

一株貂肠炎病毒某些特性的研究

冯 锋 李天宪 马志勇*

陈溥言* 赵 林

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

(* 南京农业大学动物医学院 南京 210095)

摘 要 采用猫肾传代细胞 FK 增殖华东地区分离的貂传染性肠炎病毒(mink infectious enteritis virus, MEV-S₁)能产生明显的细胞病变。浓缩的病毒液经 Sepharose-4B 柱层析提纯处理后置电镜下观察,可见典型的病毒粒子。经蛋白酶 K、SDS 裂解病毒,用苯酚-氯仿法抽提病毒核酸,二苯胺试验和酶消化试验表明该病毒核酸为 DNA 类型。吡啶橙染色试验表明该 DNA 为单链。甲酰胺法进行核酸分子展层,病毒核酸呈线状,长度为 1.5~2.0 μ m。

关键词 貂传染性肠炎病毒,细胞病变,病毒核酸

本病首先在加拿大威廉堡地区(Schofield 1949 年)发现。当时通过粪便滤液的人工感染试验,证实是一种病毒性传染病,由 C. Wills 分离鉴定了病原,并命名为水貂肠炎病毒(mink enteritis virus, MEV)。我国于永仁^[1]、张德礼^[2]等先后分离到 8 株貂肠炎病毒,但对它们的研究主要集中在生物学特性方面。张振兴^[3]等 1992 年报道了 MEV-S₁,研制出高效价的灭活疫苗,在此基础上我们在 MEV-S₁ 生物学特性、核酸性质方面做了一些研究,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 病毒株和细胞株

1.1.1 病毒株:供试的 MEV-S₁、猫泛白细胞减少症病毒(FPLV)、鸡减蛋综合症(EDS₇₆)均系南京农业大学惠赠。

1.1.2 细胞株:猫肾传代细胞 FK 从中国兽药监察所购进。

1.2 病毒的增殖

在 100ml 容量的细胞瓶里进行,用异步接种法,即当 FK 细胞长成 75%单层时,倾去培养液,加 1ml 病毒液 37℃ 吸附 1h,补加 9ml 维持液继续培养 4~5d,出现 70%~80% CPE 时收获。

1.3 病毒的浓缩与提纯

将 MEV-S₁ 细胞培养物反复冻融三次,用 GL-20 型高速离心机 8℃ 5850g 离心 1h,除去细胞碎片,上清液用日本产 SCP85H 型超速离心机 8℃ 105630g 离心 2h,弃上清液,沉淀用适量 0.015mol/L pH6.4 PBS 悬浮。浓缩的病毒液经 Sepharose-4B 柱层析提

纯, 柱床体积为 $1.6 \times 50\text{cm}$, 流速为 28ml/h , 在 XZ-85-1 型核酸蛋白检测仪监测下收集 280nm 处洗脱液, 再用 SCP85H 型超速离心机 8°C 105630g 离心 2h, 沉淀用少许 pH6.4 0.015mol/L PBS 悬浮。

1.4 病毒粒子的电镜观察

取提纯病毒一滴于粘有 Formvar 膜铜网上, 数分钟后用滤纸吸去多余的液体, 加 2% 磷钨酸 1 滴, 负染 2~5min, 晾干, 置电镜下观察并摄影记录。

1.5 病毒核酸的性质

1.5.1 核酸的提取: 分别采用 V Hari^[4]和 G K McMaster^[5]介绍的方法提取病毒核酸。

1.5.2 核酸类型的测定: 按常规方法对病毒核酸进行二苯胺^[6]、酶消化^[7]试验。

1.5.3 核酸链数的测定: 按文献[8]介绍的方法进行吖啶橙染色, 用 450nm 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[9]并稍加改进。

