

罗氏沼虾苗种肌肉白浊病诺达病毒的分离和特性研究

钱冬¹, 石正丽², 曹铮¹, 刘问¹, 张叔勇², Bonami J R³

(1. 浙江省淡水水产研究所, 浙江 湖州 313001;

2. 中国科学院武汉病毒研究所无脊椎动物病毒学联合开放实验室, 湖北 武汉 430071;

3. UMR 5098, DRIM, CNRS/IFREMER/UM2, cc-80, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France)

摘要:本实验在以往罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)苗种肌肉白浊病病毒致病性的基础上对病毒特性进行深入研究。病虾除菌过滤液以1:50和1:250浸泡感染可复制出典型的症状,病毒对氯仿抵抗;用PEG法浓缩病毒后,35 000 r/min超速离心部分纯化病毒,在电镜下可观察到大量直径24 nm的球形病毒颗粒,无囊膜,此外还观察到大小为14 nm的病毒粒子;采用Trizol试剂对病毒进行了核酸提取,电泳结果发现有4条核酸条带,分别为3.0 kb、1.3 kb、0.8 kb、0.75 kb,对RNA核酸酶、S1核酸酶敏感,对DNA酶抵抗,为单链RNA病毒。用罗氏沼虾诺达病毒核酸探针进行分子杂交,探针可与提纯核酸及病虾样品匀浆液反应,Southern杂交表明3.0 kb、1.3 kb条带分别属于诺达病毒的RNA1和RNA2。对不同的发病样品进行了核酸电泳,4个典型症状的样品均存在诺达病毒条带,2个样品还存在小病毒核酸。上述结果表明,诺达病毒是引起罗氏沼虾苗种肌肉白浊病的主要病原。14 nm小病毒与罗氏沼虾肌肉白浊病中的关系有待进一步的研究。

关键词:罗氏沼虾;肌肉白浊病;诺达病毒

中图分类号:S945.41

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2003)06-0457-05

罗氏沼虾肌肉白浊病又称白体病、白尾病,主要危害罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)苗种,发生于我国南方各罗氏沼虾苗种场。一般出现在虾苗淡化后3~5周内,病虾表现为肌肉出现白斑或呈白浊状,病虾可在较短时间内大量死亡。对于高密度养殖的育苗池,死亡率可高达90%。该病最早于1996年前后出现在广东、广西一带,以后迅速传播到江苏、浙江等地^[1],2001年在全国主要罗氏沼虾苗种场广泛流行,2002年更是呈蔓延趋势,成为罗氏沼虾苗种业和养殖业的主要威胁。近年来,国内学者分别报道了病毒病原、细菌病原及环境因素等与该病的关系^[2-5]。2001年,实验中发现了引起该病的病毒病原^[2],在此基础上,对病毒进行了分离

和鉴定,并对2000~2002年期间收集的病虾样品进行了病毒核酸分析,现予报道这一研究结果。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 罗氏沼虾材料 病虾采自浙江、江苏罗氏沼虾苗种场患典型肌肉白浊病的虾苗,保存于-40℃冰箱;实验用健康虾来自浙江省淡水所苗种场,个体重0.02 g,28~30℃暂养1周,无发病后备用。

1.1.2 试剂 核酸提取用Trizol试剂购自Promega公司,核酸酶购自大连宝生物(Takara)公司。诺达病毒核酸探针由法国蒙比利埃大学Bonami教授提供^[1]。

1.2 病毒的致病性测定

收稿日期:2003-05-16; 修订日期:2003-07-28.

基金项目:中国水产科学研究院重点科研项目(2003-4-4).

作者简介:钱冬(1963-),男,副研究员,主要从事水产动物病害及疫苗研究. E-mail: qdmonas@163.com

1) Bonami J R. A new viral disease in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [A]. World Aqu 2002 [M]. Beijing China. Abstract. 79.

