

334-341

8429(15)

第7卷第3期
1992年9月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol.7 No.3
Sep.1992兔出血症病毒四个分离株的病毒
多肽和血清学关系研究朱文* 罗经[✓] 杨学楼

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

S 852.65

提 要

使用 PEG-DS 两相系统和超离心提纯的兔出血症病毒 (RHDV) 四个分离株病毒, 再经 Sepharose 4B 柱层析进一步提纯后, 得到较纯的病毒粒子, 回收率可达 70% 以上。应用常规双向免疫扩散试验, 交叉血凝抑制试验和酶联免疫吸附试验 (ELISA) 对四个不同地区分离株间的血清学关系进行了比较研究。结果表明实验中的四个分离株病毒均属同一血清型。SDS-PAGE 结果表明, 这四个分离株病毒均含有四条多肽, 分子量为 28-64KD。各株病毒多肽的分子量和各多肽在病毒粒子总蛋白中所占比例略有差异。因此四个分离株的 RHDV 在蛋白结构上可能存在地区差异。

关键词: 兔出血症病毒 血清学关系 病毒多肽

兔出血症病毒自1984年发现以来, 国内许多科学工作者针对本地区发生的兔出血症分离株进行了形态结构、理化性质方面的研究^[1-4]。罗经^[7]、黄文林^[8]、孙富林^[9]等曾对国内一些地区 RHDV 分离株之间的血清学关系进行了研究, 证明这些地区的分离株同属一血清型。对 RHDV 的结构多肽的研究报道为数不多, 且结果也各有差异^[10-12]。本文采用几种不同的血清学试验方法, 对我国四个地区分离株的 RHDV 病毒进行了血清学关系研究, 同时对四株病毒的蛋白多肽进行了分析。这将为今后生产亚单位疫苗和诊断药盒的研制提供理论依据, 为有效地防治该病的流行和 RHDV 的分子病毒学基础研究具有重要意义。

材 料 与 方 法

- 一、病毒 无锡 A₂R-3 株 (WS), 无锡兽医站提供。
山东 1-7-2 株 (SD), 从山东兔出血症病死兔肝中分离。
贵州株 (GZ) 从贵州兔出血症病死兔肝中分离。

本文于1991年8月19日收到, 12月20日修回。

此课题为国家自然科学基金资助项目之一。

* 现在成都四川大学生物工程系工作。

湖北滨湖株(BH)为本组在武汉分离。

以上各株病毒均在兔体内传代两次后使用。

二、病毒抗原的制备 四株RHDV均采用两相法和 Sepharose 4B 柱层析法提取和纯化。

病兔肝组织经匀浆,冻融,10000r/m 30'离心后,上清液加入6.5%(W/V)PEG和0.4%(W/V)硫酸葡聚糖(DS500000)溶解后4℃过夜,沉淀溶于0.1mol/L PBS(pH7.4)中,10000r/m离心30分钟。上清液再经40000r/m离心90分钟,和以25%蔗糖溶液垫底40000r/m离心90分钟,沉淀溶于0.02mol/L PBS中,再经 Sepharose 4B 柱层析进一步纯化,获得纯病毒粒子。

正常兔肝匀浆液经高速离心后,上清液用作正常对照。

三、病毒抗血清的制备 四株RHDV抗血清均采用相同方法制备。

按常规方法将纯病毒经甲醛灭活后,与福氏佐剂混合多点注射实验兔,每星期注射一次共五次。以静脉放血收集抗血清,加防腐剂后-20℃保存备用。取健康未经接种疫苗的兔血清作正常血清对照。

四、血清学试验

1. 免疫双扩散试验(ID):按文献[13]介绍的方法进行试验。

2. 对流免疫电泳试验(CIE):按文献[13]介绍的方法进行。

3. 交叉血凝抑制试验:用作试验的各毒株的抗血清在使用前先经56℃灭活。稀释液为含0.05%明胶和0.025%BSA的PB(pH7.2)缓冲液,抗原为8HAU。室温感作30—60',再加入1.0%人“O”型血球,室温中静置1—2小时后,观察结果。

