

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.23.006
文章编号: 1005-8982 (2018) 23-0026-05

人星状病毒 1 型野毒株的培养及生物学鉴定*

梁雪雪, 刘鹏飞, 谭李倩, 李明, 赵微
(锦州医科大学, 辽宁 锦州 121001)

摘要:目的 研究人星状病毒 1 (HAstV-1) 型野毒株的分离方法、细胞培养适应条件及相应生物学性质。**方法** 对收集的腹泻粪便样品, 采用间接酶联免疫吸附法和逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 进行 HAstV 检测。阳性样品按常规方法处理, 并进行细胞培养分离及最佳培养条件确定, 将毒株连续传 10 代, 采用实时荧光定量聚合酶链反应和免疫荧光法检测病毒的增殖, 细胞荧光灶法进行滴度测定, 采用 RT-PCR 进行特异性基因组稳定性检测。**结果** 通过检测野毒株为 HAstV-1d 亚型。将其中编号为 JZ-10 的毒株进行传代培养。该毒株在传代过程中无明显细胞病变, 在人结肠癌细胞株 (Caco-2) 中传代适应培养 10 代 (P10) 后, 病毒能够稳定增殖并具有良好的识别 HAstV 抗体的能力。随着传代次数增加, 病毒基因拷贝数与病毒滴度增加, P10 代病毒基因拷贝数达 2.7×10^7 , 病毒感染性滴度达 $6.97 \log \text{FFU/ml}$ 。在传代过程中, 病毒基因组核酸序列稳定, 无突变。**结论** 该实验获得 HAstV-1 型 JZ-10 细胞适应毒株, 为后续进行该病毒的基础研究奠定基础。

关键词: 人星状病毒; Caco-2 细胞; 适应性; 生物学性质

中图分类号: R373

文献标识码: A

Isolation of wild strain of *Human astrovirus* serotype 1 and adaptability in Caco-2 cells*

Xue-xue Liang, Peng-fei Liu, Li-qian Tan, Ming Li, Wei Zhao
(Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

Abstract: Objective To investigate the adaptability of *Human astrovirus* serotype 1 (HAstV-1) wild strain in Caco-2 cells and the biological characteristics of adapted strain. **Methods** All the collected acute diarrhea stool samples were screened for HAstV by ELISA and RT-PCR. A HAstV-1 positive stool sample was propagated in Caco-2 cells and the culture condition was optimized. The adapted strain was subcultured in Caco-2 cells for 10 passages, then virus proliferation was determined by qRT-PCR and immunofluorescence method, virus titer was detected by fluorescent focus assay (FFA), and specific gene stability was determined by RT-PCR. **Results** The positive stool sample called JZ-10 strain belonged to HAstV-1d type. The adapted strain had no obvious cytopathic effect (CPE) on Caco-2 cells during propagation. The virus of passage 10 was positive for antigenicity and virus gene could stably proliferate. JZ-10 strain showed good adaptability in Caco-2 cells, while the titer of the virus of the 10th passage was $6.97 \log \text{FFU/ml}$ and the virus gene copies reached 2.7×10^7 . The virus gene sequence had no mutation, indicating a high genetic stability. **Conclusions** A Caco-2 cells-adapted *Human astrovirus* JZ-10 strain has been obtained. It shows the primary biological characteristics of the original strain and good antigenicity. These findings lay a material foundation for the basic researches on *Human astrovirus* and the development of vaccine.

Keywords: *Human astrovirus*; human colon adenocarcinoma cell; adaptability; biological characteristics

收稿日期: 2018-02-06

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81201285); 辽宁省自然科学基金 (No: 20170540399); 辽宁省高校优秀人才项目 (No: LJQ2015067); 辽宁省大学生创新创业项目 (No: 201510160000027)

