

## 鳊鱼病毒结构特征与形态发生\*

方勤<sup>1,2</sup>, 艾桃山<sup>3</sup>, 汪亚平<sup>1</sup>, 朱作言<sup>1</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北武汉 430072; 2. 中国科学院武汉病毒研究所, 湖北武汉 430071; 3. 武汉市水产科学研究所, 湖北武汉 430006)

## Morphology and Morphogenesis of Mandarin fish Virus

FANG Qin<sup>1,2</sup>, AI Tao-shan<sup>3</sup>, WANG Ya-ping<sup>1</sup>, ZHU Zuo-yan<sup>1</sup>

(1. State key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071, China; 3. Wuhan Institute of fishery, Wuhan 430006, China)

**Abstract:** The structure and morphogenesis of Mandarin fish (*Siniperca chuats*) virus were studied. The matured virions were about  $135\text{nm} \pm 10$  in diameter with envelope outside. The intact virus is composed of three parts, its nucleocapsid was about  $90\text{nm} \pm 5$ , and the envelope was around  $18\text{nm} \pm 3$ , the air space between core and envelope was about  $27\text{nm} \pm 2$ . The morphogenesis of the virus was observed in the ultra-thin section of spleen tissue cells with outbreak lethal disease, which were collected in different stages of infected mandarin fish. At early stage infected fish section, it showed typical virus entry into cell cytoplasm via viropexis. There were many viromatrix, unmaturred, matured and viron released phases, which were found in middle and late phase of diseased fish. In addition, the same virions were also detected in diseased kidney, liver, heart and gill tissue. Artificial infected fish also caused acute lethal disease with same virus found in its tissue section.

**Key words:** Mandarin fish Virus, Morphology, Morphogenesis

**摘要:** 从患流行病的鳊鱼脾脏组织超微切片中观察到大量的病毒颗粒。该完整病毒颗粒直径约  $135\text{nm} \pm 10$ , 具包膜。成熟病毒核壳体约  $90\text{nm} \pm 5$ , 包膜厚度约  $18\text{nm} \pm 3$ , 核壳体与包膜间的非电子致密区约有  $27\text{nm} \pm 2$ 。通过对不同发病阶段发病鳊鱼脾脏组织切片的电镜观察, 在感染初期的鳊鱼脾脏组织观察到病毒的吸附及典型的内吞入侵方式, 在感染中后期的脾脏组织细胞质内观察到病毒发生基质及病毒核壳、包膜形成与病毒的释放。此外, 在染病鳊鱼的肾、心、肝、及鳃组织亦观察到相同结构的病毒粒子。回接实验证实该病毒为引起鳊鱼暴发流行病的病原。

**关键词:** 鳊鱼病毒; 结构; 形态发生

中图分类号: Q939.4 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2001)04-0382-04

鳊鱼暴发流行病引起鳊鱼鱼苗大批死亡, 严重地威胁我国鳊鱼人工养殖业健康稳定地发展。在病原研究方面, 自 1995 年王春等首次对该病因进行推测性分析<sup>[1]</sup>, 随后吴淑勤等相继报道引起该病的病原为病毒<sup>[2-5,7,8]</sup>, 并进行了病毒纯化、核酸检测

等初步研究<sup>[4,9]</sup>, 但未见对该病毒病原生物学特性系统研究报导。由于对该病毒结构特征与生物学特性不甚了解, 近年来在对该病诊断及防治技术研究上仍未见明显进展。目前, 该病在珠江三角洲地区鳊鱼养殖基地仍有上升趋势, 每年造成的经济损失

收稿日期: 2001-04-02, 修回日期: 2001-06-13

\* 基金项目: “淡水生态与生物技术国家重点实验室”开放课题(2000FB07); 湖北省自然科学基金资助(99J097); 武汉市晨光计划(995004108G)  
作者简介: 方勤(1961-), 女, 湖北省籍, 副研究员, 主要从事水生动物病毒的分子生物学及基因工程研究。

多达数亿元。为寻找有效的防治途径, 作者在对鳊鱼病毒病原及细胞感染特性研究基础上<sup>[5]</sup>。进一步开展了鳊鱼病毒结构特征与形态发生研究, 这一结果将为该病毒的分类鉴定与复制研究提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 鱼材料来源

