

刘宇卓, 刘 飞, 李 银, 等. 鹅细小病毒 LH 株的纯化及其生物学特性[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5): 156–158.

# 鹅细小病毒 LH 株的纯化及其生物学特性

刘宇卓<sup>1</sup>, 刘 飞<sup>2</sup>, 李 银<sup>1</sup>, 黄欣梅<sup>1</sup>, 赵冬敏<sup>1</sup>, 韩凯凯<sup>1</sup>

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014;

2. 南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095)

**摘要:** 取鹅细小病毒(GPV) LH 株毒液, 通过氯仿去除杂蛋白, 用氯化钠与聚乙二醇-6000 相结合方法粗提后, 经蔗糖密度梯度离心纯化。通过 PCR 方法对不同浓度蔗糖溶液进行检测, 取纯化毒液进行蛋白电泳及电镜观察, 并无菌接种 12 日龄鹅胚, 对死亡胚尿囊液进行 PCR 鉴定。试验结果显示: 浓缩纯化后的 GPV 主要分布在 50%~65% 蔗糖浓度区间, 病毒的蛋白含量为 216  $\mu\text{g/L}$ ; 电镜观察结果表明, 病毒粒子分为实心 and 空心 2 种, 直径大小在 20~22 nm; 经 SDS-PAGE 电泳可看到多个条带, 主要蛋白大小与病毒蛋白 VP1、VP2 和 VP3 相对应。纯化后的病毒接种敏感鹅胚仍可致其 100% 死亡, 死亡胚具有特征性的病变, 尿囊液经 PCR 鉴定, 呈 GPV 核酸阳性。本试验所用方法获得的纯化 GPV 病毒液的纯度高且保持了该病毒的毒力特性, 是一种方便可行的纯化该病毒的方法。

**关键词:** 鹅细小病毒; 蔗糖密度梯度; 纯化; 生物学特性

**中图分类号:** S852.65 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)05-0156-02

鹅细小病毒(goose parvovirus, GPV)是一种引起雏鹅的急性或亚急性、败血性传染病的病原<sup>[1]</sup>。鹅细小病毒感染是 1956 年由我国学者方定一发现, 后世界各国相继有发病报道, 又称 Derzsy 病、鹅流感、鹅或小鹅瘟、鹅肠炎等<sup>[2-3]</sup>。本病主要临床特征为: 病鹅精神萎靡, 严重下痢, 食欲废绝, 腿麻痹或瘫痪。主要病理学特征为: 小肠出现卡他性、纤维素性、坏死性、渗出性肠炎, 形成特征性的肠内栓塞。GPV 主要侵害 4~20 日龄的雏鹅, 特别是 10 日龄内的雏鹅更为易感, 发病率和死亡率可高达 95%~100%, 是一种严重威胁养鹅业健康发展的传染病<sup>[1-2]</sup>。

笔者所在实验室从发病死亡鹅病料中分离到 1 株 GPV 病毒, 通过琼脂扩散试验、易感雏鹅攻毒试验及 PCR 试验, 证明所分离病毒株为鹅细小病毒<sup>[4]</sup>。本试验将分离毒株处理后经蔗糖密度梯度离心纯化, 采用 PCR 方法及电镜观察对纯化后的病毒进行鉴定, 并对其生物学特性进行研究, 为进一步的研究工作打下基础。

## 1 材料与与方法

### 1.1 供试材料

鹅胚购自安徽及常州鹅孵坊。鹅细小病毒 LH 株, 由笔者所在实验室分离、鉴定并保存。主要试剂包括: DNA 抽提试剂盒、Ex Taq DNA 聚合酶、10 $\times$  PCR buffer 及 DNA marker (DL2000) 等购自 Takara 等公司, 其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 病毒的增殖** 取保存的 LH 株病毒, 经适当稀释后, 接种 12~14 日龄易感鹅胚尿囊腔, 置 37 $^{\circ}\text{C}$  继续孵化, 观察至

144 h, 无菌收获死亡胚液, -20 $^{\circ}\text{C}$  冷冻保存。

**1.2.2 病毒的粗提** 采用文献[4]方法进行粗提。取保存的病毒尿囊液, 采用终浓度为 2.2% 的 NaCl 去杂蛋白, 在上清液中加入 40% 的聚乙二醇-6000, 使其终浓度达 6%, 4 $^{\circ}\text{C}$  放置过夜, 次日离心弃上清, 沉淀物以 0.01 mol/L PBS(pH 值 7.2) 适量悬浮。

**1.2.3 蔗糖密度梯度离心** 将病毒抗原悬浮物在 4 $^{\circ}\text{C}$  条件下, 参考蔗糖密度梯度超速离心方法<sup>[5]</sup>, 以 20%、35%、50%、65% 几个密度为超速离心的梯度, 48 000 r/min 离心 4.5 h, 小心吸取不同层的液体至不同 EP 管中, 作好标记, -20 $^{\circ}\text{C}$  冷冻保存, 备用。

