

## 中华绒螯蟹二株呼肠孤病毒的初步研究\*

张叔勇<sup>1</sup>, 张建红<sup>1</sup>, 黄灿华<sup>1</sup>, Bonami Jean-Robert<sup>2</sup>, 石正丽<sup>1\*\*</sup>

(1. 中国科学院武汉病毒研究所, 无脊椎动物病毒学联合开放实验室, 湖北武汉 430071;

2. UMR5098, CNRS/IFERMER/UMII, DRIM, cc-80, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier, France)

Preliminary Studies on Two Strains of Reovirus from Crab *Eriocheir sinensis*ZHANG Shu-yong<sup>1</sup>, ZHANG Jian-hong<sup>1</sup>, HUANG Can-hua<sup>1</sup>, Bonami Jean-Robert<sup>2</sup>, SHI Zheng-li<sup>1\*\*</sup>

(1. Joint Laboratory of Invertebrate Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. UMR5098, CNRS/IFERMER/UMII, DRIM, cc-80, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier, France)

**Abstract:** Two different reoviruses were isolated during investigation on pathogens of diseased crab *Eriocheir sinensis* (designated as *EsRV816* and *EsRV905*). *EsRV816* was isolated from crabs collected from Jiangsu province. *EsRV905* was purchased from a local farm in Wuhan, Hubei province. The spherical viral particles of *EsRV816* and *EsRV905* are about 65 and 55 nm in diameter. The two viral particles contain two different genomes of 10 and 12 RNA segments, respectively. Based on their hosts, number of segments and electrophoresis type of the genomes, they may represent two new genera of the *reoviridae*.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; Reovirus

**摘要:** 在研究中华绒螯蟹病害的过程中, 分离到两株呼肠孤病毒(分别命名为 *EsRV816* 和 *EsRV905*)。 *EsRV816* 从江苏某养殖场分离, *EsRV905* 从武汉某养殖场分离。 *EsRV816* 和 *EsRV905* 的病毒粒子为球状对称结构, 大小分别为 65nm 和 55nm。 病毒粒子基因组分别为 10 和 12 个节段的双链 RNA。 根据它们的宿主范围、基因组节段数及电泳型, 这两种病毒很可能属于呼肠孤病毒科的两个新属。

**关键词:** 中华绒螯蟹; 呼肠孤病毒样病毒

**中图分类号:** S945 **文章标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2002)03-0263-03

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是我国特有的淡水养殖业品种之一, 二十世纪九十年代以来, 养殖面积逐年增长, 遍及江苏、浙江、湖北、河北、安徽等主要淡水养殖省。近年来由于养殖规模的不断扩大和环境的恶化, 各种疾病频繁发生。其中一种被称为“抖抖”病或“颤抖”病的爆发性疾病对中华绒螯蟹的养殖危害很大。该病于 1994 年在江苏省发现, 随后传播至安徽、浙江、湖北等主要中华绒螯蟹养殖地。该病发病快, 死亡率高, 对养殖业造成严重经济损失。

中华绒螯蟹的病原尤其是病毒性病原的研究一

直是人们关注的问题。孙丽敏和姜静颖等分别描述了中华绒螯蟹仔蟹体内发现的类似 I 型疱疹病毒的病毒颗粒和一种 30nm 大小的球状病毒颗粒<sup>[1-2]</sup>。在颤抖病病原研究领域, 何介华等用细菌过滤器过滤后的病蟹组织感染健康蟹, 可造成健康蟹的死亡, 并且在蟹组织的细胞质内发现了病毒样颗粒<sup>[3]</sup>, 但没有报道病毒粒子的大小。陆宏达等也报道了一种小核糖核酸样病毒, 并通过回接实验认为是中华绒螯蟹“颤抖”病的病原<sup>[4]</sup>。随后, 贡成良等报道了一种呼肠孤病毒, 并通过回接实验证明该病毒是中华绒螯蟹“颤抖病”的病原<sup>[5]</sup>。也有作者认为该病是

收稿日期: 2001-12-20, 修回日期: 2002-02-01

\* 基金项目: 中科院重点项目(KY99-J1-308)

作者简介: 张叔勇(1970-), 男, 湖北襄樊籍, 助理研究员, 硕士生, 主要从事水生动物病毒研究。

\*\* 通讯作者。Correspondence author.