正常鳊鱼购自武汉市武昌水果湖市场。发病的鳊鱼材料于2000年8月取自广东珠江三角洲鳊鱼高产养殖鱼塘, 发病鳊鱼平均体重约200g。

### 1.2 患病鳊鱼内脏组织浸取液制备

取病鱼的肾、肝、脾及心等内脏, 用PBS漂洗三次后, 按其重量加入适量体积的1XPBS(pH7.4)工作液。用组织匀浆器磨碎, 最后制成1:10粗制病毒悬液。该悬液经8000rpm/min离心30min(Hitachi, RPR-20-2), 除去组织碎片及杂质, 取10ml过滤除菌后用于细胞感染实验<sup>[5]</sup>。其余悬液置-20℃保存, 用于人工感染实验。

### 1.3 病鱼组织超薄切片制备及电镜观察

取健康及患病鳊鱼内脏组织(脾、肝、肾、心)及鳃, 用刀片切成直径约1~2mm<sup>3</sup>的小块, 经2.5%的戊二醛作预固定后, 再用1%四氧化锇固定1~2h。经一系列酒精脱水后, 按实验室常规方法进行包埋、超薄切; 2%醋酸双氧铀染色后, 在日立H-7000FA型透射电镜下进行观察。

### 1.4 回接实验

采用病鱼组织匀浆液及细胞培养病毒<sup>[5]</sup>悬液分别对2龄健康鳊鱼进行人工感染实验。实验鱼尾注射0.1mL病毒液, 正常对照每尾注射0.1mL生理盐水或Eagle's MEM培养基。每个实验设置3组重复及一组对照。

## 2 结果

### 2.1 病毒结构特征

在超薄切片的电镜下观察到的病毒颗粒大小均一, 形状为球形, 有包膜。从图1我们可以看到, 完整病毒颗粒直径约135nm±10, 成熟病毒核壳体约90nm±5, 包膜厚度约18nm±3, 核壳体与包膜间的非电子致密区约有27nm±2。成熟的鳊鱼病毒颗粒在患病组织中的排列为非晶格式。

### 2.2 病毒的形态发生



图1 鳊鱼病毒的形态结构(X30000)

Fig.1 The morphology of mandarin fish Virus (X30000)

通过对不同发病时期鳊鱼脾脏组织的切片观察, 我们捕捉到了鳊鱼病毒的形态发生过程(图2A~F)。在染病初期(约2~3d)的鳊鱼脾脏组织中, 观察到完整病毒吸附在组织细胞表面(图2A)及进入细胞的状态(图2B)。随着病毒的人侵, 病毒包膜周围产生较为明显的囊泡(图2C)将其与细胞质隔开。从图2C中, 我们可以清楚地看到有些病毒包膜已被融合。这是由于细胞溶酶体的作用, 病毒包膜与细胞溶酶体融合, 病毒核壳释放到细胞质中。在发病中后期组织切片中(5~7d), 观察到大量病毒发生基质及正在形成的病毒核心(图2D), 病毒核壳体包装后, 病毒在细胞质内包装上包膜(图2E), 在这些病毒中, 病毒的包膜大多数为独立包装, 但也有两个或多个核壳体聚在一起的情况。随着病毒成熟, 导致细胞破裂, 新生病毒随之释放到细胞腔中(图2F)。

### 2.3 回接实验结果

采用病鱼组织匀浆液及鳊鱼病毒细胞培养液分别对健康鳊鱼进行回接实验。感染病毒的鳊鱼在7~10d死亡, 而对照鳊鱼生长良好。通过对人工感染的鳊鱼内脏组织切片观察, 我们在人工感染病鱼的内脏组织细胞内发现的病毒粒子结构与自然养殖条件下的病毒颗粒完全相同(图片未示), 通过对鳊鱼内脏(脾、肾、肝、心、肠)及鳃组织细致的超薄切片观察, 结果发现, 在鳊鱼脾组织细胞有大量成片的病毒颗粒分布, 在肾、肝、心及鳃组织也发现同样的病毒粒子, 但病毒分散, 数量稀少。在肠组织未发现病毒颗粒。

