

一种蛙病毒的纯化和酶切分析*

吕 玲, 何建国, 何华虹, 邓 敏, 王晓红, 翁少萍
(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 从患病虎纹蛙 (*Rana tigrina rugulosa*) 蝌蚪中分离得到一种蛙病毒, 感染鱼的 FHM、CO、EPC 细胞, 获得大量的病毒原料, 分离纯化得到高纯度的病毒粒子, 电镜下可见病毒粒子为二十面体, 具囊膜, 直径平均为 125 nm. 抽提病毒核酸, 对其基因组 DNA 进行酶切分析, 病毒基因组为双链 DNA 分子, 表现脊椎动物虹彩病毒基因组的特点即其胞嘧啶 5' 端高度甲基化. 以限制性内切酶 *Xba* I、*Bam* H I、*Hind* III、*Kpn* I 和 *Pst* I 酶切病毒基因组 DNA, 经电泳分离后, 分别得到 13、25、6、14、22 条清晰的酶切片段, 并根据酶切片段算得基因组的大小超过 100 kb. 用 PCR 方法, 得到这个病毒的主衣壳蛋白 (MCP) 基因保守序列, 与 FV3 相比, 同源性达 98%.

关键词: 蛙病毒; 纯化; 甲基化分析; 酶切分析; MCP

中图分类号: S941.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 05-0091-05

近年来, 在许多野生和养殖的鱼类、两栖类、爬行类中, 陆续有病害发生, 其主要病因是由虹彩病毒引起的^[1]. 虹彩病毒属于细胞质内寄生的 DNA 病毒, 具有囊膜, 二十面体, 它能够感染无脊椎动物 (如昆虫), 以及鱼类、两栖类、爬行类等脊椎动物. 病毒基因组有末端富余 (terminanl redundancy)、环状变换 (circular permutation) 的特点^[2], 脊椎动物虹彩病毒的基因组, 有 20% 胞嘧啶甲基化^[3]. 病毒中编码主衣壳蛋白 (MCP) 的基因, 具有高度保守性, 可用于鉴定所分离的虹彩病毒. 到目前为止, 全世界已发现的虹彩病毒超过 60 种. 在我国, 虹彩病毒在水产养殖中也有发现, 如养殖鳊鱼中发生的暴发性流行病的病原是 ISKNV^[4]; 我国引进的养殖品种沼泽绿牛蛙发病的病原是 RGV^[5]; 在深圳中华鳖中也发现了虹彩病毒 STIV^[6]. 最近, 在广东养殖的虎纹蛙中, 其蝌蚪大量的死亡, 给养殖业造成巨大损失. 它们发病的重要病原——蛙病毒, 也是一种虹彩病毒.

本文从患病虎纹蛙蝌蚪中分离到病毒, 通过回接感染健康的蝌蚪和成年蛙, 发病后分离到同样的病毒, 再感染鱼的 FHM、CO、EPC 细胞系, 使病毒大量的增殖, 经分离纯化, 得到大量高纯度的病毒粒子, 抽提病毒核酸, 对其基因组 DNA 进行酶切分析, 为建立这个病毒的基因组

文库和物理图谱奠定了基础, 为诊断和防治此病毒提供基础资料和理论依据.

1 材料与方法

1.1 泰国虎纹蛙 (*Rana tigrina rugulosa*)

被病毒感染的、濒死的泰国虎纹蛙蝌蚪, 以及健康虎纹蛙蝌蚪和成年蛙于 2000 年 7 月取自广东省南海某虎纹蛙养殖场, 运回实验室, 健康虎纹蛙蝌蚪和成年蛙先在实验室暂养 1 周, 无病症再用于人工感染实验.

