱不同，混合电泳可见整组基因不同程度上移或下移，以第二、三组差异最为明显。Wa 株分别引自杭州和合肥，RNA 基因图谱亦不同，差异在第 4、5、8、9 基因片段，见图 3。

#### 四、RV流行株的RNA基因图谱

184例病儿粪便标本中,83例检出RV(45.1%),其中电泳长型74株(89.2%),电泳短型9株(10.8%)。将电泳图谱有明显差异的标本置于同一块凝胶板上进行比较电泳,电泳长型可分为2种不同的电泳型(La、Lb)其中La 40株,占54%。Lb 34株,占46%。电泳短型均相同,如图4。

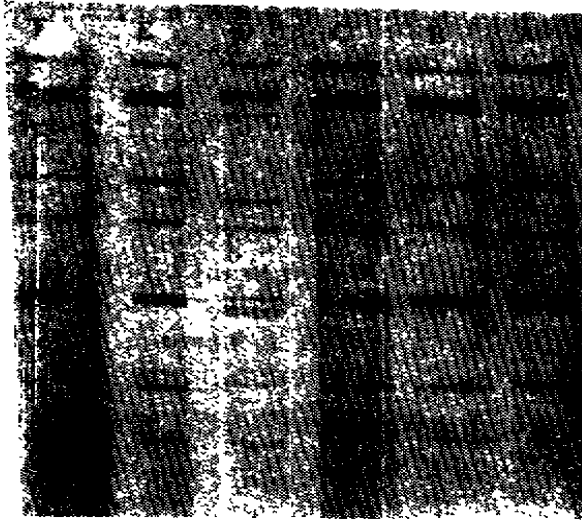


图 3 不同实验室来源的轮状病毒RNA基因图谱的比较

Fig.3 Comparison of the genomic RNA patterns of several standard strains of rotavirus obtained from different laboratories

A, SA-11 strain obtained from Hangzhou B, SA-11 strain obtained from Beijing C, A+B D, Wa strain obtained from Hangzhou E, Wa strain obtained from Hefei F, D+E

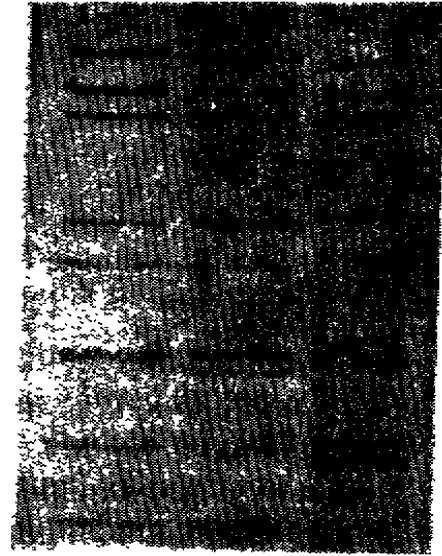


图 4 南京地区轮状病毒流行株的RNA基因图谱比较

Fig.4 Comparison of the genomic RNA patterns of epidemic strains of rotavirus isolated in Nanjing

## 讨 论

1. 有关RV流行株基因变异的报告较多,尚未见到HRV标准株基因变异的报告。本文报告的变异Wa株有演变规律,即由4:2:3:2(原始Wa)至4:3:3:2(WaV12)再至4:3:4:2(WaV13),且每出现一条新带,着色均由浅渐深,乃至与其它带一样深;而且除增加的基因片段外,同时伴有原基因片段的变异。空斑纯化试验又获得3株RNA基因图谱有明显差异的毒株,而且该3株克隆株之间及该3株与原始Wa株的混合电泳图谱与WaV12、WaV13不同,亦排除了细胞及本实验室传代毒株污染的可能。Clarke<sup>[8]</sup>证实基因核苷酸序列变化时,不一定都呈现电泳型改变,但基因电泳型的变化均有该基因核苷酸序列的明显改变。因此,我们认为RVWa有变异

株存在。3株克隆株可能是Wa株RNA片段按不同方式变异或重配所致;而WaV12及WaV13则是由于上述发生基因变异或重配的多种变异株混合的结果。但克隆株与原始Wa株的混合电泳图谱与WaV12、WaV13的不同,说明可能还有若干变异株尚未克隆到。此外,变异的演变过程说明宿主细胞因素对变异株的形成可能有一定影响。因此,有必要进一步探索变异的原因、影响因素以及是否伴有抗原性、毒力或其它生物学性状的变化。

