

栉孔扇贝体内寄生的病毒的分离纯化 及其形态学观察

李登峰¹, 孙敬锋¹, 吴信忠^{1*}

(1. 中国科学院 南海海洋研究所, 大亚湾海洋生物综合实验研究站, 广东 广州 530301)

关键词: 栉孔扇贝; 病毒粒子; 泛影葡胺密度梯度离心; 纯化

中图分类号: P714⁺.5 文献标识号: A 文章编号: 0253- 4193(2002)04- 0145- 04

1 引言

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)是我国传统海水养殖贝种, 养殖范围主要分布于黄海、渤海沿岸的山东、河北、辽宁等地, 但是, 近年来因病害发生, 造成了巨大的经济损失。扇贝大规模死亡流行病学调查研究已进行多年, 流行病学调查、病理学、病原感染实验及病原分离纯化等研究初步认为类立克次体是扇贝(包括栉孔扇贝和海湾扇贝 *Argopecten irradians*)的病原生物^[1-4]。在用泛影葡胺密度梯度离心纯化栉孔扇贝类立克次体时发现一种具囊膜的病毒粒子, 本文首次报道栉孔扇贝体内该球形病毒纯化的形态学特征。

2 材料和方法

2.1 材料

栉孔扇贝样品于 2001 年采自山东青岛、长岛、烟台等栉孔扇贝养殖区, 扇贝大小规格为 4.5~ 5.5 cm, 新鲜样品空运回实验室后, 取栉孔扇贝成体肝胰腺(含胃和部分消化道)、鳃、外套膜, 用 PBS 清洗。

2.2 试剂

- (1) PBS: pH 值 7.4; Na_2HPO_4 , 53.9 mmol; KH_2PO_4 , 12.8 mmol; NaCl 72.61 mmol;
- (2) 蔗糖: AR, 购自上海生工生物技术有限公司;
- (3) 泛影葡胺: 76%, 购自上海淮海制药厂。

收稿日期: 2002- 05- 10; 修订日期: 2002- 06- 14.

基金项目: 国家“973”重大基础研究资助项目(1999012001); 国家自然科学基金资助项目((39970581, 30170741); 广东省重大基础研究资助项目(99B06201); 中国科学院创新资助项目(KSCX2- SW- 302- 8).

作者简介: 李登峰(1975-), 女, 湖南省双峰县人, 在读博士生, 从事海洋生物病害防治研究。

* 通讯作者

2.3 初纯

经清洗的组织用电动玻璃匀浆器匀浆(中速, 5 min), 用 PBS 稀释匀浆液, 低速离心(Sorval rotor 05), 700 g, 20 min, 4 °C, 留上清. 沉淀再次充分匀浆, 稀释后低速离心(转头同上), 500 g, 20 min, 4 °C, 取上清, 合并两次上清, 高速离心, 11 000 g, 1 h, 4 °C, 弃上清及附于管壁的油脂. 重悬沉淀, 低速离心, 500 g, 20 min, 4 °C, 去沉淀. 上清铺于含 23% 蔗糖和 16% 泛影葡胺的 PBS 混合液上, 离心(转头同上), 25 000 g, 1 h, 4 °C. 沉淀用 PBS 重新悬浮, 高速离心 11 000 g, 1 h, 4 °C, 用少量 PBS 重新悬浮沉淀, 即得初纯悬液.

2.4 泛影葡胺密度梯度离心纯化

用 PBS 配制 15%, 20%, 25%, 30%, 35% 泛影葡胺液, 由下向上于 12.5 cm³ 离心管中铺梯度液, 每一浓度铺 1.9 cm³. 将初纯悬液加于梯度液上, 超速离心(Beckman SW41 Ti), 100 000 g, 1 h, 4 °C, 分层取样, 各样分别用 PBS 稀释. 稀释液再作高速离心以去除泛影葡胺、浓缩样品, 22 000 g, 1 h, 4 °C, 沉淀用少量 PBS 悬浮, 电镜观察.

2.5 电镜观察

各取经高速离心去泛影葡胺和浓缩的各层悬液一滴于覆盖有福尔瓦的铜网上, 4% 的磷钨酸染 3 min, 干后电镜观察(Phillips CM 10).

