

成人腹泻轮状病毒蛋白的免疫印迹分析

方肇寅¹ 温乐英¹ R. Glass² *Glass, Rv*

(1. 中国预防医学科学院病毒学研究所, 北京, 100052)
(2. 美国 CDC, Atlanta, GA 30333, USA)

R373.2

提 要 我们从腹泻病人便样中纯化了病毒, 其结构蛋白组分按分子量大小分别为 VP1 (136K), VP2 (113K), VP3 (92K), VP4 (84K), VP5 (64K), VP6 (47K), VP7 (41K)。所有这些蛋白皆具有抗原性。VP6 是 B 组轮状病毒的共同抗原。B 组轮状病毒的每一结构蛋白与 A 组轮状病毒都无交叉免疫反应。另外注意到二例不同病人对 VP6 和 VP7 刺激产生的抗体水平不同。

关键词 轮状病毒 成人腹泻 免疫印迹 病毒蛋白 免疫反应 *腹泻*

已知的轮状病毒可以分为六个组(A-F)^[1], 型特异抗原在病毒外壳上, 至今只有 A、B、C 三组的轮状病毒侵袭人, 成人腹泻轮状病毒(ADRV)是唯一能引起人类腹泻爆发的 B 组轮状病毒, 该病毒尚不能体外培养, 有关它的来源和生物学性质, 它与其它轮状病毒的关系, 以及为什么它仅在我国大陆流行等许多问题都值得研究。我们从腹泻病人便样中纯化了该病毒, 研究了它的结构蛋白^[2]与病毒基因组编码病毒蛋白的关系^[3], 本文报道了用免疫印迹方法研究病毒结构蛋白取得的一些结果。

材料和方法

- 1 病毒和抗血清**
ADRV 腹泻病人的便样采集于 1987 年河北省承德市腹泻爆发现场。A 组轮状病毒参考株(SA11)按常规用 MA-104 细胞培养。病人双份血清(急性期和恢复期)收集于同一流行现场。豚鼠和家兔抗 ADRV 高免血清, 豚鼠抗 SA11 高免血清皆用纯化的病毒免疫动物制备。大鼠抗大鼠 B 组轮状病毒(IDIR)双份血清(免疫前和免疫后)由美国霍普金斯大学 Dr J. Eiden 提供, 豚鼠抗牛 B 组轮状病毒(BESV), 猪抗猪 B 组轮状病毒(PN338)和牛抗牛 B 组轮状病毒(BAT1)双份血清由美国俄亥俄州立大学 Dr L. Saif 提供。
- 2 病毒的纯化方法** 参见文献^[4]。
- 3 蛋白电泳**
10 μ g 纯化病毒样品与等体积 2 \times 样品液混匀, 经 100 $^{\circ}$ C 加热 2 分钟后电泳。SDS-PAGE 使用 12%聚丙烯酰胺垂直板层凝胶(胶厚 0.75mm)和 Laemmli 不连续缓冲系统, 在 15—20mA 下电泳 5 小时, 然后用考马斯亮兰染色(0.25%)^[5]。病毒蛋白分子量由与标准参考蛋白的分子量(Bio-Rad Laboratory)比较推算出。
- 4 免疫印迹分析**
病毒蛋白组分用 SDS-PAGE 分开, 在含 20% 甲醇的 Tris-甘氨酸缓冲液内电转印至硝酸纤维素膜(65V, 2.5

本文于 1992 年 9 月 29 日收到, 1993 年 1 月 10 日修回。
* 本工作在 CDC 完成, 得到 S. Monroe, M. Estes, L. Saif, J. Eiden 和 V. Gouvea 的帮助, 作者一并致谢。