4. ELISA试验:

用碳酸钠包被缓冲液(pH9.6)稀释各株抗原后,加入聚苯乙烯板,4℃过夜,加入1%BSA于37℃封闭1小时。加入用保温液1:100稀释的抗血清,37℃2小时后,加入酶结合物,室温中4—5小时后加入酶底物邻苯二胺,于暗盒内室温下置30分钟,加终止液后于GXM-201型酶联检测仪上于492nm测定OD值,凡检测血清P/N值超过1.5者均判定为阳性。

五、病毒蛋白的SDS-PAGE:取提纯的病毒液,加入等体积样品缓冲液(0.0625mol/L Tris-HCl pH6.7, 2%SDS, 5%ME, 10%甘油,0.001%溴酚兰)混合后于100℃煮沸3分钟于冰上骤冷。凝胶采用Laemmli不连续系统^[14],浓缩胶为4%,分离胶为10%,以90V电压电泳8小时然后用考马氏亮兰染色。

结 果

一、病毒粒子的形态特征:

四个分离株RHDV经PEG-DS两相系统浓缩, Sepharose 4B 柱层析提纯后,发现四株病毒均有3—4个洗脱峰,经血凝效价测定和紫外吸收测定后,确证第一峰为病毒粒子峰。提纯的病毒经紫外分光光度计测定获得典型的病毒粒子吸收曲线(图1)。病毒样品经电镜观察后,发现大量形态大小均一的病毒粒子(图2,3,4,5)。四株病毒的形态大小基本一致,直径为33—37nm无囊膜的廿面体对称粒子。同时也观察到中心充满磷钨酸染液的空心粒子。

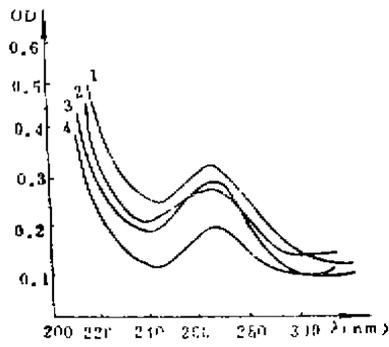


图 1. 病毒粒子紫外吸收曲线
Fig. 1. Ultraviolet absorption spectra of virions

- | | |
|-----------|-----------|
| 1. WS 株 | 2. BH 株 |
| WS strain | BH strain |
| 3. SD 株 | 4. GZ 株 |
| SD strain | GZ strain |

