

文章编号:1000-0615(2001)03-0238-06

鳊传染性脾肾坏死病毒的纯化和酶切分析

邓 敏¹, 何建国¹, 翁少萍¹, 曾 征¹, 龙紫新²

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275; 2. 中山大学生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275)

摘要: 鳊传染性脾肾坏死病毒 (ISKNV) 是近年来危害广东地区鳊养殖业的主要病原。本文用回接感染健康鳊获得病毒原料, 分离纯化了大量高纯度的 ISKNV 病毒粒子, 电镜下可见病毒粒子为二十面体, 直径平均为 150nm。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 EcoRI、BamHI、HindIII、KpnI 和 PstI 酶切 ISKNV 基因组 DNA, 经电泳分离后, 分别得到 1、8、9、18、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 108.7kbp。

关键词: 鳊; 传染性脾肾坏死病毒; 纯化; 酶切分析

中图分类号: Q614.1; S941.41 **文献标识码:** A

Purification and enzyme analysis of infectious spleen and kidney necrosis virus from *Siniperca chuatsi*

DENG Min¹, HE Jian-guo¹, WENG Shao-ping¹, ZENG Zheng¹, LONG Qin-xin²

(1. School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

2. State Key Laboratory of Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) from mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), a member of the *Iridoviridae* family, is the causative agent of a disease causing high mandarin fish mortalities and severe damage to mandarin fish cultures in China. The abundant virus material was obtained by experimental infection. Then ISKNV virions were isolated and purified. Virions are icosahedron, 150nm 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 EcoRI, BamHI, HindIII, KpnI and PstI restriction endonucleases and separated by electrophoresis, restriction fragments were clearly shown on the agarose gel. The size of the ISKNV DNA was estimated to be longer than 108.7kbp.

Key words: *Siniperca chuatsi*; infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV); purification; enzyme analysis

收稿日期: 2000-07-03

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (990255)

第一作者: 邓 敏 (1972-), 女, 重庆市人, 讲师, 主要从事水产养殖病害方面研究。Tel: 020-84113739, E-mail: mdeng@21cn.com

鳊(*Siniperca chuatsi*)是我国名优淡水养殖品种。随着鳊人工繁殖和育苗技术的成功,鳊养殖业得到较快发展,与此同时病害问题也日益严重。在1994年-1997年间,广东省每年鳊暴发流行病发病率约20%,到1998年病情进一步严重,仅南海市鳊池塘发病率达60%,死亡率达50%。吴淑勤等从患病鳊中发现了直径为150nm的球型病毒,并认为是鳊暴发性传染病的主要病原^[1]。何建国等通过回归感染进一步证明了该病毒的病原性,并对其感染的组织病理进行了研究,发现脾肾是其主要感染器官,导致脾肾坏死,因此将之暂命名为传染性脾肾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)^[2]。该病毒为细胞质内寄生的具囊膜二十面体病毒,直径大小为150nm,初步认为是一种虹彩病毒,感染鳊脾、肾、肝脏、鳃、心脏和消化道等组织器官,脾和肾是其主要感染器官,肝脏、鳃、心脏和消化道不是其主要感染器官,在光镜下偶见受感染细胞^[3]。ISKNV具很强的致病性,浸泡感染和注射感染,在25~34℃范围内,受感染鳊在7~12d内死亡率为100%。在发病池中,鳊一般10d内死亡率达90%左右。人工感染结果表明草鱼和加洲鲈是ISKNV的实验宿主,其中对草鱼不致病,不引起组织病变;而对加洲鲈有较强致病性,人工感染死亡率达100%^[4]。对ISKNV的检测方法,据报道有常规组织学方法(H.E染色)、电镜观察、分离外源性核酸^[5]、PCR检测和核酸探针原位杂交技术^[6]。在分子生物学方面,李新辉等用随机引物扩增多态性DNA(RAPD)技术克隆核酸片段,并对之进行了序列分析^[7];邓敏等对PCR扩增产物的序列分析发现ISKNV与日本报道的真鲷虹彩病毒(red sea bream iridovirus, RSIV)具有很近的亲缘关系^[6]。本文通过回接感染实验获得病毒原料,分离纯化了大量高纯度的ISKNV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ISKNV的基因组文库和物理图谱奠定了基础,为诊断和防治ISKNV提供基础资料和理论依据。

