

# 对虾白斑病毒感染的电子显微镜观察 及 DNA 杂交证据<sup>\*</sup>

徐洪涛<sup>1</sup> 朴春爱<sup>2</sup> 王 雷<sup>1</sup> 王文兴<sup>3</sup> 相建海<sup>1</sup> 王运涛<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(<sup>2</sup> 中国预防医学科学院病毒学研究所 北京 100052)

(<sup>3</sup> 国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266003)

**摘 要:** 中国大陆养殖的中国对虾从 1993 年开始至今连年爆发病毒性流行病, 俗称“白斑病”(WSBV), 死亡率近 100%, 造成巨大经济损失。为进一步明确虾病暴发原因, 利用电子显微镜技术, 对 1993 年至 1998 年收集的发病中国对虾组织进行观察, 发现病原体为直径  $(125 \pm 7.6) \text{ nm}$ 、长约  $(345 \pm 16) \text{ nm}$  大小的带包膜的非包涵体型杆状病毒。经氯化铯密度梯度超速离心技术获得了纯化的病毒核衣壳, 大小为  $(80 \pm 13) \text{ nm} \times (380 \pm 24) \text{ nm}$ 。形态学特征与台湾地区发现的白斑杆状病毒(WSBV)相似。利用地高辛标记的 WSBV DNA 探针, 对病虾标本及纯化病毒 DNA 进行斑点杂交检测, 均呈阳性反应, 而与正常对虾组织无杂交反应。从形态学及分子生物学角度证明 WSBV 感染是造成中国大陆养殖对虾连年暴发流行病的重要原因。

**关键词:** 中国对虾, 白斑杆状病毒, 流行病, 电子显微镜, DNA 探针

中图分类号: Q934.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2000)03-0252-56

中国大陆养殖对虾自 1993 年以来连年爆发病毒性流行病, 发病对虾典型表征为体色发红、空胃、甲壳易剥离, 不粘表皮, 部分病虾甲壳呈现白斑, 俗称“白斑病”。对虾从发病到死亡历时仅数天, 死亡率近 100%。中国大陆养殖的对虾主要为中国对虾, 斑节对虾及日本对虾在部分地区也有养殖。许多学者利用电子显微镜在中国发病对虾中发现非包涵体型杆状病毒, 认为是主要致病病毒并赋予不同命名: 中国对虾杆状病毒(PCBV)<sup>[1]</sup>; 皮下及造血组织坏死性杆状病毒(HHNBV)<sup>[2]</sup>; 淋巴样细胞核型杆状病毒(LNBV)<sup>[3]</sup>; 对虾白斑杆状病毒(PWSBV)<sup>[4]</sup>; 中国对虾杆型病毒(PcBLV)<sup>[5]</sup>; 中国杆状病毒(CBV)<sup>[6]</sup>及中国对虾非包涵体型杆状病毒(PcNOBV)<sup>[7]</sup>等。其中部分报道认为各自发现的病毒为新的病毒。养殖对虾白斑病最早于 1992 年初发生于台湾<sup>[8]</sup>, 其病原为白斑杆状病毒(WSBV)<sup>[9, 10]</sup>, 从发病特征、地域邻近及发病的时间顺序等资料分析, 中国大陆虾病的暴发可能与台湾地区养殖对虾的 WSBV 感染有关。本文对中国大陆自 1993 年至 1998 年的发病中国对虾进行了电子显微镜观察, 并利用 WSBV DNA 探针进行斑点杂交检测, 从

<sup>\*</sup> 本研究得到海洋 863-819-02-05 课题、中国科学院海洋研究所 EMBL 开放课题及中国科学院海洋研究所所长基金部分资助

作者简介: 徐洪涛(1965-)男, 山东省德州人, 中国科学院海洋研究所, 医学博士, 1994 年赴美国纽约州立大学研修, 主要从事海洋病毒学研究

收稿日期: 1998-12-28, 修回日期: 1999-10-18

## 形态学角度及基因水平探讨中国对虾的疾病暴发与 WSBV 感染的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

1993年至1998年典型发病中国对虾分别取自青岛地区当年夏季发病虾池,冻存于 $-70^{\circ}\text{C}$ 。健康中国对虾(平均体长 $7.2\text{cm}$ )为本所水族楼育种养殖个体。

