

三角帆蚌瘟病的研究

II. 三角帆蚌瘟病的病原——一种嵌砂样病毒

张治国 丁苏芳 汪洁

(江苏省微生物研究所, 无锡)

邱并生 裴美云

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从自然发病与人工感染发病蚌分离的三角帆蚌瘟病病毒(HcPV)呈球形、类球形,大小差异悬殊,直径45—296nm。病毒颗粒外被一层表面突起和类脂质的囊膜。核衣壳呈串珠状,直径10—12nm,卷曲于细胞浆内,可超过1000nm。超薄切片中病毒颗粒积聚于细胞浆与内质网中。超微病变的主要特征:内质网高度扩张,核糖体增殖并凝聚,胞浆内出现包裹着病毒的层卷状结构。病毒核酸对RNA酶敏感,对DNA酶不敏感,经聚丙烯酰胺凝胶电泳,出现4条大分子带与1条低分子带。HcPV的上述特征与嵌砂样病毒基本吻合。因此认为三角帆蚌瘟病的病原是一种嵌砂样病毒。

关键词 嵌砂样病毒;核衣壳;层卷状结构;珍珠;软体动物

前文曾报道了近年来我国部分地区流行的三角帆蚌瘟病(*Hyriopsis cumingii* Plague, HcP),是一种病毒性传染病^[1]。本文介绍不同疫点自然罹病与人工感染病蚌的超薄切片、病毒的提纯与电镜观察、病毒核酸的提取与聚丙烯酰胺凝胶电泳等试验结果。以及根据HcPV及其核衣壳的形态特征、细胞超微病变特征和核酸的性质,对HcPV的分类地位作的初步讨论。

材料与方 法

(一) 病毒提纯

剪取病蚌的消化腺、肾、肠道,加pH7.2 PBS匀浆,低速离心去沉淀,8,000×g离心20分钟,上清液加在pH7.2、0.01M PB配制的20%、50%(W/W)双层蔗糖层上,130,000×g离心3小时,取双层蔗糖层界面的沉淀带,加10倍体积pH7.2、0.01M PB稀释,超速离心沉淀病毒。研磨悬浮,低速离心去沉淀,通过pH7.2、0.01M PB

配制的20—60%(W/W)蔗糖线性梯度,130,000×g离心4小时。取出在密度1.14—1.18g/cm³处的病毒带,经过稀释,超速离心或通过Sephadex G50柱去除蔗糖,可供电镜制片及提取病毒核酸用。

(二) 电镜制片

上述制备的病毒悬液,点铺在喷有碳膜的铜网上,2%PTA(pH7.0)负染,观察病毒和核衣壳的形态。病毒悬液按8:1分别加入乙醚、氯仿或正丁醇,室温振荡10分钟,离心后取水相制片,观察病毒的表面突起与囊膜情况。

(三) 感染性测定

经过8,000×g离心并加青霉素、链霉素处理的除菌病料,按8:1加入氯仿或乙醚,室温搅拌15分钟,离心取水相,经内脏注射非疫区三角帆蚌,每只蚌0.4ml。在与前文相同的条件下饲养,观察发病情况。

本文于1985年11月27日收到。

南京医学院周燧、薛婉芬同志参加部分工作,特此致谢。

(四) 超薄切片的制备(同前文^[11])**(五) 病毒核酸的提取**

参照 Anon^[12] 的方法略加修改。上述经过蔗糖线性梯度离心的病毒沉淀带加 0.5% SDS 缓冲液 [0.1M NaCl-0.01M Tris·HCl (pH 7.2)-0.01M EDTA-0.5% SDS] 稀释至含蔗糖 10% 左右, 加等量的 pH 7.0 pB 饱和的苯酚, 缓缓振荡 10 分钟, 离心取水相, 加 2.5 倍体积乙醇, -20℃ 过夜沉淀核酸, 离心, 真空干燥, 加适量含 10% 聚蔗糖的电泳缓冲液稀释。

(六) RNA 酶、DNA 酶水解

参照 Francki^[13] 的方法, 分别用 RNA 酶 T 和 DNA 酶 I 处理。RNA 酶 T 浓度 20μg/ml, 反应液 2.5×SSC, 33℃ 水解 30 分钟。使用前 RNA 酶先加热灭活 DNA 酶。DNA 酶 I 的浓度为 10μg/ml, 反应液为 5mM Tris-HCl-5mM MgCl₂, pH 7.3, 33℃ 水解 1 小时。

(七) 聚丙烯酰胺凝胶电泳与核酸染色

3% 聚丙烯酰胺垂直胶板长 15cm, 电泳缓冲液为 TBE (0.089M Tris-0.089M 硼酸-0.02M EDTA pH 8.0), 电压 75V, 电泳 7 小时。按照 Sammon 的银染色方法染核酸^[4]。

