

桡足类浮游动物细胞膜与白斑综合症病毒的结合研究

冯书营^{1,2,3}, 黄 捷¹, 张士瑾³

(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. 新乡医学院 微生物学与免疫学实验室, 河南 新乡 453003; 3. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要:通过差速离心法提取桡足类组织细胞膜, 依照本实验室确立的细胞膜与 WSSV 特异性的结合关系, 进行了桡足类细胞膜与白斑综合症病毒(WSSV)结合实验。结果表明, 桡足类细胞膜与 WSSV 之间存在着特异性的结合, 二者的结合说明了桡足类细胞膜上存在有 WSSV 的受体蛋白, 其为确定桡足类属于 WSSV 感染宿主提供了重要证据。同时, 比较了凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)细胞膜对桡足类细胞膜与 WSSV 结合的影响作用, 证实了凡纳滨对虾细胞膜对二者的结合具有明显的封闭作用, 侧面说明了 WSSV 在二者细胞膜上存在有相同的受体蛋白或结合位点。桡足类细胞膜经表面活性剂 Triton X-100 处理后, 与 WSSV 的结合活性没有受到影响, 而经 Tween-20 处理能显著提高与 WSSV 的结合活性, 提示受体蛋白在细胞膜上可能占有一段较小的跨膜区域。经 SDS-PAGE 分析确定了桡足类细胞膜由分子量为 18~207 kD 范围的约 33 条蛋白条带组成。

关键词:桡足类; 细胞膜; WSSV; 结合研究

中图分类号:S941 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)04-0458-07

白斑综合症病毒(WSSV)是一种对水产养虾业造成巨大损失的病原^[1-2], 其感染的对象也十分广泛。雷质文^[3]对 WSSV 的宿主调查表明, 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)及其他甲壳类动物均为该病毒的天然宿主, 并在不同组织细胞上呈一定的分布特异性。对于虾池中的桡足类浮游动物是否携带 WSSV, 不同研究者持不同意见。雷质文等^[3]采用斑点杂交技术在桡足类体内没有检测出 WSSV, 而宋晓玲等^[4]采用同样方法却检测出部分桡足类浮游动物呈阳性结果, 可以携带 WSSV。为此, 根据病毒与受体蛋白的特异性结合原理, 本实验进行了桡足类浮游动物细胞膜与 WSSV 的结合实验, 以便从细胞受体角度探讨桡足类浮游动物是否可能是 WSSV 的宿主提供证据。

目前, 白斑综合症病毒病原检测技术较为成熟^[5], 但针对其防治方面, 尚无有效的治疗方法, 因此确定和分离 WSSV 受体蛋白的研究具有重要意义。本实验室易志刚^[6]根据病毒与受体的特异性结

合的原理, 确立了对虾细胞膜与 WSSV 的结合关系, 解飞霞^[7]也对二者的结合进行了详细深入地研究, 查明了温度、pH 值、无机盐的浓度、表面活性剂、有机溶剂以及超声波等因素对对虾细胞膜与 WSSV 结合的影响作用。本实验进行了桡足类细胞膜与 WSSV 的结合研究, 同时比较了凡纳滨对虾细胞膜对上述结合作用的影响, 初步查明桡足类细胞膜与对虾细胞膜上的 WSSV 结合位点相似, 旨在查明和确定 WSSV 受体蛋白的类型和结构特点提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

桡足类浮游动物于 2003 年 9 月采集自山东省乳山市周戈对虾养殖场虾池, 采用 300 目浮游生物网于上午 10 点在固定池塘表层采集, 过滤搜集后立即 -20℃ 冰冻, 带回实验室为提取组织膜所用。同时, 带回少量活的浮游动物样品作形态学鉴定。

实验所用的凡纳滨对虾于 2003 年 9 月购自青岛

收稿日期:2004-06-08; 修订日期:2004-12-10。

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目课题(G1999012002); 国家自然科学基金课题(30271020); 青岛市自然科学基金课题资助(03-JZP-10)。

