



2003 水产科技论坛

可持续水产养殖

—— 资源 环境 质量

SUSTAINABLE AQUACULTURE
Resources, Environment and Quality

王衍亮 主编



海洋出版社

2003 水产科技论坛

可持续水产养殖
——资源 环境 质量

王衍亮 主编

海洋出版社

2004年·北京

图书在版编目(CIP)数据

可持续水产养殖:资源 环境 质量:2003 水产科技
论坛 / 王衍亮主编. —北京:海洋出版社,2004.5

ISBN 7-5027-6076-8

I. 可… II. 王… III. 水产养殖-文集-汉、英
IV. S96-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 011638 号

责任编辑:方菁

责任印制:严国晋

海洋出版社 出版发行

<http://www.oceanpress.com.cn>

(100081 北京市海淀区大慧寺路8号)

北京玥实印刷有限公司印刷 新华书店发行所经销

2004年5月第1版 2004年5月北京第1次印刷

开本:787mm×1092mm 1/16 印张:19.5

字数:520千字 印数:1~700册

定价:40.00元

海洋版图书印、装错误可随时退换

2003 水产科技论坛

主办单位：中国水产科学研究院

支持单位：农业部科技教育司 农业部渔业局

中国科学院生命科学与生物技术局

协办单位：中山大学 中国海洋大学 上海水产大学

韩国国立水产科学院

组织委员会

名誉主席：陈宜瑜 中国科学院副院长 中国科学院院士

主 席：王衍亮 中国水产科学研究院院长

学术委员会

名誉主席：朱作言 国家自然科学基金委员会副主任

中国科学院院士 第三世界科学院院士

主 席：唐启升 中国水产科学研究院黄海水产研究所所长 研究员

中国工程院院士

执行主席：林浩然 中山大学教授 中国工程院院士

夏德全 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心研究员

中国工程院院士

副 主 席：李思发 上海水产大学教授

桂建芳 中国科学院水生生物研究所所长 研究员

王清印 中国水产科学研究院黄海水产研究所副所长 研究员

委 员：(按姓氏的拼音顺序排列)

曹文宣 中国科学院水生生物研究所研究员 中国科学院院士

董双林 中国海洋大学副校长 教授

刘 筠 湖南师范大学教授 中国工程院院士

麦康森 中国海洋大学教授 “长江学者奖励计划”特聘教授

孙效文 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 研究员

吴淑勤 中国水产科学研究院珠江水产研究所所长 研究员
徐 洵 国家海洋局第三海洋研究所研究员 中国工程院院士
贾晓平 中国水产科学研究院南海水产研究所所长 研究员
杨 健 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 研究员
张福绥 中国科学院海洋研究所研究员 中国工程院院士
赵法箴 中国水产科学研究院黄海水产研究所 研究员
中国工程院院士
庄 平 中国水产科学研究院东海水产研究所副所长 研究员

编辑工作委员会

主 编：王衍亮

副 主 编：李杰人

编辑组成员：聂善明 李应仁 张晓琴

唐 琳 吴 均 韦 玮

方 辉 陈晓慧 赵红萍

目 次

水产种质资源与育种

- 鳊鱼病毒核酸特异片段表达及高效价抗体制备 严家彬等(3)
- 对虾酚氧化酶原基因和溶菌酶基因 ORF 的分离与特征分析 叶 星等(11)
- Genetic analysis for Heilongjiang *Coregonus ussruensis* Berg population
..... Liang Liquan *et al*(18)
- 黄喉拟水龟两个种群的遗传分析与比较 朱新平等(23)
- 青虾的多态性研究 傅洪拓等(33)
- 条斑紫菜叶绿体甘油醛-3-磷酸脱氢酶的 cDNA 克隆和序列分析 马凌波等(41)
- 紫外线辐射对平鲷精子活力和受精率的影响 蔡泽平等(47)
- 黑脊倒刺鲃人工繁殖技术研究报告 黄种持(53)
- 匙吻鲟人工繁殖技术研究 肖 慧等(63)
- 黄河上游鱼类资源现状调查与分析 张建军等(68)
- 洞庭湖野生大口鲶临产亲鱼捕获优质受精卵获得原种培育 傅建平(78)
- 我国淡水虾蟹养殖业的现状及发展方向 戈贤平(81)

