

赤点石斑鱼诺达病毒的纯化及其衣壳蛋白的 Western-blot 分析

黄剑南^{1,2}, 林 鑫¹, 翁少萍¹, 冯 娟², 何建国¹

(1. 中山大学生命科学学院生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300)

摘要: 采用差速离心, 蔗糖 (10% ~ 40%, W/V) 密度梯度离心和氯化铯 (30% ~ 40%, W/W) 等密度梯度离心法, 对赤点石斑鱼诺达病毒大亚湾株 (RG-CN) 进行了纯化, 测定计算其浮密度为 1.3102 ~ 1.3243 g·cm⁻³。通过 Western-blot 法检测到的病毒的结构蛋白的分子量为 37 和 31 kDa, 而以 31 kDa 的蛋白为主。

关键词: 赤点石斑鱼诺达病毒; 衣壳蛋白; 纯化; Western-blot 分析

中图分类号: Q343.1; S917

文献标识码: A

文章编号: 1673-2227-(2005)05-0033-04

Purification and Western-blot assay of the capsid protein of the red-spotted grouper nodavirus

HUANG Jian-nan^{1,2}, LIN Li¹, WENG Shao-ping¹, FENG Juan², HE Jian-guo¹

(1. State Key Laboratory for Biocontrol, School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Red-spotted grouper nodavirus Dayawan isolate (RG-CN) was purified by differential centrifugation, sucrose density gradient centrifugation (10% ~ 40%, W/V) and CsCl isopycnal density centrifugation (30% ~ 40%, W/W). The results showed that the viral particles exhibited a buoyant density of 1.3102 ~ 1.3243 g·cm⁻³. By Western-blot assay, viral capsid protein showed two polypeptides with molecular weights of 37 and 31 kDa, mainly being 31 kDa.

Key words: red-spotted grouper nodavirus; capsid protein; purification; Western-blot assay

鱼类诺达病毒也称神经坏死病毒 (nervous necrosis virus, NNV)^[1], 鱼类脑炎病毒 (fish encephalitis virus, FEV)^[2], 分类上属于诺达病毒科 (Nodaviridae), Beta 诺达病毒属 (*Betanodavirus*), 病毒粒子无外膜, 只有一种衣壳蛋白^[1]。由鱼类诺达病毒引起的病毒性神经坏死症 (viral nervous necrosis, VNN)^[3], 又称空泡性脑视网膜炎 (vacuolating encephalopathy and retinopathy, VER)^[4], 是一种世界范围内流行的海水鱼类病毒病, 主要发生

在海水鱼类种苗生产阶段, 鱼苗死亡率高达 90% 以上, 给海水鱼类养殖业的发展带来严重的危害^[5], 目前已有 8 目 18 科 30 多种经济鱼类的人工繁殖鱼苗和部分成鱼受到感染而致病, 而且有向淡水鱼类蔓延的趋势^[6-7]。

2001 年, 我们在我国大陆首次报道了石斑鱼神经坏死病毒^[8], 并克隆了该病毒的衣壳蛋白基因^[9], 研究了该病毒株的基因型^[10]。为在细胞株上分离该病毒, 以进一步研究该病毒基因的体外表

收稿日期: 2005-07-29; 修回日期: 2005-08-11

资助项目: 国家“863”高技术研究发展计划项目 (2001AA621010, 2002AA603012); 广东省科技计划项目 (2005B20301016)

作者简介: 黄剑南 (1968-), 女, 副研究员, 博士, 主要从事水产动物病害与分子生物学研究。E-mail: hjn327@yahoo.com.cn

通信作者: 何建国, E-mail: lsbr05@zsu.edu.cn

达和调控机制、病毒的感染和致病机理等,需得到高度纯化的病毒。本文报告了病毒的纯化方法和对病毒衣壳蛋白的 Western-blot 分析,为后续的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

2000年广东省大亚湾水产试验中心生产的赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 鱼苗。采集具有病毒性神经坏死症症状的垂死的鱼苗,全长 1.5 ~ 2.0 cm,日龄 20 ~ 30 d,保存在 -85°C 的超低温冰箱中。

Western-blot 所用试剂:

4 × Laemmli buffer: 0.125 mol·L⁻¹ Tris-Cl, pH 6.8; 40 g·L⁻¹ SDS; 100 g·L⁻¹ β-巯基乙醇; 0.2 g·L⁻¹ 溴酚蓝。

12.5% 浓缩胶: 1.565 mL 40% Acrylamide, 2.135 mL dH₂O, 1.25 mL 1.5 mol·L⁻¹ Tris pH 8.8, 0.05 mL 10% SDS pH 7.2, 7 μL TEMED, 80 μL 10% APS。

