

277-284

12

福州地区对虾白斑病病毒的超微结构

R945.47

郭银汉¹, 林诗发¹, 杨小强², 张诚², 谢联辉¹¹(福建农业大学病毒研究所, 福州 350002)²(福州市海洋生物工程研究开发中心, 福州 350026)

摘要:在福州地区分离到一种高致病性的白斑病病毒, 该病毒仅存在于细胞质中, 完整的病毒粒子有囊膜, 一端略圆, 一端稍尖, 直径约为 80~100 nm, 囊膜与核衣壳之间的间隙约为 20~25 nm。该病毒在细胞内不形成包含体, 但有些可形成封入体。负染观察到的病毒核衣壳呈直杆状, 但长度和直径相差较大, 最长的病毒超过 600 nm。这些特征与其它已报道的白斑病病毒有所不同, 因此暂将它称为“对虾白斑病病毒福州分离株”。

关键词:对虾白斑病病毒; 福州分离株; 超微结构

中图分类号: S945.19 **文献标识码:** A **文献编号:** 1003-5125(2000)03-0277-08

病毒性白斑病是目前世界上危害最广, 致病性最强的对虾病害之一。其主要特征是对虾甲壳上出现白斑, 感病个体活力差, 摄食量下降。目前, 对于白斑病病毒病原的性质等研究已有报道^[1-4], 并已获得几种不同地区的病毒“株系”。

对虾养殖是福建沿海地区的一个重要产业, 1992年起发生大规模流行性病害以来, 产量大幅度下降, 至今仍在低谷中徘徊。为尽早解决对虾病害问题, 我们以福州地区为立足点, 对福建对虾病害的病原进行了研究。

1997~1998年, 从福州地区各对虾养殖场采集了多组病虾样品。病虾的主要特征为甲壳白斑, 发病时摄食减少或停止摄食, 应激性下降; 从个体发病到大面积群体感染的间隔时间短, 多数养殖池一旦发生病害即无收成。上述特征与近年来国内外普遍流行的病毒性白斑病相同。经人工感染实验和病原回接实验证实, 病害的主要致病病原为病毒。现已分离到该病害的一种致病病毒, 并对其流行病学进行了细致深入的研究(另文发表)。本文主要报道该病毒的超微结构。

1 材料与方 法

1.1 样品来源

自1997年6月20日至1998年9月30日, 从福州地区15个对虾养殖场共采集到不同养殖季节、不同养殖池的多种白斑病对虾样品(斑节对虾、长毛对虾和短沟对虾), 样品虾体长3~12 cm不等。上述样品-70℃保存, 备用。

收稿日期: 1999-05-04, 修回日期: 1999-10-26

作者简介: 郭银汉(1971年-)女, 福建人, 助理研究员, 硕士。研究方向为病毒学。

1.2 病毒提取

将去除甲壳的病虾头胸部加入4倍(w/v)的TENP缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L PMSF, pH 8.0),冰浴匀浆,匀浆液7 000 g离心30 min,取上清,10 000 g离心30 min,取上清,50 000 g离心2 h,保留沉淀作为病毒的粗提纯物。取少许沉淀悬浮于TE缓冲液(pH 8.0),负染观察。其余沉淀直接用于人工感染实验。

1.3 实验对虾

分别从不同育苗场进苗,不同来源的虾苗完全隔离饲养。虾苗入池前经高锰酸钾冲洗,以除去虾苗表面的病原。养殖池为水泥池,建于密封的养殖室内。养殖用水由近海抽入,经沉淀池沉淀两天以上,然后经二级沙滤进入清水池,再经400目的水袋过滤进入实验室蓄水池。蓄水池内的海水用有效氯浓度为50 mg/L的漂白粉消毒12 h以上,以杀灭其中所有病原微生物;使用前加入适量硫代硫酸钠,中和残留的氯。养殖过程中,养殖池内全天充气,保证供氧;所有器具专池专用,使用前均经过消毒;饵料采用配合饵料或高温蒸煮过的鲜活饵料;养殖池每天吸污换水1~2次,并定期(每月)加入甲醛等化学试剂进行池内消毒;定期从各池内抽样,应用光镜、电镜和PCR等方法检测样品携带病原的情况。选取3~5 cm的健康对虾作为人工感染的实验对虾。饲养的对虾品种有:长毛对虾、刀额新对虾、短沟对虾和斑节对虾。