水产养殖生态环境与修复

- Fisheries and environment in reservoirs of China Wu Shenggui *et al*(93)
- 南美白对虾高位池细菌数量变化及其与水环境因子的关系 申玉春等(100)
- 基于 GIS 的考洲洋水域浮游植物的时空分布及其与营养盐的相关性分析
..... 蔡文贵等(107)
- 不同类型咸水的水产养殖研究 王 慧等(116)
- 芽孢杆菌对凡纳对虾生长及免疫的影响 郭志勋等(121)
- 珠江口浮游动物物种多样性研究 杜飞雁等(127)
- 有益微生物的应用对海水对虾养殖中细菌数量动态变化的影响 黄洪辉等(132)
- Optimization of fermentation and product collection process of the functional
bacteria for bioremediation of shrimp culture environment Li Qiufen *et al*(140)
- 工厂化养殖中悬浮生物膜的构建、性能和应用 刘 飞等(147)
- 小池塘与稻田结合养鱼应大力推广 蔡友芳(159)
- 漳州市水产养殖生态环境保护与修复 蓝希文(162)

兴凯湖浮游植物种类、生物量及数量变动研究	姜作发等(170)
溴氰菊酯对鱼类的安全评价及检测技术研究	赖子尼等(176)
有益微生物在暗尾东方鲀养殖中应用的研究	陈家长等(181)
A review and prospects of cold-water fish culture in China	Ye Jidan <i>et al</i> (186)
水域生态系统修复理论、技术的研究进展	晁 敏等(192)
Healthy aquaculture pattern and technology without environment pollution	Wang Anli <i>et al</i> (203)
养殖水体氨氮污染生物—生态修复技术研究及其前景	李 谷等(208)

水产养殖与质量安全

Effects of five kinds of Chinese herbal medicine on nitric oxide concentration in serum of common carp and their remission of nitric oxide toxicity of anthron	Liu Hongbai <i>et al</i> (219)
Effect of protein on nutrient components of Chinese soft-shelled turtle(<i>Trionyx sinensis</i>)	Qian Guoying <i>et al</i> (223)
Use of degossypolled cottonseed protein in diets of rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Luo Lin <i>et al</i> (228)
饲料中微生态制剂对斜带石斑鱼生长和饲料利用的影响	林黑着等(236)
用两种方式固定化的菌株对养殖水质净化效果的研究	杨莺莺等(240)
水产品中病原生物的危害及预防措施	吴燕燕等(248)
SQA对虾活力素绿色饲料添加剂	张甲耀等(254)
The effect of chromium-riched yeast on growth, feed utilization and tissue composition in tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> × <i>O. aureus</i>	Pan Qing <i>et al</i> (260)
Effect of starvation and re-feeding on feeding, growth and body biochemical composition of <i>Acipenser schrenckii</i> juveniles	Gao Lujiao <i>et al</i> (266)
酶联免疫吸附法快速检测鳃弧菌	杨莺莺等(274)
Comparative pharmacokinetic studies of norfloxacin in the penaeid shrimps, <i>Penaeus vannamei</i> and <i>Penaeus monodon</i>	Fang Wenhong <i>et al</i> (279)
Feed attractants and protein quality mean less waste	Liang Mengqing <i>et al</i> (288)
对虾发光病的生态防治技术研究	陈月忠等(296)

水产种质资源与育种 ■

鳊鱼病毒核酸特异片段表达及高效价抗体制备*

严家彬 李新辉** 吴淑勤 杜合军

(中国水产研究院 珠江水产研究所,广东 广州 510380)

摘要:鳊鱼病毒(*Siniperca chuatsi* virus, SCV)是1994年以来广东省养殖鳊鱼暴发性流行病的主要病原,其基因组为双链DNA。采用随机扩增多态性分析(RAPD)方法获得病毒基因组的部分扩增核酸片段,并进行了克隆和序列分析。在上述基础上,本论文选取一个鳊鱼病毒基因组随机克隆片段,成功地实现鳊鱼病毒核酸特异片段在原核细胞中的表达;对表达产物进行纯化,通过免疫制备抗体方法制得免疫抗体,抗体效价测定表明所获免疫抗体具有高效价特性,为进一步研究鳊鱼病毒的特性、建立新的检测方法打下了基础。

关键词:鳊鱼病毒;原核表达;蛋白纯化;抗血清

The expression for specific nucleic acid of *Siniperca chuatsi* virus and the preparation for high efficient antibody

Yan Jiabin Li Xinhui Wu Shuqin Du Hejun

Abstract: *Siniperca chuatsi* virus(SCV) is the major pathogen of infectious disease broken out in cultured Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) since 1994 in Guangdong Province, and its genome belongs to double-stranded DNA. By means of Random Amplification of Polymorphic DNA(RAPD), some nucleic acid segments of SCV genome were cloned. In this paper we selected one of the above clones and succeeded in expressing the specific DNA sequence in *E. coli* (DH5 α). Using the expression protein to immune rabbits, we obtained high efficiently antibody.