1.2 病毒和细胞系

单层 FHM (fathead minnow cell)、CO (grass carp ovary)、EPC (epithelioma papillosum cyprini) 细胞, 于细胞培养瓶 (Greiner 公司) 中生长, 分别加入 100 u/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素, 以及含 $w = 10\%$ 胎牛血清的 M199 培养基 (GIBCO/BRL 公司). 病毒液由患病蝌蚪分离得到, 即分别取健康蝌蚪和被病毒感染的患病蝌蚪按 $w = 0.10$ 加入 PBS (pH 7.2)、1 000 u/mL 青霉素和 1 000 μ g/mL 链霉素, 冰浴中匀浆后, 5 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 30 min, 取上清, 经 0.22 μ m 滤膜抽滤后, 感染这 3 种细胞系. 出现细胞病理变化 (cytopathogenic effects, CPE) 后, 收集细胞液, 用于病毒的纯化.

健康蝌蚪匀浆液接种至细胞中, 作负对照.

* 基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (990255)

收稿日期: 2001-04-28; 作者简介: 吕 玲 (1966-), 女, 博士研究生; 通讯联系人: 何建国.

1.3 电镜样品的制备

取健康、患病和人工感染蝌蚪,切成小于0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 的组织块;取发生CPE变化的细胞,离心,倾去上清液,沉淀的细胞和组织块于25 g/L的戊二醛(0.1 mol/L PBS配制, pH 7.2)中固定, PBS冲洗, 10 g/L的锇酸(0.1 mol/L PBS配制, pH 7.2)后固定, PBS冲洗,乙醇梯度脱水, Epon's 812液渗透包埋,超薄切片经醋酸铀和柠檬酸铅染色,透射电镜观察。

1.4 病毒粒子的分离纯化

感染病毒的细胞出现CPE后,置于-20℃,经冻融后,用差速离心法得到病毒粗提液,再将它铺于蔗糖梯度上,用Beckman SW40 Ti转子4℃,超速离心2 h。收集病毒带于透析袋中,用透析缓冲液(15 mmol/L NaCl, 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)透析过夜。

纯化的病毒粒子滴加于铜网上,用 $w = 2\%$ 磷钨酸(pH 7.0)负染2 min后,滴加蒸馏水洗,干后用日立JEM-100CX II透射电镜观察。

1.5 病毒核酸的提取

纯化的病毒粒子悬液加入SDS和蛋白酶K(Merck公司)至终浓度分别为 $w = 0.5\%$ 和0.5 mg/mL,于55℃消化3 h,随后用酚法抽提、乙醇沉淀病毒DNA。

1.6 病毒核酸的甲基化分析

病毒DNA用限制酶Hpa II和Msp I(华美公司)于37℃酶切1~3 h,取5 μL反应液在 $w = 0.8\%$ 琼脂糖凝胶上电泳观察。

1.7 病毒核酸的限制酶切分析

病毒DNA用限制性内切酶Xba I、BamH I、Hind III、Kpn I和Pst I(New England公司)于37℃酶切过夜,在 $w = 0.6\%$ 琼脂糖凝胶上电泳。利用UVP Life Science公司UVP-8000凝胶分析系统摄像,并扫描出各条带迁移距离。以相对分子质量Marker为标准,借助DNASIZE软件计算出个酶切片段的相对分子质量,并由此算出病毒基因组大小。

1.8 PCR扩增

根据蛙病毒属的代表种FV3主衣壳蛋白(MCP)基因高度保守区设计一对引物^[1]:

P1: 5'-GACTTGCCCACTTATGAC-3'

P2: 5'-GTCTCTGGCCACTTATGAC-3'

模板的制备如下:取感染病毒的细胞液或浓缩的病毒液,加入0.5 mg/mL蛋白酶K(Merck

公司)、 $w = 0.5\%$ SDS, 55℃消化1~3 h,用酚/氯仿/异戊醇抽提,乙醇沉淀后用无菌水重溶,存于-20℃。

反应体积为25 μL,除模板DNA外,还含有10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.9), 50 mmol/L KCl, $\varphi = 0.1\%$ Triton-100, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 10 pmol/L引物, 1 u Taq DNA聚合酶,上层盖少许矿物油防止蒸发。

