

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00509

## 病毒铺膜印迹技术分离牙鲆鳃细胞上的淋巴囊肿病毒结合蛋白

汪沐, 绳秀珍, 战文斌

中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003

**摘要:** 利用非变性电泳与病毒铺膜印迹技术(VOPBA)分离了牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)鳃细胞(FG)上淋巴囊肿病毒结合蛋白, 结果显示在 FG 细胞膜上有分子量为 135 kD 的蛋白与淋巴囊肿病毒特异结合; 对该蛋白切胶回收后进行 SDS-PAGE 与双向电泳, 发现 135 kD 蛋白由 3 个蛋白组成, 分子量分别为 58.3 kD、44.6 kD 及 37.6 kD; 135 kD 蛋白 SDS-PAGE 的 VOPBA 显示, 仅出现 37.6 kD 的蛋白带, 而 58.3 kD、44.6 kD 蛋白皆不与淋巴囊肿病毒结合。结果表明牙鲆 FG 细胞上 135 kD 蛋白是淋巴囊肿病毒的结合蛋白, 其 37.6 kD 蛋白具有病毒结合活性。

**关键词:** 非变性电泳; 病毒铺膜印迹技术; 病毒结合蛋白; 淋巴囊肿病毒

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)03-0509-05

淋巴囊肿病毒(lymphocystis disease virus, LCDV)属于虹彩病毒科(Iridoviridae)、淋巴囊肿病毒属(Lymphocystivirus), 可引起 140 多种海、淡水鱼的淋巴囊肿病, 尤其在中国养殖的牙鲆中大量爆发, 造成严重的经济损失<sup>[1-3]</sup>。近年来, 各国学者对该病的研究主要集中在流行病学、病理学、分子生物学及快速诊断等方面, 并取得一定进展<sup>[4-8]</sup>。但是, 在对淋巴囊肿病毒的受体及病毒的侵入机制方面, 除了本实验室的相关研究工作外<sup>[9-10]</sup>, 国内外尚未见报道。

病毒对靶细胞的入侵是由位于细胞表面的受体分子介导的<sup>[11]</sup>, 因此研究病毒受体的特性及其功能, 对于从分子水平阐明病毒感染与免疫的机制, 深刻理解病毒与宿主细胞的相互关系, 研制更有效的病毒疫苗、抗病毒药物和诊断试剂等, 都具有重要的实践与理论意义。由于病毒受体绝大多数是蛋白质, 几乎所有研究蛋白质相互作用的方法都可以用于病毒受体的研究。目前鉴定病毒受体蛋白多采用病毒铺膜印迹技术(VOPBA)、

免疫共沉淀技术、噬菌体表面呈现技术、酵母双杂交技术及 GST 亲和层析等<sup>[12-16]</sup>。其中病毒铺膜印迹技术是在 Western 印迹技术的基础上, 将与印迹于 PVDF 膜上的宿主细胞蛋白结合的病毒显示出来, 从而鉴定在细胞或者组织蛋白中与病毒特异结合的受体蛋白成分<sup>[17]</sup>。但是此方法鉴定受体蛋白的局限在于必须保证受体蛋白在变性剂的作用下不失去结合病毒的能力。因此, 本研究采用非变性电泳(Native-PAGE)加 VOPBA 的方法, 对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)鳃细胞(FG)上的 LCDV 结合蛋白进行分离与初步鉴定, 以确保可能的受体蛋白具有完全的生物学活性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂与材料

乙基苯基聚乙二醇(Nonidet P-40, NP-40)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、抑肽酶(Aprotinin)、亮抑酶肽(Leupetin)购自 Amersco 公司; 氯化硝基四氮唑蓝(NBT, nitroblue tetrazolium)、5-溴 4-氯-3-吲哚-

收稿日期: 2011-09-27; 修订日期: 2011-11-27.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31072232, 31172429).

