

绵羊进行性肺炎病毒的抗原成分分析与 PCR 检测

丁恩雨

(复旦大学生命科学学院病毒学研究室, 上海 200433)

摘 要

利用绵羊胎肺细胞进行绵羊进行性肺炎病毒 (OPPV) 的增殖, 对其病毒的细胞病变 (CPE) 进行探讨. 采用 10% 蔗糖垫子及 20%—55% 不连续蔗糖密度梯度离心方法纯化 OPPV, 并用 SDS-PAGE 和 Western Blotting 试验分析 OPPV 的结构蛋白与抗原成分. 此外, 还应用聚合酶链反应 (PCR) 检测病毒细胞培养物和感染绵羊体外周血单核细胞中的 OPP 前病毒 cDNA. 结果表明, OPPV 在绵羊胎肺细胞上所致 CPE 较典型; 纯化的病毒经电子显微镜观察, 病毒粒子结构完整, 且量大较纯; OPPV 有 18 条多肽带, 分子量在 18 kd—120 kd 之间, 其中含有 gp120, gp50 及 gp47 3 种不同分子量的糖蛋白; OPPV 接种绵羊体后 p28 抗体的出现时间及高峰期均早于 p94 抗体, 且 p28 抗体的反应强度亦高于 p94 抗体. 经 PCR 检测表明, OPP 前病毒 cDNA 整合于绵羊胎肺细胞和绵羊体外周血单核细胞的最初时间分别为接毒后 24 h 与第 9 天.

关键词 绵羊进行性肺炎、慢病毒、细胞病变、结构蛋白、聚合酶链反应

绵羊进行性肺炎 (*Ovine Progressive Pneumonia*, 简称 OPP) 是一种慢性进行性传染病, 以损害绵羊多种器官为特征, 其病原为反转录病毒科慢病毒亚科中的成员^[1]. OPP 在临床上表现两种症候群, 一种以慢性进行性肺炎为特征的梅迪病 (Maedi), 另一种以侵害中枢神经系统引起脑膜脑炎为特征的维斯纳病 (Visna). 目前, 世界上的感染绵羊大多以发生肺炎为主, 尽管梅迪病和维斯纳病在症状上有所不同, 但一般认为它们的病原是同一种病毒^[2-4].

1923 年在加拿大绵羊中发生肺型 OPP, 1933 年在冰岛绵羊中大流行, 1940 年在法国曾描述 OPP 为淋巴瘤, 1943 年在荷兰又称此为肺子病 (Zwoegerziekte), 1947 年才用 Maedi (意为呼吸困难) 的名称描述了肺型 OPP. 1951 年有用 Visna (意为消瘦) 的名称描述了麻痹型 OPP. 绵羊进行性肺炎病毒 (OPPV) 首先由 Sigurdsson 于 1960 年分离出来. 现已知德、英、美、法、丹麦、荷兰、肯尼亚、印度、以色列、挪威、瑞典等国都有 OPP 存在^[5, 6]. 我国 OPP 可追溯到 80 年代从澳大利亚和新西兰进口边区莱斯特绵羊 (Border Leicester Sheep) 中发现“肺脓肿

