

中华鳖虹彩病毒的纯化及分析

朱春华^{1,2}, 刘 荭³, 杨金先¹, 刘晓东¹, 郑在予¹, 林天龙¹

(1. 福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350003; 2. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013; 3. 深圳出入境检验检疫局, 广东 深圳 518001)

摘 要: 为制备高纯度的中华鳖虹彩病毒, 分析其免疫相关抗原, 采用 3 种方法纯化中华鳖虹彩病毒粒子并对其结构蛋白进行了初步分析。结果表明: 差速离心法回收的样品中病毒纯度差、密度低, 在电镜下不易观察到病毒粒子; 病毒培养物经冻融、磁力搅拌、超声处理后, 进行差速离心可提高病毒的回收率, 但超声处理易造成病毒结构破坏; 病毒培养物经离心浓缩、匀浆、磁力搅拌处理, 再通过差速和蔗糖密度梯度离心纯化后, 在蔗糖密度为 30%~ 40%、40%~ 50% 和 50%~ 60% 之间分层的样品中均可观察到病毒粒子, 其中, 蔗糖密度为 50%~ 60% 之间回收的病毒粒子纯度最高, 且结构完好。SDS-PAGE 分析表明, 纯化病毒至少含 20 条蛋白条带, 分子量为 50kDa 的核衣壳蛋白是中华鳖虹彩病毒的高丰度蛋白。Western blot 分析结果证实大多数蛋白条带能被鼠抗中华鳖虹彩病毒高免血清特异性地识别。

关键词: 虹彩病毒; 中华鳖; 纯化; 分析

中图分类号: S 941. 41 文献标识码: A

Purification and analysis of soft shell turtle iridovirus

ZHU Chunhua^{1,2}, LIU Hong³, YANG Jinxian¹, LIU Xiaodong¹, ZHENG Zaiyu¹, LIN Tianlong¹

(1. Biotechnology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China; 2. Animal Husbandry and Veterinary Medicine Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China; 3. Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen, Guangdong 518001, China)

Abstract: In order to obtain highly purified soft shell turtle iridovirus (STIV) for immunological studies, 3 methods were investigated. The purified virus was analyzed to certify its purity and protein structure. Results indicated an impurity and low recovery rate in the process applying two freezing-thawing cycles followed by differential centrifugation. Furthermore, the electron microscopic observation on the virus was difficult. On the other hand, by freezing-thawing the virus culture followed by magnetic stirring, ultrasonication and differential centrifugation, the virus recovery rate was improved. However, the virus structure was damaged. Alternatively, virus culture was concentrated by centrifugation, homogenization, magnetic stirring and differential centrifugation, in that order, and followed by sucrose density gradient centrifugation. The most satisfactory result was finally obtained. The virus particles collected could be observed in 30%–40%, 40%–50% or 50%–60% sucrose density fractions. The most abundant and intact virions were seen in the 50%–60% fraction. The purified STIV virions were further subjected to SDS-PAGE. The result showed that the STIV contained more than 20 proteins, and that its major capsid protein corresponded to a 50kDa abundant protein. The Western blot analysis further indicated that most of the protein bands could be specifically recognized by using high quality mouse anti-STIV serum.

Key words: Iridovirus; soft shell turtle; purification; analysis

中华鳖 (*Trionyx sinensis*) 隶属爬行纲、龟鳖目 (Testudinata)、鳖科 (Trionychidae)、鳖属 (*Trionyx*), 是一种珍贵的、经济价值很高的水生动物。国外对爬行纲动物病毒的研究约始于 20 世纪 60 年代, 从蛇类、海龟、蜥蜴等动物中已发现 10 多种病毒^[1], 其中也有龟鳖类感染虹彩病毒的

收稿日期: 2008- 10- 22 初稿; 2008- 12- 12 修改稿
作者简介: 朱春华 (1980-), 女, 硕士, 研究实习员, 主要从事动物病毒学研究(E-mail: zchlxd80@163.com)
通讯作者: 林天龙 (1955-), 男, 研究员, 主要从事鱼类免疫学和病原学研究(E-mail: lint05@163.com)
基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科研项目 (2007IK022); 科技部 863 计划 (2006AA100306); 科技部“十一·五”国家科技支撑计划重点项目 (2006BAK10B06)