作者简介:冯书营(1978-), 男, 硕士, 从事海洋养殖病害防治。E-mail: fshy2001-007@163.com

通讯作者:黄 捷。Tel:0532-5823062。E-mail: HuangJie@YSFRI.ac.cn

南山水产品市场,数量40尾,体长8~10 cm,体重约15 g,实验室条件下暂养1周。用本实验室研制的对虾暴发性流行病原核酸探针点杂交试剂盒,对其进行WSSV的检测,确定实验用虾不携带WSSV。

实验所用进行提取WSSV的病料组织,采用人工感染致死的克氏原螯虾鳃组织作为病料进行病毒的提取^[8]。

1.2 方法

1.2.1 凡纳滨对虾鳃细胞膜和桡足类细胞膜的提取 细胞膜的提取方法采用差速离心法^[9],所有操作过程均保持4℃以下低温。分别取凡纳滨对虾鳃丝和桡足类于玻璃匀浆器中,加入适量冰冷的研磨液(250 mmol/L 蔗糖,10 mmol/L Hepes pH 7.4,1 mmol/L EDTA,0.1 mmol/L 苯甲基磺酰氟),在冰上研磨约5 min。研磨后3 000 r/min离心20 min,收集上清,沉淀重新研磨,重复该步骤,以去除大块组织及细胞碎片。收集所用上清于12 000 r/min离心20 min,去掉线粒体等细胞器,上清于40 000 r/min离心20 min,收集沉淀(沉淀即为细胞膜),按1 mL/支,分装 eppendorf 管于-75℃保存,取少量样品作电泳分析、电泳观察和蛋白含量测定。

1.2.2 WSSV 的提取 采用实验室常规的WSSV提取方法^[10-11],所有操作过程均保持4℃以下低温进行。其主要过程为:取20 g病料组织,加入等体积的20%蔗糖溶液在冰浴上进行匀浆,5 000 r/min(F34-6-38, Eppendorf Centrifuge 5810R)离心10 min,收集上清,沉淀重新匀浆并离心3次,合并所有上清,于8 000 r/min(F34-6-38)离心20 min,上清于24 000 r/min(P50AT2,日立70P-72)离心1 h,用20%蔗糖溶液重悬沉淀,铺于蔗糖梯度(35%、40%、46%、52%、59%和65%,质量分数)上方,26 000 r/min(P28S,日立70P-72)离心3 h,收集在管中的各区带,各条区带于25 000 r/min(P50AT2,日立70P-72)离心60 min,弃上清,用少量冷的dH₂O的重悬沉淀,每管1 mL分装后于-75℃保存,提纯后的病毒区带取少量样品作电泳观察和蛋白含量的测定。

1.2.3 WSSV 和桡足类细胞膜地高辛(DIG)标记前后蛋白含量的测定 采用Bradford法^[12]对二者样品进行蛋白含量测定,以牛血清白蛋白(BSA)作为参照标准。

1.2.4 桡足类细胞膜的SDS-PAGE分析 采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术^[13],15%分离胶,电压

70 V;5%的堆积胶,电压110 V。电泳完毕后考马斯亮蓝R-250染色,脱色后照相分析。

1.2.5 WSSV、桡足类细胞膜和BSA的DIG标记及其产量的测定 按DIG(Roche,批号1333054)与蛋白标记比例(0.327 mg DIG/1 mg 蛋白),称取DIG分别与桡足类细胞膜、BSA、WSSV在室温下孵育2 h,用G-25葡聚糖凝胶柱去除未标记上的游离DIG,收集DIG标记好的蛋白组分,按照DIG DNA Labeling and Detection Kit(Roche)产量测定方法测定DIG标记物的产量。