Key words: *Siniperca chuatsi* virus(SCV); prokaryotic expression; protein purification; antiserum

自1994年以来,广东省鳊鱼养殖主产区每年5~10月大规模地暴发一种流行性疾病。病鱼活动力弱,静止塘边,对外界干扰不敏感,10天内死亡率接近100%。吴淑勤、李新辉等(1997)结合流行病学和分子生物学手段,首先从患暴发性流行病的濒死鳊鱼中提取到外源核酸,并通过电镜在病鱼脾脏组织中观察到一种截面呈六角型、直径约150 nm的球状病毒,认为是该病的主要病原,将其命名为鳊鱼病毒(*Siniperca chuatsi* virus, SCV)。此后,何建国、张奇亚、方勤等(1998, 1999, 2000)相继从病鳊组织中分离到病毒,从而进一步确认几年来引起广东省养殖鳊鱼大规模死亡的主要原因是病毒感染。其中张奇亚等先后从病鳊组织中分离到3种病毒,即直径约280 nm的球状病毒、250 nm \times 120 nm的弹状病毒和200 nm \times 100 nm的杆状病毒。

* 广东省自然科学基金(20010675)、中国水产科学研究院(2001-3-5)基金资助
** 通信作者

何建国实验室研究认为鳊鱼病毒主要感染鳊鱼的脾脏和肾脏,是一种虹彩病毒,并发表了该病毒的基因组全序列(2001)。我们将发表的 SCV 核酸序列与 ISKNV 序列比较,并未发现明显的相似性,证明鳊鱼暴发性流行病的病原不止一种,这与张奇亚在病鳊组织中发现多种病毒的结果相吻合。

对于鳊鱼病毒建立了外源核酸分析法、PCR 检测方法,但是这些检测方法都需要依赖实验室条件。免疫斑点法,即 Dot-ELISA,灵敏度高,且能同时进行多样本检测,既适用于实验室,也可用于养殖场,而且能开发为试剂盒,因此是很有推广价值的。本论文选用特异的病毒核酸,将之翻译为蛋白,通过免疫新西兰大白兔,制得病毒的特异抗血清,从而建立抗体水平的病毒病检测方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SCV 克隆片段来自本实验室,新西兰大白兔,2.0 kg/只,购自广东省医学实验动物中心。核酸工具酶购自宝生物工程(大连)公司,辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)等购自美国 Sigma 公司,其他试剂为国产分析纯试剂。质粒纯化试剂盒 GEL DNA EXTRACTION KIT 为上海生物工程公司产品。pBV220 来自中国预防医学科学院病毒所。鳊鱼病毒核酸克隆子 S102A 由本室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 表达质粒的构建

根据软件分析 S102A 克隆序列,确定表达序列框,起止位点从 GTG 到 TTT,以 pBV220 为表达系统,设计引物: P₁: TCGAATTCATGGTGACAATTACTCGAG, P₂: CCGGATCCCTAAA ACA-CACTATTCA。其中 P₁引物在 GTG 前加上起始密码子 ATG 以及两个保护性碱基和一个 EcoRI 酶切位点, P₂引物在 TTT 加上终止子 TAA 及两个保护性碱基和一个 BamHI 酶切位点。

