

鱼虾贝病毒分离纯化技术概述

于佐安¹ 王崇明^{2*} 任伟成^{1,2} 蔡玉勇^{1,2} 李 贇¹

(¹中国海洋大学, 青岛 266003)

(²农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘要 多年来由于水产动物病毒病的流行,在世界范围内给水产养殖业,尤其是鱼类、对虾类和贝类养殖产业带来了严重的危害。病毒的分离纯化作为研究病毒病的必要手段,作用十分重要。因此,国内外学者对此进行了大量的研究,并取得了许多成果。本文综述了这 3 种水产动物病毒分离纯化的研究概况。

关键词 水产动物 病毒 分离纯化

中图分类号 S94 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)02-0127-05

Review of virus purification techniques for fish and shellfish

YU Zuo-An¹ WANG Chong-ming^{2*} REN Wei-cheng^{1,2}

CAI Yu-yong^{1,2} LI Yun¹

(¹Ocean University of China, Qingdao 266003)

(²Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT In recent years, the outbreak of the aquatic animal diseases caused serious damage to aquaculture industry. The damage was particularly serious in cultivated fish and shellfish. Virus purification is very important as a necessary step for virus disease research. A lot of work on virus purification has been done by domestic and foreign scholars, and lots of accomplishments were achieved. This paper reviews the virus purification methods in fish and shellfish.

KEY WORDS Aquatic animals Virus Purification

病毒提纯,就是应用各种物理、化学方法,以不使病毒受损伤和失活为前提,去除宿主细胞组分等非病毒杂质,提取出高纯度浓缩的病毒样品。病毒提纯是病毒学研究的重要前提,病毒微细形态结构的研究、病毒抗原蛋白的分离提纯、病毒的化学成分及其遗传物质 DNA 或 RNA 的详细研究都需要高纯度的病毒样品。

由于病毒的生长特性及理化学性质不同,其寄生的宿主也不同,因此提纯方法也不尽一致。以往使用的沉淀法,是从稀释的悬浮液中浓缩病毒;由于病毒粒子表面携带特定的电荷群,所以也可采用层析法提纯病毒。

国家 863 计划项目(2006AA100307)资助

* 通讯作者。wangcm@ysfri.ac.cn

收稿日期:2008-01-28;接受日期:2008-04-22

作者简介:于佐安(1982-),男,硕士研究生,主要从事海水贝类病毒研究。E-mail:abc2033864320@sohu.com, Tel:13963960851

此外,两相溶剂间分配系数法、红细胞吸附法和电泳法,也是提纯病毒的常用方法。这些方法都比较简单、温和,并且对实验室的条件要求不高,所获得的纯化病毒能够满足一般的实验要求。但是,分子水平方面的研究往往需要高度纯化的病毒,所以又出现了细胞培养的方法,细胞培养作为扩增病毒的一种手段,为病毒的分离纯化提供足够量的病毒,然后通过超速离心得到高度纯化的病毒,是分离提纯病毒的有效方法。但是由于建立细胞系存在一定困难,大部分鱼虾贝类病毒分离纯化的方法仍然是对动物组织样品直接离心提取。

1 鱼类病毒的分离纯化

鱼类属于水生脊椎动物,为建立细胞系、分离富集病毒,再进一步离心得到纯化病毒,国内外许多学者作了大量工作。

20世纪60年代,由Wolf和Quimby建立了世界上第1个鱼类细胞系,即虹鳟鱼生殖腺细胞系。此后,鱼类的细胞培养研究进展十分迅速(于森等2003)。据Fryer等(1994)统计,到1994年为止,至少已建立了159株鱼类细胞系。

