

兔 的 一 种 新 病 毒

II. 一株兔出血症病毒的某些理化性质的研究

郑 红 赵 林 孙富林

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

采用氯仿-聚乙二醇-硫酸葡聚糖钠盐二相系统和蔗糖密度梯度离心法, 从患病兔肝组织中提取、纯化病毒。该病毒粒子无囊膜, 呈 20 面体对称, 直径一般为 33—37 nm。其三角剖分数 $T=3$, 共有 32 个子粒, 每一子粒为中空的、外径为 9 nm 左右的圆形轮廓。经蔗糖密度梯度离心后, 可获得沉降系数为 166 S 的病毒颗粒, 这种颗粒具有很强的感染性。经 SDS-PAGE 测得病毒粒子有四种多肽, 分子量分别为 66.4 k、65.0 k、63.5 k、41.0 k。二苯胺试验, 吡啶橙染色、甲醛试验及热变性曲线表明, 该病毒是单链 DNA 病毒。电镜下经甲酸胺法展层的病毒核酸呈单链线状, 分子量平均为 2.1×10^6 道尔顿。此病毒的上述性质类似于细小病毒。53° 中空的圆形子粒, 有很强的血凝性, 而对照组铁蛋白和同一条件下所制备正常兔肝成份无凝血特性, 说明 53° 的 9 nm 粒子应为病毒外壳蛋白子粒。

关键词 兔出血症病毒; 病毒粒子

自 1984 年初次在我国发现兔出血症病毒以来, 陆续发表了一些关于不同发病地区的兔出血症病毒 Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV) 的研究报告^[1-7]。但就该病毒的性质存在着不同的认识, 其差别着重在病毒核酸是 DNA^[3] 还是 RNA^[1,2], 后争鸣在于病毒的核酸是单链^[2] 还是双链^[1,3], 对于所分离到的小颗粒是病毒降解的亚单位还是铁蛋白, 认识不一。为此, 作者以武汉第二制药厂兔自然患病肝组织中提取、纯化的病毒为材料, 通过病毒接种、传代, 对其形态观察, 蛋白多肽分析, 核酸类型和链数的确定, 以及蛋白亚单位的性质做了研究, 为 RHDV 的分类归属提供了一些依据。

材 料 与 方 法

(一) 病毒的提纯

RHDV 来源: 武汉第二制药厂自然发病病死的兔肝组织, 由本所保藏室提供。病肝组织加 10 倍 PBSE (0.15 mol/L pH 7.2) (W/V) 匀浆, 经 1:1 氯仿去脂后, 加入 6.5% PEG 6000、0.2% DSS 50000^[8] 搅拌分相, 浓缩的病毒经一次差速离心 (11000g 15 分钟, 125000g 90 分钟, 4℃) 后, 经 10—40% 蔗糖连续密度梯度离心^[9] (170000 g 3.5 h, 10℃) 即得到纯病毒。

(二) 病毒粒子形态结构的观察

采用悬滴法^[10] 分别取纯化的病毒悬液和小颗粒各一滴, 分别滴于粘有 Formvar 膜的

本文于 1991 年 4 月 24 日收到。

纯化工作得到中国科学院生物物理研究所毕次华等同志的大力支持, 特此致谢。

铜网上,以 3% 的磷钨酸染色,自然干燥后在电镜下观察。

(三) 病毒的蛋白多肽

按常规 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 法进行测定和计算^[11],采用二相胶系统,浓缩胶为 4%,分离胶为 10%。标准参照蛋白为国产标准蛋白系统: 磷酸化酶 B 94 k, 牛血清 67 k, 肌动蛋白 43 k, 碳酸酐酶 30 k, 烟草花叶病毒外壳蛋白 17.5 k。电泳时电流为 10—35 mA, 电泳时间为 3.5 小时左右。电泳后用 0.05% 考马斯亮蓝 R250 染色过夜。

(四) 病毒核酸的性质

1. 核酸的提取: 参照 D. C. Kelly 等人方法^[12],在低盐、高盐环境中提取病毒核酸。

2. 核酸类型的测定: 按常规方法对病毒核酸进行二苯胺、地衣酚试验^[11]。

3. 核酸链数的测定:

(1) 病毒粒子的吖啶橙染色: 按 H. D. Mayer 等人方法进行染色^[13]。取 M13 DNA (SS) 和蓖麻蚕 NPV (含 ds-DNA) 经 2% SDS 于室温下作用 45 分钟后,立即于荧光显微镜下观察,选用蓝色滤光片,入射光波长范围为 350—600 nm。

