

## 新分离呼吸道肠道病毒生物学特性和 S4 片段的序列测定\*

朱虹<sup>1</sup>, 苏裕心<sup>1</sup>, 宋立华<sup>1</sup>, 何君<sup>1</sup>,

黄如统<sup>1</sup>, 貌盼勇<sup>2\*\*</sup>, 端青<sup>1\*\*</sup>

(1.军事医学科学院微生物流行病学研究所病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071; 2.解放军第 302 医院, 北京 100039)

### A New Reovirus Isolate: Biological Characteristics and Sequencing of the S4 Gene

ZHU Hong<sup>1</sup>, SU Yu-xin<sup>1</sup>, SONG Li-hua<sup>1</sup>, HE Jun<sup>1</sup>, HUANG Ru-tong<sup>1</sup>,

MAO Pan-yong<sup>2\*\*</sup>, DUAN Qing<sup>1\*\*</sup>

(State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China; 302 Hospital of PLA, Beijing 100039)

**Abstract:** The biological Characteristics and partial S4 gene sequence of a new Reovirus isolate was determined. Cell sensitivity testing on four cell lines was conducted by using the new isolate and the data showed that L929 cells and LLC-MK<sub>2</sub> cells were highly permissive. The reovirus was resistant to ether, non-resistant to acid and heat in the physicochemical characteristics. It also had hemagglutination activity to human O-erythrocyte, and the titer reached up 1:32. Electron microscopic (EM) examination of LLC-MK<sub>2</sub> cells infected with the reovirus revealed characteristic reovirus particles of about 70nm~80nm in diameter. Aggregates of reovirus particles showed in the cytoplasm of L929 cells. The putative S4 gene was amplified by PCR and the product had sequence homology to 3 prototypic strains T1L, T2J and T3D was 84%, 78%, 85%, respectively. All the results suggested that the new reovirus isolate is closely related to the known clusters of *Reoviridae*.

**Key words:** Reovirus; Cell sensitivity; Physicochemical characteristics; Virus morphology; Sequence analysis

**摘要:** 新分离呼吸道肠道病毒(简称呼肠病毒)经过空斑分纯后进行生物学和部分基因序列的鉴定。首先通过 BYD 株(由端青从北京于某患者标本中分离到的第一株呼肠病毒)对 4 种传代细胞的敏感性试验,选出 L929 和 LLC-MK<sub>2</sub> 敏感细胞,然后用 LLC-MK<sub>2</sub> 细胞进行理化性质试验,血凝试验和形态学鉴定。结果显示该病毒为耐乙醚、不耐酸、不耐热的 RNA 病毒;对人 O 型红细胞能产生凝集,滴度达 1:32;电镜下可查见细胞胞浆内有球形、直径为 70nm~80nm、双层衣壳的病毒颗粒。提取 BYD 株 RNA 并进行 S4 片段序列分析,结果显示该片段的氨基酸序列与已知呼肠病毒 1~3 型标准株的同源性分别为 95%、90% 和 95%。以上这些生物学以及 S4 片段的序列分析结果表明:新分离 BYD 株病毒符合呼肠病毒科的特性。

**关键词:** 呼吸道肠道病毒; 细胞敏感性; 理化性质; 形态学; 序列分析

中图分类号: R373.21

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)04-0324-04

呼吸道肠道病毒(Reovirus)为二十面体对称的双层衣壳结构,无包膜,能抵抗脂溶剂,完整的病毒颗粒直径 60nm~80nm,其核酸由 10 个片段的 dsRNA 组成。已知人类呼肠病毒分为 3 个血清型,

都能凝集人 O 型红细胞。该病毒国外研究较多,国内在 1970~1980 年有分离鉴定的报道。

本室自 SARS 患者分离到 4 株呼肠病毒,并经电镜形态学,血清学和 S2 片段基因鉴定,初步鉴

收稿日期: 2005-12-12, 修回日期: 2006-04-03

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助(30471555); 军事医学科学院创新启动基金资助(200408183)。

作者简介: 朱虹(1962-), 女, 吉林省籍, 副研究员, 博士, 主要从事微生物检验学研究。

\*\* 通讯作者: 端青(1955-), 女, 江苏省籍, 研究员, 主要从事微生物检验学研究; 貌盼勇(1957-), 男, 河南省籍, 研究员, 从事医学病毒学研究。Corresponding author Tel: 010-66948560, E-mail: duanq@nic.bmi.ac.cn



定为呼肠病毒<sup>[1]</sup>。但在后来的试验中发现该份呼肠病毒材料中还混有脊髓灰质炎病毒 (*poliovirus*) 随后建立了呼肠病毒空斑试验, 对 4 株新分离呼肠病毒进行了两次克隆分纯, 获得纯病毒<sup>[2]</sup>。最近对分纯后的病毒进行了较系统的鉴定, 本文就新分离呼肠病毒的生物学性状及 S4 片段的序列测定报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒株

