

类猪圆环病毒 P1 的免疫电镜观察

温立斌¹, 何孔旺¹, 解建平¹, 杨浩², 周建新², 金全胜², 王玉然²

(1. 江苏省农业科学院 兽医研究所, 农业部兽用生物制品工程技术重点实验室, 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014; 2. 河北省动物卫生监督所, 河北 石家庄 050081)

摘要: 采用氯化铯平衡密度梯度离心获得较为纯净的病毒粒子后, 经过免疫电镜技术(液相免疫电镜法和免疫胶体金标记法)对 P1 病毒进行了观察鉴定。结果表明, P1 病毒呈球形、无囊膜、直径约为 25 nm。

关键词: 类猪圆环病毒因子 P1; 形态学; 免疫电镜技术

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)增刊-0400-03

The Morphology Analysis of Porcine Circovirus-like Agent P1 by Immunoelectron Micrography

WEN Li-bin¹, HE Kong-wang¹, XIE Jian-ping¹, YANG Hao²,
ZHOU Jian-xin², JIN Quan-sheng², WANG Yu-ran²

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture, National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China; 2. Hebei Animal Health Inspection, Shijiazhuang 050081, China)

Abstract: The results of porcine circovirus-like agent P1 morphology were reported here. Relatively pure viral particles were obtained by CsCl equilibrium density-gradient centrifugation, and then detected by immune electron microscopy (Both liquid phase immune electron microscopy and immunogold labeling electron microscopy). The results showed that P1 is spherical in shape, non-enveloped and about 25 nm in diameter.

Key words: Porcine circovirus-like agent P1; Virus morphology; Immunoelectron microscopy

猪断奶后多系统衰竭综合征(PMWS)于1991年加拿大首次发生^[1-2],其主要发生于5~12周龄的断奶仔猪,临床出现进行性消瘦、皮肤苍白、呼吸困难等症状,体表淋巴结,特别是腹股沟浅淋巴结肿大^[3]。PMWS已成为当今危害我国乃至世界养猪生产的重要免疫抑制性疫病之一^[4-5],也相应成为猪病研究领域的热点和难点。目前公认猪圆环病毒2型(PCV2)是该病的必要病原,PCV分类地位属于圆环病毒科成员,基因组为单股、环状DNA,是迄今发现的一种最小的动物病毒,直径约为17 nm。但单独用PCV2感染很难复制出典型的PMWS临床症状,这促使研究人员从PCV2基因型、共感染等方面研究PMWS是如何发生的,甚至提出是X因子导致了PMWS的发生。我们在检测临床送检疑似PMWS的血清样品中,不仅证实PCV2具有多种基因型^[6];

而且还分离到一株类PCV2因子(暂定为P1),其基因组全长仅648个核苷酸,且大部分核苷酸与PCV2相应的核苷酸具有很高的同源性。随后,研究表明构建的P1基因组的双拷贝串联分子克隆在体外和体内具有感染性,表现为可在转染的PK15细胞中形成胞浆和胞核包涵体;感染猪在临床上出现类似PMWS症状,即部分感染猪出现消瘦和贫血等现象^[7-12]。流行病学调查结果表明该因子在我国猪群中已有相当范围的感染^[13]。因此,P1有可能成为危害我国养猪业健康发展的又一潜在的病原,它的出现不仅对重新认识传统的PCV2以及其与PMWS的关系具有意义;同时,拥有如此小的基因组对探讨生命的起源和进化也具有重大意义。前期研究表明P1为单股环状DNA病毒^[14],本试验主要对该病原的形态学进行了研究。

收稿日期:2013-07-25

基金项目:国家自然科学基金项目(31272574);江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(11)2060)

作者简介:温立斌(1967-),男,河北宣化人,研究员,博士,主要从事动物分子病毒学与免疫学研究。

1 材料和方法

1.1 分子克隆和细胞

P1 双拷贝串联的分子克隆和 P1 表位肽抗体由江苏省农业科学院兽医所人兽共患病研究室保存, 构建及制备方法参见文献 [7, 15]。无 PCV1、PCV2 和支原体污染的 PK-45 细胞由江苏省农业科学院兽医所人兽共患病研究室传代、保存。

