

中国对虾非包涵体杆状病毒在体内的感染与发生

张建红 陈棣华 肖连春 张立人

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

高学兴 吴志广

(河北省乐亭县水产局, 河北乐亭 063600)

S917.1

A

提要 在感染发病成虾的肝胰腺和中肠上皮细胞的胞核内, 出现大量病毒发生基质, 核衣壳, 套膜和完全的病毒粒子。病毒粒子为短杆状, 两端呈钝圆形, 平均大小约为 250-300×110nm, 在核内无包涵体形成。在胞质内发现伴随病毒粒子并具有双层膜的蛋白质结构, 这种结构建议称为该病毒的“封入体”。同时, 我们认为这种无包涵体的杆状病毒, 有可能应归属于杆状病毒科的第三个亚组。

关键词 中国对虾, 非包涵体杆状病毒, 人工感染, 形态发生, 电镜观察

感染, ~~病毒~~

在无脊椎动物病毒学中, 昆虫纲的病毒研究内容最多, 而且已成为无脊椎动物病毒学的重要组成部分。特别是昆虫杆状病毒为人们最早发现, 其种类之多、研究内容之深早已广为人知。然而, 甲壳纲中对虾病毒的研究在国外尚属初期阶段, 国内对虾病毒的探讨也起步不久。

1974年 Couch J. A. 首次报告一种桃红小对虾的核多角体病毒流行病。1981年 Lightner, D. V. 等人第一次发现斑节对虾杆状病毒(MBV)。其后 Sano, T. 等认为日本对虾肝胰腺和中肠上皮细胞为杆状病毒的靶细胞(BMNV)。1988年前后我国台湾地区对虾病害大发生, 产量急剧下降, 造成重大经济损失, 检测出对虾杆状病毒是其主要病因之一。1993年我们从河北等地采集病虾材料, 在其中均发现有杆状病毒。

本文应用人工感染与电子显微技术, 对中国对虾 *Penaeus orientalis* K. 的一种杆状病毒在宿主体内进行感染及其细胞内的形态与发生进行了观察与分析。现将研究结果报告如下:

材料与方 法

- 1 材料来源** 正常对虾和典型病毒病虾均由河北省乐亭县水产局养殖试验场提供。
- 2 人工感染试验** 取体长 10-12cm 的正常成虾 20 头, 饥饿过夜, 次日将典型的病毒致病病虾解剖, 取出肝胰腺组织, 将 5g 肝胰腺作为饵料, 喂食 10 头经停食的正常成虾, 另 10 头对虾正常喂养作为对照。
- 3 电子显微技术** 取经人工感染发病后的试验对虾、对照组正常对虾和天然发病的典型病毒病虾的中肠、肝胰腺组织, 迅速切成 1mm² 小块, 经 2.5% 戊二醛和 1% 四氧化锇作双固定, 梯度酒精脱水, 然后, 用苯甲酸二丙烯酯包埋, 聚合。在 LKB-2128 型超薄切片机上切制, 切片经醋酸铀和柠檬酸铅双染色, 切片在日本日立公司生产的 H-7000FA 型透射电子显微镜中观察与分析。

本文于 1994 年 5 月 9 日收到, 7 月 7 日修回
• 国家自然科学基金资助课题

结果和讨论

1 天然发病与人工感染后发病对虾的病症表现基本相同。主要表现为不喜进食,在水面旋转,体色变深呈暗灰色或红棕色,行动迟缓,肝肿大致使头胸甲膨大,有时甲壳出现白色斑点,2-6天内全部死亡。经解剖后有肝肿大、空肠等病症。人工感染对虾死亡率为100%,对照组对虾生长正常。从表1可看出两组对虾存活与死亡的情况。

表1 人工感染试验与正常对比的死亡及存活数

Table 1 The dead and alive number of infected and normal *Penaeus orientalis* K. in an artificial infecting experiment

组别 Groups	试验天数 Trial days	感染及喂食 Infection and food	存活头数 Alive number	死亡头数 Dead number	死亡率 Death rate
试验组 Trial group	1	喂病虾肝胰腺	10	0	100%
	2	人工饵料	9	1	
	3	人工饵料	7	2	
	4	人工饵料	6	1	
	5	人工饵料	5	1	
	6	人工饵料	0	5	
对照组 Comparative group	1	人工饵料	10	0	0
	2	人工饵料	10	0	
	3	人工饵料	10	0	
	4	人工饵料	10	0	
	5	人工饵料	10	0	
	6	人工饵料	10	0	

2 在正常生长对照组的虾体内均无上述病症。并通过超薄切片电镜观察,检测细胞内无病毒粒子存在,细胞内的细胞器亦属正常,如线粒体的双层膜样结构和其中嵴的构造均完整,核膜层次清晰,核质分布正常,粗面内质网上的核糖体多数排列整齐,胞质内的核糖体分散均匀(图1)。