1.2.6 桡足类细胞膜与WSSV的结合分析 采用类似ELISA原理,将提取的桡足类细胞膜(质量浓度为0.165 mg/mL,每孔20 μL)包被96孔板,每孔加100 μL包被液,4℃包被过夜。用PBSM(即含有5%脱脂奶粉的PBS溶液,pH 7.4)加满各孔,室温下封闭3 h。甩干封闭液后,每孔加入100 μL PB-SM,同时加入PBSM稀释的DIG标记的WSSV(终质量浓度分别为0.12 mg/mL、0.6 mg/mL、1.2 mg/mL、1.8 mg/mL、2.4 mg/mL、3.0 mg/mL、3.6 mg/mL和4.2 mg/mL加入),补加PBSM使每孔达150 μL,设两组重复对照。同时,用DIG标记BSA代替DIG标记的WSSV作为阴性对照,只包被桡足类细胞膜没加入标记物的孔作为空白对照,在室温下结合2.5 h,使细胞膜和DIG标记物结合。用PBST(PBS,含2% Tween-20,pH 7.4)轻柔洗板2次,甩干溶液,每孔分别加入100 μL 1:2 000稀释的辣根过氧化物酶偶联的抗DIG抗体Fab片段(Roche,批号1207733),室温下孵育1.5 h。用PBST洗板2次,每孔加入100 μL底物溶液(含0.2 mol/L Na₂HPO₄,2.57 mL;0.1 mol/L 柠檬酸,2.43 mL;3% H₂O₂,15 μL;OPD,4 mg;dH₂O,5 mL),37℃暗处显色10~20 min,最后每孔加入50 μL 2 mol/L H₂SO₄溶液终止反应。用酶标仪(TECAN SAFIRE)测定492 nm处OD值,以695 nm作为参比。

1.2.7 未标记WSSV对桡足类细胞膜和DIG标记WSSV结合的封闭抑制实验 桡足类细胞膜与标记WSSV的特异性结合可通过未标记WSSV对二者的封闭抑制试验得到证实。其操作过程如1.2.6所述,不同之处在于包被了桡足类细胞膜的孔经过PBSM封闭后,先加入未标记WSSV(蛋白质量浓度2.14 mg/mL),各孔终质量浓度分别为1.07 mg/mL、4.28 mg/mL、10.7 mg/mL、21.4 mg/mL、27.82 mg/mL、

36.38 mg/mL、42.8 mg/mL 和 53.5 mg/mL 封闭 2 h, 然后每孔加入 DIG 标记 WSSV 进行结合(终质量浓度分别为 0.12 mg/mL、0.6 mg/mL、1.2 mg/mL、1.8 mg/mL、2.4 mg/mL、3.0 mg/mL、3.6 mg/mL 和 4.2 mg/mL 加入), 其余操作步骤与 1.2.6 相同。

1.2.8 凡纳滨对虾细胞膜对桡足类细胞膜与 WSSV 结合的竞争抑制性作用 用提取的 WSSV (蛋白质质量浓度 2.14 mg/mL, 每孔加 10 μ L) 补加 90 μ L 包被液, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。用 PBSM 封闭 3 h 后加入 DIG 标记的桡足类细胞膜, 另设一对照组即同时加入定量的凡纳滨对虾细胞膜(蛋白含量为 0.113 mg/mL, 每孔加入 15 μ L) 和 DIG 标记的桡足类细胞膜, 在室温下作用 3 h, 其余的操作过程与 1.2.6 所述相同。

1.2.9 表面活性剂(Tween 20 和 Triton X-100)对桡足类细胞膜与 WSSV 结合活性的影响 用非离子型表面活性剂 Tween 20 和 Triton X-100 室温下分别对 DIG 标记的桡足类细胞膜处理 2 h 后, 再进行与包被 WSSV 的结合实验, 操作过程如 1.2.8 所述。

2 结果与分析

2.1 桡足类浮游动物形态学鉴定

实验所用的桡足类浮游动物采集于固定水面区域, 样品形态均一, 个体大小一致, 体长约 3 mm, 依据浮游生物形态学对其进行鉴定^[14], 应属于太平洋纺锤水蚤(*Acartia pacifica*) (图版 I-1)。

2.2 凡纳滨对虾细胞膜与桡足类细胞膜的提取

用差速离心法提取凡纳滨对虾细胞膜和桡足类细胞膜, 经过负染后在电镜下可以看到, 细胞膜均呈均匀卷曲的膜状, 其中南美白对虾细胞膜大小较均匀, 细胞膜的含量适中(图版 I-2), 桡足类细胞膜较大并且含量较高(图版 I-3)。

