

几种理化因子对斑节对虾白斑杆状病毒 (WSBV) 感染力的影响*

谢数涛¹⁺ 邱德全² 何建国¹ 杨晓明¹ 江静波¹

(¹ 中山大学生命科学学院 广州 510275)

(² 湛江海洋大学水产学院 524088)

提要 将部分纯化的 WSBV 暴露于不同理化条件下, 通过人工感染的方法测定 WSBV 的感染力。结果表明, 病毒在纯水中 1 h 能保持感染活性, 但在 3 mol/L NaCl 的高盐溶液中 1 h 失去感染力; WSBV 在 30 °C 中 4 h 感染活性丧失, 在 70~90 °C 中 10 min 均失去感染力; 当环境 pH 值为 5 以下或 12.6 以上时, WSBV 在 1 h 后丧失感染活性; NP40, Triton X100, ClQ 或甲醛等均能灭活 WSBV。

关键词 白斑杆状病毒, 斑节对虾, 理化因子, 感染力

白斑病是近年来危害包括我国在内的整个亚洲地区对虾养殖业的主要流行病^[1], 国内外有关学者大多认为其病原是一种不形成包涵体的杆状病毒^[3,5,7,10,11]。1995 年国际病毒分类委员会第六次报告取消了裸杆状病毒亚科, 同时也没有建立新的分类阶元将原裸杆状病毒亚科的病毒收录^[9], 因此这种对虾病毒的分类地位尚待确定。本文使用白斑杆状病毒 (White spot baculovirus, WSBV) 作为此病原的命名。

病毒在不同理化条件下的稳定性, 是病毒生理生化特性的一个重要方面, 也是病毒分类的重要依据之一^[9], 目前 WSBV 有关此方面的报道较少。研究 WSBV 在不同理化条件下的稳定性, 不仅能为 WSBV 提供分类依据, 同时也能在生产实践提供灭活 WSBV 的手段和方法。本文以我国南方的主要养殖对虾——斑节对虾为材料, 将部分纯化的 WSBV 暴露于不同理化条件下, 再通过人工感染测定了 WSBV 在不同理化条件下的稳定性。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

健康斑节对虾取自广东省遂溪县一未发病对虾养殖场 (体长 6.4~7.8 cm), 实验前暂养 5 d, 5 d 内没有出现死亡等异常现象。患白斑病的濒死斑节对虾取自广东省廉江市一发病对虾养殖场 (体长 6.6~8.4 cm)。

1.2 WSBV 的部分纯化

取病虾的鳃, 剪碎后按约 1/10 (W/V) 的比例, 加入 TN 缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 0.4 mol/L NaCl), 制备成匀浆液。经 4 °C, 6 000 r/min 离心 20 min 去渣, 细菌滤器过滤, 再 4 °C, 15 000 r/min 离心 50 min, 沉淀即为部分纯化的 WSBV。

1.3 人工感染实验

1.3.1 NaCl 浓度对 WSBV 感染力的影响 部分纯化的病毒沉淀, 分别用 10 倍体积的无菌水, 天然海水 (盐度为 18, pH 7.8, 经细菌滤器过滤), 0.15, 0.4, 1 和 3 mol/L NaCl 的缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6) 悬浮, 1 h 后进行注射感染。每组斑节对虾 3~4 尾, 于对虾第 2 和第 3 腹节间肌肉注射 0.05 ml 经不同盐浓度处理的 WSBV 悬浮液。

1.3.2 WSBV 在不同 pH 条件下的稳定性 病毒沉淀分别用 10 倍体积的天然海水及不同 pH 值的缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 0.4 mol/L NaCl) 悬浮, pH 值分别为: 1, 3, 5, 5.6, 7.6, 9.6, 10.6 和 12.6。1 h 后进行注射感染。

1.3.3 WSBV 在不同温度条件下的稳定性 病毒沉淀用 10 倍体积的 TN 缓冲液悬浮后, 分别暴露于 4, 30, 40, 50, 60, 70, 80 和 90 °C 等不同温度条件下, 至预定时间后置 4 °C 冷却, 再进行注射感染。

* 国家自然科学基金资助项目 39670577 号。

+ 现工作单位: 华南农业大学动物医学系。

收稿日期: 1999-03-29; 修回日期: 1999-07-14

1.3.4 几种化学试剂对 WSBV 感染力的影响
病毒沉淀用 10 倍体积的 TN 缓冲液悬浮后,分别加入 NP-40(终浓度为 2%)、Triton X100(终浓度为 1%)、C1Q(终浓度为 20×10^{-6}) 和甲醛(终浓度为 1%),混匀,4 °C 放置 1 h 后进行注射感染。