反应条件为:95℃预处理2 min,进行30个循环,每个循环反应包括94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min,循环完成后,72℃充分延伸10 min,取5 μL反应液在 $w = 0.8\%$ 琼脂糖凝胶上电泳观察。

1.9 PCR产物的克隆

PCR扩增产物用NucleoTrap® DNA纯化试剂盒(CLONTECH)回收纯化后插入pT-Adv载体中,转化入E. coli XL1-blue中,挑选白色菌落,碱法提质粒,用Hind III和Xba I双酶切以鉴定重组子。

1.10 序列分析

重组质粒用Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit(BIO-RAD)抽提纯化后,用ABI PRISMTM进行测序,所得序列通过Internet进入GenBank(National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA),进行BLASTN比较。

2 结 果

2.1 细胞的感染

用患病的虎纹蛙蝌蚪匀浆液分别接种至FHM、CO、EPC细胞中,病毒在这3种细胞系中均增殖,其中对EPC细胞最敏感,24 h后就出现细胞病理变化(CPE),即排列紧密的细胞出现空洞,空洞周围的细胞收缩变圆、坏死,空洞逐渐变大、变多,形成破鱼网状,最后细胞全部缩成球状,脱离瓶壁。用健康的虎纹蛙蝌蚪匀浆液做负对照,没有发现异常变化。

电镜观察发现细胞质中有大量病毒粒子,为二十面体,具囊膜,直径平均为125 nm,在细胞质中呈整齐的晶格状排列。

2.2 病毒纯化及其形态特征

经超速离心后,在蔗糖梯度中可见一条乳白色(有时为淡黄色)不透明的折光带,收集此折光带经负染后于电镜下观察,可见大量高纯度的病毒粒子(图1),因此这一乳白色或淡黄色折

光带即为病毒区带。经超速离心后，病毒粒子有一些变形，已失去囊膜，核衣壳为六边形，负染后内部结构不可见。

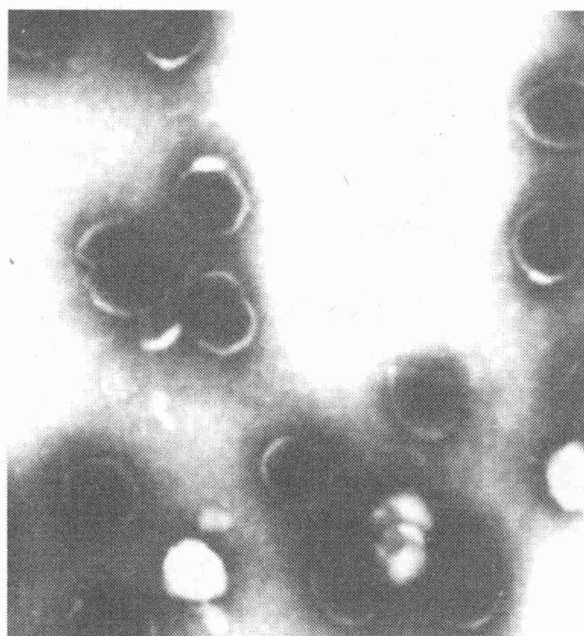


图 1 负染的蔗糖密度梯度离心纯化的病毒粒子电镜照片 ($\times 50\,000$)

Fig.1 Negative stain of the virions

2.3 病毒基因组 DNA 的甲基化分析

限制酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 是一对同裂酶，但它们具有不同的甲基化敏感性，其中 *Hpa* II 对 CpG 甲基化修饰敏感，而 *Msp* I 则对之不敏感。病毒基因组 DNA 经 *Hpa* II 和 *Msp* I 酶切后，取 $5\,\mu\text{L}$ 反应液在 $w = 0.8\%$ 琼脂糖凝胶上电泳，其结果如图 2 所示，病毒基因组 DNA 能被 *Msp* I 切开，而不能被 *Hpa* II 切开。由此证明病毒基因组 DNA 胞嘧啶 5'端高度甲基化。