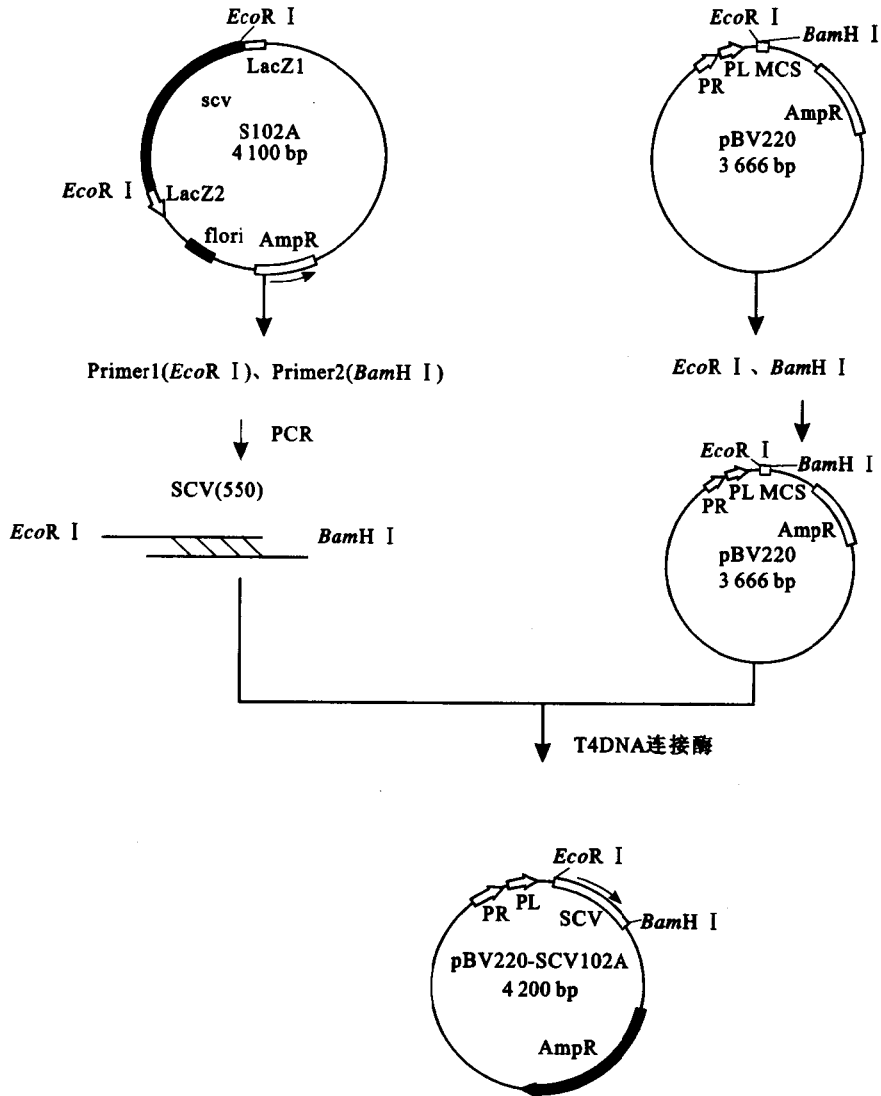
以质粒 S102A(或 EcoRI 酶切 S102A 的小片段)为模板,在 0.2 mL 反应管中扩增目的基因。反应条件为:94 °C 变性 5 min,进行 30 个循环,每个循环反应包括 94 °C, 30 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 30 s。循环完成后,72 °C 延伸 7 min。取反应液 5 μl 在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳观察。用胶回收方法回收 PCR 产物,并用 GEL DNA EXTRACTION KIT 纯化。纯化好的 PCR 产物和质粒 pBV220 都用 EcoRI 和 BamHI 双酶切,通过 T4 DNA ligase 连接,转化大肠杆菌,用酶切和 PCR 方法鉴定重组子 pBV220-SCV102A。

附 S102A 克隆序列:

```
TTCCGACGTGACAATTACTCGAGATGTGGTTGCTATAGAGTTGGTTAATAACACTGCC
GACTCCGAGAAACCCGTATCCACCCAGCAGCAAATGGTGTGGACGACTATGCAAACA
CCGTCCACACGCATACGGCACAGGAGCTTTCACTACCAGTTGCTACAGATGCTGTATAT
GGCATAGCCTATCGCTATTCTGGTGACATAGGTACGACCCACGGTACAGTAACGCCTTC
TACTCTAAAGCAAATAGTCGATGCGATGGCCGAACGCCTAAAATCATCAACGATGCA
TTGGAGATGGATGCACTGCCCGTCATCTCACTTACAAACACGGCTATCGTCTCGCCTAA
GAACCCAGCGCCGACAGGGTACCTGAAAGTGAGGTATGGTCTGCGGTAATTGGC
```

TCTGGCCAACAGCTATATATGAACCGTAACGTATATGTTCGGTGAGGAGACTCTAGTAA
 GTCTTCGAGACGTACTTCCATCCGGAAGTCTAGCCAGCCGTACTTACTACGTGTATCGT
 CGTGCAGGCGATTTGAATAGTGTGTTTAAAACAAAGGAAATCCAAAGGAATACCAAGG
 TTATATCTGATATGT