[通信作者] 赵微, E-mail: zhaowei8072@163.com; Tel: 0416-4673371

人星状病毒 (human astrovirus, HAstV) 为无囊膜、单股、正链 RNA 病毒, 是导致婴幼儿、老人及免疫缺陷人群腹泻的重要病原体^[1]。HAstV 具有 8 个传统的血清型 (HAstV 1 ~ 8), 其中 HAstV-1 型在全世界范围内广泛流行^[2]。目前, 国内 HAstV 的研究报道局限在流行病学分析, 有关病毒的分离方法及生物学特性报道较少。本文对 HAstV-1 型野毒株进行细胞适应性培养及生物学鉴定, 为后续深入研究星状病毒的分子致病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞与病毒

Caco-2 细胞 (美国 ATCC 细胞库), 35 份腹泻患儿粪便样本来源于辽宁省某市私立幼儿园群体腹泻样本, 并由本实验室保存。

1.2 主要试剂

DMEM 培养基、胎牛血清 (Cell Culture Companion, 美国 Gibco 公司), HAstV 抗体 (8E7) 为小鼠单克隆抗体 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司), HAstV、轮状病毒、诺如病毒、腺病毒酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒购自丹麦 Dako Diagnostics 公司, FITC 标记的羊抗鼠 IgG、猪胰酶及胰酶抑制剂购自美国 Sigma-ALDRICH 公司和中国上海分公司; 病毒 RNA 抽提试剂盒 (德国 Qiagen 公司), 逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 和实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 相关分子生物学试剂购自大连宝生生物工程公司有限公司, 基因测序由上海杰李生物测序公司完成。

1.3 HAstV 的鉴定

粪便样本经过 PBS 漩涡离心处理后取上清液作为第一代野毒株 P1, 采用 ELISA 试剂盒检测样本中 HAstV、轮状病毒、诺如病毒、腺病毒。提取病毒 RNA, 采用病毒的特异性引物分别对 HAstV、轮状病毒、诺如病毒、腺病毒进行 RT-PCR 定性检测, 引物序列参考文献 [3-4]。

1.4 HAstV 在 Caco-2 上的扩增及适应性培养

将 Caco-2 细胞接种于 6 孔板, 长至单层, 取 500 μ l HAstV P1 代野毒株上清液, 加入猪胰酶 (终浓度 100 ~ 200 μ g/ml), 于 37℃ 激活 60 ~ 90 min 后, 加

入同量的猪胰酶抑制剂。病毒加入细胞前, 细胞饥饿培养 4 h, 将病毒液加入细胞表面吸附 60 ~ 90 min 后, 弃去病毒, 用 PBS 洗 2 次, 加入无血清培养基 DMEM 持续培养, 96 h 后用细胞刮刀收集所有细胞及细胞培养液, -70℃ 冻存。感染后的细胞及细胞培养液经过 3 次反复冻融后, 使病毒释放, 4℃ 离心, 弃细胞碎片, 收集上清液作为第 2 代病毒 (P2) 进行扩增。按照上述方法经过 10 次 (P1 ~ P10) 扩增传代及适应性培养。

1.5 qRT-PCR

采用 SYBR 染料法检测每一代次 HAstV 的拷贝数。HAstV 正向引物: 5-CCGAGTAGGATCGAG GGT-3, HAstV 反向引物: 5-GCTTCTGATTAATCAAT TTTAA-3, 扩增 HAstV 衣壳蛋白 *ORF2* 特异性基因, 扩增产物 88 bp。扩增产物经过回收纯化后构建标准质粒, 采用核酸分光光度计检测质粒浓度, 并根据公式基因拷贝数 / (copies/ml) = (6.02 \times 10²³/mol \times 质粒浓度 g/ml) / 分子量 (MWg/mol), 计算标准质粒 DNA 拷贝数, 建立 DNA 标准品质粒。标准品质粒进行 10 倍梯度稀释, 每个样本重复 3 次, 以 Ct 值为横坐标, 以 log 基因拷贝数为纵坐标, 建立标准曲线。采用 qRT-PCR 仪 (BIO-RAD IQ5) 对病毒基因拷贝数进行测定。

