

一种改良的对虾白斑综合征病毒的提纯技术*

解云礼, 张叔勇, 黄茹, 石正丽**

(中国科学院武汉病毒研究所分子病毒学重点实验室无脊椎动物病毒学联合开放实验室, 湖北武汉, 430071)

A Modified Technique for Purifying *White spot syndrome virus*

XIE Yun-li, ZHANG Shu-yong, HUANG Ru, SHI Zheng-li**

(Key laboratory of Molecular Virology, Joint-Laboratory of Invertebrate Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: The envelope proteins of *White spot syndrome virus* (WSSV) are very fragile and easy to be destroyed during purification. It was difficult to obtain a large quantity of intact virions by routine sucrose gradient centrifugation. After modifying the sucrose gradient by adding citrate sodium, we can obtain a large quantity of intact virions and nucleocapsids. This purified virions and nucleocapsids were subsequently used for analyzing viral structural proteins and DNA extraction. The result showed that this modified technique is very efficient for virus purification.

Key Words: *White spot syndrome virus* (WSSV); Sucrose gradient centrifugation; Purification technique

中图分类号: S945

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 04-0391-03

对虾白斑综合征病毒 (*White spot syndrome virus*, WSSV) 是对虾养殖业的主要病原, 自 1992 年以来一直严重影响对虾的产量和质量, 造成巨大的经济损失。由于其宿主范围涉及几乎所有的水生甲壳类动物, 因此成为水生动物病毒研究领域重要的病毒之一。在对虾白斑综合征病毒研究的过程中, 病毒的提纯是关键的一步。由于该病毒的囊膜蛋白很容易降解, 很难得到完整的病毒粒子。传统的蔗糖密度梯度离心介质不仅会破坏病毒囊膜, 而且还会丢失大量的病毒粒子, 从而不易得到大量的、完整的病毒粒子^[1]。曾经报道一些改良的提纯技术可以得到纯度较高的核衣壳和病毒粒子, 为 WSSV 基因组研究奠定了良好的基础^[2, 3]。本论文报道的是一种改良的、能大量获得完整病毒粒子的蔗糖密度梯度提纯技术。

1 材料与方 法

病毒增殖采用敏感宿主-克氏原螯虾, 参照文献方法进行^[4]。

1.1 病毒的提纯

蔗糖 (分析纯) 溶于改良的柠檬酸钠缓冲液 (0.0272 mol/L Citrate sodium, 0.072 mol/L NaCl pH7.4), 配制成 50% 的储备液, 经自动梯度仪制成 20%~50% 的线性梯度。取 2mL 的血淋巴小心铺于梯度介质上。110 000g, 4℃ 离心 1h。吸出病毒带后, 用 TNE (0.5 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 0.01mol/L EDTA, pH 7.4) 稀释, 110 000g, 4℃ 离心 45min。病毒沉淀溶于 100μL 的 TNE 中, -80℃ 保藏备用。

1.2 病毒核衣壳的纯化

完整的病毒粒子 (250μg) 孵溶于 1.0% NP-40, 10mmol/L Tris-HCl, pH 8.5 中, 室温 30min。然后铺于 30% 的甘油上 (10mmol/L Tris-HCl, pH.8.5 配置), 150 000g, 4℃ 离心 1h (Beckman SW55)。沉淀为核衣壳成分, 囊膜成分从梯度顶部回收, 并经过丙酮沉淀。

1.3 电镜负染观察

取纯化的核衣壳和完整病毒粒子, 经过 2% 的

收稿日期: 2002-12-20, 修回日期: 2003-02-12

* 基金项目: 中国科学院生命科学与生物技术领域 2001 年知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-SW-302-2); 863 海洋生物技术课题 (2001AA620201)。

作者简介: 解云礼 (1977-), 男, 内蒙古籍, 硕士研究生。研究方向为水生动物病毒。

** 通讯作者: 石正丽 (1964-), 女, 博士, 研究员, 研究方向为水生生物病毒。Correspondence author. E-mail: zishi@pentium.whiov.ac.cn

PTA (pH7.0) 染色后, 在日立 (HITACHI) 7000-FA 型透射电镜下观察。

1.4 病毒的结构蛋白多肽分析

采用不连续 SDS-PAGE 系统^[5], 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 15%, 凝胶自动成像系统 (Gel Doc 2000) 扫描记录病毒多肽图谱。

2 结果与讨论

常用的蔗糖密度梯度缓冲液为 TN, 提纯的病毒收获量低, 且病毒粒子的囊膜易受到破坏^[1, 6]。本实验采用柠檬酸钠缓冲系统配置蔗糖梯度, 病毒在改良后的蔗糖密度梯度离心后, 出现明显的病毒粒子带, 病毒收获量明显多于常用的蔗糖密度梯度, 且病毒粒子的囊膜保存完整 (图 1)。经 NP-40 处理后的核衣壳在改良的离心介质中同样得到很好的结果 (图 2)。



图 1 纯化的完整 WSSV 病毒粒子

a, 大量纯化的完整的病毒粒子, 标尺表示 300 nm; b, 病毒粒子显示尾状结构, 标尺表示 100 nm。

Fig.1 Purified intact virions

a, Large quantity of intact virions, bar = 300 nm; b, The tail-like structure of virion, bar=100 nm.

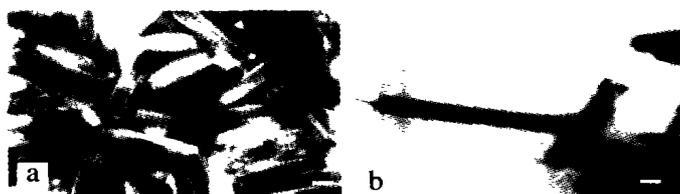


图 2 纯化的 WSSV 核衣壳

a, 大量纯化的 WSSV 核衣壳; b, 显示异常长度的核衣壳; 标尺表示 100nm。

Fig.2 Purified WSSV nucleocapsids

a, Large quantity of WSSV nucleocapsids; b, An unusual nucleocapsid; Bar=100nm.