2.4 病毒基因组 DNA 的酶切分析

如图 3 所示，病毒基因组 DNA 用限制性内切酶 *Xba* I、*Bam*HI、*Hind*III、*Kpn* I 和 *Pst* I 酶切过夜，用 $\rho = 0.6\%$ 琼脂糖凝胶电泳分离后，分别得到 13、25、6、14、22 条片段，其中小于 0.5 kb 的片段已跑出凝胶。计算各酶切片段的大小，算得基因组的大小超过 100 kb。

2.5 PCR 扩增

根据 FV3 主衣壳蛋白 (MCP) 基因高度保守区而设计的一对引物，对本文所发现的这种病毒基因组 DNA 进行扩增，得到 532 bp 的片段 (图 4)，测得的序列与 FV3 比较，发现它们的同源

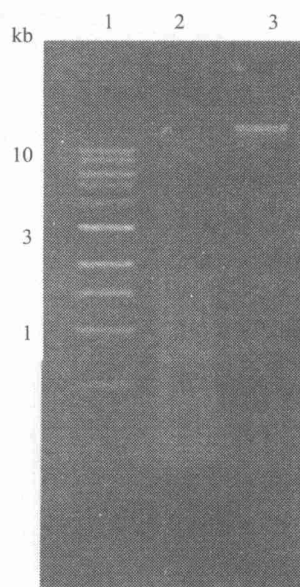


图 2 病毒的甲基化分析

Fig.2 Digestion of the viral DNA with methylation-sensitive endonucleases

1 DNA 相对分子质量标准 (1 kb Marker);

2 病毒 DNA 经 *Msp* I 酶切;

3 病毒 DNA 经 *Hpa* II 酶切

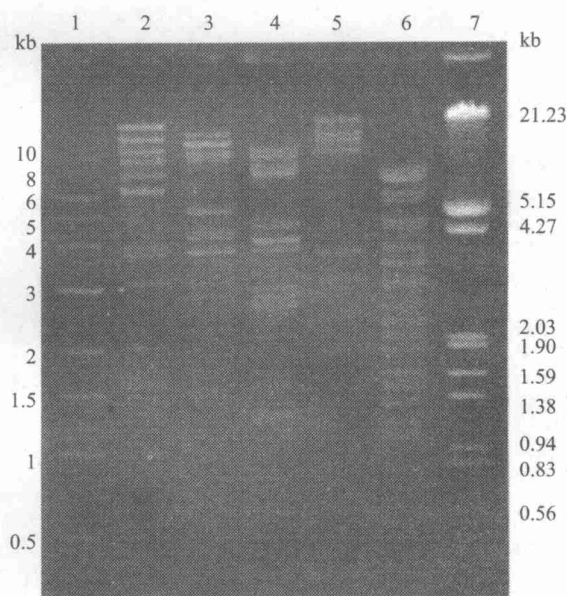


图 3 病毒的限制性内切酶酶切图谱

Fig.3 Restriction pattern of the viral DNA by 0.5% agarose gel electrophoresis after restriction endonuclease digestion

1 DNA 相对分子质量标准 (1 kb Marker);

2 病毒 DNA 经 *Xba* I 酶切;

3 病毒 DNA 经 *Kpn* I 酶切;

4 病毒 DNA 经 *Pst* I 酶切;

5 病毒 DNA 经 *Hind*III 酶切;

6 病毒 DNA 经 *Bam*HI 酶切;

7 DNA 相对分子质量标准 (DNA/*Eco*RI + *Hind*III)

性高达 98% (数据未显示), 表明这个病毒与 FV3 接近.

