

综 述

对虾病毒的分离纯化和检测方法研究进展

ADVANCES ON PURIFICATION AND EXAMINATION OF VIRUSES IN PENAEID SHRIMP

王安利 李文利

Wang An-Li, Li Wen-Li

(河北大学生物学系, 保定 071002)

(Department of Biology, Hebei University, Baoding 071002)

孙儒泳

Sun Ru-Yong

(北京师范大学生物学系, 100875)

(Department of Biology, Beijing Normal University, 100875)

关键词 对虾, 病毒, 分离纯化, 检测

KEYWORDS penaeid shrimp, virus, purification, examination

中图分类号 S945.4

对虾病毒的研究始于本世纪70年代[Couch 1974],全世界现已发现的对虾病毒至少在18种以上[陈细法等 1997]。自1993年我国沿海地区暴发大面积养殖对虾病毒性流行病以来,病毒病的不断发生与传播已给我国养虾业造成了空前的危害,全国养殖对虾产量从1992年的220 000t跌至1993年的87 000t和1994年的53 000t[石拓等 1998]。1995~1997年养殖对虾的产量仍在低水平线上徘徊。时至1998年6月上旬,在未采用对虾病毒病综合防治技术[Wang A L和 Wang W N 1996]的大部分养虾区,当养殖对虾体长达到30~40mm时即纷纷死亡。虾病不仅未随时间的推移有所减轻,而且还呈现出发病提早和死亡率高的趋势。因此,高效实用的预防措施和快速准确的病毒病原分离检测技术已成为虾病防治和对虾病毒学研究中的热点。

1 对虾病毒的分离纯化

对于一种新病毒的认识,首先必须获得一定量纯病毒颗粒。但由于至今尚未建立起室内感

染系统,还无法借此得到病原材料。因而当前迫切任务之一仍是进一步改进病毒提纯技术,以提高检测手段的实用性和灵敏度[薛清刚等 1996,涂小林等 1996]。

目前,国内外有关对虾病毒的分离纯化方法可归纳为三大类。①蔗糖或氯化铯梯度超速离心法。90年代初,一些学者利用蔗糖或氯化铯梯度超速离心法得到病毒粒子[Sun 等 1993, Chang 等 1993a]。90年代后期,孔杰等[1997]对病虾头部组织以6000 r/min(4350g)匀浆,6000 r/min 与10000 r/min(15300 g)差速离心,再经10%~15%蔗糖密度梯度离心,得到了形态完整的C型杆状病毒粒子;陈细法等[1997]取发病典型且镜检带有淋巴样细胞核型杆状病毒(LNBV)的日本对虾和中国对虾的头胸部捣碎匀浆,并反复冻融,15000 g 低温离心20 min,上清液经70000 g 低温超离心3h 和20%~50%连续蔗糖离心2h,获得纯净的病毒悬液(病毒粒子大小平均为240nm×100nm)。石拓等[1998]先将冰冻病虾虾头去除头胸甲,再加入适当体积的PPB缓冲液(NaCl 24g/L、K₂SO₄1.1g/L、CaCl₂0.8g/L、MgSO₄·7H₂O 1.6g/L、NaH₂PO₄·2H₂O 1.35g/L、NaHCO₃0.05g/L、pH 6.5~6.8),匀浆低速离心去粗渣;上清7000g 离心15min,所得液相铺于蔗糖梯度(25%、30%、35%、45%,W/W)上,100000g 离心3h,取出梯度中的乳白色区带,用适当体积PPB稀释,超速离心去蔗糖则可得到悬于PPB中的病毒粒子(320~400nm×100~300nm)。②蛋白酶抑制剂及差速和高速离心法。美国Lightner实验室多次试图分离包涵体,均未获成功[Bonami 等 1990, Bruce 1991, Mari 等 1993];Chang 等[1993b]报道在氯化铯超速离心分离病毒过程中得到了部分包涵体,杨丰等[1995]利用蛋白酶抑制剂防止包涵体破坏,通过差速和高速离心得到了高纯度MBV包涵体;Zhang[1995]采用温和的病毒分离技术,完成了MBV核衣壳和有包膜病毒颗粒的分离及定性研究,从病毒感染的斑节对虾肝胰腺中分离到两种有包膜的形态大小不同的完整病毒颗粒和一种形态大小均一的病毒核衣壳。王金星等[1997]利用不同地区典型病虾的头胸部和肝胰腺,通过差速和超速离心,进行了病原的分离纯化,得到了长度为380~410nm 直径为90~100nm 的杆状病毒颗粒。③酒石酸钾—甘油密度梯度离心法。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,从中国对虾病虾肝胰组织中,对肝胰腺细小病毒进行了纯化,获得了良好的纯化效果。

