

一种简便提纯白斑综合症病毒核衣壳的方法^{*}

李 方, 苗素英, 王莉贞, 何建国

(中山大学生命科学学院//生物防治国家重点实验室, 广东 广州510275)

摘 要: 通过人工感染, 获得具典型白斑综合症的病虾, 取病虾的鳃和胃组织冰浴匀浆, 通过3次冷冻差速离心, 获得大量较纯的病毒核衣壳, 其大小为 $(58\sim 75)\text{ nm}\times (360\sim 420)\text{ nm}$ 。

关键词: 白斑综合症病毒; 核衣壳

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2002) 02-0123-02

白斑综合症病毒(WSSV) 又称作白斑综合症杆状病毒(WSBV), 是一种对养殖对虾有很强致病性的病原体。对WSSV的病理学和形态学研究表明, 它是一种不形成包涵体的杆状病毒, 由于其形态和遗传物质与杆状病毒有很大差别, Vlcek等建议将该病毒另立一新属为Whispovirus, 而WSSV则为该属的代表种^[1]; 该病毒能对对虾外胚层和中胚层来源的组织细胞造成系统性和广泛性的破坏, 能感染斑节对虾、日本对虾、中国对虾、印度对虾、墨吉对虾、白对虾和长毛对虾等多种对虾, 致使其发生严重致死性感染, 染病对虾起始症状出现3~10 d内累积死亡率接近100%^[2~5], 其典型表征为甲壳白斑, 俗称“白斑病”。该病自1993年在中国大陆养殖对虾中暴发流行以来, 严重制约了对虾养殖业的发展, 造成了巨大的经济损失^[4]。至今未能对该病毒进行细胞培养, 研究所需的病毒粒子都只能从染病虾组织中提取, 因而提纯WSSV成了研究该病毒的首要问题。已有的提纯方法都比较复杂, 往往需要超速冷冻离心或密度梯度离心^[5,6], 费时, 对仪器和药品要求高, 且获得的病毒粒子少。本文参考了现有的方法, 并通过多次实验摸索, 提供了一种快捷简便而高效的提纯WSSV完整核衣壳的方法, 能在短时间内获得大量纯化的WSSV完整核衣壳。

1 材料和方法

1.1 实验动物 自然发病的斑节对虾(体长6~10 cm), 2000年7月收集于广东省廉江市龙营围虾场, 健康斑节对虾(5~10 cm) 为该虾场未发病虾池中的养殖个体。

1.2 人工感染实验 取典型发病对虾的鳃和胃组织, 在10倍体积的无菌PBS缓冲液中冰浴匀浆, 匀浆液经 $0.4\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后既用于注射感染。每只健康虾于第二腹节处注射0.05 mL滤液, 针头

朝向头部方向刺入。死亡个体立即收集, 贮存于一70℃冰箱。

1.3 病毒核衣壳分离纯化 取病虾的鳃和胃组织, 加入20倍体积的TEP(Tris HCl 10 mmol/L pH 8.0, EDTA 1 mmol/L pH 8.0, PMSF 1 mmol/L) 冰浴匀浆, $7\,000\times g$ 4℃离心10 min去沉淀, 上清 $30\,000\times g$ 4℃离心30 min, 取沉淀于20倍体积的TEP(含 $w=0.5\%$ TritonX-100) 中用匀浆器混匀, 于 $7\,000\times g$ 4℃离心10 min沉淀, 上清 $30\,000\times g$ 4℃离心30 min, 取沉淀于20倍体积的TEP中用匀浆器混匀, 于 $7\,000\times g$ 4℃离心10 min去沉淀, 上清于 $30\,000\times g$ 4℃离心30 min, 取沉淀, 此即为纯化的病毒核衣壳, 取少许作适当稀释, 经磷钨酸(PTA) 负染, 电镜观察, 其余可长期保存在-70℃冰箱中。

2 结 果

2.1 人工感染试验 健康对虾在注射感染10~18 h后开始死亡, 3 d内注射感染个体全部死亡。感染对虾表现为停止摄食、空胃、体色逐渐变黑或先发红继而发黑、身体衰弱侧卧于养殖箱底。濒死虾头胸甲甲壳与表皮之间充满液体呈水肿样, 甲壳易与表皮剥离, 其上可见明显白斑(直径约0.5~2.5 mm)。

