

养殖贻贝中观察到一种球形病毒

王 斌, 李 霞, 杨喜东

(大连水产学院农业部海洋水产增养殖生态学重点开放实验室, 辽宁大连, 116024)

Examination of Spherical Viruses from *Mytilus edulis*

WANG Bin, LI Xia, YANG Xi-dong

(Key Laboratory of Mariculture Ecology, Dalian Fisheries College, Dalian 116024, China)

Abstract: A lot of spherical virions were observed in internal organization such as gill and mantellum of the diseased *Mytilus edulis* with negative staining method. The diameter of Virion is around 80—200nm with dual unit membrane. Same virions were observed in connective tissues of infected organs with ultrathin section electronmicroscopic observation. The “occlusion body” were observed in cell matrix and no inclusion body was present. A few same virions were observed in internal organization of normal *Ruditapes variegata*, *Neptunea cumingi* and *Dstrea lalienwhanensis* with negative staining method. The normal *Chlorostoma rusticum* can be infected by organizational liquid with the viruses from diseased *Mytilus edulis* through mouth and injured section on skin. The virus was purified from the diseased tissue by sucrose gradient centrifugation with 25 000 r/min, 3h. The virus sediment lies between 20%~30% of sucrose.

Key word: *Mytilus edulis*; Spherical virus; Virus purification; Electronic microscopy.

提要: 用电镜负染方法在发病的贻贝内脏团、鳃、外套膜组织匀浆中观察到一种球形病毒粒子, 其直径为 80~200nm, 具囊膜。上述组织超薄切片发现在其结缔组织细胞质中均存在该病毒粒子, 带双层囊膜, 有“封入体”结构, 未见包涵体。在未发病的杂色蛤、香螺、牡蛎等内脏团中也观察到少量同种病毒粒子。用带病毒贻贝组织匀浆投喂和划伤感染不带病毒的绣凹螺, 使之成为带病毒状态。采用蔗糖梯度离心法, 25 000 r/min, 离心 3h, 可于 20%~30%蔗糖层间获得病毒沉淀带。

关键词: 贻贝; 球形病毒; 病毒纯化; 电镜检测

中图分类号: S945

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2003)03-0288-04

贝类是我国沿海地区养殖的一大类海产品, 具有很高的营养价值。贻贝 (*Mytilus edulis*) 为养殖贝类中主要产品之一。自 1998 年以来, 辽宁沿海滩涂的养殖和天然生长贻贝散在发生一种病症, 表现为个体生长缓慢, 体瘦, 壳薄而脆易碎, 内脏团发暗, 鳃色灰暗易破损。部分死亡。产量下降造成很大经济损失。关于贝类病毒病的报导国内外较少见。仅 Eiston 等^[1] 1979 年报导了太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 的类疱疹病毒感染, Meyers^[2] 1979 报导了美国牡蛎 (*crassostrea virginica*) 的类病毒感染, Lammers^[3] 报导从不同类群水生腹足动物中分离到类病毒粒子。国内王斌等^[4] 报道过皱纹盘鲍

(*Haliotis discus hannai* Ino) 的一种球形病毒感染。姜静颖^[5] 等报道过类疱疹病毒对海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 苗期的感染。本文就发病养殖贻贝体内病毒存在情况, 感染情况进行了一系列的研究, 并从病变组织中分离提纯该病毒。

1 材料和方法

1.1 病贝来源

发病贻贝采自大连湾养殖海区, 其它贝类分别采自大连湾海区, 大连龙王塘、双岛、小平岛海区。

1.2 病毒超薄切片观察

1.2.1 病毒负染法电镜观察

收稿日期: 2002-10-05, 修回日期: 2002-12-23

作者简介: 王斌 (1962-), 女, 云南曲靖籍, 副教授, 从事专业: 微生物与水产病害。Tel: 0411-4762812(O)

分别取患病贻贝的内脏团、鳃, 外套膜约 2g, 加倍量 pH7.6, 15mmol/L PBS 匀浆后, 8 000r/min, 离心 10min, 取上清液常规方法负染后电镜观察并拍照。未发病的其它贝类同样方法制样后观察病毒存在情况。

1.2.2 超薄切片电镜观察

分别取发病贻贝的内脏团、鳃、外套膜用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定常规方法制样电镜观察并拍照。

1.3 感染实验

由于无法采到不带病毒的贻贝, 故采用不带病毒的绣凹螺做为感染对象, 以期了解该病毒的传播途径。

1.3.1 投喂感染

将带病毒贻贝的内脏团匀浆后, 8 000r/min 离心 10min, 取上清液搅拌到饵料中投喂绣凹螺, 分别设 5℃、12℃、16℃~22℃三个不同温度。投喂 30d 后, 以一个绣凹螺为单位取其内脏团、鳃、外套膜混合匀浆, 同样方法离心处理后负染电镜观察带病毒情况。

