

文章编号: 1000-0615(2002)02-0180-05

· 研究简报 ·

栉孔扇贝一种球形病毒的分离纯化 及其超微结构观察

王崇明¹, 王秀华¹, 宋晓玲¹, 黄 杰¹, 宋微波²

- (1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海洋渔业资源
可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071;
2. 青岛海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003)

关键词: 栉孔扇贝; 非包涵体球形病毒; 分离纯化; 电镜观察

中图分类号: S944.4 文献标识码: A

Purification and ultrastructure of a spherical virus in cultured scallop *Chlamys farreri*

WANG Chong-ming¹, WANG Xi-hua¹, SONG Xiao-ling¹, HUANG Jie¹, SONG Wei-bo²

- (1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource by the Ministry of Agriculture
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071, China;
2. Fisheries College of Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract: Electron microscopic examinations of ultrathin sections reveal the presence of spherical virus-like particles in the digestive gland, kidney, and the intestine of moribund scallop *Chlamys farreri* collected during a severe mortality in Jiaozhou Bay (Qingdao, China) in 2000. The virions are approximately 130 to 170 nm in diameter and have a bilaminal envelope, while the nucleocapsids are 90–140 nm. The virus occurs and distributes in the cytoplasmic vesicles of infected cells, and it is arranged in a scattered form without occluding protein. The viral particles are consistent in size and morphology in preparations derived from the isolation and also from ultrathin sections. The spikes of envelope are clearly observed with negative staining. By the same methods, this virus was not found in the healthy scallop, indicating that this virus might be the causative aetiology for the abnormal mortality.

Key words: *Chlamys farreri*; non-occluded spherical viruses; isolation and purification; electronic observation

栉孔扇贝是我国北方沿海贝类养殖的重要经济种类, 目前已成为我国北方海洋经济的支柱性产业之一。但随着近年来病害的不断加剧, 养殖期栉孔扇贝的大规模死亡现象频繁发生, 极大地威胁着这一产业的可持续发展。因此, 国内围绕扇贝大规模死亡的致病因子及病原学的探讨已引起养殖界各方的高度关注^[1-4]。2000年我们对山东省内主要扇贝养殖海区开展了系统的病原学和流行病学调查。通过病贝组织超薄切片的电镜观察, 在病害高发期的病贝体内大量发

收稿日期: 2001-09-07

资助项目: 国家重点基础研究规划项目课题资助 (G1999012001)

作者简介: 王崇明(1962-)男, 山东青岛人, 副研究员, 主要从事海水养殖动物病害研究。E-mail: aqadis@public.qd.sd.cn

现一种球形病毒样颗粒。在此基础上,我们进一步完成了该病毒粒子的分离和纯化,现将有关结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源

具典型发病症状的栉孔扇贝(壳高 4.5~ 5.0cm)和健康的栉孔扇贝(壳高 7.5~ 8.0cm),分别于 2000 年 7 月和 12 月采自青岛黄岛海珍品养殖场。

1.2 病毒的分离与纯化

材料的处理:取扇贝消化腺加八倍体积的 TEN 缓冲液(0.05M Tris-HCl, 0.01M EDTA, 0.4M NaCl, pH 7.8),以 FHX-1 型高速分散器 $4\ 000\ \text{r}\ \text{min}^{-1}$ 冰浴研磨匀浆。

初步提纯(差速离心):将上述组织匀浆液于 $4\ ^\circ\text{C}$ $3\ 500\ \text{g}$ 离心 15min,取上清液,以 TEN 重悬沉淀物,反复离心 2~ 3 次。弃沉淀,合并上清液,加入蔗糖配制终浓度为 25% (w/w) 的蔗糖垫,于 $4\ ^\circ\text{C}$ $45\ 000\ \text{g}$ 离心 1.5h。弃上清,以 25% (w/w) 蔗糖/TEN 重悬沉淀物。

进一步提纯(蔗糖密度梯度离心):以 TEN 配制蔗糖梯度(30%、35%、40%、45%、50%、55%, w/w),加铺上述重悬液于离心管管顶。于 $4\ ^\circ\text{C}$ $125\ 000\ \text{g}$ 离心 4h,收取蔗糖梯度中乳白色或浅褐色沉淀带,以 TE(0.05M Tris-HCl, 0.01M EDTA, pH 7.8)稀释。于 $4\ ^\circ\text{C}$ $45\ 000\ \text{g}$ 离心 1.5h 去除蔗糖,以 TE 重悬沉淀物, $-70\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.3 病毒沉淀带浮力密度测定