由细菌所致<sup>[6]</sup>,但由于在生产实践中采用抗生素治疗颤抖病无任何防治效果,人们更倾向于认为病毒是中华绒螯蟹“颤抖”病的病原。但究竟是一种病原,还是多种病毒病原共同作用,还需要进一步的研究。本实验室近年来在研究中华绒螯蟹病害的过程中分离到多种病毒,本文报道从中华绒螯蟹体内分离的二株呼肠孤病毒及其核酸图谱。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

病蟹分别采自江苏和武汉某养殖场,个体重为 100~150g,解剖症状表现为空胃严重,有烂鳃及肝胰腺糜烂现象。健康蟹购自武汉水产市场,个体重为 80~120g,暂养一周确定健康无病。感染用的江苏病蟹血淋巴经 0.22 $\mu$ m 滤膜除菌过滤。

### 1.2 细菌分离

病蟹经灭菌生理盐水漂洗后,用 75% 的酒精将病蟹的外壳及步足外表擦拭消毒。分别从鳃、血淋巴、肝胰腺、心脏、肠胃、结缔组织取样在营养琼脂平板上进行划线分离。在 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 12~24h 后,观察细菌分离结果。

### 1.3 人工感染实验

取江苏病蟹的除菌组织滤液经稀释后从健康蟹第三步足基部注射到蟹的腹腔内。每只注射 0.2mL。对照组每只注射 0.2mL 灭菌 TN 缓冲液。置于恒温水族箱培养,水温控制在 24 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C。取人工感染的濒死的病蟹血淋巴,经 0.22 $\mu$ m 滤膜除菌过滤后,重复进行三次回接。

### 1.4 病毒的提纯和电镜负染

病毒的提纯参照参考文献<sup>[10]</sup>。取少量病毒粗提液用 2% 磷钨酸负染。

### 1.5 核酸纯化

病毒提取液经酚、氯仿抽提,乙醇沉淀,70% 乙醇洗涤干燥后,溶于 DEPC 水中。

### 1.6 病毒核酸电泳分析

核酸分别于 1% 的琼脂糖凝胶及 4.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,溴化乙啶染色后在紫外检测仪下观察拍照。

## 2 结 果

### 2.1 细菌分离

从病蟹的鳃中分离出几种杆状细菌,但在其它内脏中均无分布。人工回接不能引起病症。

### 2.2 人工感染实验

经人工注射 *EsRV905* 的除菌过滤血淋巴后,病毒可以在健康蟹体内大量增殖,被感染的蟹有摄食减少现象,挣脱力减弱,前螯夹取能力降低,但没有其它明显的症状出现。解剖后可观察到鳃丝发暗,肝胰腺糜烂。在人工感染一个月后,实验组共有 30% 死亡,而对照组的累积死亡率为 10%。但在未死亡的蟹体内也可以检测出有大量病毒存在。

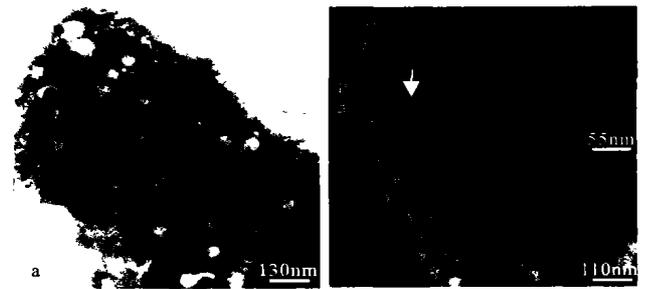


图 1 病毒粒子的负染电镜照片

a, 粗提纯的江苏分离株的病毒粒子(*EsRV816*); b, 提纯的武汉分离株的病毒粒子(*EsRV905*); 箭头指示病毒粒子的核衣壳。

Fig. 1 Viral particles (negative stain)

a, Pre-purified viral particles of Jiangsu isolate(*EsRV816*); b, Purified viral particles of Wuhan isolate(*EsRV905*), Arrow indicates the empty nucleocapsid.

