

利用对虾原代细胞增殖对虾杆状病毒 HHNBV 的研究

苗宏志¹ 童裳亮¹ 徐 斌² 姜 明³ 刘晓云³

¹(青岛海洋大学生命学院 青岛 266003)

²(青岛海洋大学水产学院 青岛 266003)

³(青岛海洋大学测试中心 青岛 266003)

关键词 对虾, 细胞培养, 杆状病毒, HHNBV。

中图分类号 Q782 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)02-0221-04

自 1993 年起,国内养殖的中国对虾(*Penaeus chinensis*)出现暴发性流行病。该病来势猛,发病急,传播快,死亡率高,严重影响我国的对虾养殖。在青岛地区,发病时间在 6~8 月。一旦发病,全池对虾可在 3~10 d 内大部或全部死亡。现已查明,该流行病的病原体为对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒(HHNBV)^[1,2],又称对虾白斑综合征 C 型杆状病毒(WSBV, type C)。为了用细胞分离和体外增殖该对虾病毒,自 1994 年起我们便致力于中国对虾的组织培养研究^[3]。迄今已研制成适合中国对虾细胞生长的培养基 MPS。利用此培养基,对虾淋巴组织的迁出细胞能在 3 d 内形成单层。只要每隔 4~5 d 更换培养基,此细胞单层可维持 1~3 个月^[4]。但细胞在体外不能持续分裂,故传代有困难。本文报道用对虾淋巴组织的原代细胞来分离和增殖对虾杆状病毒的结果。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养

细胞培养用海捕的中国对虾。将对虾放入消毒海水(内含青霉素 1000 IU/mL,链霉素 1000 μg/mL)中暂养 4~18 h。实验前将对虾浸入 5% 次氯酸钠溶液消毒 1~2 min。然后用 70% 乙醇进一步擦洗消毒体表。在无菌条件下摘取对虾的淋巴器官,在 MPS 培养基中剪碎,接种于进口 25 cm² 塑料细胞培养瓶中。加入 MPS 培养基,内含 20% 胎牛血清,100 IU/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素。在 25℃ 培养箱中密闭培养^[4]。

1.2 病毒悬液的制备

疾病流行季节,在养殖场选用有典型杆状病毒病症状的对虾(头胸甲有许多白色斑点)10 尾,剥去头胸甲,取头部组织,加入 4 倍体积的培养液进行匀浆。用 2000 r/min 离心 20 min。上清液用孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤除菌。滤液作为待用病毒悬液。

1.3 接种病毒

待对虾淋巴组织的迁出细胞形成单层后,倾去培养液,每瓶细胞接种上述病毒悬液 0.1 mL。吸附 1 h 后加入培养液 MPS,在 25℃ 培养箱中培养。对照组以 0.1 mL 培养液代替病毒悬液。用倒置显微镜逐日观察细胞病变。

1.4 电镜观察

待细胞出现病变后,用细胞刮刀刮下细胞。将细胞悬液注入离心管,用 1000 r/min 离心分离细胞。再用 PBS (pH7.2)离心清洗细胞 3 次。用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定细胞,梯度乙醇脱水,Epson812 树脂包埋,超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅染色,用日立 H-7000 型透射电镜观察。

2 结 果

2.1 细胞培养

在 MPS 培养基中培养 24 h,对虾淋巴组织便有大量细胞迁出。细胞呈细长的纺锤形,胞核位于中央(图版 I-A、B)。迁出细胞不断增多,3 d 内细胞便形成单层。此时细胞的长度由刚迁出时的 20~50 μm 生长至 200 μm 以上。

2.2 细胞病变

接种病虾组织匀浆液后 5 d 细胞便出现病变,即局部细胞收缩、变圆。7 d 后细胞病变波及全瓶。此时,大部细胞变圆、脱落、死亡。而对照组的细胞单层则完好无损(图版 I-C、D)。

2.3 电镜观察

在电镜下,可看到细胞受病毒感染后的核相变化(图版 I-E):在感染初期,细胞核的染色质逐渐向核膜移动,在核内形成电子密度较高的染色质浓密区(a、b)。接着,在染色质浓密区出现病毒粒子。此时,染色质的电子密度下降(c-e)。最后,染色质消失,成熟的病毒粒子向核膜移动,局部核膜破裂(f)。

在高倍电镜下可看到病毒粒子的形态及其组装过程(图

版 I-F)。病毒粒子呈圆柱形,有囊膜,长约 360 nm,直径 120 nm。病毒一端的囊膜向外延伸,形成尾状结构。箭头所指为病毒核衣壳正套入囊膜。

3 讨 论

实验结果表明,利用中国对虾淋巴器组织的原代细胞从病虾组织中分离和增殖对虾杆状病毒是可行的。细胞单层在 MPS 培养基中能维持 1~3 个月^[4]。而接种病毒悬液到出现细胞病变只需 5 d,故细胞的存活时间大大超过病毒繁殖所需时间。

