

文章编号:1000 - 0615(2001)06 - 0576 - 04

研究简报 ·

三种水生动物病毒感染鱼类细胞的扫描电镜观察

Scanning electron microscope observation on the infected fish cells with three aquatic viruses

张奇亚, 袁秀平, 李正秋

(中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

ZHANG Qi-ya, YUAN Xiu-ping, LI Zheng-qiu

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology,
Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

关键词:中华鳖;蛙;鳊;病毒;扫描电镜观察

Key words: soft-shell turtle; frog; mandarin fish; virus; scanning electron microscope observation

中图分类号:Q247;S917 文献标识码:A

近年,从我国患病的水生动物中已发现和分离到不同的病毒病原^[1,2],并通过透射电镜对部分水生动物病毒作了形态学研究,包括病毒的大小和形态结构、病毒在感染鱼类细胞内的复制和装配、病毒引起宿主细胞内超微病变及与细胞的相互作用等^[3-6]。但对病毒引起宿主细胞表面病变的研究不多^[7],尤其是借助扫描电镜对水生动物病毒进行深入观察与比较的报道就更少^[8]。在本实验室已确定鲤乳头瘤细胞(Epithelioma papulosum cyprini, EPC)、草鱼性腺细胞(Grass carp ovaries, GCO)和草鱼鳍条细胞(Grass carp fins, GCF)分别为中华鳖病毒(*Trionyx sinensis virus*, TSV)、蛙虹彩病毒(*Rana grylio virus*, RGV)和鳊球形病毒(*Siniperca chuatsi spherical virus*, SCSV)敏感细胞的基础上,将这3种水生动物病毒接种到各自敏感的细胞中,制备病毒感染细胞的样品,进行扫描电镜观察,并比较了病毒与宿主细胞相互作用及引起宿主细胞表面超微结构变化的情况。

1 材料与方法

1.1 材料

分别制备3种水生动物病毒TSV, RGV和SCSV悬液;准备好3种新鲜传代并已长成单层的培养细胞:EPC、GCO和GCF,这些细胞均为国际上检测水产动物鱼类病毒的标准细胞系^[9]。

1.2 方法

无菌操作,取出患病水生动物的肝、肾、脾组织,剪碎,加PBS匀浆后,再加双抗,冰冻过夜,离心取上清液,过滤,所得过滤液即为病毒粗提液。将病毒粗提液经过滤除菌,接种到不同的培养细胞中,同时扩增获得病毒悬液,冻存备用。

分别传代培养EPC、GCO和GCF细胞,待传代细胞在培养瓶中长成单层后,取病毒悬液并将TSV接种到EPC, RGV接种到GCO, SCSV接种到GCF细胞上,每瓶接种病毒1mL(病毒滴度约为 10^4 TCID₅₀),用含10%胎牛血清的199培养液(美国GIBCO公司产品)25培养。同时另设未接种病毒的细胞为对照。待感染细胞出现病变后,以0.25%胰酶消化,收集病变细胞,再用2.5%戊二醛作前固定,1%锇酸双固定,磷酸缓冲液冲洗,梯度丙酮脱水,乙酸异戊酯置换,临界点干

收稿日期:2001-02-12

基金项目:国家重点基础研究计划(973)资助项目(G1999053908);中国科学院生物特支费资助项目(STZ-00-13)

第一作者:张奇亚(1957-),女,湖北黄梅人,博士,研究员,从事水生动物病毒学及相关学科领域的研究。E-mail:zhangqy@ihb.ac.cn

燥后喷金,经 AMRAY-1830 型扫描电镜进行观察。

2 结果

经扫描电镜观察,可见未感染病毒的正常 EPC 细胞(图版-1)、GCO 细胞(图版-4)或 GCF 细胞(图版-7)均为圆形或椭圆形,其表面光滑或有少数细微颗粒分布其细胞膜表面。但经不同病毒感染的宿主细胞则发生了不同程度或状况的病变。

2.1 TSV 感染 EPC 细胞

TSV 可直接穿透细胞膜从宿主细胞中释放出来,或通过细胞表面伸出的纤毛状伪足释放(图版-2)。以这两种方式释放的病毒对宿主细胞的损害相对较少。另外,从感染的 EPC 细胞中,成熟的 TSV 颗粒还可以另一种方式释放,即通过宿主细胞的裂解,从细胞碎片中游离出大量病毒颗粒(图版-3)。

2.2 RGV 感染 GCO 细胞

RGV 多以出芽方式从感染的 GCO 细胞中释放。在宿主细胞表面,布满了出芽向细胞外释放的 RGV 颗粒(图版-5)。如增加扫描电镜观察的放大倍数,可更清晰地看到从细胞内出芽、暂时还聚集在宿主细胞周围的大量球形病毒颗粒(图版-6)。

2.2 SCSV 感染 GCF 细胞

SCSV 感染 GCF 后,随着病毒的复制增殖,使宿主细胞表现出明显肿胀,部分成熟的 SCSV 可通过出芽方式释放(图版-8)。但有不少宿主细胞会崩解,同时可见成束的病毒粒子随崩解细胞的碎片散开(图版-9)。