(2) 病毒粒子的甲醛反应试验^[12]: 纯化病毒经 0.07 mol/L PBE, pH 7.2 充分透析后,加入新鲜甲醛溶液至终浓度为 2%, 37℃ 保温,分别作用 0 小时、24 小时进行紫外波段 (200—350 nm) 扫描。

(3) 病毒核酸的热变性曲线的测定: 适当稀释病毒核酸悬液,使其紫外吸收在 0.2—0.4 之间。分别取高盐、低盐核酸样 (见前报中核酸的提取) 于紫外扫描仪中自控加工 (4.5—100℃),记录温度和紫外吸收值的变化,并绘出热变性曲线。

(4) 病毒核酸的电镜观察: 采用甲酰胺-细胞色素 C 法进行病毒核酸分子展层。上相液含 50% 甲酰胺, 0.1 mg/ml 细胞色素 C, 适当稀释的核酸溶液, 1/15 mol/L PBE, 下相液含 20% 甲酰胺。1/100×1/15 mol/L PBE, 展层后用喷碳的 Formvar 膜粘附,经无水乙醇脱水后,以 5°—7° 角喷镀铂钯合金后观察。

结 果

(一) 病毒的纯化

获得的纯化病毒悬液的紫外吸收曲线具有典型的核蛋白吸收峰的特征,最大吸收值在 260 nm 附近,260 与 280 nm 的 OD 值比为 1.707,电镜下可见形态均一的病毒粒子 (图版 I-1)。

用蔗糖密度梯度离心,在提纯病毒过程中观察到离心管从上到下分为三个组分,在离心机上测定每一组分的沉降系数^[6],并将每一组分制样于电镜下观察。结果发现,组分 1 的 $S_{20w} = 53$,形态为 9 nm 左右的中空圆形颗粒 (图版 I-2); 组分 2 的 $S_{20w} = 130$,形态为中空病毒颗粒 (图版 I-3); 组分 3 的 $S_{20w} = 166$,形态为完整的病毒颗粒 (图版 I-1),大部分为实心的,形态结构和大小均一。曾有作者认为组分 1 是铁蛋白。为此,我们做了血凝试验,发现 $S_{20w} = 53$ 的中空圆形粒子和 $S_{20w} = 166$ 的实心完整病毒颗粒具有相同的血球凝集结果。用提纯病毒同法所制备的正常兔肝成份未见有 9 nm 样物,同时正常兔肝成份以及铁蛋白均无血凝现象。因此,形态为 9 nm 左右的中空圆形颗粒,应

是病毒外壳降解亚单位而非铁蛋白。

(二) 病毒的形态结构

病毒粒子无囊膜,直径在 33—37 nm。病毒呈 20 面体对称,颗粒表面由外径约 9 nm 左右的中空子粒组成,面的三角剖数 $T=3$ 有 $10T+2=32$ 个子粒,有 $60T=180$ 个结构亚单位^[4](图版 I-4)。病毒外壳的结构不完全同于细小病毒,其细微结构正在深入研究中。

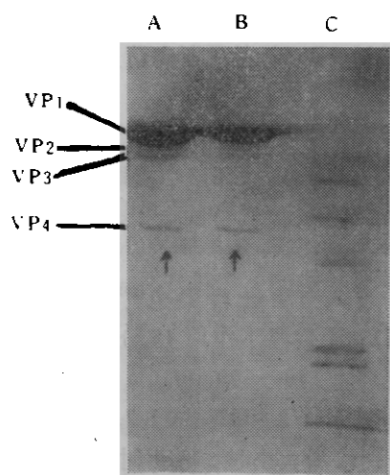


图 1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶图(示 RHDV 多肽)

A. $S_{20,w}=130$ 。B. $S_{20,w}=166$ 。C. 正常兔肝(同上法提取成分)。

Fig. 1 SDS-PAGE of components of the RHDV

A. Component 2 $S_{20,w}=130$ 。B. Component 3 $S_{20,w}=166$ 。C. Control (sound rabbit livers in accordance with purifying sequence but with no sucrose density gradient centrifugation).