小时),印迹滤膜在室温下与洗液(0.01mol/L PBS 配制的 0.3%吐温 20 和 0.25%脱脂奶粉)稀释的抗血清孵育 2 小时,滤膜洗四次用含 5%脱脂奶粉的 PBS 封闭,再洗四次后用不同酶结合物(羊抗豚鼠 IgG, Dako 公司;兔抗猪 IgG, Accurate 公司;羊抗大鼠 IgG, Accurate 公司;羊抗牛 IgG, Accurate 公司;猪抗兔 IgG, Dako 公司)检测结合的抗体,加酶底物染色,蒸馏水洗后滤膜即可干燥保存。

结 果

1 纯化的病毒和病毒的结构蛋白

纯化病毒颗粒在电镜下呈典型双壳轮状病毒形态(见图 1)。经蛋白电泳后未见杂蛋白带,与已知 A 组轮状病毒 SA11 比较,病毒蛋白带的分布模式大致相近,然而每一相应病毒蛋白的分子量要比 SA11 高些(见图 2),它们分别为 VP1(136K),VP2(113K),VP3(92K),VP4(84K),VP5(64K),VP6(47K)和 VP7(41K)。

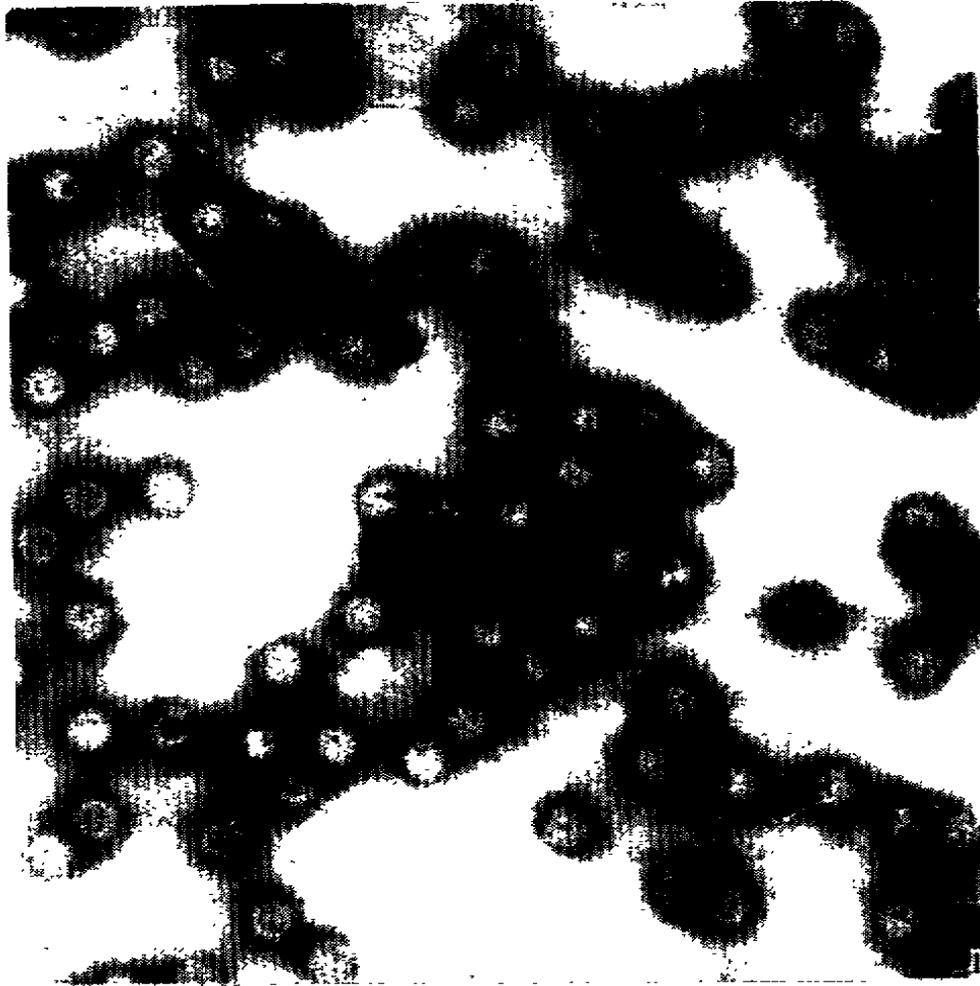


图 1 从腹泻病人便样中纯化的 B 组轮状病毒 ADRV, 2%PTA(pH4.6)负染。 $\times 87,500$

Fig. 1 Purified group B rotavirus ADRV from infected faeces, negative staining with 2% PTA (pH4.6), $\times 87,500$