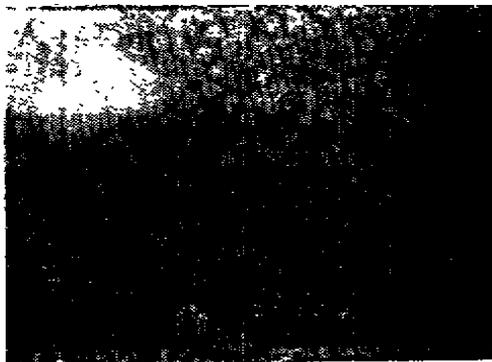


图 2. BH 株病毒粒子 (81000X)
Fig. 2 Virions of BH strain

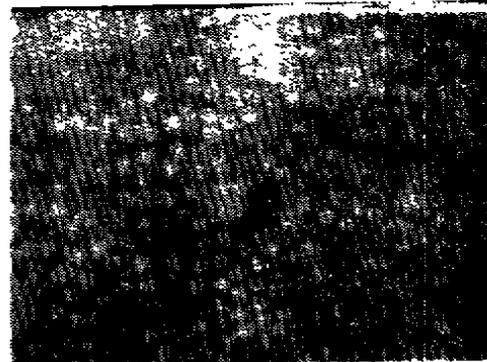


图 3. WS 株病毒粒子 (81000X)
Fig. 3 Virions of WS strain

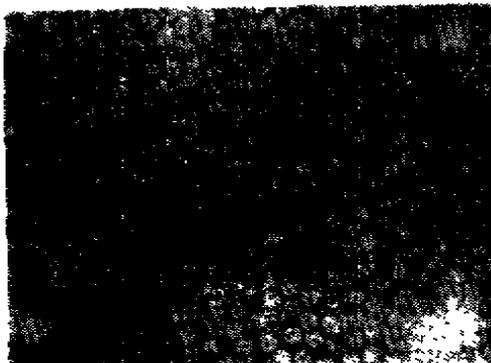


图 4. GZ 株病毒粒子 (81000X)
Fig. 4 Virions of GZ strain

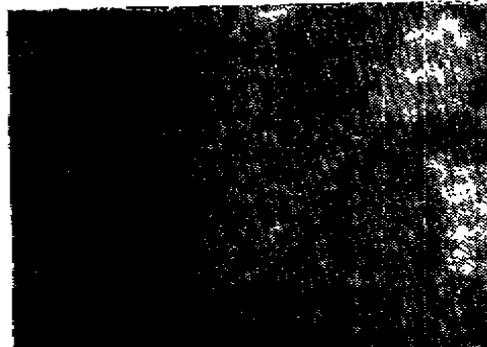


图 5. SD 株病毒粒子 (81000X)
Fig. 5 Virions of SD strain

二、四株病毒的血清学关系:

1. 琼脂糖免疫双扩散试验: 结果如图 6, 7。从图中可以看出四个分离株病毒抗原均能与 WS 株抗血清产生沉淀带, 同时也能与 SD 株抗血清产生沉淀带, 且无交叉沉淀现象。这说明四个分离株病毒有相同的抗原性, 属同一血清型。

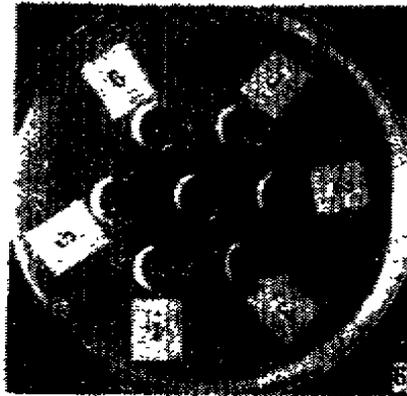


图6. RHDV WS 株抗血清免疫双扩散

Fig. 6 ID of antisera to WS strain of RHDV

中心孔: WS 株抗血清

Center: Antisera to WS strain

- 1. BH 株
- BH strain
- 2. WS 株
- WS strain
- 3. GZ 株
- GZ strain
- 4. SD 株
- SD strain

5. 正常兔肝组织液对照

Normal rabbit liver as a check

6. 正常兔血清对照

Normal rabbit serum as a check

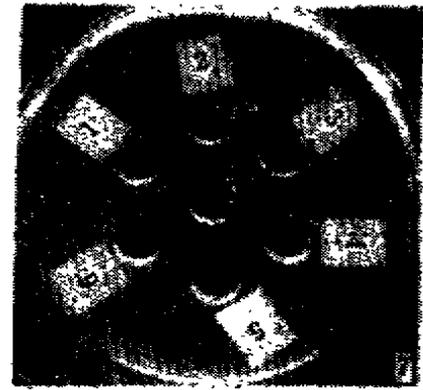


图7. RHDV SD 株抗血清免疫双扩散

Fig. 7 ID of antisera to SD strain of RHDV

中心孔: SD 株抗血清

Center: Antisera to SD strain

- 1. BH 株
- BH strain
- 2. WS 株
- WS strain
- 3. GZ 株
- GZ strain
- 4. SD 株
- SD strain

5. 正常兔肝组织液对照

Normal rabbit liver as a check

6. 正常兔血清对照

Normal rabbit serum as a check

2. 对流免疫电泳试验: 将四个分离株 RHDV 抗原作倍比稀释后, 分别与 1:2 稀释的 WS 株抗血清, SD 株抗血清作对流免疫电泳, 结果见表 1、2 所示。

表 1. WS 株抗血清与四个分离株 CIE 试验结果
Tab. 1. Results of CIE of four strains of RHDV with antisera of WS strain

| 抗血清 Antisera | 病毒抗原 Virus antigens | 抗原稀释度 Antigen dilutions | | | | | |
|--|------------------------|----------------------------|-----|-----|-----|------|------|
| | | 原液 | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 |
| WS 株抗血清 (1:2) Antisera to WS strain | BH | + | + | + | - | - | - |
| | WS | + | + | + | + | - | - |
| | GZ | + | + | + | - | - | - |
| | SD | + | + | + | - | - | - |

表 2. SD 株抗血清与 RHDV 四个分离株 CIE 结果
Tab. 2 Results of CIE of four strains of RHDV and antisera to SD strain

| 抗血清 Antisera | 病毒抗原 Virus antigens | 抗原稀释度 Antigen dilutions | | | | | |
|--|------------------------|----------------------------|-----|-----|-----|------|------|
| | | 原液 | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 |
| SD 株抗血清 (1:2) Antisera to SD strain | BH | + | + | + | - | - | - |
| | WS | + | + | + | - | - | - |
| | GZ | + | + | + | - | - | - |
| | SD | + | + | + | - | - | - |