1.4 人工感染

选取同池的大小相近的自养健康长毛对虾60条,分为六组,每组10条,两组为对照组,四组为感染组,暂养于90 L的塑料桶中,充气,保证供氧,每日吸污换水。暂养7 d后,饥饿过夜。对照组投喂配合饵料,感染组投喂以1:10(W/W)混入粗提纯病毒的配合饵料,每日投喂两次,投喂量约为总生物量的10%。水温维持在24~28℃,盐度维持在20‰~25‰。定时监测、记录实验对虾的健康情况,将濒死的实验对虾用于电镜观察。每组观测时间为20 d。

1.5 超薄切片

用病毒提取物感染实验对虾,待症状表现明显时取胃和肝胰腺,切成1 mm³的小块,3%戊二醛固定,2%锇酸后固定,梯度丙酮脱水,Spurr mixture包埋,70℃聚合24 h,常规切片染色,JEM-1200型透射电子显微镜(TEM)观察。

1.6 负染色

取粗提纯病毒10 μL,滴加于覆有Formvar膜的铜网上,3~5 min后,用滤纸吸去多余液体,滴加2%的磷钨酸钠染色3~5 min,吸去多余染液,于室温晾干,TEM观察。

2 结果与讨论

2.1 人工感染

人工感染后,感染组对虾相继出现摄食减少,应激性下降,肝胰腺白浊肿大等症状,继而死亡,每条病虾的甲壳上均可见不同程度的白斑。感染组发病的潜育期一般少于3天,病程很短,多在一周左右,总死亡率达100%。对照组实验对虾健康,在观测时间内无异常死亡。从感染组对虾中可再次分离到该病毒。根据“柯赫法则”,可以确定该病毒是白斑病的致病病毒。

2.2 细胞的病理变化

健康实验对虾的细胞结构完整(图1),细胞器形态正常;核膜清晰可辨,外膜波浪状,内膜平坦,其上附有高电子密度的异染色质;胞质中有内嵴清晰的线粒体,板状的粗面内质网,泡状的滑面内质网以及大量的核糖体等细胞器。细胞内无病毒粒子。

实验对虾发病后,组织细胞出现线粒体形变(图2),细胞结构崩解(图3,4),内质网髓样病变(图5)等明显的病理变化。同时,胞内出现大量病毒,除少数游离(图5)外,大部分病毒相互聚集,形成一个“病毒群”(图7)。病变细胞不形成包含体,病毒仅分布于细胞质中,未见于

表1 对虾白斑病的人工感染试验

Table 1 Artificial infection experiment of white spot disease of shrimp

	样品组号 No. of samples	达80%死亡率的时间(d) Time of 80% mortality(days)	总死亡率(%) Total mortality(%)	总病程(d) Course of disease(days)
对照组	1	—	0	—
control	2	—	0	—
感染组 infected group	1	5	100	5
	2	7	100	9
	3	6	100	6
	4	7	100	10

细胞核。

通常,病毒的排列方式是病毒鉴定的依据之一。该病毒在病毒群中的排列方式差异很大,有的无序(图7),有的则排列整齐,呈结晶状(图8)。我们把同一个病毒群中,以相同规律排列的病毒群体称为“簇”。通常,一个大的病毒群中会有几个病毒簇(图8中的A、B、C),一个病毒簇里的病毒一般按同一方向排列。

2.3 病毒封入体的超微结构

在病变细胞的胞质中,常常出现几个或很多个病毒粒子被胞质膜包起来的现象,这与张立人^[4]等报道的中国对虾非包涵体杆状病毒感染产生的封入体相似,因此,暂将这种膜结构称之为“封入体”。封入体通常没有固定形状(图6),有的为单层膜,有的为多层膜。个别的封入体形状规则,如椭圆形。封入体大小差异很大,小的不足1 μm,大的接近10 μm。封入体中未见以特定晶格方式排列的蛋白基质,只有病毒粒子(有囊膜病毒粒子或无囊膜病毒粒子)和正常的细胞基质,有的还内含一些病毒装配组件。