自Wolf等(1959)首次利用虹鳟鱼生殖腺细胞系分离出第1个鱼类病毒——传染性胰坏死病毒(IPNV)以来,目前,世界上已经发现了50余种鱼类病毒(陈怀青1990)。1965年,Jensen用虹鳟鱼生殖腺细胞系细胞研究了虹鳟病毒性出血性败血症(VHS)病毒的特性。1971年,Fijan等用鲤鱼卵巢原代培养细胞分离了鲤鱼春季病毒血症病毒(SVCV),而后又从黑头软口鲮尾柄(FHM)细胞中分离出弹状病毒。1971年,Wolf和Darlington用云斑叉尾蛔细胞系分离出斑点叉尾鱼回病毒病(CCVD)的病毒。1988年,童裳亮等利用虹鳟脾细胞系从病鱼中分离出鱼传染性胰坏死病毒。长江水产研究所和中国科学院病毒所通过草鱼肾脏组织的细胞培养分离鉴定了草鱼出血病原——鱼呼肠弧病毒(钱华鑫等1991)。陈燕桑等(1999)通过鳗鲡性腺细胞系分离纯化出鳗鲡开口病病毒。Zhang等(1999)将虹彩病毒Rana grylio virus接种在鲤鱼上皮瘤(EPC)细胞系中,观察病毒的形态发生,对其进行了鉴定分类。Chang等(2001)建立了鲈鱼细胞系,研究了其对虹彩病毒、双RNA病毒、呼肠弧病毒、棒状病毒和野田村病毒的敏感性,证明该细胞系适合作为分离各种鱼病病毒的载体。李东等(2005)将海水鲈鱼和淡水鲟鱼的病鱼脑组织浸出液接种到SSN-1,传到第3代后,出现典型的细胞病变(CPE),收获细胞分离物并冻存。

通过细胞培养分离的病毒不仅纯度高,而且保种方便,但我国海水鱼细胞系较少,所以对于一般海水鱼病毒来说仍然通过离心方法获得。日本吉水守(1998)用滤膜过滤法纯化牙鲆淋巴囊肿病毒(LCDV),建立ELISA诊断技术,但并未发表纯化病毒的照片。曲凌云(2001)用常规方法处理病料,经差速离心后,虽然得到了LCDV,但病毒数量和纯度均不理想。程开敏(2001)用常规的低速蔗糖密度梯度离心提取,也没有获得大量病毒。刘允坤等(2002)通过不同的样品处理和离心方法,发现了影响淋巴囊肿病毒(LCDV)得率和纯度的因子,通过消除该因子并结合计算机软件设计程序,应用差速离心和蔗糖低—高速离心相结合的方法建立了牙鲆淋巴囊肿病毒快速分离技术。宋晓玲等(2003)利用差速离心和蔗糖密度梯度离心技术分离了牙鲆淋巴囊肿病的病原——淋巴囊肿病毒。

2 对虾类病毒的分离纯化

对虾属于水生无脊椎动物,而水生无脊椎动物的细胞培养比较困难,原代培养细胞不能形成单层,或即使形成单层,但细胞不分裂,难以进行传代。因而,至今没有得到对虾的连续性细胞系。所以通过细胞培养来达到分离对虾病毒的目标目前还不能实现,但是仍然有很多科研工作者进行了有益的探索。

Chen等(1989)在 $2 \times L-15+20\%$ 小牛血清+ $10\mu\text{g/ml}$ 链霉素+ 100IU/m 青霉素,温度为 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 的条件下培养斑节对虾的淋巴细胞,以研究斑节对虾杆状病毒(MBV)的感染。岳玉环等(1997)选用鲤鱼上皮乳头瘤细胞(EPC)和虹鳟肝细胞(R1),对新发现的副粘病毒样病毒进行细胞分离与培养。结果表明,对虾副粘病毒样病毒可在这两种鱼类传代细胞中复制。黄健(1998)对该结果提出了商榷意见,提示结果中的副粘病毒样病毒可能是对虾的立克次氏体。Lu等(1991)在进行对虾细胞培养时观察到细胞存在弹状病毒,分离到了传染性皮下及造血组织坏死病病毒(IHHNV)。Tapay等(1997)利用蓝对虾和万氏对虾的淋巴器官的细胞培养

来进行对虾无包涵体杆状病毒(NOSV)的定量分析研究,为病毒的鉴定和感染提供了简捷方便的方法。苗宏志等(2000)利用培养的中国对虾淋巴器官细胞研究了中国对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒(HHNBV)的增殖。汪 岷等(2000)利用中国对虾淋巴组织进行球形病毒超微结构的研究。Loh 等(1990)曾报道传染性皮下及造血组织坏死病病毒(IHHNV)可以在鲤鱼上皮乳头状细胞上增殖。但该篇文章的结论已被推翻,该病毒后被证实是鲤鱼春季病毒血症病毒(冯书营等 2003)。