作者简介: 汪沐(1987-), 女, 博士, 主要从事水生动物分子病毒学与免疫学研究. E-mail: qdwm08@163.com

通信作者: 绳秀珍, 副教授. Tel: 0532-82032284; E-mail: xzsheng@ouc.edu.cn

磷酸(BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate)以及碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗小鼠 IgG 抗体均购自 Sigma 公司。

抗牙鲈 LCDV 单克隆抗体与 LCDV 由本实验室制备<sup>[18]</sup>。

### 1.2 FG 细胞膜蛋白的提取

利用 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶培养牙鲈鳃细胞(FG)<sup>[19]</sup>。将 FG 细胞用 PBS 清洗 2 遍, 用预冷的细胞刮将贴壁生长的细胞从底面刮离, PBS 液重悬, 500 g 4℃离心 10 min; FG 细胞沉淀用 4℃预冷的 NP-40 细胞裂解液(250 mmol/L 蔗糖, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 137 mmol/L NaCl, 10% 甘油, 1% NP-40, 及各种蛋白酶抑制剂: 1 mmol/L PMSF, 2 mmol/L EDTA, 10 mmol/L NaF, 2 μg/mL Aprotinin 和 5 μg/mL Leupetin)重悬, 超声波冰浴破碎, 设定时间为 3 min, 其中 2 s 开, 6 s 关, 39%的振幅; 破碎后的细胞悬液经 1 000 g 4℃离心 10 min, 去除细胞碎片和细胞核; 将上清稀释 4 倍, 10 000g 4℃离心 10 min 去除溶酶体和线粒体; 取上清于 100 000 g 4℃离心 20 min, 沉淀用 PBS 重悬, 为提取的 FG 细胞膜蛋白。Bradford 法测定样品的蛋白质浓度。

### 1.3 非变性电泳与病毒铺膜印迹技术(VOPBA)

凝胶制备: 分离胶与浓缩胶浓度由预实验确定, 凝胶单体储液为 29.2%丙烯酰胺+0.8%甲叉双丙烯酰胺; 分离胶浓度为 10%, 以 pH8.8 的 1.5 mol/L Tris-HCl 溶液为缓冲液; 浓缩胶浓度 5%, 以 pH6.8 的 0.5 mol/L Tris-HCl 溶液为缓冲液。

上样: 每个泳道 10 μL, 其中 FG 膜蛋白与 5×样品缓冲液(pH6.8 的 0.5 mol/L Tris-HCl, 50%甘油, 1%溴酚蓝, H<sub>2</sub>O)比例为 4:1。

电泳: 70 V 恒压电泳至溴酚蓝进入分离胶界面, 将电压调为 110 V, 至溴酚蓝迁移至距凝胶下沿 2 mm 时结束电泳, 实验在 4℃下进行。一半的胶用考马斯亮蓝 R-250 染色。

VOPBA: 另一半胶转移至 PVDF 膜; 将 PVDF 膜置于 3%脱脂奶粉中, 4℃封闭过夜; 次日将膜用 PBST (含 0.05% TWEEN-20)洗涤 3 次, 每次 5 min, 然后置于提纯的牙鲈 LCDV(1:100)中,

22℃孵育 4 h; PBS 代替牙鲈 LCDV 作为阴性对照。将 PVDF 膜用 PBST 洗 3 次, 每次 5 min, 放入抗牙鲈 LCDV 单抗中, 37℃ 孵育 1 h; PBST 洗 3 次后, 将 PVDF 膜放入 AP 酶标记的羊抗鼠 IgG (1:30 000)中 37℃ 孵育 50 min; PBST 洗 3 次后, 将 PVDF 膜浸入 NBT-BCIP 显色底物中发色 10~30 min, 直到颜色清晰为止, 放入蒸馏水中终止反应, 取出膜室温晾干后拍照。

