# 白斑综合症病毒与对虾血淋巴细胞的体外结合实验

宋晓玲[1]　梁　艳[2]　黄　[1]　解飞霞[2]
(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛　266071; 2. 中国海洋大学, 青岛　266003)

摘要: 通过差速离心和蔗糖密度梯度离心, 从感染了白斑综合症病毒(WSSV)的病虾头胸部分离了 WSSV, 利用地高辛对病毒蛋白进行了标记(DIG-WSSV), 以体外培养的对虾血淋巴细胞为吸附基底, 观察和分析了病毒与细胞间的结合现象及特性。以 NBT/BCIP 为酶反应显色底物观察到在细胞周围形成许多暗紫色颗粒, 证实病毒与细胞间存在着稳定的结合。以 OPD 为酶反应显色底物分析了结合反应的特性: 当 DIG-WSSV 维持恒定值时, 随着血淋巴细胞数量的增加结合显色增强, 细胞数量达到 $1.2\times 10^4$ cells/孔, 492nm 处的吸光值达到饱和; 当血淋巴细胞数量维持恒定值时, 随着 DIG-WSSV 蛋白含量的增加显色增强, 且在 DIG-WSSV 的蛋白浓度达到 4μg/孔时, 492nm 处的吸光值达到饱和; 未标记 WSSV 可竞争抑制血淋巴细胞与 DIG-WSSV 间的结合作用。进一步的研究得出: 4℃下, 随着结合时间的延长显色增强, 但继续延长结合时间显色反而减弱; 缓冲液的渗透压对结合结果影响甚微, 而酸性条件利于病毒与细胞间的结合。37℃孵育对病毒结合活性影响不大, 55℃和 70℃孵育可显著影响病毒的结合活性; 短时间超声波处理病毒可增加病毒结合能力, 长时间超声波处理可破坏病毒结合能力; 有机溶剂处理同样可破坏病毒结合能力, 其中尤以氯仿/甲醇的处理更为激烈; 不同的去垢剂对病毒结合活性的影响结果不同: SDS 和脱氧胆酸钠可以降低病毒的结合活性, 而 Triton X-100 和 NP-40 可以提高病毒的结合活性。

关键词: 白斑综合症病毒; 对虾; 血淋巴细胞; 结合
中图分类号: S945.4　　文献标识码: A　　文章编号: 1000-3207(2006)04-0386-08

对虾白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)具有很强的侵染性和复制能力, 可广泛感染大多数对虾属的成员、多种小型虾类、多种蟹类, 是目前引起养殖对虾暴发性大规模死亡的一种主要病毒[1,2]。被感染的细胞最先在对虾的胃、鳃和上皮组织的细胞中观察到, 感染随之扩散到对虾的其他组织中[3]。基因探针技术、PCR 扩增技术和免疫学方法已应用于该病毒的诊断和检测[4,5], WSSV 的主要结构蛋白以及基因组全序列也随之被报道[6,7]。

与对病毒本身较为详尽的研究相比较, 关于病毒的感染模式以及病毒与宿主间的相互作用方面的报道少了许多。最近, 有报道介绍 WSSV 的感染可诱导对虾宿主细胞凋亡[8], 高温可防御病毒的爆发[9]。加强对病毒感染与复制模式以及宿主对病毒的防御反应的了解, 建立控制病毒感染有效方法是恢复对虾养殖业的当务之急。例如, 从分子水平研究病毒与细胞之间的识别机制, 揭示病毒感染的分子机理, 进而可能找到阻断病毒感染和流行的关键技术[10]。从此目的出发, 建立了一个可分析病毒与宿主细胞间相互作用的方法, 具体内容报道如下。

## 1　材料和方法

**1.1　病毒提纯及标记**　感染 WSSV 的养殖中国对虾(编号 WSSV-010901), 2001 年 9 月采自青岛胶南琅琊台镇, 去除肝胰腺的头胸部, -70℃冻存。称取 5g 以上毒种, 加入适量体积 PBS(288.8mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl, 4.3mmol/L, $Na_2HPO_4\cdot 7H_2O$, 1.4mmol/L $KH_2PO_4$, pH7.7) 4000r/min 高速分散器匀浆; 匀浆液经反复差速离心(2000 r/min × 20min → 4000 r/min × 20min → 7000 r/min × 20min)回收上清; 加入蔗糖至终浓度 30%(W/W), 25000 r/min 离心 1.5h, 沉淀用 3mL PBS 重悬; 重悬液铺于 35%—65%连续蔗糖密度梯度

收稿日期: 2005-09-14; 修订日期: 2005-10-10
基金项目: 国家重点基础研究规划项目(G1999012002)资助
作者简介: 宋晓玲(1962—), 女, 河北省张家口市人; 副研究员; 研究方向: 水产养殖动物疾病学