2. RV标准株Ito、Yo、Hochi、UK RNA基因图谱完全相同。Beards等<sup>[6]</sup>证实不同血清型的RV流行毒株有同一RVA基因图谱。而我们发现不同血清型RV标准株Ito、Yo、Hochi、UK RNA基因图谱完全相同。此现象与Beards的结果类同。

3. 不同实验室来源的同一标准株, RNA基因图谱不同。说明同一毒株, 由于环境条件的改变, 如传代细胞的种类、代次, 毒株传代的感染复数、传代频率等, 可引起基因图谱的变异。根据Clarke的实验推测, 此现象亦有基因核苷酸序列的改变。

4. RV是1989年南京市婴幼儿秋季腹泻的主要病原, 总检出率为45.1%, 电泳长型为流行优势株(89.2%)。且仅见3种不同电泳型。RV流行株RNA基因图谱有高度变异性, 一次流行最多曾见到32种变异图型<sup>[3]</sup>。变异图型的多少与年份、季节、地区、年龄等因素有关。此外, 我们在实验过程中观察到, 即使电泳实验条件的微小差异, 亦可导致基因图谱的改变。因此, 在同一块凝胶板上进行电泳比较, 方能确定为差异电泳型。王永祥报告<sup>[10]</sup>, 同一份样品在同一块凝胶上电泳, 第7、8、9基因亦会出现微小的差异。所以, 我们认为第7、8、9基因的微小差异似乎不能作为确定不同电泳型的标准。

### 参 考 文 献

- [1] 陈锦生等, 1990, 中国人兽共患病杂志 6(1): 43。
- [2] Pelley S, et al., 1984, *J Gen Virol* 65: 1141.
- [3] Spencer EG, et al., 1983, *Infect Immun* 39: 569.
- [4] 王英才, 邵济钧, 1986, 病毒学报 2: 3。
- [5] Graham A, et al., 1987, *J Gen Virol* 68: 115.
- [6] 王思智等, 1985, 中华儿科杂志, 23(6): 343。
- [7] 孟继鸿等, 1989, 中国人兽共患病杂志 5(2): 9。
- [8] Clarke TN, et al., 1982, *Infect Immun* 36: 492.
- [9] Beards GM, et al., 1982, *Arch Virol* 74: 67.
- [10] 王永祥等, 1990, 中华流行病学杂志 6: 387。

## Analysis of the Variations of Genomic RNA Patterns of Rotavirus

Zhang Jian-qiong Meng Ji-Hong Lin Ling

(Department of Microbiology, Nanjing Railway Medical College, Nanjing, 210009)

Using PAGE method, we analysed genomic RNA patterns of several standard strains of rotavirus including Wa, Ito, Yo, Hoshi, ST, SA-11 and UK strains, and the epidemic strains of rotavirus which caused infant diarrhoea in Nanjing in October to December 1989. It was interesting that the electrophoretic model of Wa strain had changed from 4 : 2 : 3 : 2 to 4 : 3 : 3 : 2, and then to 4 : 3 : 4 : 2 after it was cultured on MA104 or CV-1 cells for several passages. Three variants were cloned by the plaque assay from the "Wa" strain with the electrophoretic model of 4 : 3 : 4 : 2. The genomic RNA patterns of these variants were different each other and different from that of Wa strain. It was suggested that the mutations and rearrangements of the genome of Wa strain may occur. The different standard strains of human rotavirus (Ito, Yo, Hoshi strain) and bovine rotavirus (UK strain) showed the same genomic RNA patterns, but the same standard strains (Wa, SA-11 strain) obtained from different laboratories expressed different genomic RNA patterns. Besides, we proved that the human rotavirus was the major pathogen of the infant diarrhoea in Nanjing in the winter in 1989. The positive rate was 45.1%. The long electropherotype of human rotavirus was the dominant epidemic strain (89.2%).

**Key words,** Rotavirus Variation PAGE Analysis of Genomic Patterns