

265-272

我国一株鸚鵡病毒的鉴定及其生化特性

夏 菁* 冯 锋 李天宪 陈绳亮 赵 林

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

* (华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079)

S 252.65
Q 939.409

摘 要 1995年作者从湖北濒死鸚鵡体内分离到一株新病毒, 经鸚鵡胚成纤维细胞盲传四代过渡到鸡胚成纤维细胞, 再传至第五代出现细胞病变。适应细胞的病毒纯化后, 经 SDS-PAGE 分析, 发现病毒粒子结构蛋白由 8 条多肽组成, 分子量范围在 14.5~60 kD 之间。病毒的酸碱氨基酸之比为 2.51, 富含 Asp、Clu 和 Leu, 而 Arg 和 Met 含量较少。病毒核酸为双链 DNA, 存在超螺旋型、环型和线型三种形态, G+C 的含量为 45%。经限制性内切酶分析, 核酸的分子量为 3.3×10^6 D。根据病毒分类的标准确认为澳洲长尾小鸚鵡幼稚病病毒, 应归属于乳多空病毒科多瘤病毒属。

关键词 澳洲长尾小鸚鵡幼稚病病毒, 乳多空病毒科, 多瘤病毒属

湖北云梦是我国最大的养鸟基地。七十年代起, 养鸟业便在此悄然兴起, 平均每年产商品鸟 400 万对, 远销东南亚各国及香港、澳门, 年产值 3000 多万元。1994 年 2 月起, 云梦发生了前所未有的大规模鸚鵡幼稚死亡, 死亡率超过 80%, 直接经济损失超过 1000 万元。同时, 北京、山东等地养鸟业也遭受重创。

1995 年冯锋等人^[1]从濒死鸚鵡幼稚体内分离到一种大小约 50 nm 的病毒粒子, 经初步纯化后在健康的澳洲长尾小鸚鵡体内进行了感染试验, 证明该病毒是引发鸚鵡幼稚死亡的主要病原。为了进一步探索有效的防治方法, 本研究对该病毒的生化特性进行了研究, 完成了此病毒的鉴定工作, 确定了其分类地位。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 濒死鸚鵡幼稚由湖北省云梦县畜牧局提供。

1.2 病毒的初步分离 取典型症状的濒死鸚鵡若干只, 在无茵条件下取心、肝、脾等脏器, 磨碎后低速离心, 取上清留待细胞培养用。

1.3 病毒的细胞培养 选取 10~16 日龄鸚鵡胚做鸚鵡胚成纤维细胞(BEF), 按参考文献[2]的方法。选用含 5% 小牛血清的 199 培养液。当 BEF 长成 80% 单层后, 接种分离的病毒液 0.5 mL/瓶。培养 7 d 后, 收获细胞液, 冻融三次, 离心后取上清 0.5 mL, 再接种原代 BEF, 这样每隔 4~5 d 盲传一次, 盲传数代后, 观察有无细胞病变(CPE)。同时, 将每次 BEF 盲传的分离物接种鸡胚成纤维细胞(CEF), 观察有无 CPE。

1.4 病毒的浓缩与纯化 将产生 CPE 的细胞液冻融三次, 低速离心取上清, 再经 10 000 r/min 高速离心 30 min 和 105 630 g 超速离心 2 h, 沉淀用 PBS 悬浮。浓缩的病毒液经 Sepharose-2B 柱层析纯化, 方法同文献

[11]。采用紫外分光光度计检测其纯度。

1.5 病毒结构蛋白的生化特性

1.5.1 SDS-PAGE 分析 参照文献[13]的方法进行。用考马斯亮蓝 R₂₅₀染色,分子量标准蛋白采用上海丽珠东风生物技术有限公司产品。

1.5.2 氨基酸组成分析 将纯化的病毒以 6 mol/L HCl 110 ℃ 条件水解 24 h,其产物经日立 835 型氨基酸自动分析仪测定。

1.6 病毒核酸的生化特性

1.6.1 核酸的抽提 采用氯仿-酚法抽提^[3]。将抽提的核酸溶于 TE buffer 中,利用 UV-300 型双光束分光光度计测核酸的纯度。

1.6.2 核酸类型测定 按照常规方法对病毒核酸进行二苯胺^[4]和 DNase、RNase 消化试验^[5]。均以 λDNA 和酵母 RNA 为对照。

1.6.3 核酸链型测定 按文献[6]介绍的方法进行吖啶橙染色,以 λDNA 和酵母 RNA 为对照,用 450 nm 波长(高压汞加蓝色滤光片)在荧光显微镜下观察颜色反应。核酸热变性试验按文献[7]并稍加改进,核酸溶液 100 ℃ 保温 10 min 使之变性,立即冰浴 2 min,室温下测定紫外吸收光谱,以加热前的紫外吸收光谱为对照。