1.2 主要试剂及仪器

氯化铯为 Sigma 产品; Lipofectamine™ 2000 转染试剂为 Invitrogen 产品; 5 nm 胶体金偶联的山羊抗兔 IgG 为 Sigma-aldrich 产品; 病毒基因组提取试剂盒为北京天恩泽基因科技有限公司产品(柱式病毒 DNAout); Eppendorf BioPhotometer; Optima™ L-80 XP 超速离心机(BeckMan 公司产品); H7500 电子显微镜(Hitachi 公司产品)。

1.3 类猪圆环病毒因子 P1 的拯救和提纯

将 PK-45 细胞传入 6 孔细胞培养板, 待细胞密度达到 85% 细胞融合时, 按转染试剂说明进行 P1 双拷贝串联分子克隆的转染, 培养 72 h 后收获 P1 拯救毒, 冻融 3 次后, 首先差速离心进行粗提, 即通过 3 000 r/min 30 min 以及 10 000 r/min 30 min 离心, 去除较大的宿主细胞碎片及杂质; 然后进行氯化铯平衡密度梯度离心, 分段收集离心样品, 经过蛋白浓度测定及 PCR 确定病毒所在的区段, 其中 PCR 所用的 DNA 模板为柱式病毒 DNAout 试剂盒所提取, 所用引物及扩增参数具体见文献 [13]。本研究通过了 2 轮氯化铯平衡密度梯度离心, 首先以 30%、40%、50% (W/V) 浓度的氯化铯对病毒样品 100 000 r/min 离心 48 h (SW41Ti 转头), 然后收集病毒条带再以 10%、20%、30% (W/V) 浓度的氯化铯对病毒样品 100 000 r/min 离心 48 h (SW41Ti 转头)。

1.4 抗原-抗体免疫复合物(液相免疫电镜法)

取上述氯化铯平衡密度梯度离心提纯的病毒样品 0.1 mL 和等量稀释的 P1 表位肽抗体混合, 37 °C 感作 1 h, 然后 4 °C 过夜, 12 000 r/min 离心 30 min, 去上清, 将沉淀用少量 PBS 悬浮。另外, 取病毒样品与正常兔血清混合, 处理同上, 作为对照。

1.5 免疫胶体金标记

分别向上述 2 种处理的样品中, 加入等量的 1:20 倍稀释的胶体金偶联的山羊抗兔 IgG, 混匀后, 置 37 °C 感作 30 min, 然后 12 000 r/min 离心 30 min, 去上清, 将沉淀用少量 PBS 悬浮。

1.6 负染和电镜观察

将上述样品, 包括氯化铯提纯的、抗原抗体复合

物的、免疫胶体金标记的以及对照的样品, 用微量移液器吸取滴于蜡板上, 用覆膜的载网向下浮在液滴上, 数分钟后用干净滤纸从网边吸去液体, 稍干后用 2% 磷钨酸染液染色 1 min, 用滤纸吸去染液, 进行电镜观察。

2 结果与分析

2.1 氯化铯平衡密度梯度离心提纯病毒的电镜结果

通过 P1 双拷贝串联分子克隆转染 PK15 细胞, 获得的 P1 拯救毒, 经氯化铯平衡密度梯度离心后, 并未出现肉眼可见的条带, 估计与转染形成的拯救毒含量偏低有关。通过蛋白测定及 PCR 鉴定, 病毒主要集中在 20% 浓度的氯化铯中。负染可见 P1 病毒呈球形, 无囊膜, 大小较一致, 直径约 25 nm (图 1)。

