

研究简报

一种检测鳊鱼病毒方法

A METHOD FOR DETECTING VIRUS IN *SINIPERCA CHUASTSI*

李新辉 吴淑勤 潘厚军 黄志斌

(中国水产科学研究院珠江水产研究所,
农业部热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广州 510380)

Li Xinhui Wu Shuqin Pan Houjun Huang Zhibin

(Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences,
Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation, Guangzhou 510380)

关键词 鳊鱼, 病毒核酸, 检测

KEY WORDS *Siniperca chuatsi*, Virus nucleic acid, Detecting

鱼类病毒学研究发展至目前, 已发现隶属于11个病毒科、50余种鱼类病毒^[1], 其危害养殖的程度很大。因为对病毒病的研究, 还不能象对微生物类病原那样研究透彻, 且受检测手段的限制, 待到确定病因时往往已难于处理了, 造成无法挽回的经济损失, 因而生产上亟需一种对病毒病早期检测的方法。

对病毒病检测, 国内外通常用的方法有通过易感细胞观察细胞病变达到检测目的; 或用组织超薄切片在电镜中直接观察病毒; 近年来采用免疫学、PCR技术进行针对性的快速检测。但前者由于病毒感染具有比较专一的宿主, 在还未能建立敏感细胞系的情况下, 很难开展工作; 电镜检测难度大, 不适合于生产上应用; 免疫学和PCR技术则依赖于对大量病原相关的免疫原性因子和分子生物学研究基础, 建立系列检测盒才能有意义于生产应用。本文参照分子克隆用噬菌体DNA快速分离的方法^[5], 在传统离心分离基础上结合分子生物学手段, 在患鳊鱼暴发性病的鱼组织中, 从核酸水平进行病毒检测。

1 材料及试剂

1.1 试验鱼 于发病季节, 从珠江三角洲鳊鱼塘取呈现暴发性传染病病症鳊鱼。以无症状、并在室内水族箱适应数天, 追吃饵料活跃的鳊鱼作为健康试验鱼; 以健康胡子鲶作为对照。

1.2 溶液和试剂 核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶、蛋白酶K等购自华美公司。4M异硫氰酸胍混合液^[5]; pH 7.4磷酸盐缓冲液(PBS)^[2]。

1.3 试验设备 玻璃组织匀浆器一套; P-72型日立超速离心机; 普通电泳仪等。

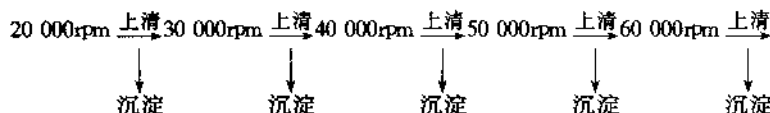
2 方法

2.1 取鱼的肝、脾、肾内脏, 用冷磷酸盐缓冲液冲洗。加二倍体积(V/W)冷磷酸盐缓冲液于玻璃匀浆器中

收稿日期: 1996-11-19。

匀浆,匀浆液在 10 000rpm 条件下离心 20 分钟,吸取上清液,用 DNase 和 RNase(50 μ g/ml)室温处理 30 分钟。

2.2 溶液分级离心各 20 分钟



将沉淀分别用异硫氰酸胍溶液悬浮,悬浮液用终浓度 1% SDS、50 μ g/ml 蛋白酶 k、65 $^{\circ}$ C 处理 30 分钟。

2.3 核酸抽提采用 Chomczynski^[4]方法,核酸用 TE 溶解,琼脂糖电泳检测。

3 结果与讨论

3.1 将分级离心沉淀物提取的各核酸样品进行电泳检测,脾和肾脏组织中发现一个分子量约为 1.3×10^7 道尔顿的外源核酸(如图 1),正常鱼和胡子鲇对照核酸检测阴性。该种核酸来自 20 000rpm~30 000rpm 区域的沉淀物。