1.6 免疫荧光法

采用免疫荧光法检测病毒抗原。将 Caco-2 细胞接种于 6 孔板, 取第 6 代病毒液 (P6) 按照上述方法感染细胞, 采用 4% 多聚甲醛固定, 经过打孔、封闭后, 一抗加入 HAstV 8E7 抗体 (1 : 1 000, 8E7 为小鼠单克隆抗体), 二抗为 FITC 标记的山羊抗小鼠抗体 (1 : 500)。荧光显微镜下观察细胞内 HAstV 荧光灶。

1.7 病毒基因稳定性检测

分别提取 P1 ~ P10 代病毒液 RNA, 经过逆转录后, 采用 PCR 方法扩增 HAstV 衣壳蛋白特异性基因 *ORF2*。ORF2 正向引物: 5-ATGGCTAGCAA GTCCAATAAGCA-3, ORF2 反向引物: 5-CTACTCGG CGTGGCCGCGCTTCC-3, 扩增产物 2 364 bp。扩增产物经过琼脂糖电泳检测, 回收纯化, 构建到 PMD-18T 载体中, 转化大肠杆菌, 经过扩增培养后提取质粒, 送上海杰李生物测序公司测序。

1.8 荧光灶法

采用荧光灶法检测病毒滴度。将 Caco-2 细胞按 1 \times 10⁴ 个 /ml 的密度接种于 96 孔板, 再加入 10 倍系列稀释的病毒感染细胞上清 (50 μ l / 孔), 按照 1.4 中的

方法感染细胞, 96 h 后弃去病毒液, 加入 4% 多聚甲醛 4℃ 固定 30 min; 弃去固定液, 加入抗 HAstV 荧光抗体 8E7 (1 : 1 000 稀释) 50 μl/孔, 37℃ 中和 1 h; PBS 清洗后, 加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG (1 : 500), 37℃ 孵育 1 h, PBS 冲洗后, 在荧光显微镜下观察, 计算终末稀释孔荧光灶个数, 并计算病毒滴度。病毒滴度 (FFU/ml) = (最高稀释倍数孔荧光灶个数的平均值 + 相邻较低稀释倍数孔荧光灶个数的平均值) / 2 × 相邻较低稀释倍数 × 每孔加入的病毒稀释液的体积。

1.9 统计学方法

绘制 qRT-PCR 标准曲线, 基因拷贝数取 Log 对数作为因变量, Ct 值作为自变量, 应用直线回归法。

2 结果

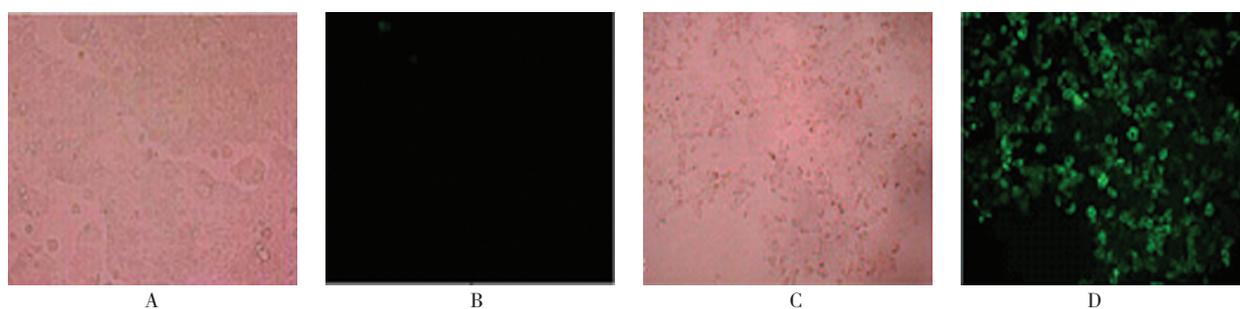
2.1 HAstV 的定性结果

35 份腹泻样本经过 PBS 处理后 ELISA 结果表明, HAstV 感染率为 85.7% (30/35), 未检出其他病毒的感染。RT-PCR 检测结果表明, HAstV 检出率为 100%。将所有样本进行基因测序, 结果检测出 15 株 HAstV