病”, 1984 年用美国的 OPP 血清和抗原在进口边区莱斯特绵羊中检出 OPP 患病羊^[7], 随后分离出 OPPV^[8], 首次证明 OPP 已在我国出现. 近年来研究表明, OPPV 粒子呈球型、圆型, 直径 80—110 nm, 病毒有囊膜、核芯, 在宿主细胞内以出芽方式增殖, 不耐热, 经 56℃ 30 min 即可失去感染力. 病毒基因序列分析表明^[9], Visna 病毒 1514 冰岛株基因组全长有 9202 个核苷酸, 长末端重复序列 (LTR) 含 414 个 bp. 整个病毒基因结构包括 5'-gag-pol-Q-env-3', 其中 gag 基因编码核芯蛋白, pol 基因编码病毒蛋白酶、反转录酶和核酸内切酶或整合酶. Visna 病毒开读框架 (Orf) pol 和 Orf env 并不重叠, 而由 Orf Q (230 个密码子) 分开, env 基因编码病毒囊膜糖蛋白. Haase 和 Baringer 等^[10]报道 OPPV 结构蛋白系由 15 种多肽组成, 主要包括 3 种内部蛋白 (p14, p16, p25) 和一种囊膜糖蛋白 (gp135). Fu Hailing 报道^[11], 琼脂糖凝胶柱层析纯化的 Visna 病毒 (K796 株) 经 SDS-PAGE 分析, 是由 25 种蛋白质组成的, 最大的蛋白成分为 gp175 和 gp115, 最小的蛋白成分为 p12. 目前国外对 OPP 的研究进展甚快, 而我国尚处于起步阶段. 本文旨在利用绵羊胎肺细胞进行 OPPV 的增殖, 对其病毒的细胞病变 (CPE) 进行探讨, 采用一系列方法纯化病毒, 并用 SDS-PAGE 和 Western Blotting 分析 OPPV 的结构蛋白与抗原成分. 此外, 还应用聚合酶链反应 (PCR) 检测病毒细胞培养物和感染绵羊体外周血单核细胞中的 OPP 前病毒 cDNA. 为进一步深入研究 OPPV 及其它慢病毒包括人类艾滋病病毒 (HIV) 提供重要的科学依据.

1 材料和方法

1.1 材料

OPPV (WLC-1 株) 系由美国华盛顿州立大学惠赠; OPP 标准阳性血清系由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供; 胰蛋白酶, Difco 进口分装; 聚乙二醇 20 000, Japan 进口分装; 蔗糖, 北京化工厂产品; Tris, Serva Feinbiochemica 产品; EDTA, 北京化工厂产品; 丙烯酰胺, E. Merck 产品; 双甲叉丙烯酰胺, Fluka 产品; SDS, Serva 进口分装; 过硫酸铵, 北京化学试剂三厂产品; TEMED, Kochlight Laboratories Ltd 产品; 标准分子量蛋白质, Pharmacia 产品; 甘氨酸, 北京化工厂产品; 甲醇, 长春市化学试剂厂产品; 乙酸, 齐齐哈尔轻工学院试剂厂产品; 考马斯亮蓝 R250, Fluka 进口分装; 牛血清白蛋白, 上海长阳生化制药厂产品; DAB, 上海试剂厂产品; 刀豆蛋白 A, Sigma 产品; 聚蔗糖 400, Pharmacia 进口分装; 复方泛影葡胺, 中国上海信谊药厂产品; DNA 扩增系统 B 试剂盒, 华美生物工程公司产品; 琼脂糖, Promega Corporation 产品; 溴化乙锭, Sigma 产品; PBR322HaeIII, 华美生物工程公司产品; 硝酸纤维素膜, Schleicher & Schuell 产品.

1.2 方法

1.2.1 绵羊胎肺细胞的培养 无菌采取健康绵羊胎肺, 用灭菌 Hanks 液 (含 300 IU/ml 青霉素、300 mg/ml 链霉素) 冲洗数次, 剪碎用适量 0.25% 胰蛋白酶液消化后加 199 生长液 (含 10% 牛血清、100 IU/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素), 混匀并分装于培养瓶内, 置 37℃ 下培养. 当细胞生长到一定程度时倾去未贴壁的组织块及旧液, 再加适量生长液继续培养. 待细胞长成单层后, 按常规方法消化继代.

1.2.2 OPPV 的培养 绵羊胎肺细胞长成单层后, 接种 OPPV (接毒量为维持液的 4%), 37℃ 吸附 1h, 加 199 维持液 (含 2% 牛血清、100 IU/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素), 37℃ 培养

并观察细胞病变(CPE)。当病变达 70% 左右时收毒。经 3 次反复冻融后获得的病毒液供作种毒。凡供纯化用的病毒液, 均经 $5000 \times g$ 离心 30 min 后备用。

1.2.3 OPPV 对绵羊的感染试验 5 只试验绵羊(1 岁左右)接种 OPPV19-SFL16 病毒液(1×10^6 TCID₅₀/ml)的途径和剂量如下, 颈静脉内接毒 5 ml, 气管内接毒 5 ml, 肺内接毒 8 ml; 并设 2 只健康对照绵羊。两组均在不同时间采血并分离血清及单核细胞等。