1 材料与方法

1.1 鳊

被ISKNV感染的濒死鳊于1998年11月取自广东省南海市某鳊养殖场,表现典型的传染性脾肾坏死病症状,经组织病理和电镜检测在其脾脏和肾脏发现大量ISKNV,PCR检测为阳性。将之用液氮冷冻后带回实验室,-70℃保存。健康鳊每尾250~300g,取自广东省东莞市某鳊养殖场,外观和解剖没有ISKNV病症,PCR检测为阴性。先在实验室水泥池饲养1周,无病症后移至可控温水簇箱中饲养,水体120L,水温30℃,1周后无病症用于人工感染实验。

1.2 鳊人工感染

分别取健康鳊和被ISKNV感染的患病鳊脾肾按1:10(w/v)加入PBS(pH7.2),1000 μg·mL⁻¹青霉素和1000 μg·mL⁻¹链霉素,冰浴中匀浆后,5000r·min⁻¹,4℃离心30min,取上清,经0.22μm滤膜抽滤后,4℃保存。滤液接种于LB平板上30℃培养48h,观察平板上无细菌生长^[2]。

人工感染实验共分2组,每组健康鳊15尾,养殖温度为(30±0.5)℃,充气饲养于120L控温循环过滤水族箱中,每天投喂一次活鱼饲料和吸污一次。感染组按每100g鱼体重0.1mL腹腔注射被ISKNV感染的患病鳊脾肾滤液,对照组按每100g鱼体重腹腔注射0.1mL健康鳊脾肾滤液。

分别取感染组和对照组鳊脾肾进行PCR检测、组织切片(H.E染色)和电镜观察。

1.3 PCR检测

按邓敏等^[6]的方法制备模板:分别取被ISKNV感染的患病鳊与健康鳊脾和肾,按1:10(w/v)加入PBS(pH7.2),冰浴中匀浆后,3000r·min⁻¹,4℃离心10min,取上清,分别用酚/酚/氯仿/异戊醇、氯仿/异戊醇抽提1次,乙醇沉淀后用无菌水重溶,存于-20℃。

反应体积为25μl,除模板DNA外,尚含10mmol·L⁻¹ Tris HCl (pH8.9), 50mmol·L⁻¹ KCl, 0.1% Triton-100, 1.5mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.2mmol·L⁻¹ dNTP, 10pmol·L⁻¹引物,1U 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℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 1min, 循环完成后, 72℃ 充分延伸 10min, 取 5 μ L 反应液在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳观察。

1.4 组织切片染色

取健康、患病和人工感染鳊的脾肾, 切成小于 0.5cm \times 0.5cm \times 0.5cm 的组织块, Davidson's AFA 固定液中固定 24h 以上, 按组织切片常规技术制成 5~6 μ m 厚的组织切片, 经 H.E 染色, 封片后于光镜下观察。

1.5 电镜样品的制备

取健康、患病和人工感染鳊的脾肾, 切成小于 0.5cm \times 0.5cm \times 0.5cm 的组织块, 于 2.5g \cdot 100mL⁻¹ 的戊二醛 (0.1mol \cdot L⁻¹ PBS 配制, pH7.2) 中固定, PBS 冲洗, 1g \cdot (100mL)⁻¹ 的锇酸 (0.1mol \cdot L⁻¹ PBS 配制, pH7.2) 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。

1.6 病毒粒子的分离纯化

取被 ISKNV 感染的濒死鳊的脾和肾, 称重, 剪碎后于液氮中研磨成粉, 随后加入 10 倍体积 PBS (pH7.2) 玻璃匀浆器冰浴匀浆后, 4℃, 6 500g 离心 20 min, 上清于 4℃, 25,000g 离心 30 min。沉淀用 PBS (pH7.2) 重悬。重复上述步骤 2~3 次后, 将病毒重悬液铺于 20%~50% (w/w) 蔗糖梯度上用 Beckman SW40 Ti 转子 4℃, 23 000r \cdot min⁻¹ 离心 2h。收集病毒带于用透析缓冲液 (15 mmol \cdot L⁻¹ NaCl, 10 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂, 10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl, pH8.0) 透析过夜。