1.6.4 核酸构型测定 核酸的琼脂糖凝胶电泳按文献[3]的方法进行,琼脂糖浓度为 1%,电泳缓冲液为 TAE,以 λDNA/Hind III 为对照。采用甲酰胺-细胞色素 C 法^[8]将核酸进行分子展层,展层后用喷碳的 Formvar 膜粘附,脱水后以 6°~7° 角喷涂铂钨合金,电镜下观察、拍照。

1.6.5 核酸(G+C)%的测定 将纯净 DNA 进行稀释,使其吸光度 A₂₆₀为 0.2~0.4,然后采用热变性温度 T_m 值法^[4]测定。

1.6.6 核酸的限制性内切酶特性 限制性内切酶 BamHI、EcoRI、Pvu II、Hind III、BglI 和 XhoI 均购自华美生物工程公司。酶切反应和琼脂糖凝胶电泳按文献[9]的方法进行,以 λDNA/Hind III 酶切片段为分子量标准绘制标准曲线,测定核酸酶切片段的分子量。

2 结果与分析

2.1 病毒的细胞培养 从组织中分离的病毒经原代 BEF 盲传四代后,仍然没有出现 CPE。将盲传四代的分离物接种到 CPE,再在 CEF 上进行盲传,病毒感染第五代 CEF 后可见 CPE。CPE 表现为细胞肿大,变圆。出现 CPE 的时间最早为 48 h,第 5~7 天病变较明显。

2.2 病毒的电镜形态观察和纯度鉴定 病毒粒子在电镜下的形态同文献[1]的报道。提纯的病毒粒子的紫外吸收峰最高在 260 nm 外,最低在 250 nm 外,为典型的核蛋白吸收曲线(见图 1)。

2.3 病毒结构蛋白的生化特性

2.3.1 病毒经 SDS-PAGE 分析后,呈现 8 条带,3 条主带和 5 条次带(图 2)。按 Müller^[10]的分析,图 2 中所示的 a、b 两条带可能为高分子量蛋白所经过的痕迹。根据标准蛋白工作曲线,可推算出病毒粒子各种多肽的分子量,结果见表 1。

表 1 病毒结构多肽的分子量表

Table 1 Molecular weights of viral structural polypeptides

| 组分 Component | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 分子量 M. W(D) | 60 000 | 56 000 | 42 000 | 39 000 | 29 000 | 26 000 | 16 200 | 14 500 |

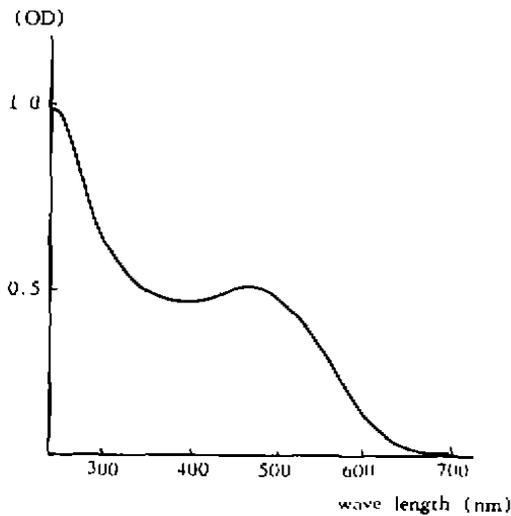


图1 纯化病毒粒子的紫外吸收曲线

Fig.1 Ultraviolet absorptive curve of purified virions

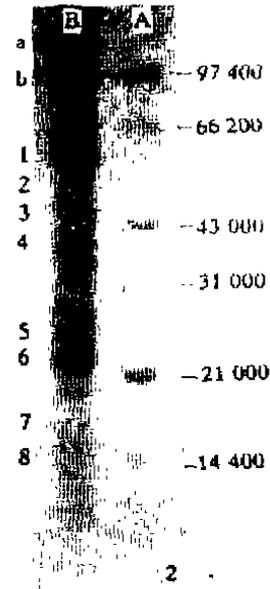


图2 病毒粒子结构蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 Pattern of structural protein bands of the virions by SDS-PAGE

