

文章编号: 1674-5566(2009)03-0372-04

· 研究简报 ·

# 一种改进的对虾白斑综合征病毒提纯方法

姜有声<sup>1,2</sup>, 战文斌<sup>1</sup>, 程顺峰<sup>1</sup>, 王世表<sup>1</sup>

(1. 中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 对虾白斑综合征病毒 (WSSV) 的囊膜蛋白在提纯的过程中易脱落, 用传统的密度梯度离心方法不易获得完整的病毒粒子, 对传统的蔗糖密度梯度离心方法加以改进后, 可以获得大量完整的病毒粒子。用患白斑综合征病毒病的中国对虾制备 WSSV 粗提液, 感染螯虾 (*Cambarus proclarkii*), 选取 25% 的蔗糖溶液用作病虾的匀浆液, 然后经蔗糖密度梯度离心, 分取各带负染后电镜观察, 大量完整的病毒位于 46%~52% 蔗糖梯度之间, 病毒粒子末端带有很长的尾; 而病毒裸露的核衣壳位于 40%~46% 蔗糖梯度之间; 在 57%~62% 之间观察到较多完整病毒粒子和少量细菌。实验结果表明改进的病毒提纯方法较好, 可得到大量完整的带囊膜的病毒颗粒。

**关键词:** 白斑综合征病毒; 病毒提纯; 完整病毒

**中图分类号:** S945.1      **文献标识码:** A

## A method of white spot syndrome virus (WSSV) purification

JIANG You-sheng<sup>2</sup>, ZHAN Wen-bin<sup>1</sup>, CHENG Shun-feng<sup>1</sup>, WANG Shi-biao<sup>1</sup>

(1. Laboratory of Pathology and Immunology of Aquatic Animals IMMEC

Ocean University of China Qingdao 266003 China

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306 China)

**Abstract:** The envelope proteins of white spot syndrome virus (WSSV) are easy to be destroyed during purification. It was difficult to obtain intact virions by routine sucrose gradient centrifugation. After modifying the sucrose gradient, we can obtain a large quantity of intact virions. WSSV inoculums were prepared from gills of heavily infected *Fenneropenaeus chinensis* and infected crayfish (*Cambarus proclarkii*). WSSV was purified from the gills of infected crayfish. 25% sucrose was selected as homogenate medium. After being centrifuged in sucrose gradient, each band was collected and examined by transmission electron microscope. Enveloped virus was located between 46%—52% sucrose gradient, and most viral particles had a long tail-like envelope extension at one extremity. The nucleocapsids were between 40%—46% sucrose gradient. Between 57%—62% sucrose gradient, there were some bacteria and intact virus. The result showed this modified technique is very efficient for virus purification.

**Key words:** white spot syndrome virus; virus purification; intact virus

收稿日期: 2008-03-08

基金项目: 国家 973 课题基金 (2006CB101806); 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金项目 (科 07-05); 上海海洋大学博士启动基金 (科 06-315)

作者简介: 姜有声 (1976-), 女, 新疆沙湾人, 讲师, 博士, 主要从事水产动物医学研究。E-mail: ysjiang@shou.edu.cn

通讯作者: 战文斌, E-mail: wbzhan@ouc.edu.cn

对虾白斑病是 1992年开始流行于亚洲地区的危害极大的病毒性流行病,感染的对虾死亡率高达 100%,其病原为白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)。WSSV可感染几乎所有的养殖对虾,以及其它的野生虾蟹类和桡足类等,具有广泛的宿主范围<sup>[1-2]</sup>,因此成为水生生物研究领域重要的病毒之一。自 WSSV流行开始,国内外学者不断利用生物学新技术,从分子或基因水平上,研究 WSSV 的流行病学、理化特性、基因、蛋白特性等<sup>[3-6]</sup>。在 WSSV的研究过程中,病毒的提纯是关键的一步。由于该病毒的囊膜蛋白很容易在提纯过程中脱落,很难得到完整的病毒粒子。传统的匀浆介质会破坏病毒囊膜,从而不易得到大量完整的病毒粒子。从患病对虾的血中提取病毒在 WSSV的研究中常用到<sup>[7-8]</sup>,但是这种方法由于较难获得病虾的血,从而不能便捷地得到大量完整的病毒粒子。曾经报道一些改良的提纯技术可以得到纯度较高的核衣壳和病毒粒子,为 WSSV基因组的研究奠定了良好的基础<sup>[7-9]</sup>,但几种方法比较复杂,且加有剧毒的蛋白酶抑制剂,有一定的危害性。本论文报道的是一种改良的,无毒性成份的加入,且能大量获得完整病毒粒子的蔗糖密度梯度提纯技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

患白斑综合征病毒病的中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)取自青岛附近患病虾池,甲壳上白斑明显,冷冻保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 。