1.2.4 OPPV 的纯化 按丁恩雨方法¹⁾, 采用 10% 蔗糖垫子及 20%, 30%, 35%, 45%, 55% 不连续蔗糖密度梯度离心纯化 OPPV。病毒沉淀物用少量 TNE 悬浮, 装入 0.5 ml Eppendorf 管中, 置 -20°C 冰箱内保存。纯化的 OPPV 按李成等^[2]进行磷钨酸负染并电子显微镜观察, 以了解其纯度及完整性。

1.2.5 OPPV 的 SDS-PAGE 试验 参照张龙翔方法^[3]制备 4%—20% 梯度胶, 纯化的 OPPV 及标准分子量蛋白分别与一定量的样品缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 2.5% SDS、少量溴酚蓝、5% 二巯基乙醇、25% 蔗糖)混合, 100°C 水浴 5 min, 电泳条件为电压 200 V, 电泳时间 50—60 min, 电极缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液(25 mmol/L Tris, 192 mmol/L 甘氨酸、0.1% SDS), 电泳结束后, 取出凝胶用染色液(40% 甲醇、7% 乙酸、0.2% 考马斯亮蓝 R250)染色, 室温过夜。经脱色液(甲醇: 水: 36% 乙酸 = 5:5:1)脱色后, 再用 10% 乙酸完全脱色。最后按常规方法测定 OPPV 结构蛋白分子量。

1.2.6 OPPV 的 Western Blotting 试验 OPPV 经 SDS-PAGE 电泳后用 Bio-Rad 转移系统在稳压 $40\text{ V } 4^\circ\text{C}$ 下, 用 Tris-甘氨酸缓冲液(25 mmol/L Tris, 192 mmol/L 甘氨酸、20% 甲醇, pH 8.3)转移 22h。电转移结束后, 迅速将硝酸纤维素膜用 0.01 mol/L, pH 7.4 PBS-0.05% Tween 20 冲洗, 用含 1% BSA 的 0.01 mol/L, pH 7.4 PBS-0.05% Tween 20 封闭, 37°C 作用 30 min, 然后再加 OPP 血清(最终浓度为 15 倍稀释), 37°C 作用 1.5h 或 4°C 下过夜。用 0.01 mol/L, pH 7.4 PBS-0.05% Tween 20 冲洗 3 次, 每次 10 min。冲洗后加入兔抗绵羊 IgG 酶标抗体(自制, 按 1:1200 稀释), 37°C 作用 1.5 h, 冲洗方法同前。最后置 DAB 显色液中显色。糖蛋白染色按 Howkes, R 等方法^[4]进行。

1.2.7 PCR 检测 引物的合成及处理, 按 Zanoni 等^[5]提供的 Maedi-Visna 病毒 gag region 序列[引物 I: 5'-ATACAAATGCTAGCACAGAC-3'(+), 起始位点在 1 459 bp; 引物 II: 5'-ATGTCCTGGTTTTCCACAAT-3'(-), 起始位点在 1 673 bp], 用 ABI 381 A 型 DNA 合成仪(美国产)合成引物, 再用 OPC(Oligonucleotide Purification Cartridge)纯化, 乙腈洗脱, 测其 OD 值, 真空离心去除乙腈, 并按下列公式计算其含量, $\text{OD}_{260} \times 33 \times \text{稀释倍数} \times \text{体积}(\text{ml}) = \text{含量}(\mu\text{g})$ 。最后用 0.01 mol/L, pH 7.4 PBS 稀释成 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$; 置 -20°C 冰箱中保存。

OPPV 绵羊胎肺细胞培养物及正常细胞模板的制备, 将接毒后不同时间收集的病毒细胞培养物和正常细胞培养物置于 Eppendorf 管中, 并在台式离心机上离心。取沉淀细胞, 加入少量 0.01 mol/L, pH 7.4 PBS, 煮沸 5 min 后备用。OPPV 感染绵羊和未接毒对照绵羊外周血单核细胞模板的制备, 按杨贵贞^[6]的聚蔗糖-泛影葡胺非连续密度梯度方法分离 OPPV 感染绵羊体后不同时间和健康对照绵羊外周抗凝血的单核细胞。单核细胞沉淀物用少量 0.01 mol/L, pH 7.4 PBS 悬浮, 装入 Eppendorf 管中, 煮沸 5 min 后备用。

PCR 扩增 OPP 前病毒 cDNA, 按华美生物工程公司 DNA 扩增系统 B 方法进行。反应

1) 丁恩雨, 中国农业科学院研究生院博士学位论文, 1993。

结束后,取出反应管,使之冷却到室温,然后取少量扩增产物以及 Marker (PBR322-Hae III) 在 2% 琼脂糖凝胶上电泳并分析结果.