结 果**(一) 病毒与核衣壳形态**

病毒颗粒呈球形、类球形, 直径 45—296nm, 多为 60—120nm。表面布满纤维

的突起, 突起长度因样品处理不同而异, 长者可达 10nm (图版 I-1a)。样品保存时间稍长, 表面突起逐渐消失 (图版 I-1b), 少数病毒颗粒中可分辨出 1—3 粒 20—30nm 直径的“砂粒”。

病毒核衣壳呈串珠状, 直径 10—12nm, 在提取样品中大部分长度为 60—120nm (图版 I-2)。

(二) 超微病变特征

病蚌的消化腺、肠和肾细胞, 内质网高度扩张, 核糖体明显增多并积聚, 胞浆空泡变性或者液化, 层卷状结构出现在胞浆内, 有的包裹着病毒。在提取样品中, 这种年轮状的层卷状结构十分密集, 形成单独的沉淀带 (图版 I-4)。

病毒颗粒积聚于细胞浆以及扩张的内质网内, 但在高尔基区则未见病毒积聚。

超薄切片中核衣壳盘曲在胞浆内, 长度可超过 1000nm (图版 I-3)。在秋末采集的病蚌样品中, 串珠状的核衣壳尤为多见。上述的病毒与核衣壳的形态特征、超微病变特征, 与嵌砂样病毒科 (Arenaviruses) 病毒极相似^[5-7]。

(三) 病毒的囊膜与感染性

经过上述有机溶剂处理后, 病毒失去

表 1 HePV 对有机溶剂的敏感性试验

Table 1 The sensitivity of HePV to organic solvents

含病毒材料来源 Source of the materials containing viruses	试验蚌死亡率 Mortality of clams	
	有机溶剂处理 Treatment with solvents	对照组 Control
H. Ch. 1代 H. Ch. 1st generation	0/7	5/7
N. W. 1代 N. W. 1st generation	0/7	7/7
N. Hen. 原代 N. Hen. original generation	1/8	7/8
Y. You. 1代 Y. You. 1st generation	1/7	6/8
平均值 Average	6.9%	83.3%

表面突起与囊膜(图版 I-1c)。4个疫点的除菌病料注射一周后,试验蚌开始死亡,死亡率 5/7—7/7,平均 83.3%。经有机溶剂处理 15 分钟,死亡率下降为 0/7—1/7,平均 6.9%(表 1)。试验结果表明,病毒的囊膜结构与其感染性密切相关。

(四) HcPV 的核酸性质

图 1 示 HcPV 核酸电泳 7 小时后的情况。病毒核酸分成 4 个分子量较大的片段。根据参照物的迁移率,第三片段的分子量约为 1.1×10^6 (22S),第四片段约为 0.7×10^6 (18S),下面还有一条低分子量的核酸带。在 $2.5 \times \text{SSC}$ 中,经 RNA 酶处理后,大分子核酸基本降解。经 DNA 酶处理的病毒核酸与未经处理者基本相同。试验结果表明, HcPV 核酸应属于 ssRNA。由此可见, HcPV 核酸的性质符合嵌砂样病毒科核酸的基本特征^[6]。

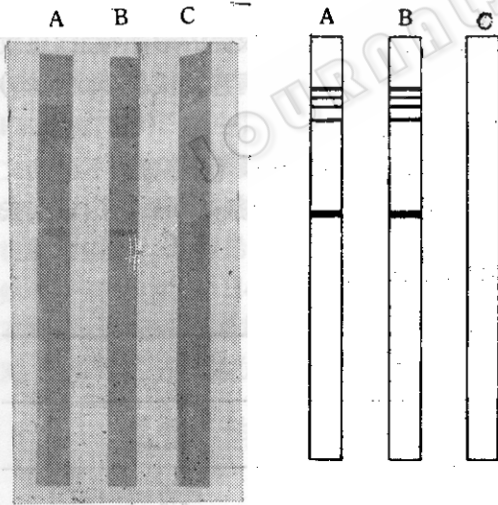


图 1 HcPV 核酸的聚丙烯酰胺凝胶电泳

A. 病毒核酸未经处理; B. 病毒核酸经 DNA 酶处理; C. 病毒核酸经 RNA 酶处理。

Fig. 1 PAGE of HcPV nuclear acid

A. nuclear acid of HcPV without treatment;
B. treated with DNase; C. treated with RNase.

讨 论

根据病毒与核衣壳形态、超微病变特征和病毒核酸的一些特征,认为 HcPV 应属嵌砂样病毒^[5-7]。本病毒形态的多样性以及细胞高尔基区没有病毒聚集的特点,易与布尼安病毒科病毒(Bunyaviruses)相区别^[7]。

在我们的几份超薄切片中均未见到嵌砂样病毒所特有的“砂粒样”核糖体,这可能是由于染色技术造成的。但在提取样品的少数病毒中依然可分辨出 1—3 粒直径为 20—30nm 的“砂粒”。病蚌组织超薄切片的大量层卷状结构中有的还包裹着病毒颗粒,并出现在胞浆内。在提取样品中常可见到这种年轮状的层卷状结构,这些特征性的病变在啮齿动物与人的嵌砂样病毒感染中均未见报道。