质粒图谱及表达质粒的构建



1.2.2 pBV220-SCV102A 的表达

重组子 pBV220-SCV102A 于 LB 培养基中, 30 ℃ 培养过夜。次日以 1:50 培养至 OD₆₀₀ 达 0.4~0.6 后, 迅速升温至 42 ℃ 培养 3~5 h, 诱导蛋白表达。5 000 g 离心 10 min 收取菌体, 经冻融处理后再用超声波破菌分离包涵体。SDS-PAGE 电泳检测表达蛋白。

1.2.3 表达蛋白提纯

包涵体经洗涤, 用 8 mol/L 尿素溶液溶解包涵体, 用还原型和氧化型谷胱甘肽透析法使表达蛋白复性。样品经离子交换层析进一步纯化。

1.2.4 抗血清的制备及抗体效价

纯化蛋白作为抗原免疫新西兰大白兔,初次免疫剂量为0.4 mL/kg,免疫蛋白浓度为0.72 mg/mL,在背颈部进行多点皮下注射。一个月后进行第一次加强免疫,免疫剂量为初次免疫的2/3。后每隔10 d进行一次加强免疫,经抗体检测后,兔颈动脉采血制备抗血清,加入叠氮钠至终浓度为0.02%后-20℃保存。凝胶双扩散法和免疫印迹分析检测抗体效价

2 结果

2.1 质粒 S102A 的提取与酶切

根据设计的特异引物,以 S102A 1.1Kb 克隆片段为模板(图1),经 PCR 扩增得到一个约 550 bp 的片段(图2)。扩增产物经 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶切,与同样酶切处理的 pBV220 进行连接,转化大肠杆菌 DH 5 α 。用 PCR 扩增和双酶切筛选转化子。

2.2 PCR 扩增及表达质粒的构建

筛选结果见图2。根据 S102A 可翻译片段的特性,设计引物时以考虑获取最大扩增片段为目的,因此对引物的特异性放在次要位置。PCR 结果获得三个片段,其中 550 bp 片段为目的片段(箭头所示)。

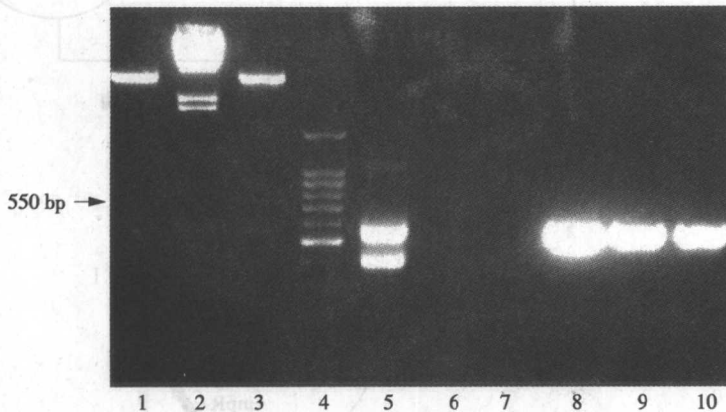


图2 PCR 扩增与重组质粒酶切鉴定

Fig.2 PCR amplification and identification of recombinant by restriction enzyme digestion

1. pBV220/*Bam* H I + *Eco* R I ; 2. λ DNA/*Hind* III ; 3. recombinant plasmid/*Bam* H I + *Eco* R I ; 4. 100 bp Marker ;
5. PCR products from S102A ; 8, 9, 10. PCR products from positive recombinant ; 6, 7. PCR failure in selecting recombinant

2.3 重组克隆的测序及推定的氨基酸序列

PCR 扩增产物经测序,与原序列比较,结果有三处发生突变,分别是第 8 个氨基酸 V \rightarrow E,第 21 个氨基酸 E \rightarrow K,第 174 个氨基酸 R \rightarrow A,推定的氨基酸序列为:

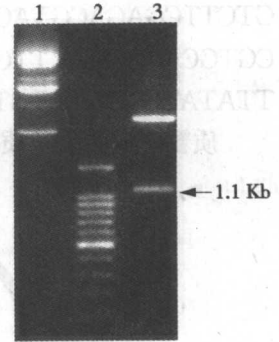


图1 S102A 酶切图

Fig.1 Restriction mapping analysis of S102A

1. Plasmid S102A ;
2. 100bp marker ;
3. Plasmid S102A/*Eco* R I

1 MVTITRD[E]VA IELVNNTADS [K]KPVSTQQQM VLDDYANTVH
 THTAQELSLP
 51 VATDAVYGIA YRYSGDIGTT HGTVTPSTLK QIVDAMAERL
 KIINDALEMD
 101 ALPVISLTNT AIVSPKNPAP PAGSPESEVW SAVIGSGQQL
 YMNRRNVYVGE
 151 ETLVSLRDVL PSGSLASRTY YVY[A]RAGDLN SVF

183个氨基酸,分子量约21 kD,等电点为4.72。根据软件分析,改变的氨基酸对肽链的理化特性影响不大,不影响表达蛋白的功能。

2.4 SDS-PAGE 检测表达产物

挑取重组子菌落于 LB 液体培养基(含 Amp)中 30℃ 摇床过夜,翌日按 1:50 扩大培养(30℃),至 OD₆₀₀ 达 0.4~0.6,迅速升温至 42℃,4 h 后结束诱导。离心收菌,SDS-PAGE 电泳(分离胶浓度 15%),考马斯亮蓝 R-250 染色,结果见图 3,从图可见重组子有特异蛋白带。箭头示目标蛋白带。

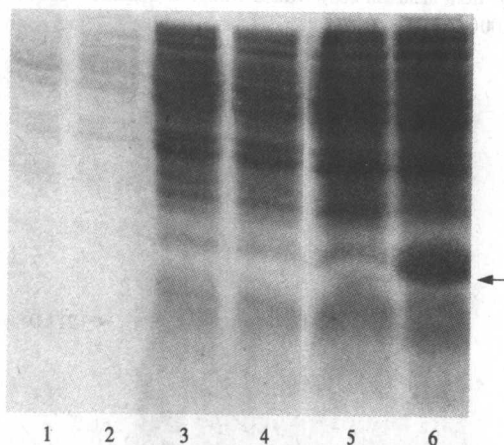


图 3 重组质粒表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the expression products of recombinant

1. Supernatant/pBV220; 2. Supernatant/recombinant; 3. Total bacteria/pBV220(before inducing); 4. Total bacteria/recombinant(before inducing); 5. Total bacteria/pBV220(inducing 2 h); 6. Total bacteria/recombinant(inducing 2 h)

2.5 蛋白质的纯化

重组蛋白以包涵体形式存在。将分离的包涵体经 Triton-X100/EDTA 及尿素洗涤液处理除去大部分杂物,用 8 mol/L 尿素变性溶解。变性蛋白在透析复性后经离子交换层析纯化。结果见图 4a 和图 4b。

在图 4a 中,1 和 2 分别为诱导 3 h 和 1 h 的重组菌,4 为 1 mol/L 尿素洗涤液处理包涵体后得到的上清,5 和 6 均为 2 mol/L 尿素洗涤液处理包涵体后得到的沉淀,7 为 1% TritonX-100 处理包涵体后得到的沉淀,8 为 1% TritonX-100 处理包涵体后得到的上清。由图可知,重组菌的表达蛋白分子量约为 21 kD,在诱导 1 h 后即有少量表达。表达蛋白的包涵体溶于 2 mol/L

尿素洗涤液,故沉淀中检测不到表达蛋白,但在上清中能检测到。包涵体不溶于 1% Triton X-100,因为在沉淀中能检测到表达蛋白,但在上清中不能检测到。

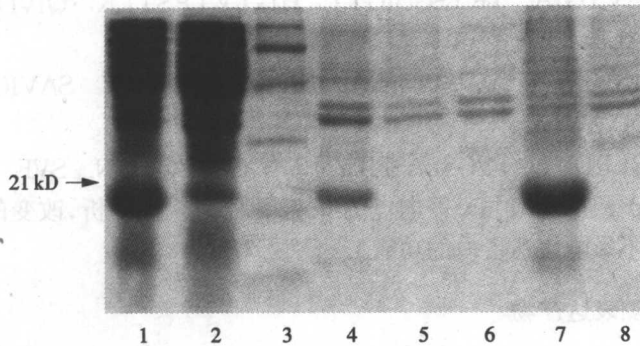


图 4a 重组质粒表达产物的纯化及 SDS-PAGE 分析

Fig.4a SDS-PAGE analysis of the expression products and protein purification

1. Total bacteria(inducing 3 h);2. Total bacteria(inducing 1 h);3. Low protein marker/kD(from up to down:97.4,66.2,43.0,31.0,20.1,14.4);4. Supernatant from inclusion body treated with 2 mol/L urine;5,6. Precipitation from inclusion body treated with 2 mol/L urine;7. Precipitation from inclusion body treated with 1% TritonX-100(v/v);8. Supernatant from inclusion body treated with 1% TritonX-100(v/v)

