

酒石酸钾-甘油密度梯度离心法纯化 对虾肝胰腺细小病毒的方法学研究

薛清刚 罗挽涛 宋庆云 王文兴 杨 虹

(国家海洋局第一海洋研究所, 青岛 266003)

摘 要 阐述一种从对虾肝胰腺组织中纯化肝腺细小病毒的方法。将对虾肝胰腺组织样品研磨并进行适当脱脂处理后, 进行一系列的浓缩和过 35% (w/w) 蔗糖垫离心, 然后通过一个不连续的酒石酸钾-甘油密度梯度离心纯化。结果证实, 该方法对样品中的病毒颗粒的分离和纯化效果均较理想, 可以满足有关研究工作的需要。经与 CsCl 密度梯度离心法比较, 提示两者效果相似, 但本方法更加经济实用。

关键词 酒石酸钾-甘油密度梯度, 对虾, 肝胰腺细小病毒, 纯化方法

人类发现对虾病毒已有二十年的历史, 对其研究也取得了一些进展, 但与其它动物病毒的研究相比, 总体水平较低, 尤其是对已发现病毒的深入鉴定工作, 更是进展缓慢。这其中最主要的原因是难以获得足够的纯病毒。对于大部分动物病毒, 获取大量病毒颗粒的方式是通过细胞培养。然而, 由于对虾细胞培养本身也还是一个未解决的难题, 所以, 这种方式在研究对虾病毒方面尚难以发挥作用。也正因为如此, 探索直接从感染组织中分离纯化病毒的有效方法, 就显得更加重要。在现已发现的 10 余种对虾病毒中, 一些有关诊断方法的研究文献中简单涉及到了相应病毒的纯化[Lewis 等 1986, Momoyama 1983], (孙修勤等 1992), 而且 Bonami 等[1990] 就对虾传染性皮下与造血组织坏死病毒(IHNV) 的纯化和鉴定也比较深入系统, 但所有这些都未能从纯化方法学的角度进行较深入的介绍。最近, 对于原称之为肝胰腺细小样病毒(*Hepatopancreatic Parvo-like Virus*, HPV) 的对虾病毒, 在许多方面取得了较大进展[薛清刚等 1996a, b], 明确了该病毒的确属于细小病毒科。而在此期间, 从对病毒纯化方法的较深入探索中得到了一些有启发性的结果, 有助于正在广泛进行的对虾病毒研究。

1 材料和方法

1.1 样品

用于纯化病毒的对虾感染组织为病虾的肝胰腺。在确定取样前, 先经组织病理检查选择出包涵体检出率高、感染程度严重的养殖群体, 捕获后洗净并在现场用灭菌器械快速取出肝胰腺, 然后, 尽快运回实验室- 70℃保存。另有部分样品是将病虾用冷藏箱低温运至实验室后再取肝胰腺保存。

收稿日期: 1995- 08- 21

(1) 孙修勤等, 1992, 对虾肝胰腺细小样病毒的免疫诊断研究, 鱼类病害研究, 14(2): 22- 24.

1.2 制备组织匀浆和样品前处理

冰冻肝胰腺样品快速解冻后,用玻璃研磨器充分研磨成糊状,然后,加 0.05 mol/L Tris-HCl, 0.001 mol/L EDTA, pH 7.6 (ET) 缓冲液配成 20%~40% (w/w) 的悬液。在悬液内加入等体积的氯仿或 1,1,2-三氯三氟乙烷充分振荡混匀 10 分钟,置 4℃于 2 小时。以 3 000 r/min 离心 20 分钟,取上部水相液,并用半倍体积的氯仿或 1,1,2-三氯三氟乙烷重复处理一次。最终的上清液用于进一步提纯病毒。