报道^[2-4]。国内 Chen 等^[5]从患病的中华鳖体内分离到1株虹彩病毒。虹彩病毒是危害中华鳖的重要病原之一,有关中华鳖虹彩病毒病原学研究还十分粗浅,病原检测缺乏有效的手段。

中华鳖虹彩病毒是虹彩病毒科(Iridoviridae)、蛙病毒属的1个成员,病毒主要通过敏感细胞系如鲤鱼表皮瘤细胞系(Epithelioma papulosum cyprini cell line, EPC)、草鱼卵巢细胞系(Grass carp ovary cell line, Co)传代培养而获得^[5]。纯化病毒是分析病毒结构蛋白及其功能的重要基础,可供选择的提纯方法多种多样,其中冻融处理是将病毒从宿主细胞中解析出来的重要步骤,然而经冻融处理的病毒悬液中富含宿主细胞碎片、膜物质、无定形结构成分碎片等杂质^[6],杂质的大量存在不仅妨碍病毒结构蛋白和基因组的精确分析,也将影响病毒抗血清的质量和特异性。本研究采用几种不同的方法纯化中华鳖虹彩病毒并对结果进行了比较与分析,旨在建立一种较为理想的中华鳖虹彩病毒纯化方法,为今后深入开展中华鳖虹彩病毒病原学特性研究奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和细胞 中华鳖虹彩病毒(Soft-shelled turtle iridovirus, STIV)和鲤鱼表皮瘤细胞系(Epithelioma papulosum cyprini cell line, EPC)均由深圳出入境检验检疫局保存。

1.1.2 试剂与培养液 L-15、胰酶购自Sigma;新生小牛血清、M199购自Hyclone;丙烯酰胺、双丙烯酰胺、TEMED、SDS购自上海生工;考马斯亮兰R/G-250购自Bio-Asia;2-巯基乙醇购自Biosharp;0.45μm硝酸纤维素膜购自Amersham;甘氨酸、Tris碱购自Novagen。

1.1.3 供试动物 SPF级、6~8周龄的Balb/C小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 病毒的提取与纯化 参考文献^[7-8]方法略做改进。3种提纯化方法简述如下,方法I:将病毒悬液在-70℃冻融两次后,4℃5 000 r·min⁻¹离心30 min,弃沉淀,上清经35 000 r·min⁻¹离心2 h,取沉淀重悬于少量PBS(pH 7.2)。方法II:将病毒悬液在-70℃冻融两次后,加入等体积的含1 mmol EDTA的PBS(pH 7.0),冰浴条件下磁力搅拌2h,200W超声波破碎30 min,然后5 000 r·min⁻¹离心30 min,弃沉淀,上清35 000

r·min⁻¹离心2 h,取沉淀重悬于少量PBS。方法III:将病毒悬液在-70℃冻融两次后,加入等体积的含1 mmol EDTA的PBS(pH 7.0),冰浴条件下磁力搅拌2h,4℃5 000 r·min⁻¹离心30 min,上清a与沉淀分离,然后将沉淀匀浆,重悬于约50 ml PBS中,5000 r·min⁻¹离心30 min,取上清与上清a混合后35 000 r·min⁻¹离心2h,取沉淀重悬于少量PBS。随后将悬液铺在蔗糖梯度(10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%)上60 000 g离心1h,根据条带的位置分成6份,用PBS重悬后35 000 r·min⁻¹离心2 h,取沉淀重悬于PBS后作电镜观察。

1.2.2 病毒的电镜观察 将经过以上3种方法提取的病毒悬液分别用无菌的PBS 10倍稀释后,取15 μL直接滴在Formvar膜覆盖的铜网上,2 min后滴加醋酸铀负染2 min,待铜网烘干后,在透射电子显微镜下观察。

1.2.3 SDS-PAGE分析 采用Mini Protein cell系统(Bio-Rad)按Laemmli系统进行变性还原条件下的凝胶电泳SDS-PAGE,分离胶的浓度为12%,堆积胶的浓度为4%,配制方法见蛋白质技术手册^[9]。将蔗糖密度梯度离心分离的各层病毒样品每孔8 μg蛋白质上样,脱色完全的凝胶经扫描后用Quantity One软件(version 4.6.2)对其条带进行分析。