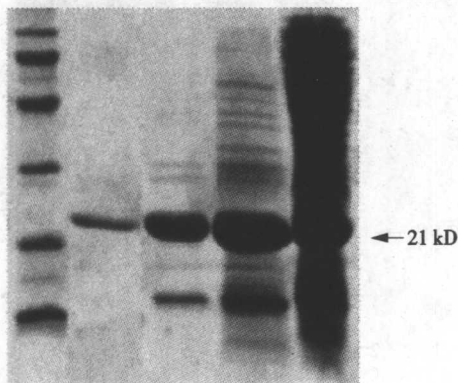


图 4b 重组质粒表达产物的纯化及 SDS-PAGE 分析

Fig.4b SDS-PAGE analysis of the expression products and protein purification

1. protein marker/kD(from up to down:97.4,66.2,43.0,31.0,20.1,14.4);2. protein purified by ion exchange (about 21 kD);3. washed inclusion body;4. inclusion body before washed;5. total bacteria/recombinant(inducing 4 h)

从图 4b 看出,包涵体经过多次洗涤,大部分杂蛋白已不存在,主要还有一条约 15 kD 的杂带。洗涤后的包涵体进一步用离子交换层析纯化,得到纯度极高的蛋白,面积定量扫描表明目标蛋白纯度达到 98.7%,洗涤后的包涵体在透析后,纯度达 73.3%。凝胶图像扫描分析表明,目标蛋白占菌蛋白总量的 18.1%。根据包涵体浓度推测目标蛋白产量为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 菌。

2.6 蛋白质浓度的测定

采用考马斯亮蓝 G-250 染色法测蛋白质的浓度。经标准曲线参数计算蛋白浓度为 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.7 mg/mL)。同样方法,将蛋白样品浓度调整到本法灵敏度内(10~1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$),测得相

应光密度,根据标准曲线推定的方程计算蛋白质的浓度。结果表明:本论文得到的包涵体、透析蛋白和离子交换纯化蛋白的浓度分别为 0.72 mg/mL,0.44 mg/mL 和 0.20 mg/mL。

2.7 抗血清的制备

取新西兰大白兔,用纯化的重组蛋白制备抗血清,经三次加强免疫后 10 d,获抗血清效价为 1:64。

2.8 免疫印迹分析

透析复性后的蛋白作为抗原免疫新西兰大白兔,得到高效价的抗血清。用此抗血清作为一抗,免疫用的蛋白作为抗原,进行免疫印记分析,结果如图 5 所示。

其中泳道 1、2、3 及 5 为表达蛋白,但浓度不同。泳道 4 为阴性对照,样品为本实验室制得的鲑鱼生长激素。由实验结果可知,免疫印记分析是非常灵敏的检测技术,可检测到 7 ng 量的抗原。

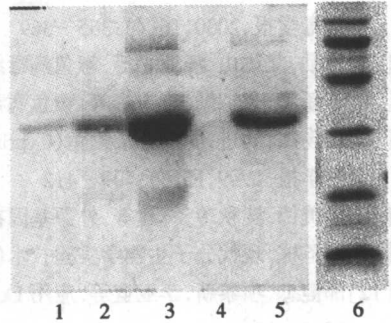


图 5 免疫印记分析

Fig.5 Western blot

3 讨论

鳜鱼病毒病从出现至今已有 7 年时间,在生产上对鳜鱼病毒病目前主要以预防为主。因此建立一种在生产上简便易行的病毒病检测和预报方法至为重要。本文拟通过表达病毒蛋白,制备抗体,建立免疫斑点检测技术为生产服务。

考虑到比较几种基因表达系统,我们选择将病毒核酸置于原核细胞中表达,并获得理想的表达效果。凝胶图像扫描分析表明,目标蛋白占菌蛋白总量的 18.1%。根据包涵体浓度推测目标蛋白产量为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 工程菌。

CCGGATCCTTAAAACACACTATTCA。其中 P_1 引物在起始密码子 ATG 前加了两个保护性碱基和一个 *Eco*R I 酶切位点, P_2 引物在终止子 TAA 后加了两个保护性碱基和一个 *Bam*H I 酶切位点。