取蔗糖密度梯度离心后的沉淀带 100 μL ,以阿贝折射仪测定病毒沉淀带蔗糖溶液的折射率,根据蔗糖折射率与浮力密度的关系,计算出病毒沉淀带的密度^[5]。

1.4 病毒提纯液的负染观察

分别取差速离心和蔗糖密度梯度离心后的病毒重悬液,滴加在载玻片上,将覆有 Formvar 碳膜的铜网反扣在病毒悬液上,5min 后,取下铜网,晾干。滴加 2% 的磷钨酸负染 5min,用滤纸吸去多余的染液,室温风干,于 JEM-1200EX 电镜下观察并摄影。

1.5 超薄切片的制作

取濒死栉孔扇贝的消化腺、肾和肠,切成 $1\ \text{mm}^3$ 小块,用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定,系列乙醇脱水,Epom812 渗透包埋,Ultracut-E 型超薄切片机切片,经醋酸铀和柠檬酸铅双染色后,于 JEM-1200EX 电镜下观察并摄影。

2 结果

2.1 患病扇贝的临床症状

患病扇贝外观症状主要表现为贝壳开闭缓慢无力,对外界刺激反应迟钝。去掉贝壳发现外套腔内分泌物增多,积有少量淤泥,消化腺轻微肿胀,肾脏易剥离,外套膜向壳顶部收缩,外套眼失去光泽。患病严重的扇贝鳃丝轻度糜烂,肠道空或半空。青岛地区发病高峰在 7 月底至 8 月初,扇贝出现上述症状 2~ 3d 后很快死亡,死亡率在 90% 以上。

2.2 病贝组织超薄切片电镜观察

病贝组织超薄切片电镜观察显示,在消化腺消化小管管间结缔组织、肠粘膜下层结缔组织以及肾小管管间结缔组织分布有大量的病毒粒子(图版-A, B, C)。该病毒粒子近似圆形,具有囊膜,囊膜内可见均匀的高电子密度的核衣壳(图版-A)。完整的病毒粒子直径为 130~ 170nm,核衣壳直径为 90~ 140nm,囊膜厚约 7~ 10nm,囊膜与核衣壳之间的间距为 13~ 16nm。病毒粒子以团聚的方式存在于结缔组织的细胞质内,核内未见分布。

在病变细胞胞质内,常常出现多个病毒粒子被一层质膜所包被起来的现象,质膜内未见以特定晶格方式排列的蛋白质,仅见病毒粒子、无囊膜的核衣壳以及空囊膜样结构(图版-D)。在超薄切片中未发现包涵体存在。

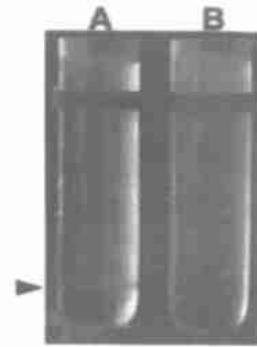


图 1 患病扇贝与健康扇贝匀浆液密度梯度离心结果的比较

Fig. 1 Comparison of gradient centrifugation between moribund scallops and healthy scallops

A Moribund scallop, B Healthy scallop;

◀ 示病毒沉淀带; ◀ Viral precipitate band

病毒侵染扇贝组织的病理变化主要发生在细胞质内,出现细胞损伤时所形成的异常致密的板层状结构,亦即髓鞘样小体;线粒体肿大,嵴崩解、消失,基质透明或呈絮状(图版-B)。

2.3 病毒的纯化与负染电镜观察

扇贝组织匀浆液经差速离心后,病毒粒子提纯效果较差,沉淀物中同时混有大量无固定形态和结构的杂质,可能与病毒粒子质量相近的细胞亚单位及碎片,但病毒粒子完整(图版-F)。病毒粒子的形态近似圆形,直径120~150nm,具囊膜,囊膜表面覆有长20~25nm的纤突,囊膜纤突致密地镶嵌成规则的毛边样(图版-G)。

经蔗糖密度梯度离心后,病毒沉淀中杂质比较少,可以得到相对纯净的病毒粒子。提取的球形病毒在蔗糖梯度50%~55%范围内形成一条清晰的沉淀带(图1),此时以阿贝折射仪测得沉淀带的折射率为1.4272,相应的蔗糖浓度为53.3%(w/w),经计算病毒粒子在蔗糖介质中的浮力密度为 $1.2579 \text{ g} \cdot (\text{cm}^3)^{-1}$ 。密度梯度离心后的病毒粒子与差速离心后的病毒粒子形状、大小一致,明显的差别是病毒囊膜表面的纤突有部分缺失或完全缺失(图版-E),这可能是由于病毒纤突与病毒囊膜连接不紧密以至于在提纯过程中造成的结构损伤有关。

