

395-399
15
S945
中华绒螯蟹呼肠孤病毒样病毒病研究*贡成良¹, 薛仁宇¹, 曹广力¹, 魏育红¹, 朱越雄¹, 陈辉², 吴祥甫³¹(苏州大学基因工程实验室, 江苏 苏州 215151)²(中国水产科学院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)³(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要:为了探讨中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)颤抖病的发生原因,从表现出颤抖症状的中华绒螯蟹中初步分离纯化出一种病毒,人工感染健康蟹,出现明显的阳性反应,并从人工感染的蟹的血液、肠道、性腺等组织中检测到病毒,表明分离到的病毒为中华绒螯蟹的病原,且对野生锯齿华溪蟹(*Sesarma < Holometapus > dehanni*)也具感染性。电镜观察结果显示该病毒粒子呈球状,无囊膜,大小为55 nm左右。病毒核酸在1%琼脂糖凝胶电泳中,电泳图谱呈现3/3/4/2型,总分子量约20 kb。该核酸对DNase I不敏感,对RNase敏感,推测病毒核酸为dsRNA,从病毒形态大小、病毒核酸等特性初步确定该病毒为呼肠孤病毒样病毒(Reovirus-like Virus)。该研究为探讨中华绒螯蟹颤抖病的发生原因及防治方法有很大的指导意义。

关键词:中华绒螯蟹; 颤抖病; 呼肠孤病毒样病毒; 病毒核酸**中图分类号:** S947.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2000)04-0395-05

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是我国主要养殖的名贵水产品,近年来由于一种被称为“颤抖病”的暴发流行,给中华绒螯蟹养殖企业和养殖户造成了极大的经济损失,由于病因不明,无针对性的防治措施,该病已成为制约中华绒螯蟹养殖业持续健康发展的最主要因素之一。笔者从步足表现出颤抖症状的中华绒螯蟹中初步分离纯化了一种呼肠孤病毒样病毒,并用粗纯化的病毒进行人工感染,被感染的蟹表现明显的颤抖症状,且能从人工感染的蟹中再次检测到病毒,确认所分离的病毒为中华绒螯蟹的病原之一。

关于蟹类病毒病的研究,国外已有较多的报道。发现引起蟹类疾病的病毒有杆状病毒样病毒(White spot syndrome virus, WSSV)^[1],呼肠孤病毒样病毒(Reovirus-like Virus)^[2,3],细小病毒样病毒(Parvo-like Virus)^[4]以及轮状病毒(Rotavirus)^[5]等,但这些研究均不涉及中华绒螯蟹。国内关于中华绒螯蟹病毒病的研究刚起步。严隽箕(1995)报道了虾池中蟹的病毒病^[6],姜静颖(1996)对中华绒螯蟹中的一种球状病毒粒子进行了电镜观察,但均未涉及人工感染、病理等方面的研究^[7]。陆宏达(1999)从表现颤抖症状的中华绒螯蟹中发现了一种小核糖核酸病毒(Picornavirus),并做了病理观察^[8]。本研究从表现出颤抖症状病蟹中分离到一株

收稿日期:1999-09-03,修回日期:1999-12-27

* 基金项目:江苏省教育委员会自然科学基金资助项目(99KJB240001)

作者简介:贡成良(通讯作者),(1965年-),男,江苏丹阳市人,副教授、博士,主要研究方向为特种经济动物病理及病毒分子生物学。

不同于已报道的病毒,从病毒的形态、核酸类型,病毒的感染性等方面进行了初步研究,这对进一步探讨颤抖病的病因及防治方法有很大的指导意义。

1 材料与方 法

1.1 病料

病蟹采自江苏省昆山某养殖场,病蟹有明显“颤抖”特征。

1.2 试剂

RNase、DNase I、Sepharose 2B 为 GIBCO BRL 公司产品。

1.3 病毒粗纯化 病蟹2只(共约50g)清洗去壳,加PBS(pH7.2 0.01 mol/L)100 mL,经组织匀浆后,15 000 r/min 4℃ 20 min 离心,上清用45%硫酸铵盐析过夜,15 000 r/min 4℃ 20 min 离心,沉淀PBS溶解后,用0.45 μm 滤膜过滤,滤液在PBS中透析24小时,尔后15 000 r/min 4℃ 15 min 离心,上清用Sepharose 2B层析,洗脱液为PBS,分部收集,将OD₂₆₀/OD₂₈₀>1的部分浓缩至2 mL备用。

1.4 人工感染

健康中华绒螯蟹由苏州工业园区阳澄湖蟹业有限公司馈赠;锯齿华溪蟹(*Sesarma < Holometapus > dehanni*)购于农贸市场。在室内水族箱中驯养一周以上,随机分组进行人工感染。人工感染方法有:①在第三步足以粗纯化的病毒10 μL/只注射;②投喂病蟹的卵巢及肝;③粗纯化的病毒从口壳边缘渗人;④在病蟹匀浆液中饲养。所有人工感染均同设对照,其中①、③为PBS;②用健康蟹组织;④健康蟹组织匀浆。