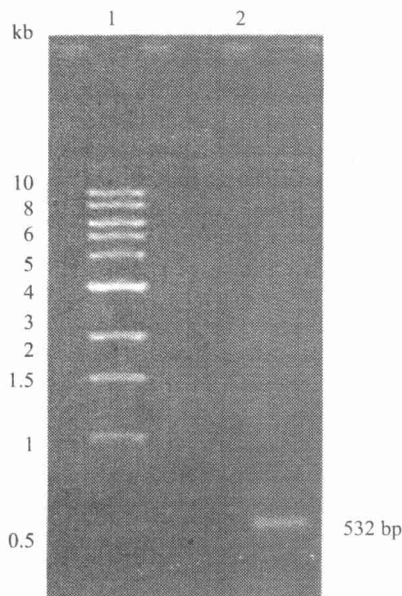


图 4 MCP PCR 检测结果

Fig.4 Characterization of the viral PCR amplification of MCP

1 DNA 相对分子质量标准 (1 kb Marker);

2 以病毒 DNA 为模板

3 讨 论

自 20 世纪 80 年代后期以来, 由虹彩病毒引起的水产动物致死性传染病在包括美洲、欧洲、亚洲和澳洲在内的世界各地普遍流行, 给海水养殖业造成了严重的经济损失^[7]. 在养殖的虎纹蛙蝌蚪中得到的使它们发病的这种病毒, 发现了它的敏感细胞株—FHM、CO、EPC 细胞系, 其中 EPC 细胞对病毒最敏感, 出现 CPE 的时间最短. 病毒的敏感细胞株的发现为分离纯化病毒提供了方便. 在这些细胞中接种病毒液, 出现 CPE 后, 用差速离心法分离提纯病毒, 经蔗糖密度梯度离心后, 电镜下可见大量的病毒粒子. 用提纯的病毒粒子抽提病毒 DNA, 用多种限制酶酶切, 经琼脂糖凝胶电泳分离得到清晰的条带, 可见得到的病毒是高纯度的. 从酶切图谱中可以看到, *Hind*III 在病毒基因组 DNA 中切点不多, 得到的酶切片段较大但不多; *Bam*HI、*Pst*I (特别是 *Bam*HI) 在病毒基因组 DNA 中切点较多, 得到的酶切片段多但相对较小. 同时, 因为较小的酶切片段已跑出凝胶, 还有一些大小相近的片段重叠在一起, 所以肉眼所看到的酶切片段数量要比

实际上少了许多.

虹彩病毒为细胞质病毒, 含有双链 DNA, 脊椎动物虹彩病毒基因组 DNA 有胞嘧啶 5' 端高度甲基化的特点, 特别是蛙病毒和淋巴囊肿病毒 (因为二者的基因所编码 DNA 甲基转移酶的缘故)^[8]. 用一对同裂酶 *Hpa*II 和 *Msp*I 分别酶切病毒 DNA, 发现基因组 DNA 能被 *Msp*I 切开, 而不能被 *Hpa*II 切开. 这是因为病毒基因组 DNA 胞嘧啶 5' 端高度甲基化, *Hpa*II 对 CpG 甲基化修饰敏感, 所以切不开; 而 *Msp*I 对之不敏感, 所以能切开. 虹彩病毒编码的主衣壳蛋白 (MCP) 基因具有高度保守性, 它也是虹彩病毒的一个重要特点, 是鉴定虹彩病毒的一个重要指标. 利用其高度保守区的引物, 在这个病毒中得到 MCP 基因的序列, 与 FV3 比较, 它们的同源性达 98%, 说明这个病毒属于虹彩病毒科, 且与 FV3 接近. Mao 等^[1]比较了 9 种虹彩病毒 (寄主包括鱼、两栖类和爬行类) 的酶切图谱、甲基化反应和 PCR 扩增产物的序列分析, 认为这些虹彩病毒与蛙病毒属的代表动物蛙病毒 3 (FV3) 更相近, 并且从同一地区分离的病毒更相似. Hyatt 等^[9]比较了来自澳洲、南美洲、北美洲、欧洲、东南亚的不同宿主的 30 种脊椎动物虹彩病毒, 认为大多数属于蛙病毒属, 将原属于蛙病毒属的 DFV 和 GV6 分离出来, 作为虹彩病毒分类未定种. 将病毒的酶切图谱与 FV3^[10,11]以及其它蛙病毒属的病毒的酶切图谱^[9]进行比较, 发现差异较大, 但从它的形态特征、基因组甲基化的特点以及编码 MCP 基因的序列来看, 它应属于虹彩病毒科, 蛙病毒属, 并且是蛙病毒属的一个地方株.