A. Markers B. Viral protein

2.3.2 氨基酸组成分析结果(表2)表明,此病毒富含 Asp、Glu 和 Leu,而 Arg 和 Met 含量较少,其中碱性氨基酸与酸性氨基酸之比为 1:2.51。

2.4 病毒核酸的生化特性

2.4.1 用氯仿-酚法抽提的核酸经紫外扫描分析,呈典型的核酸吸收曲线(如图3所示),核酸 $OD_{260}/OD_{280} = 0.633/0.347 = 1.82$,说明抽提的核酸比较纯。

2.4.2 病毒核酸与二苯胺试剂反应呈蓝色,与 λ DNA 反应相一致,而酵母 RNA 无蓝色反应。酶消化试验说明,该病毒核酸能被 DNA 酶消化,而不能被 RNA 酶消化(见图4),这两个试验证明病毒核酸为 DNA。

2.4.3 病毒 DNA 经吡啶橙染色后呈绿色,与对照 λ DNA(ds)一致,而酵母 RNA(ss)呈橙色。病毒 DNA 加热前后的 UV 吸收曲线如图5,可见到核酸热变性后紫外吸收值明显增加,显示出双链特性。

2.4.4 核酸的琼脂糖凝胶电泳结果(见图6),病毒 DNA 呈现四条带,包括两条主带和两条次带。病毒核酸展层后经电镜观察,此病毒 DNA 存在三种不同的构型:超螺旋型、环型和线型(图7、8、9)。

2.4.5 进行热变性温度 T_m 值测定时,将各温度下的溶液吸光度校正为 25℃ 数值,用校正值除以 25℃ 的吸光度,得出各温度下的相对吸光度(见表3)。以温度为横坐标,相对吸光度为纵坐标,绘成 S 形的热变性曲线,其曲线的线性部分的中点相对应的温度即为 T_m 值(图10)。根据公式计算 $G + C \text{ mol} \% = T_m - 69.3/0.41 = 87.75 - 69.3/0.41 = 45\%$ 。

