

兔出血症病毒体外复制的研究*

罗 经 杨学楼[✓] 刘 虹
严银钊 王汉中 孙松柏

S852.65

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉430071)

提 要

在几种动物细胞上, 采用同步感染的方法研究了兔出血症病毒(RHDV)的复制特性。病毒感染细胞后(PI)48—72小时可观察到明显的细胞病变, 血凝效价可增高5—10倍。病毒对细胞传代数不同, 敏感性也不同。在兔肾(RK)和兔肺(RL)细胞上以4—8代最为敏感。采用免疫荧光染色法, 经病毒感染48—72小时的细胞中可观察到特异性荧光。细胞增殖的病毒经PEG-DS浓缩, Sepharose 4B柱层析提纯后, 在电镜下可观察到完整的病毒粒子, 将此病毒回接健康实验兔可致100%死亡。免疫双扩散和免疫电泳试验表明, 细胞增殖的病毒抗原与来自病兔肝的RHDV抗血清之间产生明显的沉淀带。SDS-PAGE分析病毒获得四条多肽, 其分子量大小与病兔肝组织提取的病毒蛋白多肽分子量相比略有差异。

关键词: 兔出血症病毒 体外复制 血凝效价 病毒多肽

复制;

兔出血症病毒发现至今, 我们曾经证明它属细小病毒属(Parvovirus group)成员。对此病毒的生物学和理化特性的研究已发表文章多篇^[1-6]。对其在细胞上培养的研究仅有少数报道^[7], 但在国内外尚未见复制成功。本文研究了兔出血症病毒在几种动物细胞上的复制, 现将结果报道如下。

材 料 和 方 法

1. 病毒: RHDV-MO分离株, 为本实验室在武汉分离。
2. 细胞: 兔肾(RK)、兔肺(RL)为初生1~8天兔按常规冷消化制备成细胞悬液。
3. 培养基: 90% MEM(日本Nissui产品), 10%小牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所提供), 1%谷氨酰胺(3%溶液)。维持液为97% MEM, 2%小牛血清, 1%谷氨酰胺。传代细胞消化液采用Versene液消化。
4. 病毒的培养: 生长成单层的细胞用Hank's液洗一次后, 加入Versene消化液, 待细胞层出

本文于1991年8月28日收到, 12月20日修回。

* 本课题为国家自然科学基金资助项目

现细微裂缝时, 吸出消化液, 加入经过滤除菌的病毒液(一般接种1/10量), 室温下吸附30~60分钟, 将细胞层吸打均匀后, 加入生长培养基, 37℃孵育, 待细胞出现病变后, 细胞置-20℃冰箱冻融。

5. 病毒的浓缩与提纯:

细胞经三次冻融后, 以2000r/m离心除去细胞碎片, 上清液测HA效价后加入8%PEG和0.4%DS搅拌至溶解, 置冰箱过夜, 第二日以4000r/m离心30分钟, 沉淀加入3~5ml 20mmol/L Tris-HCl (pH7.5)-1mmol/L EDTA液溶解沉淀, 再用3mol/L KCl 0.15ml/ml冰箱作用2hr, 以除去DS, 水相溶液以Sephrose-4B柱(柱体积为2.5×42cm)层析, 收集洗脱峰。各峰测HA效价, 将含病毒粒子峰的溶液置-20℃保存备用。

6. 细胞增殖病毒的检测:

(1) 病毒回接试验:

取健康大耳白兔(重2Kg), 耳静脉采血检测基础血凝抑制效价, 阴性者备用。将兔分成三组, 一组肌肉注射兔肝组织提纯的病毒, 一组注射细胞培养的病毒液, 另一组作对照, 注射后24~72小时之间观察各组兔反应情况, 死亡兔立即解剖后取肺、肝脏器保存备用, 并测定其血凝效价。

(2) 免疫荧光染色:

按文献(8)介绍方法进行染色。以本实验室制备的RHDV-MO株抗血清(1:2560HI)经灭活后作第一抗体。酶标羊抗兔IgG(上海生物制品所产品)1:34稀释后作第二抗体使用。使用Leitz荧光显微镜观察。

(3) 病毒的免疫双扩散与对流免疫电泳:

按文献(9)方法进行。采用0.075mol/L 巴比妥钠缓冲液和0.8%琼脂糖。

(4) 病毒蛋白的PAGE-SDS分析:

按文献(10)介绍方法进行, 分离胶为10%, 浓缩胶为3%。

结 果

一、病毒的复制

用病兔肝组织分离制备的病毒悬浮液, 感染细胞后36~48小时开始出现细胞病变。病变开始时细胞变圆, 单层细胞层出现空洞, 随后细胞层拉成网状, 感染72小时后绝大部分细胞脱落(图1)。用血凝法检测细胞培养液, 血凝效价有很大增高。细胞培养液经冻融三次后离心除去细胞碎片, 上清液HA效价可提高5—10倍。

二、病毒的感染试验

病毒在RK、RL细胞上均能产生细胞病变, 但在Wish细胞上不产生明显病变。病毒对RK、RL细胞的不同代数敏感性不同, 一般以第4~8代最敏感, 细胞传至第14代后对病毒感染则不表现明显病变, 病毒产量也相对降低(见表1)。

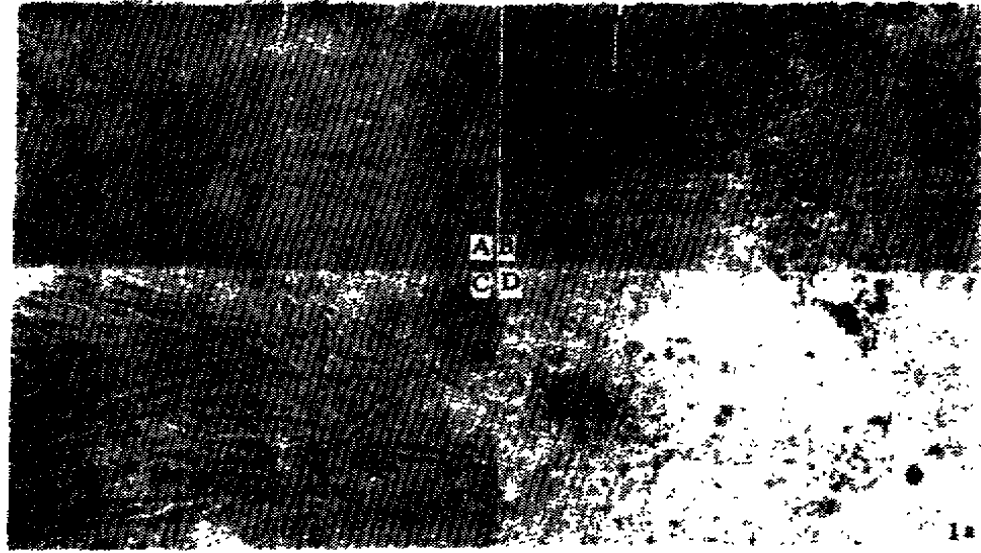


图 1 a. RHDV 感染后的细胞形态
 Fig. 1 a. The RL cell morphology after RHDV infection
 A. 正常 RL 细胞 (48 小时)
 Normal RL cell cultures (48 hrs)
 B. RHDV 感染后 48 小时的 RL 细胞
 RL cell cultures 48 hrs after RHDV infection
 C. RHDV 感染后 72 小时的 RL 细胞
 RL cell cultures 72 hrs after RHDV infection
 D. RHDV 感染后 96 小时的 RL 细胞
 RL cell cultures 96 hrs after RHDV infection