健康扇贝组织匀浆液经差速离心和蔗糖密度梯度离心后,在蔗糖介质中病毒粒子出现的相应范围内未见到沉淀带(图1)。

3 讨论

扇贝组织超薄切片电镜观察表明,在病变细胞胞质区域,病毒粒子以聚团的方式聚集形成“簇”,病毒簇由质膜包被形成有别于胞质细胞器的囊泡样结构,其内分布有大量装配好的病毒粒子、核衣壳以及囊膜材料。由此断定,病毒的发生基质应是在细胞质中。在大多数无脊椎动物病毒中,特别是某些昆虫病毒所形成的包涵体,在电镜下是一些具备蛋白质结晶性质的有形实体,其中包被着装配完整的病毒粒子^[6]。而我们观察到的是包被着大量球形病毒粒子的囊泡样结构,其内并无以特定晶格方式排列的蛋白质基质。因此,这种球形病毒极可能是一种无包涵体的病毒。囊泡样结构形成的区域是病毒合成与装配最为活跃的场所,可能是病毒粒子形成的发生基质。

病毒提纯液的负染电镜观察显示,在病毒囊膜表面覆有囊膜蛋白突起,亦即纤突。我们推测,这种结构在病毒侵染宿主细胞的过程中起着重要作用,它很可能参与病毒粒子对宿主细胞受体的识别、吸附与侵入。

细胞培养通常是获取大量纯净病毒的理想方法,但由于目前尚未建立贝类组织培养细胞系,人们只能直接从感染组织内分离纯化病毒。差速离心与密度梯度离心是常用的病毒纯化方法,差速离心法先以低速离心去除较大的细胞碎片以及其它较大杂质,再以高速离心沉淀病毒。高速离心时,我们在病毒悬液中加入适量蔗糖制成“蔗糖垫”,用以去除部分质量较轻的细胞碎片及细胞亚单位。但仅用差速离心法来纯化病毒,纯化的效果较差,大量质量与病毒粒子相近的细胞碎片和细胞亚单位与病毒粒子同时沉淀。通过密度梯度离心可以使病毒粒子与其它杂质分离开,质量较轻的杂质停留在上层介质内,质量较重的杂质继续沉降在相应密度的介质层内,从而使病毒得以进一步纯化。因此,采用差速离心法与密度梯度离心法相结合的提纯技术,可获得比较纯净的病毒样品。另外,本文所测得的病毒浮力密度可以为差速离心、密度梯度离心转速与离心时间设定以及蔗糖密度梯度设定范围提供参考与借鉴。

扇贝组织超薄切片和负染电镜观察表明,栉孔扇贝球形病毒是一种囊膜表面具纤突、形态较大的病毒粒子。在提纯过程中,纤突极易脱落或缺失。在病料样品不新鲜或保存不当,很难得到完整的病毒粒子。因此,在病毒提纯时应使用新鲜病料,并避免反复冻融。此外,过高的离心力,缓冲液渗透压的剧烈变化都会影响病毒的完整性,要综合考虑离心的时间和离心力的大小,采用适宜渗透压的缓冲溶液,并尽可能在低温下研磨与离心。

贝类病毒病的研究始于70年代^[7],迄今已见报道的贝类病毒主要有虹彩病毒、疱疹病毒和乳多空病毒,感染的贝类宿主主要是牡蛎,包括长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、欧洲扁牡蛎(*Ostrea edulis*)、扁牡蛎(*Tiostrea chilensis*)、大珠母贝(*Pinctada maxima*)^[8-12]。王斌等^[13]在皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)血细胞胞质内发现一种具有囊膜但无囊膜纤突的球形病毒,病毒粒子直径为90~140nm。我们发现的病毒是在扇贝结缔组织细胞质中装配形成的有囊膜且明显有囊膜纤突的球形病毒粒子,病毒粒子直径为130~170nm。与上述病毒相比较,仅凭形态学的观察、病毒感染的靶组织还难以确定其分类地位,有关基本特性如病毒核酸特性、病毒蛋白结构多肽等尚需进一步研究。

