

# 一种对虾杆状病毒形态及形态发生的研究

孙磊<sup>1</sup>, 王维娜<sup>1</sup>, 王安利<sup>2</sup>, 李凤超<sup>1</sup>, 郭明申<sup>1</sup>

(1. 河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002; 2. 华南师范大学 生命科学学院, 广东 广州 510303)

**摘要:** 以患病死亡的甲壳上具白斑的斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 虾头及从中提取的病毒悬液分别感染中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 幼虾及日本对虾 (*Penaeus japonicus*)。感染后此 2 种对虾均发病死亡, 且甲壳上均有白斑。电镜下对人工感染的中国对虾幼虾及日本对虾的组织器官进行观察发现了大量的病毒。此病毒为杆状, 具囊膜, 无包涵体, 大小为 295 nm × 105 nm。此病毒的形态发生起始于细胞核, 并可分为 4 个阶段: 病毒基质的形成、囊膜的形成、病毒的装配和完整的病毒粒子的形成。病毒的装配过程是与其大量迅速繁殖相适应的。

**关键词:** 形态发生; 杆状病毒; 中国对虾 (*Penaeus chinensis*); 日本对虾 (*Penaeus japonicus*); 电子显微镜

**中图分类号:** S945.19 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2004)05-0058-05

自从 1974 年 Couch<sup>[1]</sup> 发现第一种对虾病毒以来, 已发现了 20 余种对虾病毒, 其中杆状病毒占一半以上, 大多数杆状病毒所引起疾病的最主要特征就是在甲壳上出现白斑并且具有极高的致死率。杆状病毒是目前所报道的对虾病毒中毒性最强、危害最大、地域分布及宿主范围最广的病毒。目前, 关于对虾杆状病毒形态发生的报道非常少, 只有 Durand 等<sup>[2]</sup> 报道了白斑综合征杆状病毒 (WSSV) 的形态发生特点。为了研究病毒的基本特征, 作者对中国对虾幼虾及日本对虾进行了人工感染实验, 并通过电子显微镜观察, 对感染中国对虾幼虾及日本对虾的一种杆状病毒的形态及形态发生过程进行了研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

本实验所用的中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 幼虾取自浙江省乐清市海天水产苗种场, 体长 7~8 mm, 健康状况良好。所用的日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 是从市场上购买的, 体长 10~11 cm, 健康状况良好。

### 1.2 感染试验

取健康无病的中国对虾幼虾 88 只, 放养于盐度为 25 的人工海水中, 试验前一天禁食, 后投喂甲壳上具白斑的已死的斑节对虾虾头, 以后投喂人工配合饵料正常喂养, 及时将病死虾取出, 冰冻保存。

取健康无病的日本对虾 8 只, 用微量进样器吸取从患病死亡的斑节对虾中提取的病毒悬液 20 μL 注

入日本对虾的第三与第四体节间的皮下, 之后正常喂养, 并及时将病死虾取出, 冰冻保存。

### 1.3 电镜样品制备和电镜观察

将人工感染的中国对虾幼虾的肝胰腺及人工感染的日本对虾的肝胰腺、表皮、鳃、肠、胃、心等组织与器官浸于 2.5% 戊二醛溶液中进行前固定, 后用 1% 锇酸 (pH7.2) 后固定, 用系列酒精脱水, 环氧树脂 Epon812 包埋, 超薄切片, 用醋酸铀柠檬酸铅双染色, JEM-100SX 透射电镜观察并照相。

## 2 结 果

### 2.1 人工感染试验

中国对虾幼虾在感染后的前 4 天症状不明显, 摄食正常, 反应灵活; 从第 5 天起, 摄食量降低, 甚至不摄食, 粪便减少, 行动迟缓, 反应慢, 有的在水中打转, 多停留在黑暗的地方; 第 6 天开始出现大量死亡, 受感染的试验用虾在 12 天内全部死亡。用光学显微镜观察甲壳, 发现甲壳上有白斑。