1.3.2 浸泡感染

相同病料, 按 1:1000 (病毒悬液与海水体积比) 比例对绣凹螺进行划伤浸泡和不划伤浸泡感

染。感染温度为 16℃~22℃, 25d 后与投喂方式相同取样负染电镜观察。

1.4 病毒提纯

参考殷震^[6], 吕鸿声^[7], 林均安^[8]的方法, 取发病贻贝的带毒组织加倍量 pH7.6 15mmol/L 的 PBS 匀浆, 8 000r/min 离心 10min, 取上清液同样条件离心 10min 后取上清装入透析袋内, 埋入 PEG 6 000 中, 4℃ 下透析, 浓缩至原体积的 1/8~1/10 经新华滤纸过滤, 滤液为粗提纯的病毒悬液。用上述同样 PBS 配制 10%~60% 系列浓度蔗糖溶液 (每一梯度浓度差为 10%), 依次铺入离心管中, 取 2mL 制备好的病毒悬液铺于 10% 的蔗糖层上, 4℃, 25 000 r/min, 离心 3h, 取出后分层虹吸抽取沉淀, 负染电镜观察确定病毒带。

2 结果

2.1 病毒纯化与电镜观察

负染法电镜观察发现不同地区发病的贻贝内脏团、鳃、外套膜组织样品中均可见一种球形病毒粒子, 直径为 150nm~200nm, 可见双层囊膜及膜内的核衣壳, 核衣壳直径为 100nm~160nm, 未见衣壳粒。同时见囊膜破损和核衣壳从囊膜中破出的情况 (图 1-A)。疑为制样时离心造成。

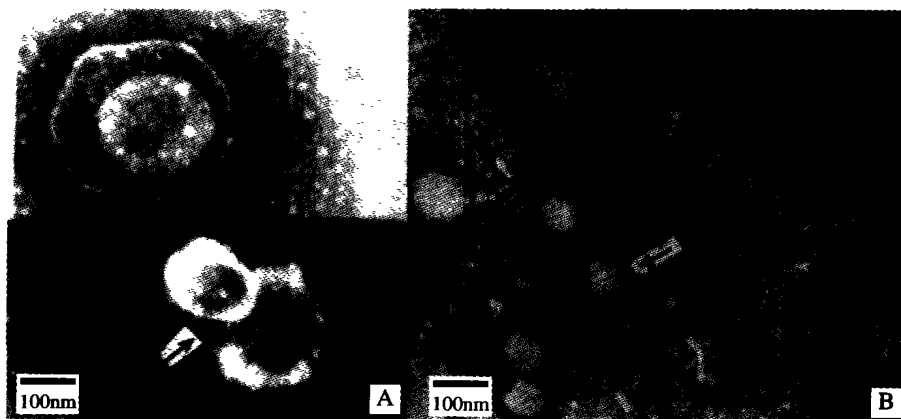


图 1 患病组织的负染照片

A, 负染电镜下贻贝内脏团中的病毒粒子, 箭头示病毒粒子从囊膜中破出; B, 提纯的病毒粒子 (箭头所示)。

Fig.1 Photograph with negative staining of diseased organization

A, The viruses in internal organs of *Mytilus edulis* with negative staining. Arrowhead shows the virus was emerging from envelop; B, The viruses of purified(viruses with arrowhead showing).

另外, 在采集发病贻贝同时我们还采集了同一海区和未发病海区的其它贝类样品共 7 种, 其中除贻贝外还有 4 种见同样病毒粒子。

利用等密度梯度法离心后在蔗糖梯度管中可

见 6 条沉淀带, 分别位于 10% 蔗糖层上及每一梯度之间。其中位于 20%~30% 蔗糖层中的沉淀带为乳白色, 浓稠致密, 不同于其它各带。负染后电镜观察该沉淀带具大量病毒粒子 (图 1-B), 形态未发生

改变, 其余均为杂蛋白带。

2.2 组织病理超薄切片

发病贻贝的外套膜、鳃、内脏组织超薄切片的结缔组织细胞质中均观察到病毒粒子(图2, A-D), 其内脏中见大量病毒离子聚集(图2, D)。病毒离

子直径 120~210nm, 双层囊膜清晰(图2C)。病毒存在的细胞中细胞器严重解体, 核内物质消失(图2D)。并见类似“封入体”^[9]的结构其中可见正在组装的病毒粒子(图2A)。未见包涵体。

