

兔 的 一 种 新 病 毒

III. 兔出血症病毒形态的超微结构和抗原性的研究

赵 林 李天宪 宋宝云 孙富林

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

1986年春,武汉市第二制药厂(WSPMM)试验用家兔突然口鼻渗出鲜血,几乎全部猝死。作者观察了罹病死亡的症状,认为此病例与黄印尧等所报道的相同。湖北省中医药研究院(HTCMI)也发生此病的流行。作者对这两种不同来源的病料,进行相同的处理,提取病毒粗纯物,回接同种动物,可引起同样典型的发病症状。进一步将死亡兔的肝、脾等脏器组织匀浆。经低速、高速、超速和蔗糖密度梯度离心后制样,电镜观察可见典型的病毒粒子。以上两种病毒粒子制备的抗血清和南京农业大学的兔出血症病毒抗原在双扩散沉淀中,产生典型的沉淀反应,说明三种病毒抗原的一致性。但是湖北株、南京农业大学病毒株抗原和日本细小病毒的抗血清,在双扩散反应时均无沉淀反应。湖北株病毒的形态大小、超微结构、外壳蛋白的多肽和血清学特性,均不同于标准兔细小病毒,可能是一新的病毒。

关键词 兔出血症病毒;兔细小病毒;抗血清

作者对来自湖北省武汉市第二制药厂和湖北省中医药研究院的兔出血症病毒形态的超微结构和抗原性进行了研究,现将结果报道如下。

材 料 与 方 法

(一) 病毒株

1. 由南京农业大学兽医微生物教研组赠送的兔出血症病毒毒株。
2. 从武汉市第二制药厂和湖北省中医药研究院的病死兔的脏器分离的病毒株。
3. 日本国立健康研究所的 Dr. Y. Matsunaga 赠送兔细小病毒抗血清。

(二) 病毒的增殖、分离和提纯

将上述病料用生理盐水进行 10 倍稀释,匀浆,室温低速离心 30 分钟,每只 2kg 左右的健康大耳白兔注射 2ml,试验兔约在 48 小时左右死亡。取人工接种病毒致死兔的肝、脾、肺等脏器进行血球凝集试验,测定其血凝效价。选择高效价的病料(一般在 1:640 以上),用两倍的生理盐水稀释,高速组织匀浆器匀浆,1—20000r/min 离心 5 分钟,再以 $21500 \times g$ 8℃ 离心 30 分钟。取上清液经滤纸过滤,再加 4℃ 等体积的氯仿,置 4℃ 10 分钟,摇动 3 次。再以 $17200 \times g$ 8℃ 离心 30 分钟,取水相,以 $56577 \times g$ 13℃ 离心 5 小时,取沉淀,加少量 TE 缓冲液 (10mol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH8.0) 匀浆悬浮。进一步采取 15—50% 不连续蔗糖梯度离心,最上层铺 1 ml 病毒悬液,以 $170000 \times g$ 8℃

离心 150 分钟。分别吸取上下两区带,经两倍 TE 缓冲液稀释,再以 $56577 \times g$ 13°C 超速离心 5 小时。其沉淀用少量 TE 缓冲液稀释,匀浆悬浮,再以 $21500 \times g$ 8°C 离心 30 分钟,其上清液病毒悬液作为电镜观察材料,置冰箱备用。

(三) 电镜观察

取病毒悬液一滴,置火棉胶膜铜网上,5 分钟后用滤纸吸干,加 2% 的磷钨酸负染,于 JEM-100C 电镜下观察记录。

(四) 血清学试验^[1]

1. 制备抗血清: 用南京农业大学、湖北省中医药研究院、武汉市第二制药厂的兔出血症病毒株为抗原,人工感染健康大耳白家兔。取病死兔的肝脏,测血凝效价。用高效价的肝等脏器制作疫苗。经无菌检查,安全试验和效力试验合格后,即可使用。

每只健康家兔注射上述疫苗 2ml,7 天后分别将病毒致死的兔肝,用两倍生理盐水稀释,匀浆,室温低速离心 15 分钟。取上清液加等量福氏完全佐剂,在兔背部皮下三点注射。每周注射一次,注射 3 次。最后一次用不含佐剂的病毒悬液,耳静脉注射 4ml,一周后采血。G₅ 细菌漏斗过滤除菌,分装小瓶,置 -20°C 冰箱备用。

2. 琼脂糖双扩散试验: 在 pH8.4 0.015mol/L 巴比妥钠缓冲液中加入 1% 琼脂糖,加热融化倒平板,打梅花形孔,中间孔加入病毒,周围小孔加入不同毒株所制备的抗体,置 37°C 24 小时进行扩散反应。

