

草鱼出血病病毒多肽的荧光染色

王炜 陈延 蔡宜权 柯丽华

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

5941.411

A **提要** 将草鱼出血病病毒(Grass Carp Hemorrhage Virus, GCHV)置于还原性的溶液中, 然后加入等体积的 NaHCO₃ 配制的异硫氰酸荧光素溶液进行多肽的标记, 再经 SDS-PAGE 分析, 在紫外灯下即可检测到 GCHV 全部的 11 个结构多肽的荧光带。该方法最小检测量为 500ng, 由该方法回收的多肽具有抗原活性, 可作为抗原进行免疫学实验。

关键词 GCHV 多肽, 荧光染色

草鱼出血病; 病毒; 多肽

草鱼出血病病毒(Grass Carp Hemorrhage Virus, GCHV)是草鱼出血病的病原^[1], 该病毒系呼肠孤病毒科的一个新成员^[2], 无论对病毒的深入研究或对此病的有效防治, 对各个多肽的性质均需深入分析, 为此必须分离到单个的多肽, 并保持其生物学性质, 通常在蛋白质电泳后, 进行荧光染色即可, 但是荧光染色试剂来源不易, 因此我们采用来源较广的异硫氰酸荧光素, 对病毒多肽进行荧光标记, 再进行 SDS-PAGE 分析, 现将结果报道如下。

材料与方 法

- 1 病毒** 草鱼出血病病毒(Grass Carp Hemorrhage Virus, GCHV)875 由本实验室提供。
- 2 多肽的荧光标记** 根据异硫氰酸荧光素的特性及影响标记的因素^[3], 将病毒置于还原性的溶液中(Tris-HCL 0.25mol/L, 甘油 25%, SDS 0.086mol/L, 2-巯基乙醇, 0.32mol/L, pH6.9), 100℃保温 3 分钟, 然后加入等体积的 1mol/L NaHCO₃ 配制的异硫氰酸荧光素溶液(2mg/ml), 在 4℃反应过夜。标准蛋白的标记方法同上所述。
- 3 多肽的 SDS-PAGE** 未标记的多肽和异硫氰酸荧光素标记的多肽分别在 10%聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 电泳条件同前文报道^[3]。电泳结束后, 荧光标记多肽的凝胶直接在紫外灯下观察, 未标记多肽的凝胶经考马斯亮兰染色。

结果与讨论

1 荧光标记的效果

通常蛋白质的荧光标记条件十分苛刻, 许多情况下的蛋白质不能被有效地标记。因此, 我们设计了将病毒蛋白在还原条件下裂解成多肽, 此时溶液 pH 为中性, 不需要更换试剂, 可直接加入配制好的异硫氰酸荧光素进行标记。经 SDS-PAGE 分析, 标准蛋白在紫外灯下的荧光图谱与考马期亮兰染色图谱一致, 如图 1 所示。标记的 GCHV 多肽的凝胶在紫外灯下可见到 11

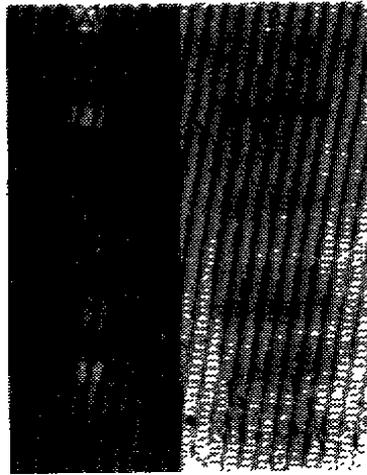


图1 标准蛋白的 SDS-PAGE 图谱

A: 荧光标记;
B: 考马斯亮兰染色

Fig. 1 Standard Protein SDS-PAGE Patterns

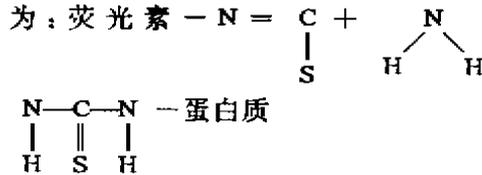
A: Fluorescence label;
B: Coomassie brilliant blue stain

条荧光带,如图2所示,与病毒结构多肽组成一致^[2]。由此说明每种多肽都能有效地标记上荧光素,方法是可行的。图2中病毒多肽的荧光强度不一,是因为各多肽在病毒中所占比例不一。在实验中,我们注意到如果直接用完整病毒进行标记,则不能使全部的结构多肽有效地标记,尤其是内层衣壳多肽不易

