

刺参一种囊膜病毒的分离及其超微结构观察

王品虹^{1,3}, 常亚青², 徐高蓉², 宋林生¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 大连水产学院 农业部海洋水产增养殖学与生物技术重点开放实验室, 辽宁 大连 116023; 3. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要:利用电镜负染技术检测发病的养殖刺参 [*Apostichopus japonicus* (Selenka)] 组织提取液。观察发现, 提取液中存在大量病毒样粒子, 该病毒粒子近似球形, 具有囊膜。囊膜内可见高电子密度的核心结构。完整的病毒粒子直径为 80~100 nm, 囊膜厚 6~10 nm, 核心结构直径 35~45 nm, 呈六边形。应用超薄切片技术对刺参的触手顶部、触手臂、疣足、呼吸树、背肠血管、肠等组织的病毒感染状况进行观察, 发现该种病毒粒子大量存在于所检测各组织内。感染细胞超微结构表现为大量细胞器崩解形成空泡结构, 并出现“髓样”结构等病理变化。根据观测结果, 该病毒是一种无包膜体病毒。

关键词:刺参; 囊膜病毒; 超微结构

中图分类号: S947 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2005)06-0766-06

刺参 [*Apostichopus japonicus* (Selenka)] 是中国北方海水养殖的重要经济种类, 目前已成为中国北方海洋经济的支柱性产业之一^[1]。但随着养殖规模的不断扩大, 刺参病害问题日趋严重。目前, 国内关于刺参的繁殖生物学^[2]、人工育苗^[3]、池塘养殖等方面的研究已有较多报道^[4], 关于刺参病害的研究却鲜有详细报道。2003年和2004年刺参越冬前期, 山东和辽宁沿海刺参出现大规模死亡现象, 极大地威胁着该地区这一产业的可持续发展。因此, 围绕刺参大规模死亡的致病因子及病原学的探讨已引起养殖界各方的高度关注。2004年开始, 本课题组对辽宁省内主要刺参养殖海区开展了系统的病原学和流行病学调查。通过刺参组织超薄切片的电镜观察, 在病害高发期的刺参体内发现了一种具有囊膜的病毒样颗粒。

1 材料与方 法

1.1 材料

具典型发病症状的刺参(体长 3~7 cm)60 头, 于 2005 年 3 月分别取自大连黄海和渤海沿岸 5 家刺参育苗场。

1.2 病毒的分离

1.2.1 缓冲液的制备 取养殖海区砂滤海水,

0.22 μm 滤膜过滤, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待用。

1.2.2 材料的处理 取刺参内脏(包括呼吸树、肠、胃及血管)加入 8 倍体积的过滤海水缓冲液(pH 7.8), 以 FHX-1 型高速分散器 4 000 r/min 冰浴研磨匀浆。

1.2.3 差速离心 将上述组织匀浆液于 4 $^{\circ}\text{C}$, 250 g 离心 30 min; 上清液经 1 000 g 离心 30 min; 取上清液经 4 000 g 离心 30 min, 弃沉淀, 并于所得上清液管底铺入 25% 蔗糖垫, 4 $^{\circ}\text{C}$ 200 000 g 离心 150 min, 弃上清, 以 25% 蔗糖溶液重悬沉淀物, 即病毒粗提液。

1.3 病毒提纯液的负染观察

取病毒粗提液, 滴加在载玻片上, 将覆有 Formavar 碳膜的铜网反扣在病毒悬液上, 5 min 后, 取下铜网, 晾干。滴加 2% 的磷钨酸负染 5 min, 用滤纸吸去多余的染液, 室温风干, 于 JEM-1200EX 电镜下观察并摄影。

1.4 超薄切片的制作

取具典型发病症状刺参的触手顶部、触手臂、疣足、呼吸树、背肠血管、肠^[1], 切成 1 mm³, 用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定, 系列乙醇脱水, Epon812 渗透包埋, Ultratome-E 型超薄切片机制片, 经醋酸铀和柠檬酸铅双染色后, 于 JEM-1200EX 电镜下观察并摄影。

收稿日期: 2005-03-31; 修订日期: 2005-06-09.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30200212); 大连市重点科技攻关项目资助(2003B1NS281, 2004B1NC030).