2 结 果

2.1 绵羊胎肺细胞的培养

健康绵羊胎肺经 Hanks 液反复冲洗,剪碎,0.25% 胰蛋白酶液消化,加 199 生长液,在培养瓶中培养 4—7d 时组织块周围长出许多细胞,当营养液变黄偏酸时,倾去旧液,加入新的 199 生长液,继续培养数天,细胞基本铺满瓶壁,呈梭形(图 1),继代细胞可传至 40 代.

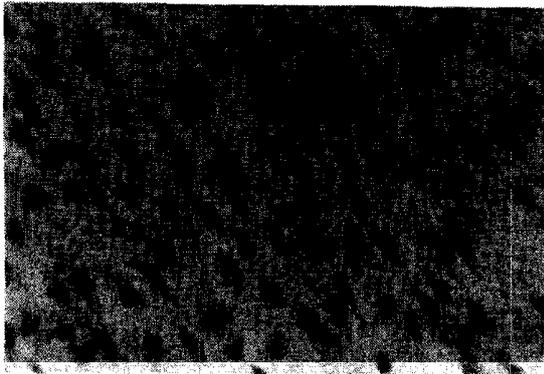


图 1 绵羊胎肺细胞($\times 80$)

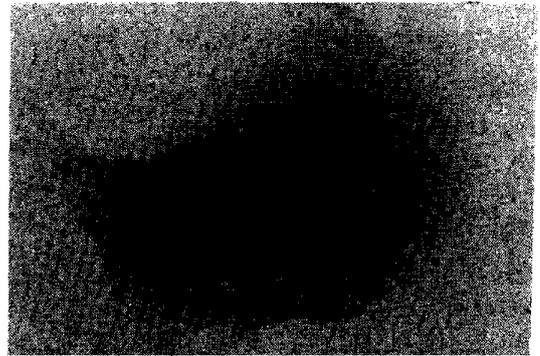


图 2 OPPV 在绵羊胎肺细胞上形成的合胞体病变
其特点是合胞体与周围细胞之间有明显界限,合胞体内含有数目不等的核, $\times 160$

2.2 OPPV 的培养

将 OPPV 接种于已长成单层的绵羊胎肺细胞后 5—6d 开始出现细胞融合,即形成多核巨细胞的合胞体.开始合胞体内核的数目有 2—3 个,其后核的数目逐渐增加,合胞体数亦逐渐增多(图 2).7—9d 后细胞单层呈拉网状并脱落. OPPV 接种绵羊胎肺细胞后第 9 天进行电子显微镜切片观察,大量 OPPV 粒子沿胞膜排列或散在于胞浆和空泡中,呈近似于球形,直径约 90—110 nm,外有一层囊膜,中间有芯髓(图 3).



图 3 OPPV 接种绵羊胎肺细胞后第 9 天的电子
显微镜切片照片($\times 24\,000$)



图 4 OPPV 的磷钨酸负染电子显微镜照片
($\times 24\,000$)

2.3 OPPV 的变化

OPPV 经 10% 蔗糖垫子及 20%—55% 不连续蔗糖密度梯度离心后, 可见 4 条区带, 其中区带 I(20%—30% 蔗糖交界处)、区带 II(30%—35% 蔗糖交界处) 和区带 IV(45%—55% 蔗糖交界处) 不太明显, 而区带 III(35%—45% 蔗糖交界处) 最明显. 各区带经磷钨酸负染并电

子显微镜观察, 区带 III 含有大量的病毒粒子, 且病毒粒子结构完整, 亦较纯(图 4).

2.4 OPPV 的结构蛋白分析

纯化的 OPPV 经 SDS-PAGE 分析, 出现 18 条多肽带, 参照标准蛋白的迁移率及其坐标图, 测定各结构蛋白的分子量如下: 120, 94, 83, 65, 59, 58, 50, 47, 43, 38.5, 34.5, 31, 28, 25.5, 24, 20.5, 19 和 18 kd(图 5).