被标记,但是否可作为研究病毒多肽在内外层衣壳的分布的一种方法,值得进一步研究完善。

2 荧光标记的多肽性质

荧光标记多肽的电泳图谱与考马斯亮兰染色的电泳图谱比较(如图1),二者图谱一致,各种多肽迁移率未见改变,说明荧光标记后多肽的电泳行为未发生可见的变化。异硫氰酸荧光素标记蛋白质是通过化学键的连接,结合比较牢固而且稳定,其反应机理^[9]为:



因此,标记的多肽经电泳后,仍带有荧光素,故可见荧光。由于荧光标记的多肽仍具有一定的生物学性质^[1],因此,将此法标记的多肽在紫外灯下回收,可作免疫学研究,也可用于病毒多肽的大量制备。我们用此法回收了病毒的11个结构多肽,经免疫学实验证明这些多肽都具有抗原活性,并逐个测定了各个多肽的中和抗原能力,结果另文报道。

3 荧光标记的多肽检测灵敏度

将标准蛋白牛血清白蛋白(BSA)定量后进行标记,再经 SDS-PAGE 分析(凝胶厚度0.8mm),90瓦紫外灯下观察荧光带,最小可见到500ng的蛋白带,比考马斯亮兰染色灵敏度稍差,如图3所示。这可能由于异硫氰酸荧光素的吸收光谱是495nm,而我们用的紫外灯为45瓦275nm和45瓦360nm各一个,使荧光强度不够。

该方法具有如下优点:试剂简单,省时间,电泳结束后即可见

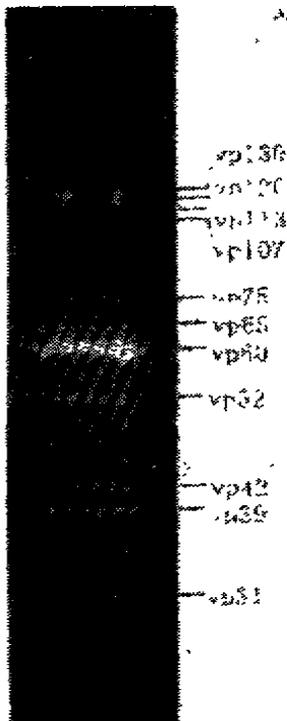


图2 GCHV多肽的 SDS-PAGE 荧光图谱

Fig. 2 GCHV Polypeptide SDS-PAGE Fluorescence Pattern

结果,可回收蛋白质,蛋白质具有抗原活性。在条件一般的实验室也能采用。



图3 标准蛋白的荧光图谱与考马斯亮兰染色图谱比较

A: 荧光图谱 B: 考马斯亮兰染色图谱

Fig. 3 Comparative SDS-PAGE Patterns of the Fluorescence Label and Coomassie Brilliant Blue Stain

A: Fluorescence label B: Coomassie brilliant blue stain I: 10µg BSA II: 0.5µg BSA III: 0.1µg BSA

参 考 文 献

- 1 中国科学院武汉病毒研究所,中国水产科学院长江水产研究所沙市分所草鱼出血病研究协作组.草鱼出血病病原—鱼呼肠孤病毒(FRV)核酸特性的研究.淡水渔业,1984,4:7-9
- 2 许屏主编.荧光和免疫荧光染色技术及应用.第1版,北京:人民卫生出版社,1983:80-82
- 3 王伟,陈延,柯丽华,等.草鱼出血病病毒武汉南湖株的精细结构与基因组及多肽的研究.病毒学报,1990,6(1):44-49
- 4 许屏主编.荧光和免疫荧光染色技术及应用.第1版,北京:人民卫生出版社,1983:69

The Fluorescence Staining of Grass Carp Hemorrhage Virus(GCHV) Polypeptides

Wang Wei Chen Yan Cai Yiquan Ke Lihua

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

It had been reported that the GCHV(Grass Carp Hemorrhage Virus)is a new member in Reoviridae and has 11 polypeptides by our laboratory. We did further experiments on the viral polypeptides. The virions(GCHV-875) were purified from the medium of infection culture cells by CsCl density gradient centrifugation,dissolved in the buffer containing Tris-HCl 250mmol/L, glycerin 25%, SDS 86mmol/L, 2-ME 320mmol/L(pH6.9) and then heated at 100℃ for 3 min. After that, by adding an equal volume of FITC solution(2mg/ml) in 1 mol/L NaHCO₃, the viral polypeptides were labelled with FITC, and analysed by SDS-PAGE. All the viral structural polypeptides(11 bands), namely VP130, VP120,VP113,VP107,VP75,VP65,VP60,VP52,VP42,VP39 and VP31, were visible under UV light. These polypeptides were retrieved by cutting down each band from the gel and demonstrated kept immunological property. The method can determine 500ng protein band in gel under UV light.

Key words GCHV polypeptides,Fluorescence staining