

中国小球藻病毒及其分子生物学性质*

张远征 樊卫国 李冬玲 叶寅** 田波

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 以小球藻 NC64A 株系为寄主,从 17 个省市采集的上百个水样中分离到了 11 个病毒分离物(BJ-1、BJ-2、BJ-3、BJ-4、FJ-1、FJ-2、NJ-1、HCJ-1、CDT-1、SCB-1、SCC-1)。这些病毒具有许多相同的性质,如均为球形多面体,基因组为 300kb 的 dsDNA。但它们的 DNA 限制性酶切图谱,碱基组成和蛋白组分等均有差异。FJ-1 的主要外壳蛋白的分子量小于 54 000,其它 10 个分离物则与 PBCV-1 一样,主要外壳蛋白的分子量为 54 000。Western blot 分析的结果显示,除 FJ-1 外其它病毒分离物与 PBCV-1 的抗血清有较强的免疫交叉反应。说明这些病毒与 PBCV-1 的同源性较高。在 11 个病毒分离物中,FJ-1 在蛋白组分、碱基组成等方面与其它分离物和 PBCV-1 差别较大。

关键词 小球藻病毒,小球藻 NC64A,分子生物学性质

分类号 Q939.4

小球藻病毒为真核藻类病毒,属 Phycodnaviridae 科,Phycodnavirus 属,模式株为 PBCV-1^[1]。该病毒为球形多面体结构,由蛋白质外壳包裹着病毒核酸。PBCV-1 由 21%~25% 的 DNA,64% 蛋白质,10% 的脂类组成。蛋白质在 50 种以上,其中分子量为 54 000 的主要外壳蛋白(Vp54 蛋白)的含量占病毒总蛋白量的 40% 以上。PBCV-1 的基因组为双链 DNA,长度为 330kb,编码上百种蛋白质^[2]。通过对 PBCV-1 的研究发现,作为一类真核藻类病毒它既具有真核病毒的性质,同时又具有某些原核生物的性质。所以小球藻病毒是一类分类地位较特殊的病毒,从一定意义上说它是一类介于真核病毒与噬菌体之间的病毒。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了解。

我们实验室从 1995 年分离出第一株小球藻病毒以来^[3],已经分离了 11 个小球藻病毒分离物,并对这些病毒进行了电镜观察、蛋白质组分分析、Western blot、核酸酶切图谱分析、甲基化碱基含量的测定等理化及分子生物学性质的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

小球藻 NC64A 细胞和小球藻病毒 PBCV-1 由 Van Etten 教授(University of Nebraska, Lincoln)惠赠。蛋白酶 K 购于 Boehringer Mannheim 公司。DNase I 购自 BRL 公司。限

*国家自然科学基金资助项目。

**联系人。

收稿日期:1997-02-20

制性内切酶和蛋白质高分子量标准混合物(40 000~212 000)均购于 Promega 公司和华美生物工程公司。

1.2 小球藻 NC64A 细胞培养和小球藻病毒的分离纯化

小球藻 NC64A 细胞的培养和小球藻病毒的分离纯化按照前报的方法进行^[3]。

1.3 小球藻病毒 DNA 限制性酶切图谱分析

1.3.1 病毒 DNA 的制备: 将病毒粗提物悬浮于 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 10 mmol/L MgCl₂ 中, 加入 10 μl DNase I (2 mg/ml), 37℃ 保温 1h。用 SDS-蛋白酶 K 法提取病毒 DNA^[4]。

1.3.2 病毒 DNA 限制性酶切图谱分析: 取 1 μg 病毒 DNA 于 20 μl 反应体积中按照相应的限制性内切酶反应条件消化病毒 DNA。在 TPE 缓冲体系 (80 mmol/L Tris-Phosphate, 8 mmol/L EDTA, pH 8.5) 中进行琼脂糖水平电泳^[5]。

1.4 PBCV-1 抗血清的制备

取经蔗糖密度梯度离心的纯 PBCV-1 颗粒, 加等体积费氏完全佐剂, 免疫注射家兔, 经四次注射后, 采集兔血, 制备抗血清。

1.5 病毒蛋白质的 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 分析

取 A_{260} 为 4 的粗提病毒 20 μl, 加等体积的上样缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl pH 6.8, 200 mmol/L DTT, 4% SDS, 0.2% 溴酚蓝, 20% 甘油), 100℃ 加热 5 min, 按 Bollag 等的方法^[6]进行 6%~18% 梯度 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色。病毒蛋白的 Western blot 分析按 Bollag 等的方法^[6]进行。