收稿日期: 2002-10-20; 修回日期: 2003-03-28

基金项目: 河北省重点科技成果推广计划项目与河北省农业综合开发科技推广项目 (98-T17)

作者简介: 孙磊 (1971-), 女, 河北唐山人, 讲师, 硕士, 研究方向: 鱼虾病害与防治, E-mail: sunlei1018@sohu.com

感染后的日本对虾行动迟缓,摄食量减少,在3天内全部死亡。虾体变红,在头胸甲上有直径为0.5 mm的白斑。

## 2.2 杆状病毒的形态及形态发生过程

观察了人工感染的中国对虾幼虾的肝胰腺及日本对虾的表皮、肝胰腺、鳃、肠、胃、心等的超薄切片,发现除了人工感染的日本对虾的心脏中无杆状病毒存在外,其余各组织中均有杆状病毒存在。此病毒横切面为圆形,纵切面为长杆形,中央是高电子密度的核心,其外紧包一层衣壳,最外层为双层的囊膜。病毒平均大小为295 nm × 105 nm,核衣壳的平均大小为239 nm × 74 nm,囊膜厚10 nm(图1-1)。在中国对虾幼虾的肝胰腺及日本对虾的表皮组织的细胞核中,发现了大量的杆状病毒,而在日本对虾的鳃、胃、肠、肝胰腺中,杆状病毒只是散落在细胞质中,细胞核保持良好的结构。这些病毒有的已装配完全,有的是裸露的核衣壳,有的是正在被囊膜包裹的核衣壳。

在病毒早期感染的细胞核中发现了大量的病毒基质和囊膜片段。囊膜片段均聚集在病毒基质周围,形状多种多样,有线形的,也有泡状的(图1-2)。

在病毒高度感染的细胞核中,发现了大量正在装配的病毒粒子,由病毒基质形成的核衣壳向囊膜运动,并逐渐被囊膜包裹。病毒的装配有几种不同方式,最普通的一种即为一个囊膜片段包裹一个核衣壳。部分病毒粒子的囊膜会向外延伸形成尾状物(图1-1)。同时,还观察到了在细胞核中有一些完整的没有囊膜包裹的核衣壳(图1-3)及被囊膜包裹的空的核衣壳(图1-4)。空的衣壳直径约为50 nm,小于完整的没有囊膜的核衣壳的直径。

通过对各组织的超薄切片的观察发现该病毒还存在另一种装配方式,即2个或3个病毒核衣壳共同利用一个囊膜片段进行装配(图1-5,1-6)。这会产生2种结果,一个是这个囊膜片段分别包裹每一个核衣壳,当核衣壳几乎被完全包裹时,囊膜断裂产生2个完整的一个囊膜包裹一个核衣壳的病毒粒子(图1-7);另一种结果是,2个核衣壳共同被一个囊膜包裹,形成一个囊膜中包含有2个核衣壳的病毒粒子,有的位于2个核衣壳间的囊膜还会向内凹陷(图1-8a,1-8b)。另外,作者还观察到了有时2个病毒核心会包入一个衣壳中。在衣壳中,这2个核心移向两端,表现出在病毒的两端为高电子密度的病毒核心,而2个核心间仍保持连接只是电子密度较低,看起来象个哑铃(图1-9a,1-9b)。随着2个核心继续向衣壳两端移动,2个核心会完全撕开,形成2个核衣壳(图1-10a,1-10b)。实验结果显示,有1.4%~5.2%

的病毒粒子为2个核衣壳共用一个囊膜。

## 3 讨论

对于多数其它动物病毒,研究其形态发生过程,都是通过细胞培养的方法,但由于对虾的细胞培养至今没有成功,所以不能按病毒侵入细胞的时间顺序来研究对虾病毒的形态发生过程。目前,只能通过对感染组织的超薄切片的观察来对对虾杆状病毒的形态发生进行研究。在不同的组织切片中会观察到病毒的不同发展阶段,以此来解释对虾病毒在形态发生中的一些问题。