2.3 桡足类细胞膜的 SDS-PAGE 分析

通过生物软件 Gel-Pro 对桡足类细胞膜的 SDS-PAGE 图谱(图版 I-4)分析得出, 桡足类细胞膜约由 33 条蛋白带组成, 其分子量分别为 207、186、171、153、140、119、97、87、83、78、67、63、56、53、48、43、42、40、39、38、36、35、34、33、31、29、27、25、22、20 和 18 kD, 其中特征性蛋白条带有 207、140、97、78、67、63、56、48、43、40、39、35、33、31、29、27、22 和 20 kD 等 18 条。

2.4 WSSV 的提取

WSSV 病料经超速离心提取后, 取离心管中的病毒区带进行电镜观察, 完整病毒区带主要位于 S2%

(质量分数)蔗糖密度梯度处, 电镜下显示完整病毒形态, 病毒带有完整的囊膜, 带有较短的尾巴(图版 I-5)。

2.5 地高辛标记产量的测定

完整的 WSSV 粒子、BSA 和桡足类细胞膜经过 DIG 标记后, 采用 DIG 标记试剂盒的产量测定方法对三者进行 DIG 的标记产量测定, 测得结果分别如下: DIG 标记的 WSSV 产量为 1 ng/ μ L, DIG 标记的 BSA 和桡足类细胞膜产量为 10 ng/ μ L 和 20 ng/ μ L。

2.6 WSSV 和桡足类细胞膜 DIG 标记前后的蛋白含量测定

取少量的上述样品经 Bradford 法测定后, 以已知的 BSA 浓度作标准曲线, 测得提取的 WSSV 和桡足类细胞膜的蛋白含量分别为 2.09 mg/mL 和 2.14 mg/mL, WSSV 和桡足类细胞膜经过 DIG 标记后, 通过 G-50 葡聚糖凝胶柱去除没有标记上的多余 DIG, 收集标记好病毒和细胞膜, 二者的蛋白含量分别为 0.47 mg/mL 和 0.658 mg/mL。

2.7 DIG 标记的 WSSV 与桡足类细胞膜结合分析

用 DIG 标记的 WSSV 与酶标板上包被的桡足类细胞膜进行结合实验, 同时以 DIG 标记的 BSA 和包被细胞膜的结合作为阴性对照, 没有加入标记物而只有包被的细胞膜作为空白对照(图 1)。空白对照(A)和阴性对照(B)均没有显示出结合, 二者的结合曲线平缓, 基本没有变化, 只有 DIG 标记的 WSSV 与桡足类细胞膜显示出明显的结合, 曲线(C)随着加入 DIG 标记的 WSSV 量的增高而逐渐升高, 说明二者之间存在着特异性的结合。

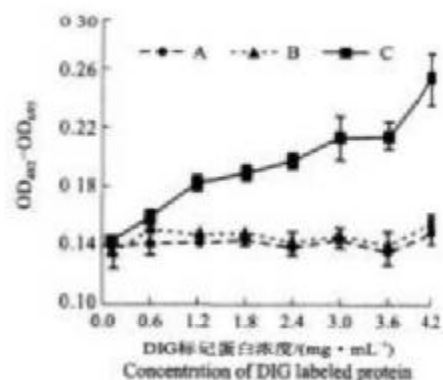


图 1 DIG 标记的 WSSV 与桡足类细胞膜的特异性结合

A: 空白对照; B: 阴性对照; C: DIG 标记液

Fig. 1 Specific binding between cell membrane of the copepoda and DIG labeled WSSV

A: Blank control; B: Negative control; C: Solution with DIG labeled protein

2.8 未标记的 WSSV 对 DIG 标记的 WSSV 与桡足类细胞膜结合的封闭抑制实验

DIG 标记的 WSSV 与桡足类细胞膜的特异性的结合也可以由未标记的 WSSV 对二者的竞争封闭抑制实验加以证实,得到了一致的结果(图 2)。空白对照(A)和阴性对照(B)均没有结合;DIG 标记的 WSSV 与桡足类细胞膜的结合非常明显,曲线(C)随着加入标记物量的增加而升高;先加入未标记的 WSSV 封闭 2 h,标记病毒与桡足类细胞膜的结合(D)曲线呈下降趋势,可以说明未标记病毒对标记病毒和桡足类细胞膜的结合具有封闭作用,该封闭作用的存在说明了桡足类细胞膜与 WSSV 之间的结合属于特异性的结合。