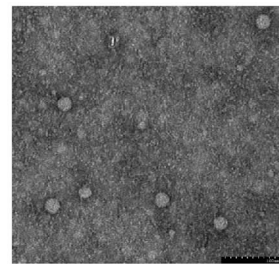


图 1 氯化铯平衡密度梯度离心提纯的 P1 病毒电镜观察结果

Fig. 1 The morphology analysis of porcine circovirus-like agent P1 purified by cesium chloride equilibrium density gradient centrifugation using TEM

2.2 液相免疫电镜法观察的结果

P1 病毒在相应兔抗 P1 抗体捕获下, 电镜下可见到表面结构清晰的病毒粒体, 未产生明显的聚集效应, 这可能与抗原抗体比例不太合适有关。但单个病毒粒体周围基本有抗体环, 病毒二聚集体之间也有抗体桥存在(图 2)。而用正常兔血清感作的样品, 基本观察不到病毒粒体。

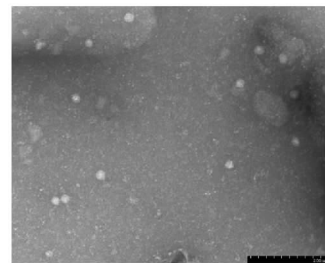


图 2 P1 病毒的液相免疫电镜观察结果

Fig. 2 The morphology analysis of porcine circovirus-like agent P1 using liquid phase immune electron microscopy

2.3 免疫胶体金标记法观察的结果

对抗原抗体免疫复合物进行胶体金标记后, 电镜下可观察到 P1 病毒粒子周围有胶体金粒子标记, 多为 2 个或多个胶体金粒子围绕(图 3)。对照

样品的胶体金标记未见病毒颗粒。

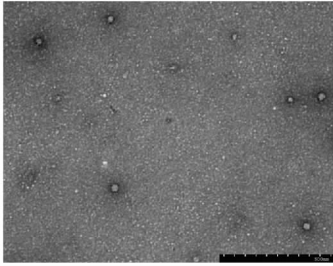


图3 P1病毒免疫胶体金标记的电镜观察结果

Fig.3 The morphology analysis of porcine circovirus-like agent P1 using immunogold labeling electron microscopy

3 讨论

类猪圆环病毒 P1 是我们新近发现的一种致病因子,起初是由发现其基因组开始的。对新发因子的形态学,如大小、形状、有无囊膜等研究是至关重要的。

大多数病毒的形态只能用电子显微镜来观察,由于病毒一般来源于宿主细胞,要想与宿主细胞成分相区分,就要将病毒尽可能的提纯。否则电镜下观察到很多大小不一的颗粒样物质,很难确定没有特殊形状的病毒形态。所以病毒纯化也成为病毒研究中的主要步骤和难点。密度梯度离心是病毒纯化中比较常用的方法,蔗糖基本不破坏病毒的外壳蛋白,在病毒纯化中显示了一定的优越性,但在蔗糖密度梯度离心中,其形成的带常常比较松散,这样,要想把病毒和细胞培养物分离开就比较困难,而氯化铯密度梯度形成条带比较紧密,相对可以得到比较纯的病毒。本研究通过氯化铯密度梯度离心来提纯 P1 病毒,也获得了比较满意的效果。电镜下可见到大小基本一致的、无囊膜的球状病毒,其他杂质较少。为了确定观察到的病毒就是 P1 病毒,本研究进一步应用免疫电镜技术对其进行了观察。

免疫电镜技术是将抗原抗体反应的特异性与电镜的高分辨能力相结合的检测技术,其主要应用于 2 个方面:利用特异性抗体捕获相应的病毒,负染后在电镜下检查病毒粒子;利用酶、铁蛋白、胶体金等标记的特异性抗体,对抗原进行检测。其中,胶体金标记技术是以胶体金作为示踪标志物或显色剂,应用于抗原抗体反应的一种新型免疫标记技术。由于它不存在内源酶干扰及放射性同位素污染等问题,且利用不同颗粒大小的胶体金还可以作双重甚至多重标记,使定位更加精确,因此已成为继荧光素、酶、同位素及乳胶标记技术之后的一种新型标记技术。Faulk 和 Taylor^[16]于 70 年代初首先应用胶体金作为透射电镜探针进行了研究。近年来,该技术几经改进,现已广泛应用于免疫学、组织学、病理学和细胞