在此杆状病毒的形态发生过程中,有几种行为是与病毒大量快速繁殖这一特征相适应的。在感染初期的细胞核中,囊膜片段总是与病毒基质非常接近,这有利于核衣壳形成后与囊膜进行快速装配。2个或3个核衣壳共用一个囊膜来装配,这有助于充分利用细胞中的膜性物质,而不造成物质的浪费。

Durand等<sup>[2]</sup>所报道的WSSV形态发生与作者所观察到的白斑症杆状病毒的形态发生有几点相似之处:(1)病毒基质和囊膜片段在核质中起始合成。(2)都观察到了被包裹的空衣壳,并且空衣壳的直径小于核衣壳的直径。这可能由于在衣壳形成以后,病毒核心与衣壳结合成核衣壳之前就被囊膜包裹的。这种现象在苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒(AcNPV)的形态发生过程中是经常出现的。AcNPV DNA基因研究表明,病毒复制受到多个基因组的控制,即使在病毒复制晚期,mRNA的翻译仍处于活跃阶段<sup>[3-5]</sup>。作者推测此杆状病毒的空衣壳是由病毒在细胞核中过多合成的病毒结构蛋白而形成的。

病毒在装配过程中囊膜的来源一直是一个值得研究的问题。从作者的观察结果分析囊膜的来源有以下2种可能:(1)形成的核衣壳利用细胞内现有的膜物质,如核膜。(2)利用在细胞核中形成的膜性物质。在中国对虾幼虾的组织切片中,发现感染初期的细胞核并没有解体,但其中含有大量的囊膜片段。Durand等<sup>[2]</sup>所描述的WSSV的形态发生和作者观察的杆状病毒的形态发生均起始于细胞核,并在感染的细胞核的核质中出现大量的膜的片段。但是正常的细胞核中并不存在膜性物质。那么,囊膜片段到底从哪儿来的呢?作者认为,核内的囊膜片段是由病毒基因编码的,利用宿主的物质合成的。

在超薄切片中,作者观察到了完整的裸露的核衣壳,这一现象不仅在中国对虾幼虾中存在,在日本对虾被感染的组织中也存在,这与徐洪涛等<sup>[6]</sup>报道的PcNOBV相似。该杆状病毒无论是侵染中国对虾还是