### 1.2.4 纯化后病毒的鉴定

**1.2.4.1 PCR 检测方法** 按参考文献[6]的操作方法进行。

**1.2.4.2 电镜观察** 将 PCR 鉴定阳性层液混合, 3% 磷钨酸负染后进行电镜观察、拍照。

**1.2.5 病毒蛋白的 SDS-PAGE** 将纯化前、后的鹅细小病毒毒液各取 15  $\mu\text{L}$ , 分别加入上样缓冲液 5  $\mu\text{L}$ , 100 $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min 后, 上样。分离胶 12%, 浓缩胶 5%, 电压为 90 V, 当溴酚蓝前沿进入分离胶后, 电压提高到 120 V, 直至溴酚蓝到达分离胶底部, 停止电泳。凝胶经考马斯亮蓝染色, 脱色后观察结果。

**1.2.6 纯化病毒对鹅胚毒力试验** 将纯化后的病毒液无菌处理后, 分别接种有鹅细小病毒母源抗体及无母源抗体的鹅胚, 0.2 mL/枚, 各 5 枚, 接种后观察 10 d, 每日照蛋, 取出死亡胚置 4 $^{\circ}\text{C}$  保存, 至 10 d 将未死亡鹅胚置 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜, 取所有死亡及未死亡胚, 无菌收获尿囊液并进行 PCR 检测, 剖检并观察鹅胚胚体变化。

## 2 结果与分析

### 2.1 病毒增殖、纯化结果

收获死亡易感鹅胚尿囊液 250 mL, 分装, 置 -20 $^{\circ}\text{C}$  冷冻保存, 备用。经蔗糖密度梯度超速离心后, 根据液面分层情况, 轻吸各离心管不同层面液体, 4 只离心管均吸出 8 层, 标

收稿日期: 2013-03-25

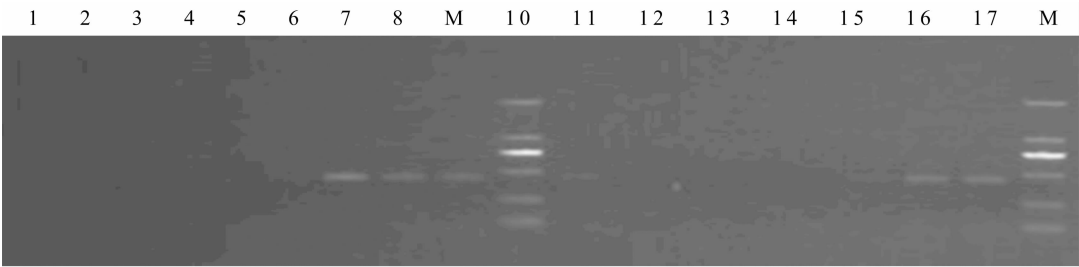
基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(09)619]。

作者简介: 刘宇卓(1967—), 女, 黑龙江泰康人, 硕士, 副研究员, 主要从事禽病诊断与预防研究。Tel: (025) 84390047; E-mail: liuyuzhuo998@sina.com。

记后冷冻保存。

2.2 鉴定结果

2.2.1 PCR 鉴定 取超速离心后 4 只离心管所分不同层液体,进行 PCR 鉴定,PCR 产物凝胶电泳结果见图 1、图 2。由



M: DNA marker DL2000; 1~8、10~17—蔗糖密度梯度离心后吸出病毒液的层数

图1 第1管和第2管离心后PCR电泳结果



M: DNA marker DL2000; 1~8—蔗糖密度梯度离心后吸出病毒液的层数; 9—阴性对照

图2 第3管、第4管离心后PCR电泳结果

2.2.2 电镜观察 取 PCR 鉴定呈阳性条带的超速离心液,经 2% 磷酸染色后电镜观察,结果见图 3。由图 3 可见大量细小病毒样粒子,外观呈球形,直径为 20~22 nm,无囊膜,有的病毒粒子呈空心状态。

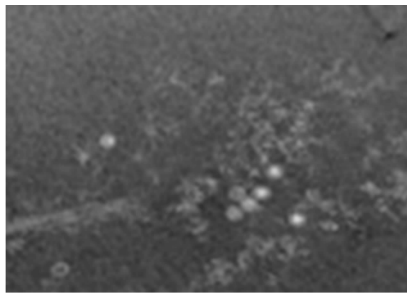
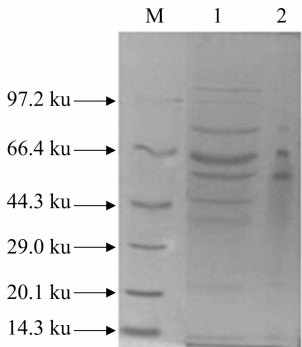