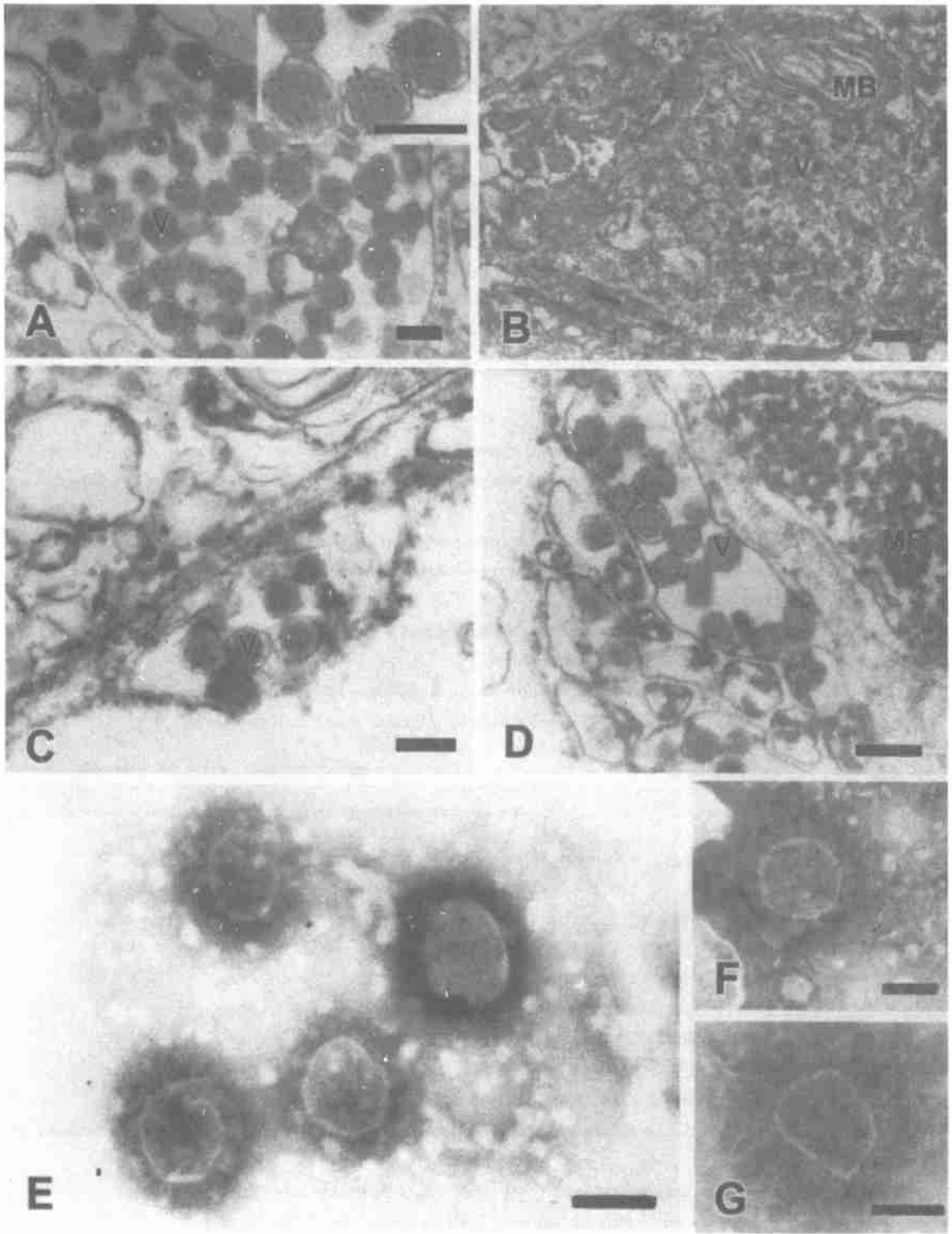
我们采用相同的提纯方法处理健康扇贝组织而未获得病毒粒子,这一结果提示从病贝组织中分离出的球形病毒可能是造成扇贝大规模死亡的致病病原。当然,要证实其是否为致病病原,还需进行病毒的回接感染实验。目前,此项实验尚在进行中。

参考文献:

- [1] Yu R H, Wang R C, Tian C Y, et al. Discussion on the high mortality and its prevention in scallop, *Chlamys farreri*[J]. Trans Ocea Limno, 1998, (3): 69- 72. [于瑞海, 王如才, 田传远, 等. 栉孔扇贝大面积死亡的原因分析及预防探讨[J]. 海洋湖沼通报, 1998, (3): 69- 72.]
- [2] Wang W X, Luo W T, Xue Q G, et al. Pathological research on Chlamydia-like organisms in the hepatopancreatic gland of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck)[J]. Marine Sciences, 1998, (3): 23- 25. [王文兴, 罗挽涛, 薛清刚, 等. 海湾扇贝消化盲囊衣原体样生物的病理学研究[J]. 海洋科学, 1998, (3): 23- 25.]
- [3] Yang X Y, Li T B, Wang Y L, et al. Preliminary study on the cause of scallop death[J]. Shandong Fisheries, 1998, 15(6): 17- 19. [杨晓岩, 李天宝, 王远隆, 等. 山东沿海栉孔扇贝大量死亡原因初探. 齐鲁渔业, 1998, 15(6): 17- 19.]
- [4] Wang Y T, Xiang JH. Studies on causation of the mass mortality of *Chlamys farreri*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1999, 30(6): 770 - 774. [王运涛, 相建海. 栉孔扇贝大规模死亡的原因探讨[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(6): 770- 774.]
- [5] Yin Z, Liu J H. Animal virology[M]. Beijing: Science Press, 1997, 309- 318. [殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1997, 309- 318.]
- [6] Yang F H. Virology[M]. Changsha: Hunan Science and Technology Press, 1991, 361- 362. [杨复华. 病毒学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1991, 361- 362.]
- [7] Farly C A. Oyster herpes-type virus[J]. Science, 1972, 178: 759- 760.
- [8] Elston R A, Wilkinson M T. Pathology, management and diagnosis of oyster velar virus disease (OVVD)[J]. Aquac, 1985, 48: 189- 210.
- [9] Hine P M, Wesney B, Hay B E. Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*[J]. Dis Aquat Org, 1992, 12: 135- 142.
- [10] Comps M, Cochenneec N A. Herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis* L.[J]. J Invertebr Pathol, 1993, 62: 201- 203.
- [11] Hine P M, Wesney B, Besant P. Replication of a herpes-like virus in the larvae of the flat oyster, *Tiostrea chilensis*, at ambient temperatures [J]. Dis Aquat Org, 1998, 32: 161- 171.
- [12] Norton J H, Shepherd M A, Prior H C. Papovavirus-like infection of the golden-lipped pearl oyster, *Pinctada maxima*, from the Torres Strait, Australia[J]. J Invertebr Pathol, 1993, 62: 198- 200.
- [13] Wang B, Li X, Gou C Z. Infection of spherical viruses from *Haliotis discus hannasi* Ino[J]. Virology Sinica, 1997, 12(4): 360- 363. [王斌, 李霞, 高船舟. 皱纹盘鲍一种球形病毒的感染及发生[J]. 中国病毒学, 1997, 12(4): 360- 363.]

图版说明 Explanation of Plate

- A. 消化腺结缔组织细胞质中病毒粒子的电镜照片, 右上角为病毒粒子局部放大图片。V: 病毒粒子, 标尺: 200nm
- B. 肠结缔组织细胞质中病毒粒子的电镜照片。V: 病毒粒子, MB: 髓鞘样小体, 标尺: 500nm
- C. 肾结缔组织血管内壁病毒粒子的电镜照片。V: 病毒粒子, 标尺: 200nm
- D. 消化腺结缔组织病毒粒子的电镜照片, 示病毒囊泡样结构。V: 病毒粒子, MF: 肌纤维。标尺: 200nm
- E. 梯度离心后病毒负染电镜照片, 示病毒囊膜纤突缺失或部分缺失。标尺: 100nm
- F. 差速离心后病毒负染电镜照片, 示完整病毒粒子及细胞碎片。标尺: 100nm
- G. 差速离心后病毒负染电镜照片, 示完整病毒粒子及囊膜表面纤突。标尺: 100nm
- A. Virions in the cytoplasm of connective tissue in digestive gland on TEM (Transmission Electron Micrograph), the part magnified virions is on the top right corner. V: virions, Bar: 200nm
- B. Virions in the cytoplasm of connective tissue in intestines on TEM. V: virions, MB: myeloid body, Bar: 500nm
- C. Virions in the wall of blood vessel of connective tissue in kidney on TEM. V: virions, Bar: 200nm
- D. Virions in the connective tissue of digestive gland on TEM, in order to show the vesicle-like structure of virus. V: virions, MF: muscle fibrin, Bar: 200nm
- E. Purified virus through sucrose density gradient centrifugation by negative staining, in order to show the spikes on the envelope of virus was deleted or part-deleted. Bar: 100nm
- F. Purified virus through differential centrifugation by negative staining, in order to show the integrity virus and the fragment of cell. Bar: 100nm
- G. Purified virus through differential centrifugation by negative staining, in order to show the integrity virus and the spikes on the surface of envelope. Bar: 100nm



栉孔扇贝球形病毒的形态特征

The morphology of spherical virus isolated from *Chlamys farreri*