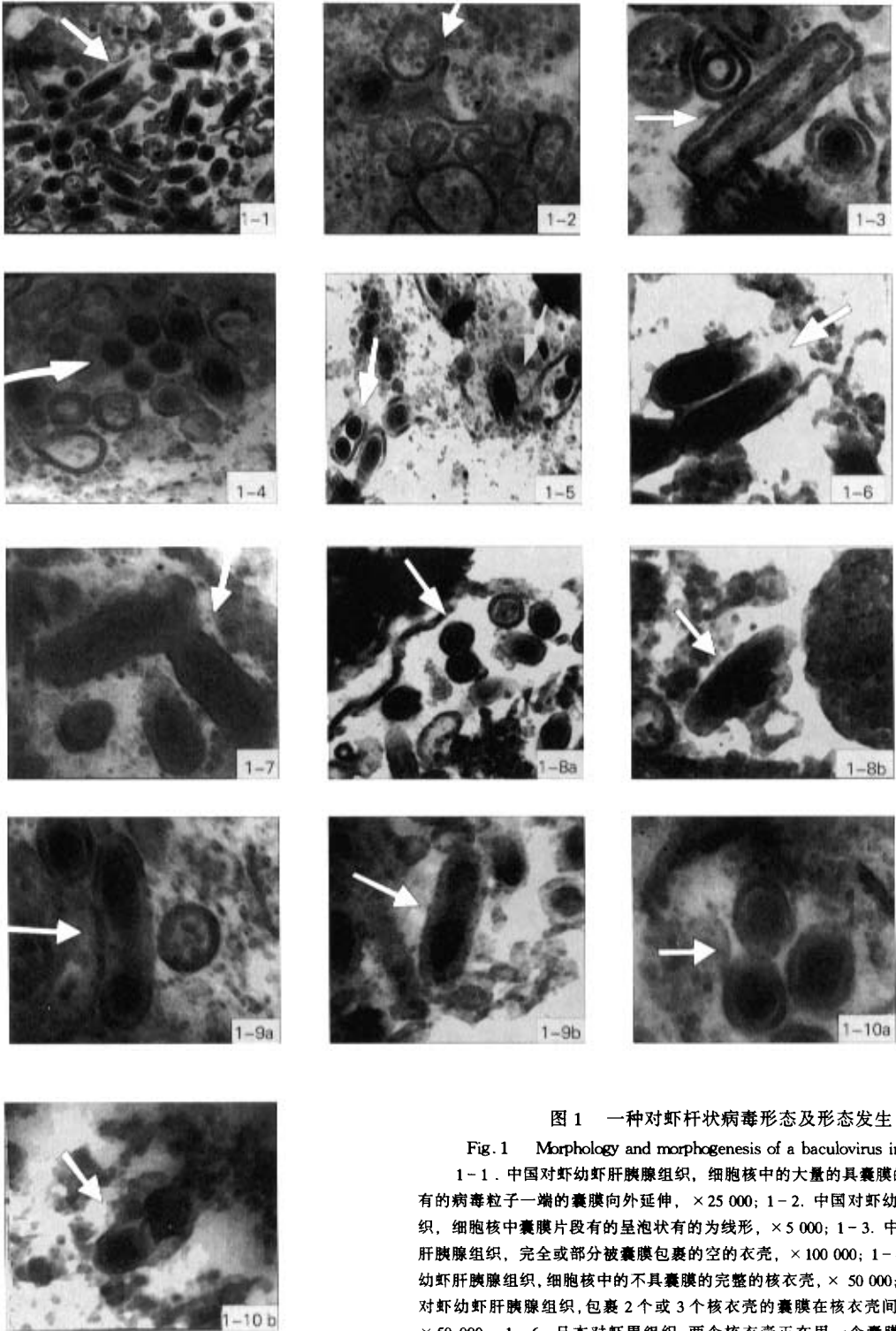


图 1 一种对虾杆状病毒形态及形态发生

Fig. 1 Morphology and morphogenesis of a baculovirus in shrimp

1-1. 中国对虾幼虾肝胰腺组织, 细胞核中的大量的具囊膜的病毒粒子, 有的病毒粒子一端的囊膜向外延伸,  $\times 25\ 000$ ; 1-2. 中国对虾幼虾肝胰腺组织, 细胞核中囊膜片段有的呈泡状有的为线形,  $\times 5\ 000$ ; 1-3. 中国对虾幼虾肝胰腺组织, 完全或部分被囊膜包裹的空的衣壳,  $\times 100\ 000$ ; 1-4. 中国对虾幼虾肝胰腺组织, 细胞核中的不具囊膜的完整的核衣壳,  $\times 50\ 000$ ; 1-5. 中国对虾幼虾肝胰腺组织, 包裹 2 个或 3 个核衣壳的囊膜在核衣壳间向内凹陷,  $\times 50\ 000$ ; 1-6. 日本对虾胃组织, 两个核衣壳正在用一个囊膜进行装配,

× 80 000; 1-7. 中国对虾幼肝胰腺组织, 囊膜分别包裹每一个核衣壳, × 80 000; 1-8. 一个囊膜中包有两个核衣壳的病毒粒子, a. 中国对虾幼肝胰腺组织中的病毒, × 50 000, b. 日本对虾表皮组织中的病毒, × 80 000; 1-9. 一个衣壳中的 2 个病毒核心移向衣壳的两端, a. 中国对虾幼肝胰腺组织中的病毒, × 80 000, b. 日本对虾表皮组织中的病毒, × 80 000; 1-10. 两个病毒粒子完全分开, 中间残存有撕裂痕迹, a. 中国对虾幼肝胰腺组织中的病毒, × 100 000, b. 日本对虾表皮组织中的病毒, × 80 000