1.2.4 免疫鼠血清的制备及效价测定 免疫分3次进行。首免取蔗糖密度梯度离心纯化的STIV用PBS稀释,再与等体积弗氏完全佐剂充分乳化后,腹腔注射6周龄Balb/C鼠,每只10 μg病毒蛋白。一免后21 d,以纯化STIV 50 μg与等体积弗氏不完全佐剂乳化后腹腔注射进行二免。二免21 d后不加弗氏佐剂进行三免。三免后第4 d摘眼球采血,10 000 r·min⁻¹离心5 min,取上层血清。间接ELISA法进行免疫鼠血清抗体效价测定。将蔗糖密度梯度离心纯化的病毒抗原稀释成10 μg·mL⁻¹包被于ELISA板条,EPC细胞经同样差速离心处理后包被作为对照,一抗为免疫鼠血清,按照1:500,1:1000...1:256000倍比稀释,同时取免疫前血清作对照;二抗为羊抗鼠HRP酶标抗体(1:5000稀释),以上各步骤加样量均为每孔50 μL。显色后在酶标仪上测定各孔的OD₄₉₀值,以P:N≥2.1、OD≥0.2时,判断为阳性。

1.2.5 Western blot分析 按照蛋白质技术手册^[9]方法进行免疫印迹试验,一抗为免疫鼠血清1:2000,二抗为AP酶标记羊抗鼠IgG(1:

20000), 用 Quantity One 软件 (version 4.6.2) 进行免疫印迹蛋白条带分析。

2 结果与分析

2.1 病毒的提取与纯化

病毒样品的蔗糖密度梯度离心结果可看到 4 条清晰的折光带 (图 1), 根据带的位置分成 6 层梯度液, B1< 20% 梯度液, 分布在带的上层, 从上到下的带分别命名如下: B2 在 20%~ 30% 蔗糖浓度之间、B3 在 30%~ 40% 蔗糖浓度之间、B4 在 40%~ 50% 蔗糖浓度之间、B5 在 50%~ 60% 蔗糖浓度之间, 同时将底层沉淀物命名为 B6。

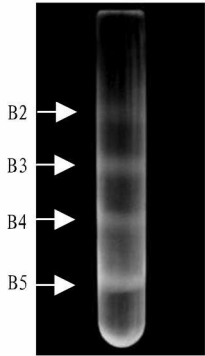


图 1 蔗糖密度梯度离心

Fig 1 Centrifugation by sucrose density gradients

2.2 病毒的电镜观察

方法 I 单纯经差速离心收获的病毒悬液, 负染未见任何病毒粒子, 只看到一些细胞碎片、无定形结构、膜物质等。方法 II 经超声破碎和磁力搅拌处理病毒悬液, 电镜下可观察到有损伤的病毒粒子 (图略)。方法 II 经蔗糖密度梯度离心, B1、B2 带区只看到细胞碎片、膜物质、无定形结构, 没有观察到病毒粒子; B3、B4 视野下能观察到病毒粒子, 但杂质含量占多数; B5 可清楚明显地观察到病毒粒子, 且呈现分开的状态, 杂质含量很少, 表明靠近 50% 的折光带为病毒主要区带 (图 2); B6 细胞碎片最多, 可观察到少数病毒粒子且同其他膜物质、无定形结构粘连, 究其原因可能是差速离心后的病毒在吹打过程中未能完全分散, 导致有些病毒粒子粘连其他物质沉到底部。负染观察到的病毒粒子主要是圆球形, 还有一些病毒粒子呈近似完整的六面形, 外周的衣壳由中央的致密核心体和其间的非电子致密层构成, 核衣壳的直径为 140~ 160 nm, 大小与 Chen 等^[5]报道基本一致。同时在电镜下可观察到单个病毒粒子的衣壳由外层和内层构成 (图 3)。