本室于 2003 年从 SARS 患者标本中分离到 4 株呼肠病毒, 其中 BYD 株、BLD 株和 JP 株分离自咽拭子标本, BYL 株分离自尸检肺组织标本。通过空斑试验得到纯毒种, 扩增后分装保存-30℃。本研究分别使用其第 18 代、9 代、14 代和 9 代的病毒液。

### 1.2 细胞

人喉癌传代细胞 (Hep-2)、鼠成纤维细胞 (L929) 和恒河猴肾传代细胞 (LLC-MK<sub>2</sub>), 均由军事医学科学院微生物检测研究中心细胞库提供。小鼠肾传代细胞 (DK), 由解放军第 302 医院提供。上述细胞均用含 10% 灭活的小牛血清、青链霉素 100 U/mL 和卡那霉素 50 U/mL 的 DMEM 培养液培养, 并用常规方法传代。

### 1.3 细胞敏感性试验

取其中 1 株分离株同时用 Hep-2、DK、L929 和 LLC-MK<sub>2</sub> 细胞以微量滴定法 (TCID<sub>50</sub>/0.025 mL) 测定其滴度。每天观察细胞病变 (CPE), 以第 7 天的结果计算病毒滴度。

### 1.4 理化性质试验

耐乙醚、耐热、耐酸以及核酸型的测定按文献<sup>[3]</sup>, 其中核酸型测定采用间接法, 在维持液中加入能抑制 DNA 的药物 5-IUDR (市售阿洛昔韦)。结果以对照组和试验组的 TCID<sub>50</sub> 之差表示, 以相差 2 个对数以上为阳性, 反之为阴性。

### 1.5 血凝试验

取 4 株呼肠病毒以及相应的细胞对照, 冻融 3 次后, 用常量法 (0.25 mL) 进行血凝试验。用 pH 7.2 的 PBS 作倍比稀释, 加入 1% 人 O 型红细胞, 置室温 45 min 后观察结果。

### 1.6 形态学观察

将呼肠病毒感染 LLC-MK<sub>2</sub> 单层细胞, 当产生明显 CPE 时将细胞刮下, 以 1500 r/min 离心 15 min, 收集细胞团块, 用 3.1% (pH 7.2) 戊二醛固定, 常规洗涤、脱水、包埋、切片、染色后, 在透射电镜下

观察。

### 1.7 RNA 提取和 S4 片段的纯化

采用水饱和酚抽提、LiCl 分级沉淀法, 从接种 BYD 株呼肠病毒的 L929 细胞中提取呼肠病毒基因组 RNA, 详见文献<sup>[4]</sup>。用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, QIAquick Gel Extraction Kit 试剂盒纯化 S4 片段。

### 1.8 全长 cDNA 克隆

采用改进的单引物扩增技术, 获得 S4 片段的全长 cDNA 克隆。主要过程如下: 用 T4 RNA 连接酶将引物 5'PO<sub>4</sub>-AggTCTCgTAgACCgTgCACCC(A)<sub>17</sub>-NH<sub>2</sub>3' 连接到 S4 片段的 3' 端, 用 oligo(dT)<sub>18</sub> 在 Superscript II 逆转录酶的作用下合成 cDNA, 用引物 5'-ggTgCACggTCTACgAgA CCT 3' 扩增获得 S4 片段的全长 cDNA, 详见文献<sup>[5]</sup>。用 TaKaRa 公司的 pMD18-T 载体克隆 PCR 产物, 任意选择 3 个克隆委托上海博亚公司进行测序。

### 1.9 序列分析

用 ClustalW 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) 对 S4 片段的核苷酸序列和编码蛋白的氨基酸序列与已知呼肠病毒 1~3 型标准株核苷酸序列和推测的氨基酸序列进行比对分析。比对结果用 GeneDoc 软件 (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>) 进行编辑。

## 2 结果

### 2.1 细胞敏感性试验

BYD 株呼肠病毒液同时用 Hep-2、DK、L929 和 LLC-MK<sub>2</sub> 细胞做微量滴定。在 Hep-2 和 DK 细胞上培养 3~4d 开始产生 CPE, 其 TCID<sub>50</sub>/0.025 mL 是 1.5 和 2.0; 在 L929 和 LLC-MK<sub>2</sub> 细胞上培养 2~3d 开始产生 CPE, 其 TCID<sub>50</sub>/0.025 mL 是 3 和 3.5 (见表 1)。结果显示, BYD 株呼肠病毒对 L929 和 LLC-MK<sub>2</sub> 细胞较敏感, 病毒滴度较高。