### 1.4 蛋白回收与变性 VOPBA

蛋白的非变性电泳结束后, 切取左右两条泳道进行考马斯亮蓝快速染色, 然后比对切胶, 切下的胶条装入洗脱玻璃管中(电洗脱仪 Model 422, Bio-Rad), 加入洗脱缓冲液(50 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 加蒸馏水至 1 L), 按 10 mA/管设置以恒流电流洗脱过夜; 洗脱完毕后, 从回收室中将样品吸出, 再加入适当体积的洗脱缓冲液将回收室清洗 1 遍, 洗涤液同回收液合并, 三蒸水透析过夜; 将透析后的蛋白样品用冷冻干燥机冻干浓缩至适当体积; Bradford 法测样品的蛋白质含量。将一部分样品进行 Native-PAGE, 凝胶用考马斯亮蓝染色后拍照; 另一部分样品 SDS-PAGE 后转至 PVDF 膜, 按 1.3 所述方法进行 VOPBA 试验。

### 1.5 双向电泳

根据 Amersham 公司的双向电泳实验手册<sup>[20]</sup>对 1.4 中回收的蛋白进行双向电泳分析, IPG 胶条的水化和聚焦在 20℃自动进行, 共需 16.5 h, 其中于 30 V 低电压水化 12 h, 再经过 500 V 30 min、1 000 V 30 min、5 000 V 90 min, 最后稳定在 8 000 V 进行 2 h 的等电聚焦。等电聚焦结束后, 将胶条进行两步平衡, 然后将平衡后的胶条移至 1 mm 厚的 12.5%均匀分离胶的上端, 使用 IEF 上样滤纸片加入分子量标准蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。电泳所得到的 2-DE 胶按双向电泳实验手册介绍的银染方法进行染色。

## 2 结果与分析

### 2.1 非变性电泳与 VOPBA 确定 LCDV 在 FG 细胞上的结合蛋白

FG 细胞膜蛋白(蛋白质质量浓度为 0.6 mg/mL)的

非变性电泳图谱显示,膜蛋白种类不多,其分子量主要集中在 60~600 kD 之间;VOPBA 结果显示,LCDV 可单一结合 1 条分子量为 135 kD 的蛋白带,此蛋白应为 LCDV 在 FG 细胞上的结合蛋白(图 1)。

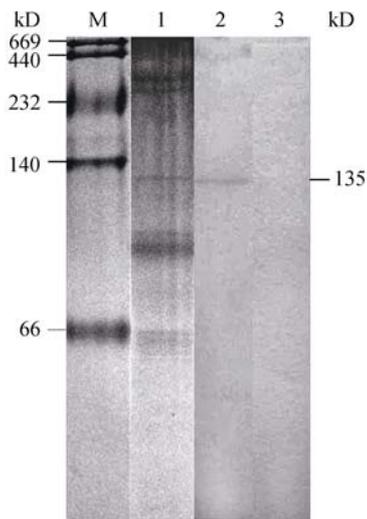


图 1 FG 细胞膜蛋白的非变性电泳与 VOPBA 结果

M: 非变性蛋白分子量标准; 1: FG 细胞膜蛋白的非变性电泳结果; 2: FG 细胞膜蛋白的非变性 VOPBA 结果; 3: 阴性对照。  
Fig. 1 Native-PAGE and VOPBA results of FG cell membrane proteins

Lane M: marker; Lane 1: native-PAGE results of FG cell membrane proteins; Lane 2: native-VOPBA results of FG cell membrane proteins; Lane 3: negative control of native-VOPBA.

## 2.2 135 kD 蛋白的特性分析

将 135 kD 蛋白切胶回收后进行 Native-PAGE, 结果显示仅有 1 条 135 kD 蛋白带, 其蛋白浓度为 0.5 mg/mL(图 2A)。然后进行 2-DE 电泳, 结果发现 135 kD 蛋白由 3 个单一多肽组成, 多肽 1 的分子量为 37.6 kD, 等电点为 6.0 左右; 多肽 2 的分子量为 58.3 kD, 等电点为 5.5 左右; 多肽 3 的分子量为 44.6 kD, 等电点为 4.0 左右(图 3)。将 135 kD 蛋白变性后进行 VOPBA 试验, 显示 LCDV 仅可结合分子量为 37.6 kD 的多肽链, 而与 58.3 kD 和 44.6 kD 的多肽链不结合(图 2B)。