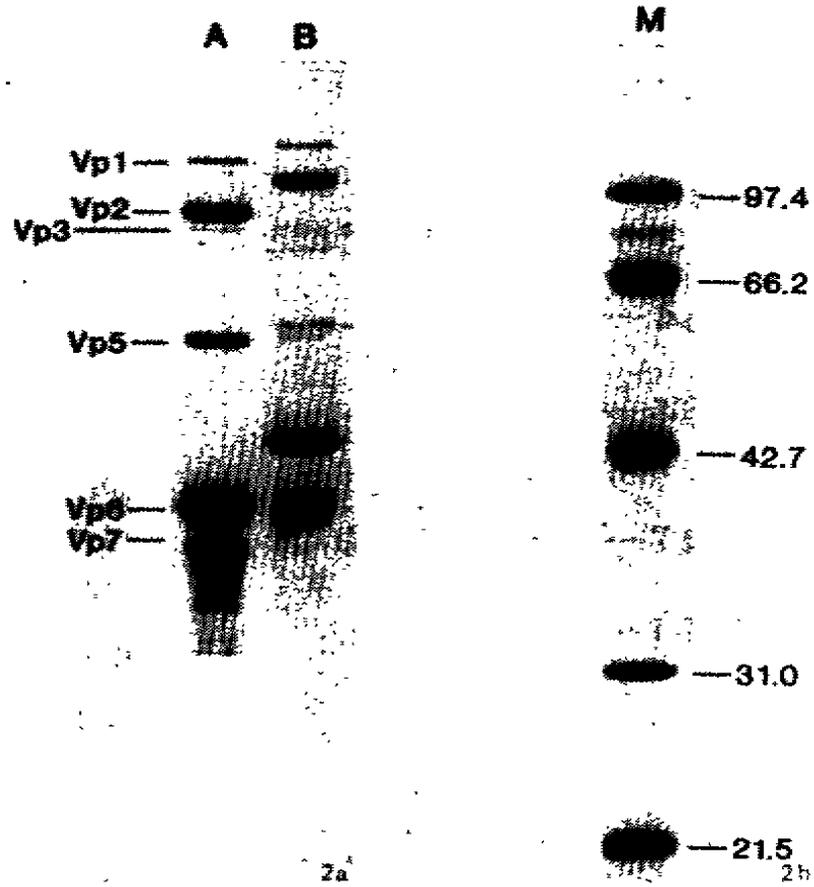


图 2 B 组轮状病毒 ADRV (B 行) 与 A 组轮状病毒 SA11 (A 行) 二者结构蛋白的比较。M 行是标准分子量参考蛋白 (KDa)。图中标有病毒蛋白 (VP) 和推算的分子量 (KDa)。

Fig. 2 Comparison of structural polypeptides of group B (lane B) and A (lane A) rotaviruses. Lane M contains molecular mass markers (in Kilodaltons). The viral proteins (VP) and their apparent molecular weights are indicated.