1.5.4 病毒核酸的电镜观察: 采用甲酰胺进行核酸分子展层^[10], 展层用的上相液 50 μl 含 pH8.5 0.1mol/L Tris, pH8.5 0.01mol/L EDTA, 50 $\mu\text{g/ml}$ 细胞色素 C, 40% 甲酰胺, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 核酸; 下相液 pH8.5 0.01mol/L Tris, pH8.5 1mmol/L EDTA, 10% 甲酰胺。展层后用喷碳的 Formvar 膜粘附, 脱水后, 以 $6^\circ \sim 7^\circ$ 角喷涂铂钨合金, 电镜下观察、拍照。

2 结果

2.1 病毒的增殖

MEV-S₁ 能在 FK 细胞上很好地增殖, 并使其产生明显的细胞病变, 表现为细胞圆缩、拉网、最后脱落(图版 I-1), 完全不同于正常细胞(图版 I-2)。收获的病毒液在 4°C 条件下 pH6.4 0.015mol/L PBS 中能凝集 0.5% 的醛化猪红细胞, 血凝效价为 2^{14} 。

2.2 病毒的形态观察

病毒在电镜下为球形, 呈二十面体立体对称, 颗粒大小均匀, 未见囊膜, 平均直径为 20~22nm(图版 I-3)。

2.3 病毒核酸的性质

2.3.1 核酸的提取: 两种方法抽提到的核酸经紫外扫描最高峰均在 260nm, 最低峰在 232nm。用 G K McMaster 法提取的核酸 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.83$ (图 1), 而用 V Hari 法抽提的核酸 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.52$ 。

2.3.2 核酸类型的测定: 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。酶消化试验证明, 该病毒核酸能被 DNA 酶消化, 而不能被 RNA 酶消化(图版 I-4)。

2.3.3 核酸链数的测定: 病毒粒子经吖啶橙染色后呈橙红色, 与对照的 FPLV DNA(ssDNA)一致, 而与 EDS₇₆ DNA(dsDNA)相反, 显示出单链的特性。提取的病毒核酸经 100°C 10min 热变性后, 紫外吸收值明显增加(图 1)。 $(\text{OD}'_{260} - \text{OD}_{260})/\text{OD}_{260} \times 100\% = (0.07 - 0.043)/0.07 \times 100\% = 38.6\%$, 显示出双链特性。

2.3.4 病毒核酸的展层: 病毒核酸展层后经电镜观察呈线状, 测得核酸平均长度为 1.5~2.0 μm (图版 I-5)。

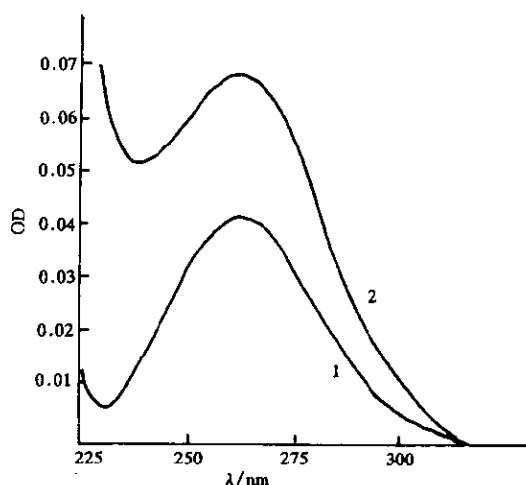


图1 热处理前(1)后(2)的 MEV-S₁ 核酸曲线

Fig. 1 The curve of MEV-S₁ DNA (1) and thermal denaturation curve of MEV-S₁ DNA (2)