3.2 本方法在离心过程中,排除了细胞核和线粒体的同时,上清液加 RNase 和 DNase 处理,进一步排除了溶液中存在的裸露内源性核酸。因此,认为经这样处理后分级离心的沉淀物所分离到的核酸,它应该是外源性的,且此种核酸在分离前应有蛋白包裹保护才能逃避 RNase 和 DNase 的降解,同时根据离心沉降中颗粒的大小,推断它是一种病毒核酸。

3.3 在临床方面,分别对两口查明已有细菌感染的鳊鱼塘进行病鱼组织外源核酸检测,阳性鱼塘施用抗菌药物,病情无好转,甚至恶化,病鳊显示细菌、病毒所致的综合症状,而阴性塘在抗菌药物处理下病情得到控制的局面;根据外源核酸出现的沉降区域,在沉降物相应的病鱼脾脏组织切片中,发现了一种截面为六角型的球状病毒^[3](如图 2),证明所分离的核酸是病毒核酸。

3.4 本方法从未知病原(怀疑为病毒病)的鳊鱼组织中进行组织外源核酸检测,一个工作日内即可完成。在核酸水平首先证明外源性病原存在,再返回来研究病鱼的组织病理学,在病毒学研究中可作为检测的一种简便方法。本方法尤其适用于象鳊鱼一样还未能建立敏感细胞系的鱼类的病毒病研究。用此方法也可以检测病毒在组织中的分布,对了解病毒在体内侵染组织、器官和扩散有一定意义。

本法除在鳊鱼组织病毒检测上具有特异性外,在感染呼肠孤病毒的草鱼细胞培养物及鳖、胡子鲇等病毒感染的养殖种类中进行检测,不同病毒在核酸检测上显示高度的特异性。因此,本法对生产上疑病毒性疾病的甄别,新出现病毒的检测具有一定的实用价值。但是,作为一种检测手段,尚需应用这种方法进一步了解感染病毒毒的潜伏期与分离病毒核酸灵敏度之间的关系。另外,在组织匀浆离心沉降中需要解决细胞内溶物伴随病毒粒子沉降,对提取病毒核酸有一定干扰的问题,本法通过调节匀浆液的 pH

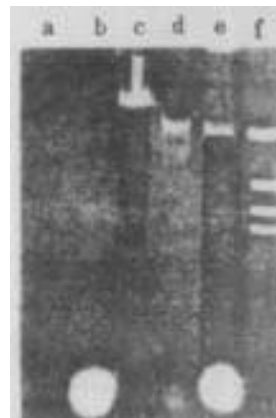


图 1 病鳊组织外源核酸电泳检测图

Fig. 1 Detected the external nucleic acid from the diseased - fish tissues of *Siniperca chuatsi* by electrophoresis

a, b: 胡子鲇和正常鳊鱼组织外源核酸对照检测阴性
c: λ -DNA; d, e: 病鳊组织外源核酸; f: λ -DNA/Hind III

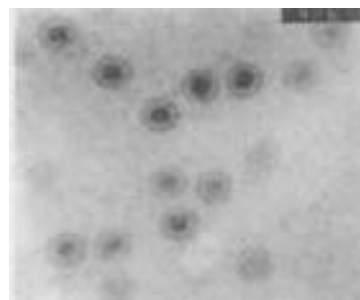


图 2 病鳊脾脏组织中观察到的病毒颗粒

Fig. 2 The viruses were viewed under the electron microscope in the spleen tissues of *Siniperca chuatsi*

值达到预期的效果。

参 考 文 献

- [1] 陈怀青, 1991. 鱼类病毒研究评述, 国外水产, (1): 30-32.
- [2] 卢圣栋等, 1993. 现代分子生物学实验技术, 582. 高等教育出版社.
- [3] 吴淑勤等, 1997. 鳊鱼暴发性传染病病原研究. 水产学报, (印刷中).
- [4] Chomczynski, P., et al., 1987. Single - step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate - phenol - chloroform extraction. Analytical Biochemistry. 162: 156 - 159.
- [5] T. Maniatis, et al., 1982. 《分子克隆》(余茂效译自 Molecular cloning), 59 - 62. 科学出版社(1986).