

# 中国对虾肝胰腺细小病毒的纯化与鉴定\*

薛清刚 官云浩<sup>†</sup> 王文兴

(国家海洋局第一海洋研究所, 青岛 266003)

<sup>†</sup>(农业部动物检疫所, 青岛 266032)

**提要** 于1991年9月—1993年底, 利用在青岛市沙子口对虾养殖场采集的中国对虾病虾肝胰腺样品, 采用一种改进的洒石酸钾—甘油密度梯度离心法, 对原先称之为肝胰腺细小样病毒的一种对虾病毒进行纯化, 通过电子显微镜观察、提取病毒核酸用不同核酸酶处理并结合电泳等方法, 对病毒的基本生物物理和生物化学特性作鉴定。结果表明, 用洒石酸钾—甘油密度梯度离心法, 可获得良好的病毒纯化效果: 纯化后的病毒颗粒显示正二十面体立体对称的特征, 颗粒直径为23.3—29.8nm, 平均26.3nm, 在CsCl中的平均浮力密度为1.360g/cm<sup>3</sup>; 空的衣壳直径为22—24nm, 平均23.2nm; 病毒基因组为分子长度相当于4.3kbp的单链DNA, 病毒具有4种结构多肽, 分子量分别为86.1kdal, 58.2kdal, 40.9kdal和39.8kdal。从而证明, 该病毒的确是一种细小病毒。

**关键词** 中国对虾 肝胰腺细小病毒 纯化 鉴定

对虾病毒和对虾病毒病是近年世界水产养殖界普遍关注的问题。到目前为止, 世界上已发现了多种对虾病毒, 见诸于文献的已有10多种(薛清刚等, 1992a, b; Lightner, 1993)。对虾肝胰腺细小样病毒(Hepatopancreatic Parvo-like Virus, HPV)是发现较早的对虾病毒之一(Lightner et al., 1985)。迄今, 有关研究除在诊断方法上有所进展外(孙修勤等, 1992), 对于病毒的分类一直是推测性的。本研究是在改进纯化方法并将病毒大量纯化的基础上, 对纯化的病毒作形态学和生物物理、生物化学特性鉴定分析, 以期为确定病毒的分类位置和对病毒作更进一步的研究提供科学依据。

## 1 材料和方法

**1.1 试剂** 所用生物试剂购自华美生物技术公司。其中, DNA酶、RNA酶和蛋白酶K为Promega生物技术公司进口, S1核酸酶为Boehringer Mannheim生化试剂公司进口, 蛋白质分子量标志物为Pharmacia公司产品, DNA分子标志物由华美公司生产。化学试剂均为分析纯级。

**1.2 样品** 中国对虾(*Penaeus chinensis*, 简称对虾), 分别于1991年和1992年在青岛市沙子口对虾养殖场, 选择生长差、累积死亡率高的养殖后期(8—9月份)对虾群体, 随机取样固定并作常规组织病理学检查。捕获检查证实有文献中报道的HPV感染典型病变(薛清刚等, 1992a; Lightner et al., 1985)的对虾, 以清水冲洗干净, 相对无菌条件下取出肝胰腺, -70℃保存备用。

\* 国家自然科学基金资助项目, 39000083号。薛清刚, 男, 出生于1962年1月, 硕士, 副研究员。

收稿日期: 1995年3月10日, 接受日期: 1995年5月。

**1.3 酒石酸钾-甘油密度梯度离心纯化病毒** 冰冻肝胰腺组织快速解冻后, 用玻璃组织研磨器研成糊状, 以  $0.05 \text{ mol/L}$  Tris-HCl,  $0.001 \text{ mol/L}$  EDTA,  $\text{pH}=7.6$  (ET) 缓冲液配成  $30\%$  ( $V/V$ ) 悬液。在悬液中加入等体积的氯仿充分振荡, 于  $4^\circ\text{C}$  静置 2h, 以  $3000 \text{ r/min}$  转速离心 15min, 取上清液用  $1/2$  体积的氯仿重复处理 1 次。最后的水相液中加入  $60\%$  聚乙二醇 (PEG, MW 6000) 和固体 NaCl, 使相应终浓度分别达到  $7\%$  和  $1\%$ , 混匀后于  $4^\circ\text{C}$  静置过夜。将混合液置 Hitachi RP 45T 转子中, 以  $6000 \text{ r/min}$ , 于  $5^\circ\text{C}$  离心 30min, 弃上清液。沉淀用原体积  $1/10$  的 ET 缓冲液悬浮, 置 Hitachi RP 45T 转子中, 以  $10000 \text{ r/min}$ ,  $5^\circ\text{C}$  (下同) 离心 20min 去大颗粒; 上清液层加到  $35\%$  ( $W/W$ ) 蔗糖垫上, 以 Hitachi RP 70T 转子,  $60000 \text{ r/min}$ , 于  $5^\circ\text{C}$  离心 3.5h。取沉淀, 用 ET 缓冲液悬浮, 以 Hitachi RP 45T 转子,  $10000 \text{ r/min}$  离心 20min 去不溶物。上清液即为部分纯化的病毒悬液。

