

利用聚乙二醇(PEG8000)纯化小球藻病毒 FJ-1^{*}

韩继刚^{1 2} 康 明^{1 2} 刘平芳¹ 王安利² 叶 寅^{1 * *} 田 波¹

(¹中国科学院微生物研究所 北京 100080) (²河北大学生命科学学院 保定 071002)

摘 要:为了提取小球藻病毒基因组 DNA,探索利用 3%~10%的 PEG8000 加 3%~7%的 NaCl 沉淀病毒。其中以 7%的 PEG 和 4%的 NaCl 沉淀效果最好,但其沉淀效率较低。

关键词 小球藻病毒 聚乙二醇 8000 纯化

中图分类号 S432.4 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2000)05-0556-58

小球藻病毒为真核藻类病毒,属 Phycodnaviridae 科,Phycodnavirus 属,模式株为 PBCV-1。它既有真核生物病毒的性质,同时又具有某些原核生物病毒的性质,所以从一定意义上说它是一类介于真核生物病毒与噬菌体之间的病毒,因而分类地位十分特殊。深入研究真核藻类病毒的性质,将有可能使人们对生物的进化有进一步的认识,同时,由于已知真核藻类病毒具有相当大的基因组,可预见其基因产物的数目和功能具有多样性,目前已对少数基因进行了克隆、基因表达及表达产物功能分析,如甲基化酶基因 M. CviBIII, M. CviRI, M. CviJI, M. CviBI 病毒外壳蛋白基因 Pvp54^[1]等。

深入研究小球藻病毒的分子生物学性质,首先要得到病毒基因组 DNA。因此有必要探索大量提纯病毒的快速简便途径。一般分离提纯小球藻病毒都是采用超速离心的方法^[2],由于非常烦琐,只适合病毒的少量分离提纯。1963 年 Hebert 就报道可以用 PEG 沉淀植物病毒^[3],而后 PEG 法逐渐成为纯化植物病毒的重要手段^[4]。因而用适当浓度的 PEG 纯化小球藻病毒是可能的。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 小球藻及小球藻病毒: 小球藻 NC64A 株系由 Van Etten 和夏远南博士(University of Nebraska)惠赠。小球藻病毒 FJ-1 由本室张远征博士分离自中国福建省。

1.1.2 培养基: MBBM 培养基是在 Bold's basal medium^[5]中加入 0.5%蔗糖和 0.1% Bacto-peptone。MBBM 软琼脂:在 MBBM 培养基中加入 0.7%琼脂。MBBM 琼脂:在 MBBM 培养基中加入 1.4%琼脂。

1.1.3 仪器: 超速离心机为 BECMEN80,高速离心机为 HITACHI CR22E。

* 由国家自然科学基金(39870016)和河北省攻关计划资助

* * 联系人

作者简介 韩继刚(1970—),男(汉族),河北省满城县人,河北大学生命科学学院讲师,主要从事植物分子生物学研究

收稿日期:1999-11-10,修回日期:2000-05-26 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.2 方法

1.2.1 小球藻 NC64A 株系的培养: 接种 NC64A 细胞于 MBBM 培养基中, 于 25℃ 连续光照、振荡 (120r/min) 培养至细胞浓度为 $1\sim 2\times 10^7$ 个/mL, 备用。

1.2.2 小球藻病毒 FJ-1 的纯化: 取单个病毒空斑接种于 2mL 寄主细胞, 连续光照摇动培养 48h, 扩大到 150mL 三角瓶中, 培养 72h。在 4℃, 5,000r/min 离心 5min, 取上清, 加 10% NP-40 至终浓度 1%。再加入不同浓度的 PEG8000 和 NaCl (见表 1), 每个浓度两个重复, 于 4℃ 过夜。经 4℃, 10,000r/min 离心 30min, 弃上清, 得粗病毒颗粒。用 50mmol/L Tris-HCl, pH7.8 重悬沉淀, 于 4℃, 34,000r/min, 离心 30min, 弃上清; 50mmol/L Tris-HCl, pH7.8, 重悬沉淀。再经 10%~40%

表 1 不同浓度 PEG8000 和 NaCl 的沉淀效果

No.	PEG8000/%	NaCl/%	PFU of the FJ-1* ($\times 10^9$ /mL)
1	3	3	2
2	5	3	30
3	7	3	3
4	10	3	4
5	3	4	15
6	5	4	13
7	7	4	90
8	10	4	50
9	3	5	33
10	5	5	36
11	7	5	55
12	10	5	79

注: 为高速离心后粗提病毒的滴度

(W/V) 蔗糖密度梯度离心 (24,000r/min 4℃, 40min), 吸取病毒带 (位于离心管 1/2~1/3 处的一条带淡蓝色荧光的乳白色条带), 50mmol/L Tris-HCl pH7.8 稀释。最后以 34,000r/min 4℃, 3h, 沉淀病毒颗粒。