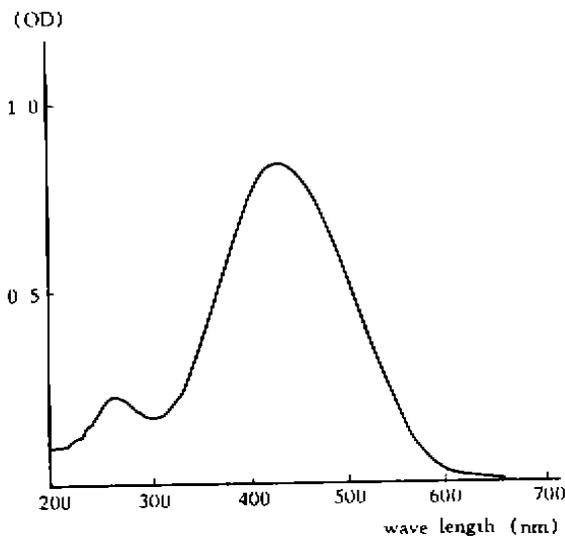


图 3 病毒核酸的紫外吸收曲线
Fig. 3 Ultraviolet absorptive curve of viral nucleic acid

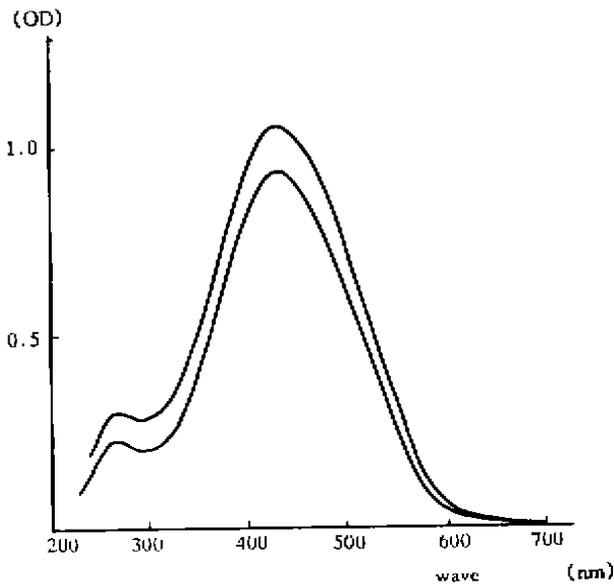


图 5 病毒 DNA 加热前后的 UV 吸收曲线
Fig. 5 Ultraviolet absorptive curves of viral DNA before and after heating

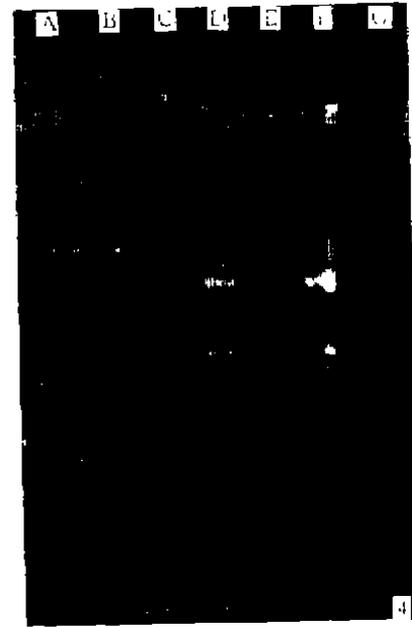


图 4 病毒核酸的 DNase 和 RNase 消化图谱
Fig. 4 Viral nucleic acid digested by DNase and RNase on agarose gel electrophoresis

A. λ DNA B. λ DNA + DNase
C. λ DNA + RNase D. Viral nucleic acid
E. Viral nucleic acid + DNase
F. Viral nucleic acid + RNase G. Yeast RNA + RNase



图 6 病毒核酸的琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig. 6 Viral DNA on agarose gel electrophoresis
A. λ DNA/Hind III B. Viral DNA