## 1.2 电子显微镜观察

取典型发病中国对虾鳃、胃、头胸甲下表皮、淋巴样器官、触角腺等组织经 2.5% 戊二醛固定、1% 锇酸后固定、乙醇脱水、树脂包埋进行常规超薄切片,醋酸铀染色,PHILIPS TEM 410 电镜观察、拍照。

### 1.3 病毒分离纯化

取典型发病对虾鳃、胃、肠及头胸甲下表皮,加液氮研磨,加含 PMSF 及  $\beta$ -ME 的 PMTNE 缓冲液:50mmol/L Tris-HCl, pH7.6, 10mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl, 1mmol/L PMSF, 2% $\beta$ -ME, 制成 10% 的悬液,超声波处理 2min,低速离心 6500g 二次,每次 15min,收上清,35000r/min 超速离心 35min,弃上清,沉淀用 PMTNE 缓冲液重悬,低速离心一次,取上清,0.45 $\mu$ m 孔滤膜过滤,超速离心沉淀,适量 PMTNE 缓冲液重悬,进行不连续氯化铯密度梯度(30 000r/min)离心 20h,收乳白色病毒带,对 0.01mol/L PBS 透析 48 h,即为纯化的病毒,经磷钨酸(PTA)负染,电镜观察。

#### 1.4 DNA 探针制备及斑点杂交

根据台湾地区 WSBV 基因组 *Sal* I 片段序列合成一对引物,用 PCR 方法及地高辛 (DIG) 标记试剂盒 (宝灵曼公司产品) 制备 DIG 标记长为 355bp 的 WSBV DNA 探针,引物及探针序列详见前文<sup>[11]</sup>。DNA 提取及斑点杂交试验按文献<sup>[12]</sup>方法进行。

## 2 结果

## 2.1 电子显微镜观察

在 1993 年至 1998 年收集的自然发病中国对虾胃(图版 I-1)、鳃、头胸甲下表皮、淋巴样器官及触角腺(结果未显示)中均见大量核内长椭圆型病毒颗粒,病毒有包膜,呈单位膜结构,厚约 8~10nm,内包杆状核衣壳。完整毒粒大小平均  $(125 \pm 7.6) \text{ nm} \times (345 \pm 16) \text{ nm}$ ,核衣壳平均  $(85 \pm 6.5) \text{ nm} \times 295 \text{ nm}$ 。细胞核内未见包涵体。部分毒粒一端可见包膜延伸形成乳头状突起。除完整毒粒外,可见大量未装配成熟的病毒空壳和裸露核衣壳(图版 I-2)。在胞浆内偶尔可见散在的或胞浆空泡内成熟的病毒颗粒(图版 I-3)。各年度收集的病虾组织内的病毒形态及大小均相似。

## 2.2 纯化病毒的结构特征

经氯化铯密度梯度离心后,获得大量纯化的病毒,包膜全部丢失。核衣壳呈杆状,大小约  $(80 \pm 13) \text{ nm} \times (380 \pm 24) \text{ nm}$ ,由 13~16 条螺旋带构成,螺旋带与衣壳长轴垂直,螺旋带两侧各由 6~7 个子粒构成,子粒直径约  $9 \text{ nm}$  (图版 I-4)。

### 2.3 斑点杂交结果

将纯化的病毒 DNA、健康中国对虾组织 DNA、各年度发病对虾组织 DNA 点样于硝

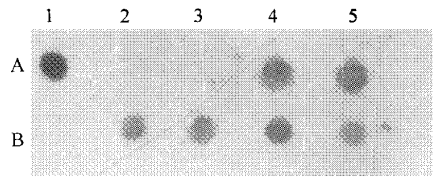


图1 地高辛标记 WSBV DNA 探针检测  
发病中国对虾(1993~1998)结果

Fig.1 Detection of diseased *Penaeus chinensis* sampled between 1993 and 1998 with digoxigenin labelled WSBV DNA probe

A-1 Purified viral DNA(positive control);  
B-2~A-3 Healthy *P. chinensis* DNA;  
B-1 Negative control;  
A-4, A-5 and B-2~B-5:Diseased *P. chinensis* sampled between 1993 and 1998.