上方,34000 r/min 离心 3h,收集在离心管中部、蔗糖密度46% —52% 间的3 条乳白色条带; 高速离心去除蔗糖并回收沉淀, PBS 重悬; 负染确定重悬液组成; Bradford 法测定重悬液蛋白含量; 在 5mg 蛋白含量的重悬液中加入 20mg/mL DIG-NHS (Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocaproic acid-N-hydroxysuccinimide ester, Roche) 50μL, 于室温温和震荡孵育 2h; Sephadex G-25 层析柱分离未反应 DIG-NHS; Bradford 法确定标记 WSSV(DIG-WSSV) 的蛋白浓度, – 70℃保存备用。

**1.2** 地高辛标记病毒感染活性的验证　将 18 只克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*, 平均体重 28.7g) 分为 3 组, 每组 6 尾。第一组注射 DIG-WSSV, 第二组注射未标记 WSSV, 第三组注射 2% NaCl。第二腹节注射感染, 100μL/尾。收集 3d 以后濒死螯虾, 先从心脏取血, 提取 DNA 作为模板用于 PCR 检测; Davidson's AFA 固定螯虾头胸部, 常规方法制片, 酸性苏木精/伊红染色, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察病理结果。

**1.3** 对虾血淋巴细胞原代培养　中国对虾(*Penaeus chinensis*), 体长 17—20cm; 凡纳对虾(*Penaeus vannamei*), 体长9—11cm, 日本对虾(*Penaeus japonics*), 体长20—22cm, 水族箱充气暂养待用。实验前对虾浸于含 150mg/L 高锰酸钾的 4℃海水中, 消毒 0.5h; 取出后将对虾体表海水吸干, 无菌条件下用 75% 酒精棉球擦拭; 围心窦采血(在无菌注射器内预先抽取等量 3.8% 柠檬酸钠抗凝); 1000r/min 离心 10min, 细胞沉淀用改良的 Grace 昆虫培养基(添加 18.9g/L 甜菜碱, 7g/L NaCl, 2.38g/L HEPES, 青霉素 100U/mL, 硫酸链霉素 100 mg/mL, 20% 热灭活胎牛血清) 悬浮, 血球计数板计数, 调节血淋巴悬浮液的细胞浓度, 分加到 96 孔细胞培养板内, 每孔 100μL, 27±1℃培养。

**1.4** 病毒与对虾血淋巴细胞的体外结合　选取培养了2—5d 生长良好的对虾血淋巴细胞与标记病毒进行体外结合, 方法由文献[11, 12] 改进, 具体操作如下: 细胞 4℃预冷 1h; 倒去培养基, PBS 洗去未贴壁细胞; 每孔加入 100μL DIG-WSSV(对照孔加入 100μL 不含 DIG-WSSV 的 PBS), 4℃孵育结合, PBS 洗去未吸附 DIG-WSSV; 每孔加入碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶标记 DIG 抗体 100μL (含 Anti-digoxigenin-AP 750mU/mL, 1% blocking reagent(W/V), 2% 灭活小牛血清的 TN 缓冲液; 或含 Anti-DIG-POD 150mU/mL, 1% BSA, 2% 灭活小牛血清的 PBS 缓冲液), 室温孵育 30min; 用 PBS 洗板 3 次; 加入酶底物显色液, 室温暗处显色。酶底物显色液分为两种: 一种为对应碱性磷酸酶的不溶性酶底物显色液, 显色液为含有 NBT 0.34mg/mL和 BCIP 0.175mg/mL 的 TN 缓冲液(Tris-HCl 100mmol/L, NaCl 100mmol/L, $MgCl_2$ 50 mmol/L), PBS 终止显色, 显微镜下观察显色结果; 一种为对应辣根过氧化物酶可溶性酶底物显色液, 显色液为含有 OPD 0.4mg/mL, 30% $H_2O_2$ 1.5μL/mL 的 $Na_2HPO_4$/柠檬酸缓冲液, 2M $H_2SO_4$ 终止显色, TECAN 连续酶标仪测定 492nm 处吸光值, Microsoft Excel 分析显色结果。

## 2　结果

### 2.1　病毒的纯化与标记

经反复差速离心、蔗糖垫离心和蔗糖密度梯度离心后纯化的病毒, 用 2% 磷钨酸染色, 在透射电子显微镜下清晰可见大量完整或不完整的病毒粒子, 在病毒粒子周围也可见到病毒囊膜碎片(图 1)。电子显微镜下的标记病毒与未标记病毒相比较, 未见到任何明显差异。

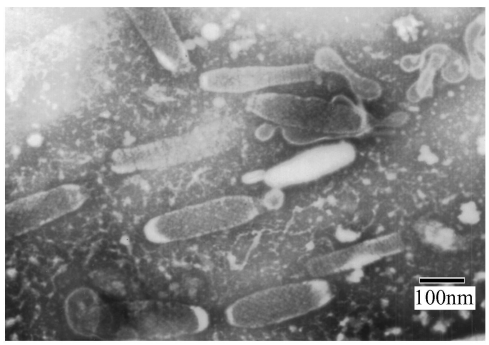



图 1　地高辛标记前病毒的负染电镜照片

Fig. 1　Transmission electron micrographs of WSSV after negative staining with 2% phosphotungstic acid