(GenBank No.KF211460 - KF211474), 经过序列分析对比及遗传进化分析, 确认分离的毒株属于 HAstV-1d 亚型^[5]。本研究选取其中 1 株毒株编号 JZ-10 作为 P1 代野毒株进行后续研究。

2.2 HAstV 的适应性培养、增殖及抗原检测结果

HAstV JZ-10 接种 Caco-2 细胞传代到第 10 代, 未观察到明显的细胞病变。但通过免疫荧光法检测细胞内的病毒感染情况, 表明 JZ-10 毒株在 Caco-2 细胞连续传 10 代, 在接种病毒的细胞内均检测到明亮的绿色病毒特异性荧光, 而对照组细胞内未见绿色荧光 (以第 6 代病毒为例) (见图 1)。表明 HAstV 已经适应在 Caco-2 内的复制, 且具有良好的抗原性。毒株适应细胞的最佳培养条件为: 毒株感染前加入终浓度为 200 μg/ml 的猪胰酶, 于 37℃ 激活 90 min 后再加入同量的猪胰酶抑制剂。激活的病毒液加入细胞表面吸附 90 min 后, 弃去病毒, 维持培养液中不加血清, 维持培养 96 h 后收取全部细胞及上清液。经过 3 次反复冻融使病毒释放, 4℃ 离心, 弃去细胞碎片, 收集上清液作为下一代病毒。



A、B: 未感染细胞; C、D: JZ-10 感染细胞

图 1 JZ-10 毒株 P6 代感染 Caco-2 细胞 (免疫荧光 × 20)

2.3 细胞内 HAstV 的拷贝数

采用 HAstV 荧光定量引物进行 PCR 扩增后出现 88 bp 的目的片段, 回收目的片段克隆测序进行序列比对, 结果显示该片段与 HAstV-1 ORF2 基因相似性为 100%。建立标准质粒 PMD18-T-ORF2, 质粒浓度 458.3 μg/ml。根据公式计算出质粒的基因拷贝数为 1.5×10^{11} copies/ml。质粒按照 10 倍梯度稀释后行 qRT-PCR 检测, 根据扩增结果绘制 Ct 值标准曲线, \log 基因拷贝数 = $-0.3141 (Ct) + 13.87$, 决定系数 $R^2 = 0.997$, T_m 值 (85 ± 0.05) °C (见图 2)。JZ-10 毒株基因拷贝数结果见附表, 随着病毒传代次数的增加, HAstV 的拷贝数增加, P9 代和 P10 代

达最高峰, 基因拷贝数达 1×10^7 。

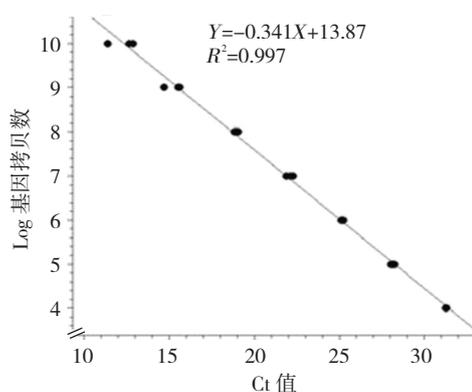


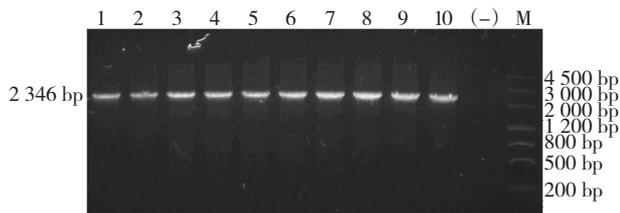
图 2 qRT-PCR 标准曲线

附表 HAstV JZ-10 毒株基因拷贝数

毒株代数	Ct/ ($\bar{x} \pm s$)	基因拷贝数 / (copies/ml)
P1	33.75 ± 0.58	1.82 × 10 ³
P2	31.47 ± 0.05	9.66 × 10 ³
P3	30.21 ± 0.07	2.30 × 10 ⁴
P4	29.23 ± 0.27	4.80 × 10 ⁴
P5	28.11 ± 0.03	1.09 × 10 ⁵
P6	27.60 ± 0.15	1.58 × 10 ⁵
P7	26.4 ± 0.21	3.70 × 10 ⁶
P8	25.3 ± 0.25	8.30 × 10 ⁶
P9	24.8 ± 0.15	1.20 × 10 ⁷
P10	23.7 ± 0.26	2.70 × 10 ⁷