取典型症状的患病罗氏沼虾虾苗(体重0.01 g),用0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液(PBS),4 ℃ 8 000 r/min离心15 min,上清稀释至1:10,用0.45 μm、0.2 μm 滤膜过滤后为感染用病毒悬液,另取病毒悬液加入1/10 体积氯仿,剧烈振荡后离心,上清用于感染实验;病毒悬液56 ℃热灭活1 h为对照。

取暂养1周以上的健康罗氏沼虾苗,置于40 mL育苗池清水中,加入病毒悬液或对照,浸泡虾苗10~15 min,每组约50尾虾苗。病毒浸泡浓度为1:50、1:250,设PBS及病毒灭活对照。浸泡结束后将虾苗及感染液倒入实验池中,每日投喂并观察发病情况。实验水体为5 L,实验水温为26~30 ℃。

1.3 病毒的提取和电镜观察

患典型肌肉白浊病罗氏沼虾苗,按方法1.2制备病毒悬液,加入1/10 体积氯仿,剧烈振荡后取上清,加入NaCl及PEG 6000使终浓度分别为0.5 mol/mL和10%,4 ℃静置过夜,8 000 r/min离心30 min,用0.1 mol/mL PBS重悬浮沉淀,35 000 r/min离心2.5 h(Hatachi 55P-72),用少量PBS重悬浮沉淀,滴铜网,2%磷钨酸负染,JEM-1200EX电镜观察。

1.4 病毒的核酸提取和电泳

取提纯病毒0.1 mL,加入核酸提取试剂Trizol 1 mL,振荡样品,室温放置5 min,加入0.1 mL氯仿,混匀后冰浴20 min,12 000 r/min,4 ℃离心15 min,取上清,经异丙醇沉淀、75%乙醇洗涤、干燥后用DEPC-H₂O重溶解。病毒核酸于1%琼脂糖凝胶中电泳1 h,溴化乙锭染色,伯乐(Bio-Rad)凝胶成像仪Gel Doc 2000记录结果。

1.5 病毒的核酸特性鉴定

取病毒核酸,分别用DNA酶、RNA酶和S1核酸酶处理提取的病毒核酸,反应条件参照说明书(大连宝生物),1%琼脂糖电泳(同上),Gel Doc2000观察记录结果。

1.6 病毒探针的分子杂交

65 ℃变性病毒核酸1 μL点样硝酸纤维素膜,紫外线固定,42 ℃预杂交3 h,用DIG标记诺达病毒探针42 ℃杂交过夜,加酶标抗DIG抗体(Roche产品),37 ℃1 h,NBT/BCIP显色。

1.7 不同样品的病毒核酸电泳

取典型症状的罗氏沼虾白浊病虾苗0.1 g,加入核酸提取试剂Trizol 1 mL,充分研磨虾体,同1.4提取病毒核酸、电泳,Gel Doc2000观察记录结果。

2 结果

2.1 病毒致病性测定

病虾制备的病毒悬液(见1.2)以1:50、1:250浓度浸泡感染健康罗氏沼虾苗,试验第7天开始出现肌肉白浊病症状,第12天左右白浊病比例最高,1:50和1:250浸泡感染组成活率分别为40%和47.92%,热灭活病毒悬液和PBS对照成活率分别为90.48%和75.51%,用10%氯仿处理病毒悬液感染罗氏沼虾苗也可产生典型白浊病症状,成活率为34.69%。表明病毒是引起罗氏沼虾肌肉白浊病的主要原因,且该病毒不具有囊膜结构。感染试验及发病情况详见图1。

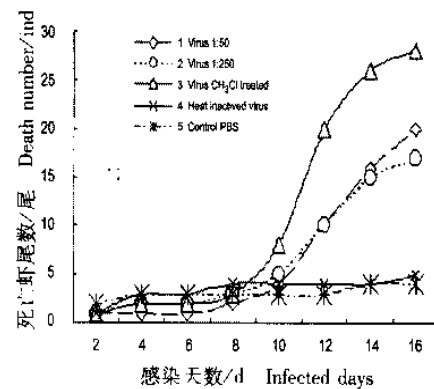


图1 罗氏沼虾肌肉白浊病病毒的致病性测定

Fig.1 Pathogenicity of *M. rosenbergii* whitish muscle virus

2.2 病毒的电镜观察

取患典型肌肉白浊病罗氏沼虾苗制备病毒悬液,经氯仿处理、PEG沉淀病毒及超速离心纯化后滴铜网(见1.3),电镜观察结果见图2。由图2可见,沉淀后的悬液中有大量的病毒颗粒及少量病毒空壳,表现为均一的球形,病毒粒子直径平均为24 nm。此外,样品中还可见到许多直径为14 nm左右的球形颗粒。

2.3 病毒的核酸特性鉴定

用Trizol试剂提取病毒核酸,经1%琼脂糖电泳,Gel Doc2000凝胶成像,可见到4个核酸片段,片段1为3.0 kb,片段2为1.3 kb,片段3和4分别为0.8 kb和0.75 kb左右。经核酸酶试验显示,病毒核酸可为RNA酶降解、对DNA酶抵抗,表明其为RNA病毒(图3)。另外病毒核酸可为S1核酸酶降解,表明核酸为单链RNA。