按照 Ashley (1982) 方法在塑料离心管内配制酒石酸钾-甘油密度梯度, 将部分纯化的病毒悬液层加到密度梯度介质表面, 置 Hitachi RPS 65T 转子中, 以  $60000 \text{ r/min}$ , 于  $10^\circ\text{C}$  离心 3h。直视下取出离心管内各折光带, 分别对  $0.01 \text{ mol/L}$  Tris-HCl,  $0.001 \text{ mol/L}$  EDTA,  $\text{pH}=8.0$  (TE) 缓冲液透析过夜。透析完毕并适当浓缩后, 分别取少量悬液作电子显微镜检查, 其余置  $-30^\circ\text{C}$  保存。

**1.4 CsCl 密度梯度离心纯化病毒与病毒颗粒的浮力密度测定** 用于分析病毒结构多肽的病毒颗粒, 在经酒石酸钾-甘油密度梯度离心后, 又通过 CsCl 密度梯度离心作进一步纯化的基本过程为: 将酒石酸钾-甘油离心纯化的病毒悬液经透析并  $3000 \text{ r/min}$  离心 15min 去大颗粒, 配制  $30\%—50\%$  ( $W/W$ ) CsCl 溶液, 制备不连续密度梯度, 置 Hitachi RPS 65T 转子,  $65000 \text{ r/min}$ , 于  $10^\circ\text{C}$  离心 3h。直视下取出折光条带, 留少许作电子显微镜观察, 其余对 TE 缓冲液透析过夜, 浓缩后于  $-20^\circ\text{C}$  保存备用。每次取离心后样品时, 先以微量注射器自条带中央吸取少量测定折光系数, 以确定病毒颗粒的浮力密度值。

**1.5 病毒颗粒的电子显微镜观察** 病毒悬液滴加到 Formvar 支持的铜网上,  $3\%$  中性磷钨酸负染, 以 JEOL-1200 透射电子显微镜观察。

**1.6 病毒结构多肽的鉴定** 选择 CsCl 密度梯度离心后含空衣壳少的病毒悬液, 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 法鉴定结构蛋白 (Tijssen et al., 1976)。缓冲系统为  $\text{pH}=7.2$ ,  $0.1 \text{ mol/L}$  的磷酸缓冲液, 凝胶浓度为  $10\%$ 。恒定电压电泳后, 考马斯亮蓝 R 250 染色, 计算各条带的比迁移 ( $R_f$ ) 值, 对照分子量标志物计算结构多肽分子量。

**1.7 病毒基因组核酸的提取与鉴定** 通过酒石酸钾-甘油密度梯度离心纯化的病毒浓缩悬液  $1 \text{ ml}$ , 加入蛋白酶 K 和  $10\%$  SDS, 使终浓度分别达到  $0.5 \text{ mg/ml}$  和  $0.5\%$  ( $W/V$ ) 并混匀, 于  $37^\circ\text{C}$  水浴 60min。反应液加入等体积的平衡酚抽提 1 次, 以酚:氯仿:异戊醇 =  $25:24:1$  的混合液抽提 2 次, 以等体积氯仿:异戊醇 =  $24:1$  的混合液抽提 2 次。最后的上层水相加  $1/10$  体积的  $3 \text{ mol/L}$  乙酸钠,  $\text{pH}=5.2$ , 混匀。加 2 倍体积的预冷无水乙醇沉淀, 于  $-20^\circ\text{C}$  过夜。室温下将沉淀液以  $13000 \text{ r/min}$  转速离心 20min。沉淀用  $70\%$  冷乙醇洗 2 次, 真空抽干, 用少量 TE 缓冲液溶解, 此即为用于鉴定的病毒基因组核酸。