纯化的病毒粒子滴加于铜网上, 用 2% 磷钨酸 (pH7.0) 负染 2min 后, 滴加蒸馏水洗, 干后用日立 JEM-100CX II 透射电镜观察。

1.7 病毒核酸的提取

纯化的病毒粒子悬液加入 SDS 和蛋白酶 K 至终浓度分别为 0.5% 和 0.5 mg \cdot mL⁻¹ 于 55℃ 消化 3 h, 随后用酚法抽提、乙醇沉淀病毒 DNA。

1.8 病毒核酸的甲基化分析

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

1.9 病毒核酸的限制酶切分析

ISKNV DNA 用限制性内切酶 EcoR I、BamH I、Hind III、Kpn I 和 Pst I (Gibco/BRL 公司) 于 37℃ 酶切过夜, 在 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。以高分子量 Marker 和 1Kb Marker 为标准, 借助 DNASIZE 软件计算出各酶切片段的分子量, 并由此算出 ISKNV 基因组大小。

2 结果

2.1 鳊人工感染

感染组健康鳊腹腔注射 ISKNV 病毒滤液后, 在 28~30℃ 下饲养, 至第七天开始死亡, 第十天全部死亡, 死亡率为 100%。其症状与自然状态下发病的鳊相同, 特征表现为脾肾肿大, 充血, 坏死; 经 H.E 染

色后,光镜下显示,感染组鳃脾肾组织的细胞病变严重,表现为细胞肿大,直径为正常细胞的3~4倍,细胞核固缩(图版-1);感染组鳃脾肾组织制成超薄切片,电镜观察发现其脾肾组织的细胞质中有大量病毒粒子,为二十面体,具囊膜,直径平均为150nm(图版-2);取其脾肾组织做PCR检测,结果都为阳性(图版-3)。

对照组健康鳃腹腔注射PBS后,在28~30℃下饲养,不发病,感染率为0%,组织学方法(H.E染色)和电镜观察未发现病变和病毒粒子,取其脾肾组织做PCR检测,结果都为阴性。

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ISKNV病毒粒子(图版-4),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,核衣壳为圆形,负染后内部结构不可见。

2.3 ISKNV 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。ISKNV基因组DNA经Hpa II和Msp I酶切后,取5 μ l反应液在0.8%琼脂糖凝胶上电泳,其结果如图版-5所示,ISKNV基因组DNA能被Msp I切开,而不能被Hpa II切开。由此证明ISKNV基因组DNA胞嘧啶5'端高度甲基化。

2.4 ISKNV 基因组 DNA 的酶切分析

如图版-6所示,ISKNV基因组DNA用限制性内切酶EcoR I、BamH I、Hind III、Kpn I和Pst I酶切过夜,用0.6%琼脂糖凝胶电泳分离后,分别得到1.8、9、18、22条片段,其中小于1.5 kbp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108.7 kbp。

3 讨论

分离提纯病毒的前提是获得大量的病毒材料。由于尚未建立ISKNV的敏感细胞株,因此我们采用回感染健康鳃,导致鳃发病、死亡,表现出与自然发病的鳃相同的症状和病理变化,运用PCR检测、常规组织学方法(H.E染色)和电镜观察确证病原为该病毒;另外,由于脾肾是其主要感染器官,电镜观察可见大量的病毒粒子,而其它部位病毒粒子较少,所以我们选择感染ISKNV的濒死鳃脾肾组织为原料分离提纯ISKNV,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,可见我们得到的病毒是高纯度的。从酶切图谱中可以看到,EcoR I不能酶切ISKNV基因组DNA;BamH I和Hind III在ISKNV基因组DNA中切点不多,所以得到的酶切片段较大但不多;Kpn I和Pst I(特别是Pst I)在ISKNV基因组DNA中切点较多,所以得到的酶切片段多但相对较小。

