

# 中国对虾中一种与肝胰腺细小病毒混合感染的呼肠孤病毒的初步鉴定\*

薛清刚 官云浩<sup>†</sup> 王文兴

(国家海洋局第一海洋研究所, 青岛 266003)

<sup>†</sup>(农业部动物检疫所, 青岛 266032)

**提要** 于1991年9月在青岛市沙子口镇对虾养殖场采集中国对虾病虾, 采用酒石酸钾-甘油密度梯度离心法从病虾肝胰腺中分离出一种呼肠孤科病毒, 并通过电子显微镜观察和提取分析病毒基因组核酸等方法进行初步鉴定。结果显示, 该病毒在酒石酸钾-甘油密度梯度离心纯化时与肝胰腺细小病毒混合存在; 病毒颗粒为有包膜的正二十面体立体对称结构; 带包膜的完整颗粒直径在64—66nm; 裸露核衣壳平均直径为53.2nm; 病毒基因组由分成10个节段的双链RNA构成。目前还没发现与该病毒有明确关系的组织和细胞病理变化。

**关键词** 中国对虾 呼肠孤病毒 混合感染 鉴定

近年来, 国内一些地区陆续发现了几种新的对虾病毒(严隽其, 1995; 国际翔等, 1994; 陈细法等, 1994; 邹国祥等, 1994)。作者在研究中国对虾肝胰腺细小病毒的过程中, 在患病虾的肝胰腺组织内发现了一种属于呼肠孤病毒科(Reoviridae)的病毒, 报告如下。

## 1 材料和方法

**1.1 试剂** 本实验中所用试剂见作者前文<sup>1)</sup>。

**1.2 样品采集** 中国对虾(*Penaeus chinensis*)(下简称对虾)病虾样品于1991年9月取自青岛市崂山区沙子口镇对虾养殖场。患病对虾表现为生长速度缓慢、身体瘦弱、体色灰暗, 群体累积死亡率明显高于正常者。取样时, 现场捕获对虾用清水洗净, 随机取10尾虾用Davidson固定液和2%戊二醛固定液固定(薛清刚等, 1992)。其余对虾于清洁条件下取出肝胰腺, -70℃保存。

**1.3 病理学检查** Davidson液固定的对虾样品, 取头胸部按常规方法制备石蜡切片, 苏木精-伊红(H·E)染色, 光学显微镜观察各种组织, 尤其是肝胰腺的病理变化。戊二醛固定的样品则直接选取肝胰腺, 按常规方法制作超薄切片, 以JEOL-1200透射电子显微镜观察。

**1.4 病毒分离** 将对虾肝胰腺组织加TNE缓冲液(0.01mol/L Tris-HCl,

\* 国家自然科学基金资助项目, 39000083号。薛清刚, 男, 出生于1962年1月, 硕士, 副研究员。

收稿日期: 1994年7月8日, 接受日期: 1995年5月10日。

1) 薛清刚等, 1995, 中国对虾肝胰腺细小病毒的纯化与鉴定, 海洋与湖沼, 第27卷, 第3期。

0.4 mol/L NaCl, 0.001 mol/L EDTA, pH=7.4) 研磨制成匀浆并配成 20% 的悬液, 用三氯三氟乙烷脱脂 2 次。上清液用 8% (终浓度) 聚乙二醇 (PEG, MW 6000) 浓缩, 差速离心 4 次, 过 35% (W/W) 蔗糖垫离心 1 次。最后, 通过按 Ashley 等 (1982) 方法改进的酒石酸钾-甘油密度梯度, 置 Hitachi RPS 65T 转子中以 50 000 r/min, 于 10 °C 离心 4h 纯化。离心后取出不同的折光带分别对 TNE 缓冲液透析, 4 °C 过夜。

**1.5 病毒形态学观察** 纯化后的病毒悬液经透析、浓缩后, 滴加到 Formvar 膜支持的铜网上, 3% 中性磷钨酸负染, 透射电子显微镜观察形态并测量计算颗粒直径。

**1.6 病毒基因组核酸的提取和鉴定** 取电子显微镜观察证实有病毒颗粒的悬液, 先按 50 u/ml 和 5.0 mg/ml 分别加入 DNA 酶和 RNA 酶, 在制造商提供的说明书所要求的缓冲液条件下, 37 °C 水浴 1.5h。接着, 在反应液中加入蛋白酶 K 和十二烷基硫酸钠 (SDS) 使终浓度分别至 0.5 mg/ml 和 0.5% (W/V), 置 37 °C 温浴 2h。然后, 用等体积的平衡酚和酚: 氯仿: 异戊醇 = 25 : 24 : 1 各抽提 1 次, 取水相用等体积氯仿: 异戊醇 = 24 : 1 抽提 2 次。最终水相液加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠 (pH=5.2) 和 2.5 倍体积的预冷无水乙醇, -20 °C 过夜。最后, 以 13 000 r/min 离心 0.5h, 弃上清, 沉淀用 70% 乙醇洗 2 次, 真空抽干。

