

引致河蟹颤抖病的病毒的核酸定性*

金 业¹, 陆承平^{1**}, 李 显²

(1. 南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室, 江苏南京 210095; 2. 江苏省疾病预防控制中心, 江苏南京 210009)

**Property of Viral Nucleic Acid from the Virus Causing the Trembling disease
in *Eriocheir sinensis***JIN Ye¹, LU Cheng-ping^{1**}, LI Xian²

(1. Key Lab of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Jiangsu Province Center for Disease Prevention and Control, Nanjing 210009, China)

Abstract: In this paper we reported the electron microscope(EM) examination of "Trembling disease" virus in *Eriocheir sinensis*. The virions were globular, with envelope and spikes, and about 150nm of diameter. The purified nucleic acid was treated with 8mol/L urea and the viral nucleic acid was transferred to the EM grids by aqueous technique. The viral nucleic acid was single stranded under EM observation. The molecular weight of the viral nucleic was calculated to be about 5.05×10^6 . The agarose gel electrophoresis of the purified viral nucleic acid showed only one band, with the size of about 15~16kb. The nucleic acid was sensitive to RNase and Mung Bean Nuclease treatment, but not sensitive to Dnase I. The above data demonstrated that the nucleic acid should be a ssRNA.

Key words: *Eriocheir sinensis*; Trembling disease virus; Nucleic Acid; Electronic Microscope

摘要: 对河蟹(中华绒螯蟹)"颤抖病"病毒及其核酸进行了电镜观察。纯化病毒经负染后由电镜观察显示,病毒粒子呈球状,有囊膜和纤突,直径约为 150nm。纯化病毒经核酸酶降解杂核酸后,加入 8mol/L 尿素释放病毒核酸,经水相法展开后,用覆有碳膜的铜网取样,再经染色和真空镀膜,于电镜下观察。病毒核酸呈单股线状,底片经光学精确放大后,测定了核酸分子的长度,根据经验公式计算出病毒核酸分子量为 5.05×10^6 。抽提的病毒核酸在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳中呈单一条带,大小为 15~16kb,经核酸酶酶切显示,核酸对 DNase I 不敏感,对 RNase、Mung Bean Nuclease 敏感,根据以上特性判断,该核酸为 ssRNA。

关键词: 中华绒螯蟹; 颤抖病病毒; 核酸; 电镜观察

中图分类号: S947

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)01-0036-03

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*, 俗称河蟹)的人工养殖近年来蓬勃发展,与此同时,养殖区爆发的"颤抖病"造成了极大的经济损失。本课题组先前的研究表明,此病由病毒引起^[1, 2]。在此基础上,本试验利用电镜技术并结合酶切鉴定技术,分析了引致"颤抖病"病毒核酸的特征。

Kleinschmidt^[3]建立了蛋白单分子技术,使之能借助电镜直接观察核酸分子的结构和形态。该技术

重复性好,成了核酸电镜技术发展史上的里程碑。此法的原理是,利用球状碱性蛋白在水溶液或盐溶液中,表面形成不溶的变性薄膜,在蛋白质溶液中含有核酸分子时,带有负离子的核酸分子被带有正离子的蛋白质分子所包围,蛋白质在溶液表面展开成膜状单分子层,与此同时核酸分子也伸展成细丝状的形态。本研究通过病毒的直接释放,运用水相法展开方法,对引致河蟹"颤抖病"的病毒核酸进

收稿日期: 2003-08-11, 修回日期: 2003-10-28

* 基金资助: 国家自然科学基金项目(30370051); 江苏省科委应用基础项目(Q9902)

作者简介: 金业(1978-), 男, 硕士生, 主要从事兽医病毒学与免疫学的研究。

** 通讯作者。Corresponding author. Tel: 025-496517, E-mail: lucp@njau.edu.cn

行电镜观察, 并测其分子量, 为病毒分类提供核酸形态学的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

有明显“颤抖病”症状的河蟹 20 只, 约 100g/只, 2001 年 7 月采自常州金坛某养殖场。采样时去除已经死亡并已腐败的病蟹, 将处于濒死状态时的病蟹置于便携式液氮罐中取回, 立即转入 -76°C 超低温冰箱中保存备用, 以确保病料中的病毒不至失活。

Dnase I (Lot CE601-1)、Mung Bean Nuclease (Lot CC1701J) 购自大连宝生物公司。Rnase (Lot CAT109126) 购自瑞士 Roche 公司。Sephrose 6B 购自美国 Pharmica 公司。细胞色素 C 购自美国 Sigma 公司。Proteinase K (Lot x442968 001) 购自美国 Merck 公司。其它试剂为国产 AR 级。