## 3 讨论

传统的 VOPBA 方法已被成功应用于多种病毒受体蛋白的分离<sup>[12,21]</sup>。采用 VOPBA 法的前提条件是受体活性由单一多肽决定, 而不需要其他

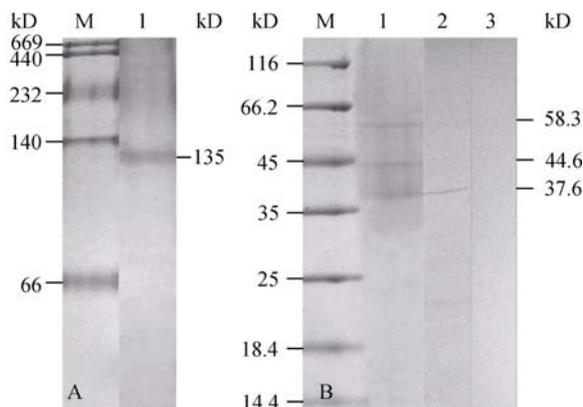


图 2 135 kD 蛋白的 Native-PAGE 与变性 VOPBA 结果  
A. Native-PAGE. M: 非变性蛋白分子量标准; 1: 提纯的 FG 细胞 135 kD 蛋白. B. SDS-PAGE 与 VOPBA. M: 变性蛋白分子量标准; 1: 135 kD 蛋白的 SDS-PAGE 结果; 2: VOPBA 结果显示仅出现 1 条 37.6 kD 病毒结合蛋白; 3: 阴性对照。

Fig. 2 Native-PAGE and VOPBA results of 135 kD protein  
A. Native-PAGE. Lane M: marker of native-PAGE; Lane 1: purified 135 kD protein; B. SDS-PAGE and VOPBA. Lane M: marker of SDS-PAGE; Lane 1: SDS-PAGE results of 135 kD protein; Lane 2: VOPBA results showing only one protein at a molecular mass of 37.6 kD can bind LCDV; Lane 3: negative control of VOPBA.

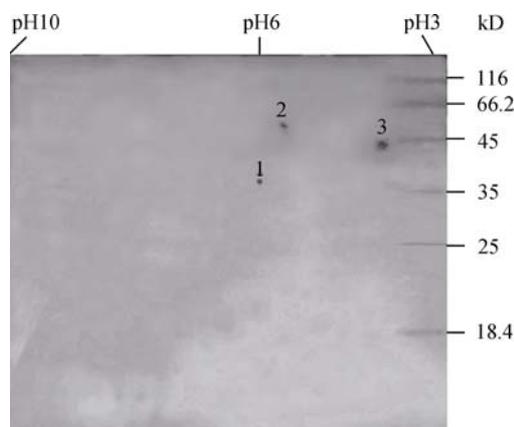


图 3 135 kD 蛋白的双向电泳图谱

1: 分子量 37.6 kD, 等电点 6.0; 2: 分子量 58.3 kD, 等电点 5.5; 3: 分子量 44.6 kD, 等电点 4.0。

Fig. 3 Two dimensional electrophoretic map of 135 kD protein  
1: 37.6 kD, pH6.0; 2: 58.3 kD, pH5.5; 3: 44.6 kD, pH4.0.

蛋白的辅助, 且该多肽经过变性剂的处理后不会丧失活性<sup>[22]</sup>。本研究创新性地采用非变性电泳与 VOPBA 相结合的方法进行 LCDV 结合蛋白的分离, 克服了传统 VOPBA 的缺陷, 保证了蛋白质天然构象的完整性, 分离出了 135 kD 病毒结合蛋白。为了进一步确定 135 kD 蛋白中起 LCDV 结

合功能的多肽,本研究对 135 kD 蛋白变性处理后进行 VOPBA,发现其中 37.6 kD 蛋白能够与 LCDV 结合,说明 37.6 kD 蛋白变性后不会失去结合活性,且 LCDV 结合活性不依赖其他蛋白。

