

研究简报

草鱼出血病鱼主要器官组织的超薄切片观察及感染力的比较

OBSERVATION ON ULTRATHIN SECTIONS OF MAJOR ORGAN'S TISSUE AND THEIR INFECTION IN HEMORRHAGE OF GRASS CARP

丁清泉 余兰芬 王学兰 柯丽华

(中国科学院武汉病毒研究所)

Ding Qingquan, Yu Lanfen, Wang Xuelan and Ke Lihua

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica)

叶荫云

(江西生物药品制造厂南昌)

Ye Yinyun

(Biological Medicine Manufactory of Jiangxi Province, Nanchang)

关键词 鱼呼肠孤病毒, 超薄切片, 草鱼出血病

KEYWORDS fish reovirus, ultrathin section, hemorrhage disease

草鱼出血病是一种严重的病毒性疾病, 它会引起草鱼大批死亡^[1,2]。已有报告指出, 在病鱼肾组织的超薄切片中观察到病毒粒子的存在, 并认为肾脏是草鱼出血病病毒侵袭最严重的器官^[3]。在制备草鱼出血病组织疫苗时仅取病鱼的肝、脾、肾和肌肉组织, 肠道组织往往弃之不用^[4]。为了进一步确定病毒在鱼体内各器官组织的分布, 揭示病毒的发生、感染及病理机制, 为制备高效价的组织疫苗提供理论依据, 我们选用了几种主要器官组织进行超薄切片观察和感染试验。现将结果报告如下:

材 料 和 方 法

草鱼出血病鱼各器官组织由江西省生物药品制造厂提供。健康草鱼鱼种由湖北省水产局野芷湖良种场提供, 规格3寸左右。

超薄切片观察: 在人工感染发病高峰期分别取出典型症状的病鱼内脏各器官和肌肉组织, 经戊二醛

(1) 中国科学院水生生物研究所, 1982。淡水渔业增产技术与渔业规划, 313—325。中国科学院水生生物研究所编。

收稿年月: 1989年3月; 同年9月修改。

固定、包埋、超薄切片、2%醋酸双氧铀染色,在 JM100-C 电子显微镜下观察。

感染试验:按已报道的方法进行^[1]。将人工感染发病死亡的草鱼各器官分别收集,用 0.01 M 磷酸缓冲液(PBS, pH7.2)洗去血污,称重,按 1:5 浓度加入 0.01M PBS 捣碎并匀浆,加双抗处理后感染健康草鱼种。同时用健康草鱼和人工感染病死鱼的内脏混合液(含心、肝、脾、肾和肠)分别感染作为对照。

结 果 和 讨 论

超薄切片观察:在 JM-100C 电镜下观察了不同器官组织的超薄切片。健康草鱼各器官及肌肉组织中没有发现病毒颗粒。在人工感染病鱼的肝、脾、心脏和肌肉等组织切片中也未发现病毒颗粒。在肾组织细胞内观察到大小为 50nm 左右(电镜底片测量结果)的病毒,有的病毒呈晶格状排列(图 1 箭头所指处),有的病毒粒子聚集团外还有一层包膜(图 2 箭头所指处),有的散在细胞质内。在肠组织细胞内观察到大小为 70-78nm(电镜底片测量结果)的病毒粒子,颗粒中央电子密度较高且均匀的髓核直径为 50nm(图 3)。其形态大小与经过差异离心提纯的病毒粒子相同(图 4)。由此推测在肾组织细胞中看到的病毒为尚未包被外膜的未成熟病毒粒子,而在肠道组织中观察到的则为成熟病毒粒子。

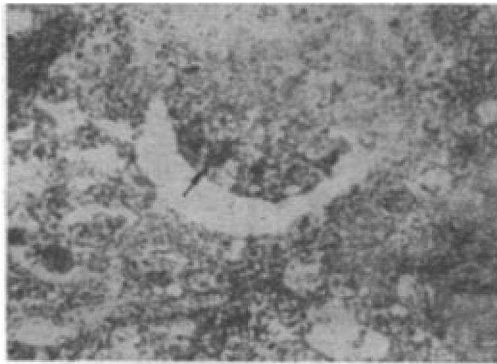


图 1 病鱼肾组织细胞内病毒粒子 × 15300
Fig. 1 Virion in cell of renal tissue of grass carp with hemorrhage.