病毒增殖选用敏感宿主—螯虾(*Cambarus proclarkii*),从青岛水产品市场购得,平均体重 20~25 g 暂养于 30 L 塑料水族箱内,20尾/箱,不投喂,暂养 5 d 后待用。

### 1.2 螯虾感染

选用白斑症明显的中国对虾,取鳃丝称重,1 g 鳃丝加 10 mL(0.01 mol/L, pH 7.4)。冰浴条件下用玻璃匀浆器匀浆,匀浆液 1 200 g 离心 20 min 取上清,0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌,保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 。

病毒母液用无菌 PBS 缓冲液稀释 100 倍,人工感染螯虾,每只螯虾腹部皮下注射 0.1 mL,7 d 后收集濒死螯虾,取鳃丝用于 WSSV 提取。

### 1.3 病毒提取

取被 WSSV 感染的螯虾鳃,1 g 病料加入 5 mL 25% (W/W, 蒸馏水配)蔗糖,石英砂研磨 2~3 min ( $4^{\circ}\text{C}$ ),使细胞破碎,病毒游离到溶液中。把研碎的病料 3 000 r/min 离心,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15 min 取上清, 5 000 r/min 离心,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15 min 取上清, 8 000 r/min 离心,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 min 取上清, 25 000 r/min 离心,  $4^{\circ}\text{C}$ , 1.5 h 取沉淀,用适量 25% 蔗糖溶液重悬,磁力搅拌器缓慢搅拌约 1 h  $4^{\circ}\text{C}$ 。把搅拌均匀的病毒粗提液铺于不连续蔗糖密度梯度上面,蔗糖梯度为 33%, 40%, 46%, 52%, 57%, 62% (W/W, 蒸馏水配制),  $4^{\circ}\text{C}$ , 25 000 r/min 离心 2 h 取各区间条带,加适量蒸馏水配成 25% 的蔗糖浓度, 25 000 r/min  $4^{\circ}\text{C}$ , 1 h 取各沉淀用 PBS 重悬,电镜观察。

## 2 结果与讨论

蔗糖密度梯度离心后,共发现有 3 条带,分别位于 40% 和 46% 之间、46% 和 52% 之间、57% 和 62% 之间。在 46% 和 52% 之间为一条奶白色的带,用注射器取出此带,经负染电镜观察发现, WSSV 密度较大,杂质少, WSSV 粒子有囊膜,形态完整(图 1)。取梯度 40% 和 46% 之间淡棕色的带电镜观察,病毒多无囊膜,多为核衣壳,且密度大,内有少量杂质; 57% 和 62% 之间的白色的带也含有 WSSV 粒子,密度较大,且多完整带囊膜,其中杂有杆状细菌。蔗糖梯度的其它条带未发现病毒。

本实验还用了被感染螯虾的血提取病毒,简单离心后,铺于不连续蔗糖密度梯度上,结果发现病毒带细,即病毒量较少。另外,实验中用了 0.01 mol/L PBS (pH 7.4), TNE 缓冲液,高渗缓冲液, 0.005 mol/L PBS 等缓冲液等研磨病料,提纯后负染电镜观察发现,病毒多破碎,不完整,多为核衣壳,有的病毒囊膜正在脱落。

用实验中建立的 WSSV 提取方法提取冰冻的患白斑病的中国对虾头胸部 (去除肝胰腺), 同样可以得到大量完整的病毒粒子 (图 2)。

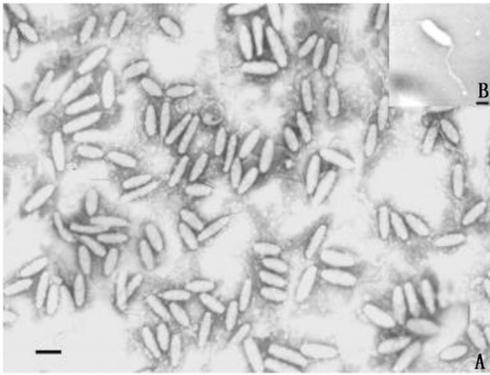


图 1 从被感染螯虾鳃中提取到的密度大、有囊膜、形态完整的 WSSV 粒子负染电镜照片

Fig 1 Electron micrograph of negatively stained WSSV showing intact virions purified from *Cambarus procladius*

A 微尺 = 200 nm B 微尺 = 100 nm

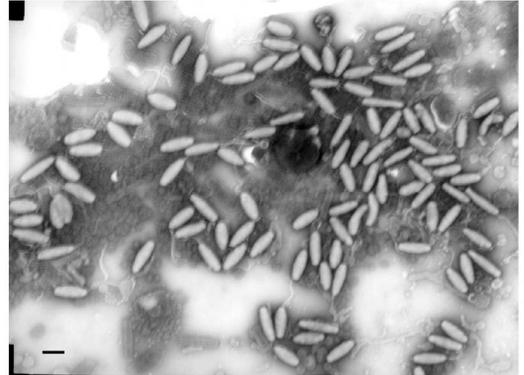


图 2 从冰冻的患白斑病的中国对虾鳃中提取到的密度大、有囊膜、形态完整的 WSSV 粒子负染电镜照片

Fig 2 Electron micrograph of negatively stained WSSV showing intact virions purified from gills of heavily infected *Fenneropenaeus chinensis*