将病毒核酸分别用 DNA 酶、RNA 酶和 S1 核酸酶按制造商提供的说明书所要求的条件进行处理。以 EcoRI-Hind III 或单纯 Hind III 处理的  $\lambda$ DNA 为核酸分子标志物，在 1% 琼脂糖凝胶上与未经核酸酶处理的病毒核酸比较电泳，溴化乙锭染色，紫外光下观察、拍照。

## 2 结果

**2.1 纯化效果与病毒的浮力密度** 部分纯化的病毒经酒石酸钾-甘油密度梯度离心后，离心管内出现 3—4 条折光带。负染后电子显微镜检查发现，上部 2 条折光带内多为大小不等的细胞碎片，有时可见到少量病毒颗粒。第 3、第 4 条带中则含有比较均匀的病毒颗粒，包括空的衣壳和完整的核衣壳两种成分。这两个条带相距很近，有时分隔不明显。将含有较纯病毒颗粒的悬液透析后再作 CsCl 密度梯度离心，产生 2 条折光带，上部条带相当于  $1.330 \text{ g/cm}^3$  的密度位置，电镜下显示有少量完整的病毒颗粒，但更多的是空的衣壳；另外可见个别的不规则颗粒。下部条带的位置相当于  $1.360 \text{ g/cm}^3$  的密度位置，含有均匀的病毒颗粒及少量空衣壳。多次离心测定的结果显示，在  $1.320—1.370 \text{ g/cm}^3$  的 CsCl 密度范围内均可见到病毒颗粒，但完整病毒颗粒多集中在  $1.357—1.362 \text{ g/cm}^3$  处，平均浮力密度为  $1.360 \text{ g/cm}^3$  ( $20^\circ\text{C}$ )。

**2.2 病毒的形态特征** 纯化病毒负染后的电子显微镜观察结果见图版 1:1。可以看出，病毒在形态上符合正二十面体立体对称病毒的特点。电子显微镜下测量计算，病毒

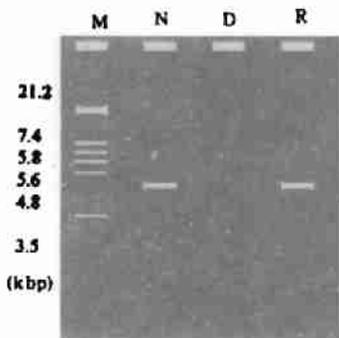


图 1 病毒核酸经 DNA 酶和 RNA 酶处理后的电泳结果

Fig.1 The indication of electrophoresis result of viral nucleic acid treated with DNase and RNase (M. molecular marker, N. viral nucleic acid without treatment by any nuclease; D. DNase treated viral nucleic acid; R. RNase treated viral nucleic acid)

M. 分子标志物 (下同); N. 未经核酸酶处理的病毒核酸 (下同); D. DNA 酶处理的病毒核酸; R. RNA 酶处理的病毒核酸。

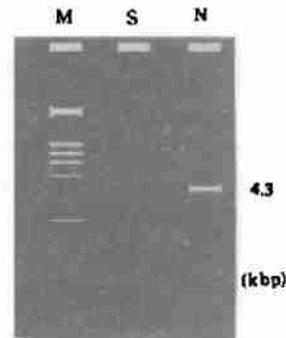


图 2 病毒核酸经 S1 核酸酶处理后的电泳结果

Fig.2 The indication of electrophoresis result of viral nucleic acid treated with Nuclease S1 [S. Nuclease S1 treated viral nucleic acid; N and M. Same to Fig.1. 5u of Nuclease S1 was used in  $30 \mu\text{l}$  of reaction volume under the same condition as Clewley' (1984);

S. S1 核酸酶处理的病毒核酸。30 $\mu\text{l}$  反应体积内含 5u S1 核酸酶，反应条件参考 Clewley 的报告 (1984)。

颗粒的直径在 23.3—29.8nm, 平均 26.3nm。图中还显示出有许多无核心的空衣壳存在, 其直径小于完整颗粒, 在 22—24nm, 平均 23.2nm。

**2.3 病毒的基因组核酸** 对病毒基因组核酸进行鉴定的结果示于图 1 和图 2。可以看出, 病毒核酸经 1% 琼脂糖电泳后在相当于 4.3kbp 的位置形成单一条带(图 1N)。但经过 DNA 酶消化处理后的病毒核酸样品无条带形成(图 1D), 相反, 经 RNA 酶处理的样品电泳后仍在与未处理样品相同的位置出现条带(图 1R), 这说明病毒基因组是对 DNA 酶敏感的核酸, 即属于 DNA。同时, 病毒核酸对选择性降解单链核酸的 S1 核酸酶也敏感, 经 S1 核酸酶处理后的样品电泳条带也消失(图 2S)。