进行非变性 VOPBA 的难点在于跑好非变性电泳。王向东<sup>[23]</sup>曾采用提取的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)鳃细胞膜进行非变性电泳,但分离效果不好,推测是由于细胞膜蛋白与细胞膜结合紧密,同时“三明治”式的细胞膜结构紧密有序,不容易破坏。因此,本研究在提取 FG 细胞膜蛋白时加入非离子去垢剂 NP-40,破坏细胞膜,便于膜蛋白溶脱下来。另外结合差速离心技术,根据沉降系数不同分步离心沉淀细胞内含物,包括细胞核、溶酶体、线粒体等,最后通过超速离心沉淀获得了 FG 细胞膜蛋白。

本研究通过非变性 VOPBA 方法鉴定出 LCDV 在 FG 细胞上的结合蛋白分子量为 135 kD,该蛋白的变性电泳与双向电泳显示其由 58.3 kD、44.6 kD 及 37.6 kD 3 个多肽组成,其中 37.6 kD 多肽显出病毒结合活性,58.3 kD 与 44.6 kD 多肽不与 LCDV 结合。因此,在 135 kD 蛋白中具有病毒结合功能的为 37.6 kD 多肽,而 58.3 kD 与 44.6 kD 可能仅具有结构功能。刁菁等<sup>[9]</sup>运用 VOPBA 技术在牙鲆鳃组织上同样鉴定出 37.6 kD 病毒结合蛋白,因此 37.6 kD 蛋白很可能是 LCDV 的受体蛋白。另外,笔者曾利用免疫共沉淀方法在 FG 细胞上鉴定出分子量为 27.8 kD 的 LCDV 结合蛋白<sup>[10]</sup>。不同方法在同种宿主的不同或相同组织细胞上鉴定出不同的 LCDV 结合蛋白,其原因一方面可能是病毒具有多个受体,分布在同一宿主细胞表面,病毒通过不同的受体通道侵染细胞<sup>[21]</sup>;另一方面则可能是由于所使用的鉴定方法不同,如利用 VOPBA 方法鉴定登革 2 型病毒在 C6/36 细胞上的受体分子量分别为 80 kD 和 76 kD,而利用免疫共沉淀方法鉴定的该病毒在相同细胞上的受体分子量为 35 kD<sup>[24-25]</sup>。至于 FG 细胞上 27.8 kD 和 37.6 kD 两种 LCDV 结合蛋白之间的关系,尚需进一步研究确定。本研究结果可为 LCDV 受体蛋白的研究提供基础资料。

#### 参考文献:

- [1] 孙修勤,洪旭光,张进兴,等. 牙鲆淋巴囊肿病毒在牙鲆鳃细胞系 FG-9307 中的增殖[J]. 高技术通讯, 2002, 12: 94-96.
- [2] Zhang Q Y, Ruan H M, Li Z Q, et al. Infection and propagation of lymphocystis disease virus isolated from the cultured flounder *Paralichthys olivaceus* in grass carp cell lines [J]. Dis Aquat Org, 2003, 57(1): 27-34.
- [3] Tidona C A, Darai G. Encyclopedia virology [M]. New York: Academic Press, 1999: 908-911.
- [4] Alborali L, Patemello P, Lavazza A, et al. An outbreak of lymphocystis in *Diplodus puntazzo*[J]. Bollettino societá Italiana di Patologia Ittica, 1996, 8(20): 2-7.
- [5] Tidona C A, Darai G. The complete DNA sequence of lymphocystis disease [J]. Virology, 1997, 230: 207-216.
- [6] Sheng X Z, Zhan W B. Occurrence, development and histochemical characteristics of lymphocystis in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. High Technol Lett, 2004, 70(2): 92-96.
- [7] 绳秀珍, 战文斌. 鱼类淋巴囊肿病毒靶器官的组织病理研究[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版, 2006, 36(5): 749-753.
- [8] Cano I, Ferro P, Alonso M C, et al. Development of molecular techniques for detection of lymphocystis disease virus in different marine fish species [J]. J Appl Microbiol, 2007, 102(1): 32-40.
- [9] 刁菁, 战文斌, 绳秀珍. 牙鲆淋巴囊肿病毒靶器官上病毒结合蛋白的鉴定[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(5): 913-918.
- [10] Wang M, Sheng X Z, Xing J, et al. Identification of a 27.8 kD protein from flounder gill cells involved in lymphocystis disease virus binding and infection [J]. Dis Aquat Organ, 2011, 94: 9-16.
- [11] Rajcáni J. Molecular mechanisms of virus spread and virion components as tools of virulence [J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 2003, 50(4): 407-431.
- [12] Salas-Benito J S, Del-Angel R M. Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind Dengue type 4 virus [J]. J Virol, 1997, 71(10): 7246-7252.
- [13] Li W H, Moore M J, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for SARS coronavirus [J]. Nature, 2003, 426 (6965): 450-454.
- [14] Hong S S, Karayan L, Tournier J, et al. Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I  $\alpha 2$  domain at the surface of