从表1、2中可看出:WS株抗血清、SD株抗血清能分别与RHDV四个分离株抗原发生反应,各株抗原稀释度在1:4以下时结果均为阳性。由此可见,CIE与ID试验结果是一致的,说明这四个不同地区分离株病毒具有相同的抗原性,属同一血清型。

3. 交叉血凝抑制试验:结果见表3。

表3. 四株RHDV交叉血凝抑制试验结果

Tab. 3. Results of Cross-HI tests of four strains of RHDV

| 抗原 Antigens | 抗血清 Antisera | | | |
|----------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | BH株抗血清 Antisera to BH strain | WS株抗血清 Antisera to WS strain | GZ株抗血清 Antisera to GZ strain | SD株抗血清 Antisera to SD strain |
| | BH | 1:2560 | 1:5120 | ND |
| WS | 1:10240 | 1:10240 | 1:5120 | 1:20480 |
| GZ | ND | 1:1280 | 1:1280 | ND |
| SD | ND | 1:10240 | ND | 1:10240 |

根据表3所列HI值,按 r (抗原比) $=\sqrt{r_1 r_2}$ 公式^[18]计算WS株抗原与其它各株抗原之间的抗原比。结果 $r_{WS:r_{BH}}=1:0.7$; $r_{WS:r_{GZ}}=1:1.4$; $r_{WS:r_{SD}}=1:0.7$ 。

“ r ”值代表两个毒株之间的抗原差别, r 值等于1时,表示两毒株之间完全相同,是同一亚型病毒。 r 值在1.5:1—1:1.5时表示毒株间抗原无显著差别。从本实验结果看,WS株与BH株、GZ株、SD株之间的抗原比均在1.5:1~1:1.5之间,表明它们无显著差别,同属一血清型。

4. ELISA 试验:结果见表4、5。

表4. WS株抗血清与RHDV四个分离株的ELISA结果

Tab. 4. Results of ELISA of four strains of RHDV and antisera to WS strain

| 抗血清 Antisera | 病毒抗原 Virus | 抗原稀释度 Antigen dilutions | | | | | | | | |
|--------------------------|---------------|----------------------------|------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| | | antigens | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:400 | 1:800 | 1:1600 | 1:3200 | 1:6400 |
| WS株抗血清 (1:100) | BH | + | + | + | + | + | — | — | — | — |
| | WS | + | + | + | + | + | — | — | — | — |
| Antisera to WS strain | GZ | + | + | + | + | + | — | — | — | — |
| | SD | + | + | + | + | — | — | — | — | — |

表5. SD株抗血清与RHDV四个分离株的ELISA结果

Tab. 5. Results of ELISA of four strains of RHDV and antisera to SD strain

| 抗血清 Antisera | 病毒抗原 Virus | 抗原稀释度 Antigen dilutions | | | | | | | | |
|--------------------------|---------------|----------------------------|------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| | | antigens | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:400 | 1:800 | 1:1600 | 1:3200 | 1:6400 |
| SD株抗血清 (1:100) | BH | + | + | + | + | + | — | — | — | — |
| | WS | + | + | + | + | + | — | — | — | — |
| Antisera to SD strain | GZ | + | + | + | + | — | — | — | — | — |
| | SD | + | + | + | + | — | — | — | — | — |

从表中可以看出四株病毒抗原均分别能与 WS 株抗血清、SD 株抗血清呈阳性反应。WS 株抗原与 SD 株抗原的抗原比为 $r_{WS} : r_{SD} = \sqrt{r_{WS} r_{SD}} = 1 : 1.4$ ，比值在 $1/1.5 \sim 1.5/1$ 之间，表明两抗原之间无明显差异，属同一血清型。

三、四个分离株 RHDV 病毒多肽的比较：

1. 病毒多肽及分子量：采用不连续 SDS-PAGE 测得四株病毒均含有四条多肽（图 8）。按标准蛋白分子量对数-迁移率（Rf）的工作曲线，测得各株病毒粒子多肽的分子量（表 6）。