作者简介: 王品虹(1979-), 女, 博士研究生; 研究方向: 海洋生物技术.

通讯作者: 常亚青. E-mail: yqchang@dlhu.edu.cn

2 结果与分析

2.1 患病刺参的临床症状

调查发现该病仅在刺参越冬期发生,患病刺参外观症状主要表现为表皮大量溃烂,表面黏液增多,对外界刺激反应迟钝。溃烂通常从口围部开始,迅速扩散到全身。触手臂以及围口部肿胀以至无法完全收回触手,并形成“肿嘴”现象。发病期间经常伴有“吐肠”现象,严重时刺参体壁变形,骨片散落,逐渐融化成鼻涕状胶体,最后其躯体全部化掉。大连地区发病高峰在2月初到3月初,刺参如出现上述症状7d内,死亡率达90%以上。

2.2 病毒样粒子的检测和负染观察

电镜下观察均发现所取刺参样品具有囊膜的病毒样颗粒存在。

病毒粗提液经负染后观察,可见大量病毒粒子存在。该病毒粒子近似球形,具有囊膜,囊膜表面光滑,未见突起结构。囊膜内可见高电子密度的核心结构(图1白色箭头所示),核心结构表面有放射状的一类突起结构(图1黑箭头所示)。完整的病毒粒子直径为80~100 nm,囊膜厚6~10 nm,核心结构直径为35~45 nm。

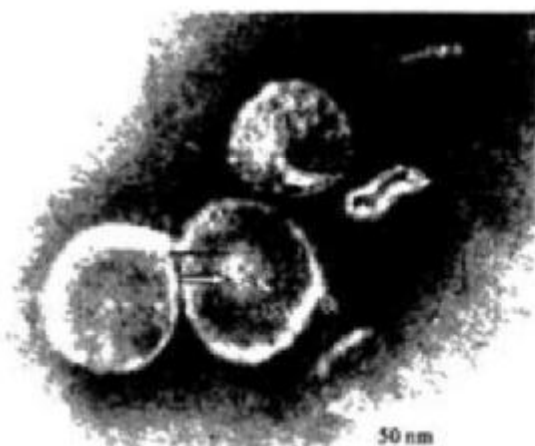


图1 刺参组织中的病毒粒子及其内部结构
Fig. 1 Virions in tissues of *Apostichopus japonicus* and the structures inside virions

2.3 刺参组织超薄切片的电镜观察

刺参组织超薄切片的电镜显示,在触手、触手臂、疣足、呼吸树、背肠血管、肠组织内均发现了病毒样颗粒,其中以触手臂组织内的分布最为集中,推测触手臂为该种病毒感染刺参的靶器官。

超薄切片电镜观察,完整的病毒粒子结构与负染观察结果一致,但同时可见大量的病毒核心结构散落或团聚在细胞质内。病毒核心结构呈明显的六边形,并具有紧密的双层膜包被。有时可见核心结构表面有突起伸向囊膜内部(图版I-5),推测此突起为引导包裹衣壳的蛋白成分。

成熟的病毒粒子以散落和团聚的方式存在于细胞质中,核内未见分布。在病变细胞的细胞质内,大量病毒粒子被一层质膜所包被起来,质膜内未见特定晶格排列的蛋白基质,仅见核心结构。在切片观察中未发现病毒包涵体存在。

病毒粒子在各组织内的分布及造成的细胞病理变化见图版I和图版II。

在被病毒感染发生病变的细胞内,可见细胞器崩解后形成的大量空泡结构,并能观察到内质网肿胀,网膜断裂,界限模糊,而且内质网周围可见散落着的大量病毒核心结构,同时在病毒感染细胞周围还可见线粒体解体变异而形成的“髓样”异常结构。

3 讨论

3.1 病毒粒子的检测

迄今,国内外关于水产动物体内寄生病毒方面的研究已有大量报道^[5],但还没有关于棘皮动物体内寄生病毒的报道。

目前,病毒的检测主要依靠电镜负染观察,但是病毒粒子浓度达到 10^5 ind/mL^[6]才能检测到,所以能否检测到病毒与取材直接相关。本研究初期,仅取病参溃烂组织电镜负染检测,未发现病毒样粒子;后将病参不分组织全部匀浆,电镜负染检测可发现大量的病毒粒子。推测溃烂部的细胞已经大部分为死亡细胞,病毒粒子寄生量很小,所以检测不到。故对于病毒的检测应该选取多个组织,不能只对病变部位进行研究。