5% 分离胶: 0.125 mL 40% Acrylamide, 0.74 mL dH₂O, 0.125 mL 1.0 mol·L⁻¹ Tris pH 6.8, 0.01 mL 10% SDS pH 7.2, 6 μL TEMED, 6 μL 10% APS。

1 × Transfer: 25 mmol·L⁻¹ Tris-Cl, pH 8.1 ~ 8.5; 192 mmol·L⁻¹ glycine; 20% 甲醇 (V/V)。

1 × TBS: Tris-buffered saline, 50 mmol·L⁻¹ Tris-Cl, pH 7.5; 150 mmol·L⁻¹ NaCl。

1 × TBST: 50 mmol·L⁻¹ Tris-Cl, pH 7.5; 150 mmol·L⁻¹ NaCl; 1 mL·L⁻¹ Tween 20。

封闭液: 含有 30 g·L⁻¹ 脱脂奶粉 (BIO-RAD) 的 1 × TBST。

1.2 方法

1.2.1 病毒的纯化 取保存的样品 120 g, 剪碎后于液氮中研磨成粉, 加入 10 倍体积 1 × PBS (pH 7.4), 于玻璃匀浆器冰浴匀浆后, 4℃, 10 000 × g 离心 10 min, 上清用 Beckman SW28 转子于 4℃, 150 000 × g 离心 45 min, 沉淀用 1 × PBS 重悬。将病毒重悬液铺于 20%, 35%, 50% (W/V, sucrose: 1 × PBS) 不连续蔗糖梯度上, 用 Beckman SW41 转子 4℃, 100 000 × g 离心 1 h。用

Beckman 回收器在 35% ~ 50% 蔗糖梯度中间收集病毒带 (收集到样品 1 ~ 13 号), 加适量 1 × PBS 重悬后, 各回收产物用 Beckman SW50 转子于 4℃, 150 000 × g 离心 45 min, 沉淀用氯化铯 ($\rho = 1.32$, 溶于 1 × PBS) 重悬, 用 Beckman SW41 转子于 4℃, 100 000 × g 离心 12 h, 各沉淀颗粒保存于 -85°C 的超低温冰箱中。用紫外测定仪, 在波长 254 nm 处测定各纯化产物的光吸收值 (表 1, 图 1)。用折射仪测定各个样品的折射指数值 η , 然后用公式 $\rho = 10.2402\eta - 12.6483$ 计算氯化铯的密度值 (表 2)。

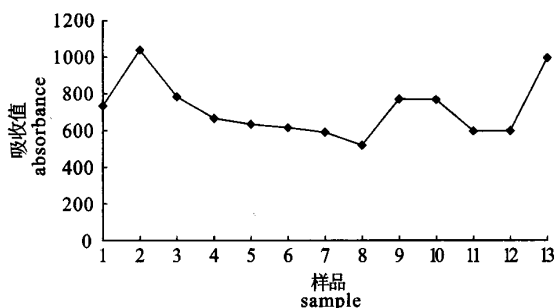


图 1 纯化产物在 254 nm 紫外线波长的吸收峰

Fig. 1 Ultraviolet absorbance of purified products at 254 nm wave length

表 1 纯化产物在 254 nm 紫外线波长的吸收峰

Tab. 1 Ultraviolet absorbance of purified products at 254 nm wave length

样品 sample	吸收值 absorbance	样品 sample	吸收值 absorbance
1	733.0	8	520.0
2	1039.5	9	770.0
3	783.0	10	766.5
4	666.0	11	597.0
5	633.0	12	598.0
6	615.0	13	995.5
7	590.0		

1.2.2 病毒衣壳蛋白的 Western-blot 分析 取纯化样品 1 ~ 13 号各 75 μL, 加入 25 μL 4 × Laemmli buffer, 充分混合, 在 99℃ 中热变性 5 min, 然后取 20 μL 进行电泳。先在电压 80 V 下电泳, 待样品

跑到同一直线时, 改用 120 V 电泳, 直到样品条带刚刚跑出分离胶为止。标准蛋白分子量采用 Bench-Mark (Invitrogen)。电泳完毕后, 用转膜仪 (BIORAD) 以半干法将蛋白质转移到硝化纤维素膜 PROTRAN (Schleicher & Schuell, Germany) 上, 12V 转移 1 h。膜用封闭液封闭 30 min, 然后用兔抗巨石斑神经坏死病毒衣壳蛋白血清 (第一抗体) 反应 1 h, 用 $1 \times$ TBST 溶液洗去非特异性结合的第一抗体, 共 3 次, 每次 5 min。再用山羊抗兔辣根过氧化物酶耦联抗体 (Dianova, Germany) 反应 30 min, 用 $1 \times$ TBST 洗去非特异性结合的第二抗体, 共 3 次, 每次 5 min。以上反应在室温中进行。用显色剂 SuperSignal (Perbio Science, Germany) 进行显影、定影, 拍照。