### 2.2　地高辛标记病毒的活性验证

用地高辛标记的 WSSV 注射感染的螯虾, 与未标记的 WSSV 注射感染的螯虾发病症状一致: 在从感染第 2d 起反应逐渐迟钝, 螯肢无力, 腹节卷曲, 3—8d 内相继死亡。以濒死螯虾血淋巴提取的 DNA 为模板, 经 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳, 紫外观测仪可见在 401bp 处有显著扩增条带。显微镜下检查组织病理切片, 在鳃上皮细胞中可以明显看到由 WSSV 感染引起的典型病理变化: 细胞核肿大, 程度不一的嗜碱性核中心包涵体被迁移到边缘的染色质所包围(图 2)。阳性对照组的濒死螯虾显示相同的组织病理变化。

### 2.3　标记 WSSV 与对虾血淋巴细胞原代培养物的体外结合

**2.3.1** 结合现象观察　以 NBT/BCIP 为底物, 通过

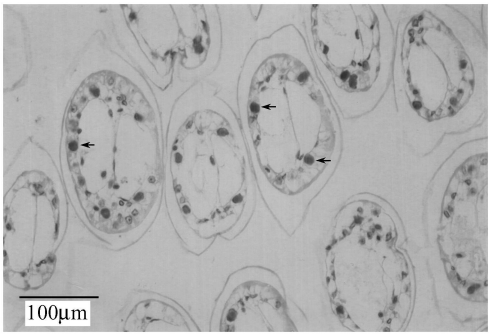



图 2 以DIG 标记WSSV 为毒种感染濒死螯虾鳃病理切片
(箭头示WSSV 感染细胞)

Fig. 2 Characteristics of WSSV lesions in the cuticular epithelium of the gill of *P. clarkia*, experimentally infected with DIG-WSSV Arrows indicate hypertrophied nuclei with intranuclear WSSV inclusions, H&E stain

酶联抗地高辛抗体的显色系统, 可以观察到实验孔(加入 DIG-WSSV) 血淋巴细胞的细胞表面被染成暗紫色, 而对照孔(加入 PBS) 血淋巴细胞未见任何显色(图3), 证实DIG 标记WSSV 与对虾血淋巴细胞之间发生稳定的结合。中国对虾、日本对虾和凡纳对虾血淋巴细胞与标记 WSSV 的结合结果未见明显差异。

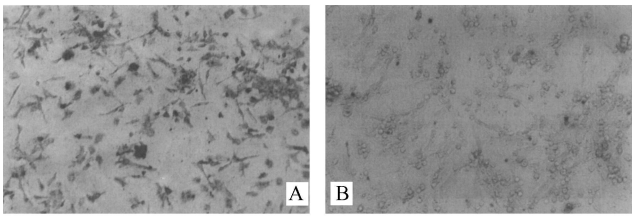



图3 对虾血淋巴细胞与 DIG-WSSV 体外结合结果的显微观察
(A. DIG-WSSV, B. 对照)

Fig. 3 Micrographs of binding between DIG-WSSV and hemocytes of *P. vannamei* by anti-digoxigenin-AP conjugated NBT/BCIP. A: DIG-WSSV, B: Negative control

**2.3.2** 细胞数量和病毒蛋白含量对结合结果的影响 以 OPD 为底物, 通过酶联抗地高辛抗体的显色系统, 可以分析 DIG 标记 WSSV 与对虾血淋巴细胞之间的结合特性。

血淋巴细胞的细胞数量对结合结果的影响见图4, 验证细胞数量对结合结果的影响时 DIG-WSSV 的蛋白含量是一致的, 为每孔 16.2μg。从图4 的结果可以看出, 随着细胞数量的增加吸光值也随之增加, 当每个培养孔的细胞数量达到 $1.2\times10^4$cells 时, 随着细胞数量的增加吸光值维持在较为恒定的数值。

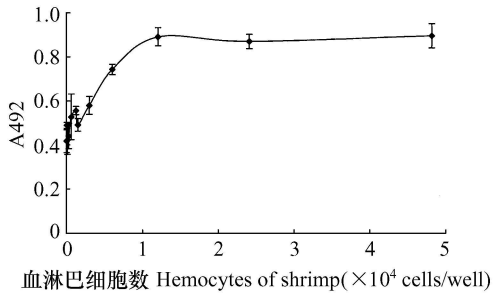



图 4 血淋巴细胞数量对 DIG-WSSV 与对虾血淋巴结合的影响

Fig. 4 Influence of hemocyte quantity on binding between DIG-WSSV and hemocytes of *P. vannamei*

病毒蛋白浓度对结合结果的影响见图5, 验证标记病毒蛋白含量对结合结果的影响时细胞的数量是一致的, 为每孔 $1.6\times10^4$cells。从图5的结果可以看出, 随着 DIG-WSSV 蛋白含量的增加吸光值迅速增加, 当 DIG-WSSV 达到 4μg 以上吸光值不再明显增加并维持在较为恒定的数值。

