356—361 6783(14)

维普资讯 http://www.cqvip.com

第10卷 第4期 中国病毒学 Vol. 10 No. 4
1995年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 1995

中国对虾一种球状病毒的分离提纯及其核酸蛋白特性的研究

肖连春 石正丽 高 玮
张立人 陈棣华

S945.19

(中国科学院武汉病毒研究所,武汉 430071)

A

提要 从感染致病的中国对虾(*Penaeus chinesis*)中分离到一种球状病毒,其直径约为20±4 nm。进行人工感染实验,对虾死亡率为66%;用脱氧核糖核酸酶(DNase),核糖核酸酶(RNase)及二苯胺染色法对病毒核酸进行处理,证明该病毒核酸为脱氧核糖核酸,用S1核酸酶(S1 nuclease)对该核酸进一步消化处理,进一步证实该病毒含单链DNA。SDS-PAGE结果显示,该病毒含4条结构多肽,其分子量分别为86 kD,79 kD,70 kD及25.5 kD。根据上述特性分析,该病毒可能属于细小病毒科(Parvoviridae),故暂定名为中国对虾细小病毒(*Penaeus chinesis* Parvovirus 简称 PcPV)。

关键词 中国对虾,细小病毒,感染试验,单链DNA,结构多肽 球状病毒,核酸蛋白,

中国对虾(*Penaeus chinesis*)营养丰富,经济价值高,自80年代以来,人工养殖对虾迅速发展,与此同时,较广泛地开展了对虾病毒病害的研究,其中病毒病原的研究在国内已有若干报道[1,2]。国外在对虾病毒的研究方面也较多。Lightner 等1985年[3]曾从发病的对虾组织切片中发现了一种似细小病毒颗粒,于1993年[4]建立了一种从对虾中快速检测细小病毒的组织学方法。本文对中国对虾的一种病毒病原进行分离提纯,并对其生化特性进行了某些研究,结果如下:

材料与方法

1 对虾材料来源

病虾于1994年在江苏沿海收集。

2 病毒的分离提纯

将对虾头胸部加0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.2)研磨匀浆,3000 r/min 离心20分钟去粗渣,8% PEG6000浓缩,溶解沉淀,经低速离心去脂,其上清经浓缩于10—50%蔗糖梯度60000 g 离心2小时,取出沉淀带,超速离心除去蔗糖,病毒悬液保存于冰箱中备用。

3 病毒粒子的电镜观察

病毒悬液以适当的浓度滴在已盖有 Formvar-碳膜的铜网上,凉干后,经1% PTA 负染,干燥后电镜检测。

4 感染试验

取体长为3—5 cm 的健康对虾30头,在实验室用人工海水喂养。实验前对虾饥饿过夜,次日用被1.5 ml蛋白含量为34 mg/ml病毒悬液浸泡过的10 g 饵料喂食感染组30头对虾,以后则与对照组一致,每日投放人工饲料。对照组10头正常喂养。

5 病毒结构多肽的SDS-PAGE 分析

基本按方法[5]进行,浓缩胶浓度为3%,分离胶浓度13%,标准蛋白为华美公司出品;磷酸化酶B(94000),

本文于1995年4月27日收到,9月6日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

牛血清白蛋白(67000)，肌动蛋白(43000)，碳酸酐酶(30000)，烟草花叶病毒外壳蛋白(17500)。

6　病毒DNA的提取

在纯化的病毒悬液中加入10% SDS使最终浓度为0.5%，用Tris-HCl饱和酚抽提两次，水相经乙醚提取两次，去乙醚后用pH5.2 NaAc及无水乙醇沉淀，高速离心，沉淀干燥后溶于TE(pH7.4)缓冲液中，低温保存。