3.2 病毒粒子感染细胞

刺参组织超薄切片电镜观察表明,在病变细胞质区域,病毒粒子以团聚的方式聚集形成“簇”,病毒簇由质膜包被形成有别于胞质细胞器的囊泡样结构,其内分布有大量装配好的有囊膜的病毒粒子,六角形的核心结构。由此断定,病毒的发生基质应是在细胞质中,在大多数无脊椎动物病毒中,特别是某些昆虫病毒所形成的包涵体,在电镜下是一些具备蛋白质结晶性质的有形实体,其中包被装配完整的

病毒粒子。而刺参体内观察到的是包被着大量病毒粒子和核心结构的囊泡样结构,并无晶格方式排列的蛋白质基质。因此,此种病毒是一种无包涵体的病毒。

观察中发现,高尔基体活动旺盛,大量高尔基小泡散落在周围,推测该病毒粒子的发生和装配与高尔基体有关(图版 I-6)。同时,在病毒感染细胞中还可可见大量溶酶体残余变异而形成的“髓样”异常结构(图版 I-1 和图版 II-5)。感染细胞的细胞核形态正常,核质均一,核内未发现病毒亚单位结构以及明显的病变现象。

3.3 关于病毒的分类地位

水产动物的病毒研究始于 20 世纪 50 年代,迄今已报道的主要有感染鱼类的虹彩病毒和弹状病毒^[7]、感染贝类的疱疹病毒和乳多孔病毒^[8],以及感染对虾的 WSSV 病毒等^[9]。与上述病毒相比较,仅凭形态学的观察、病毒感染的靶组织还难以确定刺参体内病毒的分类地位^[10],有关基本特性如病毒核酸特性、病毒蛋白结构多肽、病毒复制过程等尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 常亚青,丁 君,宋 坚,等.海参、海胆的生物学研究与养殖[M].北京:海洋出版社,2004.113.
- [2] 廖玉麟.中国动物志 棘皮动物门 海参纲[M].北京:科学出版社,1997.39-47.
- [3] 隋福林.海参增殖瓶[M].北京:中国农业出版社,1990.107-153.
- [4] Chang Yaqing, Yu Changqing, Song Xin. Pond culture of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*, in Dalian[A]. Advances in sea cucumber aquaculture and management[C]. FAO Fisheries Technical Paper, 2004(463):269-272.
- [5] 相建海.海水养殖生物病害发生与控制[M].北京:海洋出版社,2001.2.19.
- [6] 林树安,高锦荣,洪 健,等.实用生物电子显微术[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,1989.69.
- [7] 孟庆星,俞开康,战文斌,等.海水养殖动物病毒学[M].北京:中国农业出版社,1996.54-59.
- [8] 王黎明,王秀华,宋晓玲,等.稚孔扇贝一种球形病毒的分离纯化及其超微结构观察[J].水产学报,2002,26(2):180-184.
- [9] 李 霞,刘淑范,李 华,等.大连地区中国对虾爆发流行病病理学研究[J].中国水产科学,1997,4(1):52-59.
- [10] 殷 磊,刘秋华.动物病毒学[M].北京:科学出版社,1997.37-47.

Isolation and ultrastructure of an enveloped virus in cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka)

WANG Pin-hong^{1,3}, CHANG Ya-qing², XU Gao-rong², SONG Lin-sheng¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Key Laboratory of Mariculture and Biotechnology, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China; 3. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