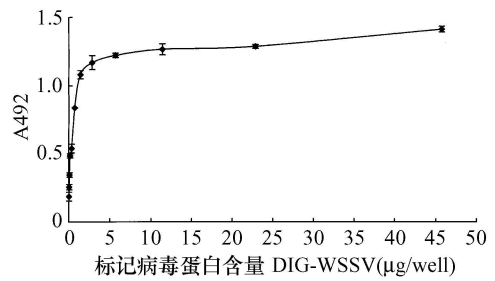



图 5 病毒蛋白含量对 DIG-WSSV 与对虾血淋巴结合的影响

Fig. 5 Influence of viral protein concentration on binding between DIG-WSSV and hemocytes *P. vannamei*

显然, 细胞数量和标记病毒量都会对结合结果产生影响, 其中标记病毒量(以蛋白含量为单位) 对结合结果的影响作用远大于细胞数量的影响。这是由病毒与对虾血淋巴细胞之间个体大小的悬殊差异造成的。

**2.3.3** 病毒对结合的竞争抑制作用 体外培养的对虾血淋巴细胞先与未标记的 WSSV 预结合, 充分震荡清洗后, 加入 DIG-WSSV 进行第二次结合, 竞争结合的结果见图6, 其中横坐标为未标记的WSSV 的蛋白含量, 而细胞量和 DIG-WSSV 为恒量, 分别为每孔 $1.6\times10^4$cells 和 1.6μg。从图6 结果可看出: WSSV 的蛋白含量在 1.7μg 以下时, DIG-WSSV 与对虾血淋巴细胞间发生结合现象, 且这种结合随着 WSSV 蛋白含量的递减而递增; 当 WSSV 的蛋白含量超过 1.7μg 后, DIG-WSSV 与对虾血淋巴细胞间的结合就难以观察到了。

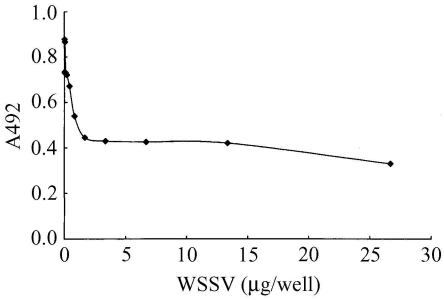



图 6　未标记病毒与标记病毒间的竞争结合实验

Fig. 6　Competetion of unlabeled WSSV with DIG-WSSV for hemocyte binding sites *P. vannamei*

**2.4**　最适结合条件的筛选

以 1.5× $10^5$ cells 的对虾血淋巴细胞与蛋白含量为 100μg 的标记病毒进行体外结合, 反应在 96 孔细胞培养板上进行(见 1.4), 通过改变结合条件, 测定了温度、pH 和渗透压等对结合结果的影响。

**2.4.1**　结合时间对结合结果的影响　不同的结合时间结合的结果也不同(图 7)。从 10min 到 40min 之内, 随着结合时间的延长显色结果加深; 继续延长结合时间, 显色反而减轻, 并在 50 —60min 间呈现明显下降趋势。

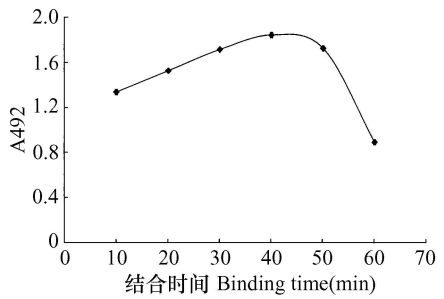



图 7　结合时间对 DIG-WSSV 与对虾血淋巴结合的影响

Fig. 7　Time-lapse study of binding between DIG-WSSV and hemocytes of *P. vannamei*

**2.4.2**　**pH** 对结合结果的影响　调整结合缓冲液(PBS)的 pH 值, 测定了 pH 对结合结果的影响。结合的结果显示, 不同 pH 的结合缓冲液结合的最终显色结果有所差异, 并在 pH = 6.5 时达到最高值, 且酸性结合条件明显优于碱性结合条件(图 8)。

**2.4.3**　渗透压对结合结果的影响　以 NaCl 调节结合缓冲液的渗透压浓度, 分析渗透压对 WSSV 与对虾血淋巴细胞间的结合的影响。实验结果显示, 渗透压自 22.5mOsmol/L 至 1000mOsmol/L 间对结合结果影响甚微。

