

文章编号: 0529-6579 (2000) 04-0090-04

对虾白斑症病毒的分离纯化及形态结构观察^{*}

谢数涛, 何建国, 闫庆生, 江静波

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘 要: 取患白斑症的濒死斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 的表皮、鳃和胃, 匀浆后通过蔗糖密度梯度离心和蔗糖垫层差速离心两种方案, 提纯出 WSSV; 两种方案比较, 蔗糖垫层差速离心操作简便, 不需使用超速离心机, 所得病毒纯度较高, 损失少。负染观察发现, 纯化的病毒核衣壳 2 个末端结构不同, 其中一端呈圆形, 高约 21 nm, 另一端较平, 高约 15 nm; 完整核衣壳的两个末端结构间的螺旋单位一般为 15 圈, 但也偶见个别较长的核衣壳, 其螺旋单位数达 23 圈。

关键词: 白斑症病毒; 斑节对虾 (*Penaeus monodon*); 纯化

中图分类号: S945.47 **文献标识码:** A

白斑症是近年来危害包括我国在内的整个亚洲地区对虾养殖业的主要流行病, 至今尚无有效的控制方法, 一般认为其病原是一种不形成包涵体、有囊膜的杆形病毒——白斑症病毒 (White spot syndrome virus, WSSV)^[1~3]。

由于目前甲壳类动物的细胞培养尚处于研究探索阶段, 在研究对虾病毒时还不能通过细胞培养的方法来获得病毒, 因此以发病对虾为材料, 建立一种简便而有效的纯化 WSSV 的方法, 对 WSSV 的深入研究至关重要。本文以斑节对虾为材料, 报告了 WSSV 一种简便的提纯方法, 并对纯化后 WSSV 的形态结构进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料来源

患白斑症的斑节对虾取自广东省廉江市一对虾养殖场, 体长 6.6~10.8 cm。

1.2 电镜样品的制备

参见文献 [1]。

1.3 病毒的分离提纯

解剖病虾的鳃、表皮和胃, 称量, 剪碎后在液氮下研磨, 按 1/10 (w/V) 的比例, 加入 TN 缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 0.4 mol/L NaCl), 用玻璃匀浆器在冰浴下匀浆。

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39670577)

收稿日期: 1999-09-09; 作者简介: 谢数涛 (1968~), 男, 博士, 现在华南农业大学医学系工作;

通讯联系人: 何建国。

对匀浆液分别按以下 2 种方案纯化病毒:

方案一 (蔗糖密度梯度离心): 匀浆液经 4 °C, 7 000 g 离心 20 min, 弃沉淀; 上清经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 4 °C, 20 000 g 离心 50 min. 沉淀用少量 TN 缓冲液悬浮, 将悬浮液铺于不连续蔗糖梯度 ($\rho/\%$ = 10, 20, 30, 40, 50) 上, 4 °C, 60 000 g 离心 1 h. 取出梯度中的病毒带, 加 TN 缓冲液稀释后, 于 4 °C, 20 000 g 离心 50 min, 沉淀即为纯化的病毒粒子.

方案二 (蔗糖垫层差速离心): 匀浆液经 4 °C, 7 000 g 离心 20 min, 弃沉淀; 上清经微孔滤膜过滤后, 铺于 ρ = 30% 的蔗糖溶液 (其体积约为样品体积的一半) 上, 4 °C, 50 000 g 离心 50 min. 沉淀加 TN 缓冲液清洗、悬浮, 再 4 °C, 20 000 g 离心 50 min, 沉淀即为纯化的病毒粒子.

纯化的病毒粒子, 用 ρ = 2% 磷钨酸 (pH 7.0) 负染后电镜下观察.

2 结 果

2.1 病虾组织电镜观察

在病虾表皮、胃和鳃等组织的超薄切片中, 电镜下可发现一种在核内大量分布的病毒粒子 (图版 1). 该病毒粒子外被双层囊膜, 纵切面多呈椭圆形, 横切面为圆形; 囊膜内可见杆状的核衣壳及其内致密的髓心. 病毒粒子大小为 (391 ~ 420) nm × (101 ~ 119) nm, 核衣壳大小为 (356 ~ 398) nm × (76 ~ 85) nm.

2.2 WSSV 的纯化

在方案一中, 经蔗糖密度梯度离心后, 在 ρ = 40% ~ 50% 蔗糖梯度交界处, 有一条乳白色 (或浅褐色) 折光带. 取出折光带, 稀释, 离心, 将所得沉淀悬浮后负染, 电镜下可见大量高纯度的病毒粒子 (图版 2). 在蔗糖梯度的其余部分, 亦能观察到少量的病毒粒子.