生物学等领域。

本研究通过免疫电镜技术进一步对提纯的 P1 病毒进行了观察,结果证实了免疫电镜是 P1 病毒形态学有效的鉴定方法。其中,抗原抗体结合比例、高质量的抗体以及胶体金标记的蛋白是本法应用的关键因素。

类猪圆环病毒 P1 由于其大部分核苷酸与 PCV2 的高度同源,有理由怀疑 P1 是否为 PCV2 的缺损病毒。本研究通过对 P1 形态学研究,直接否认了这点,传统认识缺损病毒形态大小一般与完全病毒相似。但 P1 基因组虽然较小,病毒粒子直径却大于 PCV2 的,说明 P1 也是一种相对“独立”的病毒,有可能是 PCV2 与其他生物重组而形成的。总之,本研究通过免疫电镜技术对提纯的类猪圆环病毒 P1 进行观察鉴定,为最终 P1 病毒的分类地位等奠定了基础。

参考文献:

- [1] Allan G, Meehan B, Todd D *et al.* Novel porcine circovirus from pigs with wasting disease syndrome [J]. *Vet Rec*, 1998, 142(17): 467-468.
- [2] Meehan B M, McNeilly F, Todd D *et al.* Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs [J]. *J Gen Virol*, 1998, 79: 2171-2179.
- [3] Allan G M, Ellis J A. Porcine circoviruses: a review [J]. *J Vet Diagn Invest* 2000, 12: 3-14.
- [4] Segales J, Allan G M, Domingo M. Porcine circovirus diseases [J]. *Anim Health Res Rev* 2005, 6: 119-142.
- [5] 杨汉春. 猪免疫抑制性疾病的流行特点与控制对策 [J]. *中国畜牧兽医* 2004, 31(5): 41-43.
- [6] Wen L, Guo X, Yang H. Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China [J]. *Vet Microbiol* 2005, 110: 141-146.
- [7] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春. 类猪圆环病毒 2 型因子 P1 与 P2 株全长基因组 DNA 分子克隆的构建 [J]. *江苏农业学报* 2007, 23(6): 579-582.
- [8] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春. P1 因子分子克隆的体外感染性分析 [J]. *畜牧兽医学报* 2008, 39(7): 941-944.
- [9] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 等. 类猪圆环病毒因子 P1 感染对猪红细胞的影响 [J]. *内蒙古农业科技* 2009(2): 46-48.
- [10] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春. 一株类猪圆环病毒 2 型因子 P1 的全基因组序列测定与分析 [J]. *中国农业科学* 2010, 43(2): 411-416.
- [11] Wen L B, He K W, Yu Z Y *et al.* Complete genome sequence of a novel porcine circovirus-like agent [J]. *J Virol* 2012, 86(1): 639.
- [12] Wen L, He K, Xiao Q *et al.* A novel porcine circovirus-like agent P1 is associated with wasting syndromes in pigs [J]. *PLoS ONE* 2012, 7(8): e41565.
- [13] Wen L B, He K W, Yang H C, *et al.* (2011) Prevalence of porcine circovirus-like agent P1 in Jiangsu, China [J]. *Virol J* 2011, 8: 543-547.
- [14] 温立斌, 何孔旺, 倪艳秀, 等. 类猪圆环病毒因子 P1 核酸链型和极性的研究 [J]. *华北农学报*, 2012, 27(3): 120-122.
- [15] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 等. 类猪圆环病毒因子 P1 结构蛋白表位抗体的制备及应用 [J]. *华北农学报* 2011, 26(5): 83-86.
- [16] Faulk W P, Talor G M. An immunocolloid method for the electron microscope [J]. *Immunochemistry*, 1971, 8(11): 1081-1083.