酸纤维素膜上,用 DIG 标记 DNA 探针进行杂交,同时将 TE 点于膜上作空白对照。斑点杂交结果如图 1 所示 纯化病毒 DNA、发病虾组织 DNA 杂交反应阳性 而健康对虾组织 DNA 及空白对照无杂交信号。

3 讨论

中国大陆严重流行性虾病最初于 1992 年 7 月至 9 月发生于福建南部养殖的斑节对虾、长毛对虾及日本对虾<sup>[1]</sup>,次年夏季从南到北迅速蔓延,波及全国整个沿海养殖区。本文在中国对虾中发现的病毒形态与台湾地区发现的 WSBV 形态相似,但体积较大,切片内完整毒粒为(125±7.6)nm×(345±16)nm,台湾 WSBV 大小为(87±7)nm×(330±20)nm<sup>[14]</sup>。纯化病毒核衣壳大小分别为(80±13)nm×

(380±24)nm 和(58~67)nm×(330~350)nm<sup>[9]</sup>二者具有相似的结构特征,核衣壳呈杆状,螺旋对称,由规则性排列的螺旋带状蛋白亚单位堆积构成,与衣壳长轴垂直。在纯化过程中,病毒包膜全部丢失,未能见到病毒一端突出的尾样结构,但超薄切片中部分毒粒可见乳头状突起,提示本文研究的病毒有可能在成熟毒粒的一端带有相似的尾样结构,其他作者从发病中国对虾中曾纯化到带尾样结构的病毒<sup>[2]</sup>。病毒大小的差异可能与宿主来源及标本制备方法各异有关。

根据台湾 WSBV 基因组 DNA *Sal* I 片段序列设计引物,从发病中国对虾提纯的病毒 DNA 中成功扩增出长为 355bp 目的片段, DNA 序列测定表明二者序列完全相同<sup>[11]</sup>,经 DIG 标记制成 WSBV DNA 探针,对 1993 年至 1998 年收集的中国对虾病虾标本及纯化病毒 DNA 进行斑点杂交检测,均呈阳性反应,而与正常对虾组织无杂交反应。

综合上述电镜及 DNA 杂交结果,本文证实造成中国大陆养殖对虾疾病暴发的病毒与台湾地区流行的 WSBV 有同源性。WSBV 感染是造成中国大陆养殖对虾连年暴发流行病的重要原因。我们正在进行的病毒基因组文库构建及 DNA 序列测定工作将有助于阐明中国大陆对虾病毒流行株与包括台湾 WSBV 在内的其它白斑病毒的关系。

参 考 文 献

[ 1 ] 战文斌,俞开康,孟庆显.中国水产科学,1995,2(3):22~28.  
[ 2 ] 黄捷,于佳,宋晓玲,等.海洋水产研究,1995,16(1):11~23.  
[ 3 ] 陈细法,陈平,吴定虎,等.中国科学(C辑),1997,27(5):415~420.  
[ 4 ] Yang F, Wang W, Chen R Z, et al. J Virol Methods, 1997, 67(1):1~4.  
[ 5 ] Lu C P, Zhu S, Guo F S, et al. Arch Virol, 1997, 142(10):2073~2078  
[ 6 ] Nadala E C Jr, Tapay L M, Loh P C. Dis Aquat Org, 1998, 33(3):221~229.  
[ 7 ] 徐洪涛,王运涛,朴春爱,等.病毒学报,1999,15(2):158~163.  
[ 8 ] Chen S N. Proceedings of the Special Session on Shellfish Farming and Aquaculture, 1995, Aquaculture Society, Cn

Baton Roeger , Lousiana , USA , 1995. 29~34.

[ 9 ] Wang C H , Lo C F , Leu J H *et al.* *Dis Aquat Org.* 1996 , **25** :239~242.

[ 10 ] Lo C F , Leu J H , Ho C H *et al.* *Dis Aquat Org.* 1996 , **25** :133~141.

[ 11 ] 徐洪涛 朴春爱 王 雷 等. 病毒学报, 1999 , **15** ( 4 ) 354~359.

[ 12 ] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular cloning : A laboratory manual.* 2nd. ed. New York : CSH Laboratory Pres , 1989.

[ 13 ] 苏永金 蔡心一 王 军. 海洋科学, 1995 ( 1 ) :1~4.

[ 14 ] Chou H Y , Huang C Y , Wang C H , *et al.* *Dis Aquat Org.* 1995 , **23** :165~173.

