

斑节对虾杆状病毒的超微结构

陈细法

(厦门大学, 361005)

吴定虎 黄槐 池信才

(厦门市水产研究所, 361005)

陈平

(厦门大学, 361005)

摘要 应用超薄切片技术,研究斑节对虾卵细胞和各变态期病毒及其包涵体的分布和超微结构。在糠虾前期各期未找到病毒,而糠虾后期各期的肝和中肠上皮细胞核中则有典型的病毒及其包涵体存在。这提示着 MBV 可能不经由卵细胞传播给子代。病毒粒子单个散在于核质和包涵体基质中,一端钝圆,另一端稍尖,形似葵花子,而不是如文献所言的长圆柱体,长度 270—300nm,直径平均 75nm,由囊膜、衣壳和核心三部分组成,囊膜上无纤突。这与文献上报道的斑节对虾杆状病毒(MBV)相仿,因此,所观察到的病毒应是 MBV。这表明 MBV 分布地域波及我国大陆南方沿海。此外,作者所见的核衣壳是偏心位置,而非居中排列,并指出这有利于核衣壳更快进入靶细胞。MBV 包涵体呈圆形或卵圆形,直径 2—9 μ m,外无被膜,基质裸露,是由等边六角形组成的蜂窝状和晶格线彼此平行排列的蛋白质构成。笔者认为这是由于切割平面不同造成。此外,笔者在显微、超微和分子水平上,较详细描述了文献上未报道过的 MBV 包涵体形成过程,指出斑节对虾多角体蛋白颗粒、核型多角体与 MBV 粒子各组份的合成和组装是分别同时进行的,以靶细胞核出现病毒发生基质为开始,以完整 MBV 粒子进入多角体为终止的一个连续过程。

关键词 斑节对虾,杆状病毒,超微结构

对虾病毒及其病毒病的研究起步较晚,自 Couch 等[1974]首次发现桃红对虾杆状病毒(BPV)以来,先后又发现了 10 多种对虾病毒[Akiyama, 1993; Fulks, 1992]。我国台湾省已发现传染性皮下和造血组织坏死病毒和斑节对虾杆状病毒(MBV)[黄旭田, 1979]两种病毒,大陆近几年也先后发现肝胰腺细小病毒和 MBV[薛清刚, 1992; 陈细法, 1994]。上述 10 多种对虾病毒已部分分离纯化,但只有 BPV 被国际病毒学分类委员会正式定名为“对虾杆状病毒”(Baculovirus penaei Couch)。笔者现场观察了 1992—1993 年我国养殖对虾爆发性流行病的群体症候[陈细法, 1993]、病原种类和细胞超微病理变化[陈细法, 1994],在病毒病原方面发现了 MBV、HPV、呼肠弧病毒(REO)和中肠腺坏死杆状病毒(BMNV),同时也检测到数种未见报道的病毒和一些可疑的病毒。由于国内未见有关 MBV 分布、超微结构特点的报道,现将 MBV 超微结构特点及其在疾病过程中的作用陈述如下,以期对该病毒地域分布的了解和早期诊治措施的制订有些裨益。

1 材料与方法

1.1 材料

采集台湾和东南亚进口的斑节对虾亲虾产生的卵及其孵化出来的健康无病症无节幼体、蚤状幼体、糠虾幼体、仔虾和各种大小的成虾,同时也采集弱苗,病苗和病虾。卵、无节幼体和蚤状幼体整体固定,定向包埋,其余个体取肝胰腺、中肠、胃和鳃,部分样品取心脏和肌肉。每个样品都同时制备光镜石蜡切片和电镜超薄切片,进行对比观察。

1.2 方法

光镜石蜡切片按常规方法制备,H·E染色。

电镜超薄切片的制备是把组织切成1mm³的小块,常温下用2%福马林-戊二醛(1:3)前固定2小时以上,用pH7.2的PBS洗净,再用1%锇酸后固定2小时,然后用系列酒精-丙酮脱水。Spurr和环氧树脂618包埋,40-80C固化后[陈细法,1978],用铀盐和铅盐双染色,在JEM1200EX和JEM100CX电子显微镜下观察拍片。

2 结果

在光镜下观察石蜡切片,可见部分仔虾和成虾的肝胰腺上皮细胞核内、腺管腔中和严重坏死区内有嗜伊红颗粒,但未在卵、无节幼体、蚤状幼体和糠虾幼体组织中发现类似颗粒。在电镜下,进一步观察病毒及其包涵体的超微结构和它们与病毒发生基质的关系。