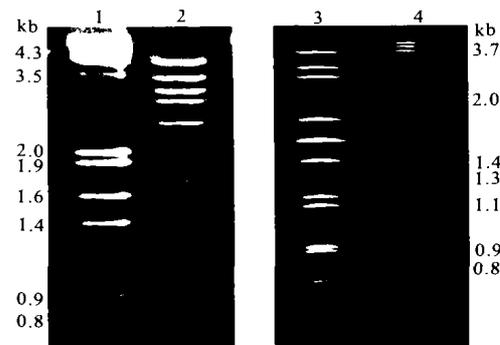


图 2 病毒核酸电泳图谱

1,  $\lambda$ DNA/*Hind* III + *Eco*R I; 2, 江苏病毒分离株 *EsRV816*; 3, 武汉病毒分离株 *EsRV905*; 4, 草鱼呼肠孤病毒<sup>[11]</sup>。

Fig. 2 Electrophoresis of viral nucleic acids

1,  $\lambda$ DNA/*Hind* III + *Eco*R I; 2, Viral isolate from Jiangsu Province; 3, viral isolate from Wuhan; 4, Grass Carp reovirus (GCV)<sup>[11]</sup>.

### 2.3 负染电镜观察

在最初的病蟹的血淋巴及组织匀浆液中,均可以观察到大量球形颗粒。从江苏和武汉的病蟹体内分别分离到的病毒形态大小分别为 65nm 和 55nm (图 1)。

### 2.4 病毒核酸的特性

从江苏病蟹体内分离到的病毒核酸经 1% 琼脂糖电泳,从核酸图谱中分别可以观察到 10 条核酸带,呈 5/3/2 带型。其分子量分别为 3.9、3.3、3.0、2.7、2.5、1.8、1.7、1.6、1.2、1.1kb。从武汉病蟹体内分离到的病毒核酸则显示出与江苏株不同的核酸图谱(图 2),在 1% 琼脂糖电泳及 4.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳中均呈 3/4/2/3 带型。其分子量分别为 3.7、3.2、2.8、1.9、1.6、1.6、1.4、1.2、1.1、0.95、0.9、0.75kb。

### 3 讨论

回接实验表明,从病蟹的鳃中分离出的几种杆状细菌均不能导致中华绒螯蟹死亡,引起中华绒螯蟹死亡的病原应该是病毒。

根据这两个病毒株的传代感染结果,EsRV816 及 EsRV905 均可以引起中华绒螯蟹死亡,但病蟹并不表现出“颤抖”症状。这一结果表明,这两株呼肠孤病毒可能不是中华绒螯蟹“颤抖”病的主要病原。主要病原有可能是本实验室从江苏的样品中分离到的另一种病毒(另文报道)。根据对 EsRV905 的持续调查和检测,此病毒不仅广泛分布于湖北省,在江苏及安徽省也广为传播,而这些区域正是中华绒螯蟹“颤抖”病的高发地区。至于这两个病毒株在“颤抖”病发生过程中究竟起何种作用,尚需进一步研究。