The arrowhead showed VP4

VP1 66.4 VP2 65.0 VP3 63.5 VP4 41.0

(三) 病毒的蛋白多肽

由于沉降系数分别为 130s 和 166s 的病毒颗粒在外壳组成上是相同的。因此,二者在进行病毒的蛋白多肽分析时,分别取样进行 SDS-PAGE,染色后可见二种不同沉降系数的颗粒均有四条多肽,分子量雷同,分别为 VP1 66.4k, VP2 65.0k, VP3 63.5k, VP4 41.0k (图 1)。其中 VP1 为主要蛋白。

(四) 病毒核酸的性质

1. 核酸的提取: 提取的核酸具有典型的核酸紫外吸收曲线特征, $OD_{260/280}=1.86$

2. 核酸类型的测定: 病毒核酸的二苯胺反应呈阳性(蓝色),地衣酚反应为阴性(非绿色),病毒核酸应为 DNA。

3. 病毒核酸链数的测定:

(1) 病毒粒子的吡啶橙染色: 吡啶橙荧光染料与双链核酸结合发绿色荧光,与单链核酸结合发红色荧光。病毒经吡啶橙染色后发红色

荧光,表明其核酸为单链,与对照 M13 DNA (SS) 一致,与 NPV (ds-DNA) 则相反。

(2) 病毒粒子的甲醛试验: 双链核酸中由于碱基的堆集,使其不能有效地和甲醛发生反应。而单链核酸,游离的碱基能自由地与甲醛反应,并因此引起紫外吸收值的增加及吸收峰向长波方向发生小的偏移^[15]。病毒经 2% 甲醛作用 24 小时后,紫外吸收峰由原来的 265 nm 移至 268 nm,最高峰吸收总增值为 14%,260 nm 处吸收增值为 12%。结果表明, RHDV 所含的是单链核酸 (图 2)。

(3) 病毒核酸的热变性曲线的测定: 分别对高、低盐病毒核酸溶液进行热变性,在 45℃—100℃ 范围内无明显的增色效应,曲线平缓,最大增值为 5—6%,表明病毒核酸为单链,且病毒粒子中只包含有一种链性核酸,正链或者是负链 (图 3)。

(4) 病毒核酸的展层: 病毒核酸展层电镜观察呈线状单链,通过测定核酸链长度,求得分子量约为 2.1×10^6 道尔顿 (图版 I-5)。

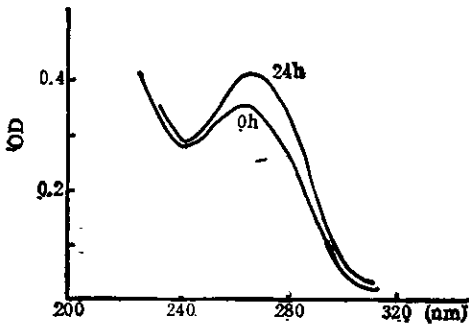


图2 2% 甲醛作用对 RHDV 紫外吸收的影响

Fig. 2 Effect of formaldehyde on the absorption spectrum of the RHDV at 0hr, 24hr, after adding 2% formaldehyde