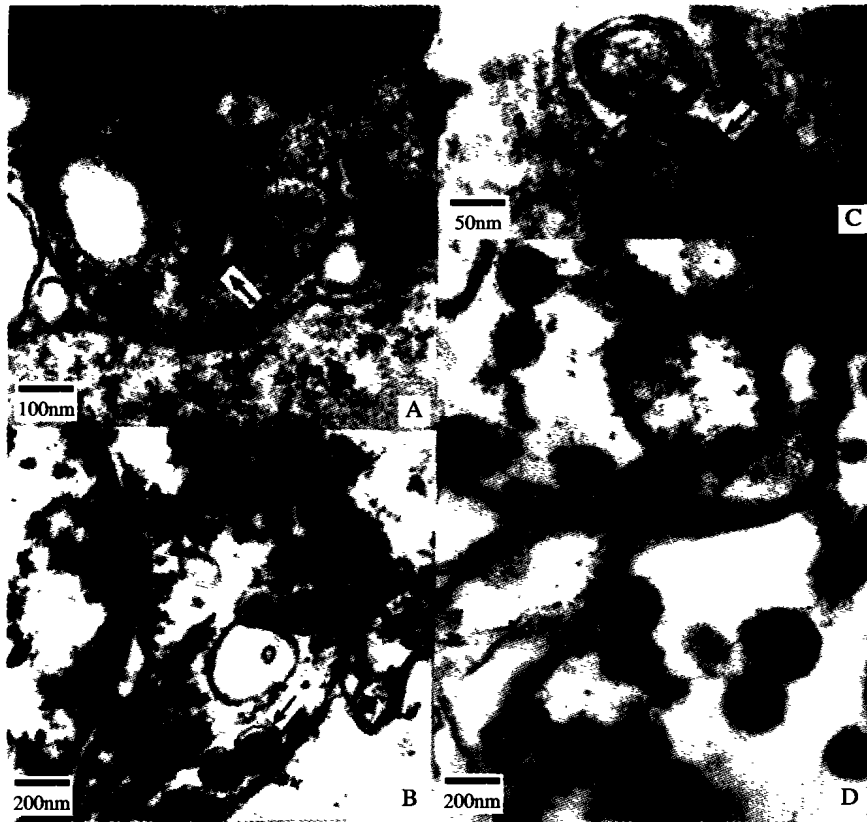


图2 患病组织的超薄切片观察

A, 贻贝鳃细胞质中的“封入体”, 其中正在组装的病毒(箭头所示); B, 鳃细胞质中的病毒粒子(箭头所示); C, 超薄切片中见病毒粒子的双层囊膜(箭头所示); D, 内脏细胞结构解体并见散在的病毒粒子(箭头所示为病毒)。

Fig.2 Photograph with ultrathin sectioning of diseased organization

A, The "occlusion body" in gill cell matrix of *Mytilus edulis* and the viruses were forming (Viruses with arrowhead showing); B, The viruses in gill of *Mytilus edulis* (Viruses with arrowhead showing); C, The dual unit membrane of virus on ultrathin section (where with arrowhead showing); D, The cytoarchitecture of internal organization cells damaging and some viruses existing (Viruses with arrowhead showing).

2.3 人工感染实验

由于无法采到不带病毒的贻贝材料, 我们考虑用多次检测均不带病毒的龙王塘海区的绣凹螺作为感染对象。感染实验中投喂组在三个不同温度下均造成感染对象带病毒, 而对照未检出。划伤浸泡也使感染对象带毒, 而正常浸泡和对照未检出。详见表2。

3 讨论

从负染和超薄切片观察结果看该病毒粒子与作者在皱纹盘鲍中发现的病毒粒子的形态结构相

似, 并且其组装的部位、方式也基本相同, 但病毒直径略大于后者。贻贝的发病情况与皱纹盘鲍“裂壳病”^[10]症状相近, 但前者在成年贝、幼贝均有发生, 后者于苗期多发。王秀华等^[11]报导在大规模死亡的栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 中发现一种球形病毒粒子, 其形态及发生部位与本文报导的病毒有相似之处。病毒的存在部位以及引起的病理变化也很相近。但发病季节和症状不同, 并且本文所报导的病毒也未见王崇明, 王秀华^[12]等报导的栉孔扇贝球形病毒囊膜外的刺突。这两种病毒的分类位置有待进一步研究。

表 2 人工感染实验结果

Table 2 The result of artificailly infected experiment

| 组别 Group | 试验温度 Temperature | 试验方法 Trial method | 试验天数 Trial days | 试验个数 Trial number | 感染率 Infection rate |
|-------------------|------------------|-----------------------|-----------------|-------------------|--------------------|
| 试验组 Trial group | 5℃ | 投喂毒饵(feed with virus) | 55 | 25 | 92% |
| | 12℃ | 投喂毒饵(feed with virus) | 55 | 25 | 84% |
| | 16℃~22℃ | 投喂毒饵(feed with virus) | 55 | 25 | 80% |
| | | 划伤浸泡(wound soaking) | 25 | 30 | 93% |
| | | 正常浸泡(normal soaking) | 25 | 30 | 0% |
| 对照组 Control group | 5℃ | 正常投喂(normal feed) | 55 | 25 | 0% |
| | 12℃ | 正常投喂(normal feed) | 55 | 25 | 0% |
| | 16℃~22℃ | 正常投喂(normal feed) | 55 | 25 | 0% |
| | | 划伤对照(wound control) | 25 | 30 | 0% |