3 经人工感染病虾组的病虾2-3天后,在其肝胰腺细胞核内,出现病毒发生基质,核衣壳和大量套膜或称囊膜(图2),它们为病毒的装配提供了必需的物质条件。该病毒在宿主细胞内的装配与我们过去多年来研究昆虫杆状病毒的形态发生并不完全类同。从图3、4、5内不难看出这种病毒主要在细胞核内发生,其中图4是一个完全的胞核,它好象是一个病毒装配的“车间”,病毒的各种“零部件”已经备齐,有的已出现装配成完全的短杆状的病毒粒子。图中箭头所示是一堆病毒粒子的横切面,在图5内出现大量的、装配成完全的短杆状病毒粒子,在其附近还保存许多没有用完的病毒发生基质和套膜。更为奇特的是我们发现这些病毒发生基质,通过核孔(*)外溢流向细胞质内(如箭头指示),在细胞质内继续装配成完全的短杆状病毒粒子,这些成片的病毒颗粒被双层膜包围自成一体。图3内显示的就是两个自成一体的单元,我们建议称它为“封入体”。它与昆虫杆状病毒的多角体不同,1982年张立人等人研究家蚕软化病病毒时也看到这种相似的结构。所谓“封入体”一般是指病毒感染宿主细胞时伴随病毒在



图1 正常对虾肝胰腺细胞的超薄切片. N: 细胞核、Mi: 线粒体、Rer: 粗面内质网、Ri: 核糖体(×15000)

Fig. 1 Thin section of penaeid shrimp hepatopancreatic cell. N, nucleus, Mi, mitochondria, Rer, rough endoplasmic reticulum, Ri, ribosome (×15000)

图2 人工感染病毒后在肝胰腺细胞核内出现的大量病毒套膜 (×28000)

Fig. 2 A lot of envelope in hepatopancreatic cell nucleus after artificial infecting (×28000)

图3 人工感染病毒后中肠上皮细胞质内,形成两个较大的双层膜蛋白结构,该结构称之为封入体,内含许多病毒颗粒 (×14000)

Fig. 3 Two-layer-protein structure named occlusion-body in midgut epithelium cell plasma after virus infecting. Lots of virions in this structure (×14000)

图4 一个完整的细胞核,核内出现大量病毒发生基质、套膜、核衣壳和完全的短杆状病毒粒子 (×14000)

Fig. 4 Virogenic stroma, envelope, nucleocapsids and virions in a complete nucleus (×14000)

图5 细胞核内装配成大量的完全的短杆状病毒粒子 (×20000)

Fig. 5 A lot of short bar virions finishing assembly in nucleus (×20000)

细胞质内形成的一种不正常的蛋白结构(保坂康弘 1972)。封入体内的病毒粒子是不恒定的。在封入体的两侧,有时出现一些不定形的、着色较深的所谓“嗜银小体”,它们与细胞内溶酶体的颜色非常相似,然而,这种解释是否确切仍待探讨。

4 通过上述试验结果可以确认该病毒为非包涵体的杆状病毒,病毒粒子形态为短杆状,两端呈钝圆形,病毒颗粒大小约为 $250-300 \times 110 \text{nm}$ 。病毒粒子具有双层套膜结构,即外膜与内膜两层。核衣壳电子密度较深。它们主要在细胞核内装配,不形成包涵体,但在胞质内有时也可以装配,形成封入体蛋白结构。该病毒在中国对虾体内发生的靶细胞为肝胰腺和中肠上皮细胞。

5 根据病毒学的分类原则,从形态学上可认为该类病毒应归属于杆状病毒C亚组。但为了更确切这类病毒的分类地位,有关基本特性的研究工作正在进行之中。

参 考 文 献

- 1 张立人,张建红,陈隽华,等. 中国对虾病毒病原在体内发生的电镜观察. 电子显微学报, 1991, 10(4): 351
- 2 张立人,陈隽华,张建红,等. 中国对虾类几种病毒的分离与电镜观察. 全国人工养殖对虾疾病综合防治和环境管理学术研讨会论文集. 中国科学协会, 1993: 7
- 3 陈隽华,张建红,高学兴,等. 中国对虾一种球状病毒的分离提取与检测. 中国病毒学, 1994, 9(2): 170
- 4 张立人主编. 中国昆虫病毒电子显微镜图谱. 北京, 科学出版社, 1988
- 5 Couch J A. An epizootic nuclear polyhidrosis virus of pink shrimp; ultrastructure, prevalence, and enhancement. J Invertebr Pathol, 1974, 24: 311-33
- 6 Lightner D V, Redman R M. A baculovirus-caused disease of the Penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. J Invertebr Pathol 1981; 38: 299-302
- 7 Sano T, Nishimura T, Oguma K, et al. Baculovirus infection of cultured Kuruma Shrimp *Penaeus japonicus* in Japan. Fish Pathol, 1981, 15: 185-191

Infection and Morphogenesis of Non-inclusion Body Baculovirus from *Penaeus orientalis* Kishinoye *in vivo*

Zhang Jianhong Chen Dihua Xiao Lianchun Zhang Liren

(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071*)

A lot of virogenic stroma, nucleocapsids, envelope and virion is detected in hepatopancreatic and midgut epithelium cell nucleus of infected shrimp. Virion shapes short bar with blunt circle at two sides. The average size is $250-300 \times 110\text{nm}$. No inclusion body is detected in nucleus. There are some two-layer-protein structures containing virion which we suggest be called occlusion-body. Meanwhile, we think that this baculovirus without inclusion body could probably belong to the third subgroup of insect baculoviride.

Key words *Penaeus orientalis* Kishinouye, Non-inclusion body baculovirus, Morphogenesis, Electronmicroscopic observation, Artificial infection