1.6 病毒 DNA 甲基化碱基含量的测定

病毒 DNA 经氯化铯-溴化乙锭梯度平衡离心法纯化^[7], 然后用氯氟酸处理 DNA, 于 180℃ 水解 20 min, 真空抽干, 再将水解产物溶于 0.02 mol/L (NH₄)₂HPO₄ (pH 2.3) 中, HPLC 分析^[8]。

2 结果

2.1 病毒的分离、纯化与形态观察

在北京、河北、河南、山东、山西、湖南、湖北、四川、江苏、福建、浙江、吉林、云南、贵州、广西、天津、黑龙江等地采集了上百份水样, 并从北京、江苏、福建、湖北和四川等地采集的水样中分离到了 11 个病毒分离物, 分别命名为 BJ-1、BJ-2、BJ-3、BJ-4、FJ-1、FJ-2、NJ-1、CDT-1、HCJ-1、SCB-1 和 SCC-1。这些病毒颗粒均为球形多面体形, 直径为 120~170 nm。

2.2 病毒 DNA 的限制性酶切图谱分析

分析病毒 DNA 的 BamHI、EcoRI、HindIII 和 Pst I 酶切图谱(图 1)可以看出, 11 个病毒分离物的酶切图谱均与 PBCV-1 的不同; 在 11 个病毒分离物中除 BJ-1 和 BJ-2 的四种酶切图谱均相同外, 其它病毒间均有差异。HindIII 不能切割 FJ-1、SCB-1、SCC-1、HCJ-1 的 DNA; PstI 不能切割 BJ-3、FJ-1、FJ-2、SCB-1 的 DNA, 表明这些病毒的相应酶切位点上存在着甲基化的碱基。通过病毒 DNA 酶切片段的大小推测, 每个病毒分离物的基因组大小为 300 kb 左右, FJ-1 的基因组明显小于 PBCV-1 的基因组。

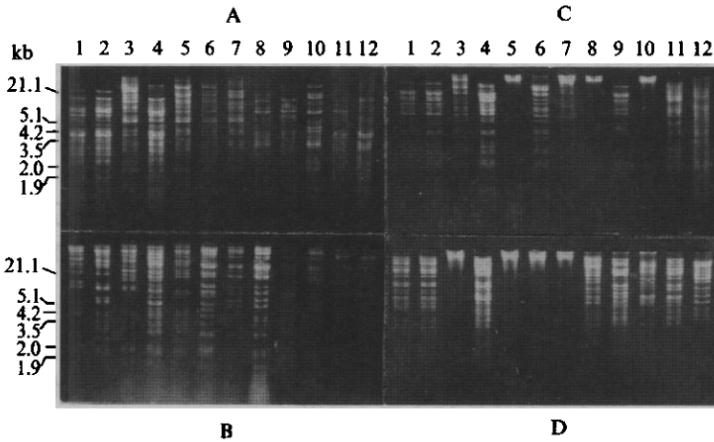


图1 小球藻病毒 DNA 的限制性酶切图谱

A. EcoRI; B. BamHI; C. HindIII; D. PstI. A, C, D: 1~12 泳道分别为病毒 BJ-1, BJ-2, BJ-3, BJ-4, FJ-1, FJ-2, SCB-1, SCC-1, CDT-1, HCJ-1, NJ-1 及 PBCV-1. B: 1~12 泳道分别为病毒 PBCV-1, NJ-1, HCJ-1, CDT-1, SCC-1, SCB-1, FJ-2, FJ-1, BJ-4, BJ-3, BJ-2 及 BJ-1.

Fig. 1 Electrophoresis of *Chlorella* virus DNAs after digestion with restriction endonucleases

A. EcoRI; B. BamHI; C. HindIII; D. PstI. The DNAs were isolated from viruses BJ-1, BJ-2, BJ-3, BJ-4, FJ-1, FJ-2, SCB-1, SCC-1, CDT-1, HCJ-1, NJ-1, and PBCV-1 (lanes 1 to 12, respectively). B. BamHI. Lanes: 1. PBCV-1; 2. NJ-1; 3. HCJ-1; 4. CDT-1; 5. SCC-1; 6. SCB-1; 7. FJ-2; 8. FJ-1; 9. BJ-4; 10. BJ-3; 11. BJ-2; 12. BJ-1.