3 讨论

探讨并认识病毒的复制过程与感染机理,是有效进行病毒病防治的前提。鱼类的组织和细胞培养是水生动物病毒学研究的基础条件^[10];而电镜技术在水生动物的微生物病原,包括细菌病原^[11]和病毒病原的形态、细胞病理和病原微生物的鉴定等方面都得到广泛的运用。扫描电镜观察能直观显示病毒与宿主细胞的相互作用,尤其是病毒引起宿主细胞表面的病理变化。在水生动物病毒学的研究中,与透射电镜技术的运用相比,扫描电镜技术的运用显得较薄弱,资料欠缺。虽然使用扫描电镜有其局限性,如分辨率不够高,但其放大倍率范围宽,制备样品方法简单,观察结果不仅与透射电镜观察的结果可相互佐证,也有助于更清晰和更全面地了解病毒释放及宿主细胞最终命运,是揭示病毒致病机理的重要手段。

利用透射电镜对感染 TSV 的中华鳖组织超薄切片和提纯的 TSV 负染样品进行观察,表明 TSV 的直径较小,仅 30nm。由扫描电镜观察显示,经细胞表面伸出的纤毛状伪足释放是成熟 TSV 释放的重要途径,但这一现象在其它两种直径较大的病毒释放过程中则较为少见。因此推测这是一种适于直径细小病毒颗粒释放的方式,在仅有少量病毒成熟释放时,对宿主细胞的损伤也相对较小。

RGV 是一种有囊膜的球形病毒,成熟 RGV 颗粒多是通过出芽方式释放,细胞膜凸起并包裹着成熟的病毒颗粒,逐步从宿主细胞表面脱离释放。在释放过程的同时从细胞膜上获取病毒囊膜,这可能是有囊膜的病毒尽量利用宿主细胞能源、生物材料并节约自身能量的一种策略。

与 RGV 相比较,SCSV 虽也可通过出芽释放部分成熟的病毒颗粒,但出芽的病毒量并不大,绝大多数 SCSV 是在宿主细胞崩解后才离开宿主细胞的。经透射电镜观察病毒感染的组织和细胞超薄切片,或经光镜观察病毒感染细胞的染色样品,显示部分水生动物病毒可在其宿主细胞内形成包涵体^[12]。人们已认识到包涵体结构可作为病毒复制和装配的工厂,是细胞内增殖病毒的活性中心。经扫描电镜观察的结果进一步证实,包涵体对病毒有一定的保护作用。SCSV 可以包涵体的形式存在于宿主细胞内,因此以出芽方式从完好的宿主细胞膜上释放的病毒量较少,能逃避或减少宿主的免疫作用,只有当病毒扩增到一定量的时候,才会突然大量释放,使宿主难以防备。由此还可推测,SCSV 病毒的潜伏期可能较长,但危害性更大,应该特别关注。

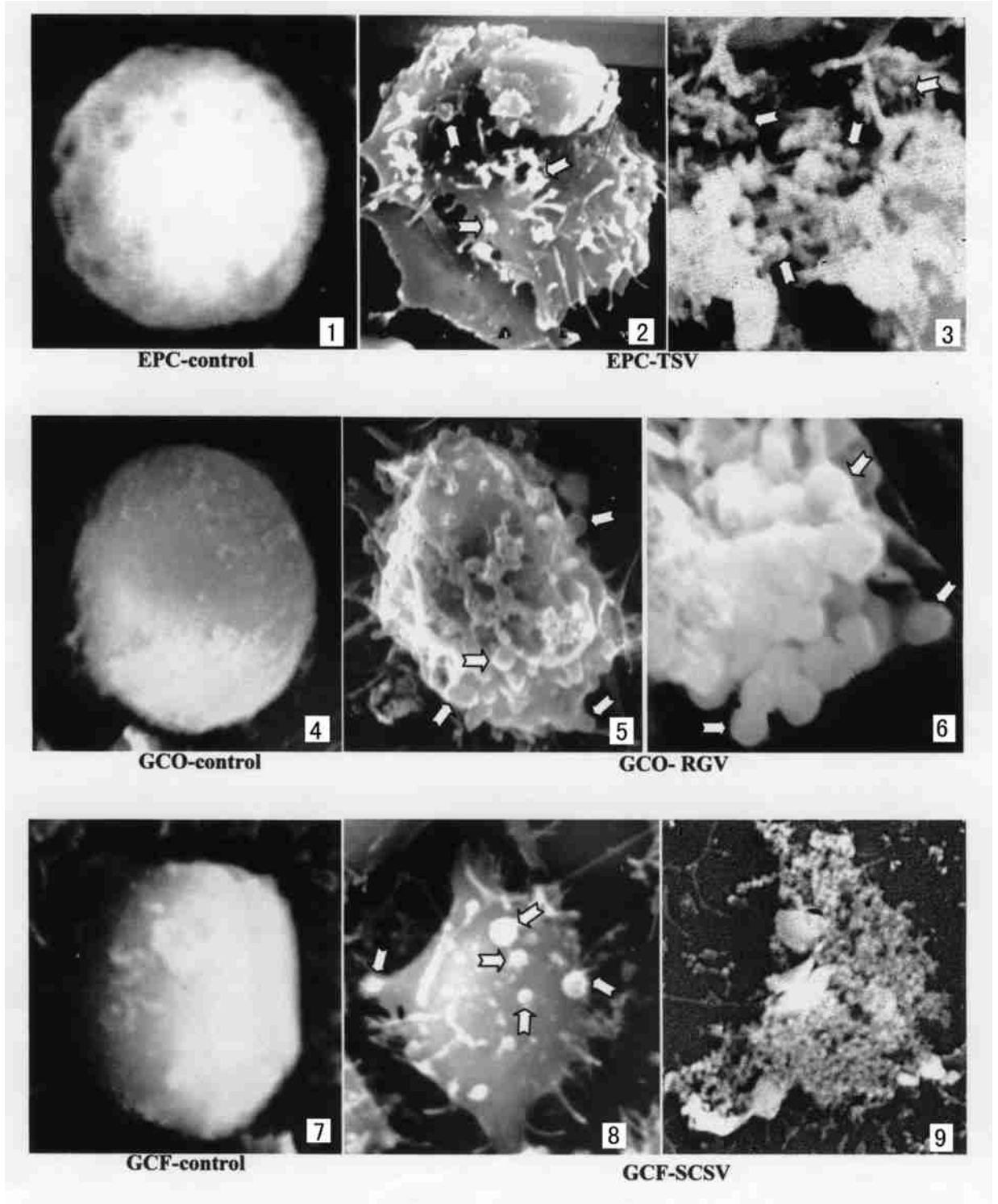
参考文献:

- [1] 张奇亚,李正秋,江育林,等. 中华鳖病毒病原的发现[J]. 科学通报,1996,41(21):1987-1990.
- [2] 张奇亚,李正秋. 在患病鳊鱼组织中观察到三种病毒[J]. 科学通报,1999,44(2):192-195.
- [3] Zhang Qi-ya, Jiang Yu-lin, Li Yan, et al. Isolation and characterization of nucleocapsids and enveloped virions of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1998, 22 (Suppl):1-5.

- [4] Zhang Qi-ya, Li Zheng-qiu, Gui Jian-fang. Studies on morphogenesis and cellular interactions of *Rana grylio* virus in an infected fish cell line [J]. *Aquac*, 1999, 175:185 - 197.
- [5] Zhang Qi-ya, Li Zheng-qiu, Gui Jian-fang. Isolation of a lethal rhabdovirus from the cultured Chinese sucker *Myxocyprinus asiaticus* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 42(1):1 - 9.
- [6] 姜明, 范瑞青, 汝少国, 等. 一种真鲷球形病毒的形态及细胞病理学电子显微镜观察[J]. *水产学报*, 2000, 24(1):52 - 55.
- [7] 彭贵洪, 张立人, 陈隶华, 等. 木毒鹅核型多角体病毒形态结构及理化性质的研究[J]. *中国病毒学*, 1995, 10(2):147 - 154.
- [8] Granzow H, Weiland F, Fichtner D, et al. Studies of the ultrastructure and morphogenesis of fish pathogenic virus grown in cell culture [J]. *J Fish Dis*, 1997, 20:1 - 10.
- [9] Wolf K. *Fish virus and fish viral diseases* [C]. Ithaca, NY: Cornell University Press. 1988, 459 - 472.
- [10] 杨先乐. 鱼类组织培养的回顾与展望[J]. *水产学报*, 1999, 23(增刊):75 - 81.
- [11] 蔡完其, 孙佩芳, 刘至治. 中华鳖爱德华氏菌病原和组织病理研究[J]. *水产学报*, 1997, 21(4):428 - 433.
- [12] 张奇亚, 李正秋. 胭脂鱼弹状病毒包涵体在培养细胞中的形成[J]. *中国兽医学报*, 2001, 21(1):38 - 41.

www.cnki.net

张奇亚等:三种水生动动物病毒感染鱼类细胞的扫描电镜观察



不同水生动动物病毒感染鱼类细胞的扫描电镜照片。可见成熟的病毒粒子从感染细胞中释放出来(箭头所示):
 1. 正常 EPC 细胞, $\times 2000$; 2.、3. TSV 感染的 EPC 细胞, $\times 2000$; 4. 正常的 GCO 细胞, $\times 2000$; 5. RGV 感染的 GCO 细胞, $\times 2000$;
 6. RGV 感染的 GCO 细胞, $\times 3000$; 7. 正常的 GCF 细胞, $\times 2000$; 8. SCSV 感染的 GCF 细胞, $\times 3000$; 9. SCSV 感染的 GCF 细胞,
 $\times 800$