将病毒基因组核酸用不同核酸酶处理, 结合琼脂糖凝胶电泳鉴定病毒核酸。基本过程为: 用少量 TE 缓冲液 (0.01 mol/L Tris-HCl, 0.001 mol/L EDTA, pH=8.0) 溶解病毒核酸, 取样分别用无 RNA 酶的 DNA 酶、RNA 酶和 S1 核酸酶按说明书要求条件处理。反应体积均为 20  $\mu$ l, 各种酶的用量分别为: DNA 酶 2u, RNA 酶 0.1  $\mu$ g, S1 核酸酶 5u。处理后的病毒核酸在用 TBE 缓冲液 (0.09 mol/L Tris-硼酸, 0.001 mol/L EDTA, pH=8.0) 配制的 1% 琼脂糖凝胶中与未经酶处理的病毒核酸同时对比电泳。将溴化乙锭按 0.5  $\mu$ g/ml 混入凝胶中。分子标志物为  $\lambda$ DNA-EcoRI+HindIII。恒压 (4V/cm) 电泳 2h, 紫外光下观察、拍照。

## 2 结果

**2.1 患病对虾的病理变化** 在固定后检查的 10 尾对虾中, 有 6 尾在组织切片中发现肝胰腺细小病毒感染的典型肝胰腺组织病变 (薛清刚等, 1992), 另外 4 尾在包括肝胰腺在内的头胸部主要器官内未发现明显改变。电子显微镜检查 4 尾对虾的肝胰腺, 2 份样品显示肝胰腺细小病感染的细胞核内病变。所有被检对虾肝胰腺组织细胞均未见到肝胰腺细小病感染以外的新的病变, 也未发现新的病毒颗粒样结构。

**2.2 病毒的形态特征** 酒石酸钾-甘油密度梯度离心后, 离心管内通常可以出现 3 条折光带。取样作电子显示显微镜检查发现, 除个别病毒颗粒存在于中间条带外, 绝大部分集中在近管底端的致密条带内。该条带中样品负染后的电子显微镜观察结果见图版 I:1。可以看到形态相似但大小差别显著的 2 种病毒核衣壳颗粒。小的病毒颗粒 ( $\uparrow$ ) 直径在 23—29 nm, 与肝胰腺细小病毒相符。而大病毒颗粒 (C $\rightarrow$ ; E $\rightarrow$ ) 直径则在 51.2—56.6 nm, 平均 53.2 nm; 同时, 大的病毒颗粒有两种形式, 一是完整的核衣壳 (C $\rightarrow$ ), 另一种为空的衣壳 (E $\rightarrow$ )。在形态上, 2 种病毒颗粒均符合正二十面体立体对称病毒的特征。在同一批纯化但于不同铜网上检查的样品中, 还见到更大且呈圆球

状的颗粒(图版 I: 1), 其颗粒直径在 64—66nm, 由致密的核衣壳(N) 和包在外面的包膜(E→) 构成。

**2.3 病毒基因组的特性** 对病毒基因组核酸鉴定的结果示于图 1。可以看出, 从病毒样品中提取的核酸经 DNA 酶(D) 和 S1 核酸酶(B) 处理后均显示 10 条核酸带。10 条带分成 3 组, 大组 4 条带(L1—L4), 由大小在 4—5kbp 的 4 个片段构成; 中组 2 条带(M1—M2), 大小在 3.5—4.0kbp 之间; 小组也有 4 条带, 大小差别较大, 但均在 2kbp 以下。病毒核酸经 RNA 酶处理后, 仅在相当于 4.3kbp 处出现 1 条浓密的核酸带(C)。不经核酸酶处理的病毒核酸电泳后也显示 10 条核酸带(A 列), 其中, 第 1, 3, 4 条带分别与 L1, L3, L4 相似; 第 2 条带的形状和位置与 C 列的条带相似; 由于其比较浓密而又与 L2 位置重合, 因此显然将后者掩盖掉了; 换言之, A 列的未经酶处理样品中应该含有可形成 11 个条带的核酸, 由于在提取病毒基因组核酸前已通过酶处理而

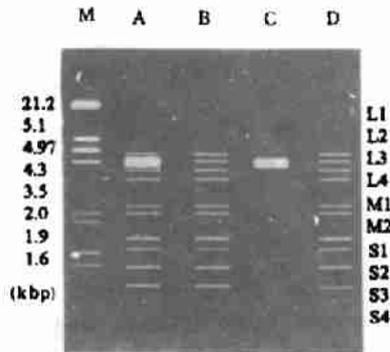


图 1 鉴定病毒基因组核酸电泳结果  
(图版 I:2 的放大)

Fig.1 Identified result of genomic nucleic acid of the reovirus that mixes with the hepatopancreatic parvovirus in *Penaeus chinensis*