1.3 浓缩与初步纯化

在前述水相液内加入 60% 的聚乙二醇 (MW6000, 以下简称 PEG) 和固体 NaCl, 使相应的终浓度分别达到 6%~8% 和 1%, 混匀后置 4℃冰箱过夜。然后,将已有沉淀的悬液置 Hitachi 85 CP, RP70T 转子, 8 000 r/min, 5℃时离心 30 分钟,弃上清液,沉淀加原体积 1/10 的 ET 缓冲液研磨重悬,相同转子 10 000 r/min, 5℃时离心 20 分钟去大颗粒。制备 35%~40% (w/w) 的蔗糖垫,将重悬液加到蔗糖垫上,蔗糖比悬液为 1:3,在相同转子中,50 000 r/min, 5℃时离心 3.5 小时,吸取近蔗糖面处的悬液保存以备再次提取病毒,然后弃上清液,管底沉淀用 ET 缓冲液重悬,10 000 r/min, 5℃时离心 20 分钟去大颗粒。上清液即为初步纯化的病毒。为比较不同的处理过程,在少数几次纯化过程中,PEG 浓缩沉淀后的重悬液先经 40 000 r/min, 5℃时离心 2 小时,取沉淀重悬,然后再过蔗糖垫离心。另外,用终浓度达 50% 饱和度的 (NH₄)₂SO₄ 代替 6%~8% 的 PEG 进行浓缩以比较效果。

1.4 酒石酸钾-甘油密度梯度离心过程

参照 Ashley[1982] 方法配制 6 个不同浓度和密度的酒石酸钾-甘油混合液。在容量为 13 mL 的离心管内,用滴管制备不连续密度梯度,每层 1.5 mL。将初步纯化的病毒悬液加到密度梯度液面上,每管 2 mL。用 Hitachi 85 CP RPS 40T 转子,10℃时以 40 000 r/min 离心 3 小时,分层取样,直接将不同折光带取出对缓冲液透析过夜后,作进一步的检查分析。

2 结果

2.1 几个主要步骤的表现

在整个纯化过程中,组织匀浆、脱脂、浓缩、过蔗糖垫和密度梯度离心等是几个关键步骤。冰冻保存的对虾肝胰腺组织解冻后,用玻璃组织研磨器反复研磨 2~3 次即呈糊状,取样在显微镜下观察无明显的完整细胞成分,加入缓冲液后完全呈混悬状态。当加入氯仿或 1,1,2-三氯三氟乙烷充分振荡并静置一段时间后,液体分成三层。最底层是已溶解有色素的有机溶剂,中间一层是呈絮块状的脂类物质,而上层为较混浊的水相液。液体自然分相的过程比较缓慢,往往在 4℃静置过夜仍不彻底,尤其是中间的脂类物质比较松散,但在适当静置后进行低速离心,则不仅水相液的回收效果好,而且去除有机溶剂更彻底。比较氯仿和 1,1,2-三氯三氟乙烷这两种有机溶剂的脱脂效果,证实两者可以互相代替使用,只是后者自然分相比较快,但较昂贵。

经脱脂处理后的水相液加入 PEG 使终浓度达到 6%~8% 时,开始阶段沉淀并不明显,静

置 4~ 5 小时以后在液体底部可见到絮状沉淀, 10 小时以上沉淀比较充分。与此不同, 使用 $(NH_4)_2SO_4$ 进行浓缩时, 在加入和混匀的过程中即有沉淀产生, 并且最终的沉淀量也明显多于用 PEG 浓缩。但是, 用 $(NH_4)_2SO_4$ 浓缩对脱脂处理要求较高, 当脱脂不彻底时往往出现两相倒置的现象, 即呈团块状的凝集物漂浮在液体的表面。这使随后的处理比较困难。

过蔗糖垫离心后, 离心管内的液体通常形成三部分。近管口处的一段比较清, 多呈淡咖啡色; 中间的原蔗糖与悬液的界面附近聚集者比较混浊, 甚至糊状的悬浮液, 将该部分回收后重新提取仍能得到一定量的病毒; 近管底处为蔗糖垫层, 视组织悬液的处理情况而有所不同, 如果前处理较彻底, 在过蔗糖垫前先经过一次沉淀和悬浮, 该层较清澈, 而假若浓缩后的重悬液过浓, 蔗糖垫层可变得混浊, 但并不影响管底沉淀。将沉淀重悬后取样用 3% 磷钨酸负染作电子显微镜观察, 可以见到大量比较均匀的病毒颗粒, 同时也有大小不规则的杂质颗粒。