3. 不连续对流免疫电泳: 利用微量血清技术进行不连续对流免疫电泳^[2],测定病毒抗原性。这比双扩散技术灵敏度高,已为许多科学家所证实。我们用移液管取 0.9% 的琼脂糖胶 (0.9% 琼脂溶于 0.15mol/L 巴比妥钠 pH8.4 缓冲液内加温溶解) 适量,覆盖于 $2.6 \times 7.5\text{cm}$ 载玻片上,待胶凝固后,用 4mm 直径打孔器,成对打孔,孔间距为 3mm,一侧孔加南京农业大学病毒抗原,一侧孔加湖北中医药研究院分离株、日本兔细小病毒标准株和武汉市第二制药厂分离株的抗血清。抗血清端电源为正极,抗原病毒端为负极,缓冲液为 0.075mol/L pH8.4 的巴比妥钠,以 5V/cm 电压,电泳 45—60 分钟。

结 果

(一) 病毒分离

在分离提纯病毒过程中发现,具有血凝活性的病死兔脏器组织经提纯后,电镜下可见有典型的病毒颗粒(图 1),而不具血凝活性的脏器组织,同法分离提纯后的材料,则未见有病毒颗粒。

(二) 病毒形态结构

电镜观察,在低倍镜下观察不到精细结构,只能看到大量形态一致的病毒颗粒,与余锐萍^[3]等人报道的一致,似球状,形态类似于细小病毒(图 1)。但是在放大 20 万倍以上观察时,其超微结构和细小病毒绝然不同,类似于嵌杯样病毒的杯状结构(图 2),极似人嵌杯样病毒,但又不绝对相同,对兔出血症病毒这一结构的发现,至今国内外未见报道,尚属首次。

(三) 病毒抗原性质

病毒免疫扩散试验结果(图 3)表明,兔出血症病毒、南京农业大学、湖北及武汉株所

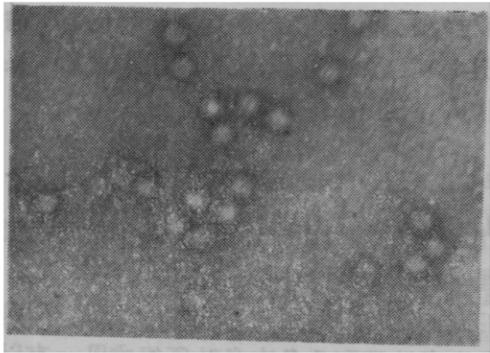


图1 低倍电镜下的病毒粒子(65700×)

Fig. 1 Low power electro microscope viroin morphology like Parvovirus

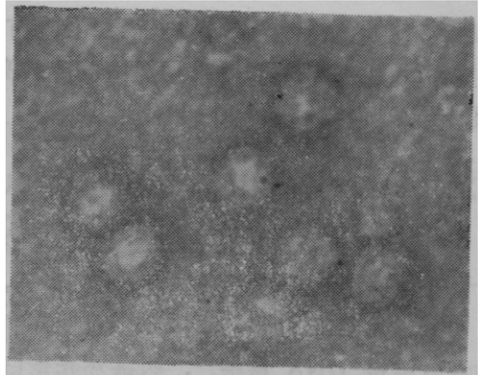


图2 高倍电镜下的病毒粒子(243000×)

Fig. 2 High power electro microscope viroin morphology like Calicivirus

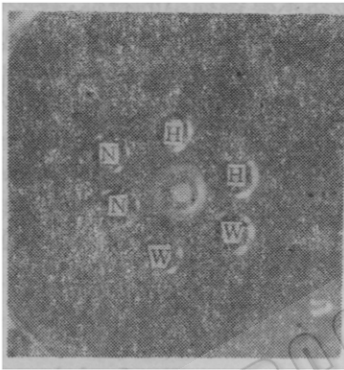


图3 抗原抗体双扩散

中心孔为 RHDV (南农株)抗原;H.湖北株抗血清;
W. 武药株抗血清; N.南农抗血清。

Fig. 3 Agar gel immunodiffusion
Central hole: RHDV antigen (NAU); Antiserum: H. HTCMi; W. WSPMM; N. NAU.

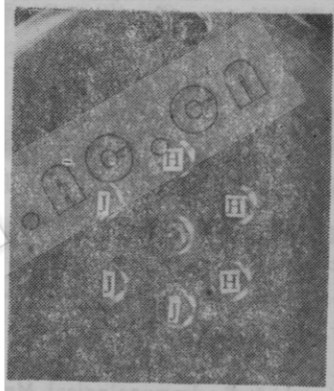


图4 抗原抗体双扩散

中心孔为 RHDV (南农株)抗原; H.湖北株抗血清;
J.日本标准兔细小病毒抗血清。

Fig. 4 Agar gel immunodiffusion
Central hole: RHDV antigen (NAU); Antiserum: H. HTCMi; J. Standard antiserum of Japanese Parvovirus of rabbit.