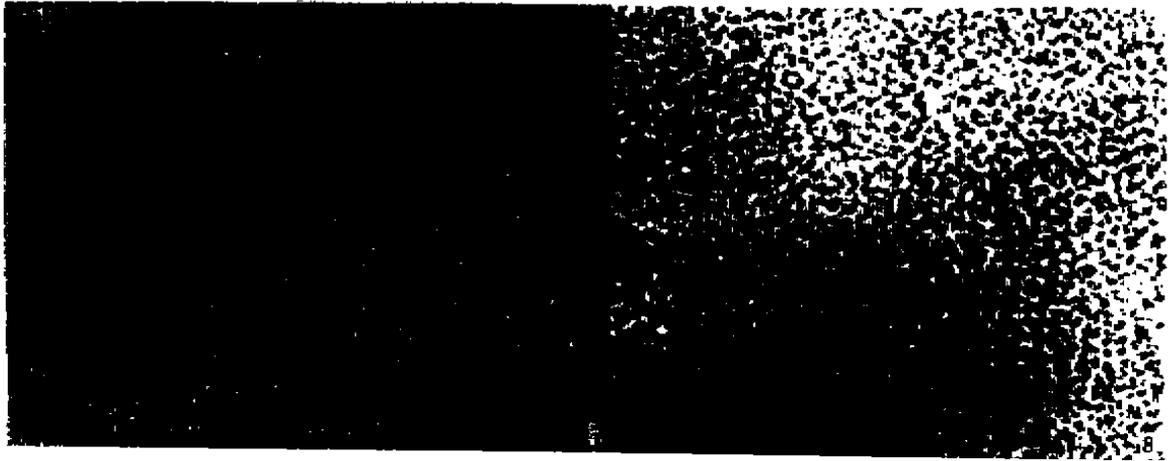


图 7 电镜下的超螺旋型 DNA
Fig. 7 Electron micrograph of supercoiled DNA

图 8 电镜下的环型 DNA
Fig. 8 Electron micrograph of circular DNA



图 9 电镜下的线型 DNA
Fig. 9 Electron micrograph of linear DNA

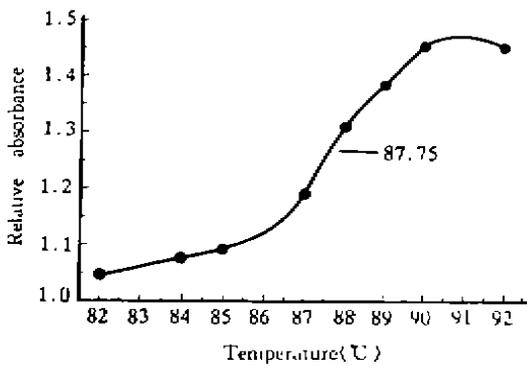


图 10 DNA 的热变性曲线 (数字示 T_m 值)
Fig. 10 Thermal denaturation curve of viral DNA (Number means the value of T_m)

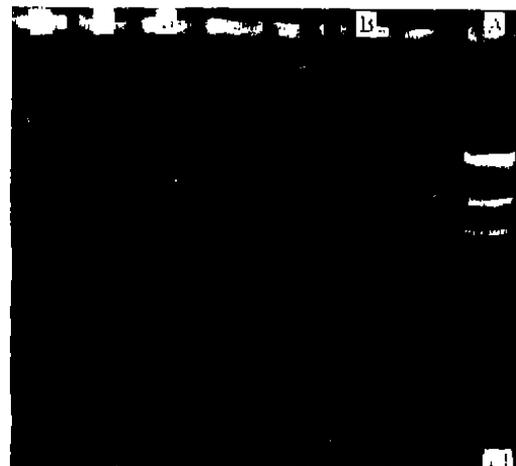


图 11 病毒 DNA 的限制性内切酶图谱
Fig. 11 Cleavage of the viral DNA fragments with restriction endonuclease
A. λ DNA/Hind III B. Viral DNA + Pvu II
C. Viral DNA + EcoR I D. Viral DNA + BamH I

2.4.6 限制性内切酶酶切电泳表明,病毒 DNA 无 Hind III、Bg II 和 Xho I 的酶切位点,经 BamHI、EcoRI、Pvu II 三种酶酶切,分别得到 1、1、2 条片段(图 11)。以 λ DNA/Hind III 为标准,计算出各酶切片段的分子量分别为 3.3×10^6 D、 3.3×10^6 D 和 $(2.7 \times 10^6 + 0.6 \times 10^6)$ D。因此,此病毒核酸的分子量为 3.3×10^6 D。

5 分离病毒的分类鉴定 通过对所分离病毒的形态学、细胞培养特性,对理化因子的敏感性、蛋白质和核酸特性以及血清学特性(另文发表)的研究,根据病毒分类的标准并结合资料^[10~13],证明分离的病毒为澳洲长尾小鸚鵡幼雏病病毒(Budgerigar fledgling disease virus, BFDV),归属于乳多空病毒科的多瘤病毒属。

3 讨论

澳洲长尾小鸚鵡幼雏病首先在美国和加拿大报道^[11,14],随后,此病迅速蔓延到日本、意大利、匈牙利、德国和澳大利亚^[15]。1981 年 Bozeman^[11]证明此病是由病毒引起的,他把濒死鸚鵡脏器中分离的病毒命名为澳洲长尾小鸚鵡幼雏病病毒(BFDV),归属于乳多空病毒科;1984 年 Dykstra^[12]克隆了 BFDV 核酸的全部基因;1986 年 Müller 等

人^[10,13]对 BFDV 的外壳蛋白和核酸进行了详细的研究;1988 年 Rott^[16]完成了 BFDV 基因的核苷酸全序列分析;从 1988 年至 1996 年,对 BFDV 的研究主要集中在早期编码区编码的两种非结构蛋白(大 T 抗原和小 T 抗原)和晚期编码区编码的三种主要外壳蛋白(VP1、VP2 和 VP3)^[16,17]。澳洲长尾小鸚鵡幼雏病在我国发现较晚,国内对 BFDV 的研究几乎是一个空白。虽然国外对 BFDV 的研究工作进行了十多年,但至今没有一种行之有效的防治方法。我们对此病毒的生化特性和分子生物学特性作了较为详细、全面的报道,旨在为 BFDV 的深入研究和寻找有效的防治方法打下坚实基础。