按方案二纯化的病毒见图版 3. 经蔗糖垫层离心后, 所得病毒沉淀易于悬浮, 病毒悬浮液所带色素明显变淡. 在上清及蔗糖垫层中均未观察到病毒粒子.

2.3 WSSV 的形态结构

纯化的 WSSV 负染后电镜下观察, 完整的病毒粒子呈不完全对称的椭圆形, 大小约 350 nm × 100 nm, 有一长长的“尾”结构 (图版 4). 病毒粒子的一端较平, 另一端略细; 略细的一端有一乳头状结构, 大小约 35 nm × 26 nm. 乳头状结构延伸出“尾”结构, “尾”长约 510 nm, 宽 16 nm. 负染后病毒粒子的内部结构不可见.

病毒核衣壳呈杆状, 大小约 380 nm × 75 nm. 核衣壳 2 个末端的结构不同, 其中一端略呈圆形, 高约 21 nm, 另一末端较平, 高约 15 nm (图版 5). 在纯化过程中核衣壳的两端较易被破坏, 因此不易观察到完整核衣壳的这 2 个末端结构.

WSSV 的完整核衣壳的两个末端之间一般有 15 圈衣壳螺旋 (图版 5 和图版 6). 衣壳螺旋与核衣壳的长轴接近垂直, 每圈螺旋宽约 21 nm, 螺旋间距约 2 nm, 因此螺距约 23 nm. 偶见个别较长的核衣壳, 螺旋数达 23 圈, 其螺旋宽度、螺旋间距及螺距, 与正常大小的核衣壳没有显著差别 (图版 7).