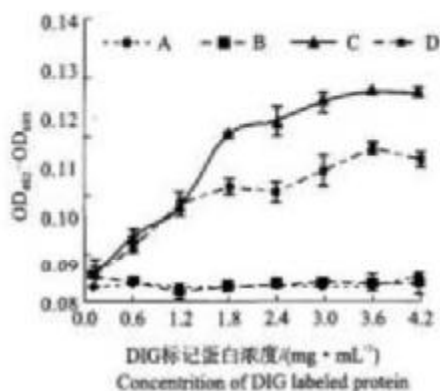


图2 未标记 WSSV 对桡足类细胞膜与 DIG 标记 WSSV 结合的竞争抑制实验

A:空白对照; B:阴性对照; C: DIG 标记液

Fig. 2 Unlabeled WSSV competitive assay to binding of cell membrane of copepoda and DIG-Labeled WSSV

A: Blank control; B: Negative control; C: Solution DIG labeled protein

2.9 凡纳滨对虾细胞膜对地离辛标记的 WSSV 与桡足类细胞膜结合的封闭作用

通过凡纳滨对虾细胞膜对桡足类细胞膜与 WSSV 二者结合的影响作用分析(图 3),空白对照(A)和阴性对照(B)均没有显示出结合, DIG 标记的桡足类细胞膜与 WSSV 的结合非常明显,曲线(C)随着加入标记桡足类细胞膜量的增加而逐渐升高;同时在加入凡纳滨对虾细胞膜和桡足类细胞膜的比较组中, WSSV 与桡足类细胞膜的结合曲线较低(D),二者结合活性的降低说明凡纳滨对虾细胞膜对桡足类细胞膜与 WSSV 的结合具有较明显的封闭作用。

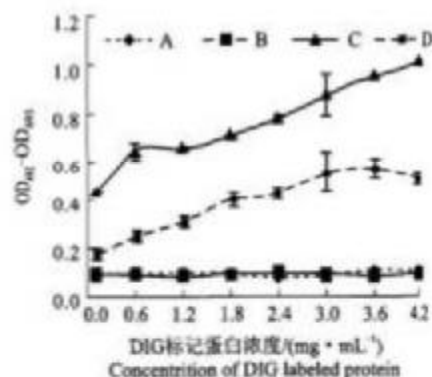


图3 南美白对虾鳃细胞膜对桡足类细胞膜与 WSSV 结合的封闭作用

A:空白对照; B:阴性对照; C: DIG 标记液; D:结合曲线

Fig. 3 Shrimp gill cell membrane restrain to the binding between cell membrane of copepoda and WSSV

A: Blank control; B: Negative control; C: Solution with DIG labeled protein; D: Binding curve

2.10 表面活性剂(Triton X-100 和 Tween 20)对桡足类细胞膜和 WSSV 结合活性的影响

用非离子型表面活性剂 Triton X-100 和 Tween 20 对桡足类细胞膜事先进行 2 h 处理后,与包被的 WSSV 进行结合分析,其结果从图 4 可以看出,空白对照(A)和阴性对照(B)均没有显示出结合, DIG 标记的桡足类细胞膜与 WSSV 之间产生了明显的结合,其曲线(C)随着加入标记细胞膜量的增加而逐渐升高,经过 Triton X-100 处理后的桡足类细胞膜与 WSSV 的结合没有显著的变化,其结合曲线(E)与曲线(C)相似,说明 Triton X-100 对桡足类细胞膜与 WSSV 的结合基本上没有影响,而 Tween 20 对二者的结合有明显的增强作用,其结合曲线(D)显著地高于曲线(C)。

3 讨论

到目前为止, WSSV 在宿主上结合位点还不清楚,受体蛋白还没有得到分离与纯化。易志刚^[4]在确立对虾细胞膜与 WSSV 特异性结合关系中,证明了对虾细胞膜与 WSSV 之间存在着特异性的结合。依照同样的方法原理,本研究采用 DIG 标记 WSSV 分析了 WSSV 与桡足类细胞膜的结合作用。通过标记的病毒与桡足类细胞膜的特异性结合实验和未标记 WSSV 的竞争抑制实验说明二者之间存在着特异性结合,这表明桡足类细胞膜上存在有