目前分离对虾类病毒的主要方法是密度梯度离心法,主要有差速离心、蔗糖密度梯度离心、氯化铯密度梯度离心和酒石酸钾-甘油密度梯度离心等。为了更好的提纯病毒,更多是将以上几种方法联合使用,以达到更好的效果。

黄 捷等(1995)运用蔗糖密度梯度法和 NaBr 密度梯度法分离提纯出对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒(HHNBV),对纯化的病毒进行了超微结构、紫外吸收、核酸类型及多肽 SDS-PAGE 的研究。薛清刚等(1996)采用一种改进的酒石酸钾-甘油密度梯度离心法,对对虾肝胰腺细小样病毒(HPV)进行纯化。结果表明,用酒石酸钾-甘油密度梯度离心法,可获得良好的病毒纯化效果,通过电子显微镜观察、提取病毒核酸用不同核酸酶处理并结合电泳等方法,对病毒的基本生物物理和生物化学特性做出了鉴定。陈细法等(1997)通过低温离心,低温超速离心和连续蔗糖密度梯度离心的方法获得了纯净的淋巴样细胞核型杆状病毒(LNBV)的病毒悬液。Bonami 等(1997)应用蔗糖密度梯度离心法初步提纯对虾桃拉病毒(TSV),然后应用氯化铯密度梯度离心法进一步提纯了病毒。谢数涛等(2000)取患白斑症的濒死斑节对虾 *Penaeus mondon* 的表皮、鳃和胃,匀浆后通过蔗糖密度梯度离心和蔗糖垫层差速离心两种方案,提纯出 WSSV,观察了病毒的形态结构。徐洪涛等(2000)为进一步研究病毒的基本特性包括其基因组结构与功能特点,应用氯化铯密度梯度超速离心技术成功地获得纯化的中国对虾非包涵体型杆状病毒(PcNOBV)核衣壳。孙 磊等(2004)从市售的甲壳上带有白斑的冷冻斑节对虾中,通过蔗糖密度梯度离心法提取到一种杆状病毒,利用电镜负染对其超微结构进行了研究。Nadala 等(1998)为了从形态学、生物化学和基因等角度比较来自 3 个不同地域的 WSSV 的差异性,通过低速离心、多次高速离心和氯化铯超速离心相结合的方法分离提纯了 WSSV。美国 Lightner 实验室也曾多次试图分离包涵体,但均未获成功(Bruce 1991; Mari *et al.* 1990; Poulos *et al.* 1993); Chang 等(1993)报道在氯化铯超速离心法分离病毒过程中得到了部分包涵体;杨 丰等(1995)为分离草虾杆状病毒的包涵体,利用蛋白酶抑制剂防止包涵体被破坏,通过差速和高速离心得到了高纯度斑节对虾杆状病毒(MBV)包涵体;王金星等(1997)通过差速和超速离心,进行了病原的纯化,得到了长度为 380~410nm 直径为 90~100nm 的杆状病毒颗粒。

3 贝类病毒的分离纯化

作为水生无脊椎动物的贝类目前也尚未建立起细胞系,从而给贝类病毒病的研究带来很大的限制。现在分离贝类病毒的主要方法同样主要是密度梯度离心。

王崇明等(2002)运用差速离心和蔗糖密度梯度离心相结合的方法,从具典型发病症状的栉孔扇贝 *Chlamys farreri* 体内提纯了一种球形病毒,应用电镜技术进行了超微结构的观察。沈 辉等(2006)运用差速离心、蔗糖垫超速离心与 CsCl 密度梯度离心相结合的方法,从江苏海域异常发病死亡的文蛤 *Meretrix meretrix* Lusoria 组织中提出一种病毒颗粒,运用原子力扫描显微镜对提纯病毒进行了表面结构观察。王 斌等(2003)通过 PEG 透析获得病毒粗提液,然后通过蔗糖密度梯度离心法获得了养殖贻贝中的一种球形病毒。

4 结语

水生动物病毒病具有潜伏期长短不一、症状复杂多变、传染性强和导致高死亡率的特点,且病原个体微小,侵染动物后在宿主细胞内复制,抗菌素对其无作用。而化学药物(消毒剂等)在杀灭病毒前,就可能使宿主动物受损或致死,可见病毒是危害非常严重的一类病原。而对于一种病毒的认识,则首先应该做好分离纯化工作,只有这样才能更好的认识该病毒,并进行更深入的研究。