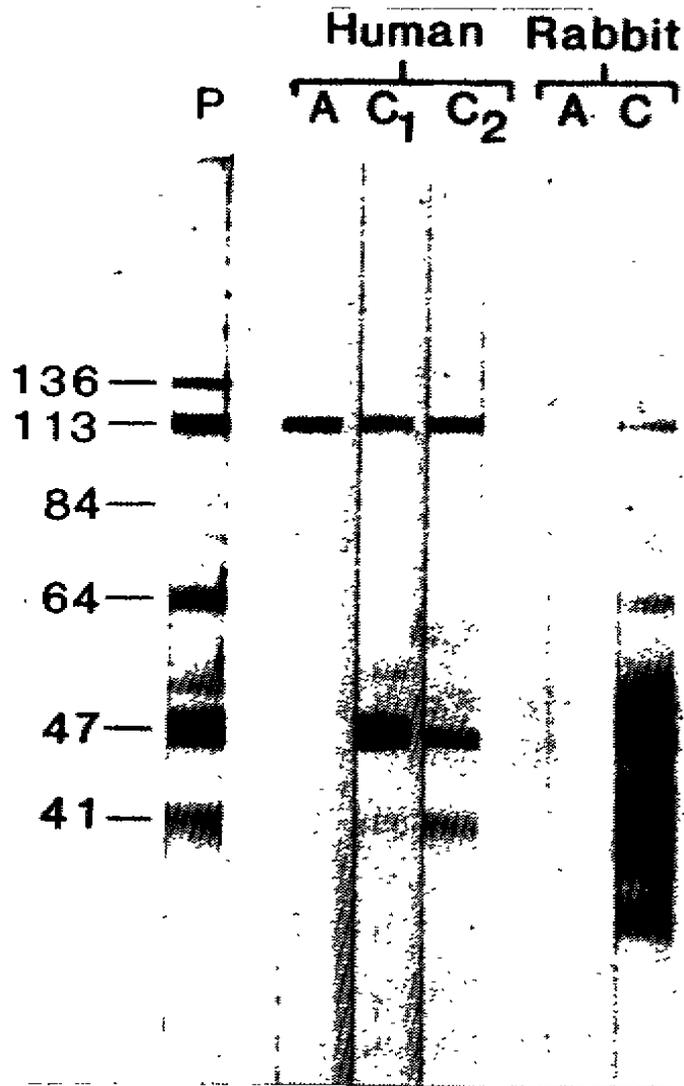


图3 人和动物对 ADRV 病毒蛋白的免疫反应比较, ADRV 蛋白印迹滤膜用病人急性期或家兔免疫前血清 (A 行), 或不同病人恢复期或兔抗血清 (C 行) 免疫检测。P 行为低稀释度的恢复期血清免疫反应作为阳性对照。

Fig. 3 comparison of human and animal immune responses to polypeptides of ADRV. Western blot of viral polypeptides were probed with acute-phase or preimmune sera (lane A) or with convalescent-phase sera or hyperimmune sera (lane C). Positive control (lane P) was a human convalescent-phase serum with higher titer.