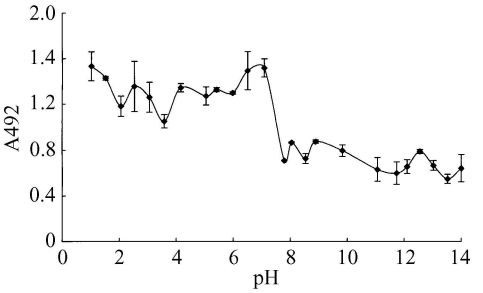



图 8　结合缓冲液的 pH 对 DIG-WSSV 与对虾血淋巴结合的影响

Fig. 8　Influence pH on binding between DIG-WSSV and hemocytes of *P. vannamei*

**2.5**　物理和化学方法处理对病毒结合力的影响

DIG-WSSV 预先经温度、超声波、有机溶剂、去垢剂等物理或化学处理, 再与对虾血淋巴细胞体外结合, 来进一步分析物理或化学处理对病毒结合能力的影响。每一个结合实验中, 血淋巴细胞数和 DIG-WSSV 量分别控制在 1.5× $10^4$ 细胞/孔和 10μg/孔, 结合温度为 4℃。

**2.5.1**　温度处理对病毒结合能力的影响　与体外培养的对虾血淋巴细胞结合之前, DIG-WSSV 在不同的温度下分别孵育不同时间, 借以分析温度处理是否会对病毒的结合能力产生影响。实验结果显示, 37℃孵育对病毒的结合能力影响不大, 而 55℃和 70℃孵育只需 10min 就会显著降低病毒的结合能力(图 9)。

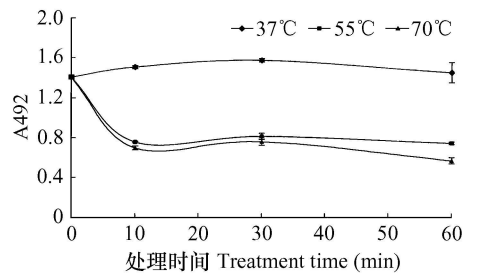



图 9　不同温度处理对 DIG-WSSV 结合活性的影响

Fig. 9　Influence of temperature treatment on binding activity of DIG-WSSV with hemocytes of *P. vannamei*

**2.5.2**　超声波处理对病毒结合力的影响　DIG-WSSV 预先经超声波处理再与对虾血淋巴细胞结合, 结合结果见图 10。从图 10 中可以看出, 超声波轻微处理病毒可扩大病毒与细胞的结合能力, 随着处理时间的延长(> 10s) 病毒的结合能力降低。

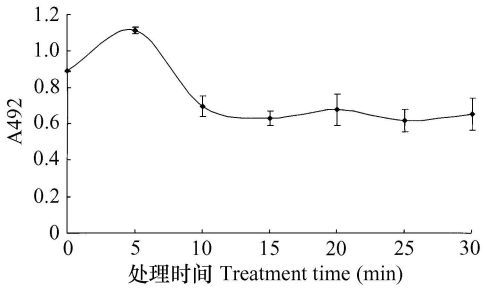



图 10 超声波处理对 DIG-WSSV 结合活性的影响

Fig. 10 Influence of ultrasonic treatment on binding activity of DIG-WSSV with hemocytes of *P. vannamei*

**2.5.3** 有机溶剂处理对病毒结合力的影响 DIG-WSSV 预先分别经等体积氯仿/甲醇(氯仿: 甲醇: $H_2O$ = 65: 25: 5)和等体积乙醚抽提 3 次, 离心后分离的水相再与对虾血淋巴细胞结合, 结合的结果见图 11。从图中结果可以看出, 有机溶剂处理明显降低了病毒的结合能力, 且以氯仿/甲醇的处理更为激烈。

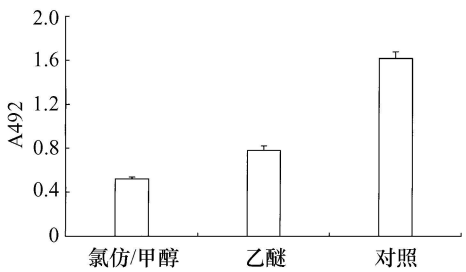



图 11 有机溶剂处理对 DIG-WSSV 结合活性的影响

Fig. 11 Influence of organic solvent treatment on binding activity of DIG-WSSV with hemocytes of *P. vannamei*

**2.5.4** 去垢剂处理对病毒结合力的影响 作者选择了 SDS、NP-40、Triton X-100 和脱氧胆酸钠 4 种常见去垢剂与 DIG-WSSV 在 37℃孵育 1h, 再与对虾血淋巴细胞结合, 其作用浓度和结合显色结果见图 12。SDS 和脱氧胆酸钠的作用结果相近, 低浓度处理病毒(0.1%)可提高病毒的结合能力; 当浓度达到 0.5%时病毒结合能力显著降低, 继续提高其作用浓度, 病毒结合能力维持在这一范围, 变化不大(图 12-A)。NP-40 和 Triton X-100 在 5%的范围内处理病毒, 均可显著提高病毒的结合能力, 2 种去垢剂的差异表现在低浓度(0.1%)处理病毒时, NP-40 可更显著提高病毒结合能力, 而 Triton X-100 与未处理组相比较却略有降低(图 12-B)。