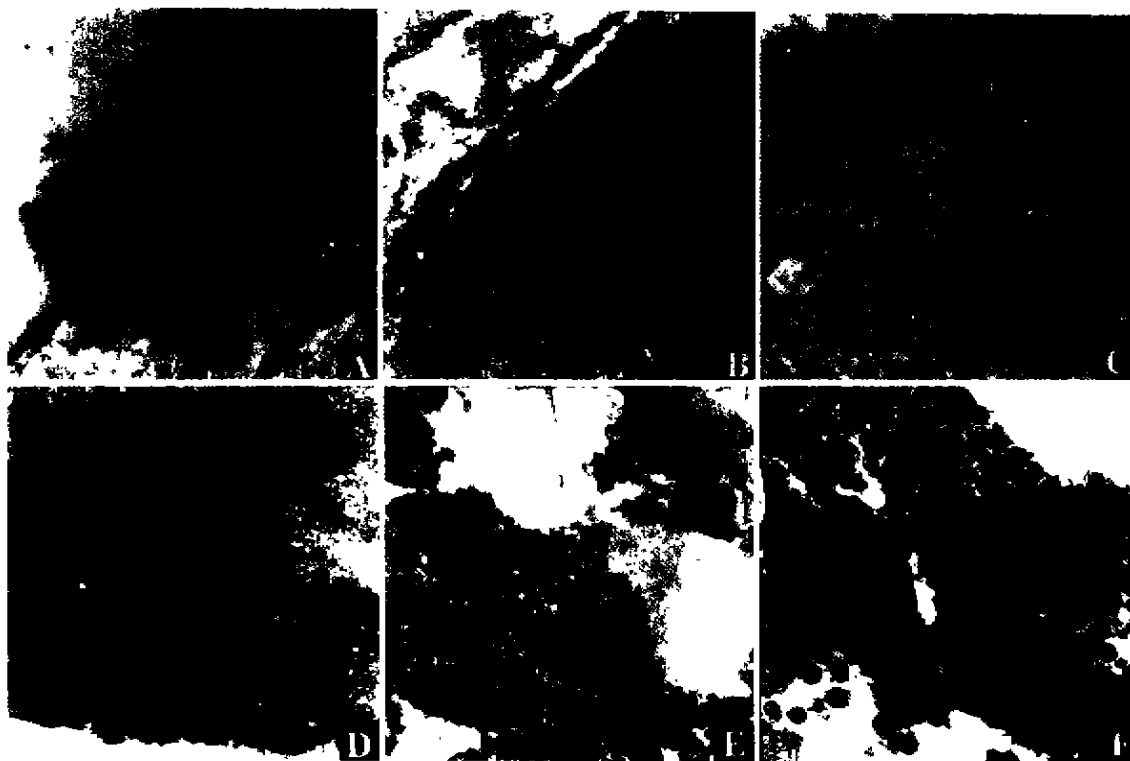


图 2 鳊鱼病毒的形态发生

A, 病毒的吸附(如箭头所示,  $\times 48,000$ ); B, 病毒的进入(如箭头所示,  $\times 20,000$ ); C, 病毒囊泡形成(箭头所示,  $\times 30,000$ ); D, 病毒发生基质与核壳体形成(如箭头所示,  $\times 30,000$ ); E, 病毒包膜形成(如箭头所示,  $\times 20,000$ ); F, 成熟病毒的释放( $\times 20,000$ )。

Fig. 2 Morphogenesis of mandarin fish virus in infected spleen tissue

A, Absorption of the virus (showed as arrow,  $\times 48,000$ ); B, Entry of the virus (as arrow show,  $\times 20,000$ ); C, Formation of vesicles (as arrow show,  $\times 30,000$ ); D, Viromatrix and core capsid (as arrow shows,  $\times 30,000$ ); E, Formation of virus envelop (as arrow show,  $\times 20,000$ ); F, Release of matured virions ( $\times 20,000$ ).

### 3 讨论

本实验通过典型患病鳊鱼及不同染病时期鳊鱼脾脏组织的超薄切片观察,对鳊鱼病毒结构组成与形态发生有了一定的认识。从本研究结果来看,鳊鱼病毒的吸附与入侵与内吞作用极为相似<sup>[6,16]</sup>。完整病毒进入组织细胞质后,即形成吞噬泡,包膜的解体是因为溶酶体与吞噬泡结合形成次级溶酶体后,溶酶体内的酸性 pH 引发由包膜糖蛋白介导的膜融合反应,这样导致病毒包膜与溶酶体膜融合,病毒核壳释放到细胞质中。本文图 2A - C 箭头所示为较为典型的内吞进入方式,这一特点与虹彩病毒的感染相吻合<sup>[6]</sup>。我们从本研究中还发现,鳊鱼病毒的包膜是在细胞质内形成,其包膜是通过细胞器(如内质网或高尔基体)芽殖,而不是细胞质膜芽殖。包膜形成后,导致细胞裂解,病毒释放。将上述结果与虹彩病毒的形态与感染特点相比较,可以看出,鳊鱼病