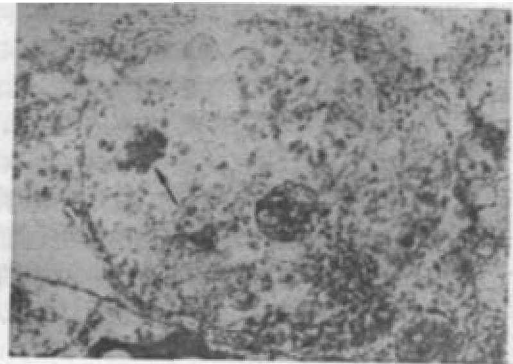


图 2 病鱼肾组织细胞内病毒粒子 × 18420
Fig. 2 Virion in cell of renal tissue of grass carp with hemorrhage.



图 3 病鱼肠道组织细胞内病毒粒子 × 53600
Fig. 3 Virion in cell of enteric tissue of grass carp with hemorrhage.

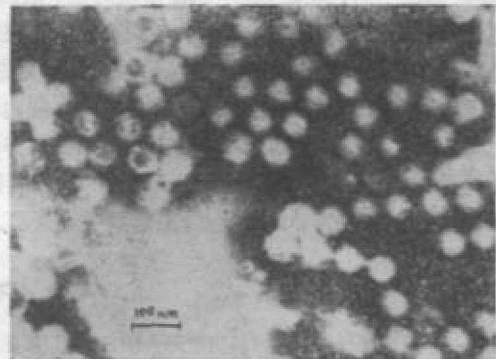


图 4 经差异离心提纯的病毒粒子(负染色)
Fig. 4 Purified virion by different centrifugation.

不同器官组织的感染试验:用人工感染发病鱼各器官组织匀浆液感染健康草鱼的结果见附表。从表中可以看出:健康草鱼内脏混合液无感染性,人工感染病死鱼内脏混合液感染死亡率为85%,相同浓度的不同器官组织导致的死亡率不同,死亡率大小的顺序是:肠、肾、肝、脾、心脏、鳃、肌肉。病死鱼内脏混合液感染死亡率大于各个内脏器官单独感染的平均死亡率(71%)。

附表 病鱼主要器官组织液人工感染结果
Attached table Infected result of major organs's tissues of grass carp
with hemorrhage

器 官	心	肝	鳃	肌肉	脾	肾	肠	病鱼 内脏	正常鱼 内脏
感染尾数	18	20	23	27	17	27	25	27	13
病死尾数	10	13	8	3	10	21	24	23	0
病死率(%)	56	65	35	11	59	78	96	85	0

早期在制备组织疫苗时考虑到肠道内含物较复杂,可能含有多种致病菌而舍弃。我们的试验表明,经双抗处理后,健康草鱼内脏组织匀浆液(包括肠组织)并无感染性,而病死鱼肠道组织感染力高于其它组织,因此制备组织疫苗时可以将病鱼肠道组织作为疫苗的材料。我们曾按常规方法从病死鱼肌肉组织中分离病毒,未获成功,但感染实验表明肌肉组织仍具有一定的感染性,其相对含病毒量较低。作为普通组织疫苗,考虑到肌肉组织在鱼体中占有很大的比例,可以将肌肉作为材料,但要制备高效价的组织疫苗或从病鱼中分离提纯病毒,则应放弃肌肉组织。

以前的研究已证实鱼呼肠孤病毒是草鱼出血病的病原^[1,2]。其它感染动物和人的呼肠孤病毒一般在宿主的呼吸道和肠道中都存在^[1]。我们首次在病鱼肠道中观察到病毒颗粒,并经感染试验证实其感染力高于其它组织。超薄切片观察与感染结果相吻合。这表明,不仅肾脏是鱼呼肠孤病毒侵袭的靶器官,肠道同样是侵袭的重要器官,这符合呼肠孤病毒对宿主组织的嗜性。但在鱼呼吸器官的鳃组织切片中未观察到病毒粒子,鳃组织匀浆液的感染力较低,由此可以认为肠道和肾脏是鱼呼肠孤病毒的主要增殖场所。

早期在病死鱼肾组织细胞核内观察到未成熟病毒颗粒,在细胞质内观察到成熟病毒粒子^[3]。但在以后的人工感染鱼肾单层细胞的超薄切片中,仅在细胞质内观察到病毒颗粒,而在细胞核内没有发现^[4]。Joklik认为:呼肠孤病毒增殖的最主要特征是在细胞质中进行复制、生物合成及装配等全过程,与DNA病毒不同,这类RNA病毒增殖的任一阶段都不在细胞核内进行^[5]。在我们的超薄切片中,在肠道和肾脏组织的细胞核中没有发现病毒。如果在细胞核中观察到病毒,那么就有理由怀疑该病毒是否是呼肠孤病毒;如果该病毒是呼肠孤病毒,推测在细胞核内看到的病毒可能是细胞核膜破裂或溶解后从细胞质进入核内。草鱼出血病病毒在宿主细胞内的活动还有待于进一步研究。