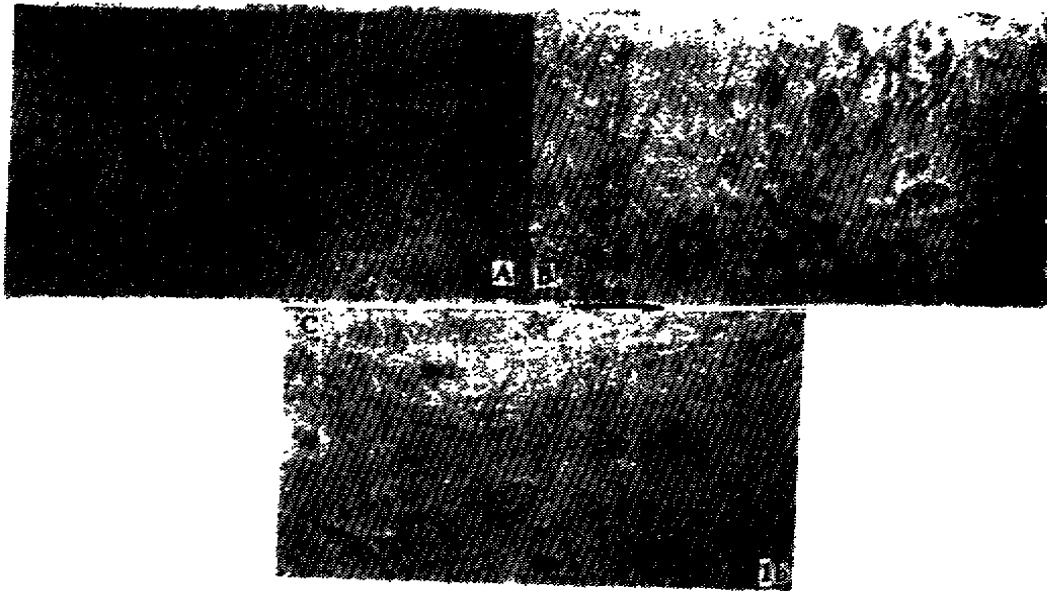


图 1 b. RHDV 感染 RK 细胞后的形态
 Fig. 1 b. The RK cells morphology after RHDV infection
 A. 正常 RK 细胞 (48 小时)
 Normal RK cell cultures (48 hr)
 B. RHDV 感染后 48 小时 RK 细胞
 RK cell cultures 48 hrs after RHDV infection
 C. RHDV 感染后 72 小时 RK 细胞
 RK cell cultures 72 hrs after RHDV infection

表 1. 不同RK细胞代数与病毒产量的关系

Table 1. Relationship between different generation of passages cell and amount of viral production after RHDV infection

感染量 (HAU/ml) Amount of infection (HAU/ml)	RK 细胞 (代 数) Generation of RK cells	病毒产量 (HAU/ml) Amount of viral pro- duction (HAU/ml)	测定时间 (小 时) Time of detection (hrs)
10×2^1	1	10×2^4	72
10×2^5	4	10×2^6	72
10×2^6	8	10×2^7	72
10×2^8	13	10×2^8	72
10×2^8	15	10×2^8	72

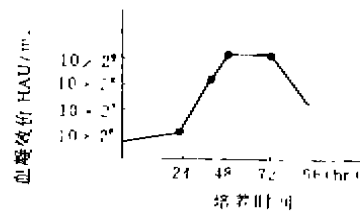


图 2. 病毒感染细胞后不同时间血凝效价水平
Fig 2. The HA titer level in different time
after RHDV infection

从表 1 可以看出不同细胞代数对病毒感染与产量有一定关系, 以第 4~8 代细胞最为敏感。病毒感染细胞后培养不同时间检测血凝效价水平, 结果见图 2。从图 2 可以看出病毒感染 36~48 小时病毒效价呈上升趋势, 48~72 小时达最高峰, 72 小时以后病毒效价开始下降。

在同一条件下用不同血凝效价的病毒感染细胞, 48 小时后检测培养液中的血凝

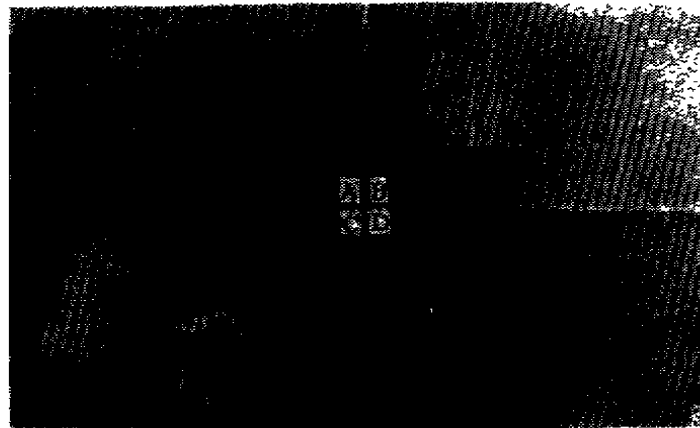


图 3. RHDV 感染后 RK 细胞中的特异性荧光
Fig.3 Special fluorescence in RK cells after RHDV infection
A. 正常 RK 细胞 (48 小时)
A. Normal RK cells (48hrs)
B. RHDV 感染后 RK 细胞 (18 小时)
B. RK cell cultures 18hrs after RHDV infection
C. RHDV 感染后 RK 细胞 (48 小时)
C. RK cell cultures 48hrs after RHDV infection
D. RHDV 感染后 RK 细胞 (72 小时)
D. RK cell cultures 72hrs after RHDV infection

效价,结果其产量有明显差异,见表2。

表2. 感染量与病毒产量的关系

Table 2. The relationship between amount of virus infection and amount of virus production