2.5 OPPV 结构蛋白中具抗原活性成分的分析

2.5.1 糖蛋白染色结果 表明 OPPV 结构蛋白中含有 3 种不同分子量的糖蛋白, 分别为 gp120, gp50 及 gp47.

2.5.2 OPPV 不同结构蛋白相应抗体的消长情况 采用 Western Blotting 试验及反射扫描方法对 OPPV 接种绵羊体后不同时间的血清进行检测, 表明 p28 抗体在接毒后 4 d 开始出现, 1 个月左右达到高峰, 然后下降并在一定水平上波动. p94 抗体在接毒后 4—9 d 开始出现, 2 个月左右达到高峰, 然后降至一定水平并上下波动(图 6,7).

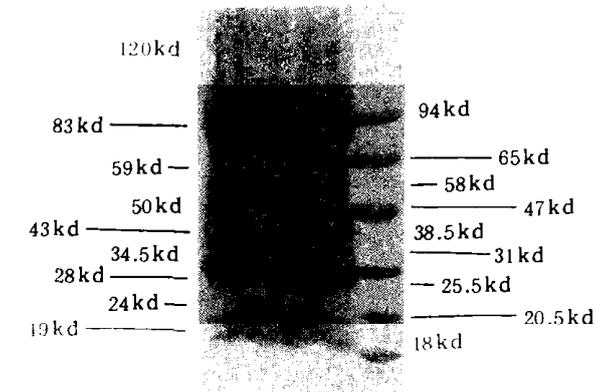


图 5 OPPV 的 SDS-PAGE 分析

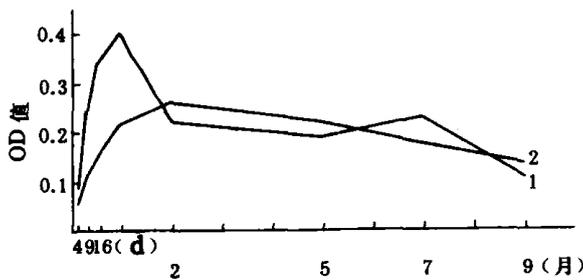


图 6 OPPV 接种绵羊体后不同时间 p28, p94 抗体的消长
1——p28 抗体, 2——p94 抗体

2.6 OPP 前病毒 cDNA 的 PCR 检测

收集 OPPV 接毒后 20, 22, 24 h 和 6 d 的绵羊胎肺细胞培养物和未接毒绵羊胎肺细胞培养物以及 OPPV 接种绵羊体后 4, 6, 9 d 的外周血单核细胞和未接毒绵羊外周血单核细胞做模板, 应用制备的引物, 按华美生物工程公司 DNA 扩增系统 B 方法扩增 OPP 前病毒 cDNA, 并在 2% 琼脂糖凝胶中电泳. 观察结果, 在 OPP 接种绵羊胎肺细胞后 24 h, 6 d 的培养物以及 OPPV 感染绵羊体后第 9 天的外周血单核细胞中均检测到 OPP 前病毒 cDNA, 扩增的片段大小为 215 bp(图 8), 未接毒对照为阴性. 结果表明, OPP 前病毒 cDNA 整合于绵羊胎肺细胞和绵羊体外周血单核细胞的最初时间分别为