贝壳类软体动物在滤过大量水体时能滞留和浓缩水中的可溶性的包括病毒的颗粒物质。Hill^[8]和 Sobsey^[9]曾报道,从贝类和繁殖贝类的水体中发现肠道病毒、腺病毒、呼肠孤病毒、脊髓灰白质炎病毒、肝炎病毒、科赛奇病毒和艾柯病毒,但它们并不能使贝类发生传染病而死亡。嵌砂样病毒也属于脊椎动物病毒,其成员约 10 种,分布在啮齿动物、人类和蝙蝠^[7],但寄生于淡水软体动物的嵌砂样病毒引起大面积传染病而造成死亡,还是第一次报道。HcPV 的发现不仅为本病的防治提供了依据,还为研究病毒的进化提供了模型。

参 考 文 献

- [1] 张治国等:微生物学报, 26(4): 308—312, 1986.
- [2] Anon, M. C. et al.: *J. Virol.*, 18: 833—838, 1976.
- [3] Francki, R. I. E. et al.: *Virology*, 101: 233—241, 1980.
- [4] Samons, D. W. et al.: *Electrophoresis*, 2: 135—141, 1981.

- [5] William, E. R. and W. C. Leung: *Arenaviruses*, *Comprehensive Virology*, 14, ed. by H. F. Conrat and R. R. Wangner, pp. 157—185, 1979.
- [6] Compans, R. W. et al.: *Molecular and Genetic Studies of Tacaribe Pichinde and Lymphocytic Choriomeningitis Viruses, The Replication of Negative Strand Viruses*, Dvia, H. L. Bishop and R. W. Compans, pp. 31—36, 1981.
- [7] F. 芬纳编著 (廖延雄等译): 《病毒的分类与命名》, 科学出版社, 北京, 第 40—42 页; 70—71 页, 1980.
- [8] Hill, B. J.: *Molluscan Viruses: Their Occurrence, Culture and Relationships*, *Proceedings of the First International Colloquium on Invertebrate Pathology*, p. 25, 1976.
- [9] Sobsey, M. D.: *Detection of Viruses in Shellfish*, *Methods in Environmental Virology*, ed. by C. P. Gerba, p. 243, 1982.

STUDIES ON THE MUSSEL *HYRIOPSIS CUMINGII* PLAGUE

II. A NEW ARENAVIRUS IS THE PATHOGEN OF *HYRIOPSIS CUMINGII* PLAGUE

Zhang Zhiguo Ding Sufang Wang Jie

(*Jiangsu Institute of Microbiology, Wuxi*)

Qiu Bingsheng Pei Meiyun

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

The *Hyriopsis cumingii* plague virus (HcPV) particles which were found in field or experimentally infected mussels are round or roundlike shape, and range widely in diameter from 45 to 296 nm. The virus particles are characterized by a layer of surface projects and a lipid envelop. The nucleocapsid appears string-of-beads to be 10—12 nm in diameter and 60—120 nm in length or over 1000 nm in coiled structure in the cells. In ultrathin-sections, the viral particles and nucleocapsid are found in cytoplasm and endoplasmic reticulum, but not in golgosome. The extremely expansion of endoplasmic reticulus, the multiplication and aggregation

of ribosome and laminae containing virus are the features of ultramicro-pathology. The viral nucleic acid is sensitive to RNase in 2.5×SSC but not to DNase. Four species of RNA have been determined by polyacrylamide gel electrophoreses. The above mentioned characters of HcPV are similar to that of Arenaviruses, we concluded that, *Hyriopsis cumingii* plague is a virus disease caused by one of frenaviruses.

Key words

Arenaviruses; Nucleocapsid; Laminae; Pearl; Mollusc

图 版 说 明

Explanation of plate

- 1a. HcPV 具表面突起(120,000 \times)。
 - 1b. HcPV 负染,病毒的大小差异悬殊,保存过程中表面突起消失(82,000 \times)。
 - 1c. 有机溶剂处理后病毒的表面突起与囊膜消失(82,000 \times)。
 2. 从病蚌组织提取的病毒核衣壳呈串珠状(箭头),(180,000 \times)。
 3. 胞浆中 HcPV 颗粒与盘曲的核衣壳(200,000 \times)。
 4. 从病蚌组织提取的、密集的层卷状结构(60,000 \times)。
- 1a. HcPV with surface projects.
 - 1b. Negative stained HcPV, the surface projects were resolved in preservation.
 - 1c. After treatment with organic solvent the surface projects and envelope were resolved.
 2. The nucleocapsid prepared from diseased mussel appeared to be string-of-beads.
 3. The virions of HcPV and coiled nucleocapsid (arrow) appeared in cytoplasm.
 4. The laminae purified from diseased mussel.