图3 超速离心后鹅细小病毒电镜观察结果

2.2.3 SDS - PAGE 由蛋白电泳结果(图 4)可知,浓缩纯化的 GPV 液经 SDS - PAGE 蛋白电泳后分析发现,蔗糖密度梯度离心纯化后的病毒液出现 3 条蛋白带,分别对应于结构蛋白 VP1、VP2、VP3,分子量分别为 85、66、60 ku(图 4)。这一结果与李茂祥等的结果<sup>[7]</sup>有些不同。

2.2.4 纯化病毒对鹅胚毒力试验结果 接种后 10 d,取出未死亡胚置 4℃过夜,同时取接种后 10 d 内的死亡胚,无菌收取死亡鹅胚尿囊液进行 PCR 检测并观察胚胎变化(表 1)。结果可见,绒毛尿囊膜水肿增厚、出血,死亡鹅胚胚体明显充

图 1 和图 2 可以看出,不同离心管中吸出的第 6、7、8 层共 3 层液体均出现与预期目的条带大小相符的片段,证明这几层液体中含有 GPV。



M: 蛋白质分子质量标准; 1—纯化前病毒; 2—纯化后病毒

图4 纯化后的GPV SDS-PAGE电泳结果

表 1 纯化后病毒液对不同鹅胚的感染性试验

鹅胚	死亡比(死亡枚数/接种枚数)	剖检鹅胚变化	尿囊液 PCR 检测
无母源抗体	5/5	心脏苍白,肌肉出血	阳性
有母源抗体	0/5	无异常	阴性

血或出血,以头、颈、翅尖部出血最明显。剖检胚体,肝脏呈郁血或黄色,且有条状出血,胆囊充盈,心脏色淡。

3 讨论

GPV 属于细小病毒科依赖病毒属成员。纯化后的 GPV 病毒液,在电镜下观察呈球形,直径为 20~22nm,有空心和实心 2 种粒子。GPV 病毒对外界有很强的抵抗力。从我国分离到的 GPV 病毒,56℃加热 1 h 仍能使鹅胚死亡。50℃加热 3 h 接种后 7 d 对感染滴度无影响。该病毒对乙醚、氯仿、胰蛋白酶、去污剂以及 pH 值 3 的酸性环境有抵抗力,经上述处理的病毒接种鹅胚与未经处理的病毒没有差异<sup>[7-8]</sup>。本试验结果证明经氯仿处理过的 GPV,仍能保留其毒力,能致死易感鹅胚,并表现出特异性剖检症状。

经 SDS - PAGE 电泳可知病毒多肽结构分子量分别为 85、66、60 ku,这一结果与李茂祥等的研究结果<sup>[7]</sup>有些出入,具体原因有待进一步分析。

病毒的纯化是进行下一步试验的基础,病毒纯化的结果关系到以后试验的成败。目前浓缩纯化病毒的方法很多,常

李凌云, 莘海亮, 田兴舟, 等. 不同水平  $\text{NaHCO}_3$  对黔北麻羊瘤胃体外发酵的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5): 158–160.

# 不同水平 $\text{NaHCO}_3$ 对黔北麻羊瘤胃体外发酵的影响

李凌云, 莘海亮, 田兴舟, 夏先林, 刘洪来, 吴文旋

(贵州大学动物科学学院, 贵州贵阳 550025)

**摘要:** 以 5 只安装永久性瘤胃瘘管的黔北麻羊为试验动物提供瘤胃液, 以青干草: 精饲料 = 80:20 为发酵底物(对照), 在此基础上分别添加 2%、4%、6%、8%  $\text{NaHCO}_3$ , 配制不同水平缓冲剂的发酵底物, 测定累积产气量、产气参数、有机物消化率、pH 值、铵态氮浓度。结果表明, 各处理组不同时间点累积产气量、潜在产气量、有机物消化率均高于对照组, 其中添加 2%、4%  $\text{NaHCO}_3$  组显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 但处理组内均随  $\text{NaHCO}_3$  添加量的提高而降低; 添加  $\text{NaHCO}_3$  对发酵底物产气速率、pH 值、铵态氮浓度影响不大 ( $P > 0.05$ )。由此可见, 低水平  $\text{NaHCO}_3$  有利于黔北麻羊瘤胃发酵状态。