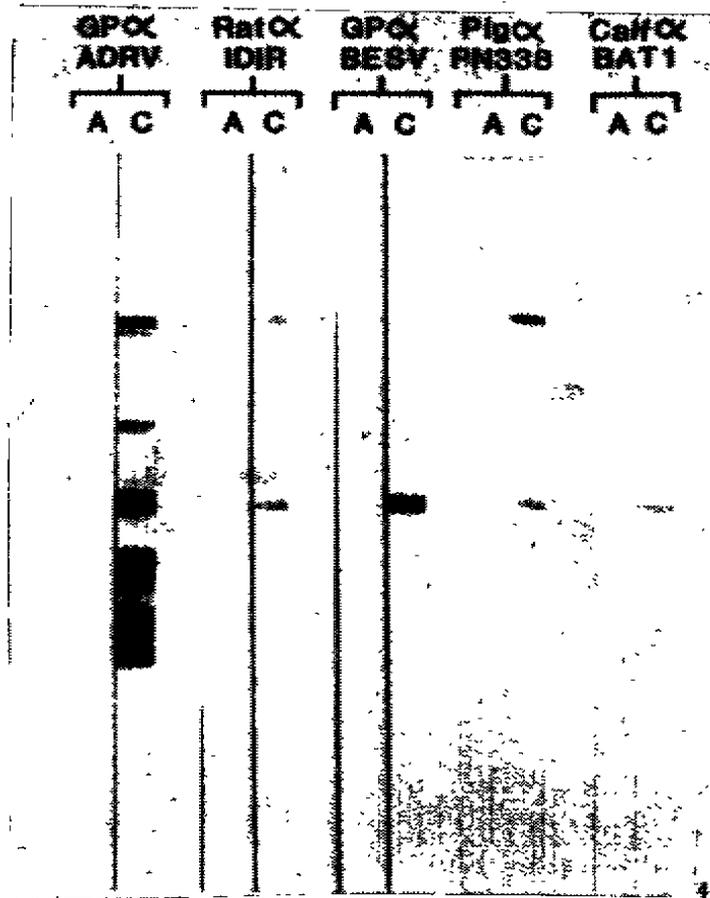


图4 ADRV蛋白印迹滤膜用豚鼠抗血清(ADRV免疫,GPαADRV行)、大鼠抗血清(IDIR免疫,RatαIDIR行)、豚鼠抗血清(BESV免疫,GPαBESV行)、猪抗血清(PN338免疫,PigαPN338行)、牛抗血清(BAT1免疫,CalfαBAT1)免疫检测。图中A行为免疫前血清,C行为免疫后血清。

Fig. 4 Western blot of ADRV viral polypeptides were probed with guinea pig antisera to ADRV (GPαADRV), rat antisera to IDIR (RatαIDIR), guinea pig antisera to BESV (GPαBESV), pig antisera to PN338 (PigαPN338), and calf antisera to BAT1 (CalfαBAT1). Lanes A, preimmune serum; Lanes b, hyperimmune serum.

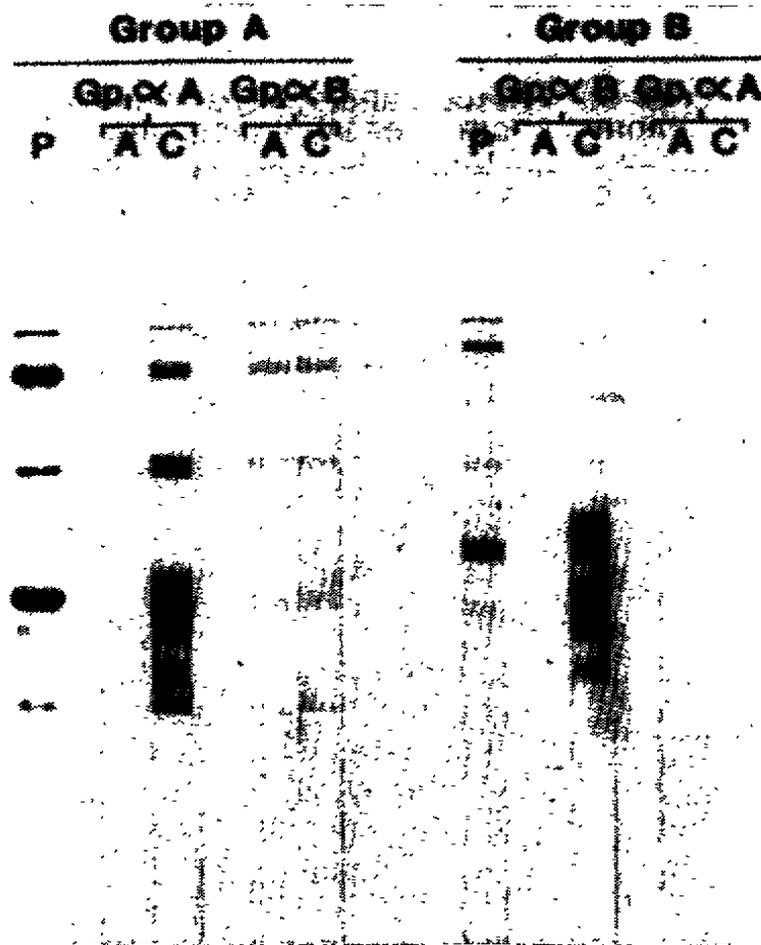


图5 A组轮状病毒(左侧)和B组轮状病毒(右侧)的病毒蛋白印迹滤膜用与病毒相应的抗血清(A/aA和B/aB)或用与病毒非对应的抗血清(A/aB和B/aA)免疫检测。图中A行为免疫前血清,C行为抗血清,P行为相应病人恢复期血清免疫反应作为阳性对照。