7　核酸特性的分析

7.1　显色反应

用二苯胺及地衣酚对所提核酸进行显色反应，按常规方法操作。

7.2　脱氧核糖核酸酶及核糖核酸酶处理

DNase及RNase均为华美公司出品。将酶分别溶于pH7.4 Tris-HCl缓冲液，DNase的浓度为3 mg/ml，RNase的浓度为10 mg/ml。将样品分别用DNase及RNase在37℃酶解1小时，琼脂糖电泳分析。

7.3　限制性内切酶处理

EcoRI及Hind Ⅲ均由华美公司出品，病毒核酸中加适量EcoRI及Hind Ⅲ于37℃作用1小时，琼脂糖电泳分析。

7.4　S1核酸酶处理

S1核酸酶由Promega公司产品。核酸样品中加入S1酶，45℃作用30分钟，琼脂糖电泳分析。

结果与讨论

1.　病毒粒子的形态结构

提取的细小病毒于蔗糖梯度10%处形成一条带(图1)。经电镜观察，病毒粒子呈球形，无囊膜，粒子大小在16-24 nm之间；其中90%的病毒粒子直径在18-24 nm之间，平均直径约为20 nm，一些病毒粒子可观察到呈典型二十面体对称结构(图2)。

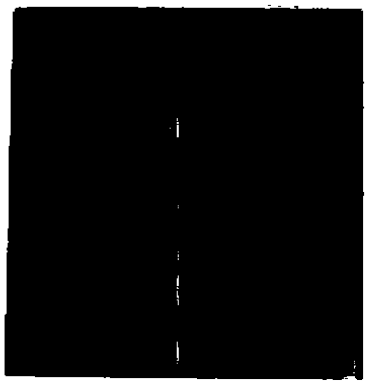

图1　病毒粒子在蔗糖梯度10%处形成一条带
Fig 1　Parvovirus band in 10% sucrose gradient

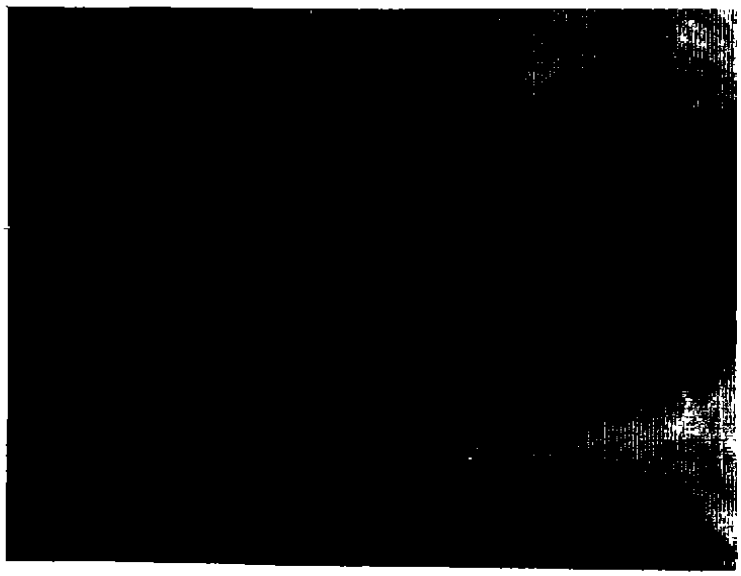

图2　从病虾样品中提取的细小病毒
Fig 2　Parvovirus purified from diseased shrimps

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 **感染试验** 人工感染后对虾发病状态与自然发病一致，3天后开始发病，对虾呈现出身体卷曲，泳动无力，无食欲，7天结束实验时，试验组对虾死亡率为66%(表1)，而对照组为10%，试验组对虾用同样的方法分离提取病毒，在电镜下检测，可见到数量不少的直径为20 nm 左右的球状病毒颗粒。充分证明病毒粒子具有感染性。

表1 细小病毒人工感染实验

Table 1 Artificial infection experiment of PcPV

	实验组 Trial group	对照组 Control group
试验虾数 Number of *P. chinensis*	30	10
死亡数 Dead number	20	1
死亡率 Dead rate	66%	10%