**关键词:**  $\text{NaHCO}_3$ ; 瘤胃发酵; 黔北麻羊

**中图分类号:** S827.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)05-0158-03

黔北麻羊主产于贵州省仁怀市、习水县, 是经当地长期选育形成的贵州独有的三大优良地方山羊品种之一, 目前存栏量约 20 万只。该羊遗传性能稳定、适应性强、耐粗饲、抗病力强, 除主产地外, 还广泛分布在贵州桐梓、道真、务川、正安等地, 与贵州黑山羊、贵州白山羊生境特征、体型外貌等区别明显<sup>[1]</sup>, 于 2009 年被农业部鉴定为国家级山羊新遗传资源品种<sup>[2]</sup>, 极具学术研究价值。目前, 有关黔北麻羊的研究报道以品种介绍、杂交改良、分子遗传学、肉质特性等方面为主<sup>[3-6]</sup>, 而未见其营养学研究报道。黔北麻羊作为反刍动物, 具有以瘤胃厌氧发酵为代表的特殊营养生理特征。因此, 笔者率先在贵州省构建了瘤胃体外发酵技术体系, 掌握了其瘤胃体外发酵特性<sup>[7]</sup>。本研究旨在探讨生产实践中常用的缓冲剂  $\text{NaHCO}_3$  对瘤胃发酵参数(累积产气量、产气参数、有机物消化率、pH 值、铵态氮浓度)的影响, 为后续研究提供基础

数据和技术积累。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物与饲养管理

选用 5 只体况良好、健康无病的去势雄性黔北麻羊为试验动物(体重 35 kg/只), 安装永久性瘤胃瘘管(Bardiamond 公司生产), 恢复后进行试验。黔北麻羊单饲于不锈钢代谢笼中, 每天分别在 09:00、13:00、19:00 饲喂, 日粮供应量为 600 g/(d·只)(精粗各半), 干物质基础为花生秧、青干草、精料, 比例为 1:1:1; 精料组成包括玉米 65%、豆粕 12%、麸皮 20%、食盐 1%、预混料 2%。日粮营养水平为: 蛋白质 12.0%、中性洗涤纤维 34.6%、酸性洗涤纤维 25.4%、钙 0.62%、磷 0.36%。黔北麻羊自由饮水。

### 1.2 人工瘤胃液的制备

人工瘤胃液由人工唾液和瘤胃液组成。参照 Menke 等的方法<sup>[8]</sup>配制人工唾液, 置 39℃ 磁力搅拌器上不断搅拌, 持续通入  $\text{CO}_2$ , 直至溶液由蓝色变成粉红色最后变成无色透明状态, 调节 pH 值至 7.0~7.3, 备用。晨饲前, 经瘤胃瘘管采集瘤胃液, 迅速用 4 层纱布过滤, 密封, 置 39.0~39.5℃ 下水浴。将瘤胃液与人工唾液按 1:2 的比例混匀, 密封, 即得人工瘤胃液。在其中持续通入  $\text{CO}_2$ , 保证厌氧环境。

收稿日期: 2012-10-07

基金项目: 贵州省农业科技攻关项目[编号: 黔科合 NY 字(2009)3085]; 贵州省省长基金[编号: 黔省专合字(2011)39]。

作者简介: 李凌云(1986—), 女, 湖南长沙人, 硕士研究生, 从事瘤胃发酵方面的科研工作。E-mail: 317587915@qq.com。

通信作者: 吴文旋, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事反刍动物营养方面的科研工作。E-mail: wwx3419@126.com。

用于病毒纯化的方法有超速离心、层析法; 但想达到病毒的高度纯化, 最常用的还是密度梯度离心和等密度梯度离心, 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。密度梯度离心法是根据病毒的密度与细胞碎块不同这一事实, 即使细胞碎块与病毒颗粒的大小相同, 在密度梯度中亦能将其分开<sup>[5]</sup>。本研究采用蔗糖密度梯度离心方法纯化了 GPV, 获得了较理想的效果, 为进一步开展研究工作打下了坚实基础。

## 参考文献:

[1] 殷震. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 1114–1119.

[2] 方定一. 小鹅瘟介绍[J]. 中国兽医杂志, 1962(8): 19–20.

[3] 卡尔尼克 B W. 禽病学[M]. 高福, 苏敬良, 译. 北京: 中国农业出版社, 1999: 988–992.

[4] 刘宇卓, 李银, 魏雪涛, 等. 鹅细小病毒 LH 株的分离鉴定[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(5): 1091–1094.

[5] 黄祯祥. 医学病毒学基础及实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1990.

[6] 刘宇卓, 李银, 魏雪涛, 等. 鹅细小病毒 PCR 检测方法的初步建立[J]. 江西农业学报, 2011, 23(3): 156–158.

[7] 李茂祥, 李俊宝, 郑玉美. 小鹅瘟病毒纯化及其理化特性的研究[J]. 病毒学报, 1990, 6(2): 155–159.

[8] 方定一, 王永坤, 郑玉美, 等. 小鹅瘟病原体及其特异性防治的研究[J]. 中国农业科学, 1981(1): 1–8.