2.4 病毒粒子的超微结构

超薄切片上观察到的病毒粒子似呈弹状,一端略圆,一端稍尖,直径约80~100 nm,核衣壳外被囊膜(图9)。由于切片上很难看到病毒的全长,因此病毒的长度难以估算,超薄切片上观察到的最长的病毒长330 nm。病毒有双层囊膜,外层囊膜与核衣壳之间的空隙宽约20~25 nm(图10)。也有一些病毒无囊膜(图6),是病毒未完成装配的结果。

负染观察病毒的粗提纯液可看到该病毒的三种形态组成。第一种是结构完整的病毒粒子(图11),呈弹状,囊膜结构致密,外缘较平滑,较尖的一端有尾。病毒粒子(不包括尾部)长约为270~280 nm,最大直径约为80~100 nm,尾长约500~600 nm。第二种是外膜松散的囊膜病毒,外缘不规则,内部核衣壳结构清晰可见(图12)。第三种是失去囊膜的病毒,即病毒核衣壳。粒子呈直杆状,有的粒子两端钝圆(图13),有的一端钝圆;一端平齐(图14),还有的一端或两端有断裂的痕迹,估计是提纯过程中造成的结构损伤。

负染观察到的完整囊膜病毒比囊膜松散的病毒或病毒核衣壳略小,估计是负染液无法渗入完整的囊膜,但可以渗入松散的囊膜并使核衣壳染色,同时使病毒粒子增大。

病毒的衣壳粒呈螺旋状排列(图15),在电镜照片上形成清晰的网状条纹,网线交错形成菱形,长对角线与衣壳长轴平行。核衣壳上有明显的深色横纹,横纹与衣壳的长轴垂直,呈等距离间隔。横纹宽度约为5 nm,间距约为20 nm。每两条深色横纹中间有一条约10 nm宽的灰带。深色横纹和灰带之间有约2.5 nm的亮带。基本上在两条深色横纹之间刚好容纳一排



图1 正常对虾肝胰腺细胞。N:细胞核, Mt:线粒体, ER:内质网, Ri:核糖体($\times 20K$)

图2 人工感染后感染细胞出现线粒体形变($\times 10K$)

图3 人工感染后细胞结构遭到破坏,细胞核暴露在外;细胞核旁有一个封人体,内有很多病毒粒子($\times 6K$)

图4 人工感染后细胞结构遭到破坏,很多线粒体散布在细胞外;未解体的细胞部分有一些游离的病毒粒子($\times 6K$)

图5 内质网髓鞘样病变,旁边有一些游离的病毒粒子($\times 20K$)

图6 细胞核旁多个封人体,有的含囊膜病毒(A),有的含无囊膜病毒(B,C,D,E)。($\times 15K$)

图7 细胞质中的一个大病毒群($\times 5K$)

图8 病毒粒子在一个病毒群中规则排列,并形成几个病毒簇($\times 10K$)

Fig.1 Thin section of normal penaeid shrimp hepatopancreatic cell. N: nucleus, Mt: mitochondria, ER: endoplasmic reticulum, Ri: ribosome ($\times 20K$)

Fig.2 Pathological changes of mitochondria after artificial infecting ($\times 10K$)

Fig.3 Structure of cell is destroyed and nucleus is exposed after artificial infecting. There are many virions in a occlusion-body beside nucleus (N) ($\times 6K$)

Fig.4 Cell structure is destroyed and mitochondria are liberated from the affected cell after artificial infecting. There are some free virions in the disaggregated part of affected cell. ($\times 6K$)

Fig.5 Endoplasmic reticulum (ER) becomes myelin-sheath-like and free virions were distributed in the affected cell ($\times 20K$)

Fig.6 There are many occlusion-bodies beside nucleus, some contain virions with envelope (A), and some contain virions without envelope (B, C, D, E)($\times 15K$)

Fig.7 A big group of virions in cytoplasm ($\times 5K$)

Fig.8 Virions are arranged regularly in a group which includes some clusters of virions ($\times 10K$)

完整的菱形。结构示意图见图16。

大部分病毒核衣壳有13~16个深色横纹,核衣壳大小约为 $280 \sim 320 \times 60 \sim 75$ nm;少数核衣壳的长度和直径差异较大,有的特别细,直径只有40 nm,有的特别长,超过600 nm(29条深色横纹)(图21)。

