
* 论文与研究报告 *

中国对虾一种 C 型杆状病毒的纯化技术 及形态特征研究*

孔 杰 石 拓 刘 萍 包振民[†] 郭福生^{††} 相建海^{†††}

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071) [†](青岛海洋大学生命科学院, 青岛 266003)
^{††}(农业部动物检疫所, 青岛 266071) ^{†††}(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 染病中国对虾于 1995 年 7 月取自青岛崂山对虾养殖场。为探索对虾杆状病毒分离纯化技术, 采用组织超薄切片技术对染病对虾进行电镜观察; 被病毒感染的对虾经组织匀浆、差速离心和密度梯度离心, 纯化出杆状病毒粒子; 纯化的杆状病毒经磷钨酸钾负染色, 于透射电子显微镜下观察形态结构。结果表明, 中国对虾中肠组织的细胞核被大量的有囊膜无包涵体的杆状病毒侵染, 属 C 型杆状病毒; 病虾头部组织以 6000r/min 匀浆, 6000r/min 与 10000r/min 差速离心, 再经 10%—50% 蔗糖密度梯度, 可纯化出形态完整的杆状病毒粒子; 与所有已报道的对虾杆状病毒不同, 中国对虾完整的病毒粒子带有一很长的尾, 可达病毒体的 1.5 倍以上。经 Triton X-100 处理, 获得脱去囊膜的核衣壳, 衣壳系由两个帽端夹 14 圈螺旋形成对称的圆柱体结构。

关键词 中国对虾 病毒 纯化

海洋甲壳类病毒学属于无脊椎动物病毒学中起步较晚但发展迅速的领域, 自从 Couch (1974) 在墨西哥湾的桃红对虾 (*Penaeus duorarum*) 中发现第一例对虾病毒始, 病毒性病原一直是对虾病害研究中的焦点。迄今, 已发现的对虾属病毒约 13 种 (Lightner, 1993), 其中只有 *Baculovirus penaei* (Bonami et al., 1990) 得到国际病毒分类委员会的认可。1993 年养殖的中国对虾发生了严重的病毒性流行病 (蔡生力等, 1994), 但有关病毒性病原的研究结果多建立在组织病理的观察和流行病学调查的基础上 (张立人等, 1994; Lightner et al., 1981; Sano et al., 1984), 而病毒的分离纯化技术及形态结构等尚未见系统全面的报道。

本文报告中国对虾一种 C 型杆状病毒的分离纯化技术及其形态结构, 以期为该病毒分类学、生理生化及分子生物学等研究提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料来源

* 国家攀登计划“B”资助项目, PD B6-6-1号。孔杰, 男, 出生于 1963 年 5 月, 副研究员。

收稿日期: 1996 年 11 月 20 日, 接受日期: 1997 年 1 月 10 日。

于 1995 年 7 月自山东青岛崂山上马镇发生对虾暴发性流行病的养殖池现场采集养殖中国对虾(*Penaeus chinensis*)(体长为 3—5cm), 冰冻后带回实验室, 于 -70°C 保存。

1.2 组织切片与电子显微技术

现场取病虾的鳃、肝胰腺和中肠组织, 按常规方法制片, 在 H-7000 电镜下观察并摄影。

1.3 病毒分离纯化及电镜观察

方法一 去除头胸甲的冰冻虾头 100 g 加入 200ml PPB 缓冲液¹⁾后在匀浆器(型号: DS-200)中以 6 000 r/min 的转速匀浆 5 min。匀浆混合液经离心机先进行差速离心, 分别以 3 000 r/min (1 090g) 离心 30min, 6 000 r/min (4 350 g) 离心 30min, 8 000 r/min (7 700 g) 离心 30 min 和 10 000 r/min (15 300 g) 离心 1 h 产生沉淀。取不同离心速度的沉淀进行电镜观察, 以确定病毒的存在。将含有病毒的沉淀悬浮于 3 倍体积 PPB 缓冲液中, 铺于 10%—50% 蔗糖梯度上再进行密度梯度离心, 经 BECKMANL8-80 离心机转子以 25 000r/min 离心 3 h。吸取梯度中的乳白色区带, 用 PPB 缓冲液充分洗涤, 去除残留的糖分。纯化的病毒重悬于 PPB 缓冲液中, 于 -70°C 保存。

方法二 为去除病毒囊膜, 获得只有核衣壳的病毒离子, 用 2% 的 Triton X-100 PPB 缓冲液替代方法一中 PPB 匀浆缓冲液, 余同方法一。

取病毒悬液 10 μl , 用覆有 Formav 膜的铜网吸附 5 min, 滴加 3% 磷钨酸钾(PTA)染色 5min, 室温风干, 于 H-7000 电镜下观察。