酒石酸钾-密度梯度离心后, 离心管内通常出现如图 1 所示意的 3~ 4 条折光带。第一条带在密度梯度介质与样品的交界处, 为颜色与样品相同的混浊条带, 电子显微镜检查显示大量大小不等的组织细胞碎片。第二条带较宽, 颜色受样品的影响而多呈淡咖啡色, 电子显微镜下显示形状不规则的碎片和少量空的病毒衣壳。第三条带较前两条带致密, 呈乳白色, 多比较均匀, 但当样品中病毒含量较高时, 条带表面可显示细絮状或细颗粒状, 电子显微镜检查证实该条带内含有大量纯净的肝胰腺细小病毒颗粒, 其绝大部分为完整的病毒核衣壳, 也有少量空衣壳。第四条带比较细弱, 有时甚至并不出现, 电子显微镜检查也为纯净的病毒颗粒, 并且目前还没发现与第三条带内含物在形态特征上有明显区别。



图 1 酒石酸钾-甘油密度梯度离心后的示意图

Fig. 1 After potassium tartrate-glycerol density gradient centrifugation

图 2 酒石酸钾-甘油密度梯度离心纯化的肝胰腺细小病毒颗粒。3% 中性磷钨酸负染, (210k, 横杠= 25nm)

Fig. 2 The purification and centrifugation of hepatopancreatic parvovirus by potassium tartrate-glycerol density gradient

2.2 酒石酸钾-甘油密度梯度离心法的纯化效果

图 2 是一次标准纯化过程所得到的纯化病毒样品的电子显微镜检查结果。从图中可以看出, 病毒颗粒大小均一, 主要是病毒核衣壳和少量空衣壳, 说明方法的纯化效果良好。另外, 用

这种纯化病毒提取病毒基因组核酸进行鉴定和免疫动物建立血清学诊断方法的结果也证实:该方法所得到的病毒纯度能够满足有关分析和研究的需要[薛清刚等 1996a, b]。

3 讨论

对于任何病毒学研究,获取足够纯净病毒是前提。而无论通过细胞培养还是直接从感染组织内获得,最终都要可靠的纯化方法。目前,浓缩纯化病毒的方法多种多样,但最常用的还是差速离心和密度梯度离心[Payment 等 1991],其中利用各种介质进行密度梯度离心是获取大量纯净病毒的最有效方法之一。正基于此,我们探讨了纯化对虾肝胰腺细小病毒的方法。

3.1 关于样品前处理中的几个问题

在样品前处理中,破碎组织细胞以释放病毒是第一步。我们曾取同一批样品分别作单纯研磨、研磨后冻融和研磨后超声波处理,最终纯化的结果并未显示出病毒得率的明显差别,说明单纯研磨可以使肝胰腺上皮细胞内的病毒得到充分释放。在作对虾组织学和病理学分析过程中发现,对虾肝胰腺有两大特点:一是结缔组织少;二是肝小管上皮细胞自溶趋势明显,而这可能是腺上皮细胞中的病毒容易释放的重要原因。肝胰腺中脂类含量较高,脱脂处理对随后的提取过程影响很大。

在病毒纯化中使用较多的是 1, 1, 2-三氯三氟乙烷[Nakagaki 1980],但是该试剂比较昂贵,我们发现用氯仿代替可以得到同样的效果。当然,由于有机溶剂的脱脂过程没有选择性,因此,对于一些有包膜的病毒进行纯化应慎用或不用。因为过于强烈的脱脂作用可以使病毒的包膜脱落,我们在纯化肝胰腺中的一种呼肠孤病毒时曾遇到过这一问题[薛清刚等 1996b]。病毒的浓缩过程可以起到缩小体积和使一些小颗粒留在上清液中而去除之。聚乙二醇是一种稳定的有机大分子,能够通过“空间排挤”作用促使其它大的有机分子或颗粒从溶液中沉淀出来,同时不影响溶液的 pH 值和离子强度,并且通过调节其终浓度可以相对选择性地促使不同大小的分子或颗粒沉淀,是病毒浓缩纯化中经常用到的促沉淀剂之一[Payment 1991]。我们在本方法中利用 PEG 取得了比较理想的效果。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 也有促进蛋白质等大分子有机物沉淀的作用,而且在许多蛋白质制备过程中广泛使用,但本项研究的结果提示,用其对虾肝胰腺组织悬液中浓缩沉淀肝胰腺细小病毒,效果不如 PEG。除了结果部分提到的缺点外, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀产生较多的沉淀物却不提高病毒纯化的得率,反而为后续的处理过程增加了工作量。蔗糖垫离心对于去除一些大的不规则颗粒,如组织细胞碎片等有较好的作用。我们曾将过蔗糖垫后再进行密度梯度离心与差速离心后直接密度梯度离心作比较,发现前者无论在分离效果还是得到病毒的纯度方面均明显优于后者。