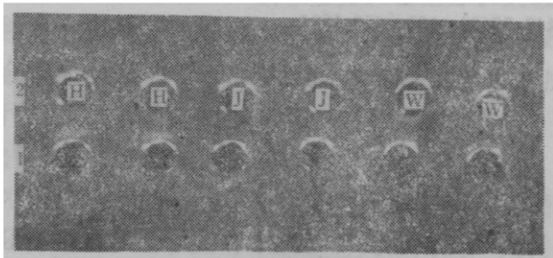


图5 对流免疫电泳

1排: 兔出血症病毒抗原; 2排: H.湖北株抗血清; J.日本标准兔细小病毒抗血清; W.武药株抗血清。

Fig. 5 Counter immuno electrophoresis

1: Antigen of RHDV (NAU); 2: Antiserum: H. HTCMi; J. Standard antiserum of Japanese Parvovirus; W. WSPMM.

制抗血清,对南京农业大学病毒抗原,可产生明显地融合沉淀线,说明三者抗原性的一致性。而图4 湖北株和日本赠送的兔细小病毒抗血清,对南京农业大学病毒抗原,双扩散试

验时,前者有明显地沉淀反应,而后者没有任何沉淀反应,说明兔出血症病毒和兔细小病毒抗原性的绝然不同,此外用灵敏度比较高的不连续对流免疫电泳,也得到了相同的结果(图5)。

讨 论

自1984年首次报道在福建省大田县发生兔出血症的流行以来,不到10年该病已流行于亚欧美诸国。该病发病急,死亡率高,为病理学家、病毒学家所关注。

经过几年来的研究,国内对兔出血症病毒的某些方面,得到了较为一致的认识。即病毒含有单链DNA核酸^[4],病毒外壳蛋白为一条主多肽带和几条次多肽所组成^[5]。有以此为据,把它归类于细小病毒科、细小病毒属,但多数学者认为其某些性质类似于细小病毒。我们研究结果,对病毒的形态结构有着不同的看法和新的认识,因为该病毒大小超出了细小病毒直径18—26nm^[6]范围,而是33—39nm,显然不具备细小的特征,其形态精细结构也不同于细小病毒,蛋白亚单位也有差别。标准兔细小病毒的蛋白亚单位组成,为六边形柱状结构,兔出血症病毒精细结构又似人的嵌杯样病毒,为杯状结构。更重要的是其病毒抗原性和兔细小病毒不同。病毒蛋白多肽为四条^[4,7],也不同于细小病毒。鉴于以上特性,我们认为兔出血症病毒,不能归属于目前已知的59个科,而应列为一个新的科。国内外对兔出血症病毒在分类学上的认识不一,这很像嵌杯样病毒分类情况,早期有研究者将其归于微核糖核酸病毒科,经深入研究后,订为一新的嵌杯样病毒科。

参 考 文 献

- [1] Ackroyd, J. F.: Immunological Methods, by Adlard & Son LTD, The Partholomew Press, Oxford, pp. 56—57, 1964.
- [2] Sun Fulin et al.: *J. of Invertebrate Pathology*, 46:121—124, 1985.
- [3] 余锐萍等: 中国兽医杂志, 12(9): 2—4, 1986.
- [4] 杜念兴等: 中国农业科学, 24(1): 1—10, 1991.
- [5] 巫爱珍等: 病毒学报, 6(4): 332—334, 1990.
- [6] Matthews, R. E. F.: Classification and Nomenclature of Viruses, Fourth, Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Medical and Scientific Pub., Basel, Munchen, Paris, London, New York, Tokyo, Sydney, pp. 72—75, 1987.
- [7] 郑 红等: 微生物学报, 32(3): 198—203, 1992.

A NEW VIRUS OF RABBIT

III. STUDY ON MORPHOLOGICAL SUPERSTRUCTURE AND ANTIGEN-ICITY OF RABBIT HEMORRHAGIC DISEASE VIRUS (RHDV)

Zhao Lin Li Tianxian Song Baoyun Sun Fulin

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

In the spring 1986, an acute infectious disease occurred in Wuhan Second Producing Medical Manufactory, and the rabbit almost died. We tested the mortal symptom and confirmed rabbit Hemorrhagic Disease (RHD) as same as Huang Yinyao report. Hubei Traditional Chinese Medicine Institute appear this RHD also. After we purified virus of above two source by low speed, high speed and sucrose density gradient centrifugation, they can react with antiserum of RHDV from Nanjing Agricultural University in agar gel immunodiffusion tests. These results proved that they belong to the same serotype. Data indicate RHDV have difference morphological superstructure, viral polypeptides and especilly RHDV can't react with antiseum of standard Parvovirus of rabbit and so on, so we suggest RHDV is a new virus.

Key words RHDV; Parvovirus of rabbit; Antiserum