2 结果

2.1 对染病中国对虾组织超薄切片的电镜观察结果

电镜观察表明, 在染病中国对虾中可发现大量的病毒粒子分布在病变组织的细胞核内, 部分分布在细胞质中(图版 I:1)。该病毒粒子横切面为圆形, 纵切面为杆状而略带椭圆, 中央是高电子密度的核心, 其外紧裹着一层衣壳, 最外层是囊膜。染病中国对虾的细胞核肿胀或破裂, 核仁模糊不清甚至消失, 核内异染色质明显减少或完全消失。细胞核的核膜增生并扩散至细胞质中, 形成多层膜的回纹结构。细胞质减少, 线粒体变圆, 嵴变模糊。

2.2 病毒的纯化技术及其结果

用上述两种方法, 染病的中国对虾的匀浆液经差速离心、密度梯度离心后, 均分离纯化出大量的、形态均一的杆状病毒。差速离心过程中病毒的电镜跟踪检查表明, 经过 30min 的离心, 在 3 000r/min 和 6 000r/min 转速的沉淀中没有病毒离子; 在 8 000r/min 的离心速度下, 部分病毒开始沉淀; 10 000r/min 的离心速度可使绝大部分的病毒沉淀(表 1)。在方法一中, 经差速离心所得病毒沉淀中混有无固定形态和结构的团块状杂质, 病毒粒子结构完整, 而方法二所得到的病毒沉淀中杂质相对少, 并且沉淀中大部分的病毒外部结构被破坏。两种方法中使病毒发生沉淀的离心速度无变化。

经密度梯度离心后, 两种方法所沉淀的病毒在 40% 和 50% 蔗糖密度交界处形成

1) 黄捷等, 1993, 中国对虾生理无机盐缓冲液的组成研究。

表1 染病中国对虾组织匀浆液经差速离心后的电镜检查结果

Tab.1 Results of electromicroscope inspection of the homogenate of diseased shrimp after differential centrifugation

离心速度 (r/min)	3 000		6 000		8 000		10 000	
	上清液	沉淀	上清液	沉淀	上清液	沉淀	上清液	沉淀
病毒离子	?	无	?	无	有	有	无	有

浅褐色的沉淀带。电镜检查的结果表明, 未经 Triton X-100 处理的中国对虾组织纯化的病毒, 带有长长的尾巴, 外裹病毒囊膜; 经 Triton X-100 处理后, 尾巴和囊膜脱落, 病毒核衣壳螺旋带结构清晰可见。

2.3 病毒的形态特征

2.3.1 病毒粒子的外部形态结构 完整的病毒粒子外被囊膜, 内部结构不可见。病毒呈椭圆形, 一端较平并轻微凹陷, 另一端略细, 大小约为 300—370nm × 90—130nm。较细一端带一乳头状突起, 由此延伸出一很长的尾, 宽约 20—30nm, 长约 500—700nm。尾巴经常呈盘旋、卷曲状态; 完全伸展的尾部长度可达病毒体长的 1.5 倍以上(图版 I:2)。

2.3.2 病毒的核衣壳 经 Triton X-100 处理的完全脱去囊膜的核衣壳结构为螺旋圆柱体形, 大小为 270—320nm × 60—80nm; 螺旋带几乎与衣壳长轴垂直, 每匝螺旋宽 20nm 左右, 螺旋间距在 2.5nm 左右。衣壳螺旋由两条平行的约 7nm 宽的螺旋夹一条宽约 6nm 的中间带组成; 在衣壳螺旋的边缘及中间带上可清晰地区分出衣壳的结构单位; 在两端为一对高度约 20nm 的梯形帽状结构, 帽状结构之间有 14 圈衣壳螺旋(图版 I:3)。

3 讨论与结论

电镜观察表明, 染病中国对虾组织切片中无核型多角体或颗粒体类包涵体存在。据 Fohrmann(1986) 报道, 杆状病毒科分为三个亚群, 即核型多角体病毒(A亚群)、颗粒体病毒(B亚群)和非包涵体病毒(C亚群)。与 A 亚群和 B 亚群不同, 杆状病毒 C 亚群没有多角体或颗粒体类晶体蛋白包围。因此本研究分离纯化的病毒属于杆状病毒 C 亚群。

在病毒的纯化过程中, 组织匀浆、差速离心、有机溶剂处理等是几个关键步骤。匀浆的目的在于破碎细胞, 使病毒释放出来。为了保持病毒粒子的完整结构, 匀浆的速度不宜太高、时间不宜太长, 以打碎细胞为准。实验表明, 去除头胸甲的冰冻虾头在匀浆器中以 6000 r/min 的转速匀浆 5 min, 既破碎对虾细胞, 释放病毒离子, 又能保证病毒的完整性。差速离心可以去除组织匀浆中较大的细胞样物质, 使病毒粒子与大量的脂质、杂蛋白甚至一些未完全破碎的组织碎屑分离, 因此查清使病毒粒子沉淀的离心速度对差速离心是至关重要的。一旦确定病毒粒子沉淀的离心速度, 一方面可以最大程度地去除组织匀浆液中的杂质, 另一方面还能避免过高的沉淀速度对病毒粒子的损伤。经过差速离心后