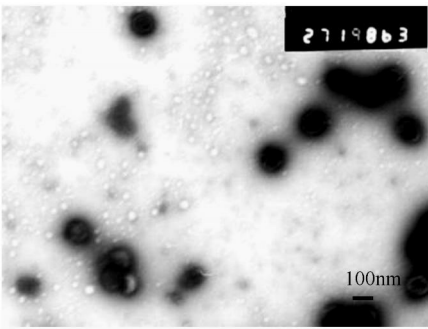


图 2 蔗糖密度梯度离心纯化的病毒粒子电镜负染图 (27000×)

Fig 2 Electron micrograph of negatively stained, purified viral particles obtained by means of sucrose gradient centrifugation

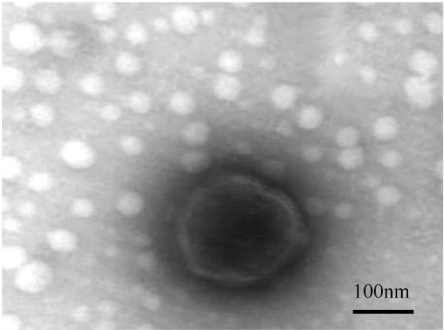


图 3 单个病毒粒子的电镜负染图 (27000×)

Fig 3 Negative stained virus particle

2.3 SDS-PAGE 分析离心产物

SDS-PAGE 鉴定纯化病毒样品的纯度, 通过考马斯亮兰染色法对电泳后的凝胶进行染色 (图 4、图 5)。由图可知, 经超速离心粗提的病毒悬液中至少 80% 以上为非病毒多肽成分, 其中只经过差速离心处理的病毒在 66kDa 左右有 1 条主带 (图 5), 可能是病毒培养基中的牛血清成分。SDS-PAGE 分析蔗糖密度梯度离心纯化后的病毒, 其中主要的蛋白分子量分别是 101kDa、84kDa、50kDa、35kDa、16kDa、14kDa。观察病毒的多肽, 发现在约 50kDa 的位置有 1 条丰度很高的蛋白带, 根据已有报道, STIV 的主要衣壳蛋白 (MCP) 带分子量是 50kDa^[10]。MCP 是虹彩病毒主要的结构蛋白, 占整个病毒粒子多肽的 40%~ 45%^[11], 并构成病毒的二十面体衣壳^[12]。