1-1. Envelope baculovirus in nuclei of hepatopancreas of larval *P. chinensis* and some showing the characteristic envelope extension at the apex of the particle, × 25 000; 1-2. The membrane showing the characteristic vesicles or line-shape in nuclei of hepatopancreas of larval *P. Chinensis*, × 50 000; 1-3. Some empty capsids enveloped completely or partly in nuclei of hepatopancreas of larval *P. Chinensis*, × 100 000; 1-4. Full nucleocapsids without an envelope in nuclei of hepatopancreas of larval *P. Chinensis*, × 50 000; 1-5. Membrane enveloped two or three nucleocapsids sinking between two nucleocapsids in nuclei of hepatopancreas of larval *P. chinensis*, × 50 000; 1-6. Two nucleocapsids using one membrane to assemble in cell of the stomach of *P. japonicus*, × 80 000; 1-7. Membrane enveloping respectively each nucleocapsid in nuclei of hepatopancreas of larval *P. chinensis*, × 80 000; 1-8. Virions showing two nucleocapsids wrapped in one envelope; a. The virion in nuclei of hepatopancreas of larval *P. chinensis*, × 50 000, b. Virion in the epiderm of *P. japonicus*, × 80 000; 1-9. Two viral cores wrapped in one capsid moving to the both ends of the capsid, a. Virion in nuclei of hepatopancreas of larval *P. chinensis*, × 80 000, b. Virion in the epiderm of *P. japonicus*, × 80 000; 1-10. Two virions completely separated and splitting mark between them, a. Virion in nuclei of hepatopancreas of larval *P. chinensis*, × 100 000, b. Virion in the epiderm of *P. japonicus*, × 80 000

日本对虾均有一个囊膜包含 2 个核衣壳的病毒粒子, 而且这种形态的病毒粒子还比较普遍。在对虾杆状病毒中, 只有王安利等<sup>[7]</sup>、石拓等<sup>[8]</sup>对中国对虾杆状病毒的研究过程中观察到了有一个囊膜包含有 2 个核衣壳的病毒, 但并未观察到 2 个或 3 个核衣壳共用一个膜正在进行装配的过程。在本次实验中, 作者不仅观察到了一个囊膜包含有 2 个核衣壳的完整的病毒粒子, 还观察到了此种病毒粒子装配的过程。该杆状病毒的形态发生起始于细胞核, 其装配的过程可分为 4 个阶段: 病毒基质的形成、囊膜的形成、病毒的装配和完整的病毒粒子的形成。另外, 作者还观察到了一个衣壳中包含有 2 个病毒核心, 这 2 个核心在衣壳中逐渐分开形成 2 个核衣壳, 这一过程类似于细菌的二分裂, 只是病毒的这一过程是 2 个已形成的病毒核心的分离, 而不是由一个核心复制出另一个核心再进行的分裂过程。关于对虾杆状病毒 2 个或 3 个核衣壳共用一个囊膜进行装配的报道是很少的, 而一个囊膜包含 2 个甚至 3 个以上核衣壳的现象在昆虫杆状病毒中是极为普遍的<sup>[9]</sup>, 这可能是由于对虾杆状病毒和昆虫杆状病毒宿主亲缘关系较远, 而导致它们之间形态、增殖方式上的差异。

作者建议将由 1 个囊膜包含有 2 个核衣壳的病毒粒子形成 2 个 1 个囊膜包有 1 个核衣壳的病毒粒子的过程及 1 个衣壳包有 2 个病毒核心的核衣壳形成 2 个 1 个衣壳包有 1 个核心的核衣壳的过程称为类分裂过程。此类分裂过程的后一种方式类似于细菌的二分裂, 只是并非病毒自主复制的结果。侯云德<sup>[10]</sup>指出有时几个杆状病毒基因组会串联在一起。这种高效的装配过程也是与病毒的大量迅速繁殖这一特征相适应的。