本报道中分离的两株病毒的核酸图谱显示,这两株病毒具有典型的呼肠孤病毒的分段基因组特征。其中,武汉分离株的核酸图谱与贡成良等报道的相似<sup>[5]</sup>,不同的是我们的核酸图谱经多次电泳均没有两个最小分子量的核酸片段(0.41kb 和 0.28kb)。根据呼肠孤病毒的结构特点,其基因组最多可有 12 个节段。我们推测,这两条小分子量片段可能为病毒的缺损颗粒或者某种杂质<sup>[7]</sup>。EsRV905 分离株图谱中第 5 条带的核酸带明显强于其它核酸带,经软件分析发现,此位置有两条分子量非常接近的难于分开的病毒核酸带。

呼肠孤病毒是水生动物中普遍存在的病毒,在鱼、虾、蟹中均有报道,其中大多划分在呼肠孤病毒科的水生呼肠孤病毒属。其中,在草鱼中发现的草鱼出血热病毒曾造成草鱼养殖业的严重损失,该病毒已经被列入呼肠孤病毒科的水生呼肠孤病毒属作为一个单独的亚群<sup>[8]</sup>。在法国地中海两种螃蟹 *Macropipus depurator* 和 *Carcinus Mediterraneus* 体内发现的呼肠孤病毒 P 和 W2 则揭示了两种新的呼肠孤病毒<sup>[9,10]</sup>,其电泳型为 1/5/6,与水生呼肠孤病

毒属截然不同<sup>[11,12]</sup>。我们从中华绒螯蟹体内分离的呼肠孤病毒株 EsRV905 的基因节段数与 P 及 W2 相同,与水生动物呼肠孤病毒属病毒相比,不仅节段数不同,电泳型也有明显差异;而 EsRV816 的基因组节段数及电泳型与以上病毒相比,均有明显差异。因此,我们在中华绒螯蟹体内发现的呼肠孤病毒在病毒的分类上可能具有重要意义;EsRV905 与 W2 及 P 病毒构成呼肠孤病毒科一个新的属,但分别属于不同的群;而 EsRV816 则可能属于呼肠孤病毒科另一个新的属。对这两种病毒的分类地位的确定,有助于了解病毒的进化历程、分布及传播媒介,在病毒病害的防治过程中也具有重要意义。

### 参考文献

- [1] 孙丽敏,国际翔. 中华绒螯蟹放养期仔蟹 I 型疱疹病毒的电镜观察[J]. 水产科学, 1999, 18: 20-22.
- [2] 姜静颖,邢殿楼,王斌,等. 池塘养殖中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: 51-53.
- [3] 何介华,贺路,曾令兵,等. 中华绒螯蟹颤抖病病原的初步研究[J]. 淡水渔业, 1999, 29: 10-11.
- [4] 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: 61-68.
- [5] 贡成良,薛仁宇,曹广力,等. 中华绒螯蟹呼肠孤病毒样病毒病研究[J]. 中国病毒学, 2000, 15: 395-399.
- [6] 余为一,李谨年,祖国掌. 一株中华绒螯蟹病原菌的研究初报[J]. 安徽农业大学学报, 1999, 26: 174-177.
- [7] 邱涛,张菁,陆仁后,等. 草鱼出血病病毒 873 株基因组外发现缺损性干扰颗粒的亚基因组成分[J]. 病毒学报, 2001, 17: 140-143.
- [8] Murphy F A, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. Virus taxonomy, classification and nomenclature of Viruses. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses [M]. Archives of virology (suppl), Springer-Verlag, Vienna, 1995. 586.
- [9] Mari J, Bonami J R. W2 virus infection of the crustacean *Carcinus mediterraneus*: a reovirus disease [J]. J Gen Virol, 1988, 69: 561-571.
- [10] Montanie H, Bossy J P, Bonami J R. Morphological and genomic characterization of two reovirus (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.
- [11] Rangel A A C, Rockemann D D, Hetrick F M, et al. Identification of grass carp haemorrhage virus as a new genogroup of aquareovirus [J]. J Gen Virol, 1999, 80: 2399-2402.
- [12] Van Regenmortel M H V, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. Genus Aquareovirus, in Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. Edited by Regenmortel et al. Academic press, San Diego. 2000. 440-445.