2 结果

2.1 纯化产物的紫外吸收

纯化产物在 254 nm 紫外线波长处有吸收峰。

2.2 纯化产物的密度

各纯化产物的折射指数和密度值见表 2。

2.3 病毒衣壳蛋白的 Western-blot 分析

在 8、9、10、11 四个纯化样品中检测到病毒的衣壳蛋白, 与紫外吸收光谱的结果基本一致。根据氯化铯密度值, 病毒粒子 (包含空病毒粒子) 的密

度范围为: $1.3102 \sim 1.3243 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 。病毒的衣壳蛋白含有 2 条带, 大小分别为 37 和 31 kDa (图 2)。通过成像扫描系统分析, 小带的含量约为大带的 10 倍。

表 2 纯化产物的折射指数和密度值

Tab. 2 Refractive index and density data of purified products

样品 sample	折射指数 η refractive index	密度 ρ density
1	1.3700	1.3809
2	1.3695	1.3755
3	1.3689	1.369
4	1.3675	1.3538
5	1.3665	1.3428
6	1.3661	1.3385
7	1.3658	1.3352
8	1.3648	1.3243
9	1.3645	1.3211
10	1.3640	1.3158
11	1.3635	1.3102
12	1.3630	1.3049
13	1.3610	1.2723

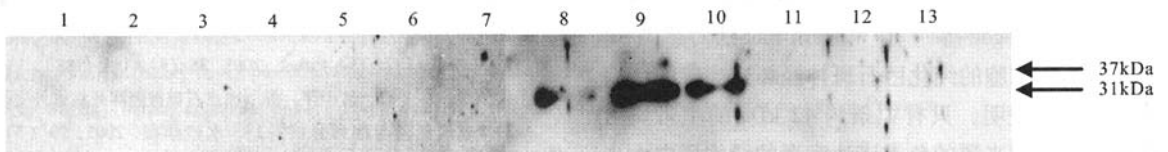


图 2 病毒衣壳蛋白的 Western-blot 检测

Fig. 2 Western-blot assay of viral capsid protein

3 讨论

为了研究病毒的本质并对病毒性疾病进行诊断, 必须对病毒颗粒的物理化学性质和病毒遗传物质的结构进行研究, 需要高度纯净的病毒制品。利用超速离心法提纯各种大小的颗粒和病毒是一种有效的手段, 主要有差速离心法、密度梯度离心法、等密度梯度离心法等^[1]。在鱼类诺达病毒的研究中, 通常将上述 3 种超速离心法结合起来, 对病毒进行纯化。Breuil 等^[12]采用差速离心和氯化铯

(25% ~ 38%, W/W) 密度梯度离心, 纯化了欧洲鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 脑炎病毒。经氯化铯梯度离心可见 2 条病毒带, 浮力密度为 $1.30 \sim 1.34 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 。Comps 等^[2]同样采用差速离心和氯化铯 (25% ~ 38%, W/W) 密度梯度离心对感染尖吻鲈 (*Lates calcarifer*) 和欧洲鲈的 2 种鱼类脑炎病毒进行了纯化分析。完整病毒粒子在氯化铯中的浮密度为 $1.35 \sim 1.36 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Mori 等^[1]采用差速离心、蔗糖 (10% ~ 40%, W/V) 密度梯度离心和氯化铯 (30% ~ 40%, W/W) 等密度梯度离心纯化了

3 mm拟鲮仔鱼的神经坏死病毒。Chi 等^[13]用差速离心和氯化铯 (10% ~ 40%, W/W) 密度梯度离心对经 GF-1 (来源于斜带石斑鱼鳍细胞) 细胞培养的石斑鱼神经坏死病毒 (GNNV) 进行纯化。可见, 不同种类的宿主、同一宿主不同生长阶段的个体所感染的鱼类诺达病毒和不同方法制备的鱼类诺达病毒需用不同的方法和条件进行纯化。本文借鉴了不同的纯化方法, 经过反复摸索和改进, 纯化了赤点石斑鱼诺达病毒大亚湾株 (RG-CN), 测定其浮密度为 $1.3102 \sim 1.3243 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, 与上述研究结果相一致。