表 2 病毒结构蛋白的氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of viral structural protein

| 氨基酸 Amino acid | 重量百分比 Weight percentage | 摩尔数比 Molar ratio | 摩尔数百分比 Molar percentage |
|-------------------|----------------------------|---------------------|----------------------------|
| Asp | 10 | 67.32 | 9.44 |
| Thr | 6.67 | 50.02 | 7.01 |
| Ser | 5.71 | 47.48 | 6.65 |
| Glu | 15.71 | 95.22 | 13.35 |
| Gly | 6.19 | 71.80 | 10.06 |
| Ala | 7.14 | 70.66 | 9.09 |
| Cys | 2.76 | 10.14 | 1.42 |
| Val | 6.19 | 48.48 | 6.80 |
| Met | 1.38 | 4.92 | 0.69 |
| Ile | 4.24 | 28.62 | 4.01 |
| Leu | 8.57 | 59.04 | 8.28 |
| Tyr | 4.29 | 20.84 | 2.92 |
| Phe | 6.19 | 35.24 | 4.94 |
| Lys | 6.67 | 39.26 | 5.50 |
| His | 2.52 | 14.14 | 1.98 |
| Arg | 1.05 | 5.28 | 0.74 |
| Pro | 6.19 | 45.00 | 6.31 |
| 总计 Total | 101.47 | 713.46 | 100 |

注:由于酸解, Asp = Asp + Asn, Glu = Glu + Gln

Notes: Asp = Asp + Asn, Glu = Glu + Gln

表 3 病毒 DNA 的热变性测定值

Table 3 Values of determining thermal denaturation of viral DNA

| 温度(℃) Temperature | 吸光度 Absorbance | 校正膨胀体积后吸光度 Absorbance adjusted swollen volume | 相对吸光度 Relative absorbance |
|----------------------|-------------------|---|------------------------------|
| 25 | 0.245 | 0.2450 | 1.0000 |
| 82 | 0.249 | 0.2558 | 1.0441 |
| 84 | 0.256 | 0.2633 | 1.0749 |
| 85 | 0.260 | 0.2671 | 1.0904 |
| 87 | 0.284 | 0.2928 | 1.1949 |
| 88 | 0.311 | 0.3208 | 1.3092 |
| 89 | 0.327 | 0.3375 | 1.3775 |
| 90 | 0.343 | 0.3543 | 1.4461 |
| 92 | 0.343 | 0.3548 | 1.4480 |

在BFDV的细胞培养特性研究中,我们采用了Bozeman^[11]的方法。BFDV先在BEF上盲传再过渡到CEF。由于鸚鵡胚个体小,制备细胞困难,收获病毒量少,因此,我们也尝试了将分离的BFDV接种传代细胞(Vero, Hep, BHK等细胞)和在原代CEF盲传两种方法,希望找到细胞制作简单、病毒量收获大的培养方法,但BFDV均不在这些细胞上生长。在试验中,我们发现盲传后BFDV接种CEF,第五代分离物经提纯在电镜下观察到许多病毒粒子,其浓度和纯度已达到生化分析的要求。此方法的研究成功将对今后研制该病的弱毒活苗成为可能。

我们采用传统方法抽提BFDV的核酸,经琼脂糖凝胶电泳呈现四条核酸带,核酸展层分析后,电镜下该病毒DNA存在超螺旋型、环型和线型三种不同形态。这种现象与Müller的报道十分类似^[10]。但是,我们发现电泳后经EB染色看到的核酸带与Müller描述的四条相对应的带之间在亮度和相对位置上有一定的区别,而且通过苯酚-氯仿抽提,在其它条件均相同的情况下,每次抽提到的核酸带的亮度和位置也不完全相同。BFDV DNA会不会是小分子量的环状DNA,在酚抽提过程中或者高度缠绕呈超螺旋型,或者断裂呈线型,形成了电镜下见到的三种形态,而且每次抽提DNA断裂的部位可能不同,经琼脂糖凝胶电泳形成的带在亮度和相对位置上也会出现变化,这一假设尚需进一步的试验证实。