总之, 以囊膜的形成、核衣壳的装配、核衣壳的套

膜以及病毒不完全装配为特征的这些现象足以说明, 此杆状病毒在形态发生学上显示出多样化的方式。

#### 参考文献:

- [1] Couch J A. An epizootic nuclear polyhedrosis of pink shrimp: ultrastructure, prevalence and enhancement[J]. *J Inver-tebr Pathol*, 1974, 24: 311 - 331.
- [2] Durand S, Lightner D V, Redman R M, et al. Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV)[J]. *Dis Aquat Org*, 1997, 29: 205 - 211.
- [3] Adang M J, Miller L K. Molecular cloning of DNA complementary mRNA of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: location and gene products of RNA transcripts found late in infection[J]. *J Virol*, 1982, 44: 782 - 793.
- [4] Esche H, Lubber H, Siegmund B, et al. The translation map of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) genome[J]. *BMBO*, 1982, 1: 1 629 - 1 633.
- [5] Smith G E, Vlcek J M, Summers M D. In vitro translation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mRNA[J]. *J Virol*, 1982, 44: 199 - 208.
- [6] 徐洪涛, 王运涛, 朴春爱, 等. 1996 年中国对虾暴发性流行病病毒病原研究[J]. *病毒学报*, 1999, 15(2): 158 - 163.
- [7] 王安利, 王维娜, 郭明申, 等. 杆状病毒侵染中国对虾鳃、胃和肝胰腺的电镜观察及感染途径的探讨[J]. *动物学报*, 1997, 43(增刊): 45 - 48.
- [8] 石拓, 孔杰, 包振民, 等. 从中国对虾分离纯化的一种杆状病毒及其超微结构的研究[J]. *海洋学报*, 1998, 20(2): 60 - 64.
- [9] 吕鸿声. 昆虫与昆虫病毒病[M]. 北京: 科学出版社, 1982: 77.
- [10] 侯云德. 分子病毒学[M]. 北京: 学苑出版社, 1990. 11, 73.

## Morphology and morphogenesis of a baculovirus in shrimps

SUN Lei<sup>1</sup>, WANG Wei - na<sup>1</sup>, WANG An - li<sup>2</sup>, LI Feng - chao<sup>1</sup>, GUO Ming - shen<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, University of Hebei, Baoding 071002, China; 2. College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510303, China)

Received: Oct., 20, 2002

Key words: morphogenesis; baculovirus; *Penaeus chinensis*; *Penaeus japonicus*; electron microscopy

**Abstract:** Larvae of *Penaeus chinensis* were fed with the heads of *Penaeus monodon* affected with white spots on the carapace while *Penaeus japonicus* were injected with virus suspension also from *Penaeus monodon* affected with white spots on the carapace. After infection, larvae of *P. chinensis* and *P. japonicus* all died, white spots were found on their carapaces. A non - occluded baculovirus was observed from the artificially infected larvae of *Penaeus chinensis* and *Penaeus japonicus*. The virion was enveloped with a mean size of 295 nm × 105 nm. Beginning in the nuclei the viral morphogenesis process was composed of four stages: formation of viral stroma, formation of membrane, assembly of the virus and formation of complete virions. The assembling procedure allows large and rapid propagation of the baculovirus.

(本文编辑:刘珊珊)

---

(上接 第 57 页)

## Study on peptides composition on the nervous connective surface from *Aplysia* using maldi - tof mass spectrometry technology

Huang He - qing<sup>1</sup>, Kim Won - suk<sup>2</sup>, Lin Qing - mei<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, MEO Laboratory of Marine and Environmental Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Department of Chemistry and Beckman Institute, University of Illinois, Urbana, IL 61801, USA)

Received: Dec., 6, 2003

Key words: *Aplysia*; central nervous system; neural connective; peptide composition; mass spectrogram

**Abstract:** The central nervous system (CNS) of *Notarcus leachii cirrosus* off Xiamen lacks abdominal ganalion. *Aplysia juliana* Quoy & Gaimard and *Aplysia californica*, however, have ganalion. Using biological mass spectrometry, results show that the connective surface of the CNS of both *Aplysia californica* and *Notarcus leachii cirrosus* have abundant peptides, indicating that some of these peptides indicating these peptides play some part in the transmission among ganalions.

(本文编辑:张培新)