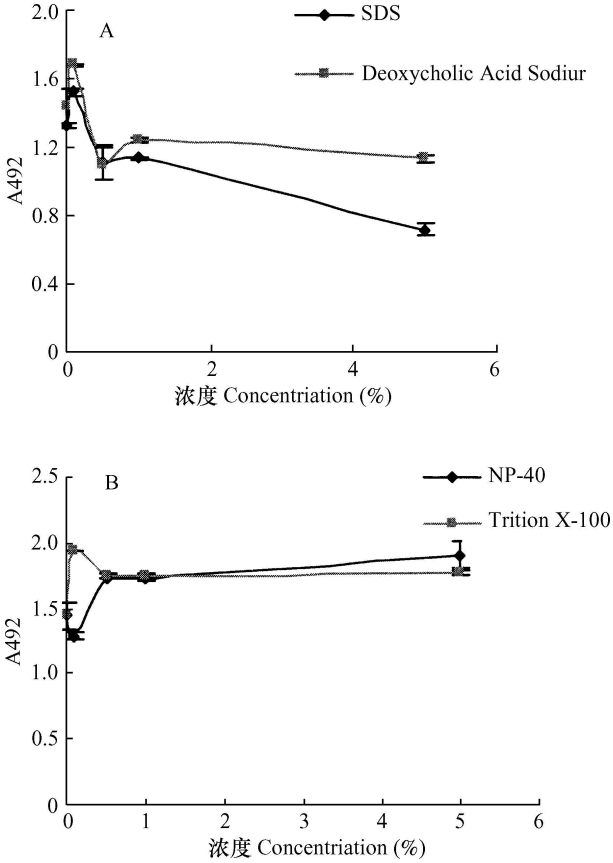



图 12 去垢剂处理对 DIG-WSSV 结合活性的影响

Fig. 12 Influence of detergents treatment on binding activity of DIG-WSSV with hemocytes of *P. vannamei*

## 3 讨论

对于有包膜的病毒, 其包膜除了保护其病毒粒子免受外界环境不利因素的影响外, 还在病毒吸附、细胞融合以及抗原性质等方面有着不同的功能。尤其是病毒包膜糖蛋白突起作为吸附蛋白, 直接影响到病毒粒子的吸附和侵入, 同病毒感染成功与否密切相关。目前, 已证实 WSSV 包膜蛋白 VP28 的兔抗血清可抑制斑节对虾感染 WSSV[11], 原核表达的 VP28 与天然蛋白具有相似的免疫原性[12], 其单链抗体具有很高的 WSSV 结合活性[13]。研究病毒与宿主细胞间吸附作用的存在与否及其特性, 选择正确的病毒蛋白的标记方法是前提。地高辛是常用的蛋白质标记物, 它与蛋白质组分的氨基酸 $NH_2$ 端稳定结合, 通过其特定的抗体反应及底物显色系统示踪。实验结果可通过固相底物系统, 利用光学显微

镜直接观察; 也可通过液相底物系统, 利用吸光值读取设备, 如酶标分析仪记录分析实验结果。由于克氏原螯虾具有来源广泛、饲养简单和感染结果稳定等优势, 目前多应用于 WSSV 的实验室增殖和人工感染研究[14]。病毒经地高辛标记仍可感染健康的克氏原螯虾, 且被感染动物呈现的病理变化与未标记病毒感染后呈现的病理变化相同, 首先确认标记不会影响病毒的感染活性。

对虾组织细胞培养的研究工作起始于 20 世纪 60 年代, 虽然细胞系至今尚未成功建立, 但对虾多种组织的原代细胞如造血组织细胞、血淋巴细胞、心脏上皮细胞、类淋巴细胞体外培养时易贴壁, 并可在人工培养条件下维持较长的存活时间, 可作为观察病毒与细胞间相互作用的理想材料[15—17]。本研究利用原代培养的对虾血淋巴细胞, 作为病毒结合的基质细胞。由于对虾血淋巴细胞是 WSSV 感染的敏感细胞, 且细胞量大, 采集简便易行, 可以控制合适的细胞数量, 细胞可贴壁存活, 生长状况较为一致, 在洗涤过程中不宜脱落, 且显色结果稳定, 满足了病毒与细胞之间结合现象的观察与分析。作者在实验中还发现: 除了良好的细胞生长状况, 足够的细胞数量不仅可以为病毒提供一定的吸附基质, 同时也是体外培养成功的前提。如果细胞数量偏少, 即使已为细胞培养提供了较好的无菌条件, 血细胞仍然较易污染, 无法进行下一步结合实验。这是由于对虾为开放式循环系统, 其血淋巴在正常情况下含有一定数量的细菌和真菌[18], 在细胞数量优势不明显时, 这部分细菌或真菌易繁殖起来, 试验无法进一步进行。

