

·研究简报·

中华绒螯蟹 1 种球状病毒颗粒的电镜观察

Electron microscopic observation of spherical viruses in *Eriocheir sinensis*

陈 辉

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081)

Chen Hui

(Freshwater Fisheries Research Center, Academy of Fishery Sciences of China, Wuxi 214081)

薛仁宇 贡成良

(苏州大学, 苏州 215151)

Xue Renyu Gong Chengliang

(Suzhou University, Suzhou 215151)

关键词 中华绒螯蟹, 颤抖病, 球状病毒, 电镜观察

Key words *Eriocheir sinensis*, trembling disease, spherical viruses, electron microscopic observation

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)养殖病害问题已成为制约养殖生产的主要因素, 病害造成的损失逐年增长, 损失也越来越严重。1996年以来, 江苏、浙江、安徽等地相继发生养殖中华绒螯蟹患颤抖病成批死亡的病例, 养殖单位采用多种抗菌药物治疗均无明显效果。病蟹的主要症状表现为步足出现明显的颤抖现象, 指节变红并伴有肝部糜烂、鳃丝略黑、三角膜水肿等特征。此病一般多发生在高温季节7~9月份, 并以8月份最为严重。经电镜观察, 病蟹组织内存在大量的病毒颗粒。采集病蟹组织液进行人工感染试验, 结果与自然发病特征相同, 并从感染发病蟹体中再次分离到此病毒颗粒。因此确定该病是由病毒引起的。对于蟹类疾病多见于细菌和寄生虫的研究, 姜静颖等^[1]观察到幼蟹小球病毒颗粒, 但未对该病毒的致病性进行研究。严隽箕^[2]观察到对虾池中的野杂蟹机体组织有对虾杆状病毒的存在, 而对于中华绒螯蟹的病理性疾病的研究尚未见报道。本文对中华绒螯蟹颤抖病及病毒电镜观察结果作了初步报道。

1 材料与方法

1.1 实验材料

病蟹采集于江苏省昆山阳澄湖地区养殖场。采集的病蟹有明显的“颤抖病”特征。健康蟹采自阳澄湖围网养殖区, 并在实验室暂养及抽样检查无任何病症。

1.2 分离提纯病毒

病蟹用清水冲洗干净, 再用75%的酒精擦洗, 除去甲壳后, 病蟹样品整体在pH 7.2的PBS液中研磨匀浆成悬浊液, 离心5

min, 8 000 r/min, 4℃, 取上清液(去脂肪); 再离心20 min, 15 000 r/min, 4℃, 取上清液(去脂肪); 经0.45 μm滤膜过滤, 将滤液离心20 min, 15 000 r/min, 4℃, 取上清液加硫酸铵沉淀; 沉淀用PBS液溶解, 经24 h, 4℃透析; 取溶液再离心15 min, 15 000 r/min, 4℃; 取上清液在Sephacrose 2B柱上进行层析, 分别收集紫外扫描200~300 nm区段, 并选取260 nm/280 nm>1的分离液, 此液再经24 h, 4℃透析, 用蔗糖垫底浓缩; 浓缩液再经24 h, 4℃透析, 得初步纯化液(260/280=1.10); 取上清液置于支持膜的铜网上, 经负染后进行电镜观察并拍照。同时取健康蟹进行对比实验。

1.3 人工感染

用注射器取上述初步纯化液稀释10倍后, 注射到健康蟹的腹腔和步足基部内, 每只蟹注射0.2 ml。试验组和对照组各10只, 体重为(50±5) g, 对照组注射0.2 ml生理盐水。人工感染后的中华绒螯蟹放入水族箱中, 并进行正常的饲养管理, 使水族溶氧DO>5 mg/L, pH 7.2左右, 温度控制在(28±1)℃范围内。观察人工感染后中华绒螯蟹的病变情况。