1.2.3 病毒空斑的检测: 小球藻病毒 FJ-1 的空斑检测通过 Van Etten^[5] 和张远征等^[6] 的方法进行。

1.2.4 病毒形态的电镜观察: 参照田波等的方法^[4], 纯化病毒颗粒用 1% 醋酸双氧铀负染色, 用日立 H-500 电子显微镜观察。

1.2.5 纯化病毒的收率: 在纯化操作中的每一步骤, 取样, 测定其滴度, 并计算其收率。收率 (%) = 纯化操作后样品中总的病毒含量 (PFU) / 原始病毒裂解液中总的病毒含量 (PFU) $\times 100$

2 结果和讨论

在一定的离子强度下, PEG 可以使病毒沉淀, 颗粒较小的圆形病毒需要较高浓度的 PEG^[7]。PEG 的沉淀效果取决于病毒的特性、病毒浓度和溶液中盐的浓度。表 1 的结果证实了这一点。在 NaCl 一定的情况下, 随着 PEG 浓度的升高, 病毒沉淀的效果也越好。实验中发现, 随着 PEG 浓度的增高非病毒物质的沉淀也增加, 但这些非病毒物质的沉淀可在随后的洗涤过程中予以除去。沉淀的效率还与盐的浓度有关。实验表明在 PEG8000 为 7%、NaCl 为 4% 时, 对小球藻病毒 FJ-1 的沉淀效果最好。表 2 的数据表明, 虽然 PEG8000 可以有效的沉淀小球藻病毒, 但其沉淀的效率较低, 仅为 21%, 而采用超速离心的方法沉淀小球藻病毒效率较高, 可以达到 36%。但在一般要求下, 经高速离心后粗提的病毒完全可以满足提取其基因组 DNA 的要求, 此时 PEG 沉淀病毒的收率为 70%。因此, 利用 PEG8000 沉淀小球藻病毒以期提取其基因组 DNA, 仍可认为是一种较

为简捷的方法。

目前,从国内外分离到的小球藻病毒均为球形多角体结构,直径 125~200nm^[8]。其中 FJ-1 直径较小,为 120nm^[1]。电镜观察表明,用 PEG 方法分离提纯的病毒颗粒与用一般超速离心方法分离提纯的病毒颗粒在形态上没有明显的区别。

表 2 两种方法沉淀病毒的收率

纯化步骤	裂解液		滴度		总 PFU×10 ¹²		收率/%	
	体积/mL		/(PFU/mL)×10 ⁹		A	B	A	B
未处理裂解液	3000	3000	7.8	7.8	23	23	100	100
离心并加入 NP-40 后	3330	3330	5.9	5.9	19	19	83	83
加入 NaCl、PEG8000 并过夜	3696	—	.9	—	18	—	78	—
高速离心后	120	—	133	—	16	—	70	—
超速离心后	5	75	210	210	11	16	48	70
蔗糖密度梯度离心后	15	215	460	56	6.9	12	30	51
再次超速离心后	2	22	2500	380	4.9	8.3	21	36

注:A,PEG8000 沉淀的方法;B,超速离心的方法。

参 考 文 献

- [1] 张远征 樊卫国 李冬铃,等.微生物学报,1998,38(3):176~180.
- [2] Narva K E, W wndel D L, Skrdla M P *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1987, **15**: 9807~9823.
- [3] Hebert T T. *Phytopathology*, 1963, **53**: 362.
- [4] 田 波 裴美云.植物病毒研究方法.北京:科学出版社,1987. 165, 178~183, 194~207.
- [5] Van Etten J L, Burbank D E, Kuczmariski D *et al.* *Science*, 1982, **219**: 994~996.
- [6] 张远征 王苏燕 盛 刚,等.微生物学报,1996,36(1):67~68.
- [7] Yamamoto. *Virology*, 1970, **40**: 734~744.
- [8] Van Etten J L, Lane L C, Meints R H. *Microbiol Rev*, 1991, **55**: 586~620.

PERCIPITATION OF CHLORELLA VIRUS FJ-1 BY POLYETHYLENE GLYCOL(PEG8000)*

Han Jigang^{1,2} Kang Ming^{1,2} Liu Pingfang¹ Wang Anli² Yie Yin¹ Tien Po¹

(¹Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

(²College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002)

Abstract: Chlorella virus FJ-1 was isolated in Fujian Province of China. It can be percipitated by polyethylene glyco(PEG8000) and the best condition if 7% PEG8000 and 4% NaCl. But the percipitation efficiency of PEG8000 is lower than that of ultracentrifugation.

Key words: Chlorella virus, PEG8000, Purification

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39870016)