PCR 产物克隆入表达质粒 pBV220 后测序,序列分析表明,有三处碱基发生了错义突变,分别是第 8 个氨基酸 GTG \rightarrow GAG(Val \rightarrow Glu),第 21 个氨基酸 GAG \rightarrow AAG(Glu \rightarrow Lys),第 174 个氨基酸 CGT \rightarrow GCT(Arg \rightarrow Ala)。采用 NTI Vector 6.0 基因软件对突变前后的氨基酸序列进行分析,发现蛋白质的等电点及摩尔消光系数等其他参数都没有变化。此外表达蛋白中没有二硫键,因此对蛋白空间结构影响不大。

重组蛋白经离子交换层析进一步纯化,以得到高纯度的抗原。推定的蛋白等电点为 4.72,故用阴离子交换柱进行纯化。洗脱时,为尽量将目标蛋白与杂蛋白分开,选用梯度洗脱方式,但这样增加了洗脱体积。回收得到的蛋白浓度降低,因此用冷冻干燥法浓缩保存。表达蛋白的生物学功能正在分析中。

1. 0.72 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2. 7.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3. 720 $\mu\text{g}/\text{mL}$,
4. GH(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 5. 72 $\mu\text{g}/\text{mL}$ M: Low
molecular protein marker/KD (from up to
down: 97.4, 66.2, 43.0, 31.0, 20.1, 14.4)

参考文献

- [1] 吴淑勤,李新辉,潘厚军等. 鳊暴发性传染病病原的研究[J]. 水产学报,1997,21(增刊):56~60
- [2] 李新辉,吴淑勤,李凯彬等. 鳊鱼病毒核酸的初步分析[J]. 水产学报,2000,24(2):171~174
- [3] 李新辉,吴淑勤,李凯彬等. 鳊鱼病毒核酸随机引物扩增与克隆[J]. 中国水产科学,1999,6(4):21~23
- [4] 李新辉,吴淑勤,潘厚军等. 一种检测鳊鱼病毒方法[J]. 中国水产科学,1997,4(5):112~114
- [5] 何建国,翁少平,黄志坚等. 鳊暴发流行病病毒性病原研究[J]. 中山大学学报(自然科学版),1998,37(5):74~77
- [6] 邓敏,何建国,左涛等. 鳊鱼传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)PCR 检测方法的建立及虹彩病毒新证据[J]. 病毒学报,2000,16(4):365~369
- [7] 方勤,艾桃山,汪亚平等. 鳊鱼病毒结构特征与形态发生[J]. 中国病毒学,2001,16(4):382~385
- [8] 李新辉,吴淑勤,李凯彬等. 鳊鱼病毒 PCR 诊断方法的建立[J]. 水产学报,2001,25(1):43~46
- [9] 白俊杰,马进,简清,等. 鲤鱼(*Cyprinus carpio*)生长激素基因克隆及原核表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报,1999,15(3):409~412
- [10] 廖美德,谢秋玲,林建等. 外源基因在大肠杆菌中的高效表达[J]. 生命科学,2002,14(5):283~287
- [11] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术(第二版)[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,1999
- [12] 邵健忠,项黎新,李亚蓝等. 应用 Dot-ELISA 技术快速检测草鱼出血病病毒的研究[J]. 水产学报,1996,20:6~12
- [13] 殷震,刘景华. 动物病毒学(第二版)[M]. 北京:科学出版社,1997
- [14] 张奇亚,李正秋. 在患病鳊鱼组织中观察到 3 种病毒[J]. 科学通报,1999,44(2):192~195
- [15] 周为民,谷淑燕. 细小病毒壳抗原在大肠杆菌中的表达及血清学检测[J]. 生物技术通讯,13(3):176~178
- [16] Babiuk L A , van-Drunen-Little-van-den-Hurks-s, Babiuk-L. Immunization of animals: from DNA to dinner plate[J]. Vet immunol immunopathol,1999,72(1/2):189~201
- [17] He J G, Deng M, Weng S P, *et al.* Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus [J]. Virology,2001,291,126~139
- [18] Qin Q W, Shi C, Gin K Y, *et al.* Antigenic characterization of a marine fish iridovirus from grouper *Epinephelus* spp. [J]. J Virol methods,2002,106(1):89~96
- [19] Tidona C A , Darai G. The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus[J]. Virology,1997,230:207~216