## INFECTION OF WHITE SPOT BACULO-LIKE VIRUS( WSBV ) IN *PENAEUS CHINENSIS* : EVIDENCE FROM ELECTRON MICROSCOPY AND DNA HYBRIDIZATION

Xu Hongtao<sup>1</sup> Piao Chunai<sup>2</sup> Wang Lei<sup>1</sup> Wang Wenxing<sup>3</sup> Xiang Jianhai<sup>1</sup> Wang Yuntao<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Oceanology , Chinese Academy of Sciences , Qingdao 266071 )

(<sup>2</sup> Institute of Virology , Chinese Academy of Preventive Medicine , Beijing 100052 )

(<sup>3</sup> The 1st Institute of Oceanography , Chinese National Bureau of Ocean , Qingdao 266003 )

**Abstract :** Severe epizootic causing high mortalities in cultivated *Penaeus chinensis* has occurred every year in mainland China since 1993 with great economic loss. Naturally diseased *P. chinensis* sampled in Qingdao shrimp farming regions between 1993 and 1998 were examined by electron microscopy. A similar non-occluded nuclear bacilliform virus like the white spot baculo-like virus( WSBV ) reported in Taiwan was mostly found in the gill , cuticular epidermis under the exoskeleton , stomach , lymphoid organ and other tissues of ectodermal and mesodermal origin from these diseased samples. The virion was enveloped with a mean size of (  $125 \pm 7.6$  ) nm  $\times$  (  $345 \pm 16$  ) nm. Sometimes , a nipple-like appendage could be found protruding from one extremity of the virion. Envelopes were all lost after purification from cesium chloride gradient ultracentrifugation. The cylindrical nucleocapsid in negatively staining preparations was (  $80 \pm 13$  ) nm  $\times$  (  $380 \pm 24$  ) nm with 13~16 stripes perpendicular to the longitudinal axis of the nucleocapsid. Based on its pathogenic and morphological characteristics , this virus should be related to WSBV. A pair of primers created from information of WSBV genome DNA *Sal*I fragment produced a 355bp band using the WSBV isolate from *P. chinensis* in mainland China , as the DNA template. The specific PCR product was cloned , sequenced and labeled with digoxigenin( DIG ) DNA labeling kit( Boehringer Mannheim ). The sequence of the probe is identical to that of WSBV. All of the sampled diseased shrimps between 1993 and 1998 reacted with the DIG-labeled probe by dot-blot hybridization and no hybridization was observed using DNA from health shrimp as templates. These results based on electron microscopy and DNA hybridization indicated that the shrimp epizootic occurred in mainland China was related to

the WSBV infection previously occurred in Taiwan early 1992.

**Key words :** *Penaeus chinensis* , WSBV , Epizootic , electron microscope , DNA probe

图 版 说 明

Explanation of plates

- 1. 发病中国对虾胃组织电镜照片( ×14 200 )  
Electron micrograph of the stomach of diseased *P. chinensis*( ×14 200 )
- 2. 发病中国对虾胃组织电镜照片( ×33 800 )  
Electron micrograph of the stomach of diseased *P. chinensis*. Arrowhead indicates a nipple-like structure projecting from one end of the virus( ×33 800 )
- 3. 发病中国对虾胃组织电镜照片( ×33 800 )  
Electron micrograph of the stomach of diseased *P. chinensis*. Arrowhead indicates the viron in the cytoplasm( ×33 800 )
- 4. 纯化病毒核衣壳负染电镜照片( ×111 400 )  
Negatively stained electron micrograph of purified viral nucleocapsids from diseased *P. chinensis*( ×111 400 )

<sup>1</sup> Corresponding author

敬 告 读 者

《微生物学报》是中国自然科学核心期刊( 名列生物类期刊第 4~6 位 )。据中国科技信息研究所最新出版的《中国科技期刊引证报告》( CJKR )中报道 , 1998 年我刊的影响因子为 0.359 ,名列生物类期刊第八位。

另据中国科学引文数据库 1998 年最新数据统计 ,在被引频次最高的中国科技期刊 500 名排行表中 ,本刊名列第 68 位 ,并连续五年( 1994~1998 )入围中国科技期刊《引文频次百名表》。

重 要 声 明

凡本刊刊出的稿件 ,除在本刊出版使用外 ,还要以《光盘版》等多种形式出版使用 ,作者如不同意 ,敬请来稿时声明。

从 2000 年开始 ,凡被本刊录用的稿件 ,编辑部将及时发出录用通知 ;对未被录用的稿件 ,将及时函告 ,并说明原因 ,稿件一律不退 ,请作者自留底稿。

《微生物学报》编辑部