3 结果

电镜负染观察各层偶尔可见少量病毒粒子, 25%~30% 界面层中病毒粒子较多, 且背景较干净. 但同时也存在一定量 RLO(Rickettsia-like organism), 可通过用细菌滤膜过滤法除去. 绝大多数粒子呈圆形或近圆形, 大小差异较大, 直径平均为(148 ± 7) nm ($n = 37$), 少数形态不规则呈缺刻的叶片状. 病毒粒子具双层囊膜(见图 1). 完整粒子囊膜可见放射状突起, 囊膜内核衣壳粒清晰可见, 呈螺旋状排列(见图 1a). 前期大量组织细胞病理切片检查未见病毒包涵体.

4 讨论

在流行病学调查研究中, 采用组织切片法进行大量组织细胞病理学研究中未发现病毒包涵体, 故纯化中所发现的病毒为非包涵体病毒. 病毒的形态具有如下特征: 不形成包涵体, 绝大多数粒子呈圆形或近圆形, 大小差异较大, 直径平均为(148 ± 7) nm, 少数形态不规则呈缺刻的叶片状. 病毒粒子具双层囊膜, 完整粒子囊膜可见放射状突起, 核衣壳粒呈螺旋状排列. 根据病毒这些特征与副黏病毒科的鸡瘟新城疫病毒进行形态学比较可以发现这两者较相似^[5,6], 究竟其是否属于副黏病毒科, 有待进一步研究鉴定.

迄今贝类病毒的研究较少, 已报道的有鲍(abalone)、牡蛎(oyster)、三角帆蚌等^[7-15]. 这些报道认为病毒是贝类的病原. 同时目前医学界已认识到贝类能作为引起人类消化道疾病的中间宿主^[16,17]. 我们的研究发现栉孔扇贝的胞内寄生物较复杂, 有类立克次体、类支原体和病毒. 其中在栉孔扇贝的幼苗、幼贝阶段可能以类立克次体为主, 成贝中以类支原体和病毒较多. 栉孔扇贝生长各阶段均能发生爆发性死亡, 可能是由各种病原综合作用的结果. 其中在幼苗、幼贝阶段可能以类立克次体为主, 成体阶段则以类支原体和病毒为主. 鉴于该病毒在形态学特征上与人类的副黏病毒较相似, 因此也不排除该病毒是污染的人源性病毒的可能性.

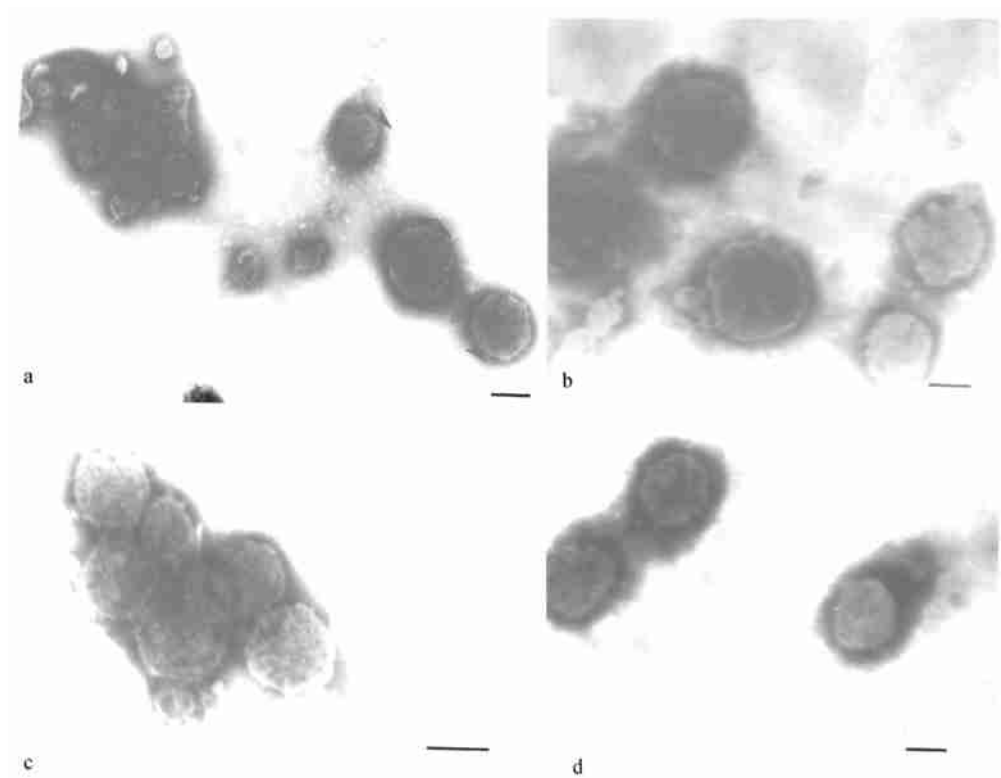


图 1 纯化的病毒负染。4 图的 Bar= 100 nm 病毒圆形或近圆形,少数形态不规则呈缺刻的叶片状。箭头示囊膜放射状突起

参考文献:

- [1] 吴信忠, 刘英杰, 李登峰, 等. 栉孔扇贝和海湾扇贝系统性感染原核生物的超微结构和细胞病理学研究 [A]. 潘金培, 王肇鼎, 吴信忠. 海湾生态环境与生物资源持续利用 [R]. 中国科学院大亚湾海洋生物综合实验站研究年报第三期 (1997~ 2000), 北京: 科学出版社, 2001. 61~ 66.
- [2] LI Deng-feng, WU Xin-zhong. Purification and biological features of rickettsia-like organism (RLO) from scallops *Chlamys farrieri* and *Argopecten irradians* in China [A]. Book of Abstract of World Aquaculture [Z]. 2002. 832.
- [3] LIU Ying-jie, WU Xin-zhong, ZHANG Qi-zhong, et al. Experimental infection of bay scallop *Argopecten irradians lamarck* with a rickettsia-like organism (RLO) [A]. Book of Abstract of World Aquaculture [Z]. 2002. 447.
- [4] WU Xin-zhong, LIU Ying-jie, LI Deng-feng, et al. Ultrastructure and histopathology of a procaryotic organism causing systematic infection in the scallops *Chlamys farrieri* and *Argopecten irradians lamarck* in China [A]. Book of Abstract of World Aquaculture [Z]. 2002. 829.
- [5] 甘肃农业大学主编. 兽医微生物学 (第二版) [M]. 北京: 农业出版社, 1988. 343—344.
- [6] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 (第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 1997. 743—738.
- [7] 王军, 苏永全, 张蕉南, 等. 1999 年春季东山九孔鲍暴发性病害研究 [J]. 厦门大学学报, 1999, 38(5): 641—644.
- [8] 王斌, 李霞, 高船舟. 皱纹盘鲍一种球状病毒的感染及其发生 [J]. 中国病毒学报, 1997, 12(4): 360—363.
- [9] 沈明山, 罗文新, 苏文金. 存在于牡蛎肝胰腺的病毒样颗粒的发现 [J]. 厦门大学学报, 2000, 39(4): 526—529.
- [10] 邵健忠, 项黎新, 李亚南. 三角帆蚌瘟病的组织病理研究 [J]. 水产学报, 1993, 17(1): 1—7.
- [11] 姜静颖. 海湾扇贝体内发现一种新病毒——疱疹病毒 [J]. 山东农业大学学报, 1997, 28(增刊): 26—28.
- [12] OTSU R, SASAKI K. Virus-like particles detected from juvenile abalones (*Nordotis discus discus*) reared with an epizootic

- fatal wasting disease[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1997, 70(2) : 167—168.
- [13] COMPS M, COCHENNEE N A, PRIOR H C. Papovavirus-like infection of the golden-lipped pearl oyster, *Pinctada maxima*, from the Torres Strait, Australia[J]. J of Invertebrate Pathology, 1993, 62(2): 201—203.
- [14] COMPS M, DUTHOIT J I. Infection virale associee a La “maladie des branchies” de l’huitre portugaise *Crassostrea angulata*[J]. Lnk C R, Acad Sci Parts Ser, D, 1976, 283: 1 595—1 596.
- [15] ELSTON R. Virus like particles associated with lesion in larva Pacific oyster (*Crassostres gigas*) [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1979, 33 : 71—74.
- [16] CHRISTENSEN B F, LEES D, WOOD K H, et al. Human enteric viruses in oysters causing a large outbreak of human foodborne infection in 1996/97 Christensen BF[J]. Journal of Shellfish Research, 1998, 17(5) : 1 633—1 635.
- [17] SHIEH Y S C, CALCIKR, BARIC R S. A method to detect low levels of enteric viruses in contaminated oysters[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1999, 65(11): 4 709—4 714.

Purification and feature of virions from *Chlamys farreri*

LI Deng-feng¹, SUN Jing-feng¹, WU Xin-zhong¹

(1. Center for Marine Disease Control, Marine Biology Research Station at Dayawan (MBRS), South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Key words: Renografin density gradient centrifugation ; purification ; *Chlamys farreri* ; virions