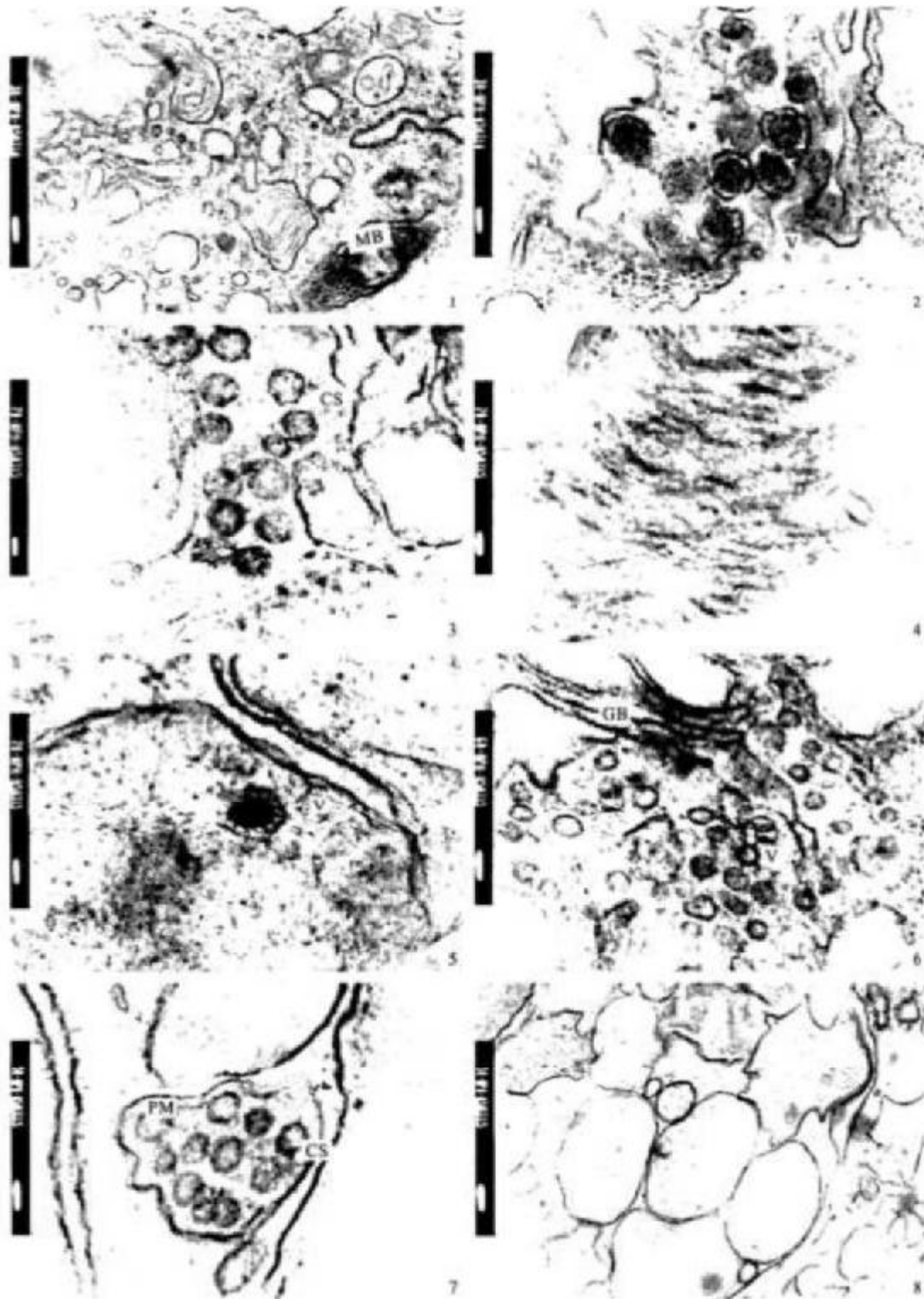
Abstract: The sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka), can be found along the Korean Peninsula, Japan, the eastern shores of Russia and the northern coast of China. It is a favorite seafood in these areas, especially in China. Researches on its aquaculture began in the middle of the 1980s. Great progress was made in the breeding and larval rearing of *Apostichopus japonicus* (Selenka), which promoted rapid development of the aquaculture industry in Dalian, Yantai, Weihai and Qingdao. However, with the expansion of aquaculture, more diseases occurred. From 2003 to 2004, an investigation on epidemiology of *Apostichopus japonicus* (Selenka) was performed. Electron microscopic examinations on homogenate fluid of *Apostichopus japonicus* (Selenka) revealed the presence of mass enveloped virus-like particles. The virions are approximately 80 to 100 nm in diameter and have a smooth envelope without any spikes, while the hexagon core structures are 35 to 45 nm, which are probably icositrahedron. Examination of ultrathin sections shows that the virions exist in many tissues of sea cucumber *Apostichopus japonicus*, such as tentacle, blood vessel, respiratory tree, papillate podium, of intestine and tentacle arm. Changes of ultrastructures in cells find expression in that many bubble structures and myline figures appear.