2.4 HAstV 特异性基因稳定性鉴定结果

提取 P1 ~ P10 培养物的 RNA, 采用 RT-PCR 扩增 HAstV 衣壳蛋白全长基因 ORF2, 同时设立阴性对照组和阳性对照组。经琼脂糖凝胶电泳分析, 可见 2 346 bp 的特异性基因片段(见图 3)。经过测序分析, P1 ~ P10 代基因序列一致, 无突变现象, 基因序列稳定。



M: DNA marker; 1 ~ 10: P1 ~ P10 代病毒 PCR 产物

图 3 HAstV 衣壳蛋白全长基因 ORF2 RT-PCR 扩增产物

2.5 HAstV 的感染滴度

HAstV-1 型 JZ-10 株在 Caco-2 细胞上连续传 10 代, 病毒的感染性滴度呈持续升高直至稳定适应过程, 第 1、2 代病毒滴度最低, 传至第 3 代时, 病毒的感染性滴度开始增加, 达 3.3 logFFU/ml; 至第 9、10 代, 病毒滴度最高, 达 6.97 LogFFU/ml(见图 4)。

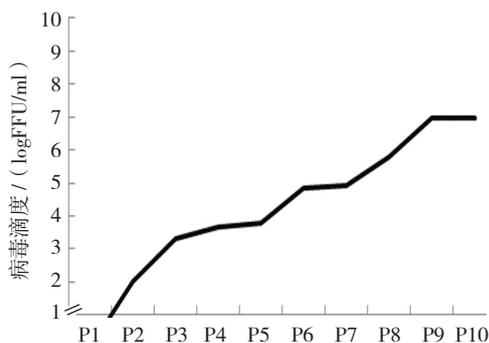


图 4 HAstV-1 型 JZ-10 毒株不同代次感染性滴度

3 讨论

小儿腹泻是全球性的重要公共卫生问题之一, 除轮状病毒、杯状病毒和腺病毒以外, HAstV 是也是一个引起儿童病毒性腹泻的重要致病因子^[6]。近 10 年来, 我国婴幼儿感染 HAstV 的检出率逐年增加; 2010 年, 国内幼儿园及产科病房新生儿 HAstV 感染性腹泻的爆发引起儿科的高度重视^[7]。HAstV 与其他肠道病毒, 如诺如病毒、轮状病毒、腺病毒等混合感染, 延长患者的治愈周期, 增加患者的死亡率, 已成为公共卫生问题^[8]。本实验分析 HAstV-1 型毒株在 Caco-2 细胞上的适应性及毒株的生物学特性, 为后续研究病毒的分子生物学机制及疫苗研发奠定基础。

HAstV 具有独特的生物学特性, 由于病毒感染细胞后, 没有明显的细胞病变, 因此给病毒的分离培养及滴度检测带来困难。本课题组前期在幼儿园腹泻群体样本中分离出 1 株 HAstV-1 型, 根据病毒的生物学特性, 进行病毒分离与细胞的适应性培养。文献报道, Caco-2 细胞能够支持 HAstV 株的复制和感染, 已成为研究 HAstV 感染的标准细胞系^[9]。一些肠道病毒在体外细胞培养时都需要胰酶的存在, 如小儿轮状病毒^[10]。本文实验最终采用终浓度为 200 μg/ml 的猪胰酶, 于 37℃ 激活 90 min 后进行病毒感染, 在细胞的传代过程中, 每次接种病毒都要进行胰酶的激活处理, 胰酶的活性作用可以使病毒粒子激活, 形成具有感染性的病毒粒子, 并能够维持病毒在细胞内具有一定的感染滴度。本实验结果表明, JZ-10 毒株经过 10 代的细胞适应性培养后, 虽然未出现可见的 CPE, 但是免疫荧光检测结果提示, HAstV 已经适应在 Caco-2 内的复制, 在无血清 DMEM 维持培养时, 细胞不脱落, 免疫荧光检测病毒能够识别 HAstV 单克隆抗体, 具有良好的抗原性。而本实验采用 Caco-2 细胞进行病毒的分离培养, 该细胞的功能和分泌与小肠上皮细胞类似, 并能够形成隐窝结构, 因此 HAstV 感染 Caco-2 后的致病作用与天然病毒感染类似。