1.2 病毒纯化

无菌操作解剖病蟹 10 只, 取肝胰脏、腮、胃肠及神经组织, 加入等量 PBS(pH7.2, 0.1mol/L), 加入青霉素、链霉素至终浓度达到 500IU/mL 及 500mg/mL, 置组织匀浆机内, 经 15000g 捣碎 5min, 连续 3 次。再用超声波乳化器处理 5min, 以 10000g 4°C 离心 30min, 除去上层油脂和下层组织碎片。上清用 10% 聚乙二醇 (PEG) 6000 盐析过夜, 10000g 4°C 离心 30min, 沉淀用 PBS 悬浮, 20000g 4°C 离心 30min, 取上清经 40 000rpm 4°C 离心 2h, 于沉淀中加入少量 PBS(pH7.2, 0.1mol/L) 悬浮混匀, 用 Sepharose 6B 层析, PBS 洗脱, 分部收集, 将 A260/A280>1 的部分置 PEG20000 透析, 浓缩至 2mL 备用。纯化的病毒悬液滴加于铜网上, 经 2% 磷钨酸染色 2min 后滴加蒸馏水洗, 干后用透射电镜 (日立 JEM-100CX II) 观察。

1.3 核酸电镜观察

1.3.1 细胞核酸的降解: 病毒液经 AGE (琼脂糖电泳) 后如存在污染的宿主细胞核酸, 则需用核酸酶处理, 取病毒液 1mL, 加入 Dnase(20mg/mL)、Rnase(25mg/mL) 各 100 μL , 置 37°C 水浴 1h。取 25 μL , 经 AGE 检查污染核酸已否降解。如否, 则需继续处理。

1.3.2 病毒核酸的释放: 病毒液 1 份, 加入 8mol/L 尿素 1 份, 混匀后置室温下作用 8~10h。

1.3.3 核酸展开及取样: 经尿素处理的病毒液 50 μL , 加入 25 μL 4mol/L 醋酸铵溶液, 10 μL 0.1mol/L TE, 10 μL 细胞色素 C 液, 混匀, 作为展层

液。取一洁净培养皿, 加入 0.25mol/L 的醋酸铵溶液作为下相液。于下相液表面轻撒少许滑石粉, 使其呈一层均质的薄膜。取一洁净玻片, 约以 30° 角斜插于下相液中。待下相液静止后, 吸取展层液约 15 μL , 滴于离下相液液面约 0.5cm 处的玻片上。液体沿玻片流下至下相液, 推开滑石粉形成蛋白膜。30s~5min 后, 用覆有碳膜的铜网, 在离玻片与液面交界处约 0.5cm 的无滑石粉区域取样。

1.3.4 染色与投影: 已取样的铜网用滤纸稍吸干后, 用 0.1% 的醋酸铀 (无水乙醇配置) 染色 30s, 于无水乙醇中漂洗 30s。置真空镀膜仪中以 6° ~ 9° 角旋转镀膜。最后于透射电镜下以放大 10 000~30 000 倍观察。底片经光学放大后, 测定核酸分子的长度, 并推算出核酸的分子量。

1.4 核酸抽提及鉴定

纯化病毒悬液用 10% SDS 及 Proteinase K 于 55°C 消化 3h, 用酚、氯仿-异戊醇混合抽提后, 加入 10% 的 3M 醋酸钠和 2 倍体积预冷无水乙醇, 12 000g 4°C 离心 15min, 获得病毒核酸, 分别经 DNase I、RNase、Mung Bean Nuclease 作用后, 在浓度为 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳观察, 利用凝胶成像分析系统 (Bio-Rad 公司) 摄像。

2 结果

2.1 病毒形态

纯化的病毒经磷钨酸染色后, 在电镜下可见球状病毒粒子有囊膜, 有纤突, 病毒直径约为 150nm (图 1)。



图 1 负染的病毒

Fig.1 Virions of crabs by negative staining

2.2 病毒核酸

采用水相法展开的核酸分子, 经醋酸铀染色和铂投影后, 在电镜下获得较满意的图象和反差, 核

酸呈单股线状, 核酸外有许多核蛋白结合小体^[4], 尚可见到正在释放核酸的病毒颗粒 (图 2)。

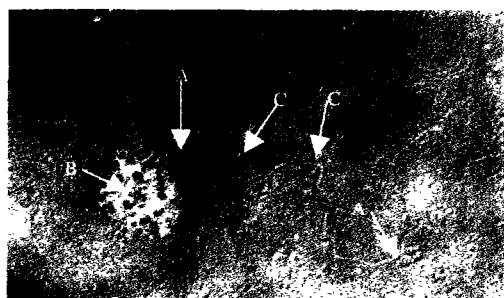


图 2 核酸电镜

Fig. 2 Viral nucleic acid under EM(25000×)

A, Viral nucleic acid; B, Viral nucleic acid liberating from virions; C, Nucleic protein.

