

鼠痘病毒的分离鉴定及感染性研究

安学芳¹, 刘峰松², 方明刚¹, 朱幼玲¹, 王汉中^{1**}

(1. 中国科学院武汉病毒所分子病毒学重点实验室, 湖北武汉, 430071; 2. 湖北鄖阳医学院实验动物中心, 湖北十堰, 442000)

Isolation and Identification of a Mouse Poxvirus and Its Infectivity

AN Xue-fang¹, LIU Feng-song², FANG Ming-gang¹, ZHU You-ling¹, WANG Han-zhong^{1**}

(1. The Key Laboratory of Molecular Virology, Wuhan Institute of Virology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. Experimental Animal Center, Yunyang Medical College in Hubei Province, Shiyan 442000, China)

Abstract: A Mouse poxvirus has been isolated from different pathological tissues in dead mouse that natively infected by virus. In negative stained preparations, the size of the virus particles was 160~190nm×250~300nm and the virus particle revealed ovoid-shape. The healthy Blab/C mouse were infected by injection with purified virus particles, resulting in the death of mouse and producing the same virus particles as inoculated virus. The electron microscopy of an ultrathin section confirmed that viral replication and assembly of virions occurred in the cytoplasm of different pathological tissues infected by viruses such as liver, lung, kidney, intestine and pancreas. These results demonstrated that the virus should be classified into *Poxviridae*.

Key words: Poxvirus; Morphology; Infectivity

摘要: 分别从自然感染死亡的小鼠不同病理组织内分离到一种大小为 250~300nm×160~190nm 的卵圆型病毒粒子。以腹腔注射的方式将纯化的病毒粒子回接种到小鼠体内, 能引起小鼠死亡, 从不同的病理组织内分离到与接种病毒粒子相同的病毒粒子。病理组织的超薄切片电镜观察结果表明在肝、肺、脾、肠等组织的细胞质内均能观察到病毒粒子的存在, 表明病毒的复制和装配是在细胞质内完成的, 该病毒应归类于痘病毒科。

关键词: 痘病毒; 形态学; 感染性

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2003)06-0563-03

痘病毒是动物病毒中体积最大、结构最复杂的在细胞质内复制的 DNA 病毒。该病毒具有独特的形态结构, 电镜下的病毒为砖形或卵圆型颗粒。砖形病毒粒子的大小为 220~450nm×140~260nm, 卵形病毒粒子的大小为 250~300 nm×160~190nm。病毒粒子由 1 个核心、两个侧体和两层脂外膜组成, 基因组由 170~250kb dsDNA 组成。病毒的核心呈两面凹陷的哑铃状结构, 是由 DNA 和蛋白质组成的核衣壳。核衣壳和侧体由脂蛋白性表面膜包围, 又称为外膜, 其间充满可溶性蛋白^[1,2]。细胞外的病毒粒子表面还有一层来自宿主细胞膜的囊膜, 囊膜表面含有病毒特异性蛋白质。

1982 年 Paoletti 和 Moss 将外源基因 插入到痘

病毒基因组中 TK 基因中, 首次成功地构建在哺乳动物细胞内表达外源基因的重组痘病毒^[3]。由于重组痘病毒具有宿主范围广, 基因组容量大, 表达效率高以及具有完善的修饰功能, 因而, 目前痘病毒已成为重要的哺乳动物表达载体和转基因及基因治疗载体, 是当今病毒学研究的重要领域之一。

最近本研究室从自然感染死亡的小鼠体内分离到一株痘病毒, 并对该病毒的感染性和病理特征作了初步研究, 报道如下。

1 材料和方法

1.1 病毒的分离

收集自然感染死亡的小鼠的肝、肺、肾脏、脾

收稿日期: 2003-06-12, 修回日期: 2003-09-01

作者简介: 安学芳(1965-), 女, 湖北老河口市, 高级实验师, 从事实验动物和动物实验技术管理工作。

** 通讯作者。Corresponding author.

和十二指肠等病变组织, -80°C 保存。分离病毒时将组织放入匀浆器中反复碾磨, 加入等体积的 PBS 缓冲液。将组织悬液置于 -20°C 冰箱中反复冻融三次后, $5\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min 去掉细胞沉淀, 上清液经 $15\,000\text{ r/min}$ 离心 1.5 h 后, 收集沉淀溶于 $50\mu\text{L}$ TE 缓冲液中, 将悬液放置在 4°C 静置 12 h 使病毒沉淀充分溶解。

1.2 病毒粒子的电子显微镜观察

具体操作见文献^[4]。将分离提纯的病毒粒子用 2% (W/W) 醋酸铀进行负染, 在电镜下观察病毒粒子的形态和大小。测定 10 个完整的病毒粒子的大小计算出病毒粒子大小的平均值, 得出所分离的病毒粒子的大小。