3 **病毒蛋白的SDS-PAGE电泳** 从SDS-PAGE图中(图3)可以看到，该病毒含有4条结构多肽，其分子量分别为86 kD，79 kD，70 kD，25.5 kD。细小病毒科多肽分子量为60－90 kD；宿主是昆虫和虾蟹等节肢动物的细小病毒经常是4条多肽[7]，因此，本文中对虾病毒的多肽均在细小病毒的范围之内。

4 **病毒核酸分析**

4.1 核酸性质的测定

图3 中国对虾细小病毒结构多肽SDS-PAGE电泳
1. 中国对虾细小病毒结构多肽 2. 标准蛋白
Fig 3 SDS-PAGE pattern of PcPV structural polypeptides
1. PcPV structural polypeptides 2. The standard proteins

4.1.1 从病毒中提取的核酸，经RNase及DNase酶解后，从电泳结果显示，DNase能将核酸完全酶解，而RNase则不能。作为对照的λDNA能被DNase酶解；从家蚕质型多角体病毒(Bm CPV)提取的RNA能被RNase酶解，故表明该病毒核酸为DNA(图4)。

4.1.2 病毒核酸与二苯胺反应溶液呈蓝色，同样证明该病毒核酸为DNA。

维普资讯 http://www.cqvip.com

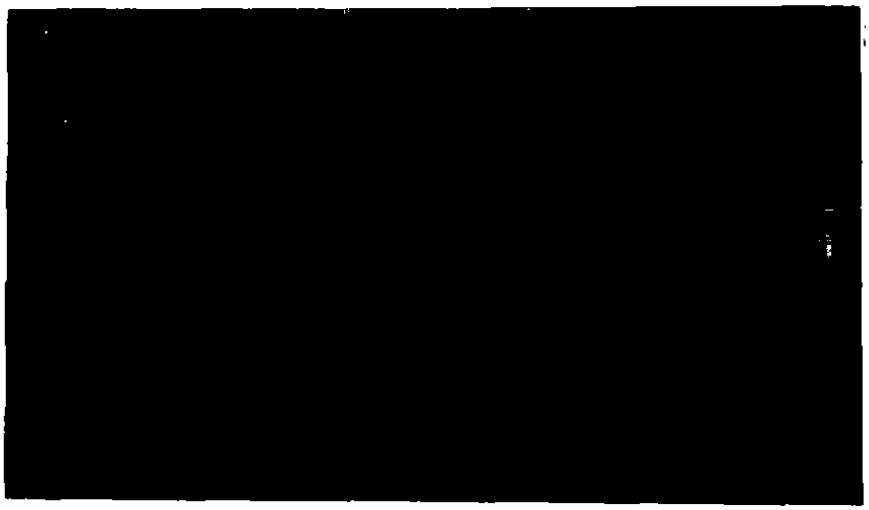

图4　核酸经RNase及DNase酶解后电泳分析

Fig 4　Electrophoretogram of nucleic acid digested with DNase and RNase

1. λDNA/Hind Ⅲ	1. DNA/Hind Ⅲ
2. 家蚕质型多角体病毒RNA	2. BmCPV RNA
3. 中国对虾细小病毒核酸	3. PcPV DNA
4. 中国对虾细小病毒核酸+RNase	4. PcPV DNA+RNase
5. 中国对虾细小病毒核酸+DNase	5. PcPV DNA+DNase
6. λDNA/Hind Ⅲ+RNase	6. DNA/Hind Ⅲ+RNase
7. λDNA/Hind Ⅲ+DNase	7. DNA/Hind Ⅲ+DNase
8. 家蚕质型多角体病毒RNA+RNase	8. Bm CPV RNA+RNase
9. 家蚕质型多角体病毒RNA+DNase	9. BmCPV RNA+DNase

1.2　核酸链性测定

1.2.1　病毒核酸样品经EcoRI及Hind Ⅲ处理未被切开，表明该病毒核酸可能为单链(图5)。

1.2.2　病毒核酸经S1核酸酶消化，电泳显示，S1酶能将病毒核酸完全酶解，M_{13}噬菌体单链DNA能被酶解，而λ双链DNA则不能，故表明病毒核酸为单链(图6)。