3 讨论

国内文献报道,用 FK 细胞、CRFK 细胞均能增殖 MEV。实验过程中,作者用 CRFK 细胞增殖 MEV-S₁ 没有获得成功,故 MEV-S₁ 与国内报道的 MEV 其他株有所不同。采用 G K McMaster 核酸提取方法尽管较为复杂,核酸提取量少,但核酸纯度较高,且重复性好,同 V. Hari 介绍的方法相比,前者更适合于该病毒核酸的提取。二苯胺试验及酶消化试验均为检验核酸类型的经典方法,对从较高纯度的病毒粒子中提取的核酸进行类型鉴定结果应是可靠的。因此,MEV-S₁ 是 DNA 病毒。通过吡啶橙染色断定 MEV-S₁ 核酸为单链,但热变性的结果却显示出双链的特性。作者认为,核酸在病毒衣壳内呈单链特性,而脱离了病毒衣壳后,不同病毒粒子抽提出的核酸容易发生碱基自由配对,形成复制型核酸。因此,MEV-S₁ 核酸应判定为单链的 DNA。通过核酸分子长度估算其分子量在 $1.5 \sim 2.0 \times 10^6$ 之间。综合本实验结果,MEV-S₁ 具有典型的细小病毒科成员特征。核酸性质的研究将为从分子水平上研制貂传染性肠炎病快速诊断试剂盒打下基础,将有益于对该病的预防和治疗。

参 考 文 献

- [1] 于永仁,韩慧民,贾补年,等. 病毒学报,1985,1(2): 147~152.
- [2] 张德礼. 中国畜禽传染病,1992,2: 3~5.
- [3] 张振兴,钱建飞,张 存,等. 中国兽医科技,1992,22(11): 5~6.
- [4] Hair V. *Virology*, 1981, 112(2): 391~399.
- [5] McMaster G K, Beard P, Engers H D *et al.* *J Virology*, 1981, 38(1): 317~326.
- [6] 袁厚积,蔡武城,赵志安. 核酸类. 见: 蔡武城等主编. 生物物质常用化学分析法. 北京: 科学出版社,1982. 120~122.
- [7] 孙富林,陈明树,孙松柏,等. 微生物学报,1986,26(2): 188~190.
- [8] 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.
- [9] Peter J, Gomatos I T. *Proceedings of the National Academy of Science*. 1963, 49(5): 707~714.

- [10] 蔡良琬, 梁 杰, 宋国兴. 核酸电泳标本的制作原理及其方法. 见: 蔡良琬主编. 核酸研究技术. 北京: 科学出版社, 1987. 252.

STUDIES ON SOME CHARACTERISTICS OF A STRAIN OF MINK INFECTIOUS ENTERITIS VIRUS

Feng Feng Li Tianxian Ma Zhiyong*

Chen Puyan* Zhao Lin

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

(* Nanjing Agriculture university, Nanjing 210095)

Abstract A strain of mink infectious enteritis virus that was isolated from the east district of China can be bred on FK cell. Concentrated viruses were purified by using Sepharose-4B chromatography. The size of the virus was about 20~22nm by electron microscope. Viral nucleic acid was extracted from pure virus by using SDS-protease K-Phenol. Tests with diphenylamine, acridine orange and the curve of thermal denaturation, etc. showed that the virus had a single-stranded DNA. The molecular weight of the ssDNA was from 1.5×10^6 to 2.0×10^6 determined by length of the viral nucleic acid.

Key words MEV, Cytopathic effect, Viral nucleic acid

图 版 说 明

Explanation of plate

1. MEV-S₁ 致病的 FK 细胞(40000×); 2. 正常的 FK 细胞(40000×); 3. 低倍电镜下的 MEV-S₁(81000×);
4. 病毒核酸酶消化电泳; 5. MEV-S₁ DNA 展层(35000×).

1. FK cell infected by MEV-S₁; 2. Normal FK cell; 3. Low power electron micrograph of MEV-S₁;
4. MEV-S₁ DNA digested by DNase and RNase on agarose gel electrophoresis. (1) λ DNA;
(2) MEV-S₁ DNA; (3) λ DNA + DNase; (4) MEV-S₁ DNA + DNase; (5) Yeast RNA + RNase; (7) λ DNA
+ RNase; (8) MEV-S₁ DNA + RNase; 5. Electron micrograph of MEV-S₁ DNA.