1.3 感染性试验

分别将自然感染死亡小鼠的肝、肺、脾、肾脏等病理组织经碾磨制成细胞悬液, 经 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌后, 取 0.2 mL 滤液以腹腔注射的方式将病毒接种到 BALB/c 和 KM 小鼠体内。同样, 将提取的病毒悬液用 100 倍 TE 缓冲液稀释, 经 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌后, 取 0.1 mL 滤液接种到 BALB/c 和 KM 小鼠体内, 观察感染小鼠的状况和死亡情况。同时做阴性对照。

1.4 病毒感染组织的病理切片及电子显微镜观察

取自然感染和人工感染死亡的实验小鼠的肝、肺、肾、脾和肠等内脏组织, 分割成 $1\sim 2\text{ mm}^3$ 的组织块, 经 2.5% 戊二醛固定后, 在用 1% 的四氧化锇固定 1 h , 经系列乙醇脱水后包埋, 超薄切片, 2% 醋酸双氧铀染色, 电镜观察。具体方法见文献^[5]。

2 结果

2.1 动物感染试验

按上述方法进行动物感染试验, 感染后第 5 天 BALB/c 小鼠和 KM 小鼠开始出现精神不振, 被毛粗乱, 嗜睡, 并在当天或次日死亡。剖检死亡鼠可见其病理变化为肝、肺、脾、肾以及 12 指肠和小肠均出现出血性坏死病变, 尤其是肝、脾和 12 指肠更为典型, 未见四肢和尾部溃烂坏死, 与自然死亡鼠一致。

2.2 电镜观察

从自然感染死亡和回接感染致死的组织悬液中纯化病毒, 通过负染, 在电镜下可见大小为 $250\sim 300\text{ nm}\times 160\sim 190\text{ nm}$ 呈卵圆形的病毒粒子, 表面十分粗糙并布满凹凸不平的皱折。其形态大小与痘病毒科正病毒属的病毒粒子一致, 应属于痘病毒科正痘病毒属的一种 (图-1)。

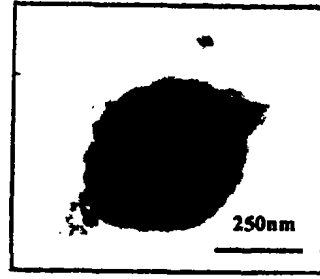


图 1 病理组织内提纯的病毒粒子电镜负染照片

Fig. 1 The negative stained preparations of the purified virus particle from pathological tissue.

取自然感染和人工感染死亡鼠的不同组织器官, 经超薄切片, 在电镜下可观察到肝、脾、肾、肺和肠组织中均可见大量的病毒粒子, 该病毒粒子位于不同组织细胞质内, 病毒粒子呈卵圆形颗粒, 中央为两面凹陷的核心, 具有典型的哑铃状结构 (见图-2-B、F), 图-2D 中可以观察到细胞质内存在着典型的未成熟的病毒粒子 (如箭头所示), 而细胞核内没有发现病毒粒子。

3 讨论

目前仅发现小鼠传染性脱脚病是一种由痘病毒 (*Ectromelia virus* / ECTV or Mousepox virus) 引起的小鼠传染病^[1, 2]。该病是以接触感染的方式在小鼠中传播, 呈全身性感染, 死亡率高达 95%。其典型症状是肢体水肿和坏死, 最初是在嘴部、四肢和尾部出现水肿性肿胀, 因病毒侵染皮肤的毛细血管和皮肤上皮细胞而引起皮肤病变以及四肢和尾部组织坏死而脱落。病毒感染常引起致死性肝、脾出血性坏死。剖检病鼠可观察到肝、脾呈出血性坏死^[1, 2, 6]。然而, 本实验分离的鼠痘病毒不引起肢体水肿和坏死, 也没有发现皮肤病变以及四肢和尾部组织坏死甚至脱落现象。剖检病鼠的结果表明该病毒除了能引起肝、脾组织的出血性坏死外, 也能引起肺、肾以及十二指肠和小肠的出血性坏死, 小鼠发病急、病死率高。因此, 所分离的鼠痘病毒是一种毒力更强的突变株还是一种新的毒株有待于进一步研究证实。

最近美国报道源于非洲的猴痘病毒经非洲冈比亚大鼠和美洲草原土拨鼠 (Prairie dog) 感染人的事件, 表明猴痘病毒能感染猴、啮齿类动物、兔、人等不同宿主, 导致相同的临床症状。和 SARS 病毒一样, 该病的出现引起科学家们的极大关注, 原因之一就是担心该病毒可能从此在北美的野生动

物中长期立足, 一旦发生进化, 将更易在人体中传播, 甚至取代早已消灭的天花病毒而填补已出现的生态链缺口。

由于痘病毒是唯一在细胞质内复制的 DNA 病毒^[1, 2], 在整个病毒复制周期中宿主因子在其中扮演的重要角色是当今分子病毒学研究的重要课题,

如在病毒 mRNA 转录、病毒的装配过程中都需要宿主细胞核内因子参与, 宿主细胞核内因子如何参与病毒的 mRNA 的转录和病毒粒子的装配等课题都是病毒分子生物学研究中热点课题。