表1 小球藻病毒基因组中甲基化碱基的含量

Table 1 Concentration of methylated bases in the genome of *Chlorella* virus

小球藻病毒 <i>Chlorella</i> virus	G+C%	甲基化碱基含量 Concentration of methylated bases	
		m ⁵ dC*	m ⁶ dA**
BJ-1	53.7	6.1	—
BJ-2	46.9	7.1	—
BJ-3	48.1	10.1	6.9
BJ-4	53.7	14.4	5.0
FJ-1	48.6	18.1	10.2
FJ-2	48.7	12.5	7.4
NJ-1	53.6	12.0	5.3
CDT-1	52.7	12.1	5.1
HCJ-1	47.7	10.9	1.8
SCB-1	48.3	11.3	7.3
SCC-1	49.3	12.5	5.9

* m⁵dC与C+m⁵dC的百分比。

** m⁶dA与A+m⁶dA的百分比。

2.3 病毒蛋白组分的比较及 Western blot 分析

病毒蛋白质 SDS-PAGE 电泳结果 (图版 I-A) 表明, 除 BJ-1 和 BJ-2 的蛋白组分基本相同外, 这些病毒分离物间均有差异。11 个病毒分离物均有一种蛋白质的含量较高, 该蛋白为病毒的主要外壳蛋白。FJ-1 的主要外壳蛋白的分子量明显小于 54 000, 其它 10 个病毒分离物的主要外壳蛋白的大小与 PBCV-1 的相同, 均为 54 000。Western blot 的分析结果表明 (图版 I-B), FJ-1 的蛋白基本上不能与 PBCV-1 的抗血清发生免疫交叉反应, 而其它 10 个病毒分离物的蛋白却与 PBCV-1 的抗体具有较高的免疫亲和性。

2.4 病毒 DNA 甲基化碱基含量的测定

由于有些限制性内切酶不能消化某些病毒分离物的 DNA, 表明在这些病毒的 DNA 中存在有被修饰的碱基。因此, 对 11 个病毒分离物 DNA 的碱基组成进行了分析。结果表明(表 1), 11 个病毒分离物 DNA 中均含有 m^5dC , 含量从 6.1%~18.1% 不等; 除 BJ-1、BJ-2 外其它 9 个病毒分离物 DNA 中均含有 m^6dA , 含量从 1.8%~10.2% 不等。11 个病毒分离物 DNA 的 G + C% 含量为 46.9%~53.7%。

3 讨论

我们将采集的水样按采样的地点和时间不同进行了分类。按采集的地点不同分为(1)江河、湖泊; (2)有机质丰富的自然小水体; (3)山泉水。按采集的时间不同分为 3 个时间段, 第一段: 2~4 月; 第二段: 5~9 月; 第三段: 10~12 月。从分离结果看, 小球藻病毒多存在于有机质丰富的水体中, 而在山泉等无污染的水体中, 因为浮游生物稀少, 检测不到小球藻病毒。所以, 小球藻病毒的有无及数量的多少可作为监视水体污染程度的一个指标。另外, 水样采集的时间不同, 小球藻病毒的数量也有显著差异。在温暖季节采集的水样中, 小球藻病毒大量存在, 而在寒冷季节采集的水样中, 检测不到小球藻病毒。

我们从 17 个省市采集了上百个水样, 从北京、江苏、福建、湖北和四川等地采集的水样中分离到了 11 个病毒分离物。从分离结果看, 我国小球藻病毒资源丰富, 分布较广泛。BJ-1 与 BJ-2 是根据空斑的大小不同从同一个水样中分离到的, 二者的四种酶切图谱和蛋白组分基本相同, 但基因组甲基化碱基含量和 G + C mol% 不同, 所以有待进一步确证是否为同一株病毒。实验中发现, 来源于单个空斑的病毒经四次纯化后, 子代病毒形成的空斑大小仍有差别。所以, 根据空斑大小不能判断病毒的种类。这一点和以前的报道^[4]不同。

由于这些病毒分离物具有相同的寄主, 病毒的形态相同, 且均含有一巨大的双链 DNA (dsDNA) 基因组, 所以应属于同一组病毒。但是, 由于这些病毒间存在着许多差异, 如病毒颗粒的大小不同, 基因组 DNA 限制性酶切图谱不相同(除 BJ-1 和 BJ-2 相同外), 蛋白组分不同和甲基化碱基含量不同, 所以, 这些病毒应属于同一组病毒中不同的病毒株。值得注意的是, 尽管 PBCV-1 是从美国分离到的病毒, 我们分离到的 11 个病毒分离物中的 10 个(除 FJ-1 外)仍与 PBCV-1 的抗血清具有较强的免疫交叉反应, 表明这些病毒与 PBCV-1 有较近的亲缘关系。这说明病毒亲缘关系的远近并不受地理位置的影响。