1.5 负染 粗纯化的病毒悬液经2%磷钨酸染色后进行电镜观察。

1.6 核酸的抽提及电泳

粗纯病毒悬液经酚、酚/氯仿抽提后,加总体积10%的3 mol/L 醋酸钠和2倍体积预冷无水乙醇,12 000 r/min 4℃ 10 min 后获病毒核酸;电泳琼脂糖浓度为1%,电泳缓冲液为TAE缓冲液,在25 mA 4 V/cm 条件下电泳4 h后,于紫外检测仪下观察拍照。

2 结果

2.1 病蟹的症状

病蟹患病初期症状不太明显,后期行动趋缓,对外界的刺激不敏感,步足将蟹支撑起来,出现程度不同的阵发性颤抖,可持续1~2天,病蟹指节段变红(也有人称红肢病),步足上有明显的锈斑。濒死前步足表现为卷缩,病蟹血色微混,血液不易凝固,鳃丝褐色,肝区呈糜烂状。

2.2 人工感染

用不同方法人工感染健康扣蟹,结果如表1所示。健康扣蟹投喂表现颤抖症状的病蟹卵巢及肝,32℃饲养第5天全部死亡,而在25~28℃饲养到第7天后才死亡,用上述人工感染发病的死蟹投喂健康扣蟹,32℃饲养,第4天又表现出明显的阳性反应;健康扣蟹以10 μL/只注射粗纯化病毒,室温下饲养(20~25℃),7 d后开始死亡,血液中可以检查到病毒粒子,第9天移入32℃饲养,第11天全部死亡;健康扣蟹投喂病蟹匀浆液,25~28℃饲养,第3天换水,改喂健康蟹肉,第6天病蟹表现出明显颤抖症状;第7天死亡;健康扣蟹从口壳边缘以1 mL/只渗人粗纯化病毒,第5天蟹反应迟钝,步足出现锈斑,第7天濒于死亡。所有人工感染的扣蟹均表现出不同程度的颤抖,在血淋巴、肠道组织、性腺中都可以检查到病毒粒子,而对照区则检查不到。此外,用病蟹投喂锯齿华溪蟹(*Sesarma < Holometapus > dehanni*),6~7 d后可出现同样病症,并可在患病的蟹中检测到病毒粒子。

表1 人工感染健康扣蟹试验

Table 1 Artificial infection of the juvenile crab

病毒源	回感方法	感染宿主	水温(℃)	供试数(只)	发病数(只)	死亡时间(d)
病蟹卵巢及肝	投喂	中华绒螯蟹	32	4	4	5
病蟹卵巢及肝	投喂	中华绒螯蟹	25~28	4	4	7
人工回感病蟹	投喂	中华绒螯蟹	32	4	4	4
粗纯病毒	1 mL/只口壳边缘渗入	中华绒螯蟹	25~28	3	3	7
病蟹匀浆液	投喂	中华绒螯蟹	25~28	4	4	7
粗纯病毒	注射 10 μL/只	中华绒螯蟹	20~25, 9 d后 32	4	4	11
病蟹	投喂	锯齿华溪蟹	25~28	6	6	7

2.3 病毒形态

粗纯化的病毒经磷钨酸负染后,在电镜下可见球状病毒粒子(图1),大小约为 55 nm。健康蟹经同样的纯化方法,检测不到病毒粒子。



图1 病毒粒子的形态

Fig. 1 Morphology of the virion

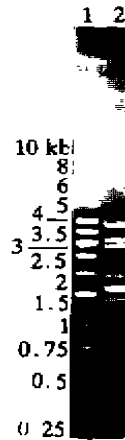


图2 病毒核酸的电泳图谱

1. 标准分子量 2. 病毒核酸

Fig. 2 Electrophoretic pattern of nucleic acid of the virion

2.4 病毒核酸

抽提的病毒核酸经 1% 琼脂糖电泳后,如图 2 所示,病毒基因组分节段,可见 12 个片段。电泳图谱为 3/3/4/2 型。以标准分子量为标准,通过回归分析,计算出的各片段的分子量大小如表 2 所示。病毒核酸的总分子量约为 20 kb。根据电泳图谱的特点,推测第 5、第 9 条带都含有 1 个分子以上的分子质量相似且迁移率相似的核酸分子,因此分离到的病毒的基因组至少有 14 个节段。病毒核酸 20 μL (1.5 μg) 变性后,加 1 μL RNase (10 mg/mL), 37℃ 保温 1 h 后,电泳检测发现病毒核酸被降解;而用 DNase I 2 μL (1 u/μL), 37℃ 处理 1 h,病毒核酸的电泳图谱不变,推测病毒核酸为 dsRNA。