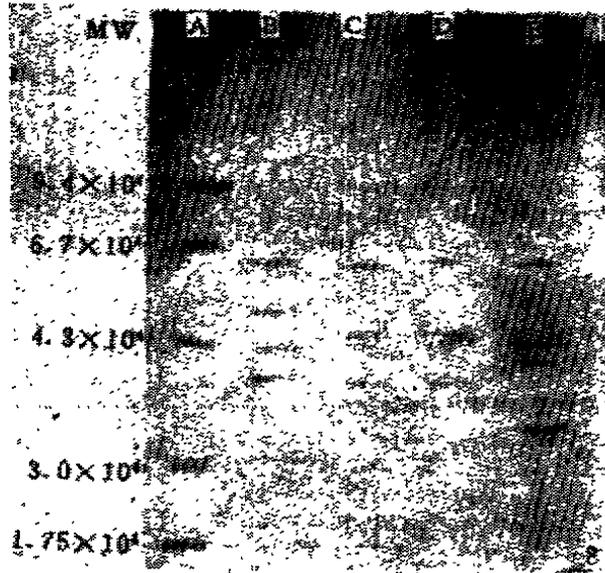


图 8 病毒多肽的 PAGE 图谱
Fig. 8 Viral polypeptide SDS-PAGE patterns

- A. 标准蛋白
Standard protein
- B. BH 株
BH strain
- C. WS 株
WS strain
- D. GZ 株
GZ strain
- E. SD 株
SD strain

表 6. 四株 RHDV 的病毒多肽
Tab. 6. Viral polypeptides of four strains of RHDV

| 病毒粒子 Virions | 病毒多肽(d) Viral polypeptides | | | |
|-----------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | VP ₁ | VP ₂ | VP ₃ | VP ₄ |
| BH | 64000 | 62000 | 43000 | 39000 |
| WS | 61000 | 46000 | 43000 | 36000 |
| GZ | 61000 | 46000 | 43000 | 36000 |
| SD | 64000 | 43000 | 40000 | 28000 |

从表 6 中可以看出四株毒病的 VP₁ 分子量大小相同，VP₃ 也基本一致。其中 WS 株与 GZ 株病毒的四条多肽 VP₁、VP₂、VP₃、VP₄ 的分子量完全相同，而 BH 株、SD 株病毒的 VP₂、VP₄ 的分子量与 WS 株、GZ 株的 VP₂、VP₄ 的分子量略有不同。这可能是分离地区不同引起的差异。

2. 病毒多肽在病毒粒子总蛋白中的比例：

SDS-PAGE 电泳后的凝胶，用 UV-300 紫外分光光度仪上在 560nm 进行扫描，凝胶扫描结果见图 9。用重量法求得各多肽在病毒粒子总蛋白中所占的比例（表 7）。

从表中可见四株病毒粒子均有四条多肽，但各多肽在病毒粒子总蛋白中所占比例有所不同。BH 株、WS 株中，VP₁ 所占比例最高，而 GZ 株、SD 株中 VP₂ 所占比例最高，因此推测 VP₁ 和 VP₂ 是病毒粒子的主要结构多肽。

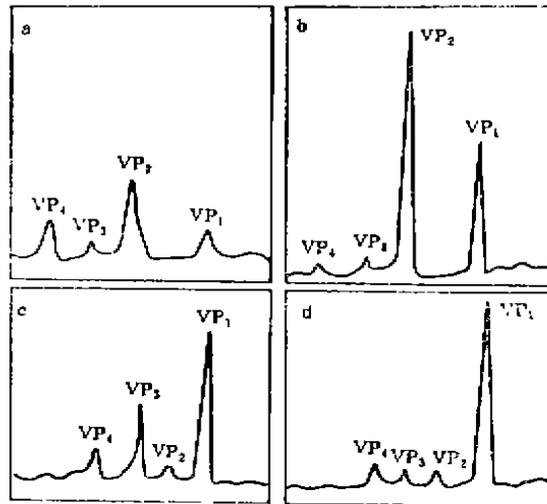


图 9 病毒多肽的扫描图谱

Fig. 9 Scanning patterns of viral polypeptides

扫描方向: 从右至左
 Scanning direction: from right to left
 波长: 560nm
 wavelength: 560nm
 a. SD 株 SD strain
 b. GZ 株 GZ strain
 c. WS 株 WS strain
 d. BH 株 BH strain