本次实验观察到的病毒颗粒大小与中国科学院水生生物研究所报道的结果相近^[6],而比我所原分离到的病毒颗粒(直径 $55.5 \pm 3nm$)要大^[5]。我们认为,不同地区分离到的草鱼出血病病毒在形态大小及基因结构上存在差异,这一点,还需进一步证实。

参 考 文 献

- [1] 中国医学科学院流行病防治研究所,1978. 常见病毒病实验技术,338—341. 科学出版社,北京。
- [2] 中国科学院水生生物研究所,1978. 草鱼出血病病原的研究,水生生物学集刊,6(3):321—330。
- [3] 中国科学院水生生物研究所,1980. 草鱼出血病病原的研究II,电镜观察. 水生生物学集刊,7(1):75—84。
- [4] 中国科学院武汉病毒研究所、中国水产科学院长江水产研究所沙市分所草鱼出血病协作组,1983. 草鱼出血病病毒的电子显微镜观察初报. 淡水渔业,(3):39—40。

- [5] ——, 1984a. 草鱼出血病病毒精细结构的研究. 淡水渔业, (2):21—22。
- [6] ——, 1984b. 草鱼出血病病原—鱼呼肠孤病毒核酸特性的研究. 淡水渔业, (4):7—9。
- [7] 陈燕乐、江育林, 1983. 草鱼出血病病毒形态结构及其理化特性的研究. 科学通报, 28:1138—1139。
- [8] Joklik, W. K., 1974. Reproduction of Reoviridae. in *Comprehensive Virology 2*, 278—334. Plenum Press, New York & London.

上接第 65 页 (continued from page 65)

学技术对巩固、发展远洋渔业至关重要。如在远洋渔业起步初期,有关科研和教育部门协同工作,搜集并提供大量技术资料,为了解和掌握所要开发的资源、渔场、所在国的渔业法规以及最后的定项决策等都起到重要作用。但迄今远洋渔业调研工作未能列入国家科技规划,无专项科研经费。由于科研工作的落后,在远洋渔业实际生产过程中,暴露出一些诸如难于全面掌握中心作业渔场和鱼群数量分布状况,对海流、地形、地貌了解不够,作业方法不适应,网具破损严重,捕捞效率不高等一系列科学技术方面的问题,这些都直接影响了远洋渔业的经济效益。我国在白令海公海水域的狭鳕捕鱼业,目前已面临美、苏两国在这一公海海域对外国渔船不断进行限制的严峻现实,前景令人忧虑。为了我国远洋渔业的生存和稳固发展,立足于激烈的国际渔业斗争中,更需要拥有自己调查研究所取得的科学技术资料,以维护我国远洋渔业的合法权益。为此全体委员建议:(1)远洋渔业的科学研究必须纳入国家“八五”、“九五”科学技术发展规划。在国家和地方经委定项的远洋渔业,一定要相应的在国家和地方科委同时定项,相应拨款,让科研部门组织力量与生产部门协同工作;(2)组织和调动黄、东、南海区三个水产科研院所和有关省(市)水产研究所、大专院校科技人员的积极性,密切结合生产,明确分工海区和鱼种。根据需要,派船进行重点渔场试捕调查,积极收集研究世界渔业资源和渔场利用潜力,捕捞和加工技术等资料,掌握有关渔业法规和国际合作与贸易动向等。也可采用组织科研人员随生产船出海的方式,协助生产单位及时解决存在的技术难题。大力支持继续办好《远洋渔业》等期刊,及时交流经验,提供宏观决策参考;(3)根据远洋渔业的特点,从实际需要出发,采取教育、科研、生产相结合,长远和短期相结合,多层次、多渠道的方式对远洋渔业的管理人员和职务船员等进行培训,以迅速提高我国远洋渔业队伍的素质;(4)远洋渔业是一项外向型开拓性开发事业,具有投资大、担风险、涉及面广等特点。为增强后劲,急需国家加强对远洋渔业的领导和宏观管理,制定优惠政策,依靠、协调和组织科研工作,才能得以巩固和稳步发展。

(黄海水产研究所 林福申)