Fig. 5 Western blot of viral polypeptides of group A (left) and group B (right) antivirus were probed with homologous (A/aA and B/aB) or heterologous (A/aB and B/aA) antisera. Lane A, preimmune serum; Lane C, hyperimmune serum. Positive control (lane P) was a homologous human convalescent serum.

2 人和动物对 ADRV 的免疫反应

电泳分开的病毒蛋白经电转印至硝酸纤维滤膜,用不同病人的双份血清和家兔双份血清进行免疫印迹分析,结果见图3。从兔抗血清和低稀释度的病人恢复期血清(C行和P行)的免疫反应看,显示每一病毒蛋白皆具有免疫原性和反应原性,而VP6(47K)带染色最深。对比病人双份血清的免疫反应看,C₁病人对VP6产生抗体的水平大大超过抗VP7的抗体,而C₂病人

则抗 VP6 和抗 VP7 二者的抗体水平相近。此外在病人急性期血清的实验中亦有较强的 VP2 带,在另一例正常婴儿血清免疫印迹试验亦有 VP2 带(结果未列入),提示正常人可能有抗 ADRV VP2 的非特异性抗体。

3 VP6 是 B 组轮状病毒的共同抗原

ADRV 病毒蛋白的印迹滤膜,用不同动物 B 组轮状病毒免疫前后的双份血清进行免疫印迹分析结果见图 4,免疫前的血清内皆无抗体(A 行),免疫后的抗血清:用 ADRV 免疫的豚鼠(α ADRV,C 行)其免疫反应与兔抗 ADRV 的抗血清结果相同,用其它动物 B 组轮状病毒大鼠的 IDIR(α IDIR,C 行)和猪的 PN338(α PN338,C 行)免疫的抗血清仅有 VP6 带和可能的非特异 VP2 带,牛的 BESV(α BESV,C 行)和 BAT1(α BAT1,C 行)免疫的抗血清则仅有 VP6 带。这表明 VP6 是所有 B 组轮状病毒的共同抗原。

4 A 组轮状病毒和 B 组轮状病毒无交叉免疫反应

用豚鼠抗 SA11 和抗 ADRV 免疫前后的双份血清分别与转印至硝酸纤维滤膜上的 SA11 病毒蛋白和 ADRV 病毒蛋白进行免疫反应,其结果见图 5。用 SA11 免疫的豚鼠 1(GP1 α A)的双份血清与 SA11 病毒蛋白印迹反应,表明其具有高滴度的抗 A 组轮状病毒抗体(Group A, GP1 α A 行),而该抗体与 ADRV 病毒蛋白印迹反应时,不与 B 组轮状病毒的任何病毒蛋白带产生免疫反应(Group B, GP1 α A 行),用 ADRV 免疫的豚鼠 2(GP2 α B)双份血清与 ADRV 病毒蛋白印迹反应,表明其具有高滴度的抗 B 组轮状病毒抗体(Group B, GP2 α B 行),而该抗体与 SA11 病毒蛋白印迹反应时,双份血清无差别(Group A, GP2 α B 行),但都有弱的显色带,表明豚鼠 2 在用 ADRV 免疫前已具有低滴度的抗 A 组轮状病毒抗体,但免疫后产生的抗 B 组轮状病毒抗体则不与 A 组轮状病毒的任何病毒蛋白带产生免疫反应。