2.1 病毒包涵体的超微结构

包涵体位于肝胰腺和中肠上皮细胞核质中,数量不等,少则一个(图版-1),多则3-5个(图版-2,9),甚至更多。各个包涵体体积变化颇大,刚形成时,为少量杂乱无章的蛋白颗粒和由蛋白颗粒组成的纤丝聚集而成松散的多角体,体中无病毒粒子。体积略大于病毒粒子(图版-8),随后体积逐渐增大,发育成包涵体。包涵体直径多在2-9 μm 之间,最大可达13 μm 以上,园球形,少数卵园形,外无被膜包裹,基质裸露,边缘不整齐,呈锯齿状。

病毒包涵体基质是由多角体蛋白质组成的,这些蛋白质以特定的晶格彼此互相结合,排列成有规律的晶状体,病毒粒子单个散在其中。笔者所见的基质晶格有两种排列方式,一种形似蜂窝状,由无数等边6角形组成,顶角连线为15nm,中空无物(图版-6),另一种平行排列,未见横线阻隔,线粗细均匀,晶格间距16nm(图版-7)。

此外,在包涵体晶体结构的基质中尚可见一丛以上的纤丝(图版-1,10),外无被膜,也不呈晶格排列,仅以单丝平行聚集成丛。各丛大小不一,单丝长度难以测定,直径相当一致,其功能意义尚不清楚,可能与病毒组装有关。

2.2 病毒粒子的超微结构

病毒粒子不组成病毒束,而是单个随机分布在细胞的核质中(图版-4)和包涵体基质中(图版-5),阻断晶体,且彼此间有一小间隙隔开。在胞质和细胞间隙内偶尔能见到病毒粒子

(图版—3),它属于单粒包埋型病毒(single embeded virus)。斑节对虾病毒粒子外形为杆状,长度多在 270—300nm,一端钝圆,另一端稍尖,形似葵花子,因而横切面直径变化颇大,平均在 75nm 左右。

病毒粒子由三部分组成(图版—3、4、5),最外层囊膜(envelope),类似质膜的单位膜,厚约 90—110A,全封闭,表面光滑无凸起,提示囊膜表面无纤突(projection)存在;中心部分是核酸核心(nucleic acid core),孚根染色显示 DNA,是一种 DNA 病毒[殷震,1985],由于 DNA 高度扭曲压缩,故电子密度甚高;在囊膜与核心之间隔着一层衣壳(capsid),衣壳是蛋白质膜,紧包在核酸核心的外缘,起着支持和保护作用,多数呈对称多面体,以最小的体积包容最大的信息。在一般情况下,很难从形态上将核心和衣壳分开来,因此,常把两者的结合存在统称为核衣壳(nucleocapsid),其长度在 220—270nm 之间,且偏心位置,使病毒粒子钝圆一端的间隙显得特大。核衣壳是斑节对虾病毒感染宿主细胞并增殖的物质基础,也是生命活动的中心。

在斑节对虾杆状病毒之间,散布着少量直径小,长度短的病毒粒子,它们是否就是缺损性干扰病毒(defective interfering virus)尚未定论,有待提出更充分的证据。

2.3 病毒发生基质和病毒粒子及其包涵体形成的关系

病毒发生基质(virogenic stroma)位于肝胰腺和中肠上皮细胞核中,由中等电子密度的细颗粒物聚集而成,体积大小不等,多数为疏松团块(图版—8),外无被膜,其周围散布着大量的核衣壳物质和囊膜材料,以及装配完好的病毒粒子;少数为网状,在其网孔中也分布着核衣壳物质,但囊膜材料相对少一些。与病毒发生基质伴随存在的有一些是电子密度较低的纤丝状物质,这些物质可能是组成囊膜和衣壳的蛋白质或前体。另一些是高电子密度的颗粒,它们由分散到聚拢成片,部分呈晶状排列,这些物质可能是角蛋白。这类细胞的胞质中的细胞器,尤其是核糖体较丰富,且多聚集在细胞核周围。

此外,还可看到囊膜材料包被核衣壳,装配成一个完整的病毒粒子,并向多角体和包涵体靠拢(图版—9),有的粘附在多角体表面,有的单个插入多角体内(图版—10),并逐渐形成完整的病毒包涵体。从图版—9 的 A—E 可以看出,体积最小的多角体(A)中无病毒粒子,体积最大的包涵体(E)内有 70 多个病毒粒子。