2.2 电子显微镜观察 核衣壳呈杆状, 螺旋对称, 大小为 $(360\sim 420)\text{ nm}\times (58\sim 75)\text{ nm}$, 由13~18条螺旋带构成, 螺旋带与衣壳长轴垂直, 见图1。

3 讨 论

WSSV能感染中胚层和外胚层来源的对虾组织, 尤以鳃、胃和头胸甲及附肢的表皮组织对其最敏感^[3]。头胸甲及附肢表皮取样较难, 且表皮往往会带有肌肉, 至使匀浆液很粘稠, 在第一次去沉淀时会吸附大量病毒, 从而减低病毒的产量。鳃和胃取样方便, 其中病毒含量高, 且其匀浆液几乎无粘

^{*} 收稿日期: 2001-10-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30000138, 39670577)

作者简介: 李方(1965-), 女, 讲师, 通讯联系人: 何建国; E-mail: lsbr05@zsu.edu.cn

性, 是提纯 WSSV 核衣壳的最佳组织。

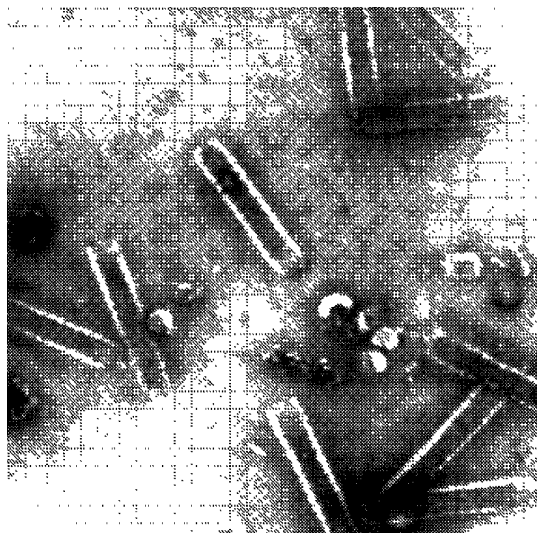


图 1 分离纯化所得的 WSSV 核衣壳的负染电镜照片 ($\times 52\,000$)

Fig 1 Electron microscope of negatively stained nucleocapsid of WSSV

参考文献:

- [1] MARIELLE Van, HULTEN C, MARCEL W, et al. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp[J]. *Virology*, 2000, 266: 227–236.
- [2] 何建国, 邓敏, 龙紫新, 等. 斑节对虾白斑综合症杆状病毒检测方法及其应用[J]. *中山大学学报 论丛*, 1996(增刊): 16–21.
- [3] 翁少萍, 何建国, 邓敏, 等. 斑节对虾白斑综合症杆状病毒致病性及组织细胞特异性研究[J]. *中山大学学报 论丛*, 1996(增刊): 6–11.
- [4] 何建国, 周化民, 邓敏, 等. 白斑综合症杆状病毒致病性特征[J]. *热带海洋*, 1999, 18: 59–67.
- [5] 徐洪涛, 王运涛, 相建海, 等. 1996 年中国对虾爆发性流行病病毒病原研究[J]. *病毒学报*, 1999, 15(2): 158–163.
- [6] HUANG C H, ZHANG L R, ZHANG J H, et al. Purification and characterization of white spot syndrome virus (WSSV) produced in an alternate host: crayfish, *Cambarus clarkii*[J]. *Virus Research*, 2001: 115–125.

A Simple and Efficient Method for Purification of the Nucleocapsid of WSSV

LI Fang, MIAO Su ying, WANG Li zheng, HE Jian guo

(State Key Laboratory for Biocontrol, Sun Yat sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: White spot syndrome virus (WSSV) is a major mortal virus in shrimp culture. Since 1993 the virus was discovered in the cultured shrimp of the main land of China, the method of cell culture of this virus hasn't been found, and sample of the virus can only be purified from the infected shrimp. A simple and efficient method of isolation of the nucleocapsid of this virus was developed. By infecting the shrimp, removed the gill and stomach from the shrimps with white spot syndrome Homogenized the gill and stomach in an ice bathed beaker, no density gradient centrifugation or ultracentrifugation were needed, through only tree times of differential centrifugation, a lot of pure nucleocapsid was about 58 ~ 75 nm in width and 360 ~ 420 nm in length as observed by transmission electron microscope.

Key words: white spot syndrome virus (WSSV); nucleocapsid