表 1 呼肠病毒 BYD 株的细胞敏感性试验

Table 1 Results of cell sensitivity of reovirus BYD strain		
Cells	Days of CPE appearance	Viral titers (TCID <sub>50</sub> /0.025mL)
Hep-2	3~4	1.5
DK	3~4	2.0
L929	2~3	3.0
LLC-MK <sub>2</sub>	2~3	3.5

### 2.2 理化性质试验

用 LLC-MK<sub>2</sub> 细胞对 BYD 和 BYL 株病毒液做耐乙醚、耐酸 (pH3.0)、耐热 (56℃, 30min) 和病毒核酸型测定。结果显示 BYD 株和 BYL 株病毒都耐乙醚、不耐酸、不耐热, 且不受 5-IUDR 的抑

表 2 呼肠病毒 BYD 和 BYL 株的理化性质试验  
Table.2 Results of physico-chemical property of reovirus

Test group	Viral titers (TCID <sub>50</sub> /0.025 mL) #	
	BYD(18)	BYL (9)
Ether	3.5	4.0
Acid (pH 3.0)	<1.0	1.0
Heat (56°C 30min)	<1.0	<1.0
Nucleic acid	3.3	3.5
Virus control	3.5	4.0

# Determined in LLC-MK<sub>2</sub> cell

制 (见表 2), 说明这两株病毒属无包膜、不耐酸和不耐热的 RNA 病毒。

2.3 血凝试验

BYD、BLD、JP 和 BYL 株病毒经 LLC-MK<sub>2</sub> 细胞培养收获的病毒液能与人 O 型红细胞出现凝集, 血凝滴度分别为 1: 32、1: 16、1: 8 和 1:32。

2.4 形态学观察

用透射电子显微镜观察, 可查见感染细胞胞浆内靠近核膜处有大量病毒性包涵体 (见图 1A), 以及胞浆内聚集在一起、不同发育阶段、直径为 70nm~80nm 的病毒颗粒, 其中成熟的病毒颗粒可明显分辨出双层衣壳 (见图 1B)。

2.5 序列测定及同源性比较

测定 BYD 株 S4 片段全长为 1196bp, 已登录 GenBank (登录号 DQ318037), 与已知呼肠病毒 T1L、T2J 和 T3D 的核苷酸序列的同源性分别为 84%、78% 和 85%, 推测的氨基酸序列的同源性分别为 95%、90%和 95% (见图 2)。

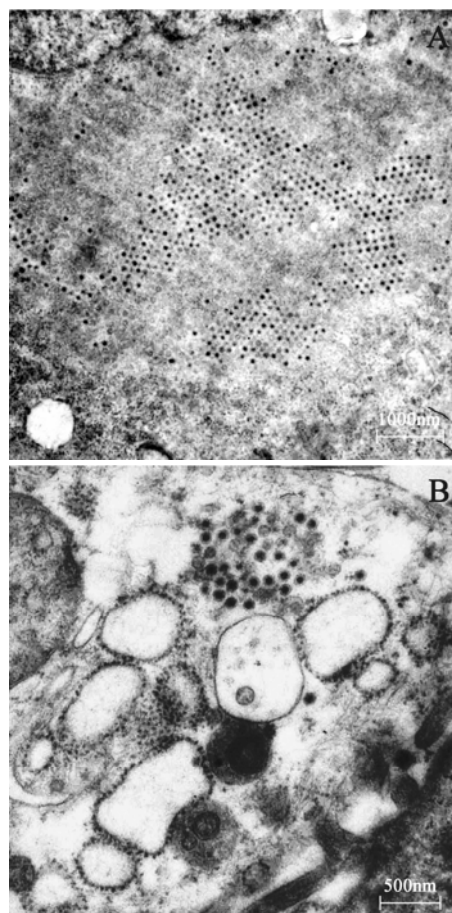


图 1 呼肠病毒 BYD 株感染 LLC-MK<sub>2</sub> 细胞的电镜照片  
Fig.1 Electron micrograph of LLC-MK<sub>2</sub> cells infected with reovirus BYD strain  
A: Viral inclusion bodies in infected cytoplasm; B:Virus particles of different development stage in infected cytoplasm.