为了构建病毒的基因组文库, 将各酶切片段插入质粒 pBluescript II KS 中, 转化入大肠杆菌 *E. coli* XL1-blue 中, 目前对重组子的筛选和测序工作正在进行中.

参考文献:

- [1] MAO J H, HEDRICK R P, CHINCHAR V G. Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses [J]. *Virology*, 1997, 229: 212–220.
- [2] GOORHA R., MURTI K G. The genome of frog 3, an animal DNA virus, is circularly permuted and terminally redundant [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79, 248–252.

- [3] WILLIS D B, GOORHA R. Frog virus 3 DNA is heavily methylated at CPG sequences[J]. Virology, 1980, 107: 250 - 257.
- [4] 何建国, 翁少萍, 黄志坚, 等. 鳊鱼暴发性传染病病毒病原研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1998, 37(5): 74 - 77.
- [5] 张奇亚, 李正秋, 江育林, 等. 沼泽绿牛蛙病毒的分离及其细胞感染的初步研究[J]. 水生生物学报, 1996, 20(4): 390 - 392.
- [6] CHEN Z X, ZHENG J C, JIANG Y L. A new iridovirus isolated from soft-shelled turtle[J]. Virus Research, 1999, 63(1-2): 147 - 151.
- [7] HE J G, WENG S P, ZENG K, et al. Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)[J]. J Fish Diseases, 2000, 23: 1 - 4.
- [8] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997: 1095 - 1103.
- [9] HYATT A D, GOULD A R, ZUPANOVIC Z, et al. Comparative studies of piscine and amphibian iridovirus[J]. Archives of Virology, 2000, 145: 301 - 331.
- [10] LEE M H, WILLIS D B. Restriction endonuclease mapping of the frog virus 3 genome[J]. Virology, 1983, 126: 317 - 327.
- [11] TONDER L, THAM T N, MUTIN P H, AUBERTIN A M. Molecular cloning and physical and translational mapping of the frog virus 3 genome[J]. Virology, 1988, 162: 108 - 117.

Purification and Enzyme Analysis of A Virus from Frog (*Rana tigrina rugulosa*)

LÜ Ling, HE Jian-guo, HE Hua-hong, DENG Min, WANG Xiao-hong, WENG Shao-ping
(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A virus from frog (*Rana tigrina rugulosa*), a member of the *Iridoviridae* family, is the causative agent of a disease caused high young frog mortalities and severe damage to frog cultures in China. The abundant virus material was obtained from FHM, CO and EPC cells infected by the virus. Then the virions was isolated and purified. Virions are icosahedron, enveloped, 125 nm in diameter averagely as observed by transmission electron microscopy. The genome of ISKNV is a double-stranded DNA molecule and highly methylated at cytosines in the CpG. As the viral DNA was digested with *Xba* I, *Bam*H I, *Hind* III, *Kpn* I and *Pst* I restriction endonucleases and separated by electrophoresis, restriction fragments were clearly shown on the agarose gel. The size of the virus DNA was estimated to be longer than 100 kb. At the nucleotide level of MCP, the virus showed 98% identity to FV3.

Keywords: frog virus; purification; enzyme analysis; methylation analysis; MCP