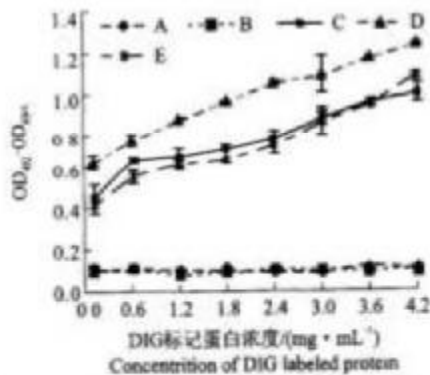


图4 表面活性剂(Triton X-100和Tween-20)对桡足类细胞膜与WSSV结合的影响

A:空白对照; B:阴性对照; C: DIG标记液; D:结合曲线

Fig.4 Effects of triton X-100 and Tween-20 on the binding of cell membrane of copepod and WSSV

A: Blank control; B: Negative control; C: Solution with DIG labeled protein; D: Binding curve

WSSV的受体蛋白,说明桡足类浮游动物属于该病毒的感染宿主,该结果与其他研究者的结论一致,如宋晓玲^[4]等采用斑点杂交法检测出部分桡足类浮游动物呈阳性结果,可以携带WSSV;Lo^[15]用PCR法在桡足类体内检出了WSSV;黄健^[16]采用单克隆抗体酶联免疫技术检测到桡足类浮游生物呈阳性结果,并且其带毒率高于对虾,可能是对虾暴发该流行病的主要病原;何建国等^[17]和刘萍等^[18]也持相同观点,认为桡足类是对虾白斑病毒的中间宿主。桡足类属于WSSV宿主范围的确定为进一步了解桡足类在该病毒病的发病和流行中所起的作用提供了新的证据。

不同病毒在不同宿主或同一宿主上存在的受体类型不尽相同,对虾细胞膜能与WSSV产生特异性的结合,桡足类细胞膜也能与WSSV产生特异性的结合,但就WSSV在二者细胞膜上的受体蛋白的类型和结构特点还不清楚,为此,本实验查明了凡纳滨对虾细胞膜对WSSV与桡足类细胞膜结合的影响,结果显示,凡纳滨对虾细胞膜对WSSV与桡足类细胞膜结合具有明显的封闭作用,该封闭作用的存在初步说明二者细胞膜上存在有WSSV相同的结合位点或受体蛋白,该结果为WSSV受体蛋白的鉴定与分离工作提供了线索,缩小了受体蛋白的鉴定与分离的范围。

同时,本实验进行了表面活性剂(Triton X-100

和Tween 20)对桡足类细胞膜与WSSV结合影响的分析。其结果表明,Triton X-100对桡足类细胞膜与WSSV的结合没有什么影响,而Tween 20对桡足类细胞膜与WSSV的结合具有明显的提高效应。根据表面活性剂对受体蛋白的作用特点,可以初步说明在桡足类细胞膜上存在的WSSV受体蛋白占有较小的一段区域,为查明和确定该病毒受体蛋白的类型和结构特点提供了理论基础。

参考文献:

- [1] 黄健,宋晓玲,于佳,等.杆状病毒性的皮下及造血组织坏死——对虾暴发性流行的病原学和病理学[J].海洋水产研究,1995,16(1):1-10.
- [2] Mohan C V, Corsin F, Thakur P C, et al. Usefulness of dead shrimp specimens in studying the epidemiology of white spot syndrome virus (WSSV) and chronic bacterial infection[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2002, 50: 1-8.
- [3] 雷质文,黄健,史成银,等.白斑综合症病毒(WSSV)的宿主调查[J].海洋与湖沼,2002,33(3):250-258.
- [4] 宋晓玲,史成银,黄健,等.用DNA斑点杂交法检测对虾及其饲料和环境生物携带白斑综合症病毒状况的调查[J].中国水产科学,2001,8(4):36-40.
- [5] 雷质文,黄健,寇运同,等.白斑综合症病毒(WSSV)实验室检测技术[J].海洋通报,2002,2:52-56.
- [6] 葛志刚,黄健,解飞霞,等.对虾白斑综合症病毒与对虾细胞膜特异性结合关系的确立[J].中国病毒学,2003,18(3):295-297.
- [7] 解飞霞.对虾白斑综合症病毒(WSSV)囊膜蛋白vp28与对虾细胞膜蛋白的分离和结合活性分析[D].青岛:中国海洋大学,2003.
- [8] 魏静,陆承平,黄健,等.用对虾的致死病毒人工感染克氏原螯虾[J].南京农业大学学报,1998,21(4):78-82.
- [9] 马歇尔 D R, 门永 J T, 布格斯 R R, 等.朱厚础,等译.蛋白质纯化与鉴定实验指南[M].北京:科学出版社,1999.198-199.
- [10] 黄健,于佳,宋晓玲,等.对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒的精细结构、核酸、多肽及血清学研究[J].海洋水产研究,1995,16(1):11-23.
- [11] 汪岷,包振民,邵晓钧,等.中国对虾(Penaeus chinensis)的白斑综合症病毒(WSSV)的提纯和核酸提取[J].青岛海洋大学学报,1999,29(3):479-482.
- [12] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2002.42-47.
- [13] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2000.77-100.
- [14] 厦门水产学院.海洋浮游生物学[M].北京:中国农业出版社,1979.99-101.
- [15] Lo C F, Ho C H, Peng S E, et al. White spot syndrome baculovirus detect in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1996, 17: 215-225.

- [16] 黄 健,于 佳,王寿华,等. 单克隆抗体酶联免疫技术检测对虾皮下及造血组织坏死病的病原及其传播途径[J]. 海洋水产研究,1995,16(1):40-50.
- [17] 何建国,莫 强. 对虾白斑综合症病毒暴发流行与传播途径、气候和水体理化因子的关系及其控制措施[J]. 中国水产,1999(7):34-41.
- [18] 刘 萍,孔 杰,孟宪红,等. 白斑综合症病毒(WSSV)在对虾养殖过程中传播途径的调查[J]. 海洋水产研究,2000,21(3):9-12.

Binding research between cell membrane of copepod and WSSV

FENG Shu-ying^{1,2,3}, HUANG Jie¹, ZHANG Shi-cui³

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources Ministry of Agriculture, Qingdao 266071, China; 2. Microbiology and Immunology Laboratory of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China; 3. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Infection host of White Spot Syndrome Virus (WSSV) is very widely, such as *Litopenaeus vannamei*, *Procambarus clarkii* and *Marsupenaeus japonicus*, etc., but whether copepod belongs to the infection host above is still controversial. This paper focuses on investigating this debate through binding study between WSSV and cell membrane of copepod, which not only offers the evidence that copepod is of the infection host of WSSV, but also is quite valuable to further cognize the receptor of WSSV. Cell membrane from copepod was obtained through centrifugation and then was binded to the WSSV resorted to the specific binding relation which our Lab established between WSSV and cell membrane. The assay results showed that WSSV and cell membrane of copepod had a specific binding, this binding indicated receptor of WSSV on the cell membrane of copepod, it was a important proof to point that copepod belongs to the hosts of WSSV infection. This experiment also compared the influence of gill cell membrane of shrimp to the binding between WSSV and cell membrane of copepod and found that shrimp gill cell membrane had a distinctly close rolling to their binding. To some extent, this result proved that gill cell membrane of shrimp and copepod had the same WSSV binding location or receptor. Cell membrane of copepod was treated by triton X-100 and Tween 20 and then binded to WSSV, Tween 20 can enhance their binding but Triton X-100 can not. Cell membrane of copepod consist of 33 bands which MW range from 18 kD to 207 kD by SDS-PAGE analysis.