表 7. 病毒多肽在病毒粒子总蛋白中的比例 (%)

Tab. 7. Proportion of viral polypeptides in total viral proteins

| 病毒粒子 virions | 病毒多肽 viral polypeptides | | | |
|-----------------|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | VP ₁ | VP ₂ | VP ₂ | VP ₁ |
| BH | 81.9 | 5.5 | 2.4 | 10.2 |
| WS | 58.2 | 7.7 | 23.8 | 10.3 |
| GZ | 32.4 | 59.4 | 6.5 | 7.7 |
| SD | 15.5 | 51.8 | 7.2 | 26.5 |

讨 论

本文首次对 RHDV 几个地区分离株的病毒多肽进行了比较研究, 结果表明它们均具有四条多肽, 四条多肽的分子量大小与王汉中⁽¹¹⁾、张全顺⁽¹²⁾等的报道略有差异。这可能与病毒的纯化方法及所用凝胶系统不同有关。这四株病毒均具有分子量大小相同的 VP₁。其中 WS 株、GZ 株的 VP₂、VP₁ 分子量略有差异。但采用几种血清学方法检测证明它们属同一血清型, 具有相同的抗原性, 由此推测 VP₁ 是主要决定病毒抗原性的。4 条多肽中究竟哪几条是主要决定病毒抗原性的, 正在进行研究中。

另外, 从 SDS-PAGE 凝胶扫描结果看, 四株病毒的多肽在整个病毒粒子总蛋白中所占比例各不相同。因此尽管这四株病毒同属一个血清型, 它们在蛋白结构上有一定的差异, 这可能是 RHDV 各地区分离株在结构多肽上存在地区差异。因此今后在制备亚单位疫苗和生产诊断药盒时应给予注意。

参 考 文 献

- 〔1〕 刘胜江等, 1984, 畜牧与兽医, 16(6): 253—254。
- 〔2〕 邓瑞堂等, 1987, 南京农业大学学报, 10(2): 110—114。
- 〔3〕 徐 新等, 1988, 南京农业大学学报, 11(3): 90—94。
- 〔4〕 周 炯等, 1986, 病毒学报, 2(3): 269。
- 〔5〕 杜念兴等, 1986, 病毒学报, 2(6): 146—151。
- 〔6〕 杨学楼等, 1999, 病毒学杂志, 4(2): 188—192。
- 〔7〕 罗 经等, 1989, 中国畜禽传染病, (5): 53—54。
- 〔8〕 黄文林等, 1989, 病毒学杂志, 4(1): 90—96。
- 〔9〕 孙富林等, 1988, 微生物学报, 28(2)~183。
- 〔10〕 邓瑞堂等, 1986, 全国生化会议论文摘要, p. 56。
- 〔11〕 王汉中等, 1986, 青年科技工作者学术讨论会论文摘要, p. 136。
- 〔12〕 张全顺等, 1991, 第二届全国病毒学学术会议论文集, p. 181。
- 〔13〕 张龙翔等, 1981, 生化实验方法和技术, 高教出版社, p. 311, p. 315。
- 〔14〕 Laemmli U. K., 1970, *Nature (London)* 227: 680。
- 〔15〕 殷震等主编, 1985, 动物病毒学, 科学出版社, p. 655。

Studies on the Viral Polypeptides and Serological Relationships of Four Strains of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV)

Zhu Wen Luo Jing Yang Xue-lou

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

In this paper four different strains of RHDV were purified by two phases of polyethylene glycol-dextran sodium sulfate and centrifugation, then virions in highly pure form were obtained by using Sepharose 4B chromatography. The recovery rate of virus preparation was about 70 percent. Serological relationships of four different strains of RHDV were studied by using immunodouble diffusion, cross hemagglutination inhibition and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that serotypes are the same among four different strains of RHDV. The viral proteins of four strains of virus were analysed by SDS-PAGE. The results indicated that the four strains of virus all have four polypeptides. Their molecular weight rang from 28KD to 64KD. But the molecular weight of polypeptides of four strains and the composition ratio of each polypeptide in total viral proteins are different. The results suggested that the district difference probably exist in structural proteins of four strains of virus.

Key words, Rabbit haemorrhagic disease virus Serological relationship Viral polypeptide