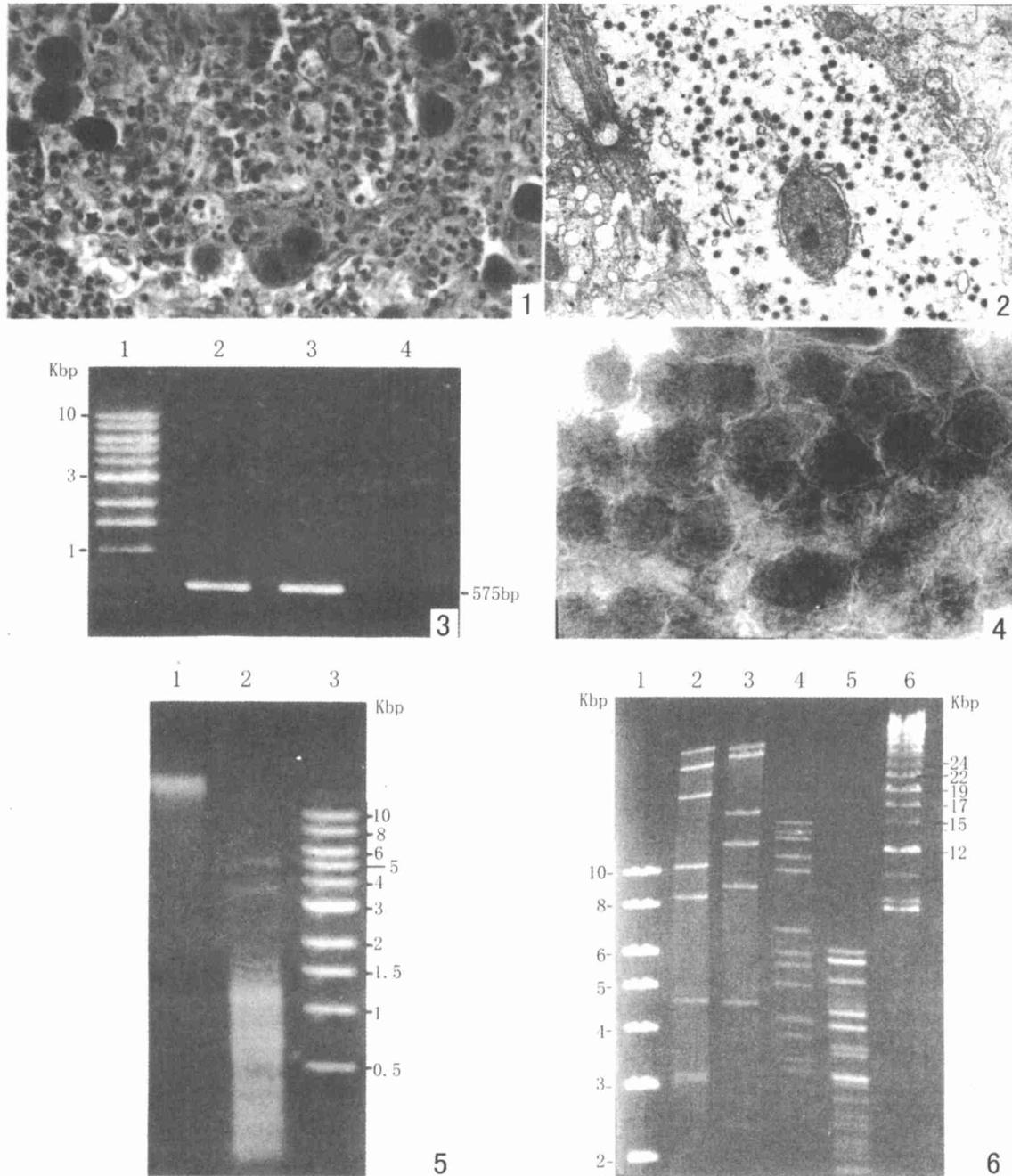
自80年代后期以来,由虹彩病毒引起的水产动物致死性传染病在包括美洲、欧洲、亚洲和澳洲在内的世界各地普遍流行,给海淡水养殖业造成了严重的经济损失^[8]。虹彩病毒为细胞质内寄生的病毒,具有致密的不规则的中央核心体,含有双链DNA,其基因组DNA胞嘧啶5'端高度甲基化,特别是蛙病毒和淋巴囊肿病毒(因为二者的基因所编码DNA甲基转移酶的缘故)^[9]。我们用一对同裂酶Hpa II和Msp I分别酶切ISKNV DNA,其结果发现ISKNV基因组DNA能被Msp I切开,而不能被Hpa II切开。这是因为ISKNV基因组DNA胞嘧啶5'端高度甲基化,Hpa II对CpG甲基化修饰敏感,所以切不开;而Msp I对之不敏感,所以能切开。而且,由于限制酶EcoR I对CpG甲基化敏感,也不能酶切ISKNV DNA,所以ISKNV DNA经EcoR I酶切只得到一条片段。至于ISKNV应属于哪一属,目前不能定论,Mao等^[10]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,认为鱼的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。我们对 ISKNV PCR 产物的克隆与序列分析发现 ISKNV 与从日本分离的真鲷虹彩病毒(RSIV)同源性很高^[6],但由于没有 RSIV 酶切图谱的报道,所以无从比较,不能进一步确证。我们将 ISKNV 的酶切图谱与 FV3^[10]和鱼淋巴囊肿病毒(FLDV)的酶切图谱^[11]进行比较,发现差异较大。