在病毒结构蛋白的分析中经常采用 SDS-PAGE 和 Western-blot 法。而后者因用抗原抗体反应检出蛋白质, 因此灵敏度、特异性都很高, 是特定蛋白质分子高灵敏检出的方便而有效方法。Mori 等^[1]用 SDS-PAGE 的考马斯亮蓝染色法对纯化的拟鲮神经坏死病毒结构蛋白进行分析, 得到 2 条蛋白带, 分别为 42 和 40 kDa。Comps 等^[2]对感染尖吻鲈和欧洲鲈的纯化脑炎病毒也采用 SDS-PAGE 的考马斯亮蓝染色法进行分析。结果表明这 2 种病毒粒子的结构多肽各有 2 种, 尖吻鲈脑炎病毒的结构多肽分子量为 42、36 kDa, 欧洲鲈脑炎病毒的为 42、40 kDa。Chi 等^[13]也用同样的方法分析了纯化的石斑鱼神经坏死病毒, 得到分子量为 43 和 41 kDa 的结构蛋白带。Hegde 等^[14]用 Western-blot 法对感染 SB (sea bass) 细胞的纯化巨石斑神经坏死病毒的结构蛋白的分析表明, 只有 1 条约 42 kDa 的主带。由此可见, 不同来源的鱼类诺达病毒的结构蛋白大小不尽相同。本文采用 Western-blot 法对纯化的赤点石斑鱼诺达病毒的结构蛋白进行分析, 所用的一抗为兔抗巨石斑神经坏死病毒衣壳蛋白血清, 这 2 种病毒的衣壳蛋白 (结构蛋白) 均由 338 个氨基酸组成, 其氨基酸同源率达 99%^[9], 因此本文所用的一抗能很好地识别所检测的结构蛋白。结果赤点石斑鱼诺达病毒的衣壳蛋白含有 2 条带, 大小分别为 37 和 31 kDa, 小带的含量较大带多, 说明衣壳蛋白以 31 kDa 的组分为主, 与上述几种鱼类诺达病毒的结构蛋白大小不同, 这和纯化病毒的浮密度差异相一致。

致谢: 林鑫曾得到中国国家留学基金委和德国学术交流中心 (DAAD) 奖学金的资助; 兔抗巨石斑神经坏死病

毒衣壳蛋白血清由新加坡的谭子龙博士惠赠, 特此致谢。

参考文献:

- [1] Mori K, Nakai T, Muroga K, et al. Properties of a new virus belonging to Nodaviridea found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with necrosis disease [J]. *Virology*, 1992, 187: 368 - 371.
- [2] Comps M, Pepin J F, Bonami J R. Purification and characterisation of two fish encephalites viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax* [J]. *Aquac*, 1994, 123 (1-2): 1 - 10.
- [3] Yoshikoshi K, Inoue K. Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel) [J]. *J Fish Dis*, 1990, 13 (1): 69 - 77.
- [4] Munday B L, Langdon J S, Hyatt A, et al. Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* Bloch [J]. *Aquac*, 1992, 103 (3-4): 197 - 211.
- [5] Munday B L, Kwang J, Moody N. Betanodavirus infections of teleost fish: a review [J]. *J Fish Dis*, 2002, 25 (3): 127 - 142.
- [6] Athanassopoulou F, Billinis C, Psychas V, et al. Viral encephalopathy and retinopathy of *Dicentrarchus labrax* (L.) farmed in fresh water in Greece [J]. *J Fish Dis*, 2003, 26 (6): 361 - 365.
- [7] Hegde A, Teh H C, Lam T J, et al. Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poecilia reticulata*-comparative characterization and pathogenicity studies [J]. *Arch Virol*, 2003, 148 (3): 575 - 86.
- [8] Lin L, He J G, Mori K, et al. Mass mortalities associated with viral nervous necrosis in hatchery-reared groupers in the People's Republic of China [J]. *Fish Pathol*, 2001, 36 (3): 186 - 188.
- [9] 黄剑南, 林鑫, 翁少萍, 等. 赤点石斑神经坏死病毒外壳蛋白全基因克隆与序列分析 [J]. *水产学报*, 2005, 29 (3): 429 - 432.
- [10] 黄剑南, 林鑫, 翁少萍, 等. 中国大亚湾赤点石斑鱼神经坏死病毒分离株的基因型分析 [J]. *高技术通讯*, 2004, 14 (11): 75 - 80.
- [11] 杨占秋, 余宏. 临床病毒学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000. 319 - 325.
- [12] Breuil G, Bonami J R, Pepin J F, et al. Viral infection (picornalike virus) associated with mass mortalities in hatchery-resred seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles [J]. *Aquac*, 1991, 97 (2-3): 109 - 116.
- [13] Chi S C, Lo C F, Lin S C. Characterization of grouper nervous necrosis virus [J]. *J Fish Dis*, 2001, 24 (1): 3 - 13.
- [14] Hegde A, Chen C L, Qin Q W, et al. Characterization, pathogenicity and neutralization studies of a nervous necrosis virus isolated from grouper, *Epinephelus tauvina*, in Singapore [J]. *Aquac*, 2002, 213 (1-4): 55 - 72.