Key words: *Apostichopus japonicus*; enveloped virus; ultrastructure

Corresponding author: CHANG Ya-qing. E-mail: yqchang@dlfu.edu.cn

王品虹等:刺参一种囊膜病毒的分离及其超微结构观察

WANG Pin-hong et al: Isolation and ultrastructure of an enveloped virus in cultured sea cucumber
Apostichopus japonicus (Selenka)

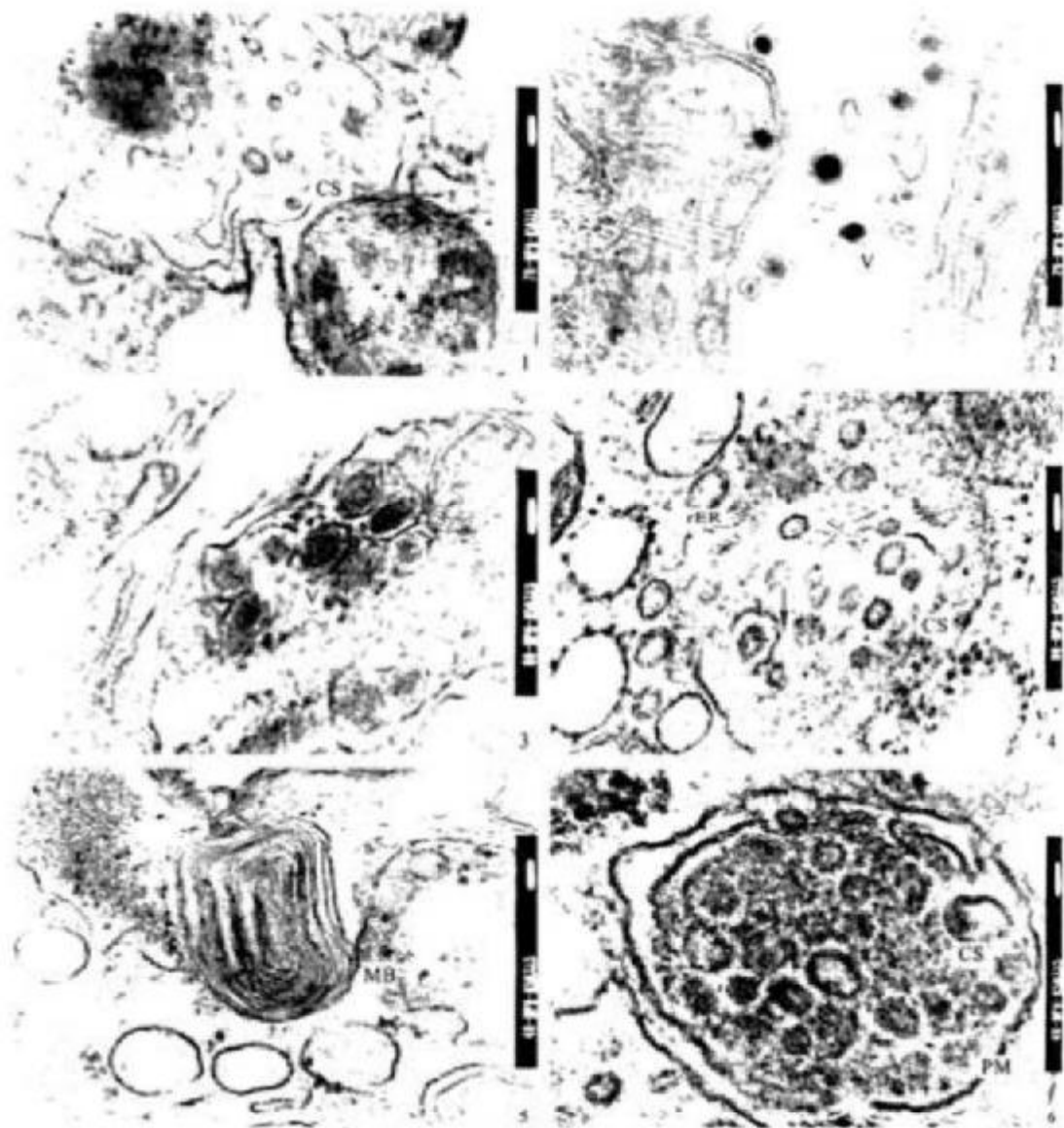


图版 I Plate I

(图版说明见 P771 Explanation of Plate I at page 771)