病毒滴度测定是 HAstV 在后续研究实时处理因素中的重要步骤。目前测定病毒滴度的方法有多种, 一类是对病毒粒子进行物理定量; 一类是生物学方法, 如空斑滴定法、50% 细胞组织感染法、免疫荧光法等。由于 HAstV 感染细胞后不能观察到明显的细胞病变, 因此本实验采用微量免疫荧光灶法测定病毒滴度, 通过 HAstV 一抗孵育, FITC 标记的二抗杂交, 利用荧光显微镜观察发光细胞的数量, 判断细胞的感染量。该

方法有效检测出 HAstV 的滴度,随着传代次数的升高,病毒滴度增加,病毒感染滴度可以满足后续实验的需要。同时本实验采用 qRT-PCR 对病毒在细胞内增殖情况进行检测,病毒的基因拷贝数能够反映病毒在宿主细胞内的复制情况和宿主细胞的感染性。该方法能够较为精确地反映病毒中的病毒颗粒数。本实验中,病毒的基因拷贝数与病毒的滴度呈正相关,且随着传代次数增加,病毒基因组保持稳定。

通过本实验 HAstV 的适应性培养与增殖研究,获得能够在实验室中分离培养的细胞适应性 HAstV-1 毒株,该毒株的获得为后续进行 HAstV 的研究奠定了基础。

参 考 文 献:

- [1] TOH Y, HARPER J, DRYDEN K A. Crystal structure of the human astrovirus capsid protein[J]. *J Virol*, 2016, 90(20): 9008-9017.
- [2] KHAMRIN P, THONGPRACHUM A, OKITSU S. Multiple astrovirus MLB1, MLB2, VA2 clades, and classic human astrovirus in children with acute gastroenteritis in Japan[J]. *J Med Virol*, 2016, 88(2): 356-360.
- [3] BENNETT S, GUNSON R N. The development of a multiplex real-time RT-PCR for the detection of adenovirus, astrovirus, rotavirus and sapovirus from stool samples[J]. *J Virol Methods*, 2017, 242: 30-34.
- [4] PHAN T G, NGUYEN T A, YAN H, et al. Development of a novel protocol for RT-multiplex PCR to detect diarrheal viruses among infants and children with acute gastroenteritis in Eastern Russia[J]. *Clin Lab*, 2005, 51(7-8): 429-435.
- [5] HOU M, LIANG X, TAN L, et al. Outbreak of human astrovirus 1 lineage 1d in a childcare center in China[J]. *Virol Sin*, 2016, 31(3): 258-261.
- [6] THONGPRACHUM A, KHAMRIN P, PHAM N T. Multiplex RT-PCR for rapid detection of viruses commonly causing diarrhea in pediatric patients[J]. *J Med Virol*, 2017, 89(5): 818-824.
- [7] LI C Y, LIU N, GUO W D, et al. Outbreak of neonatal gastroenteritis associated with astrovirus serotype 1 at a hospital in Inner Mongolia, China[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(11): 4306-4309.
- [8] JOHNSON C, HARGEST V, CORTEZ V. Astrovirus pathogenesis[J]. *Viruses*, 2017, 9(1): 22.
- [9] BRINKER J P, BLACKLOW N R, HERRMANN J E, et al. Human astrovirus isolation and propagation in multiple cell lines[J]. *Arch Virol*, 2000, 145(9): 1847-1856.
- [10] DENNEHY P H. Rotavirus infection: a disease of the past[J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2015, 29(4): 617-635.

(童颖丹 编辑)