以上每个实验组各取 1 尾发病死亡对虾用于光镜组织病理检查和 PCR 检测,方法分别参见文献 [7] 和文献 [8]。

2 结果

2.1 NaCl 浓度对 WSBV 感染力的影响

差速离心纯化的 WSBV,用不同 NaCl 浓度的溶液于 4 °C 悬浮,再用病毒悬浮液进行注射感染,结果见表 1。

表 1 NaCl 浓度对 WSBV 感染力的影响

Tab.1 Viability of WSBV by exposure to various NaCl concentrations

离子(NaCl) 浓度(mol/L)	悬浮时间 (h)	对虾样本数 (尾)	对虾死亡率 (%)
无菌水	1	4	100
0.15	1	4	100
天然海水	1	4	100
0.40	1	4	100
0.40	6	3	100
1.00	1	4	100
3.00	1	4	0

从表 1 可知,WSBV 在 0~1 mol/L NaCl 的溶液中 1 h 内,其感染活性不受影响,其中在相当于对虾血淋巴盐离子浓度,即 0.4 mol/L NaCl 的条件下,WSBV 的感染力 6 h 内没有变化。表明在从淡水到 1 mol/L NaCl 的环境中,WSBV 均能较稳定地保持活力,可见 WSBV 能抵抗较宽范围的盐浓度变化。但 WSBV 在 3 mol/L NaCl 的溶液中 1 h,失去感染力。

2.2 WSBV 在不同 pH 条件下的稳定性

WSBV 用不同 pH 值的溶液于 4 °C 悬浮,再进行注射感染,结果见表 2。

从表 2 可知,WSBV 在 pH 值为 5.6~10.6 的缓冲液中 1 h 内,病毒具有感染活性;但在 pH 值小于 5 或大于 12.6 的条件下,失去感染力。

pH5.0 属弱酸, pH10.6 属中强碱。WSBV 在弱酸性的环境中易失去感染活性,而在中强碱的条件下,可保持感染能力,表明低的 pH 对游离 WSBV 的存活有更大影响,即 WSBV 对酸较为敏感,对碱性环境则

有一定程度的抵抗力。

表 2 pH 值对 WSBV 感染力的影响

Tab.2 Viability of WSBV by exposure to various H-ion concentrations

溶液 pH 值	悬浮时间 (h)	对虾样本数 (尾)	对虾死亡率 (%)
1.0	1	4	0
3.0	1	4	0
5.0	1	4	0
5.6	1	4	100
7.6	1	4	100
天然海水	1	4	100
9.6	1	4	100
10.6	1	4	100
12.6	1	4	0

2.3 WSBV 在不同温度条件下的稳定性

WSBV 经不同温度处理后,于 4 °C 冷却,再进行注射感染,结果见表 3。

表 3 温度对 WSBV 感染力的影响

Tab.3 Viability of WSBV by exposure to various temperature conditions

温度 (°C)	处理时间 (min)	对虾样本数 (尾)	对虾死亡率 (%)
4	600	3	100
30	240	3	0
30	60	3	100
40	10	4	100
50	10	4	100
60	10	4	100
60	60	3	0
70	10	4	0
70	5	3	0
80	10	4	0
90	10	4	0

从表 3 可知,当温度为 30 °C 时,1 h 内 WSBV 有感染活性,4 h 后失去感染力;当温度为 60 °C 时,10 min 内 WSBV 有感染活性,1 h 后失去感染力。提示在同一温度下,随着时间的延长,WSBV 的感染活性逐渐降低。

WSBV 在 70 °C 中 10 min 失去感染力;但在 60 °C 中 10 min 仍具感染活性。提示随温度升高,WSBV 的感染力下降。

WSBV 在 70 °C 中处理仅 5 min,其致病性即消失,说明 WSBV 对 70 °C 的高温非常敏感。推测 70 °C 可能

是个临界点,因此用热灭活的方法进行 WSBV 消毒时,可选择 70 °C 或更高的温度。

2.4 部分化学试剂对 WSBV 感染力的影响

WSBV 经几种化学试剂处理后,进行注射感染,结果见表 4。

从表 4 可知,经 NP-40 或 Triton X100 处理,WSBV 失去感染力。NP-40 和 Triton X100 属去污剂类试剂,它们均能破坏病毒粒子的囊膜,可见囊膜受破坏的 WSBV 没有感染力。

表 4 化学试剂对 WSBV 感染力的影响

Tab.4 Viability of WSBV by exposure to some chemicals

化学药品	终浓度	处理时间 (min)	对虾样本数 (尾)	对虾死亡率 (%)
ClO ₂	20 × 10 ⁻⁶	60	3	0
NP-40	2 %	60	3	0
Triton X-100	1 %	60	3	0
甲醛	1 %	60	3	0
正对照 (病虾组织匀浆液)	/	/	4	100