3 讨论

3.1 MBV 特点的分析

我们从进口亲虾培育的糠虾、仔虾、和成虾的肝胰腺和中肠上皮细胞核中观察到的病毒粒子呈杆状,长度为 270—300nm,平均直径 75nm,由囊膜、衣壳及核心三部分组成。病毒包涵体无被膜,基质是晶格状排列的蛋白质,病毒粒子单个散在其中,这些基本组份和超微结构特点与 Lightner[1983]、Lester[1987]和 Doubrovsky[1988]所描述的斑节对虾杆状病毒(*Penaeus monodon*-type baculovirus)的特征相仿,因此,笔者观察到的这些病毒也是属于斑节对虾单包埋型核型多角体杆状病毒,即是斑节对虾杆状病毒(MBV)。这表明 MBV 分布地域不只局限在从台湾一直延续到印度的弧形海域,而是波及到我国大陆南方诸省沿海。但是,笔者观察到的 MBV 不仅与上述三作者,而且与其他一些作者的描述也有些不同之处。首先,MBV 不是圆柱体,上下端大小一样,而是一端阔大,且呈钝圆状,另一端稍尖,所以在二维平面上呈葵花

瓜子状,在三维构型呈葫芦状。这种整体形态也有别于多数昆虫核型多角体病毒[张立人,1988]。虽然昆虫和对虾同属于节肢动物甲壳纲,但是分属于不同种和属,这些区别反映出病毒种属特异性。其次,笔者观察到 MBV 粒子的核衣壳在囊膜内偏心位置,一侧紧贴囊膜,另一侧留有宽阔的间隙,不是如文献[Lightner,1983;Fulks等,1992]所述居中排列。众所周知,核衣壳是病毒在宿主细胞内增殖和生命活动的物质基础,当病毒吸附在靶细胞质膜,并脱掉囊膜时,其偏心位置的核衣壳能更快更安全地进入宿主细胞,因而 MBV 具有更强的传染性。第三,笔者在超薄切片上观察到的 MBV 囊膜是光滑平整,即无突起,也无摺折,这表明无纤突(projection)存在,然而,Fliegel 应用电镜负染色技术观察纯化分离的 MBV,发现囊膜上有蛋白质亚单位颗粒均匀分布。笔者认为这可能是实验方法不同造成的。电镜负染色技术的分辨率优于电镜超薄切片技术,能分辨出直径几十埃的颗粒,而 800 埃厚的切片分辨率仅能达到 nm 量级。所以负染色样品上能见到的亚单位在超薄切片上不一定可见。所以说 Brenner 首先把负染色技术应用于病毒学,是对病毒形态学等方面的深入研究起着决定性的推动作用。

与此同时,笔者也观察到细胞质、细胞间隙和腺腔面上散在着病毒粒子(图版-3),其形态与上述的 MBV 粒子完全相同,但未见胞质中有囊膜材料、核衣壳和病毒发生基质,与文献[殷震,1985;张立人,1988]报道的昆虫质型多角体病毒迥然不同。目前也未见斑节对虾有质型多角体病毒存在的报道。笔者认为,这可能是细胞核被 MBV 严重感染后核膜破裂,核质崩解,病毒粒子和包涵体游离到胞质中,随后细胞破裂而逸出间隙,这可以从周围细胞破坏严重和腺管中游离着一些残缺不全的包涵体获得佐证[陈细法,1994]。

3.2 MBV 包涵体形成过程

未见国内外有文献报道 MBV 包涵体的形成过程。笔者发现斑节对虾核型多角体与 MBV 粒子各组份的合成和组装是分别同时进行的(图版-8,10)。病毒感染的初始,靶细胞核中央电子密度降低,周边电子密度稍高,胞质中游离的多聚核糖体聚集在细胞核周围→细胞核内周边出现大小不等的病毒发生基质、单根零乱分布的纤丝,以及杂乱无章的细小颗粒,部分纤丝聚拢成束,有些颗粒排列成小片晶格,推测是多角蛋白→与此同时,紧靠着病毒发生基质出现高电子密度的病毒核心,附近出现大量核衣壳和囊膜材料→出现大量装配完整的病毒粒子和数个体积不大的多角体,多角体基质晶格排列规整有序,但多数无病毒在其中→结构完整的 MBV 粒子粘附在多角体周围,并单个插入多角体内,使得具有结晶基质的多角体充满各种数量的病毒粒子,从而完成 MBV 包涵体形成的全过程。这时的包涵体体积明显大于多角体,细胞核也随之膨大。