病毒吸附于敏感细胞需要病毒表面特异性的吸附蛋白与细胞表面的病毒受体相互作用, 吸附是启动病毒感染的第一步, 它也是决定病毒感染成功与否的关键环节。病毒吸附蛋白与宿主细胞表面受体的特异性结合现象, 可通过病毒与细胞的体外结合试验来观察分析。结合实验的结果显示: 一定量的 DIG-WSSV 需要结合一定量的细胞, 同样一定量的细胞也需要一定量的 DIG-WSSV 结合。这一结果验证细胞表面的病毒受体的数量是有限的。在竞争实验中, 当非标记 WSSV 存在时会占有部分或全部受体, 使得标记 WSSV 与宿主细胞的结合几率降低。这一竞争抑制现象同样验证了细胞表面受体数目的有限性, 并证实 WSSV 与宿主细胞间的结合是特异性的、稳定的结合。由于没有合适的细胞系来扩增 WSSV, 无法定量病毒的浓度。

病毒与宿主细胞间的结合可受到结合时间、温度、pH、无机盐离子浓度等因子的影响。本文选择 4℃为结合温度, 这是考虑低温下病毒不易进入细胞内部的原因。因为一旦病毒进入细胞内部, 由于细胞膜的屏障作用, 病毒就无法检测到了[19]。随着结合时间的增加, 可以与细胞结合的病毒量也会随之增加。但继续延长时间, 反而会减少, 60min 时的吸光值仅为 40min 的一半。作者认为可能有两个原因造成时间延长结合显色反而降低; 一是随着结合时间的延长, 部分病毒进入细胞内部; 二是随着时间的推移部分与细胞的结合病毒由于酶的作用, 或是血淋巴本身的抗逆和防御作用而解离。

不同物理处理方式会对 WSSV 的感染活性产生显著影响。黄 等报道 WSSV 经 56℃ 30min 处理, 病毒就会失去感染能力[20]。Maeda 等报道 WSSV 经过 50℃或更高温度处理 20min, 病毒失去感染活性, 但如果处理的温度不超过 40℃, 病毒就不会失去感染活性[21]。本实验中 DIG-WSSV 经过 56℃和 70℃孵育后失去了其结合活性, 可见病毒的结合活性与其感染活性是一致的。

几乎所有蛋白质电泳分析都需在聚丙烯酰胺凝胶上进行, 而所有条件总要确保蛋白质解离成单个多肽亚基, 并尽可能减少其相互间的聚集。将强阴离子去垢剂( 如 SDS) 与还原剂并用是最常用的方法。同时, 由于膜蛋白的蛋白质分子是嵌埋在磷脂双层中的, 因而膜蛋白纯化的关键步骤是选择一种能溶解这种蛋白质但又不会使它变性的去垢剂。因而去垢剂的正确选择和使用是病毒与细胞间吸附分析及进而病毒细胞受体的分离和分析的基础。但不同的作用浓度其影响结果也不尽相同。同时, 不同浓度的去垢剂作用于病毒后, 与细胞结合的病毒并未除去残留的去垢剂。而残留去垢剂是否影响受体与配基的结合, 从而进一步影响结合显色结果。

本研究从细胞水平上观察和分析了 WSSV 与对虾血淋巴细胞间的结合现象, 及其结合作用的阻遏和激活因子。WSSV 与对虾的血淋巴细胞间特异性结合现象的存在, 提示对虾细胞膜有介导病毒吸附与结合的特定结构 ——受体。本实验的结果将为病毒细胞受体的性质及进一步分离鉴定提供理论基础, 进一步的研究工作尚在进行之中。

参考文献:

[1] Huang J, Song X L, Yu J, *et al*. Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis-study on the pathogen and pathology of the

explosive epidemic disease of shrimp [J]. *Marine Fisheries Research*, 1995, **16**(1): 1—10[黄 , 宋晓玲, 于佳, 等. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死-对虾暴发性流行病的病原和病理学. 海洋水产研究, 1995, **16**(1): 1—10]

[2] Flegel T W. A turning point for sustainable aquaculture: the white spot virus in Asian shrimp culture [J]. Aquaculture Asia, 1996, **1**: 29—34

[3] Chang P S, Lo C F, Wang Y C, *et al*. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization [J]. *Dis Aquat Org*, 1996, **27**: 131—139

[4] Lo C F, Leu J H, Ho C H, *et al*. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction [J]. *Dis Aquat Org*, 1996, **25**: 133—141

[5] Nadala E C B, Tapay L M, Loh P C. Characterization of a non-occluded baculovirus-like agent pathogenic to penaeid shrimp [J]. *Dis Aquat Org*, 1998, **33**: 221—229

[6] van Hulten M C W, Witteveldt J, Peters S, *et al*. The white spot syndrome virus DNA genome sequence [J]. *Virology*, 2001, **286**: 7—22

[7] Yang F, He J, Lin X H, *et al*. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus [J]. *Journal of Virology*, 2001, **75**: 11811—11820

[8] Granja C B, Aranguren L F, Vidal O M, Aragón L, Salazar M. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*? [J] *Dis Aquat Org*, 2003, **54**: 73—78

[9] Vidal O M, Granja C B, Aranguren F, *et al*. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus [J]. *J World Aquacul Soc*, 2001, **32**: 364—372

[10] Schneider-Schaulies J. Cellular receptors of virus: link to tropism and pathogenesis [J]. *J Gen Virol*, 2000, **81**: 1413—1429