Bar = 100 nm

图2 罗氏沼虾肌肉白浊病病毒的电镜观察

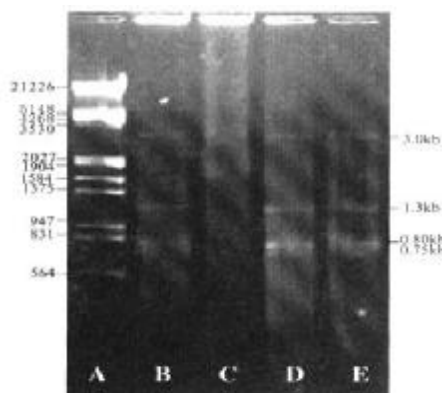
Fig. 2 Observation of *M. rosenbergii* whitish muscle virus

图3 罗氏沼虾肌肉白浊病病毒的核酸特性

Fig. 3 Characteristics of nucleic acid extracted from *M. rosenbergii* whitish muscle virus

A - marker; B, E - 病毒; C - RNA 酶处理; D - DNA 酶处理

A - marker; B, E - virus; C - RNase treated; D - DNase treated

2.4 病毒探针的分子杂交

用法国蒙比利埃大学的 Bonami 教授提供的罗氏沼虾病毒探针,对病毒核酸进行了杂交实验,实验结果见图4。由图4可见,提纯的病毒核酸及病虾样品均可与诺达病毒探针反应。表明提取的病毒为

1) 石正丽,钱冬,张建红,等. 罗氏沼虾体内两种病毒颗粒的分离、纯化与生化特性[J]. (待发表)

罗氏沼虾诺达病毒。另外,将病毒核酸电泳后凝胶转至硝酸纤维膜上,进行 Southern 杂交,3.0 kb 及 1.3 kb 的核酸片段可分别与罗氏沼虾诺达病毒 RNA1 制备的探针与 RNA2 制备的探针杂交,表明 3.0 kb、1.3 kb 核酸片段分别对应诺达病毒的 RNA1 和 RNA2(结果另文发表)¹⁾。

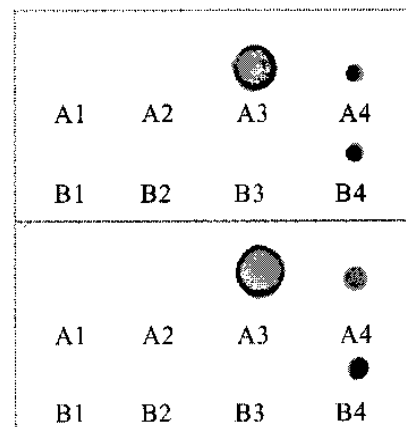


图4 罗氏沼虾诺达病毒探针杂交结果

Fig. 4 Hybridization of molecular probe prepared with *M. rosenbergii* Nodavirus

A1, A2: 对照 RNA; A3, A4: 病虾 RNA; B1, B2: 对照虾; B3: PBS; B4: 病虾; 上: RNA1 探针; 下: RNA2 探针

A1, A2: control prawn RNA; A3, A4: diseased prawn RNA; B1, B2: control prawn; B3: PBS; B4: diseased prawn; Up: Nodavirus RNA1 probe; Down: Nodavirus RNA2 probe

2.5 不同样品的病毒核酸电泳

对 2000 ~ 2002 年收集的 4 个具典型肌肉白浊病症状的罗氏沼虾病样, Trizol 试剂提取病毒核酸后电泳结果见图 5。由图 5 可见,诺达病毒核酸条带在 4 个样品中均可发现,而样品 1、样品 2 除诺达病毒核酸外还发现 0.75 ~ 0.8 kb 的核酸片段,同时样品 1 还可观察到大量 14 nm 的病毒颗粒。这一结果表明诺达病毒在罗氏沼虾肌肉白浊病中存在较为普遍,而小颗粒病毒只存在于部分样品中。

3 讨论

2001 年,笔者报道了该病病毒及感染实验和电镜观察结果^[2]。本研究在此基础上,进一步对病毒进行了纯化、形态观察和核酸提取及特性研究。病毒颗粒直径为 24 nm 左右,无囊膜;病毒核酸对 RNA 核酸酶敏感、对 DNA 核酸酶抵抗,对单链特异