- human epithelial and B lymphoblastoid cells [J]. *EMBO J*, 1997, 16(9): 2294–2306.
- [15] Li L Y, Liu X, Zhang P, et al. Cloning and identification of measles virus receptor gene from marmoset cells [J]. *Chin Sci Bull*, 2002, 47 (20): 1679–1687.
- [16] Ryu C J, Cho D Y, Gripon P, et al. An 80-kilodalton protein that binds to the Pre-S1 domain of hepatitis B virus [J]. *J Virol*, 2000, 74 (1): 110–116.
- [17] Horton H M, Burand J P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion [J]. *J Virol*, 1993, 67(4): 1860–1868.
- [18] Cheng S F, Zhan W B, Xing J, et al. Development and characterization of monoclonal antibody to the lymphocystis disease virus of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* isolated from China [J]. *J Virol Methods*, 2006, 135: 173–180.
- [19] Tong S L, Li H, Miao H Z, et al. The establishment and partial characterization of a continuous fish cell line Fg-9307 from the gill of flounder *paralichthys olivaceus* [J]. *Aquaculture*, 1997, 156: 327–333.
- [20] Berkelman T, Stenstedt T. 2D electrophoresis using immobilized pH gradients principles and methods [M]. Sweden: Amersham Pharmacia Biotech, 1998: 1–47
- [21] Schneider-Schaulies J. Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 1413–1429.
- [22] 独军政, 常惠芸, 高闪电, 等. 病毒受体及其研究方法进展[J]. *生物技术通讯*, 2007(5): 856–858.
- [23] 王向东. 对虾白斑综合症病毒(WSSV)细胞膜受体及高分子量蛋白的初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004. 35–41.
- [24] Muñoz M L, Cisneros A, Cruz J, et al. Putative dengue virus receptors from mosquito cells [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 168: 251–258.
- [25] 刘美德, 赵彤言, 董言德, 等. C6/36 细胞上登革 2 型病毒受体的免疫共沉淀[J]. *中国病毒学*, 2004, 19(3): 217–219.

## Isolation of lymphocystis disease virus binding proteins in *Paralichthys olivaceus* gill cells by virus overlay protein binding assay

WANG Mu, SHENG Xiuzhen, ZHAN Wenbin

Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

**Abstract:** We used native-PAGE and virus overlay protein binding assay (VOPBA) to identify binding proteins for lymphocystis disease virus in flounder(*Paralichthys olivaceus*) gill cells(FG). We isolated a 135 kD putative LCDV binding protein molecule. SDS-PAGE and two-dimensional (2-D) gel electrophoresis analysis of this molecule indicated it consisted of three proteins with molecular weights of 58.3 kD, 44.6 kD, and 37.6 kD, of which only the 37.6 kD polypeptide was able to bind to LCDV.

**Key words:** Native-PAGE; virus overlay protein binding assay (VOPBA); virus binding protein; lymphocystis disease virus (LCDV)

**Corresponding author:** SHENG Xiuzhen. Tel: +86 532-82032284; E-mail: xzsheng@ouc.edu.cn