参 考 文 献

- 1 冯锋,夏苇,赵林等.我国一种鸚鵡新病毒的分离.中国病毒学,1996,11(4):384-386
- 2 殷震,刘景华主编.动物病毒学.北京:科学出版社,1985.182-183
- 3 J.萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著.金冬雁等译.分子克隆实验指南(第二版).北京:科学出版社,1992.880-887,955-961,304-340
- 4 袁厚积,蔡武城,赵志安.核酸类.见:蔡武城,袁厚积主编,生物物质常用化学分析法.北京:科学出版社,1982.110-153
- 5 Krell P J, Stoltz B D. Unusual baculovirus of the parasitoid wasp *apanteles melanoscelus*: Isolation and preliminary characterization. *J Virol*, 1979, 29(3):1118-1130
- 6 熊菊贞(美),卡罗林, K. Y. 方.诊断病毒学.北京:科学出版社,1987.43-45
- 7 Peter J G, Tartun I. The secondary structure of reovirus RNA. *Pro Nat Acad Sci*, 1963, 49(5):707-714
- 8 蔡良琬,梁杰,宋国兴.核酸的电镜观察与应用.见:蔡良琬主编,核酸研究技术(上册).北京:科学出版社,1987.246-258
- 9 姜泊,周殿元.DNA的限制性内切酶酶切技术.见:姜泊,张亚历,周殿元主编,分子生物学常用实验方法.北京:人民军医出版社,1996.7-14
- 10 Müller H, Nitschke R. A polyoma-like virus associated with an acute disease of fledgling budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Med Microbiol Immunol*. 1986, 175:1-13
- 11 Bozeman L H, Davis R B, Gaudry D *et al.* Characterization of papovavirus isolated from fledgling budgerigars. *Avian Dis*, 1981, 25(4):972-980
- 12 Dykstra M J, Dykstra C C, Lukert P D *et al.* Investigation of budgerigar fledgling disease virus. *Am J Vet Res*, 1984, 45(9):1883-1887
- 13 Lehn H, Müller H. Cloning and characterization of budgerigar fledgling disease virus, an avian polyomavirus. *Virology*, 1986, 151(2):362-370
- 14 Hunter B, Gagnon A, Onderka D *et al.* Viral hepatitis in Southern Ontario. *Can Vet J*, 1979, 20:176-179
- 15 Rische B W, Niagro F D, Latimer K S *et al.* Efficacy of an inactivated avian polyomavirus vaccine. *J Assoc Avian Vet*, 1993, 7(4):187-192
- 16 Roti O, Kroger M, Müller H *et al.* The genome of budgerigar fledgling disease virus, an avian polyomavirus. *Virology*, 1988, 165:74-86

- 17 Rodgers R E D, Consigli R A. Characterization of a calcium binding domain in the VP1 protein of the avian polyomavirus, budgerigar fledgling disease virus. *Virus Research*, 1996, 44(2):123-135

Identification and Biochemical Characteristics of a New Psittacine Virus in China

Xia Wei* Fong Feng Li Tianxian Chen Shengliang Zhao Lin

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

* (College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079)

Abstract A strain of new virus was isolated from fledgling budgerigars by authors in 1995. Cytopathic effect became visible after the isolate was passaged 4 generations on budgerigar embryo fibroblast and 5 generations on Chicken embryo fibroblast. The SDS-PAGE proved that viral capsid was composed of eight polypeptides with molecular weight from 60 000 to 14 500 D. The protein was rich in Asp, Glu and Leu, but comparatively poorer in Arg and Met. The ratio of acidic amino acid to basic amino acid was 1:2.51. The nucleic acid was dsDNA and existed as supercoiled circular, relaxed circular and linear molecules. G + C of viral DNA was 45%. The molecular weight of DNA was 3.3×10^6 D by restriction endonuclease analysis. According to standards of virus classification, it is proved that the isolate was budgerigar fledgling disease virus which had placed into the *Polyomavirus* genus of *Papovaviridae*.

Key words Budgerigar fledgling disease virus, *Papovaviridae*, *Polyomavirus* genus