病毒的形态结构和大小是病毒基本特性之一。从中国对虾(*Penaeus chinesis*)中分离的病毒颗粒在蔗糖梯度10%处形成一条带，经高分辨率透射电镜观察该颗粒为小球状，无囊膜病毒，其中有些呈对称的二十面体。随机统计100个病毒粒子，90%的病毒颗粒直径在18—24 nm之间。同时亦发现约有10%的颗粒在14—17 nm范围之内。

1990年美国Lightner等[9]对红额角对虾(*P. stylirostris*)的皮下及造血器官坏死病(IHHN)进行了分析，认为是由细小病毒引起，测出该病毒结构蛋白含4条多肽，分子量分别为71 kD，47 kD，39 kD及37.5 kD。我们从中国对虾中分离纯化的小球状病毒，其核酸为单链DNA，病毒结构蛋白也含4条多肽，分子量分别为86 kD，79 kD，70 kD及25.5 kD。细小病毒科细小病毒属(*Parvovirus*)和依赖病毒属(*Dependovirus*)的病毒蛋白含3条多肽；而浓核病毒属(*Densovirus*)中病毒蛋白由4条结构多肽组成。

综上所述，我们分离的中国对虾细小病毒的形态结构、核酸特性、病毒多肽分析等表明与细小病毒的基本特征相似，更和宿主为无脊椎动物的细小病毒相近，因此，可以认为本文所报道的病毒应暂归属于细小病毒科(Parvoviridae)。但最终归宿如何，有待进一步研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

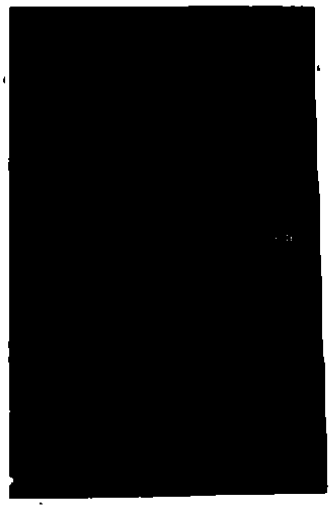

图5 中国对虾细小病毒的限制性内切酶分析

Fig 5 Electrophoretogram of 2 REN fragment of the PcPV-DNA

1 中国对虾细小病毒 DNA + EcoR1

2 中国对虾细小病毒 DNA + HindⅢ

3 λDNA/HindⅢ

1 PcPV-DNA + EcoR Ⅰ

2 PcPV-DNA + Hind Ⅲ

3 λDNA/Hind Ⅲ

图6 核酸的S1酶消化

Fig 6 Analysis of nucleic acid digested with S1 nuclease

1 λDNA/HindⅢ 2. M_{13} ssDNA

3. 中国对虾细小病毒 ssDNA 4 M_{13} ssDNA + S1 酶

5. 中国对虾细小病毒 DNA + S1 酶

6. λDNA/HindⅢ + S1 酶

1. DNA/HindⅢ 2. M13 ssDNA

3. PcPV DNA 4. M13 ssDNA + S1 nuclease

5 PcPV DNA + S1 nuclease 6. DNA/Hind Ⅲ + S1 nuclease

我们曾在河北乐亭、山东青岛等地所采集的病虾样品中，同样分离到这种细小病毒，通过超薄切片在病虾的几种组织细胞的核中发现大量密集的病毒颗粒。有关该病毒的复制、传播途径等方面的研究，目前正在进行中。在提取该病毒的过程中，经常可以发现颗粒较大的另一种球状病毒颗粒；亦发现与无包涵体杆状病毒复合感染。因此二种或二种以上病毒复合感染时，对宿主的致病机制、感染毒力是否增效等均是值得进一步探索的问题。