自 1992 年对虾病爆发以来, 很多研究小组投入了很大的精力对该病毒进行研究。但由于对虾白斑

综合征病毒的囊膜成分比较容易降解, 得到完整的病毒一直得不到很好的解决。Yang^[2]等报道的核衣壳纯化技术避免了密度梯度纯化步骤, 但不适于完整病毒粒子的纯化。Huang^[3]等采用溴化钠密度梯度介质, 也很好的分离纯化到了完整的病毒。但这两种方法的缓冲系统成分复杂, 且加有剧毒的蛋白酶抑制剂苯乙基甲磺酰氯 (PMSF), 给科研人员带来一定的危害。通过摸索, 我们发现在普通蔗糖介质中加入柠檬酸钠缓冲液, 能够降低普通蔗糖介质的粘度, 并有效的保护病毒的囊膜不被降解, 可以获得大量的纯度高的病毒粒子, 有效地解决了常规病毒提纯过程中病毒收获量的问题。这种改良的介质成分简单, 无毒性成分加入, 经多次重复均得到很好的结果, 是 WSSV 理想的提纯技术。

利用提纯的完整病毒粒子、核衣壳和囊膜成分进行蛋白电泳分析, 病毒的囊膜蛋白出现三条带, 分别为 19、24 和 26kDa。核衣壳蛋白出现一条带, 分子量为 15kDa (VP15)。VP19 的蛋白表达量相对其他主要结构蛋白要少, 有少量 VP24 在核衣壳蛋白电泳中出现微弱的一条带 (图 3)。没有病毒宿主血淋巴蛋白成分出现, 进一步证实了该提纯技术的可靠。

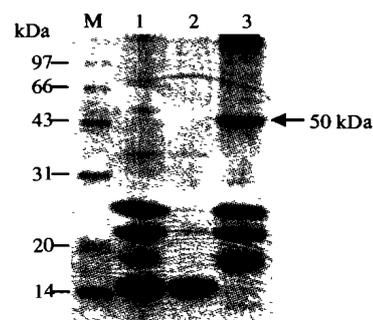


图 3 WSSV 结构蛋白 SDS-PAGE 图谱

1, 完整病毒; 2, 核衣壳; 3, 囊膜成分。

Fig.3 SDS-PAGE of WSSV structure protein.

1, Intact virions; 2, Nucleocapsid; 3, Envelope fraction.

在蛋白图谱中, 我们的结果以前的报道有一定的差异。Vlak 等报道在病毒的结构蛋白中有 5 条主要的结构蛋白带, 即 VP15、VP19、VP24、VP26 和 VP28^[7]。Huang 等报道的结果中也只有 4 条主要的结构蛋白带, 并且指出 VP28 和 VP26 为等分子量, 其分子量大小为 28kDa^[3]。我们用 Dr.Vlak 赠送的 VP24、VP26 和 VP28 特异性抗体杂交的结果表明, VP24 和 VP26 在同一分子量位置上, 大小为 24kDa, 难以分开, 而 VP28 的大小为 26kDa (结果

未显示)。我们认为, 导致这种不同的结果可能是由于不同的分离方法和时间所致。另外, 在病毒的囊膜成分中, 出现一条在完整病毒粒子成分中不存在的蛋白多肽(50kDa), 几次重复均出现相同结果, 其原因有待于进一步探讨。

在以前的报道中, 核衣壳的螺纹数多为 14-15 节^[1, 3, 8], 但在我们的实验中, 我们发现了长度为 30 节的核衣壳, 从形态上观察, 不是两个病毒的连接体, 与其它报道的长核衣壳相似^[9]。此类特异长度的核衣壳有可能是在病毒的装配过程中出现的错误或未被切割的核衣壳。

参考文献

- [1] Durand S, Lighter D V, Redman R M, *et al.* Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV)[J]. *Dis Aquat Org*, 1997, 29:205-211.
- [2] Yang F, Wang W, Chen R Z, *et al.* A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus DNA[J]. *J Virol Methods*, 1997, 67:1-4.
- [3] Huang C, Zhan L, Zhang J, *et al.* Purification and Characterization of white spot syndrome virus (WSSV) produced in an alternate host: crayfish, *Cambarus clarkii*[J]. *Virus Research*, 2001, 76, 115-125.
- [4] 黄灿华, 石正丽, 张建红, 等. 中国对虾无包涵体杆状病毒体内增殖模型的建立[J]. *中国病毒学*, 1999 14:358-363.
- [5] Laemmli U K. Leavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [6] Shi Z. Etude d'un virus bacilliforme des crevettes Penaeidae (White Spot Syndrome Virus, WSSV): clonage, analyse partielle du genome et outils de diagnostic [D]. Montpellier: Montpellier University II, 2000.
- [7] Van Hulst M C, Westenberg M, Goodall S D, *et al.* Identification of two major protein genes of white spot syndrome virus of shrimp[J]. *Virology*, 2000a, 266: 227-236.
- [8] 黄捷, 于佳, 宋晓玲, 等. 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒的精细结构、核酸、多肽及血清学研究[J]. *海洋水产研究*, 1995, 16(1): 11-23.
- [9] 郭银汉, 林诗发, 杨小强, 等. 福州地区对虾白斑病病毒的超微结构[J]. *中国病毒学*, 2000, 15(3): 277-284.