**2.4 病毒的结构多肽** 纯化的病毒颗粒经 SDS-PAGE 后的结果示于图 3。可以看出, 病毒样品显示 4 条多肽条带, 由大到小分别称之为 VP1, VP2, VP3 和 VP4, 测量计算  $R_f$  值并作图估算分子量, 分别为: VP1  $\cong$  86.1kdal, VP2  $\cong$  58.2kdal, VP3  $\cong$  40.9kdal, VP4  $\cong$  39.8kdal。从各条带着色强度看, VP2 的条带最宽, 着色最深; 其次是 VP1; VP3 与 VP4 着色强度接近但条带最窄。

### 3 讨论与结语

对于一个新病毒的认识, 首先必需有获得一定量纯病毒颗粒的方法。在对虾病毒的研究中, 目前还无法通过细胞培养的方式获得大量病毒颗粒, 因此, 一个从组织内纯化病毒的好方法就显得更加重要。另外, 对病毒的生物物理和生物化学特点进行较系统的鉴定后作出分类位置的判断, 也是全面认识病毒的基础。本文正是在这两个方面对对虾的肝胰腺细小病毒进行研究探讨。

**3.1 病毒的纯化方法** 作者曾经根据吕鸿声(1982)报道的纯化家蚕浓核症病毒的方法用蔗糖密度梯度离心法纯化对虾肝胰腺细小病毒, 但离心后条带不集中, 浓缩分离效果不理想, 难以满足对病毒作精细鉴定的需要。Ashley 等(1982)在纯化人细小病毒时建立了一种以酒石酸钾和甘油两种介质形成密度梯度的病毒纯化方法, 经比较, 发现该方法在分离和浓缩方面与 CsCl 平衡密度梯度离心有同样效果, 但比后者经济。为此, 本研究将 Ashley 的方法予以改进, 应用于该病毒的纯化。方法中保留了密度梯度介质的制备过程, 将离心时间缩短为原来的 1/5。用该方法纯化出的病毒颗粒经常规方法提取, 可以得到纯净的病毒核酸, 同时, 用其作为抗原免疫家兔制备的抗血清经环状沉淀法鉴定, 证实与正常对虾组织无明显的交叉反应(薛清刚等, 1995)。这说明, 本文所介绍的酒石酸钾-甘油密度梯度离心的方法纯化肝胰腺细小病毒效果良好, 可以满足对其进行深入研究的需要。CsCl 密度梯度离心作进一步纯化, 可以在一定程度上使空衣壳与完整颗粒相对分开, 但这对大部分研究都意义不大; 另外, CsCl 密度梯度离心还存在材料昂贵的缺点。

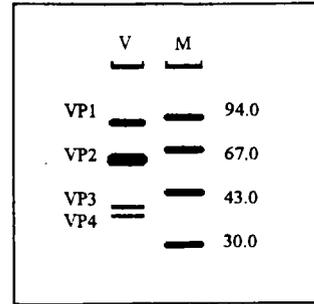


图 3 中国对虾肝胰腺细小病毒结构多肽的 SDS-PAGE 结果 (V. 病毒结构多肽)

Fig.3 The indication result of SDS-PAGE of the constructure polypeptides in HPVPC (V. constructure polypeptides of HPVPC)

**3.2 病毒的几项主要生物物理和生物化学特征** 从结果可以得知,病毒完整颗粒在 CsCl 中的平均浮力密度为  $1.360 \text{ g/cm}^3$ 。从形态上看,病毒颗粒具有二十面体立体对称的特点,平均直径为 26.3nm。病毒基因组则具有以下特点:(1)对 DNA 酶敏感,而对 RNA 酶有耐受力;(2)能被低浓度的 S1 核酸酶降解,而 S1 核酸酶在低浓度时只选择性降解单链核酸;(3)在琼脂糖凝胶电泳中显示分子大小相当于 4.3kbp。由此,可以得出以下判断:病毒的基因组是一种长度相当于 4.3kbp 的单链 DNA 分子。对病毒结构多肽的分析结果显示了该病毒具有 4 条大小不等的结构多肽,分子量在 39.8—86.1 kdal 之间。