3.2 关于酒石酸钾-甘油密度梯度离心

Ashley 等[1982]首先建立了利用酒石酸钾和甘油两种介质的密度梯度离心法,并成功地将其用于从人类粪便中分离小的球形病毒。这种方法的优点有:1)所用试剂价格低廉;2)由于粘度增加而离子密度相对较小,所以,减少了在单纯的无机盐(如 CsCl)的密度梯度介质中长时间离心能对病毒表面结构造成的损伤;3)酒石酸钾梯度具有 CsCl 类似的分辨能力和在离心过程中浓缩被纯化颗粒的作用,而逐渐降低的甘油密度梯度则能更好地阻挡杂质。我们曾将该方法与 CsCl 和蔗糖密度梯度离心相比较,发现其与前者效果相似,但好于后者。Ashley 所

报道的方法离心时间为 1 小时,这在常规制备时不适用。我们对方法进行了改进,将离心时间缩短为 3 小时,同样得到了良好的分离纯化效果,这说明该方法可以比较广泛地应用于多种病毒,尤其是一些球形病毒颗粒的纯化制备。

本研究为国家自然科学基金资助项目,编号:39000083。部分受国家攀登计划 B 资助,PDB 6-6-2 号。

参 考 文 献

薛清刚等. 1996a. 中国对虾肝胰腺细小病毒的纯化与鉴定. 海洋与湖沼, 27(3): 308~ 313.

薛清刚等. 1996b. 中国对虾中一种与肝胰腺细小病毒混合感染的呼肠孤病毒的初步鉴定. 海洋与湖沼, 27(3): 314~ 318.

Ashley C R, et al. 1982. Potassium tartrate-glycerol as a density gradient substrate for separation of small, round viruses from human feces. J Clin Microbiol, 16(2): 377~ 381.

Bonami J R, et al. 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. J Gen Virol, 71: 2657~ 2664.

Lewis D H, et al. 1986. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting penaeid baculovirus. J Fish Dis, 9: 519.

Momoyama K. 1983. Studies on baculoviral mid-gut gland necrosis of kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). III. Presumptive diagnostic techniques. Fish pathol, 17: 263.

Nakagaki N, et al. 1980. DNA of a new parvo-like virus isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. J Invert Pathol, 35: 124~ 133.

Payment P, et al. 1991. Concentration and purification of viruses: practical aspects in virology and molecular biology. In Chermisnoff P N and Forrante L M (eds). Biotechnology-current progress, Volume I, Technomic Publishing Company.

METHODOLOGICAL STUDY OF THE PURIFICATION OF THE HEPATOPANCREATIC PARVOVIRUS OF PENAEID SHRIMP BY A POTASSIUM TARTRATE-GLYCEROL DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION

XUE Qing-Gang, LUO Wan-Tao, SONG Qing-Yun, WANG Wen-Xing, YANG Hong
(First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266003)

ABSTRACT A method to purify the hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp from the infected tissue by density gradient centrifugation using potassium tartrate-glycerol as substrate is described in this article. Taken from the heavily infected shrimp population, the hepatopancreas was ground thoroughly and treated with 1, 1, 2-trichlorotrifluoroethane or chloroform. After the concentration with 6% ~ 8% of polyethylene glycol (PEG), centrifugation through a sucrose cushion of 35% (w/w) was performed. Then, the resulted pellet was resuspended and centrifuged through a density gradient of potassium tartrate-glycerol prepared according to Ashley (1982). It is indicated from the purification result that the method is as effective as the CsCl density gradient centrifugation yet less expensive.

KEYWORDS Potassium tartrate-glycerol density gradient, Penaeid shrimp, Hepatopancreatic parvovirus, Purification method