[11] van Hulten M C W, Witteveldt J, Snippe M, *et al*. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp [J]. *Virology*, 2001, **285**: 228—233

[12] Zhao X Y, Wei C, Dai L F, *et al*. Research on the prokaryotic expression and characteristics of VP28, a structure protein of *Penaeus monodon* white spot syndrome virus [J]. *Acta hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(3): 234—239[赵新颜, 魏聪, 戴玲芬, 等. 对虾白斑综合症病毒结构蛋白 VP28 的原核表达和性质研究. 水生生物学报, 2004, **28**(3): 234—239]

[13] Cao H, Zhou Y F, Zhang X H, *et al*. Expression of scfv-A1 of against-white spot syndrome virus (WSSV) in yeast *Pichia pastoris* [J]. *Acta hydrobiologica Sinica*. 2004, **28**(5): 531—534[曹宏, 周亚凤, 张晓华, 等. 抗对虾白斑综合症病毒单链抗体 A1 基因在酵母中表达及其与抗原结合活性. 水生生物学报, 2004, **28**(5): 531—534]

[14] Huang C H, Zhang L R, Zhang J H, *et al*. Purification and characterization of White Spot Syndrome Virus (WSSV) produced in an alternate host: crayfish, *Cambarus clarkii* [J]. *Virus Research*, 2001, **76**: 115—125

[15] Chen S N, Wand C S. Establishment of cell culture systems from penaeid shrimp and their susceptibility to white spot disease and yellow head viruses [J]. *Methods in Cell Science*, 1999, **21**(4): 199—206

[16] Itami T, Maeda M, Kondo M, *et al*. Primary culture of lymphoid organ cells and haemocytes of Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* [J]. *Methods in Cell Science*, 1999, **21**(4): 237—244

[17] Bangrak P, Graidist P, Chotigeat W, *et al*. A syntenin-like protein with postsynaptic density protein (PDZ) domains produced by black tiger shrimp *Penaeus monodon* in response to WSSV infection [J]. *Dis Aquat Org*, 2002, **49**: 19—25

[18] Ellender R D, Najafabadi A K, Middlebrooks B L. Observations on the primary culture of haemocytes of *Penaeus* [J]. *J Crustacean Biol*, 1992, **12**: 178—185

[19] Hefferon K L, Oomens A G P, Monsma S A, *et al*. Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry [J]. *Virology*, 1999, **258**: 455—468

[20] Huang J, Cai S L, Song X L, *et al*. Study on artificial infection for *Penaeus chinensis* by the pathogen of the explosive epidemic disease of shrimp [J]. *Marine Fisheries Research*, 1995, **16**(1): 51—58[黄 , 蔡生力, 宋晓玲, 等. 对虾暴发性流行病病原的人工感染研究. 海洋水产研究. 1995, **16**(1): 51—58]

[21] Maeda M, Kasornchandra J, Itami T, *et al*. Effect of Various Treatments on White Spot Syndrome Virus (WSSV) from *Penaeus japonicus* (Japan) and *P. monodon* (Thailand) [J]. *Fish Pathology*, 1998, **33**(4): 381—387

# *IN VITRO* BINDING BETWEEN WHITE SPOT SYNDROME VIRUS AND HEMOCYTES OF PENAEID SHRIMP

SONG Xiao-Ling[1], LIANG Yan[2], HUANG Jie[1] and XIE Fei-Xia[2]

(1. *Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao* 266071; 2. *China Ocean University, Qingdao* 266003)

**Abstract:** White spot syndrome virus (WSSV) was isolated from the cephalothorax of infected *Penaeus chinensis* by differential centrifugation and then labeled by DIG-NHS in order to test whether it could bind to hemocytes of penaeid shrimp *in vitro*. Using an NBT/BCIP color detection system, dark purple grains were seen around cells by light microscopy and indicated stable binding between DIG-WSSV and hemocytes. Characterization of binding by holding the concentration of DIG-WSSV constant and measuring absorption at 492nm with a perroxidase (POD) detection system revealed that binding increased gradually as the quantity of hemocytes increased. Saturation was reached at $1.2 \times 10^4$ hemocytes per well. If the quantity of hemocytes was held constant, absorption (binding) increased gradually as the quantity of DIG-WSSV increased and saturation was reached at 4μg protein/well. Addition of sufficient unlabeled WSSV completely blocked this binding. Further analysis revealed that absorption at 4℃ increased with incubation time up to 40 min after which it decreased with prolonged incubation. Osmolarity of the binding buffer had little influence on binding while pH in the acid range promoted it. Incubation at 37℃ did not affect binding but at 55 and 70℃, it was reduced. Short term ultrasonic treatment increased binding but long term treatment reduced binding. Organic solvents reduced binding and this was particularly strong with chloroform/methyl alcohol. With respect to detergents, SDS and deoxycholic acid sodium salt decrease binding but Triton X-100 and Nonidet P-40 increased it.

**Key words:** White spot syndrome virus (WSSV); Penaeid shrimp; Hemocytes; Binding