关于水产动物病毒的提纯研究, 国内有草鱼出血病病毒的提纯^[13]和对虾球形病毒的提纯^[14]等报导。但贝类病毒的提纯研究国内较少见, 目前有王崇明等报导的栉孔扇贝球形病毒的提纯。国外 Lammers 报导过贝类中类病毒粒子的分离。我们采用殷震等提出的沉淀法和超速离心法结合进行。并将 PEG 内沉淀法改为外透吸, 吸出过多水份以达到浓缩病毒粗提液的目的。这样保证了病毒粒子不丢失。

根据病毒提纯结果, 本文所报导的病毒与栉孔扇贝球形病毒的浮力密度不同(后者沉淀带位于 50%~55%蔗糖梯度之间), 这也提示两者分类位置有所不同。在提纯过程中我们发现贻贝病料杂蛋白较多, 收集病毒带很困难。具体解决方法正在摸索。

从感染实验结果可以看出, 该病毒可以经口和体表伤口进入机体, 造成带毒状态, 但无明显的症状出现。当外界条件合适时, 病毒可大量复制引起发病。而感染实验水质等条件较好, 故呈现隐性感染。另外, 投喂感染在低温时感染率较高, 随温度升高而有所下降。这与自然发病情况相近。贻贝每年发病高峰均在冬季到春季之间, 可能由于低温下贻贝体质较弱, 免疫力低下容易被病毒感染。李霞等报导的皱纹盘鲍“裂壳病”的发病季节也与贻贝相同。贻贝的发病情况与栉孔扇贝大规模死亡的季节不同, 但温度过高或过低对机体都有一定的影响。从目前报道的贝类病毒病的发病情况看均与环境的恶化有关。而且根据在其它几种贝类中观察到同样病毒离子这一结果, 我们认为此种病毒很可能是一种潜伏于贝体内的常在病毒并宿主范围较宽。是否引起宿主发病取决于病毒是否大量增殖, 而病毒增殖的条件与宿主的免疫状态和外界环境的改

变密切相关。因此提高机体的免疫力、改善环境条件是避免病毒病的关键所在。

参考文献

- [1] Elston R. Virus like particles associated with lesion in larval pacific oysters(*crassostrea gigas*)[J]. J Invertbr Pathol, 1997, 33: 71-74.
- [2] Meyers T R, Areo—like virus isolated from juvenile American oysters (*crassostrea virginica*)[J]. J Genirol, 1979, 43:203.
- [3] Lammers W T, Virus — like particles isolated from different populations of aquatic gastropods. International association of theoretical and applied limnology, proceedings[J]. vol. 20. part 1 and 2. Copenhagen Denmark, 1977.
- [4] 王斌, 李霞, 高船舟. 皱纹盘鲍一种球形病毒的感染与发生[J]. 中国病毒学, 1997, 12 (4): 360-363.
- [5] 姜静颖, 高悦勉, 史小明. 海湾扇贝体内发现一种新病原—疱疹病毒[J]. 山东农业大学学报, 1997, 28 (增刊): 26-27.
- [6] 殷震. 动物病毒学[M]. 北京, 科学出版社, 1985
- [7] 吕鸿声. 昆虫病毒与昆虫病毒病[M]. 北京, 科学出版社, 1988
- [8] 林均安. 实用生物电子显微技术[M]. 辽宁, 辽宁科学技术出版社, 1988
- [9] 张建红, 陈棣华, 肖连春. 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 (2): 362-366.
- [10] 李霞, 王斌, 王琦. 皱纹盘鲍“裂壳病”的病原及组织病理研究[J]. 水产学报, 1998, 22 (1): 61-66.
- [11] 王秀华, 王崇明, 李筠. 胶州湾栉孔扇贝大规模死亡的流行病学调查[J]. 水产学报, 2002, 24 (2): 149-155.
- [12] 王崇明, 王秀华, 宋小玲. 栉孔扇贝一种球形病毒的分离纯化及其超微结构观察[J]. 水产学报, 2002, 24 (2): 180-184.
- [13] 罗毅志. 草鱼出血病病毒的培养及分离提纯的研究[J]. 鱼病简讯, 1989, (2-3): 1-2.
- [14] 陈棣华, 张建红, 石正丽. 中国对虾一种球形病毒的分离提纯与检测[J]. 中国病毒学, 1994, 9 (2): 170-173.