讨 论

成人腹泻轮状病毒自 1982 年在我国发现以来^[5,6],由于不能在体外培养,限制了对病毒性质的研究,我们从腹泻病人便样中纯化了病毒,利用免疫印迹分析研究病毒结构蛋白的抗原性,实验表明病毒颗粒的每一蛋白组分都可以在机体内刺激产生相应的抗体,VP6 是 B 组轮状病毒的共同抗原,当 ADRV 感染人时,C₁ 病人抗 VP6 的抗体水平明显高于抗 VP7 的水平,这与一般轮状病毒感染的情况相同,可能是由于 VP6 的量占全部病毒蛋白成分的 50%以上,且其免疫原性和抗原性强^[4]有关。本实验中 C₂ 病人抗 VP7 的抗体水平与抗 VP6 的水平较相近,这一现象过去未被研究者注意过,由于抗 VP7 抗体是病毒中和抗体^[2],是否这是 ADRV 感染病人后在不同病人中引起临床症状不同的原因之一,有待进一步证实。

抗 ADRV VP2 抗体在一例病人急性期血清,一例正常婴儿血清,以及大鼠和猪抗非 ADRV 的 B 组轮状病毒抗血清内都存在,提示抗 VP2 抗体不是 ADRV 感染所特异的,这一非特异的抗体在一些正常人体内的存在可能是为什么在用对流免疫电泳进行人群抗 ADRV 抗体血清流行病学调查时^[7]出现假阳性的原因^[8]。

研究 ADRV 病毒蛋白的抗原性质,为弄清该病毒的来源及其生物学性质,以及如何控制它在我国的流行提供了参考依据。

参 考 文 献

- 1 Estes MK. Rotaviruses and their replication. In: Fields Virology, Raven Press, New York, 1990, 1329—1352.
- 2 Fang Zhao-yin, R. Glass, M. Penaranda, et al. Purification and characterization of adult diarrhea rotavirus; Identification of viral structural proteins. *J Virol*, 1989, 63 : 2191—2197.
- 3 Fang Zhao-yin, S. Monroe, Hong Dong, et al. Coding assignments of Adult diarrhea rotavirus. *Arch Virol*, 1992, 125 : 53—69.
- 4 Estes MK and Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev*, 1989, 53 : 410—449.
- 5 洪涛, 王长安, 陈广牧, 等. 在暴发流行的成人无细菌性腹泻中发现的新轮状病毒. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1984, 4 : 1—5.
- 6 方肇寅, 邓水生, 王长安, 等. 成人流行性腹泻病原基因组的电泳分析. *中国医学科学院学报*, 1985, 7 : 93—96.
- 7 洪涛, 王长安, 周德南, 等. 成人腹泻轮状病毒的血清流行病学. *病毒学报*, 1985, 1 : 233—237.
- 8 方肇寅, 方煜平, 温乐英, 等. ELISA 阻断试验用于成人腹泻轮状病毒的血清流行病学调查. *中华流行病学杂志*, 1992, 13(特刊 8) : 157—159.

Western Blot Analysis of Viral Proteins of Adult Diarrhea Rotavirus

Fang Zhaoyin¹ Wen Leying¹ Roger Glass²

(1. *Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing, 100052*)

(2. *Centers for Disease Control, Atlanta, GA 30333 USA*)

Adult diarrhea rotavirus (ADRV) is known as only one of group B rotavirus that causes human diarrhea. The viral proteins were determined by SDS-PAGE of purified virions from infected feces as follows: VP1 (136K), VP2 (113K), VP3 (92K), VP4 (84K), VP5 (64K), VP6 (47K), VP7 (41K).

Western blot analysis was used to examine their immunological properties. The results showed that all structural polypeptides are antigenic, VP6 is most strongly one and contains a common group B antigen. The ratio of the antibody response to VP7 and VP6 differed markedly between two patients. No cross-reactivity could be demonstrated with antisera to group A rotavirus tested by western blot of ADRV polypeptides or antisera to ADRV tested against group A proteins.

Key words: Rotaviruses Adult diarrhea Western blot Viral protein Immune responsibility