2.5 病毒的装配

在病变细胞的胞质区域,可见大量的核衣壳、囊膜材料和装配好的病毒粒子(图6);有时还可见一些空衣壳(图9)、无核心病毒(图9,20),以及正在包被囊膜的空衣壳、核衣壳(图9,18,19)和装入两个核衣壳的共囊膜病毒(图17)。其特征与核型多角体的病毒发生基质(virogenic stroma)相似,估计是病毒装配的场所。其中,很多病毒装配区域的线粒体数目明显增多,并发生形变,原有的膜结构被破坏(图20粗箭头所示),附近的封人体有明显的双层膜,形状大小都与线粒体有些相似(图20)。因此,线粒体可能与病毒装配有密切的关系,囊膜和封人体膜可能一部分来源于线粒体膜。

封人体与病毒装配可能也有密切联系。超微病理研究观察到的无囊膜病毒粒子(核衣壳)均聚集成群、正在形成(图6的B,C)或已形成封人体(图6的D,E);其中有的封体内还有一些空衣壳(图6的C,D)。有囊膜病毒粒子形成的封体内也常有一些病毒装配组件(图6的A),多为用于形成囊膜的空泡膜(胞质膜)。

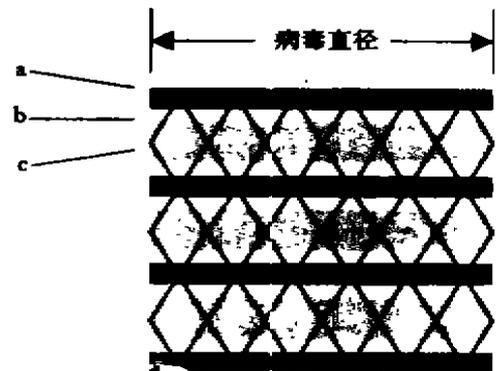


图16 白斑病病毒衣壳精细结构示意图

a. 深色横纹; b. 亮带; c. 灰带

Fig.16 Pattern of fine structure of WSDV virion



图9 空衣壳(↑)、无核心病毒(↑↑)和正常病毒粒子的形态和大小(×50K)

图10 病毒粒子的精细结构(箭头所示处为双层囊膜)(×174K)

图11 一个完整的病毒粒子(可见精细的粒子轮廓及尾)和一个病毒核衣壳(×80K)

图12 外膜松散的病毒粒子,可见内部核衣壳的精细结构(×60K)

图13 两端钝圆的病毒核衣壳(×60K)

图14 一端钝圆,一端平齐的病毒核衣壳(×60K)

图15 (负染)病毒核衣壳的精细结构(×160K)

图17 共囊膜病毒(×20K)

图 18 正在装入囊膜的空衣壳($\times 50K$)

图 19 正在装入囊膜的核衣壳($\times 40K$)

图 20 病毒装配区的双膜封入体和病变线粒体($\times 20K$)

图 21 625 nm 长的核衣壳($\times 80K$)

注:图 1-10、17-21 采用的样品除 1 和 17 出自肝胰腺外,其余均出自前胃。

Fig. 9 Morphology and size of empty capsides (\uparrow), virions without nucleoprotein ($\uparrow\uparrow$) and normal virions ($> 50K$)

Fig. 10 Ultrastructure of virions, arrows point to double membrane ($\times 174K$)

Fig. 11 A intact virion appeared the fine outline and the tail and a nucleocapsid ($\times 80K$)

Fig. 12 A virion with a loose envelope, and the fine structure of capsid of the virion is clear ($\times 60K$)

Fig. 13 A virion with two smooth end ($\times 60K$)

Fig. 14 A virion with one smooth end and one straight end ($\times 60K$)

Fig. 15 Morphology and structure of nucleocapsid negative stain ($\times 160K$)

Fig. 17 Both virions in the same envelope ($\times 20K$)

Fig. 18 A empty capsid is being enclosed with a envelope ($\times 50K$)

Fig. 19 A nucleoprotein is being enclosed with a envelope ($\times 40K$)

Fig. 20 A occlusion-body with two membrane and pathological mitochondria ($\times 20K$)

Fig. 21 A very long nucleocapsid 625 nm in length ($\times 80K$)

Note: All samples derived from heratopancreas except for 1 and 17 from stomach among fig 1~10 and 17~21.