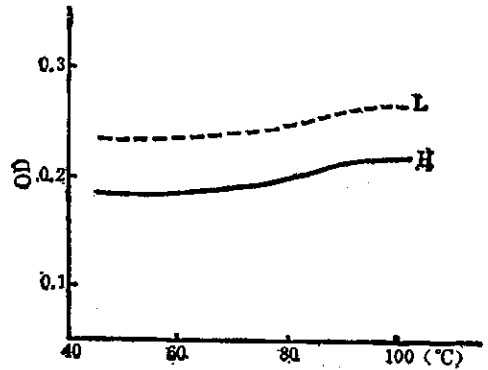


图3 RHDV 的热变性曲线

H: 高盐环境——PBSE L: 低盐环境——0.07 mol/L PBE

Fig. 3 Curves of thermal denaturation of the RHDV DNA

H: High salt buffer PBSE L: Low salt buffer 0.07 mmol/L PBE

讨 论

用二苯胺试验检测核酸的类型是一种经典的方法。从高浓度和较高纯度的病毒中提取的病毒核酸对二苯胺试剂的反应是可靠的, 因此 RHDV 是含 DNA 的病毒。鉴于 RHDV 是单链还是双链核酸的问题有不同的认识。为防止病毒核酸从衣壳中释放出来后, 有可能由于核酸间碱基的互相互补配对, 在外观上反应出双链的性质, 在对病毒核酸做链数分析时, 选用了病毒粒子和病毒核酸为材料, 以比较核酸在原位(即病毒内)和离体环境中的表现是否一致。实验结果表明, 两者都一致表现为单链核酸, 从而肯定了 RHDV 为单链。而且病毒核酸的热变性曲线表明 RHDV 含有的是单一型的链性, 是正链或者是负链。上述结果说明, 这种病毒是一种 33—37 nm 大小, 无囊膜, 含单链线状的 DNA 的 20 面体病毒, 可能有四种蛋白多肽。已有报道表明, RHDV 能抗热、抗酸、抗乙醚、抗氯仿^[1,3], 具有较窄的血凝谱^[1,6], 在细胞膜内增殖^[3,16]。根据国际病毒分类委员会第四次报告^[17], RHDV 与细小病毒科(Parvoviridae)中的自主型细小病毒某些性质相类似。RHDV 具有自主型细小病毒所具有的三大特性, 即: 独立复制、单链线状 DNA、对外界环境有较强的抵抗力。因此 RHDV 的性质类似于细小病毒科。RHDV 分类地位的最后确定, 有待于按照病毒分类与命名的 8 项标准完善实验数据, 逐一对照定论。

感染试验表明沉降系数 166s 的完整粒子具有很强的感染性, 而 130s 的空壳颗粒无感染性, 但二者有同样的 4 种多肽, 且分子量一致。说明前者为成熟病毒, 而后者为流产病毒。

参 考 文 献

- [1] 杜念兴等: 病毒学报, 2(2): 146—151, 1986。
- [2] 邓正文等: 实验生物学报, 19(1): 137—141, 1986。
- [3] 沈学仁等: 病毒学报, 2(4): 320—326, 1986。

- [4] 周 鍾等: 病毒学报, 2(3): 269—270, 1986。
- [5] 孙富林等: 微生物学报, 28(2): 183—185, 1988。
- [6] 宋宝云等: 湖北畜牧兽医, 2: 21—22, 1987。
- [7] 杨学楼等: 病毒学杂志, 2: 188—192, 1989。
- [8] Maramorosch, K.: *Methods in Virol.*, 2: 2—13; 315, 1967.
- [9] McEwen, C. R. et al.: *Anal. Biochem.*, 20: 114—149, 1967.
- [10] 朱丽霞等: 生物学中的电子显微技术, 北京大学出版社, 北京, 第 77, 226 页, 1983。
- [11] 沈 嗣等: 生物化学实验技术与方法, 上海科学技术出版社, 上海, 第 94—112, 219—220 页, 1984。
- [12] Kelly, D. C. et al.: *J. Virol.*, 21(1): 396—407, 1977.
- [13] Mayer, H. D. et al.: *Virol.*, 14: 74—82; 264—266, 1961.
- [14] 卢礼亚等: 普通病毒学, 上海科学技术出版社, 上海, 第 29 页, 1987。
- [15] Helenc, W. et al.: *Virol.*, 33(3): 617—621, 1961.
- [16] 余锐屏等: 中国兽医杂志, 12(9): 2—4, 1986。
- [17] 马修斯, R. E. F.: 病毒的分类与命名, 科学出版社, 北京, 第 113—119 页, 1987。

A NEW VIRUS OF RABBIT

II. STUDY ON MORPHOLOGICAL STRUCTURE AND SOME PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF A STRAIN OF RABBIT HEMORRHAGIC DISEASE VIRUS

Zheng Hong Zhao Lin Sun Fulin

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

In this paper a strain of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV) was isolated and purified from the diseased rabbit livers with a method of using chloroform, two-phase of polyethylene-glycol-dextran sulfate sodium and sucrose density gradient centrifugation. Purified virus was nonenveloped, icosahedral symmetry with a triangulation number of 3, and 33—37 nm in diameter. The capsid was composed of 32 capsomeres with central holes in an outer diameter of about 9nm. Two types of viral particles having different sedimentation coefficient, 130s and 166s could be identified after sucrose density gradient centrifugation. Probably no less than four virion proteins with molecular weight of 66.4, 65.0, 63.5, 41.0×10^4 dalton were detected by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Viral nucleic acid was extracted from purified virus by using SDS-proteinase K-phenol. Tests with diphenylamine, formaldehyde, and staining with acridine orange as well as the curves of thermal denaturation showed that this kind of virus had a single-stranded DNA. The molecular weight of the ssDNA was approx 2.1×10^6 dalton as determined by electron microscopy.

Data indicate that the RHDV may like the parvovirus of the family Parvoviridae.

Key words

RHDV; Virion