

河蟹颤抖病病毒的分离纯化及其动物致病性试验*

孙学强, 陆承平**

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京 210095)

Isolation and Purification of the *Eriocheir sinensis* "Tremble Disease" Virus and Its Pathogenicity on Crabs

SUN Xue-qiang, LU Cheng-ping**

(Key lab of Animal Disease Diagnosis & Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agri Univ, Nanjing 210095, China)

Abstract: The *Eriocheir sinensis* (ES) that suffered "tremble disease" by artificial infection were homogenated. The supernatant was concentrated with polyethyleneglycol (PEG) 6000 and purified by gel filtration chromatograph with Sepharose 4B. The eluates collected were concentrated at 4°C. The virus particles in the first part of the eluates could be seen under electron microscopy. The diameter of virions varied in 50~100nm. *Sinopotamon denticulatum* artificial infected with the purified virus became ill. By double antibody sandwich ELISA detection, the results showed that there was significant difference between the infected and the control crabs.

Key words: *Eriocheir sinensis*; Tremble disease; Virus

摘要: 将人工复制发病的河蟹(中华绒螯蟹)组织匀浆,离心上清经聚乙二醇(PEG 6000)沉淀,再经分子筛层析,分部收集分别测定 256~300nm 的吸光值。各收集峰用 PEG20000,于 4°C 浓缩,制作负染标本经透射电镜观察,发现在第一峰浓缩液中存在大量球状病毒颗粒,大小 50~100nm,用纯化的病毒进行动物致病性试验,接种石蟹(锯齿华溪蟹)发生"颤抖病",并用 ELISA 双抗体夹心法进行检测,显示感染石蟹较对照石蟹有明显差异。

关键词: 河蟹;颤抖病;病毒

中图分类号:S945 文章标识码:A 文章编号:1003-5125(2002)02-0185-04

随着河蟹养殖业的迅猛发展,"颤抖病"的危害也日益严重,已成为目前威胁我国河蟹养殖业发展的最主要的疾病。尽管有报道数种细菌与该病有一定的关系,但是许多研究结果表明,其病原是一种病毒。孙学强等用病蟹组织除菌滤液,接种健康河蟹复制"颤抖病"获得成功,并在电镜下观察到病毒的存在^[1]。为了进一步阐明病毒的特点及分类地位,有必要探讨分离纯化病毒的方法,并证实纯化病毒对动物是否有致病性。

1 材料与方法

1.1 病毒纯化

1.1.1 病料及处理 取人工复制发生"颤抖病"河蟹(中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis*, ES)20只,其中第1代(BY1)及第2代(BY2)各10只^[1],解剖肝胰脏、胃肠、腮、神经等组织,取样作超薄切片,电镜检查证实有病毒存在(图4)。取-20°C保存的BY1 BY2上述组织湿重120g,加入含5mmol/L EDTA、500μg PMSF的120mL PBS,经高速组织捣碎机捣碎。匀浆液经低速1200g离心20min,弃去上层油脂和下层沉淀,取中层澄清液250mL,并重复离心两次,澄清液再经高速离心20000g 20min。

1.1.2 沉淀、层析和浓缩 40%PEG6000溶液100mL通过虹吸作用缓缓加到300mL匀浆液中,

收稿日期:2001-09-28,修回日期:2001-12-09

* 基金项目:江苏省科委应用基础项目(Q9902)

作者简介:孙学强(1974-),男,硕士,主要从事兽医病毒学与免疫学的研究

** 通讯作者:Correspondence author

同时用磁力搅拌混合均匀,混合液 4℃ 静置 12~24h。将混合液 400mL 经 5000g 离心 30min, 弃去上清, 沉淀用 100mL 生理盐水悬浮, 然后再经 15 000g 离心 10min, 上清分装 -20℃ 冻存^[4-6]。

分离材料选择 Sepharose 4B, 层析操作参照张龙翔方法^[3]。柱高 99cm 直径 4cm, 柱床体积 180mL, 上样前样品解冻后, 经 20 000g 离心 4℃, 10min, 取上清, 每次上样 4mL, 自动收集仪收集, 分峰合并。并测定各峰的 250~300nm 的吸光值。