**3.3 病毒的分类位置及与其它细小病毒的比较** 按照现行的动物病毒分类体系,只有细小病毒具有基因组是单链 DNA 的特点(侯云德,1990)。同时,本研究所鉴定的这种病毒在形态学特征和理化特性也与其它动物细小病毒相似,因此可以认为,它的确是细小病毒科(Parvoviridae)的病毒,应正式称之为中国对虾肝胰腺细小病毒(Hepatopancreatic Parvovirus of *Penaeus chinensis*, HPVPC)。当然,与整个细小病毒科的共同特征相比,肝胰腺细小病毒具有以下特点:(1)病毒颗粒偏大,这导致病毒粒子的浮力密度相对较低;(2)基因组核酸分子偏小;(3)4 条结构多肽与一般细小病毒有一定差异。但是,这些特点与 Bonami 等人(1990)对另一种对虾细小病毒——传染性皮下与造血组织坏死病毒(Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus, IHNV)的鉴定结果类似,尤其在基因组大小和结构多肽数量方面更加接近。这是否意味着肝胰腺细小病毒与 IHNV 之间有某种亲缘关系呢?对此,尚有许多比较性工作有待于进行。

## 参 考 文 献

- 吕鸿声著,1982,昆虫病毒与昆虫病毒病,科学出版社(北京),333—334。
- 孙修勤等,1992,鱼类病害研究,14(2): 22—26。
- 侯云德著,1990,分子病毒学,学苑出版社(北京),237—246。
- 薛清刚、王文兴,1992a,对虾疾病的病理与诊治,青岛海洋大学出版社(青岛),60—63。
- 薛清刚、王文兴,1992b,鱼类病害研究,14(2): 16—21。
- 薛清刚等,1995,水产学报,19(3): 210—216。
- Ashley, C. R. et al., 1982, *J. Clin. Microbiol.*, 16(2): 377—381。
- Bonami, J. R. et al., 1990, *J. Gen. Virol.*, 71: 2657—2664。
- Clewley, J. P., 1984, *J. Gen. Virol.*, 65: 241—245。
- Lightner, D. V. et al., 1985, *J. Invert. Pathol.*, 45: 47—53。
- Lightner, D. V., 1993, CRC Handbook of Mariculture, 2nd Edition, Volume I. Crustacean Aquaculture, ed. by McVey, J. P., CRC Press Inc (Boca Raton, Florida), pp.393—486。
- Tijssen, P. et al., 1976, *J. Virol.*, 17: 686—691。

## PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE HEPATOPANCREATIC PARVOVIRUS IN *PENAEUS CHINENSIS*

Xue Qinggang, Gong Yunhao<sup>†</sup>, Wang Wenxing

(First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266003)

<sup>†</sup>(National Animal Quarantine Institute, Ministry of Agriculture, Qingdao 266032)

**Abstract** During a September, 1991 to end of 1993 study, the hepatopancreatic parvovirus in *Penaeus chinensis*, named originally as hepatopancreatic parvo-like virus (HPV), was purified from the hepatopancreas of diseased *Penaeus chinensis* collected in September 1991 at the Shazikou Shrimp Farm near Qingdao. The virus has been characterized for its biophysical and biochemical properties also. This study showed the virus can justifiably be classified as a member of the Parvoviridae. The purification procedure includes concentrating the virus by differential centrifugation and purifying by density gradient ultracentrifugation through a potassium tartrate-glycerol substrate. The latter was a modified procedure of Ashley's and the centrifugation time was shortened to 3 hours, 1/5 that of the original method. Ideal purification of the virus was achieved. When negatively stained with neutral phosphotungstic acid solution and examined under electron microscope, the purified virus particles were icosahedrons with average diameter of 26.3 nm (23.3—29.8 nm). The average diameter of the empty capsid measured 23.2 nm. After extraction from the purified preparation, the viral nucleic acid was treated with DNase, RNase and Nuclease S1 before electrophoresis in agarose gel. The authors' finding that the genome nucleic acid of the virus was sensitive to DNase and Nuclease S1 but resistant to RNase. So, it indicates that the viral genome was a single strand DNA molecule about 4.3 kbp long. On SDS-PAGE, the virus showed 4 construction polypeptides, namely VP1, VP2, VP3 and VP4, with molecular weight of about 86.1 kdal, 58.2 kdal, 40.9 kdal and 39.8 kdal respectively. The average buoyant density of the virus particles was 1.360 g/cm<sup>3</sup> in CsCl. All the above characteristics are similar to those of the Parvoviridae.

**Key words** *Penaeus chinensis* Hepatopancreatic parvovirus Purification characterization