	10	20	30	40	50	60	70	80
T1L :	MEVCLPNGHQIVDLINNAFEGRVSIYSAQEGWDKTISAQPDMMVCGGAVVCMHCLGVVGSQRKCLKLPHHRCNQIRHQ							
T2J :	.....W.....Q.....K.....L.Q.							
T3D :	.....v.....							
BYD :	.....V.....Q.....							
	90	100	110	120	130	140	150	160
T1L :	DYVDVQFADRVTAHWKRGMLSFVAQMHAMMNDVSPEDLDRVRTEGGSLVELNWLQVDPNSMFRSTHSSWTDPLQVDDLD							
T2J :	.....S.....I.....T.....E.....D.....A.....G.....E...							
T3D :	.....E.....D.....R.....							
BYD :	.....A.....D.....N.....E...							
	170	180	190	200	210	220	230	240
T1L :	TKLDQYWTALNLMIDSSDLVPNFMMRDPHAFNGVRLEGDARQTQFSRTFDSRSSLEWGVVMVYDYSELEHDPKGRAYRK							
T2J :	..Q..R.....K..E.....N.....I.....R..L.....							
T3D :	.....I.....K.....							
BYD :	....C...SI.....K.....P.....L.....R							
	250	260	270	280	290	300	310	320
T1L :	ELVTPARDFGHFGLSHYSRATTPILGKMPAVFSGMLTGNCKMYPFIKGTAKLKTVRKLVDSNHAWGVVEKIRYALGPGGM							
T2J :	..V.....R..K...A...T..S.....							
T3D :	.....EA.....							
BYD :	....P.....A.....							
	330	340	350	360				
T1L :	TGWYDRMQQAPIVLTAAALTMFSDTTKFGDLLDYPVMIGDPMILG							
T2J :	...N.....P.M.....Q..I.....AV..							
T3D :	...N.....P..I.....N.....							
BYD :	...N.....P.....N...T.....							

图 2 呼肠病毒 BYD 株与已知呼肠病毒 1~3 型标准株 S4 片段氨基酸序列的比较  
Fig.2 The amino acid sequence comparison of reovirus between BYD isolate and standard 1~3 type





### 3 讨论

本室 2003 年从临床确诊的 SARS 患者标本中分离到 4 株呼肠病毒, 经两次空斑克隆分纯。呼肠病毒能在许多传代细胞上生长, 1982 年 Ridinger 等<sup>[6]</sup>报道牛肾细胞、恒河猴肾细胞和人胚肠细胞对呼肠病毒 1~3 型较敏感; 1988 年 Furlong 等<sup>[7]</sup>报道在 L929 细胞上易产生空斑。本研究选用 4 种传代细胞对新分离呼肠病毒 BYD 株进行敏感性试验, 结果表明 BYD 分离株对 Hep-2 和 DK 细胞敏感性较差, 对 L929 和 LLC-MK<sub>2</sub> 细胞敏感性较好。随后我们用 L929 细胞对新分离呼肠病毒成功地建立了空斑技术<sup>[2]</sup>, 并用 LLC-MK<sub>2</sub> 细胞对新分离呼肠病毒进行了理化性质试验。

新分离呼肠病毒 BYD 株和 BYL 株为耐乙醚、不耐酸和不耐热的 RNA 病毒; 4 株呼肠病毒均能与 O 型红细胞产生凝集, 血凝滴度 1: 8~1: 32。电镜下观察呼肠病毒在宿主细胞胞浆内装配, 球形, 直径为 60nm~80nm。从理化性质、血凝活性和形态学结果表明, 该病毒符合呼肠病毒科的特征。

呼肠病毒的核酸分节, 有 10 个片段组成, 其中 S4 片段比较保守。BYD 株呼肠病毒 S4 片段的核苷酸序列全长 1196bp, 与已知呼肠病毒 1~3 型标准株的同源性分别为 84%、78%和 85%, 推测的氨基酸序列同源性分别为 95%、90%和 95%, 该结

果从分子水平上证明新分离株为呼肠病毒。

### References

- [1] Duan Q, Zhu H, Yang Y, *et al.* *Reovirus*, isolated from SARS patient [J]. *Chin Sic Bull*, 2003, 48 (13): 1293-1296.
- [2] Su Y X, He J, Zhu H, (苏裕心, 何君, 朱虹) *et al.* Plaque assay and purification of new isolated *reovirus* strains [J]. *Bull Acad Mil Med Sic* (军事医学科学院院刊), 2005, 29 (5): 418~420.
- [3] Li Q H, Huang R T, Wei S J, (李庆虹, 黄如统, 魏绍静) *et al.* Study on genetic and biological character of sporadic strains of acute HEV in Guangzhou [J]. *Virologica Sinica* (中国病毒学), 2000, 15 (1): 39-44.
- [4] Diaz-Ruiz J R, Kaper J M. Isolation of viral double-stranded RNAs using a LiCl fractionation procedure [J]. *Prep Biochem*, 1978, 8: 1-17.
- [5] Lambden PR, Cooke SJ, Caul EO, *et al.* Cloning of noncultivable human rotavirus by single primer amplification [J]. *J Virol*, 1992, 66: 1817-1822.
- [6] Ridinger D N, Spendlove R S, Barnett B B, *et al.* Evaluation of cell lines and immunofluorescence and plaque assay procedures for quantifying *reoviruses* in sewage [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 43 (4): 740-746.
- [7] Furlong D B, Nibert M L, and Fields B N. Sigma 1 protein of mammalian *reoviruses* extends from the surfaces of viral particles [J]. *J Virol*, 1988, 62 (1): 246-256.