就目前的研究手段来说,鱼、虾、贝等水产动物病毒分离纯化的主要方法是超速离心法,由于分离纯化病毒

的研究目的不同,对病毒的纯度要求也不同,具体的方法有所差异。通过差速离心法往往可以获得病毒的粗提液,能够满足人工感染试验和观察病毒超微结构的要求,但是如果研究病毒的基因组结构或者进行更深入的研究,必须用超速离心法或者差速离心和超速离心相结合的方法得到更加纯的病毒。由于病毒感染部位不同,感染部位的组织成分也有所不同,如扇贝的肝胰腺由于油脂含量过多就会对病毒的提纯造成很大影响。另外,由于病毒纯化步骤中的各个关键参数(包括缓冲液选择、离心时间、离心转速和梯度液配制等)会对病毒的分离纯化效果产生很大的影响,因此目前通过超速离心法提纯病毒并没有统一的标准。

细胞培养作为分离病毒的一种手段,可以得到含量很高的病毒,能够满足分子水平等方面的研究,而且可以通过传代培养进行保种,能够在病毒的分离和纯化方面发挥很重要的作用。对于鱼类而言,由于鱼类细胞培养发展很快,至少已建立起159株细胞系,但我国海水鱼细胞系却相对较少,所以对于一般海水鱼病毒来说仍然只能通过离心方法获得。由于虾、贝类和蟹类等其他无脊椎水生生物至今也不能成功地建立细胞系,所以分离纯化病毒只能采用梯度离心、差速离心、盐析法和层析法等,这些方法虽然也能得到大量的病毒,但纯度不是很高,从而给更深入的研究带来一定的限制。因此,进一步改进病毒的分离纯化技术,建立我国鱼、虾、贝3种水产动物的细胞系,应该成为科研工作研究重点之一。

参 考 文 献

- 王金星,刘昌斌,张为红,赵晶,赵双宜,张燕君. 1997. 中国对虾暴发性流行病病原体研究 I. 病原体的分离纯化. 海洋学报, 19(2): 95~98
- 王崇明,王秀华,宋晓玲,黄捷,宋微波. 2002. 栉孔扇贝一种球形病毒的分离纯化及其超微结构观察. 水产学报, 26(2): 180~184
- 王斌,李霞,杨喜东. 2003. 养殖贻贝中观察到一种球形病毒. 中国病毒学, 18(3): 288~291
- 孙磊,王维娜,郭明申,苏磊,李凤超,王军霞,张辉,王安利. 2004. 对虾一种杆状病毒的分离纯化及超微结构. 河北大学学报(自然科学版), 24(1): 76~82
- 冯书营,黄捷,张士瑾. 2003. 对虾细胞培养的研究现状. 海洋水产研究, 24(1): 107~114
- 汪岷,徐怀恕,李红岩,王旭,姜明,樊廷俊. 2000. 中国对虾淋巴组织培养细胞中一种球形病毒的超微结构研究. 青岛海洋大学学报, 30(2), II: 111~114
- 曲凌云. 2001. 养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)淋巴囊肿病的研究. 见: 国家海洋局一所博士论文
- 刘允坤,孙修勤,黄捷. 2002. 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)淋巴囊肿病毒的分离. 高技术通讯, 12(6): 92~95
- 李东, Xylouri-Frangiadaki, E. 2005. 鱼类神经坏死病毒的分离及其部分衣壳蛋白基因的核苷酸序列分析. 中国兽医科技, 35(2): 108~111
- 杨丰,林彬,陈细法. 1995. 分离草虾杆状病毒包涵体的一种新方法. 台湾海峡, 14(1): 80~82
- 沈辉,万夕和,李元宝,陈颖,许璞. 2006. 一种文蛤球形病毒分离纯化的初步研究. 江苏农业科学, 6: 336~338
- 宋晓玲,黄捷,杨冰,史成银,张立敬. 2003. 牙鲆淋巴囊肿病的病理和病原分离. 中国水产科学, 10(2): 117~120
- 陈细法,陈平,吴定虎. 1997. 养殖对虾一种新杆状病毒研究. 中国科学(C辑), 27(5): 415~420
- 陈怀青. 1990. 鱼类病毒研究概述. 国外水产, 3: 30~32
- 岳玉环,黎诚耀. 1997. 对虾副粘病毒样病毒的细胞分离培养. 中国兽医学报, 17(3): 306~307
- 程开敏. 2001. 海水养殖鱼类淋巴囊肿病的快速检测. 见: 青岛海洋大学硕士论文
- 苗宏志,童裳亮,徐斌. 2000. 利用对虾原代细胞增殖对对虾杆状病毒 HHNBV 的研究. 生物工程学报, 16(2): 211~212
- 徐洪涛,朴春爱,王雷,杨朵,屈建国,张宝云,候云德. 2000. 中国对虾非包涵体杆状病毒核衣壳的分离纯化. 病毒学报, 16(2): 60~64
- 黄捷,于佳,宋晓玲,孔杰,杨从海. 1995. 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. 海洋水产研究, 16(1): 11~23
- 黄捷. 1998. 关于对虾“副粘病毒样病毒”的商榷. 中国兽医学报, 18(1): 99~100
- 钱华鑫,张四明. 1991. 鱼类细胞培养在渔业科学上的应用. 淡水渔业, 5: 40~42
- 谢数涛,闫庆生,何建国,江静波. 2000. 对虾白斑症病毒的分离纯化及形态结构观察. 中山大学学报(自然科学版), 39(4): 90~93
- 薛清刚,官云浩,王文兴. 1996. 中国对虾干胰腺细小病毒的纯化与鉴定. 海洋与湖沼, 27(3): 308~313
- 吉水守,纪荣兴,绘面良男,井上洁. 1998. 牙鲆贫血症病毒分离株特性. 集美大学学报, 3(3): 120~125
- Bruce, L. D. 1991. Methods for viral isolation and DNA extraction for a penaeid shrimp baculovirus. J. Virol. Methods, 34: 245~254
- Bonami, Kenneth., Hasson, W. et al. 1997. Taura syndrome of marine penaeid shrimp: Characterization of the viral agent. Journal of General Virology, 78: 313~319
- Chen, S. N. et al. 1989. Infection of cultured cells from the lymphoid organ of *Penaeus monodon* Fabricius by monodon-type baculovirus(MBV). J. Fish Diseases, 12: 73~76