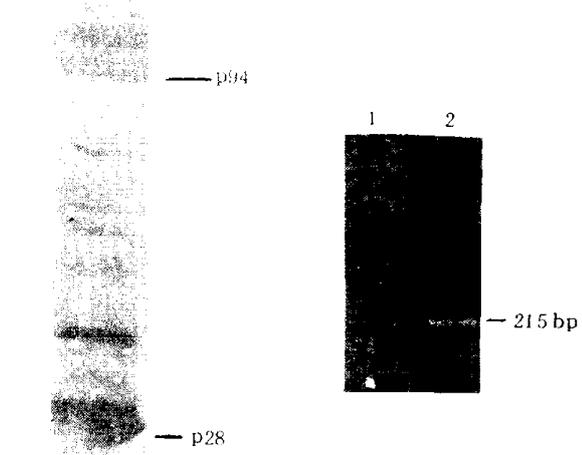


图 7 OPP 阳性血清的 Western Blotting 结果
图 8 OPP 前病毒 cDNA 的 PCR 检测
1——Marker, 2——OPPV

接毒后 24h 与第 9 天。

3 讨 论

国外很多学者在培养 OPPV 时, 采用绵羊脉络丛细胞 (SCP)。由于 SCP 细胞来源较困难, 且传代次数较低, 故较难以大量增殖 OPPV。本研究改用绵羊胎肺细胞培养 OPPV, 不仅绵羊胎肺细胞可传至 40 代, 而且病毒培养效果亦佳, 因此采用绵羊胎肺细胞培养 OPPV, 可以解决当前 OPPV 大量增殖问题。

对 OPPV 纯化时, 首先将病毒液经 $5000 \times g$ 离心 30 min 去除细胞碎片, 然后将病毒液在 10% 蔗糖垫子及 20%—55% 不连续蔗糖密度梯度上离心去除大量的血清蛋白及杂质等。稀释病毒时采用 TNE 缓冲液以使病毒不受损伤。

OPPV 经 SDS-PAGE 分析有 18 条多肽带。Haase 和 Baringer 等^[10] 认为 OPPV 结构蛋白由 15 种多肽组成, 分别为 135, 97, 90, 78, 75, 68, 56, 53, 51, 46, 41, 36, 25, 16 和 14 kd 等, 表明本试验的 OPPV 毒株与前者所用的 OPPV 毒株存在着细微差异。另据 Fu Hailing 报道^[11]: 利用琼脂糖凝胶柱层析纯化的 Visna 病毒 (K796 株) 经 SDS-PAGE 分析是由 25 种蛋白质组成的, 最大的蛋白成分为 gp175 和 gp115, 最小的蛋白成分为 p12。这可能由于纯化方法不同, 其结果亦有差异。

OPPV 接种绵羊体后 p28 抗体的出现时间及高峰期均早于 p94 抗体, 且 p28 抗体的反应强度亦高于 p94 抗体, 提示 p28 的抗原活性较强, 可能起着主要的免疫原性作用。

据 Zanoni 等^[15] 报道, OPP 的诊断通常是检测病毒抗体, 然而该病毒抗体的产生时间相对较晚, 虽可从感染绵羊中分离出病毒, 但尚需几周才能完成。而应用 PCR 方法分别在 OPPV 感染细胞后 24h 和绵羊体后第 9 天即可检出前病毒 cDNA, 故 PCR 是目前早期快速诊断 OPP 等慢病毒病的较好方法之一。

参 考 文 献

- [1] 范存军, 中国畜禽传染病, 1990, 3: 59—61.
- [2] 殷震等, 动物病毒学, 科学出版社, 北京, 1985, 603—606.
- [3] 沈荣显等, 中国畜禽传染病, 1988, 1: 18—21.
- [4] Cutlip, R. C. et al., *Am. J. Vet. Res.*, 1976, 37: 1377—1382.
- [5] Dawson, M. et al., *Vet. Rec.*, 1979, 105: 220—223.
- [6] Dukes, T. W. et al., *Can. J. Comp. Med.*, 1979, 43: 313—320.
- [7] 龚成润等, 中国兽医杂志, 1984, 12: 9—12.
- [8] 胡泽渊等, 中国兽医杂志, 1985, 9: 2—3.
- [9] Sonigo, P. et al., *Cell*, 1985, 42: 369—382.
- [10] Haase, A. T., Baringer, J. R., *Virology*, 1974, 57: 238—250.
- [11] Fu Hailin, *Journal of Virology*, 1978, 25(1): 207—214.
- [12] 李成等, 病毒学报, 1985, 3: 238—241.
- [13] 张龙翔, 生化实验方法和技术, 人民教育出版社, 北京, 1980, 94—124.
- [14] Howkes, R. et al., *Ana. Biochem.*, 1982, 123: 143—146.
- [15] Zanoni, R. et al., *Experientia*, 1990, 46: 316—319.
- [16] 杨贵贞, 医用免疫学, 吉林人民出版社, 长春, 1980, 363—364.