3 讨论

自从1995年中华绒螯蟹颤抖病暴发以来,人们对该病的发生原因进行了研究分析,有观点认为是由细菌感染引起,但至今未见细菌分离、回感成功的报道;也有观点认为是非生物因素引起的^[9],但缺乏科学的实验依据。陆宏达等(1999)通过电镜观察和回感试验,认为一种小核糖核酸病毒的感染可导致中华绒螯蟹表现出颤抖症状^[8]。笔者从表现出颤抖症状的病蟹中初步分离纯化了一种不同的病毒,从病毒粒子的形态、大小、核酸特点来看,该病毒类似于呼肠孤病毒,从病毒的基因组的分节段情况分析,该病毒与水生呼肠孤病毒属的特点不一致,基因组的14个片段代替了水生呼肠孤病毒属的11个基因组片段,电泳图谱为3/3/4/2

型,也不同于从地中海蟹(*Carcinus mediterraneus*)分离到呼肠孤病毒的核酸电泳图谱(1/5/6)^[2],同样在分类上可能属于一种新的病毒。水产养殖中,疾病表现非常复杂,往往表现出一症多病或一病多症,从回感结果分析,笔者所分离的病毒肯定是中华绒螯蟹颤抖病的病原之一,且表现出强烈的致病性。温度与该病的发生有密切的关系,32℃明显加速病势的发展,这同生产上6~9月份颤抖病流行暴发的气象条件一致。给蟹注射病毒、投喂病蟹组织、病蟹组织匀浆以及从口壳边缘渗入病毒,都可以引起感染,说明该病毒可以食下传染、创伤传染,也可以从体表渗入传染。该病毒对锯齿华溪蟹也表现出致病性,由此可以推测锯齿华溪蟹可能是颤抖病的传染源之一。从寄生组织来看,该病毒可以在性腺中寄生,但是否可以引起垂直传染还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Kanchanaphum P, Wongteerasupaya C, Stidilokratana N, *et al.* Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Dis Aquat Organ*, 1991, 43(3):193-196
- [2] Montanie H, Bossy JP, Bonami JR. Morphological and genomic characterization of two reoviruses (P and W2) pathogenic for marine crustaceans; do they constitute a novel genus of the Reoviridae family [J]. *J Gen Virol*, 1993, 74:1555-1561
- [3] Mari J, Bonami JR. W2 virus infection of the crustacean *Carcinus mediterraneus*; a reovirus disease [J]. *J Gen Virol*, 1988, 69:561-571
- [4] Mari J, Bonami JR. A parvo-like virus from the crab *Carcinus mediterraneus*; pathological aspects, ultrastructure of the agent, and first biochemical characterization [J]. *J Invertebr Pathol*, 1988, 51(2):145-156
- [5] Seidel KM, Goyal SM, Rao VC, *et al.* Concentration of rotavirus and enteroviruses from blue crabs (*Callinectes sapidus*) [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 46(6):1293-1296
- [6] 严冀箕. 虾池中中华绒螯蟹病毒的研究[J]. *水产科学*, 1995, 14(3):14-15
- [7] 姜静颖, 邢殿楼. 池塘养殖中华绒螯蟹幼蟹的一种球状病毒粒子的电镜观察[J]. *大连水产学院学报*, 1996, 11(1):51-53

表2 病毒基因组各节段的分子量

Table 2 Molecular weight of genomic segments of virus

No	病毒核酸分子量(kb)
1	3.67
2	3.11
3	2.79
4	1.76
5	1.56*
6	1.29
7	1.01
8	0.92
9	0.75*
10	0.64
11	0.41
12	0.28
总分子量	20.50

(*以2倍计算分子量)

- [8] 陆宏达,范丽萍,薛美. 中华绒螯蟹小核糖核酸病毒病及其组织病理学[J]. 水产学报, 1999, 23(1): 61 - 68
- [9] 潘连德. 河蟹“抖脚”症的病理分析及防治方法初探[J]. 中国水产, 1999, 1: 30 - 31

Study on Reovirus-like Virus of *Eriocheir sinensis*

GONG Cheng-liang¹, XUE Ren-yu¹, CAO Guang-li¹, WEI Yu-hong¹,
ZHU Yue-xiong¹, CHEN Hui², WU Xiang-fu³

¹(Gene Engineering Lab of Suzhou University, Jiangsu Suzhou 215151, China)

²(Freshwater Fisheries Research Center, The Chinese Academy of Aquatic Sciences,
Jiangsu Wuxi 214081, China)

³(Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: In order to find out the reason for causing shiver disease of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) a virus was isolated from diseased Chinese mitten crab. Symptom of normal crab was positive after it had been infected artificially with preliminary pure virion from the shiver crab. It was decided that this virus could be detected in the blood, intestinal canal and germinative gland. The virus was also infective to *Sesarma < Holometapus > dehanni*. The virion was globose, no envelope and about 55 nm in size by electron microscope observation. The electrophoretotype of the viral nucleic acid in 1% agarose was 3/3/4/2 in four different size classes, and total molecular weight was about 20 kb. The nucleic acid should be a dsRNA by the electrophoretotype and the character of sensitivity to RNase and not sensitivity to DNase I. The classification of the virus was proposed to reoviridae family by genome and morphology. The research is significant in the discussing the cause of shiver disease and preventing and treating the disease.

Key words: *Eriocheir sinensis*; Shiver disease; Reovirus-like virus; Viral nucleic acid