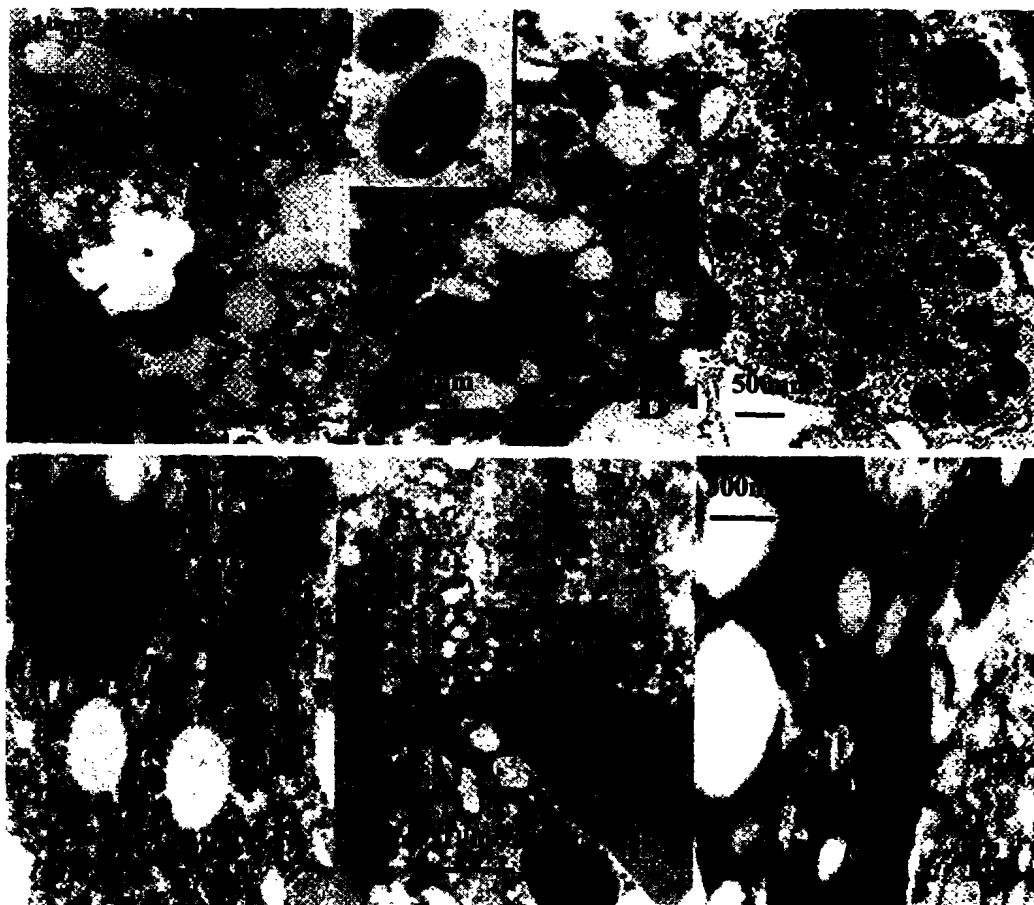


图 2 回接感染后不同组织的超薄切片的电镜观察结果

Fig. 2 Ultrathin section in different tissues infected by *Mouse poxvirus*

A/B, Liver tissue; C/D, Lung tissue; E, Spleen tissue; F, Intestine tissue.

鉴于上述原因, 我们将对新分离的鼠痘病毒的分子生物学和流行病学进行系统研究, 确定该病毒的宿主范围及其与其他痘病毒的相互关系, 为鼠痘病毒病的预防提供理论依据。

参考文献

- [1] van Regenmortel M H V, Fauquet C M, Bishop, D H L, *et al.* Virus taxonomy (Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses)[M]. New York: Academic press, A harcourt Science and Technology Company, 2000, 137-145.
- [2] Fields B N, Mnipe D, Howley, P M, *et al.* Virology[M]. 3rd edition,

New Year: Lippincott-Raven Publishers 1996, 2673-2701.

- [3] Kaufman H L, Flanagan K, Diven D, *et al.* Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety [J]. Proc Natl Acad Sci USA 1996, 93(21): 11341-11348.
- [4] Lery X, Fediere G, Taha A, *et al.* A new small RNA virus persistently infecting an established cell line of galleria mellonella, Induced by a heterologous infection[J]. J Invert Pathol, 1997, 69: 7-13.
- [5] L ó pez C, Carballal M J, Azevedo C, *et al.* Morphological characterization of the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussates* (Mollusca: Bivalvia)[J]. J Inverte Pathol, 1997, 69: 51-57.
- [6] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版, 北京: 科学出版社, 1997, 939-985.