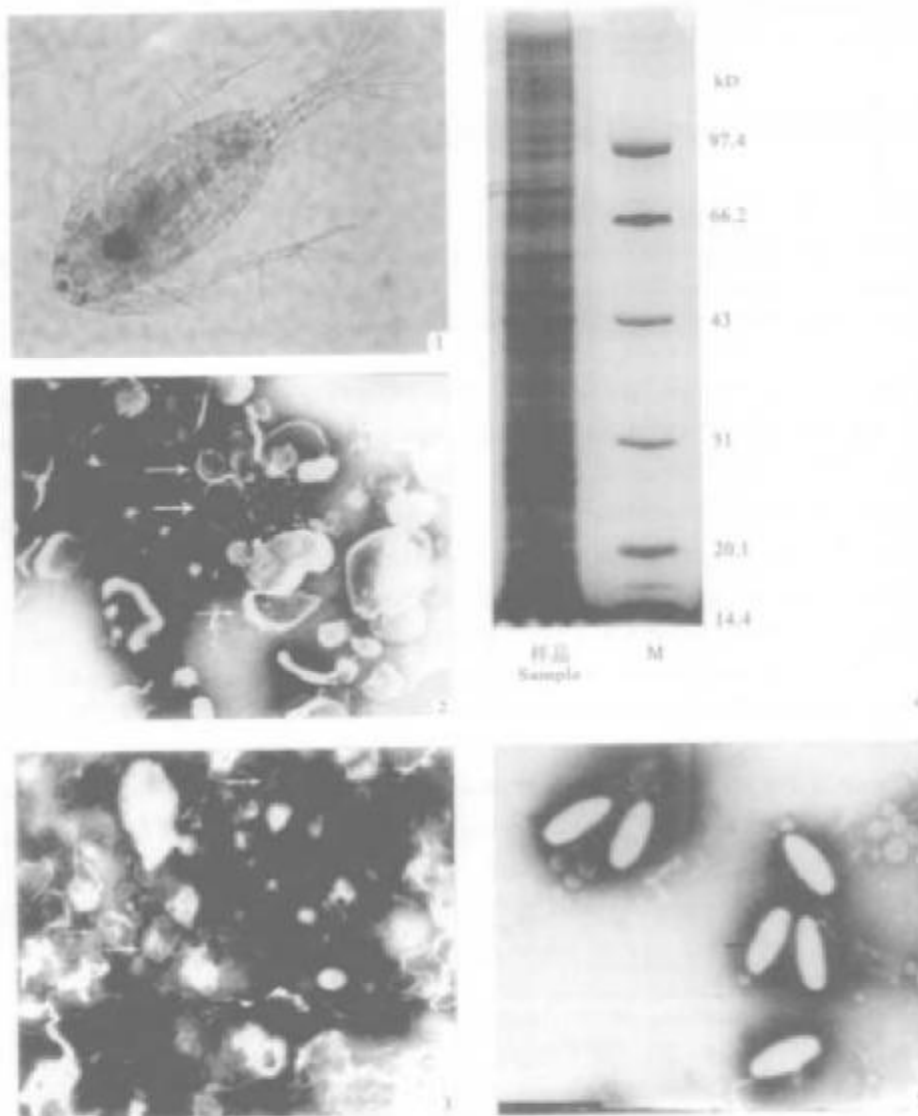
Key words: copepod; cell membrane; WSSV; binding

Corresponding author: HUANG Jie. Tel: 0532-5823062. E-mail: aqadis2000@ysfri.ac.cn

This study was supported by Major State Basic Research Development Program (G1999012002), National Nature Science Foundation of China (30271020) and Nature Science Foundation of Qingdao (03-2-JZP-10).

冯书营等:桡足类浮游动物细胞膜与白斑综合症病毒的结合研究

FENG Shu-Ying et al: Binding research between cell membrane of copepod and WSSV



图版 I

1:桡足类形态, ×10. 2:南美白对虾鳃膜(↑), ×60 000. 3:桡足类细胞膜(↑), ×60 000. 4:桡足类细胞膜的 SDS-PAGE 图谱. 5:完整的 WSSV (↑)形态, ×60 000.

Plate I

1:Micrograph of copepod, ×10. 2:Gill cell membrane of copepod, ×60 000. 3:Cell membrane of copepod, ×60 000. 4:SDS-PAGE map of cell membrane of copepod. 5:Micrograph of intact WSSV, ×60 000.