用这种方法分离到的对虾病毒,其大小和形态均与黄捷

等^[1,2]发现的对虾皮下与造血组织坏死杆状病毒(HHNBV)相同。这又一次证明,该病毒是引起中国对虾暴发性流行病的病原体。该病毒不仅感染中国对虾,而且能感染长毛对虾(*Penaeus penicillatus*),日本对虾(*Penaeus japonicus*)以及斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[1]。

迄今,从对虾中发现的杆状病毒已有 4 种。即对虾杆状病毒 BP(*Baculovirus penaei*),中肠腺坏死杆状病毒 BMNV(*Baculoviral midgut gland necrosis virus*),斑节对虾杆状病毒 MBV(*Monodon baculovirus*)以及中国对虾的皮下和造血组织坏死杆状病毒 HHNBV。这几种病毒的宿主,所感染的器官以及病毒的大小等均有所不同(表 1)^[5]。病毒 BP 已在

表 1 对虾杆状病毒的种类与特征

Virus	Host	Target organ	Size of virions/(nm × nm)
BP	<i>P. duorarum</i>	Hepatopancreas, midgut	74 × 270
	<i>P. setiferus</i>	Hepatopancreas, midgut	74 × 270
	<i>P. aztecus</i>	Hepatopancreas, midgut	74 × 270
	<i>P. vannamei</i>	Hepatopancreas, midgut	
	<i>P. stylirostris</i>	Hepatopancreas, midgut	
BMNV	<i>P. japonicus</i>	Hepatopancreas, midgut	72 × 310
MBV	<i>P. monodon</i>	Hepatopancreas, midgut	69 × 275
HHNBV	<i>P. chinensis</i>	Hypoderm, hematopoietic tissue	90 ~ 130 × 300 ~ 360
	<i>P. penicillatus</i>	Hypoderm, hematopoietic tissue	
	<i>P. japonicus</i>	Hypoderm, hematopoietic tissue	
	<i>P. monodon</i>	Hypoderm, hematopoietic tissue	

桃红对虾(*P. duorarum*)、白对虾(*P. setiferus*)、褐对虾(*P. aztecus*)、南美白对虾(*P. vannamei*)和红额角对虾(*P. stylirostris*)中发现,大小为 74 nm × 270 nm。病毒 BMNV 是在日本对虾中发现的,大小为 72 nm × 310 nm。病毒 MBV 则从斑节对虾中发现,大小为 69 nm × 275 nm。这 3 种病毒主要感染肝胰脏和中肠前部。中国对虾的杆状病毒 HHNBV 不仅感染中国的对虾,也感染长毛对虾,日本对虾和斑节对虾。感染器官主要是皮下和造血组织,但在肝胰脏、鳃、泳

足、肠道、肌肉等组织也有病毒。不同研究者报道的病毒大小为:长 300 nm ~ 370 nm,直径 90 nm ~ 130 nm。这 4 种杆状病毒的共同特征是:病毒粒子大,有囊膜,病毒核酸为双股 DNA^[5]。

斑节对虾的杆状病毒 MBV 也已用对虾淋巴器组织的原代细胞分离成功^[6]。接种病虾组织提取液后,斑节对虾的原代细胞在 2~3 d 内出现病变。

参 考 文 献

- [1] 黄捷,宋晓玲,于佳等.海洋水产研究,1995,16(1):1~10
- [2] 黄捷,于佳,宋晓玲等.海洋水产研究,1995,16(1):11~23
- [3] 童袞亮.生物工程进展,1994,14(6):47~48
- [4] Tong S L, Miao H Z. *Aquaculture*, 1996, 147:151~157
- [5] Lightner D V, Redman R M, Bell T A. *Aquaculture*, 1989, 32:209~233
- [6] Chen S N, Kou G H. *J Fish Dis*, 1989, 12:73~76

Multiplication of the Shrimp Baculovirus HHNBV with Primary Cell Cultures from Lymphoid Organ of *Penaeus chinensis*

MIAO Hong-Zhi TONG Shang-Liang

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao, 266003)

XU Bin

(College of Fisheries, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003)

JIANG Ming LIU Xiao-Yun

(Test Center, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003)

Abstract The hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus HHNBV has been confirmed to be the causative agent for the explosive epidermic disease of farmed shrimp *Penaeus chinensis* since 1993. The virus was isolated and multiplied successfully in the primary cell cultures from the lymphoid organ of the shrimp. A cell monolayer was formed in three days in the medium MPS and could be maintained for 1~3 months as the medium replaced every 4~5 days. The cytopathic effect occurred in 5 days after inoculation of the tissue extract from the diseased shrimp. The transmission electron microscopy showed many rod-shaped virions of HHNBV in the nuclei of infected cells.