王品虹等:刺参一种囊膜病毒的分离及其超微结构观察

WANG Pin-hong et al: Isolation and ultrastructure of an enveloped virus in cultured sea cucumber
Apostichopus japonicus (Selenka)



图版 I Plate I

(图版说明见 P771 Explanation of Plate I at page 771)

图版 I 说明

- 1: 触手组织细胞中的髓样小体和大量细胞器崩解形成空泡结构(标尺为 200 nm)。
- 2: 触手组织细胞中的质膜包裹的成熟的病毒粒子(标尺为 100 nm)。
- 3: 背肠血管组织细胞中散落的病毒核心结构(标尺为 50 nm)。
- 4: 背肠血管组织细胞中排列已发生紊乱的纤维结构(标尺为 100 nm)。
- 5: 呼吸树组织细胞中正在装配的病毒粒子(标尺为 50 nm)。
- 6: 呼吸树组织细胞中高尔基体及其周围散落大量的高尔基小泡(标尺为 100 nm)。
- 7: 疣足组织细胞中质膜包裹的病毒核心结构(标尺为 50 nm)。
- 8: 疣足组织细胞中细胞质内形成大量的空泡结构(标尺为 200 nm)。

图版 II 说明

- 1: 背肠血管组织细胞中质膜包裹的团聚的病毒粒子(标尺为 100 nm)。
 - 2: 背肠血管组织细胞中散乱分布的成熟的病毒粒子(标尺为 200 nm)。
 - 3: 肠组织细胞中的成熟病毒粒子(标尺为 100 nm)。
 - 4: 肠组织细胞中病毒粒子的核心结构以及正在包被囊膜的病毒粒子(黑色箭头所示)(标尺为 100 nm)。
 - 5: 触手臂组织细胞胞质内形成的空泡和典型的髓样小体(标尺为 100 nm)。
 - 6: 触手臂组织细胞中质膜包裹的大量病毒核心结构(标尺为 50 nm)。
- CS- 核心结构; GB- 高尔基体; MB- 髓样小体; Mi- 线粒体; PM- 质膜; rER- 粗面内质网; V- 病毒。

Explanation of Plate I

- 1: Myeloid body and mass vacuole structures in cells of tentacle(Bar = 200 nm).
- 2: Mature virus with plasma membrane enveloped in cells of tentacle(Bar = 100 nm).
- 3: Core structures of virus scattered in cells of blood vessel(Bar = 50 nm).
- 4: Disordered fiber structures in cells of blood vessel. (Bar = 100 nm).
- 5: A virion being assembled in cells of respiratory tree(Bar = 50 nm).
- 6: Golgi body and mass Golgi bubbles in cells of respiratory tree(Bar = 100 nm).
- 7: Mature virus with plasma membrane enveloped in cells of papillate podium(Bar = 50 nm).
- 8: Mass vacuole structures in cells of papillate podium(Bar = 200 nm).

Explanation of Plate II

- 1: Clustered virus coated by plasma membrane in cells of blood vessel(Bar = 100 nm).
 - 2: Mature virus scattered in cells of blood vessel(Bar = 200 nm).
 - 3: Mature virus with membrane in cells of intestines(Bar = 100 nm).
 - 4: Core structures of virus and virus being enveloped (shown by black arrow)(Bar = 100 nm).
 - 5: Myeloid body and mass vacuole structures in cells of tentacle arm(Bar = 100 nm).
 - 6: Mass core structures of virus with plasma membrane coated in cells of tentacle arm(Bar = 50 nm).
- CS- Core structure; GB- Golgi body; MB- Myeloid body; Mi- Mitochondrion; PM- Plasma membrane; rER- Rough endoplasmic reticulum; V- Virus.