的组织悬液再经过蔗糖密度梯度离心,病毒可与其他杂质分开而得到进一步的纯化,在蔗糖密度梯度介质中形成浅褐色或乳白色的清晰的病毒带。为去除病毒囊膜,获得只有核衣壳的病毒离子,方法二用 2% 的 Triton X-100 PPB 缓冲液替代方法一中 PPB 匀浆缓冲液,以便使病毒囊膜脱落,露出清晰的核衣壳结构。

在已经发表的研究报道中,纯化的病毒粒子或者有囊膜无典型尾状结构(彭宝珍等, 1995), 或者有尾状结构而无囊膜(Misao et al., 1995)。因为病毒的囊膜与核衣壳连结不紧密,分离过程中囊膜极易脱落,所以纯化过程中使用适宜的匀浆速度、时间以及沉淀病毒的离心速度等可能是保持病毒结构完整的关键所在。本研究结果证实:以 6 000r / min 的速度匀浆 5min 可有效地破碎中国对虾的细胞结构,释放出病毒粒子; 10 000r / min 的离心速度能沉淀绝大部分病毒粒子,上述技术参数是分离纯化中国对虾 C 型杆状病毒的重要条件。

参 考 文 献

- 张立人等, 1994, 电子显微学报, 5:354.
彭宝珍等, 1995, 病毒学报, 11(2):151—156.
蔡生力等, 1994, 水产学报, 19(2):112—119.
Bonami, J. R. et al., 1990. *J. Gen. Virol.*, 71:2 647—2 664.
Couch, J. A., 1974, *Nature*, 247:229—231.
Fohrmann, G. F., 1986, *J. Gen. Virol.*, 67:1499—1 513.
Lightner, D. V., et al., 1981, *J. Invertbr. Pathol.*, 38:299—302.
Lightner, D V., 1993, CRC Handbook of Mariculture, 2nd Edition, Volume I Crustacean Aquaculture, ed. by McVey, J. P., Crc Press Inc (Boca Raton, Florida), pp. 393—486.
Misao, A. et al., 1995, *Aquaculture*, 132:213—220.
Sano, T. et al., 1984, *Fish Pathol.*, 15:185—191.

STUDIES ON PURIFICATION TECHNIQUE AND MORPHOLOGY OF A KIND OF TYPE C BACULOVIRUS IN *PENEAUS CHINENSIS*

Kong Jie, Shi Tuo, Liu Ping, Bao Zhenmin[†],
Guo Fusheng^{**}, Xiang Jianhai^{***}

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

[†](College of Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003)

^{**}(National Animal Quarantine Institute, Ministry of Agriculture, Qingdao 266071)

^{***}(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract Moribund shrimps, *Peneaus chinensis* (3 — 5 cm in body length), were collected during an occurrence of mass mortality at a shrimp farm of Laoshan, Qingdao in July 1995. The gill tissue, hepatopancreatic tissue and mid-gut tissue were fixated for ultrathin sectioning and the existence of a kind of baculovirus was found in the gill and mid-gut by Hitachi H-7000 transmission electron microscope. Cytopathic changes associated with baculovirus infection were hypertrophy of the nucleus and accumulation of rod-shaped enveloped virions (Plate I:1). To isolate the virus, 100g of moribund shrimp were homogenized at 6 000 r/min for 5 min with PPB buffer (Huang Jie, personal communication) or PPB buffer containing 2% Triton X-100. The outer membrane of the virions was broken and the virions were purified as nucleocapsids in the presence of Triton X-100. Pellets of the material homogenated at different centrifugation speeds were inspected by electron microscope and baculovirus was found to be precipitated at 8 000 r/min (Tab. 1). Morphologically intact baculovirus and nucleocapsids could be isolated and purified by centrifugation from 6 000 r/min to 10 000r/min and density gradient centrifugation on 10%—50% sugrose at 25 000 r/min from cephalothorax homogenate. The morphology and structure of the virus, stained by phosphotungstic acid (PTA), were analyzed by transmission electron microscope. Morphologically intact baculovirus were rod-shaped, singly enveloped and with a long tail-like appendage. The head of whole virions averaged 90—130 nm in diameter and 300—370nm in length. The Tail was 20—30nm in diameter and 500—700 nm in length (Plate I:2). The nucleocapsid contained 14 helixes with 2 capped ends on both sides and formed bacilliform structure (Plate I:3).

Key words *Peneaus chinensis* Virus Purification