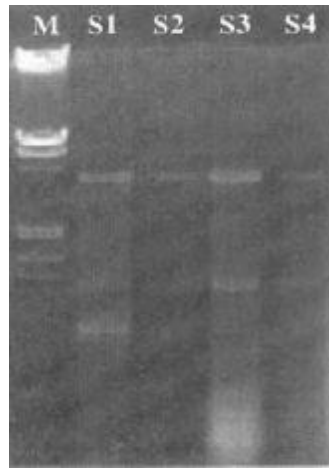


图5 不同地区罗氏沼虾肌肉白浊病样品核酸电泳图谱
Fig.5 Nucleic acid bands of *M. rosenbergii* whitish muscle collected from different regions and periods

M: Marker; S1: 浙江 2001; S2: 浙江 2002; S3: 浙江 2000; S4: 江苏 2002
M: Marker; S1: Zhejiang 2001; S2: Zhejiang 2002; S3: Zhejiang 2000; S4: Jiangsu 2002

性 S1 核酸酶敏感,表明病毒核酸为单链 RNA;病毒核酸由 2 个片段组成,分别为 3.0 kb 和 1.3 kb。上述特性与诺达病毒相符。通过罗氏沼虾诺达病毒核酸探针杂交试验,进一步证明罗氏沼虾肌肉白浊病病毒是诺达病毒,目前该病毒已命名为罗氏沼虾诺达病毒 (*Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus, MrNV)。

罗氏沼虾肌肉白浊病最早的病例是 Nash 等^[6]报道的罗氏沼虾苗种肌肉坏死症, Nash 认为与水质不良及养殖密度过高有关;杜开和等^[5]从病虾肌细胞线粒体肿胀及肌质网增多等亚细胞病理现象认为可能与养殖环境有关。Cheng Winton^[7-8]从罗氏沼虾肌肉坏死病中分离到有较强致病力的肠球菌,姜兰^[4]等从广东罗氏沼虾肌肉白浊病中分离到了木糖葡萄球菌,可复制出自然发病症状。关于病毒病因,有 Anderson 等^[10]、Tung CW 等^[11]从罗氏沼虾中发现类细小病毒、罗氏沼虾肌肉病毒等报道;陆宏达等^[3]通过超薄切片发现了罗氏沼虾肌肉白浊病的病毒颗粒。近年来, Arcier 等^[9]从中美洲法属瓜德罗普岛的罗氏沼虾苗白浊肌肉病中发现了 26 nm 左

右的病毒颗粒,并认为是一种 RNA 病毒; Bonami 等^[1]对该岛罗氏沼虾苗白浊肌肉病进行了深入研究,已鉴定为诺达病毒,并建立了核酸探针快速鉴定方法。笔者于 2001 年发现病毒可复制出典型的病症^[2],通过病毒形态、核酸特性等确定为诺达病毒,分子杂交结果表明,我国的罗氏沼虾诺达病毒与瓜德罗普岛诺达病毒相同。笔者通过对 2000~2002 年浙江、江苏收集的典型病例进行病毒核酸电泳,发现诺达病毒普遍存在于典型病例中,进一步证实了诺达病毒在罗氏沼虾肌肉白浊病中的作用。

诺达病毒是一类无囊膜的单链 RNA 病毒^[12],最早分离于日本岩手县的野田村 (Nodamura),又译作野田村病毒。按照国际病毒分类系统,诺达病毒科分为 α 诺达病毒和 β 诺达病毒两个属,前者主要感染昆虫,后者可引起鱼类脑炎与视网膜炎。罗氏沼虾诺达病毒为首例从甲壳类中分离到的诺达病毒,因此,其在诺达病毒科中的确切地位还有待于确立。除了诺达病毒,还发现一类直径为 14 nm 左右的病毒粒子,核酸电泳也发现相应 0.8 kb 左右的 RNA 片段。分析 2000~2002 年病虾样品,除了普遍存在的诺达病毒,部分样品存在 14 nm 病毒颗粒及核酸,这一病毒也同样在法属瓜德罗普岛的病样中观察到^[1]。目前已经对该病毒进行了研究,初步表明其相当于卫星病毒,但其在罗氏沼虾肌肉白浊病中的作用,还需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] 周鑫. 罗氏沼虾肌肉白浊病[J]. 科学养鱼, 2001(增刊): 60-62.
- [2] 钱冬, 杨国梁, 刘同, 等. 罗氏沼虾肌肉白浊病病原的初步研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(5): 472-476.
- [3] 陆宏达, 陈海清. 罗氏沼虾肌肉白浊病的病原和组织病理[J]. 中国水产科学, 2003, 10(2): 126-132.
- [4] 姜兰, 邓国成, 石存斌, 等. 罗氏沼虾肌肉白浊病病原研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(5): 477-482.
- [5] 杜开和, 王文, 荣黎雯, 等. 患“白体病”罗氏沼虾腹部肌肉病变的超微结构[J]. 中国水产科学, 2002, 9(4): 300-303.
- [6] Nash G, Chinabut S, Limsuwan C. Idiopathic muscle necrosis in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, cultured in Thailand[J]. J Fish Dis, 1987, 10(1): 109-120.
- [7] Cheng W, Chen J C. Isolation and characterization of an *Enterococcus*-like bacterium causing muscle necrosis and mortality in *Macrobrachium rosenbergii* in Taiwan[J]. Dis Aquat Org, 1998, 34(8): 93-101.
- [8] Cheng W, Chen J C. *Enterococcus*-like infection in *Macrobrachium rosenbergii* are exacerbated by high pH and temperature but re-