在 11 个病毒分离物中, FJ-1 是较特殊的病毒, 它的外壳蛋白明显小于其它病毒, 与 PBCV-1 的抗血清基本上没有免疫交叉反应; 它的甲基化碱基含量在 11 个病毒分离物中最高。以 PBCV-1 外壳蛋白基因为探针进行的 Southern blot 的结果表明, FJ-1 的外壳蛋白基因位于 BamHI 酶切图谱的第十条带上。而 PBCV-1 的位于第四条带上。我们已经克隆了该基因, 并对其结构进行了研究(另文发表)。

参 考 文 献

- [1] van Etten J L, Ghabrial S A. *Arch Virol Suppl*, 1991, 2: 137~139.
- [2] van Etten J L, Lane L C, Meints R H. *Microbiol Rev*, 1991, 55: 586~620.
- [3] 张远征, 王苏燕, 叶 寅, 等. *微生物学报*, 1996, 36(1): 67~68.

- [4] Yama T, Higashiyama T, Fukuda T. *Appl and Environ Microbiol*, 1991, 157: 3433~3437.
- [5] Girton L E, van Etten J L. *Plant Molecular Biology*, 1987, 9: 247~257.
- [6] Bollag D M, Edelman S J. *Protein Methods*. New York: Wiley-Liss Publications Inc, 1991.
- [7] Sambrook J, Maniatis T, Fritsch E F. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: USA Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] 何忠效, 薛继艳, 吴国利. *实验生物学报*, 1989, 22(4): 417~421.

CHINESE *CHLORELLA* VIRUSES AND THEIR MOLECULAR BIOLOGICAL PROPERTIES

Zhang Yuanzheng Fan Weiguo Li Dongling Yie Yin Tian Bo*

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

Abstract An extensive survey for *Chlorella* viruses revealed that *Chlorella* viruses are widely distributed over China. Eleven isolates of *Chlorella* viruses have been isolated, which lysis the *Chlorella* viruses sp. (strain NC64A). These isolates were named BJ-1, BJ-2, BJ-3, BJ-4, FJ-1, FJ-2, NJ-1, CDT-1, H CJ-1, SCB-1 and SCC-1 respectively. They have several common properties, including polyhedral morphology, and linear dsDNA genomes. However, the restriction patterns of viral DNA, the concentration of m⁵dC and m⁶dA in viral DNA, and the composition of viral structure protein are different among these isolates. All of viral major capsid proteins are 54 000 except FJ-1, whose major capsid protein is smaller than 54 000. Western blot analysis showed strong immunological cross reaction among all of viral proteins with PBCV-1's antiserum except FJ-1. It indicates that the homology between these isolates and PBCV-1 is high. Among these isolates, FJ-1 has some special properties.

Key words *Chlorella* viruses, *Chlorella* sp. NC64A, Molecular biological properties

图版说明

小球藻病毒蛋白组分的 SDS-PAGE电泳和蛋白质免疫印迹分析: A. 病毒结构蛋白的 SDS-PAGE电泳。1~12 分别为病毒 PBCV-1, FJ-1, FJ-2, CDT-1, SCC-1, SCB-1, NJ-1, H CJ-1, BJ-4, BJ-3, BJ-2, BJ-1 的蛋白组分; B. 蛋白质免疫印迹分析。1~12 分别为病毒 PBCV-1, CDT-1, FJ-1, FJ-2, SCC-1, SCB-1, NJ-1, H CJ-1, BJ-4, BJ-3, BJ-2, BJ-1 的结构蛋白。

SDS-PAGE of the chlorella virus structural proteins and Western blot analysis. A. The proteins were isolated from viruses PBCV-1, FJ-1, FJ-2, CDT-1, SCC-1, SCB-1, NJ-1, H CJ-1, BJ-4, BJ-3, BJ-2 and BJ-1 (lanes 1 to 12, respectively). M. High-range Protein Molecular Weight Marker; B. Western blot analysis. Lanes: 1. PBCV-1; 2. CDT-1; 3. FJ-1; 4. FJ-2; 5. SCC-1; 6. SCB-1; 7. NJ-1; 8. H CJ-1; 9. BJ-4; 10. BJ-3; 11. BJ-2; 12. BJ-1.

* Tian Bo: Po Tien