为了构建 ISKNV 基因组文库,我们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工作正在进行中,相信将对 ISKNV 的分子生物学研究有很大帮助。

参考文献:

- [1] 吴淑勤,李新辉,潘厚军,等. 鳊暴发性传染病病原研究[J]. 水产学报,1997, 21(增刊):56-60.
- [2] 何建国,翁少萍,黄志坚,等. 鳊暴发流行病病毒性病原研究[J]. 中山大学学报(自然科学报),1998,37(5):74-77.
- [3] 翁少萍,何建国,曾 慷,等. 鳊传染性脾肾坏死病(ISKN)组织病理和其与血红蛋白、红细胞和白细胞之间的关系[J]. 华南师范大学学报,1998,82(增刊):70-76.
- [4] 曾 慷,何建国,翁少萍,等. 鳊传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)感染途径、宿主范围及对温度敏感性的研究[J]. 中国病毒学,1999, 14(4):353-357.
- [5] 李新辉,吴淑勤,潘厚军,等. 一种检测鳊病毒方法[J]. 中国水产科学,1997,4(5):112-114.
- [6] 邓 敏,何建国,左 涛,等. 鳊传染性脾肾坏死病毒(ISKNV):PCR 检测方法的建立及虹彩病毒新证据[J]. 病毒学报,2000, 16(4):365-369.
- [7] 李新辉,吴淑勤,潘厚军,等. 鳊病毒核酸初步分析[J]. 水产学报,2000,24(2):171-174.
- [8] He J G, Weng S P, Zeng K, et al. Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), in China[J]. J Fish Dis, 2000, 23:219-222.
- [9] 殷 震,刘景华. 动物病毒学(第二版)[M]. 北京:科学出版社,1997. 1095-1103.
- [10] 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.
- [11] Darai G, Anders K, Koch H G, et al. Analysis of the genome of fish lymphocystis disease virus isolated directly from epidermal tumours of pleuronectes [J]. Virology, 1983, 126: 466-479.



图版 Plate

1. 受 ISKNV 感染的鳃脾脏切片 (H.E 染色), 受染细胞肿大, 嗜碱性, 核萎缩, $\times 400$; 2. 透射电镜示受 ISKNV 感染的鳃脾脏中的大量二十面体病毒粒子, $\times 3900$; 3. ISKNV PCR 检测结果, ①DNA 分子量标准 (1Kb Marker), ②以自然感染 ISKNV 的鳃脾肾组织 DNA 为模板, ③以人工感染感染组鳃脾肾组织 DNA 为模板, ④以人工感染对照组鳃脾肾组织 DNA 为模板; 4. 负染的蔗糖密度梯度离心纯化的 ISKNV 粒子电镜照片, $\times 11500$; 5. ISKNV 的甲基化分析, ①ISKNV DNA/HpaII, ②ISKNV DNA/MspI, ③DNA 分子量标准 (1Kb Marker); 6. ISKNV 的限制性内切酶酶切图谱, ①DNA 分子量标准 (1Kb Marker), ②ISKNV DNA/BamHI, ③ ISKNV DNA/HindIII, ④ISKNV DNA/KpnI, ⑤ISKNV DNA/PstI, ⑥DNA 分子量标准 (高分子量 Marker)