1) Bonami J R. A new viral disease in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [A]. World Aqu 2002 [M]. Beijing China. Abstract. 79.

- duced by low salinity[J]. *Dis Aquat Org*, 1998, 34(8): 103 - 108.
- [9] Arcier J M, Herman F, Lightner D V, et al. A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Dis Aquat Org*, 1999, 38(8): 177 - 181.
- [10] Anderson I G, Law A T, Shariff M, et al. A parvo-like virus in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *J Invertebr Pathol*, 1990, 55: 447 - 449.
- [11] Tung C W, Wang C S, Chen S N. Histological and electron microscopic study on macrobrachium muscle virus(MMV) infection in the giant freshwater prawn(de Man), *Macrobrachium rosenbergii*, cultured in Taiwan[J]. *J Fish Dis*, 1999, 22: 1 - 5.
- [12] Van Regenmortel M H V, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of viruses* [M]. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses[M]. San Diego: Academic Press, 2000.

Isolation and characterization of Nodavirus caused whitish muscle diseases in *Macrobrachium rosenbergii* larvae

QIAN Dong¹, SHI Zheng-li², CAO Zhen¹, LIU Wen¹, ZHANG Shu-yong², Bonami J R³

(1. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou, 313001 China;

2. Joint - lab of Invertebrate Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China;

3. UMR 5098, DRIM, CNRS/IFREMER/UM2, cc - 80, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France)

Abstract: The virus, which has caused whitish muscle diseases of *M. rosenbergii*, and led to a new epidemic spread out since 1996 in larvae and post-larvae of giant freshwater prawn in South China, was isolated and characterized. The typically diseased *M. rosenbergii* larvae were collected from some culture farms in Zhejiang province and Jiangsu province. The healthy individuals were from the experimental farm of Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries. The virus can cause natural symptoms when healthy post-larvae was used for immersion challenging by using bacteria-free tissue virus homogenate at concentration of 1:50 and 1:250, and is resistant to 10% chloroform treatment. The virus was partly purified with PEG precipitation followed by centrifugal at 35 000 r/min, and observed under electronic microscope after 2% PTA negative staining. Plenty of spherical virus could be found at the size of 24 nm in diameter and the same smaller particles sized 14 nm could be found also. The nucleic acid of virus was extracted by using the Trizol reagents and analyzed with 1% agarose electrophoresis. It shows the nucleic acid has four bands sized 3.0, 1.3, 0.8 and 0.75 kb respectively, and is sensitive to RNase and S1 nuclease and resistant to DNase, indicating these bands as single-strand RNA. The molecular hybridization test was carried out with *Nodavirus* probe in *M. rosenbergii*, showing strong signal to the extracted RNA and diseased prawn homogenate. Two larger bands were confirmed as *Nodavirus* RNA1 and RNA2 by Southern blot. The bands of *Nodavirus* were found in all samples with typical symptoms collected from 2000 to 2002, while the 0.8 and 0.75 kb bands were only found in two of four samples. These results indicated that *Nodavirus* was the main pathogen of whitish muscle diseases in *M. rosenbergii* larvae in China in recent years. The virus was named as *Macrobrachium rosenbergii* *Nodavirus* (MrNV). The classification and function of the smaller viral particles of 14 nm in diameter remained unclear.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; whitish muscle diseases; *Nodavirus*