本研究还发现,MBV 包涵体基质晶格有两种排列方式,一种是由等边六角形排列成蜂窝状(图版-6),另一种平行线排列(图版-7),张立人[1988]报道昆虫多角体基质晶格有方格状排列。笔者认为,这可能是同一种空间构型,由于超薄切片切割平面不同,呈现完全不同的二维图象所致,并非 MBV 包涵体有着多种构型的蛋白质基质。

3.3 MBV 可能传播途径的探讨

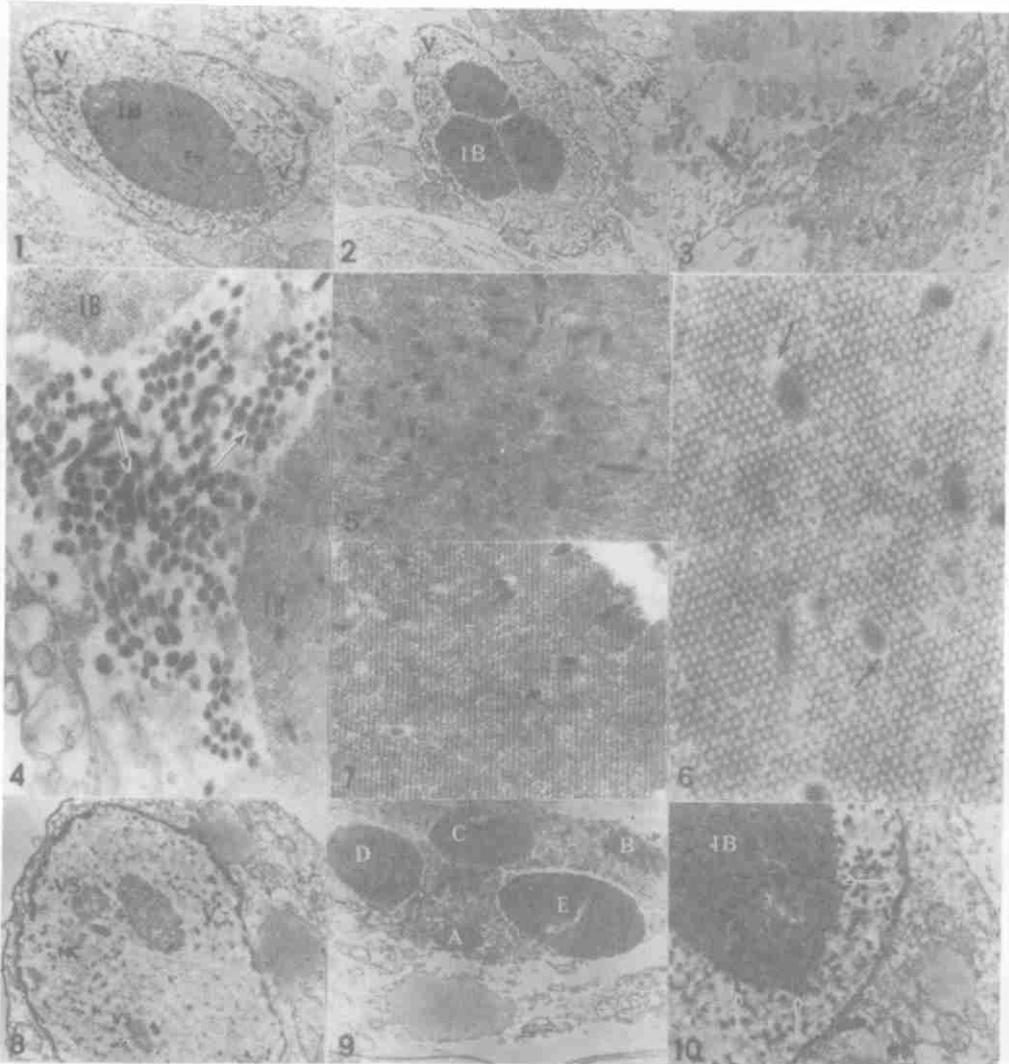
自首次报道斑节对虾杆状病毒[Lightner,1983]以来,人们从养殖环境和亲虾生殖细胞两方面探索 MBV 的传播途径,都没有取得完全统一结论,Chen[1989]和 Overstreet[1988]认为 MBV 通过养殖环境,在斑节对虾群体间水平传播,另一些学者则持相反意见,认为可以经由