病毒感染量 (HAU/ml)	RK细胞数 (10^4 /ml)	病毒产量 (HAU/ml)	测定时间 (小时)
Amount of virus infection(HAU/ml)	Number of RK cells(10^4 /ml)	Amount of virus production (HAU/ml)	Time of detection (hrs)
10×2^4	60	10×2^8	48
10×2^5	60	10×2^7	48
10×2^6	60	10×2^7	48

三、细胞培养病毒的回接试验

三组试验兔每组两只,经感染病毒72小时后,除对照组兔无死亡外,其余均先后死亡,结果见表3。

表3 RHDV回接试验

Table 3. Artificial infective test of RHDV

编号 Number	接种病毒材料 Origination of infective virus	接种量 (HAU/ml)	死亡时间(小时) Time of death (hrs)	胸腔血效价 (HAU/ml)
		Amount of infection(HAU/ml)		HA titer of blood in chest(HAU/ml)
1	兔肝组织病毒 virus of liver	10×2^{10}	36	$10 \times 2^8 \pm$
2	细胞培养的病毒 virus of cell cultures	10×2^8	42	$10 \times 2^{10} \pm$
3	兔肝组织病毒 virus of liver	10×2^{12}	36	$10 \times 2^8 \pm$
4	细胞培养的病毒 virus of cell cultures	10×2^9	54	10×2^{10}
5	生理盐水 0.85% NaCl	2ml	—	0
6	生理盐水 0.85% NaCl	2ml	—	0

四、免疫荧光染色观察

病毒感染细胞后,4小时未观察到荧光,8小时后可见细胞核出现弱的荧光颗粒,16小时后核内荧光加强,并向胞浆扩散,24小时可见胞浆中散在性荧光,48小时整个细胞充满特异性荧光,见图3,证实细胞中有大量病毒存在。正常细胞对照,48小时后仍无荧光出现。



图4. RK细胞培养物病毒的形态
Fig.4 The viral morphology of cell
cultures of RK. 81000X

其分子量为 65kd、52kd、43kd 和 36kd, 相比之下, 除第一条多肽略有差异外, 其余三条多肽大小均相同 (见图 6)。



图5. 细胞培养病毒的免疫双扩散
Fig.5. CIE of cell culture viruses

五、病毒的纯化及其抗原性

病毒经纯化后在电镜下可观察到完整均一的病毒粒子, 其大小为 31~34nm (见图 4), 同时还可看到部分未成熟病毒粒子存在, 其形态大小与病兔肝提取的病毒粒子基本一致。