各峰收集液装入透析袋, 覆盖 PEG20000 固体, 于 4℃ 做 10 倍浓缩^[2]。

1.1.3 电镜负染观察 第一峰和第二峰浓缩液取样制备电镜(EM)负染样本, 日立 H-60 透射电镜观察。

1.2 纯化病毒的动物致病性试验及 ELISA 检测

石蟹(锯齿华溪蟹, *Sinopotamon denticulatum*, SD)43 只购自南京市水产市场, 来自长江水域, 经实验室暂养 8 天, 健康无病 按照孙学强等方法^[1]取 16 只接种纯化的病毒, 每只 0.2mL, 并设立病蟹组织匀浆无菌滤液阳性对照组和生理盐水阴性对照组。试验结束后, 三组分别取 5 只, 解剖取肝胰脏和胃肠组织称重, 加入等体积的 PBS, 匀浆后进行 ELISA 检测^[6]。

2 结果

2.1 病毒纯化与定量

在层析过程中, 由洗脱曲线可见两个峰即第 I 峰和第 II 峰(图 1), 样品中的蛋白组分明显的分为两部分, 分别洗脱出。

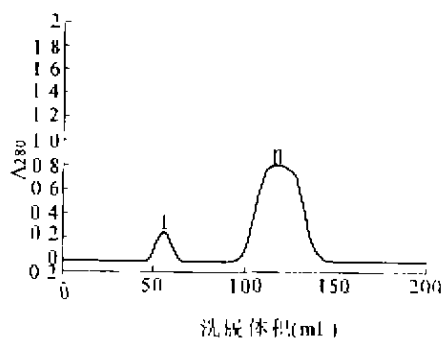


图 1 河蟹病料沉淀上清柱层析洗脱曲线
Fig 1 Elution of the supernatants by PEG

第 I 峰和第 II 峰在 256~300nm 的波长范围内的吸光值表明, 第 I 峰在波长 260nm 左右吸光值较

280nm 高, 而第 II 峰在波长 280nm 附近的吸光值明显高于 260nm(图 2)。根据紫外吸收法计算病毒蛋白浓度为 0.22mg/mL。

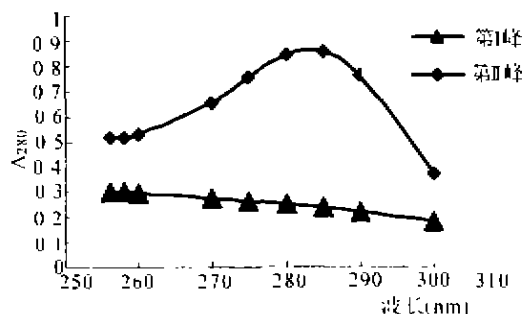


图 2 河蟹病料沉淀上清柱层析各峰 A 值
Fig 2 Absorb value of the two parts of the elution

2.2 电镜观察

在透射电下发现在第 I 峰样本中有大量球状病毒粒子, 大小约 50~100nm(图 3), 第 II 峰中杂蛋白较多(图 4)。



图 3 河蟹病料的电镜负染
Fig. 3 Virions of ES by negative staining under EM



图 4 人工复制发病河蟹电镜超薄切片
Fig 4 Thin section of the nerve tissue from diseased ES under EM

2.3 动物致病性试验

接种石蟹,水温 31℃ ~ 32℃ 时,8d 后病毒组和病料组发病,出现典型的“颤抖病”症状并死亡,病料组在 10~11d 时出现死亡高峰,至 14d 时全部发病死亡;病毒组没有出现死亡高峰而且至 14d 时仍然有 8 只存活,生理盐水组正常(表 1)。

2.4 ELISA 检测

根据 ELISA 统计学分析原则,阴性对照为 $A_{490} = 0.32$ 时, $S/N > 2$, 可以判为阳性。按检测结果分析,病毒组的石蟹死亡的 S/N 为 2.7~3.8,未死亡的 S/N 大于 2.0。病料组 $S/N = 2.0 \sim 2.7$,生理盐水组 S/N 为 0.5~1.4 均为阴性(表 2)。

表 1 纯化病毒对石蟹的动物致病性试验

Table 1 Pathogenicity on crabs of the purified virus

时间(接种后天数) Time (day after inoculated)	组别 groups		
	纯化病毒	病蟹组织	生理盐水
	Purified virus	Supernatant of diseased ES	Physiological saline
8	1	2	0
9	1	1	0
10	1	3	0
11	1	3	0
12	1	2	0
13	1	2	0
14	2	2	0
死亡数/总数 Death/totality	8/16	15/15	12/12