亲虾生殖腺和生殖细胞传给子代。但是,他们都没有进行从卵到成虾各个阶段的跟踪检测。笔者跟踪观察斑节对虾卵细胞和各变态期 MBV 分布时发现,卵、无节幼体、蚤状幼体和糠虾前期无 MBV 感染,这不仅表明卵细胞可能不带有亲虾的 MBV,而且也表明由于糠虾前期各阶段幼体无需从外界摄食,或者仅摄食单细胞藻类,因此不易食入沾污着亲虾带 MBV 粪便的食物,因而检测不到 MBV。而糠虾后期,特别是子虾和成虾已能正常从外界摄取饵料,食入 MBV 的可能性大增,因而容易检测到 MBV,这提示着 MBV 可能是通过对虾种群各个体之间进行水平传播,而不是经由生殖腺和卵细胞垂直感染子代。这些观察结果,对无毒虾苗的培育是有益的启迪,但是,病毒传播途径是个复杂问题,今后要多学科从各个不同角度作进一步确证。

笔者不仅观察斑节对虾幼体的整体,而且也观察健康虾和病虾的肝胰腺、胃、中肠、心脏、肌肉和鳃,目前仅在肝胰腺和中肠上皮细胞核中发现 MBV 包涵体,并造成病理性破坏[陈细法,1994],而其他器官均未检测到 MBV,这显示出 MBV 的靶细胞可能是消化系统上皮细胞,特别是肝胰腺和中肠上皮细胞。然而,Chen [1989]报道,MBV 能感染斑节对虾淋巴样培养细胞,这需要日后观察斑节对虾体内淋巴样细胞 MBV 感染情况后才能确证。

参 考 文 献

- [1] 陈细法,1993.对虾病毒性疾病的群体症候与病理变化.中国水产,(8):32-33.
- [2] ——,1993.对虾病毒性疾病的群体症候与病理变化.中国水产,(9):30-31.
- [3] ——,1976.应用国产包埋剂制作生物组织超薄切片的经验介绍二则.中华医学杂志,56:655-656.
- [4] ——,1994.MBV 感染的肝胰腺上皮细胞的超微病理研究.水产学报,18(4):265-271.
- [5] 张立人,1988.中国昆虫病毒电子显微镜图谱,8-17.科学出版社(京).
- [6] 薛清刚,1992.对虾疾病的病理与诊断,60-74.青岛海洋大学出版社.
- [7] 殷震,1985.动物病毒学,26-29.科学出版社(京).
- [8] 黄旭田,1979.养虾全集,139-152.养鱼进展编辑部(台北).
- [9] Akiyama, D. M., 1993. Technical Bulletin, 8-9. U. S. Wheat Associates. Soybean.
- [10] Chen, S. N., 1989. Observation on pathogenicity and epizootiology of *Penaeus monodon* Baculovirus (MBV) in cultured shrimp in Taiwan. *Fish Pathology*, 24(4): 189-195.
- [11] Chen, S. N. et al., 1989. Infection of cultured cells from the lymphoid organ of *Penaeus monodon* Fabricius by monodon-type baculovirus (MBV). *J. Fish Dis.*, 12: 73-76.
- [12] Couch, J. A. et al., 1974. Free and occluded virus similar to baculovirus in hepatopancreas of pink shrimp. *Nature*, 247: 229-231.
- [13] Doubrovsky, A., 1988. Observation on the ultrastructure of baculovirus in Australian *Penaeus monodon* and *Penaeus merguensis*. *Australian J. Marine and Freshwater Res.*, 39: 743-749.
- [14] Fulks, W., 1992. Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, 58-112, 233-253. The Oceanic Institute Makapuu Point. Hawaii.
- [15] Lester, R. J. G., 1987. Light and electron microscope evidence of baculovirus infection in the prawn *Penaeus plebejus*. *Dis. Aquat. Org.*, 3(2): 217-219.
- [16] Lightner, D. V. et al., 1983. Observations on the geographic distribution, pathogenesis and morphology of the baculovirus from *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*, 32: 209-233.
- [17] Overstreet, R. M., 1988. Experimental infections with Baculovirus penaei in the white shrimp *Penaeus vannamei* as a bioassay. *J. World Aquac. Soc.*, 19: 175-187.