由于所有病毒粒子和病毒装配组件均出现在细胞质中,可以确定,胞质是病毒装配和成熟的场所。至于形成封入体是否是病毒装配的必经步骤,囊膜蛋白和封入体膜上的膜嵌蛋白是否为同种物质,游离的病毒是否源于封入体解体,以及病毒或病毒核衣壳的规则排列是否在病毒装配过程中有某种特定的意义等等问题,仍需进一步研究。

从福州分离到的这种白斑病病毒与其它有报道的白斑病病毒有很多共同之处:它们均造成对虾的暴发性死亡,突出的症状表现为甲壳白斑;它们的形态相似,都为弹状(又称杆状),衣壳均呈螺旋对称;感染细胞均不形成包含体。这些特点表明,它们之间可能存在较近的亲缘关系。但它们也有很多不同,前者分布于细胞质中,而后者存在于细胞核中^[2-10];而且,病毒的超微结构也略有差异,尤其是对于特别长的病毒核衣壳,以前从未有类似的报道。根据上述特点,它们可能是同属异种病毒或同种病毒不同株系,暂称之为“对虾白斑病病毒福州分离株”

致谢 本文研究工作得到福州海洋生物工程研究开发中心万百源主任的大力支持,在此特别致谢。

参 考 文 献

- [1] Yang F, Wang W, Chen R Z, *et al.* A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus DNA [J]. *J Virol Meth*, 1997, 67: 1-4
- [2] 黄健,宋晓玲,于佳,等. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死—对虾暴发性流行病的病原和病理学研究[J]. *海洋水产研究*, 1995, 16(1): 1-10
- [3] 王金星,刘昌彬,张红卫,等. 中国对虾暴发性流行病病原体研究 II 病原体的分离纯化[J]. *海洋学报*, 1997, 19(2): 95-98

- [4] 张建红, 陈稼华, 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[J]. 中国病毒学, 1994, 9(4): 362 - 365
- [5] 陈细法, 陈平, 吴定虎, 等. 养殖对虾一种新杆状病毒的研究[J]. 中国科学(C辑), 1997, 27(5): 415 - 420
- [6] 国际翔, 王丽霞, 李文清, 等. 辽宁沿海养殖对虾爆发性病害的病因分析[J]. 电子显微学报, 1994, 5: 355
- [7] 彭宝珍, 任家鸣, 沈菊英, 等. 急性致死性对虾病的杆状病毒病原研究[J]. 病毒学报, 1995, 11(2): 151 - 157
- [8] 汝少国, 姜明, 李永祺, 等. 中国对虾杆状病毒垂直传播途径的初步探讨[J]. 水产学报, 1998, 22(1): 49 - 55
- [9] 吴友吕, 王方国, 拱健. 长毛对虾杆状病毒病研究[J]. 电子显微学报, 1994, 5: 356
- [10] 李霞, 刘淑范, 李华, 等. 大连地区中国对虾暴发性流行病病理学研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(1): 52 - 59
- [11] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997. 11

Ultrastructure of Fuzhou Isolate of Shrimp White Spot Disease Virus

GUO Yin-han¹, LIN Shi-fa¹, YANG Xiao-qiang², ZHANG Cheng², XIE Lian-hui¹

¹(*Institute of Virology, Fujian Agricultural University, Fuzhou 350002, China*)

²(*Fuzhou Marine Biotech. R & D Center, Fuzhou 350026, China*)

Abstract: A high virulent isolate of White Spot Disease Virus has been got in Fuzhou. The virion is in cytoplasm. Intact virion is enveloped and bullet-shaped, $d = 80 - 100$ nm. There is no inclusion body in cell, but sometime a particular structure named occlusion-body (some virions are occluded by membrane) in cytoplasm. Nucleocapsid, observed by negative stain, is rod-shaped, and its length and width are various. It is possible that the isolate is different from other isolates of White Spot Disease Virus, so the isolate is named "Fuzhou isolate of White Spot Disease Virus".

Key words: Shrimp; White Spot Disease Virus; Fuzhou isolate; Ultrastructure