2 结果

2.1 病蟹的基本症状

患颤抖病的中华绒螯蟹发病初期表现为行动迟缓, 摄食量减退, 对外界刺激的反应迟钝, 常爬到水面上呼吸; 病情严重时, 不吃食, 蟹的步足出现弯曲、无力及颤抖现象, 部分指节端变红, 其中有部分病蟹步足的长节与腕节之间肌肉病变、萎缩, 病蟹蟹足的握力明显减小; 打开病蟹腹甲后可见鳃丝略黑或呈不透明

收稿日期: 1998-12-22

水肿状,肝部呈现糜烂状尤以高温季节最为严重。三角膜呈现水肿,并造成脱壳困难。

2.2 病毒的电镜观察

提纯后的样品在电镜下可见大量球状病毒颗粒(图 1),该病毒颗粒直径 65 nm 左右,而健康蟹的对照样品中未检测出病毒粒子。经酶切试验该病毒核酸对 DNaseI 不敏感,变性后对 RNase 敏感,初步推断该病毒为 RNA 病毒

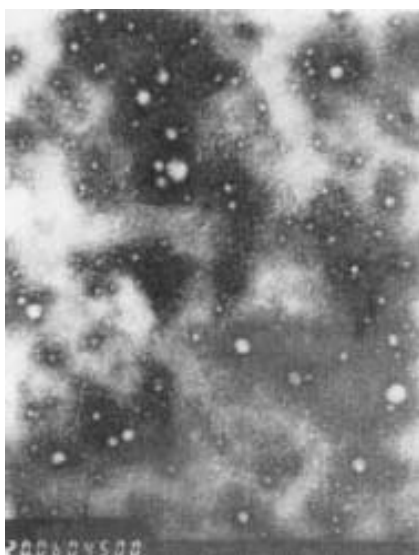


图 1 中华绒螯蟹球状病毒颗粒, $\times 40\ 000$

Fig.1 Spherical viruses in *E. sinensis*

经人工感染而发病的中华绒螯蟹,在蟹体上均分离、纯化

到病毒,而且病毒颗粒大小与上述测量结果相同,对照组没有分离到病毒。

2.3 人工感染试验结果

采用人工注射病蟹组织纯化液感染中华绒螯蟹的试验结果为:在第 1 周内中华绒螯蟹的摄食及活动情况与对照组无明显差异,从第 7 天开始出现病症,即出现病蟹食欲减退、行动迟缓、对外界刺激不敏感,病蟹的指节前端开始变红,肢体颤抖等情况,并有 1~2 只死亡。到第 9 天出现死亡高峰,死亡 5 只。到第 10 天全部死亡,对照组活动正常无死亡现象。

3 讨论

本研究从病蟹体上分离纯化的病毒,并经人工感染健康蟹,感染后的病症特点与自然条件下病症特点相同,发病的中华绒螯蟹均有明显的颤抖现象,而且人工感染的病蟹发病率达 100%,死亡率也为 100%,表明该病毒为中华绒螯蟹颤抖病的致病病原。

在人工感染试验中,前 7 天未见明显病症,说明该病毒在蟹体内有一段潜伏及隐性发病期。第 7 天后试验组均表现出不同程度的病症,并开始出现死亡现象,第 9 天达到死亡高峰。但在降低温度后病情又有所缓解,这说明该病毒对温度很敏感,这也可能是该病为什么在高温季节大量暴发流行的原因之一。

本试验因受电镜放大倍数、精度、统计测量误差和制片染色技术的影响,即使同一病毒颗粒在不同观察下,大小存在一定的差异。有关病毒的分析工作正在进行。

参 考 文 献

- 1 姜静颖,邢殿楼,等.池塘养殖中华绒螯蟹幼蟹的一种球状病毒粒子的电镜观察.大连水产学院学报,1996,11(1):51~53
- 2 严秀箕.虾池中中华绒螯蟹病毒的研究.水产科学,1995,14(3):14~15