去除了外源核酸, 所以图 1 的结果综合起来显示了被鉴定的病毒核酸中含有 2 种病毒的基因组, 同时也耐受选择性消化单链核酸的 S1 核酸酶。由此可见, 新病毒的基因组是由 10 个片段的双链 RNA 构成。综合形态学和基因组特征, 可以认为, 新病毒属呼肠孤病毒科(Reoviridae)(侯云德, 1990)。

曾在日本对虾中发现过呼肠孤病毒(Tsing et al., 1987)。而中国对虾中的呼肠孤病毒只在个别文献中简单提到过并称之 REO-4(Lightner, 1993), 但并没有详细的研究资料。由于研究材料等方面的限制, 作者尚无法对该病毒作出种属分类。

**3.2 新病毒的致病性** 日本对虾中发现的呼肠孤病毒是以肝胰腺上皮细胞的细胞质内形成包涵体为病变特征的。然而, 到目前为止本文作者在中国对虾上还未发现与分离出的呼肠孤病毒有明确关系的病理变化。这有两种可能: (1) 该病毒有很强的致死作用, 有病变的患病者已在早期死亡, 采集的样品只是呈潜伏性感染的幸存者。(2) 病毒感染后不引起明显的病变, 却造成对虾一种慢性消耗状态, 当合并其它感染或处于不利环境时则使养殖对虾持续性缓慢死亡。从采样现场养殖对虾死亡特点分析, 后者的可能性更大。

**3.3 新病毒与肝胰腺细小病毒的关系** 本项研究中的新病毒是与肝胰腺细小病毒混合在一起被分离出的。这一方面提示, 两种病毒颗粒在酒石酸钾-甘油中有相近的浮力密度; 另一方面说明, 该病毒可与肝胰腺细小病毒共同存在于中国对虾肝胰腺中。尽管对于两种病毒在形成感染过程中的确切关系还不清楚, 但毫无疑问, 两者混合感染的关系是成立的。Nash 等(1988) 和 Krol 等人(1990) 也曾注意到日本对虾呼肠孤病毒与其它病毒混合感染的现象。至于这种混合感染对于呼肠孤病毒自身的意义, 则有待于更进一步的研究。

## 参 考 文 献

- 陈细法等, 1994, 电子显微学报, **13**(5): 357.
- 邹国祥等, 1994, 电子显微学报, **13**(5): 358.
- 严隽其, 1995, 水产科学, **14**(1): 3—4.
- 国际翔等, 1994, 电子显微学报, **13**(5): 355—356.
- 侯云德, 1990, 分子病毒学, 学苑出版社(北京), 408—425.
- 薛清刚、王文兴, 1992, 对虾疾病的病理与诊治, 青岛海洋大学出版社(青岛), 60—74.
- Ashley, C. R. et al., 1982, *J. Clin. Microbiol.*, **16**(2): 377—381.
- Krol, R. M. et al., 1990, *Dis. Aquat. Org.*, **8**: 45—49.
- Lightner, D. V. et al., 1985, *J. Invert Pathol.*, **45**: 47—53.
- Lightner, D. V., 1993, CRC Handbook of Mariculture, 2nd Edition, Volume I. Crustacean Aquaculture, ed. by McVey, J. P., CRC Press Inc (Boca Raton, Florida), pp.393—486.
- Nash, M. et al., 1988, *J. Fish Dis.*, **11**: 531—535.
- Tsing, A. et al., 1987, *J. Fish Dis.*, **10**: 139—141.

## PRIMARY IDENTIFICATION OF A REOVIRUS INFECTED *PENAEUS CHINENSIS* TOGETHER WITH HEPATOPANCREATIC PARVOVIRUS

Xue Qinggang, Gong Yunhao<sup>†</sup>, Wang Wenxing

(First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266003)

<sup>†</sup>(National Animal Quarantine Institute, Ministry of Agriculture, Qingdao 266032)

**Abstract** A reovirus was separated in 1992—1993 from the hepatopancreas of the diseased *Penaeus chinensis* collected in September, 1991 at the Shazikou Shrimp Farm, Qingdao. After purification by ultracentrifugation through a potassium tartrate—glycerol density gradient, the virus preparation showed 2 different virus particles under the electron microscope. The smaller virus particle, was icosahedral and 23—29 nm in diameter, and was identified as the hepatopancreatic parvovirus of *Penaeus chinensis*. The larger one was an enveloped viron with spherical shape and diameter of 64—66 nm. The naked nucleocapsid of the larger virus particle was icosahedral and 51.2—56.6 nm (53.2 nm in average) in diameter. After extraction from the virus preparation, treatment with DNase, RNase and Nuclease S1, electrophoresis on agarose gel, the genomic nucleic acid was revealed to be completely different from the 4.3 kbp single stranded DNA of the hepatopancreatic parvovirus of *Penaeus chinensis*, but was composed of 10 fragments of double stranded RNA. As the morphological characteristics and the genome properties of the newly separated virus were obviously similar to those of the Reoviridae, the virus should be a member of this family. The histopathological and cytopathological changes that definitely related to the virus have not yet been discovered.

**Key words** *Penaeus chinensis* Reovirus Mixed infection Identification