2.4 免疫鼠血清抗体效价测定

ELISA 结果显示, 多抗血清 ELISA 效价达 10 万以上。由图 6 可知, 免疫小鼠的抗原得到较好的纯化效果, 可用于后期的试验分析。

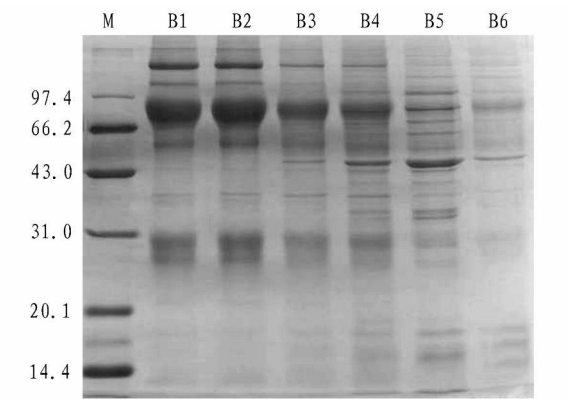


图 4 SDS- PAGE 分析蔗糖密度梯度离心的各个分层

Fig 4 SDS PAGE analysis on fractions from sucrose gradient centrifugation

注: M, 低分子量 M arker; B1- B6 分别代表蔗糖密度梯度离心后分离的各个层

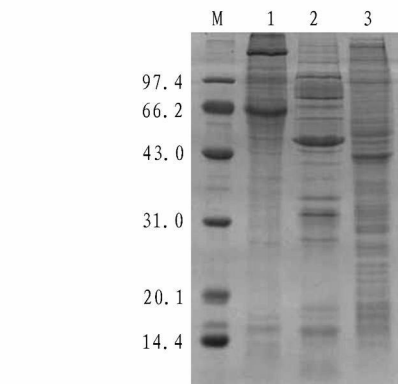


图 5 SDS PAGE 比较病毒多肽

Fig 5 SDS PAGE comparison of virion proteins

注: M, 低分子量 marker; 1, 差速离心处理的病毒; 2, 蔗糖密度梯度离心处理的病毒; 3, 正常 EPC 细胞

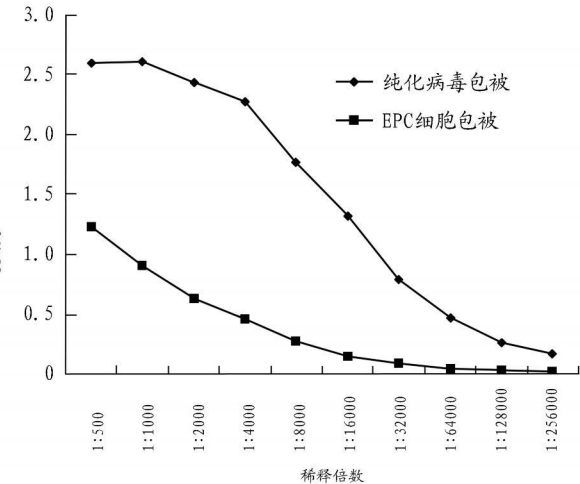


图 6 免疫鼠血清抗体效价测定

Fig 6 Titers of polyclonal mouse antiserum

2 5 Western blot 分析

运用 Western blot 进行 STIV 的抗原表位的特异性分析。由图 7 可知, 免疫鼠血清主要识别的病毒抗原的条带分别是 84kDa、63kDa、50kDa、35kDa、32kDa、16kDa、14kDa。

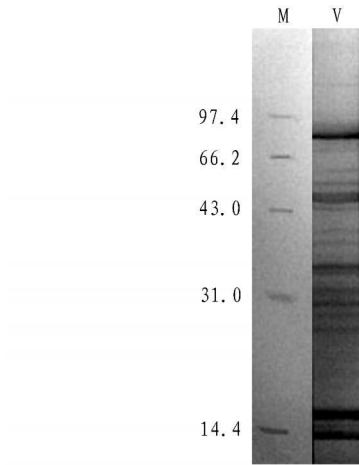


图 7 Western- blot 分析中华鲮虹彩病毒

Fig 7 Western blot analysis of STIV

注: M, 低分子量 marker; V, 纯化后的病毒粒子

3 讨 论

病毒的提取、纯化是进行病毒分类、理化特性、免疫学及分子生物学研究的基础。本项目采用的 STIV 提纯方法, 是在参考系统性造血组织坏死病毒 (EHNV)、石斑鱼虹彩病毒 (GIV)、虎纹蛙病毒 (RTV) 提取、纯化方法^[8, 13- 14]的基础上, 并经过多次比较、分析、改进而建立。建立高纯度病毒粒子的提取方法将为 STIV 等复杂病毒粒子进一步精确分析和研究奠定技术基础。

差速离心方法提取病毒简便、省时, 但所提取的病毒纯度不高, 杂质成分多不宜用于结构蛋白和基因组的分析。将差速离心提取的沉淀物再经超声波破碎或匀浆等方法的处理后, 再次差速离心纯化可以显著提高提取物的纯度。然而电镜观察发现, 经超声波破碎处理的病毒粒子存在结构上的损伤, 因此, 超声波破碎不宜用于结构复杂的病毒粒子纯化, 结构的损伤或囊膜的丢失也将影响结构蛋白分析的准确性。本方法在病毒悬液加入 EDTA, 减少细胞碎片对病毒粒子的黏附作用, 也具有抑制内原酶的酶解破坏作用, 同时在磁力搅拌的作用下促进细胞与病毒分离是获得纯化病毒的重要环节之一。分析比较的结果提示, 采用研磨匀浆处理差速离心沉淀的病毒显然优于超声波破碎, 虽然该方法不能使 STIV 与细胞碎片完全解离, 会损失部分病

毒, 但能够较好地保存病毒粒子的完整性, 因此, 要观察完整的病毒粒子或分析其结构蛋白研磨匀浆处理可能是一种理想的方法。蔗糖密度梯度离心纯化是病毒纯化常用的技术, 采用上述几种处理再经蔗糖密度梯度离心, 不仅可以获得高纯度的病毒粒子, 且结构完整。可用于中华鳖虹彩病毒结构蛋白和相关免疫学分析研究。