图版 plate

1. 肝胰腺上皮细胞核内包涵体(1B)、病毒粒子(V)和纤丝(Fm)。虽然细胞核和多数细胞器基本完好,但是内质网排列紊乱,有髓样变趋向。7200 \times ; 2. 肝胰细胞核内有三个病毒包涵体(1B)和大量病毒粒子(V)。包涵体基质是晶格状排列,外无被膜。细胞质严重水肿。5400 \times ; 3. 细胞质内和细胞间隙中散在着病毒粒子(V),未见包涵体。部份细胞质崩解(*)。10000 \times ; 4. 细胞核质中游离的杆状病毒粒子(V),外有囊膜包绕(→),在稍膨大的一端有偏心位置的核衣壳,有的纵切成杆状,有的横切成圆形。上方和右侧是包涵体(1B)的一部份,基质晶格排列清楚可辨。43000 \times ; 5. 包涵体晶格基质中散在着纵切(V₁)和横切(V₂)的病毒粒子。43000 \times ; 6. 包涵体基质的蛋白质晶体呈现六角形阵列,形似蜂窝,病毒粒子所在处晶格消失,彼此间有小空隙隔开(→)。108000 \times ; 7. 包涵体基质的蛋白质晶体呈平行线排列,结晶线粗细均匀,两线间距相等。54000 \times ; 8. 细胞核中有多处病毒发生基质(VS),附近散在着核衣壳物质(NC)、囊膜材料和病毒粒子(V),也见纤丝伴随存在。8700 \times ; 9. 细胞核中有5个大小不等,形态类似的包涵体和多角体,体积从A到E逐渐增大,其基质中的病毒粒子也从无到逐步递增。7200 \times ; 10. 病毒粒子聚集在细胞核内,尤以病毒包涵体(1B)中及其周围最为密集,并像锥子一样插进包涵体(→)。15000 \times 。

ULTRASTRUCTURE ON *PENAEUS MONODON* BACULOVIRUS

Chen Xifa

(*Xiamen University*, 361005)

Wu Dinghu, Huang Huai, Chi Xincui

(*Xiamen Aquaculture Institute*, 361005)

Chen Ping

(*Xiamen University*, 361005)

ABSTRACT With improved technique of ultrathin section, we studied the ultrastructural features and distribution of viruses and inclusion bodies (IB) from the eggs and various stages of *P. Monodon*. The relations between viruses and their IB and virogenic stormas were also discussed. The results show that the virogenic stormas, all parts of virus and intact virion have not been found in the stages of egg, nauplius, zoea, and early mysis, while the MBV virion and inclusion bodies have been detected in the nuclei of hepato-pancreatic and midgut epithelial cells in the stages of late mysis, postlarvae and adult shrimp. These results suggest, in terms of individual development, that MBV might not transmit to the offspring through eggs, but more possibly through ingesta polluted by parent shrimps feces that contain MBV. Virions spread separately in nuclear plasma and in basic material of IB, instead of assembling each other, so virus belongs to single-nucleocapsid nuclear polyhedral baculovirus. The virion has the shape of melonseeds with one end blunt and the other sharp, but not cylindric as reported. Composed of envelop, capsid and core, they are 270—300nm in length and have a widely changed diameter which is 75nm in mean. There is not any ciliary process on the envelop. The features of the three components and the main ultrastructure are similar to those of most reported MBV, so it can be concluded that the virus observed by us is MBV. These show MBV distributes not only in the arc regions from Taiwan to India, but also in the southern coast of China mainland. The capsid observed is by us eccentric and not at the center of virion. We think that this structure is helpful for entering target cells. Flegel has found subunits on the envelop by negative staining, and we have not found any process in envelop by ultrathin section. We believe the difference is due to the approaches used. MBV IB is spherical and spheroidal, 2—9 μm in diameter, unenveloped and consists of paracrystalline arrays of proteins. The paracrystalline arrays in two ways: the first the lattice is composed of hexagonal matrix which constructs a honeycomb-like structure; the second the lattice is composed of linear matrix arrays. Some literature reports that lattice exits in a form as checkerboard. We deduce the form is owing to a different cutting plane of section, but not the presence of various configuration of protein matrix in MBV IB. Besides, we first detail the forming process of MBV IB in cellular, ultrastructure and molecular levels, and indicate the polyhedral protein, nuclear polyhedral and MBV virion assemble simultaneously. This assembling is a continuing process that begins with the presence of virogenic storma in target cells and ends with the entry of MBV into polyhedral.

KEYWORDS *Penaeus monodon*, baculovirus, Ultrastructure