采用 CIE 和 ID 试验可见纯病毒粒子与 RHDV 抗血清之间产生明显沉淀带 (见图 5)。

六、病毒蛋白的 SDS-PAGE 分析

病兔肝组织提取的病毒粒子蛋白多肽的分子量约为 64kd、52kd、43kd 和 36kd 四条多肽。组织培养增殖的病毒粒子含有四条多肽,

孔1. RK细胞培养物病毒

Well 1. Viruses of RK cell cultures

孔2. RL细胞培养物病毒

Well 2. Viruses of RL cell cultures

孔3. 兔肝组织病毒

Well 3. Viruses of rabbit liver tissue

孔4. BHK细胞培养物病毒

Well 4. Viruses of BHK cell cultures

孔5. 正常兔血清

Well 5. Normal rabbit sera

孔6. 组织培养液

Well 6. Tissue culture fluid

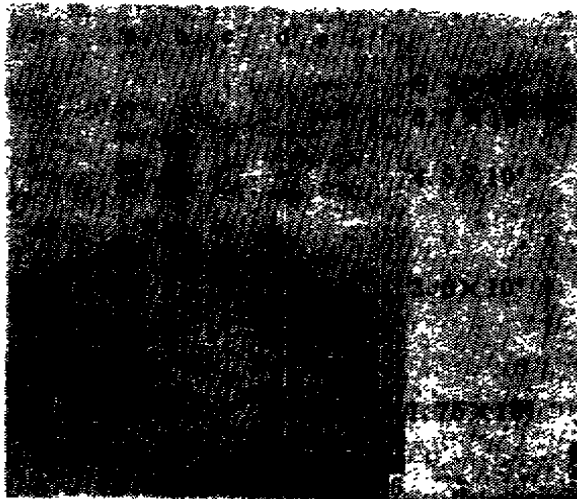


图6. 病毒蛋白多肽的 SDS-PAGE
Fig.6 SDS-PAGE of polypeptides

a、b道: 兔肝组织病毒的多肽

Lane a, b.: Polypeptides of liver
tissue viruses

c、d道: 细胞培养病毒粒子的多肽

Lane c, d.: Polypeptides of viruses
particle of cell culture

e道: 标准蛋白

Lane e.: Proteins mark

讨 论

细小病毒的体外培养要求具有旺盛增殖能力, 并处于有丝分裂过程中的细胞内增殖。因此, 我们研究了 RHDV 体外复制时病毒感染及复制的条件。其中包括: (1) 细胞与病毒的接种方式; (2) 病毒对细胞敏感性的选择; (3) 病毒对不同种类动物细胞的敏感性; (4) RHDV 不同地区分离株对细胞的敏感性和稳定性; (5) 病毒接种量与产量的关系等。经过多次重复试验, 我们使用同步感染的方式, 使病毒获得复制的条件。同时发现不同地区分离的 RHDV 对细胞的敏感性不同, 其中以 RHDV-MO 株为最敏感和最稳定。此毒种在传代细胞中已传至第五代, 血凝效价尚稳定, 现仍在试验中。在细胞中增殖的病毒, 经过多种技术方法检测确证为 RHDV 病毒粒子, 因此我们认为 RHDV 的体外培养可能与病毒的毒株及培养条件有关。朱文等^[11]曾报道 RHDV 四个不同地区分离株其血清型虽然相同, 但它们的病毒蛋白多肽结构和分子量具有差异, 因此认为不同地区分离株间可能存在地区差异。

免疫荧光染色结果的判断, 必须以必要的对照为基础, 标准特异染色应仅出现于含有对应抗原的标本。而由于标本本身出现的非特异荧光则可经过一些处理降低或消除。我们在使用羊抗兔 IgG 荧光抗体作为第二抗体时, 为了减少非特异性荧光在细胞中出现, 在染色过程中除了必备的对照试验外, 细胞经过一些处理, 使染色获得满意结果。

RHDV 在细胞上复制成功, 为 RHDV 的归属提供了论据, 同时我们还探索了 RHDV 在细胞上大量培养的条件, 这将为 RHDV 各类疫苗的研制及其分子生物学研究奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 杨学楼等, 1989, 病毒学杂志, 4(2): 188—192。
- [2] 樊英远等, 1986, 上海农业学报, 2(3): 41—46。
- [3] 邓瑞堂等, 1987, 南京农学报, 10(2): 110。
- [4] 邓正文等, 1986, 实验生物学报, 13(1): 137。
- [5] 徐为燕等, 1988, 南京农学报, 11(1): 45。
- [6] 孙松柏等, 1991, 病毒学杂志, 6(1): 75—80。
- [7] 肖关麟等, 1989, 中国畜禽传染病, (1): 7。
- [8] 戴华生等, 1983, 新实验病毒学, 中国学术出版社, 第392页。
- [9] 殷震等主编, 1985, 动物病毒学, 科学出版社, 第325页。
- [10] 张龙翔等主编, 1981, 生化实验方法和技术, 高教出版社, 第94页。
- [11] 朱文等, 1991, 全国第二届病毒学会议论文集, 第182页。

Studies on Replication of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV) in Vitro

Luo Jing Yang Xue-lou Liu Hong Yan Ying-fang
Wang Han-zhong Sun Song-hai

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

In this paper the characteristics of replication of RHDV in the RL and RK cells have been studied by using synchronous infective method. The cytopathology effect can be observed at 48—96 hrs after viruses infection. HA titer of viral increased 5—10 times as high as those HA titers of viruses infection at 72 hr. The sensitivity of RHDV to passage cells are different, it is most sensitive for 4—8 generation. Special fluorescence in the cells can be seen at 18—72 hrs using immunofluorescence stain. Viruses of multiplication in cells were precipitated with PEG-DS, and purified with Sepharose 4B chromatography. Intact virions can be observed under electronmicroscope. Healthy rabbits were infectious with pure virions, resulting in death of rabbits by 100%. Clear immuno-sedimentation band can be produced between antigens obtained from cell cultures with antisera of RHDV using ID and CIE tests. The pure virions of cell cultures resolved into four polypeptides and with molecular weight of 65kd, 52kd, 43kd and 36kd respectively was seen after coomassie blue staining following SDS-PAGE. The molecular weight of Vp2, Vp3, Vp4 polypeptide showed identical with Vp2, Vp3, Vp4 polypeptide of virions of rabbit liver tissue, but molecular weight of Vp1 polypeptide were slight different each other.

Key words: Rabbit hemorrhagic disease Replication in vitro
HA titer Virus polypeptide