Key words Shrimp, cell culture, baculovirus, HHNBV

第六届中日双边酶工程学术讨论会 通 知

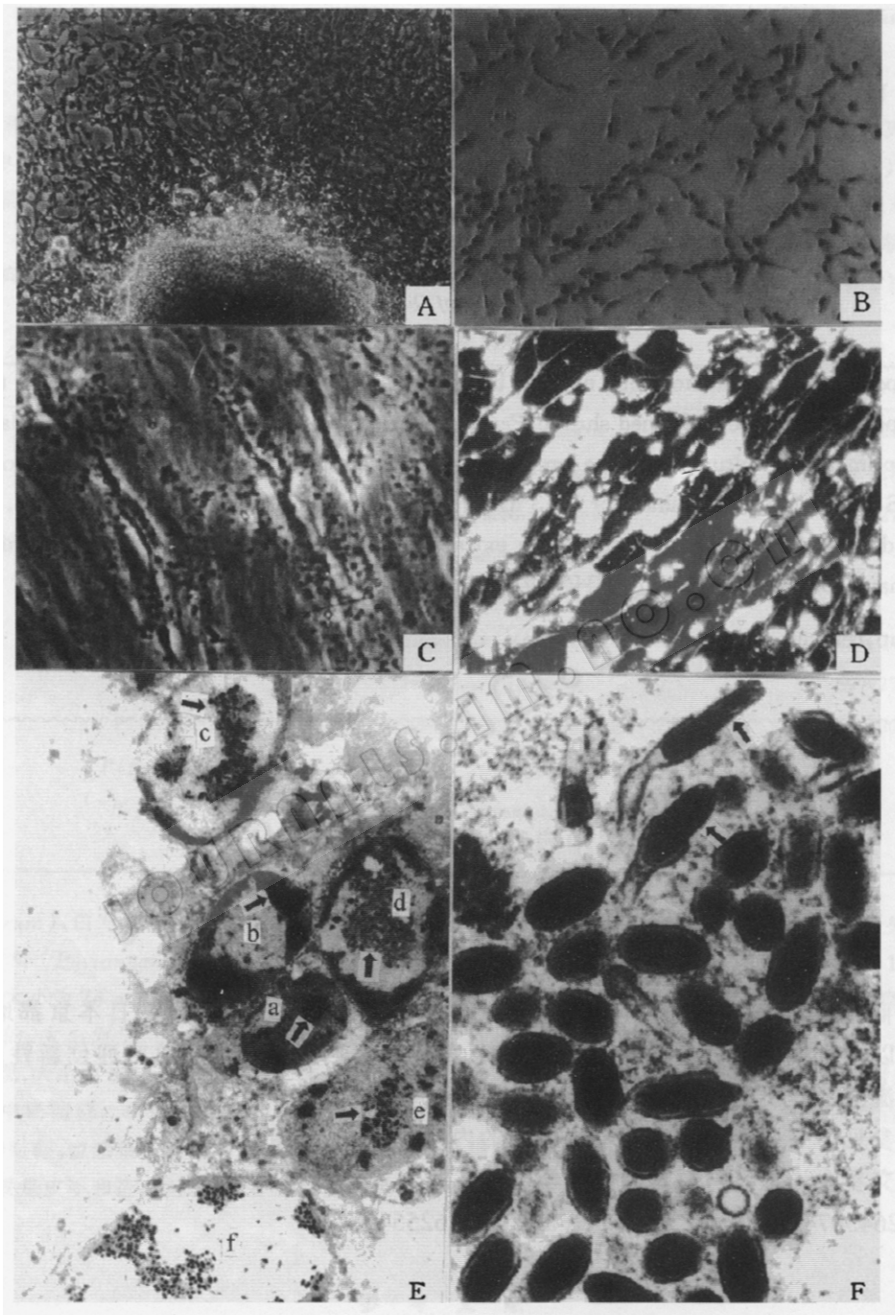
经中日双方商定,第六届中日酶工程会定于2000年10月15日至18日在日本京都地区召开,会期3天。会议论文均以大会报告或分组报告用英语发表,不以墙报形式发表。会议欢迎创新性的研究综述。目的是中日双方交流酶工程研究成果、前沿热点及二十一世纪酶工程方向。

会议内容请参见第三届全国酶工程会议通知的内容项目(见本期 p.214)。

关于论文提交参会详情请与中国微生物学会酶工程专业委员会联系。

Tel:010-62643074; 010-62554677; Fax:010-62554677

苗宏志等:利用对虾原代细胞增殖对虾杆状病毒 HHNBV 的研究
 MIAO Hong-Zhi *et al*: Multiplication of the shrimpm baculovirus HHNBV with primary
 cell cultures from lymphoid organ of *Penaeus chinensis*



A. Photomicrograph of the lymphoid tissue culture of *P. chinensis* after 24h. Giemsa stain, $\times 40$.

B. Partial amplification of plate I-A to show the cell morphology($\times 100$).

C. Phase contrast photomicrograph of shrimp lymphoid tissue culture in 10d to show the intact cell monolayer. $\times 100$.

D. Phase contrast photomicrograph to show the obvious cytopathic effect on the cell monolayer after inoculation of diseased shrimp tissue extract for 7 days. $\times 100$.

E. Transmission electron micrograph of virus infected nuclei. a, b: The chromatin margination (arrow) at the initial stage of virus infection. c - e: The viruses appeared in the dense chromatin (arrow) at the middle stage of virus infection. f: The matured virions moved toward nucleus membrane. $\times 2800$

F. Transmission electron micrograph to show the morphology of virions. Arrows indicate the nucleocapsids inserting into the envelopes. $\times 50000$.