毒的大小、结构及形态发生与虹彩病毒较为接近。当然,进一步的鉴定尚需通过病毒核酸蛋白的理化及分子生物学特性来确定。

通过对鳊鱼内脏组织超薄切片的电镜观察,在不同染病阶段的鳊鱼脾脏组织观察到该病毒的发生,经回接实验,证实该病毒为引起鳊鱼暴发流行病的病原。根据对病毒感染鳊鱼内脏切片的电镜观察,我们认为鳊鱼的脾脏组织是病毒侵染复制的重要场所,鳊鱼病毒的侵染可能具嗜脾特性。这一结论与 Ogawa 等对其它水生生物暴发流行病的病理组织分析与病毒形态发生研究较相一致<sup>[11-15]</sup>。由于病毒的内吞,使得脾脏细胞受到破坏,失去正常的免疫功能,以致通过淋巴及循环系统扩散到全身器官组织,最后使鳊鱼死亡。我们在多次采样的暴发流行病鳊鱼内脏组织超薄切片中,未发现其它病毒颗粒的存在;并通过鱼体回接实验加以证实。这一结果可以排除鳊鱼暴发流行病是由多种病毒复合感染

的可能性。虽然许多鳊鱼疾病由细菌、寄生虫所致,但由病毒引发的疾病具有特异的临床症状及流行规律。我们只有从病原着手,在确定其形态特征、生物学与理化特性基础上,才能进一步制定其防治策略。  
致谢:本所电镜室邓红、袁爱华协助拍摄电镜照片,特此致谢。

### 参考文献

- [1] 王春,董斌,刘琳.鳊鱼暴发性流行病病因初探及预防对策[J].中国水产,1995,(3):24-28.
- [2] 吴淑勤,李新辉,潘厚军,等.鳊暴发性传染病病原研究[J].水产学报,1997,21(增刊):56-60.
- [3] 何建国,翁少群,黄志坚,等.鳊暴发性流行病病毒性病原的研究[J].中山大学学报(自然科学版),1998,37(5):77-79.
- [4] 李新辉,吴淑勤,潘厚军,等.一种检测鳊鱼病毒方法[J].中国水产科学,1997,4(5):112-114.
- [5] 方勤,艾桃山,邹桂平,等.鳊鱼病毒病原及细胞感染特性的研究[J].中国病毒学,2000,15(3):297-301.
- [6] 杨复华.病毒学[M].长沙:湖南科学技术出版社,1992.
- [7] 张奇亚,李正秋.在患病鳊鱼组织中观察到3种病毒[J].科学通报,1999,44(2),192-195.
- [8] 张奇亚,李正秋.鳊鱼病毒病原的检出及组织病理分析[J].水生生物学报,1999,23(2):151-154.
- [9] 李新辉,吴淑勤,李凯彬,等.鳊鱼病毒 PCR 诊断方法的建立[J].水产学报,2001,24(10):43-46.
- [10] 潘厚军,吴淑勤,石存斌,等.鳊鱼疫苗预防鳊鱼病毒性暴发性传染病实验[J].水产科技,2000,(6):18-21.
- [11] Ogasawa M, Ahne W, Fischer-Scher T, et al. Pathomorphological alterations in sheatfish fry *Silurus glanis* experimentally infected with an iridovirus-like agent[J]. DAO, 1990,9:187-191.
- [12] Rodger H D, Knobe M, Macartney A, et al. Systemic iridovirus infection in freshwater angelfish, *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein)[J]. J Fish Dis 1997,20:69-70.
- [13] Langdon J S, Humphrey J D, Williams L M. First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like virus pathogen from redfin perch, *Perca fluviatilis* L.[J]. J Fish Dis, 1986,9:263-268.
- [14] McGrogan D G, Ostland V E, Byrne P J, et al. Systemic disease involving an iridovirus-like agent in cultured tilapia, *Oreochromis niloticus* L. - a case report[J]. J Fish Dis, 1998,21:149-152.
- [15] Langdon J S, Humphrey J D, Williams L M. Outbreaks of an EHNV-like iridovirus in cultured rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Australia[J]. J Fish Dis, 1988,11:92-96.
- [16] Fields B N, Knipe D M, Howley P M, et al. Virology [M]. Third Edition, Philadelphia; Lippincott-Raven Publishers, 1996.