传统的电镜观察中, 树脂包埋超薄切片观察到的病毒粒子多呈经典的六角形结构^[2,5]。本试验采用负染方法电镜观察到的病毒粒子多是圆球形的结构, 而不是六角形结构, 这可能是由于病毒经过超速离心处理以及负染处理过程造成的, 也可能由于 STIV 粒子比较大, 容易发生变形。

SDS-PAGE 单向电泳分析结果显示, 至少能分辨出 STIV 的 20 条的蛋白条带。Western blot 结果分析表明, 这些蛋白条带能被 STIV 的免疫鼠血清特异性识别, 其中包括跟病毒抗原在 50kDa 左右有 1 条很强的类似主要衣壳蛋白的免疫反应带, 说明主要衣壳蛋白是 STIV 重要的抗原之一, 具有良好的免疫原性。

病毒纯化是进行病毒研究的一个关键, 蔗糖密度梯度离心纯化的方法由于其成本低、易于操作、对核酸和蛋白无损伤等的特性而成为目前病毒纯化普遍采用的方法。本研究通过蔗糖密度梯度离心方法纯化 STIV, 并对其抗原特性和免疫原特性进行分析。为制备抗 STIV 的单克隆抗体、建立 STIV 快速诊断方法以及进行后续的病原学和流行病学研究奠定重要基础。

参考文献:

[1] SHORTRIDGE K F, KURSAK E. Viruses of lower vertebrates in viruses of reptiles [M]. Ahne, w, Kursak E, Berlin Heidelberg: Sprinf Verlag, 1989, 51- 59.

[2] DEV R, GEISSLER K, ELM ORES, et al. Ranavirus-associated morbidity and mortality in a group of captive eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*) [J]. J Zoo Wildl Med,

2004, 35 (4): 534- 543.

[3] MARSCHANG R E, BECHER P, POSTHAUS H, et al. Isolation and characterization of an iridovirus from Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*) [J]. Arch Virol, 1999, 144 (10): 1909- 1922.

[4] WESTHOUSE R A, JACOBSON E R, HARRIS R K, et al. Respiratory and pharyngoesophageal iridovirus infection in a gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*) [J]. J Wildl Dis, 1996, 32 (4): 682- 686.

[5] CHEN Z X, ZHENG J C, JIANG Y L. A new iridovirus isolated from soft shelled turtle [J]. Virus Res, 1999, 63 (1- 2): 147- 151.

[6] HUANG X, ZHANG Q. Improvement and observation of immunoelectron microscopic method for the localization of frog *Rana grylio* virus (RGV) in infected fish cells [J]. Micon, 2007, 38 (6): 599- 606.

[7] SHI C, WEI Q, GIN K Y, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to a grouper iridovirus [J]. J Virol Methods, 2003, 107 (2): 147- 154.

[8] 苗素英. 虎纹蛙病毒理化特性、分类地位及其主要衣壳蛋白基因的研究 [D]. 广州: 中山大学, 2002.

[9] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 8.

[10] ZHAO Z, TENG Y, LIU H, et al. Characterization of a late gene encoding for MCP in soft-shelled turtle iridovirus (STIV) [J]. Virus Res, 2007, 129 (2): 135- 144.

[11] STOHWASSER R, RAAB K, SCHNITZLER P, et al. Identification of the gene encoding the major capsid protein of insect iridescent virus type 6 by polymerase chain reaction [J]. J Gen Virol, 1993, 74 (5): 873- 879.

[12] WILLIAMS T. The iridoviruses [J]. Adv Virus Res, 1996, 46: 345- 412.

[13] STEINER K A, WHITTINGTON R J, PETERSEN R K, et al. Purification of epizootic haematopoietic necrosis virus and its detection using ELISA [J]. J Virol Methods, 1991, 33 (1- 2): 199- 209.

[14] QIN Q W, LAM T J, SIN Y M, et al. Electron microscopic observations of a marine fish iridovirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina* [J]. J Virol Methods, 2001, 98 (1): 17- 24.

(责任编辑: 周 琼)