- Chang, S. F. *et al.* 2001. Development of a tropical marine fish cell line from Asian seabass (*Lates calcarifer*) for virus isolation. *Aquaculture*, (192): 133~145
- Chang, P. S., Lo, C. F., Kou, G. H. *et al.* 1993b. Purification and amplification of DNA from *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV). *J. Invertebr Pathol.* 62(2): 116~120
- Fryer, J. L., and Lannan, C. N. 1994. Three decades of fish cell culture: A current listing of cell lines derived from fish. *Journal of Tissue Culture Methods*, (16): 87~94
- Lu, Y. *et al.* 1991. A new virus isolate from infections and hematopoietic necrosis virus-infected penaeid shrimps. *J. Virol. Methods*, Feb-Mar, 31 (2-3): 189~195
- Loh, P. C. *et al.* 1990. Growth of the penaeid shrimp virus infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in fish cell line. *J. Virol. Methods*, 28(3): 273~280
- Mari, H., Bonami, J. R., Brehelin, M. *et al.* 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.* 71: 2657~2664
- Poulos, B. T., Mari, J., Bonami, J. R. *et al.* 1993. Preliminary characterization and partial cloning of the genome of a baculovirus from *Penaeus monodon* (PmSNPV=MBV). *Dis. Aquat. Org.* 16(3): 207~215
- Nadala, E. C. Jr., Loh, P. C. 1998. A comparative study of three different isolates of white spot virus. *Dis. Aquat.*
- Tapay, L. M. *et al.* 1997. Development of an in vitro quantal assay in primary cell cultures for a non-occluded baculo-like virus of penaeid shrimp. *Virol. Methods*, Feb; 61(1): 37~41
- Wolf, K., Snieszko, S. F., and Dunbar, C. E. 1959. Infectious pancreatic necrosis, a virus-caused disease of fish. *Excerpta Med.* 13 (sect. 1. 1): 228
- Zhang Qi-Ya, *et al.* 1999. Studies on morphogenesis and cellular interaction of *Rana grylio* virus in an infected fish cell line. *Aquaculture*, (175): 185~197