微尺 = 200 nm

在 WSSV 研究中发现, 某些病毒实验要选用病毒密度大、纯度高、形态完整、有囊膜的病毒悬液。然而在提纯 WSSV 时, 经常发现提出的病毒囊膜破损、脱落, 甚至在电镜下完全看不到带囊膜的病毒粒子, 有时还发现杂质过多或病毒从中间断裂的情况, 不易得到完整的病毒粒子。国内外学者已有多种提纯 WSSV 的方法<sup>[7-10]</sup>, 都是以在密度梯度介质中的超速离心为基础。Yang 等<sup>[9]</sup>报道的核衣壳纯化技术避免了密度梯度纯化步骤, 但不适于完整病毒粒子的纯化。Huang 等<sup>[7]</sup>采用溴化钠密度梯度介质, 很好地分离纯化到了完整的病毒, 但这 2 种方法的缓冲系统比较复杂, 且加有剧毒的蛋白酶抑制剂苯乙基甲磺酰氯 (PMSF), 有一定的危害性。本文用蒸馏水配制的蔗糖作为离心介质, 并且经过摸索发现, 再用 25% 的蔗糖作为组织匀浆液, 能很好地保护病毒的囊膜不被降解, 获得了纯度较高的大量完整病毒粒子, 并在提取过程中发现, 匀浆时间不宜长, 以刚破碎细胞使病毒从细胞中释放较好。可能是由于 25% 的蔗糖溶液渗透压比较适合, 使病毒适量缩水, 但囊膜不致脱落。这种改良的方法简单, 无毒性成分的加入, 且经多次重复都得到了良好的效果。

由于病毒感染繁殖的短暂周期和病毒感染的不可预测性及其它随机性等原因, 因此从病虾组织中提取病毒, 仍然是研究对虾病毒的重要手段。有很多学者认为直接从患白斑综合征病毒病的对虾血液中提纯病毒能获得较完整较纯的病毒粒子<sup>[7-8]</sup>, Huang 等<sup>[7]</sup>从螯虾的血液中提取到了密度大而完整的病毒粒子, 但这些方法需要抽取新鲜的对虾血液, 受实验条件的限制, 不能随时获取病毒。本实验取被感染螯虾的鳃, 经过探索, 发现用 25% 的蔗糖作为匀浆液, 使用蔗糖密度梯度离心后, 出现明显的病毒粒子带, 病毒的收获量明显多于常用的从病虾血液中提取的病毒, 且病毒粒子的囊膜保持完整。利用本文改良的提取方法, 从冷冻的患病中国对虾头胸部 (除肝胰腺外) 中也提取到了完整并且密度较高的病毒粒子, 进一步证实了该提纯方法的可靠性。

## 参考文献:

- [1] Hossain M S, Chakraborty A, Joseph B. Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. *J. Aquaculture*, 2001, 198: 1-11.
- [2] Zhan W B, Wang Y H. White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China. *J. Aquat Anim Health*, 1998, 10(4): 405-410.
- [3] Sahul H A S. Studies on the pathogenicity of systemic ectoparasitic and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological

- methods J. *Aquaculture* 1998 160: 31–45
- [4] vanHulst M CW, Wittevekt J, Peters S et al. The white spot syndrome virus DNA genome sequence J. *Virology* 2001 286: 7–22
- [5] Lo C F, Leu J H, Ho C H et al. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction J. *Dis Aquat Org* 1996 25: 133–141.
- [6] Huang R, Xie Y, Zhang J et al. A novel envelope protein involved in white spot syndrome virus infection J. *J Gen Virol* 2005 86: 1357–1361.
- [7] Huang C H, Zhang R, Zhang J H. Purification and characterization of white spot syndrome virus (WSSV) produced in an alternate host crayfish *Cambarus clarkii* J. *Virus Research* 2001 76: 115–125
- [8] 解云礼, 张叔勇, 黄茹, 等. 一种改良的对虾白斑综合征病毒的提纯技术 [J]. *中国病毒学*, 2003 18(4): 391–393.
- [9] Yang F, Wang W, Chen R Z et al. A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus DNA J. *J Virol Methods* 1997 67: 1–4.
- [10] 汪岷, 包振民, 邵济钧, 等. 中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 的白斑综合征病毒 (WSSV) 的提纯和核酸提取 [J]. *青岛海洋大学学报*, 1999 29(3): 479–482