细小病毒感染无脊椎与脊椎动物的报道甚多，无脊椎动物中细小病毒的主要宿主是昆虫。中国对细细小病毒的发现，不仅为虾蟹等甲壳类病毒学提供了学术资料，亦为对虾病毒病害的防治提供了科学依据。

致谢 江苏大丰水产局沈卫东先生为本研究提供病虾材料，特表谢意。

参 考 文 献

1 陈棣华，张建红，石正丽，等. 中国对虾一种球状病毒的分离与提纯 中国病毒学，1994；9(2)：170～173

2 张建红，陈棣华，肖连春，等 中国对虾非包涵体杆状病毒在体内的感染与发生. 中国病毒学，1994；9(4)：362－366

3 D V Lightner, R M Redman A Parvo-like virus disease of Penaid shrimp. J of Invertebr Path, 1985; 45:47-53

维普资讯 http://www.cqvip.com

4 D V Lightner, R M Redman, D W Moore, Development and application of a simple and rapid diagnostic method to studies on hepatopancreatic Parvovirus of Penaid shrimp. Aquaculture, 116: 15-23

5 [美]J. 萨姆布鲁克，E. F. 费里奇，T. 曼尼阿蒂斯著. 分子克隆实验指南。第2版，北京：科学出版社，1992：880—887

6 Classification and Nomenclature of viruses. Fifth Report of the international Committee on Taxonomy of viruses. Archives of Virology, 1991, S2:167-168

7 REF Matthews. Classfication and Nomenclature of Viruses. Forth Report of the international Committee on Taxonomy of Viruses. Karger, 1982:72-75

8 殷震，刘景华主编. 动物病毒学，第1版，北京：科学出版社，1985：804

9 Jean-Robert Bonami, Brownen Trumper, D. V. Lightner *et al*. Purification and characterization of the infection hypodermal and haematopoietic necrosis virus of Penaeid shrimps. J of General Virology, 1990; 71: 2657-2664

Isolation, Purification of *Penaeus chinesis* Parvovirus and Analysis of its Nucleic Acid and Protein

Xiao Lianchun Shi Zhenli Gao Wei Zhang Liren Chen Dihua

(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan* 430071)

Small spherical virus with diameter of ca. 20 nm was isolated from infected shrimps. The virions were icosahedron and naked. The infection experiment showed that the mortality was up to 66%. The viral nucleic acid was ssDNA after digested with DNase, RNase and S1 nuclease. Analysis of viral polypeptides by SDS-PAGE revealed that the virion had four structural polypeptides with MW 86 kD, 79 kD, 70 kD and 25.5 kD. These results were in comformity with Parvoviridae, thus it was proposed that the virus be named *Penaeus chinesis* Parvovirus.

Key words *Penaeus chinesis*, Parvovirus, Infection experiment, ssDNA, Structural polypeptides

第八届国际抗病毒研究学术会议概况

The Eighth International Conference on Antiviral Research

第八届国际抗病毒学会议于1995年4月23—28日于美国 Senta Fe 市举行，参加会议代表来自世界各地，共525人，收到论文373篇。其中抗 HIV 论文占大多数，其次还包括反转录病毒，疱疹病毒，肝炎病毒，呼吸道病毒的论文。在肝炎病毒感染中，特别偏重于 HCV 的研究，美国每年丙型肝炎病毒病的患者有350万人，近10万人死于肝硬化、肝癌及其他并发症。目前美国正在研究丙型肝炎疫苗，以防止这种丙型肝炎的输血性感染。会议还报道了一些抗病毒药物如：GG167能抑制流行性感冒病毒。3Tc 及 Penciclovir 能抑制乙型肝炎病毒；PETT 能有效地抑制 HIV 的感染。另外还安排了抗病毒临床卫星会议及抗病毒新药开发的讨论会。最后，会议于4月28日在热情友好的气氛中圆满结束，并决定第九届抗病毒会议于1996年5月19—24日于日本召开。

（吴章琦）