电镜底片经光学精确放大后, 用地图测距仪测量了核酸分子的长度, 根据经验公式可推算出核酸的分子量为 5.05×10^6 Da, 与用酶切法得出的结果近似。

抽提的病毒核酸经 0.8% 琼脂糖电泳后, 病毒基因组不分节段, 呈一条带 (图 3), 以标示分子量推算, 病毒核酸大小为 15~16 kb。病毒核酸对 DNase I 不敏感, 对 RNase 敏感, 可以被单链特异性核酸内切酶 Mung Bean Nuclease 消化, 与电镜观察所得结果一致, 推测病毒核酸为 ssRNA。

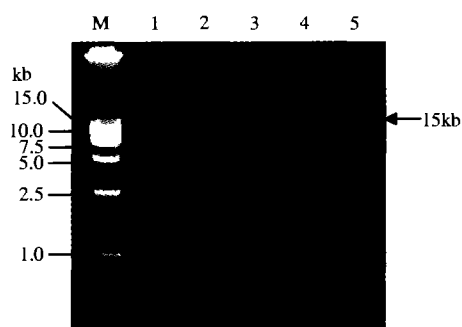


图 3 核酸的琼脂糖电泳

Fig. 3 Agarose electrophoresis of the nucleic acid

M, DNA marker; 1, RNase/Viral nucleic acid; 2, DNase I/Viral nucleic acid; 3, Viral nucleic acid; 4, Mung Bean Nuclease/Viral nucleic acid; 5. Contrast.

直接用提纯病毒经一步释放法进行核酸电镜观察^[5, 6]对于研究病毒核酸的结构、与核蛋白之间的关系和核酸股数的鉴定是一种简单而可靠的方法。本试验采用高浓度的尿素处理“颤抖病”病毒, 使其核酸从病毒的粒子中释放出来, 病毒浓度的高低, 对于能否获得良好的电镜核酸图象关系极大, 如浓度太高, 则核酸链之间互相缠绕, 重叠, 观察不清单个核酸分子的形态, 也无法测定核酸分子的长度。浓度过低, 则在电镜观察时难找到核酸分子。采用水相法展开的核酸分子, 经醋酸铀染色和铂投影后, 在电镜下可获得较满意的图象和反差, 核酸呈线性, 没有观察到核酸由于链内部分碱基配对而成的常春藤状形态^[7]。

一般认为, 单股核酸用水相法展开时, 链内或链间部分碱基往往会互相配对, 核酸链互相缠绕, 不易展成线状。但本实验中发现核酸分子展开充分, 这可能是尿素对病毒粒子作用 8~10h, 不仅能溶解病毒的衣壳蛋白, 同时在渗透中可以对核酸链给予洗涤, 使核酸的负电性表现得更为温和, 在释放过程中, 链间互相排斥, 使之有较好的分散性, 减少了交链及拉扯现象。

根据核酸分子长度推算核酸分子量, 确定核酸的股数是个关键。抽提的核酸经酶切反应鉴定显示该核酸为 ssRNA, 由此推算出的核酸分子量与酶切法得出的结果近似。

参考文献

- [1] 孙学强, 郭爱珍, 陆承平. 中华绒螯蟹颤抖病的人工复制实验[J]. 南京农业大学学报, 2000, 23(1): 74-76.
- [2] 孙学强, 陆承平. 河蟹颤抖病病毒的分离纯化及其动物致病性试验[J]. 中国病毒学, 2002, 17(2): 185-188.
- [3] Kleinschmidt A K. Methods in Entomology[M], 1968, 12B: 361-377.
- [4] Revet, B Delain E. The Drosophila x Virus contains a double-stranded RNA Circularized by a 67-kd Terminal Protein: High-Resolution Denaturation Mapping of Its Genome[J]. Virology, 1982, 123: 29-44.
- [5] Koltin Y, Steinlaur R. The killer Phenomenon in Ustilago: Electron Microscopy of the dsRNA Encapsidated in Individual Virus Particles[J]. Arch. Microbiol, 1980, 128: 45-52.
- [6] Chi, Y Y, Bassel A R. Election Microscopy of viral RNA: Molecular Weight Determination of Bacterial and Animal Virus RNAs[J]. Virology, 1974, 13, (6): 1194-1199.
- [7] Koehler J K. Advanced Technique in Biological Electron Microscope II[M]. 1978, 123-171.

3 讨论