能使蛋白质变性的 ClO 和甲醛也能使 WSBV 失去感染活性,这可能与病毒囊膜上与侵染有关的蛋白质被破坏有关。

2.5 发病对虾的检测

以上各组感染实验中,发病对虾均表现出与自然发病对虾相似的外观病症及病程变化;对死亡对虾进行组织切片和 HE 染色,在 WSBV 的靶细胞中均发现细胞核肿大和深染等白斑病病理变化;用 PCR 法对死亡对虾进行 WSBV 检测,也得到阳性结果。说明以上的各组感染实验中,对虾的发病及死亡均由 WSBV 引起。

3 讨论

作者制备病虾匀浆液及纯化 WSBV 时,均在 4 °C 或冰浴下完成所有操作。本文的感染实验发现,WSBV 置 4 °C 下 10 h,能保持其感染活性;而在 30 °C 下 4 h,WSBV 失去感染力。因此在进行注射感染或病毒纯化等相关实验时,应尽量保持低温,并尽快完成操作。

本文结果表明,WSBV 在 70 °C 时易失去感染力。有囊膜的病毒是借助其囊膜上的蛋白质与宿主细胞膜上的病毒受体相互识别后,再侵入细胞内部的^[2]。70 °C 时 WSBV 失去感染活性,可能是 WSBV 囊膜

上与侵染有关的蛋白质因高温变性所致。但 30 °C 4 h 下 WSBV 也丧失感染力,则不大可能是囊膜蛋白质热变性的缘故,WSBV 在此温度条件时失去感染活性的原因有待进一步研究。

另外,能破坏病毒囊膜的试剂如:NP-40, Triton X100, ClO 或甲醛等均可使 WSBV 丧失感染力,其原因可能也是囊膜受损的 WSBV 无法侵入宿主细胞。这一结果与黄 等^[4]用乙醚进行的实验相符,而与周国瑛等^[1]用病毒核衣壳成功进行感染实验不同(但其文中所描述的发病对虾的病程及病症似与白斑病相异)。

在适宜条件下(如在 4 °C 下的 TN 缓冲液中),WSBV 能至少保持感染活性数小时,表明离开对虾组织的 WSBV 具有一定的存活能力。这是 WSBV 逃避宿主消化液的破坏,成功进入对虾体内所必需的。但 WSBV 的这种存活能力并不强,如与形成包涵体的对虾杆状病毒(*Baculovirus penaei*, BP)相比,BP 在 20 ~ 50 °C 的条件下能保持感染活性 96 h 以上^[6]。可见在自然环境中,WSBV 抗逆境的能力不强;当环境温度稍高或 pH 偏酸时,病毒粒子即易失去感染活性;普通的去污剂或蛋白质变性剂,均能灭活 WSBV。提示 WSBV 在虾塘或自然海域中可能不以离体传播为主要方式,病毒更可能以存在于组织内的形式,通过生物间的相互摄食,来完成从一个宿主到另一个宿主的转换和传播。

参考文献

- 1 周国瑛等.第二届全国人工对虾疾病综合防治和环境管理学术研讨会论文集.青岛:青岛海洋大学出版社,1996.7~10
- 2 侯云德.分子病毒学.北京:学苑出版社,1990.573~576
- 3 黄 等.海洋水产研究,1995,16(1):1~10
- 4 黄 等.海洋水产研究,1995,16(1):51~58
- 5 Kiyoshi, I. *et al.*. *Fish Pathology*, 1994, 29(2):149~158
- 6 LeBlanc, B. D., *et al.*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1991, 57: 277~286
- 7 Lightner, D. V.. *A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp*. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 1996, 1~
- 8 Lo, CF. *et al.*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1996, 25: 133~141
- 9 Murphy, F. A. *et al.*. *Virus Taxonomy*. New York: Springer Verlag Wien, 1995, 1~
- 10 Wongteerasupays, *et al.*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1995, 21: 69~77
- 11 Wang, CH. *et al.*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1995, 23: 239~242

(下转 30 页)

EFFECT OF SEVERAL PHYSICAL AND CHEMICAL FACTORS ON VIABILITY OF WHITE SPOT BACULOVIRUS OF *Penaeus monodon*

XIE Shu-tao¹ QIU De-quan² HE Jian-guo¹ YANG Xiao-ming¹ JIANG Jing-bo¹

(¹School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

(²Fisheries College, Ocean University of Zhanjiang 524088)

Received: Mar. 29, 1999

Key Words: White spot baculovirus, *Penaeus monodon*, Physical and chemical factor, Infectivity

Abstract

Stability of WSBV to NaCl concentration, pH, heat and other chemical was investigated using clinical health *Penaeus monodon* in a bioassay. WSBV was completely inactivity within one hour after exposure to a solution of 3 mol/L NaCl. It lost infectivity after exposure to 30 °C for 4 h or 70 °C for 5 min. When the pH value of solution was higher than 12.6 or lower than 5.0, WSBV was completely inactivated within 1 h. So WSBV seemed to be more sensitive to acid solution than to basic solution. WSBV lost infectivity after exposure to NP-40, Triton X100, ClO₂ or formalin more than 1 h. ☞

(本文编辑:刘珊珊)