表 2 ELISA 双抗体夹心法检测各组石蟹

Table 2 Detection of crabs by double antibody sandwich ELISA

编号 NO	纯化病毒组死亡		纯化病毒组未死亡		病料组		生理盐水组	
	Purified virus died		Purified virus alive		supernatant of diseased ES		physiological saline	
	A_{490}	S/N	A_{490}	S/N	A_{490}	S/N	A_{490}	S/N
1	1.22	3.8	0.808	2.7	0.80	2.5	0.27	0.8
2	1.04	3.2	0.901	2.1	0.90	2.8	0.16	0.5
3	1.14	3.5	0.836	2.5	0.83	2.6	0.39	1.2
4	0.87	2.7	0.924	2.0	0.92	2.8	0.45	1.4
5	0.93	2.9	1.02	2.5	1.02	3.1	0.37	1.1

3 讨论

河蟹“颤抖病”的病毒目前尚无适合细胞进行培养,所以病毒只能从病料中提纯。本试验通过 PEG 沉淀和柱层析获得纯化病毒。柱层析纯化病毒方法适用于未知病毒和具有囊膜结构病毒的提纯,可以避免密度梯度离心等离心方法对病毒颗粒的破坏,但应注意尽量缩短操作时间,以免病毒颗粒失活。

石蟹是河蟹的近缘动物,野生,抗病力强,在自然状态下不发生“颤抖病”。选用石蟹作为“颤抖病”

病毒的动物致病模型,可排除非接种所致的发病死亡。在动物致病性试验中,由于病毒在提纯过程中受机械和温度作用使病毒粒子部分失活,特别是囊膜结构受损而影响了病毒粒子和宿主细胞的吸附,所以用纯化病毒接种的石蟹未全部死亡,也没有出现死亡高峰。

在水体及水生动物中普遍存在病毒,但大多数病毒并无致病性。本试验通过对石蟹的致病性试验,结合临床症状和 ELISA 检测,证实了所提纯的病毒确是“颤抖病”的病原。

前已报道,在患“颤抖病”河蟹的组织超薄切片中观察到的病毒具有类似囊膜的结构^[1],本试验电镜观察负染提纯的病毒,发现病毒粒子具有多形性,且核酸电泳不出现明显分节段的条带(待发表资料),因此不似呼肠孤样病毒^[7]。至于病毒的确切分类地位,尚待进一步研究。

参考文献

- [1] 孙学强,郭爱珍,陆承平. 中华绒螯蟹颤抖病的人工复制试验[J]. 南京农业大学学报, 2000, 23: 74-76.
- [2] Tannock G A, Shafren O R. A rapid procedure for the purification of avian encephalomyelitis virus[J]. Avian Dis, 1985, 29: 312-321.
- [3] Magar R, Lecomte J. Comparison of methods for concentration and purification of bovine viral diarrhoea virus[J]. J Viral Methods, 1987, 16: 271-279.
- [4] Hammar L, Eriksson Malm M, Morein B. Concentration and purification of feline leukaemia virus and its out envelope protein gp70 by aqueous two phase systems[J]. J Virol Methods, 1989, 24: 91-101.
- [5] 张龙翔,张庭芳,等. 生化试验方法和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 1996, 120-123.
- [6] 孙学强,金业,陆承平. ELISA 双抗体夹心法检测河蟹“颤抖病”病毒[J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(4): 67-70.
- [7] 贡成良,薛仁宇,曹广力等. 中华绒螯蟹呼肠孤样病毒病研究. 中国病毒学, 2000, 15: 395-399.

新书推荐

《植物病毒分类图谱》

由中国科学院院士田波研究员作序,浙江大学洪健、李德葆、周雪平教授等编著的《植物病毒分类图谱》一书已于 2001 年 12 月由科学出版社正式出版。全书以国际病毒分类委员会(ICTV)2000 年 9 月发表的病毒分类第七次报告为依据,充分吸收国内外大量植物病毒文献资料,结合作者多年的研究成果编写而成。系统描述了植物病毒 15 科、72 属及植物病毒卫星和类病毒的形态结构、基因组特征、抗原特性、细胞病理、生物学特性等。全书共 40 余万字,136 版电镜照片,文字精炼,内容丰富,图文并茂,是病毒学、植物病理学、生物学、农学、植物检疫、电镜专业工作者以及院校师生和农业科技人员的重要参考书。精装本定价 110 元,欲购书者可与浙江大学生物技术研究所联系,书款请通过邮局汇寄,款到即寄书和发票。联系人地址:杭州市凯旋路 268 号,浙江大学生物技术研究所徐颖、洪健)。邮编:310029,电话:0571-86971179,13505815179, E-mail: jhong@zju.edu.cn