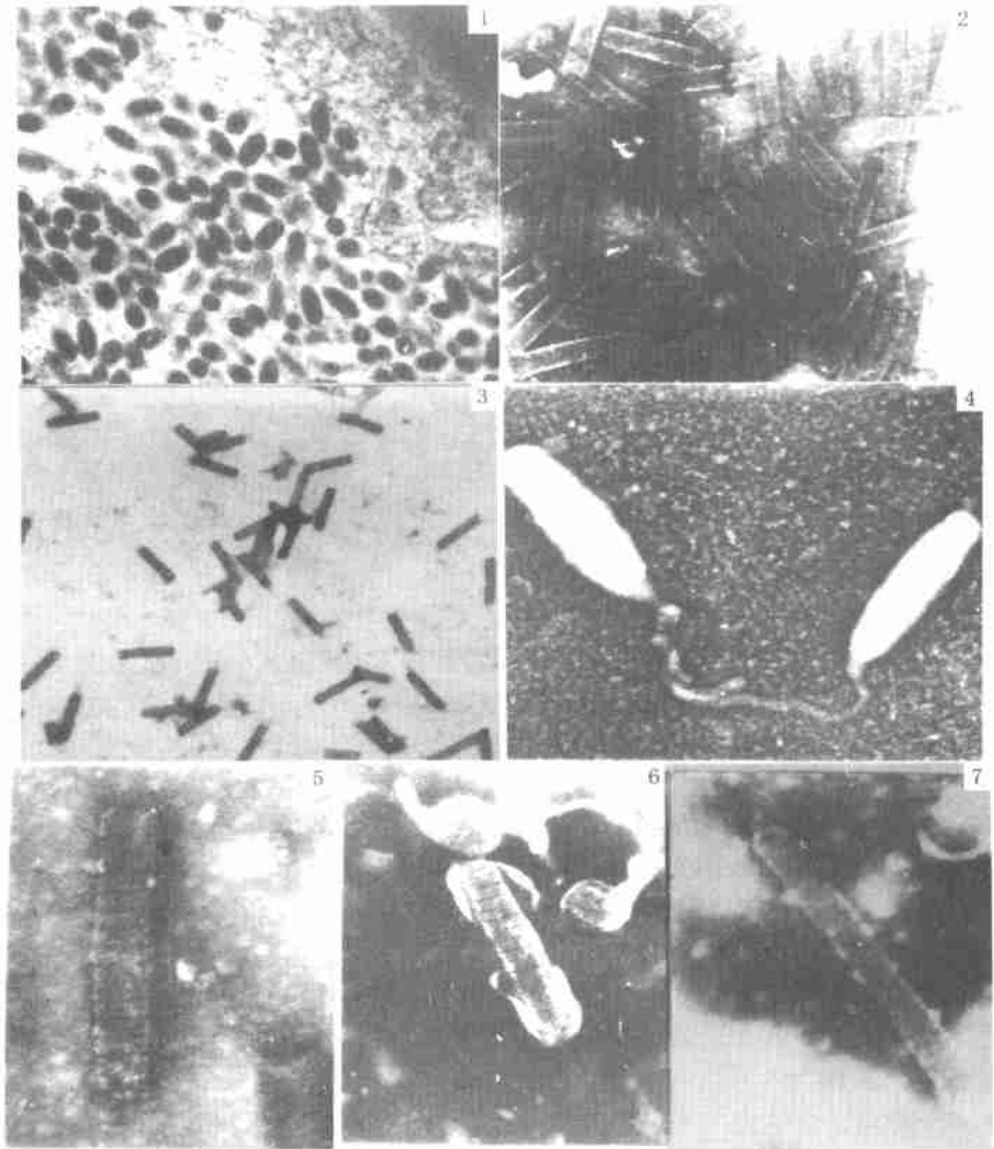


图 1 白斑症病毒的电镜照片

Fig 1 Virions of white spot syndrome virus (WSSV) under electron microscope

- 1 鳃上皮细胞白斑症病毒, $\times 13\ 200$;
- 2 负染的蔗糖密度梯度离心纯化的 WSSV 核衣壳, $\times 41\ 200$;
- 3 负染的蔗糖垫层差速离心纯化的 WSSV 核衣壳, $\times 15\ 800$;
- 4 负染的蔗糖垫层差速离心纯化的完整 WSSV 核衣壳, $\times 78\ 700$;
- 5 负染的蔗糖垫层差速离心纯化的 WSSV 核衣壳, $\times 100\ 000$;
- 6 囊膜破裂但尚未脱去的完整核衣壳, $\times 71\ 000$;
- 7 衣壳螺旋数为 23 的长核衣壳, $\times 73\ 500$

3 讨 论

密度梯度离心可纯化得到较高纯度的 WSSV^[1~3], 但操作繁琐, 费时. 而且这类方法必须使用超速离心机, 对国内许多研究单位来说, 难以具备此条件. 本文结果表明, 蔗糖垫层差速离心纯化 WSSV, 具有操作简便, 病毒纯化效果好, 病毒损失少等优点. 此外与超速离心相比, 高速离心一次即可处理大量样品, 因此易得到大量的纯化病毒.

本文发现, WSSV 完整核衣壳的两个末端的结构不同, 其一个末端结构较平, 另一末端结构略呈圆形. 作者认为 WSSV 核衣壳两个末端结构的不同与完整 WSSV 本身的不对称相一致. 在完整 WSSV 的内部, 核衣壳的哪一端帽状物下接乳头状结构和“尾”, 目前尚不能确定.

另外, 观察囊膜已破裂但未脱去的 WSSV 核衣壳, 可发现核衣壳两个末端之间的螺旋单位数为 15 圈, 而非黄捷等^[1]所报道的 13 圈及石拓等^[3]报道的 14 圈. 如果他们观察到的亦为完整的病毒核衣壳 (WSSV 的末端结构纯化时易被破坏), 那么这种结构生物学上的不同可能表明不同地区间病毒株系的差异.

参考文献:

- [1] 黄捷, 于佳, 宋晓玲, 等. 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒的精细结构、核酸、多肽及血清学研究 [J]. 海洋水产研究, 1995, 16 (1): 11~23.
- [2] WANG C H, LO C F, LEU J H, et al. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1995, 23: 239~242.
- [3] 石拓, 孔杰, 包振民, 等. 从中国对虾分离纯化的一种杆状病毒及其超微结构的研究 [J]. 海洋学报, 1998, 20 (2): 60~64.
- [4] 陈细法, 陈平, 吴定虎, 等. 养殖对虾一种新杆状病毒的研究 [J]. 中国科学 (C 辑), 1997, 3: 415~420.
- [5] WONGTEERASUPAYA C, VICKERS J E, SRIURAIRATANA S, et al. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1995, 21: 69~77.

Purification and Morphology of Shrimp White Spot Syndrome Virus (WSSV)

XIE Shu-tao^{*}, HE Jian-guo, YAN Qin-sheng, JIANG Jing-bo

Abstract: A simple and efficient method for purification of WSSV was developed. No density gradient centrifugation or ultracentrifugation was involved. The viral nucleocapsid was a spiral cylinder with 15 cycles. The two ends of nucleocapsid were different. One end was relatively flat ladder-shaped and about 15 nm high. The other end was round and about 21 nm high. A nucleocapsid with 23 cycles was observed occasionally.

Keywords: white spot syndrome virus; *Penaeus monodon*; purification

^{*} School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China