2 对虾病毒的检测方法

2.1 传统组织学方法

即随机或非随机从虾池中取对虾或对虾粪便直接作湿标本检查,配合使用适当的染色技术,在光镜下进行快速检测(见下表)。

在感染HPV(病变较轻时)的病虾切片中,可见核内包涵体在形成早期为轻度嗜酸性,H-E染色为紫红色;而在后期则为嗜碱性,H-E染色为蓝紫色。这是HPV的一个特征,可供诊断时参考[王克行等 1994]。

但值得注意的是,由于某些病毒存在于正常虾体中使对虾终生带毒而不发生病毒病(如斑节对虾可终生携带MBV),因此检测到病毒也不能就一定推断成病毒病[陈细法等 1996]。

病 毒	传统组织学方法	采 用 者
MBV	0.5%孔雀绿染色	Lightner 等,1983a
	压片、涂片、苏木精-伊红染色	Vickers 等,1994
	姬姆萨染色、孚尔根染色	徐利生等,1993
	Brown&Breen's Gram 染色	孟庆显,1992
	0.001%焰红染色,荧光显微镜观察	Thurman,1990
BPV	粪便直接镜检,用显微镜亮视野或相差法	陈秀男等,1990;Nash,1988
	0.001%焰红染色,荧光显微镜观察,苏木精-伊红染色(H-E)	Thurman,1990
BMNV	孚尔根染色;暗视野显微镜	Overstreet 等,1988
IHHNV	孚尔根染色	Momoyama,1983,1988
HPV	压片、涂片、姬姆萨染色	Lightner 等,1983b
	台盼蓝-伊红染色(T-E)	Lightner 等,1993
		黄捷等,1995a;黄捷和于佳,1995

2.2 电子显微技术

中外学者研究与检测病毒在宿主对虾组织细胞中的分布、感染、病变以及病毒是否具有囊膜与包涵体等均采用了电子显微技术[Couch 1974,Lightner 和 Redman 1981,1985,Lightner 等 1983a,1987,Roubal 1989,Thurman 1990,邹国祥等 1994,陈细法等 1995,严隽箕 1995,姜明等 1996,包振民等 1997,王安利等 1997,王维娜等 1997,石拓等 1998]。

王斌等[1996]、石拓等[1998]分别报导了中国对虾一种病原病毒负染法电镜检测技术,认为负染法可作为对虾暴发性流行病的诊断方法;张建红和黄灿华[1996]描述了一种电镜诊断快速制样的方法在对虾病害检测中的应用,该法大大缩短了常规制样法所需时间。

目前,电镜的应用已扩展到用于了解病毒的感染与复制过程。Chen 等[1989]就曾详细地描述了斑节对虾肝胰腺细胞内 MBV 的病毒发生过程,包括核酸、衣壳物质和被膜的生成以及包涵体的形成。张立人等[1994]、张建红等[1994]报道了经电镜观察到的对虾杆状病毒在体内的感染、发生与装配情况。汝少国等[1996]描述了中国对虾肝胰腺上皮细胞质中杆状病毒增殖的电镜观察结果,这与以细胞核内形成包涵体为特征的增殖方式明显不同。溶酶体在增殖过程中内吞濒临解体的线粒体和病原体,利用线粒体内嵴提供能量,有规律地组装成杆状病毒的包涵体。该结果为探讨对虾暴发性大面积死亡的病因提供了新途径。

2.3 生物指示法

即利用容易感染病毒病的对虾作为指示种进行检测的方法。Bell 和 Lightner[1987]曾指出,蓝对虾感染病毒(如 BPV、IHHNV、HPV)后症状很明显,可作为指示虾。用怀疑带病毒的对虾组织进行投喂或将可能感染病毒的对虾组织匀浆后的上清液注射到蓝对虾体内,如被检者带有病毒则可传染指示虾。在实验2~3周后将出现有关病症,据此可作出诊断。

2.4 生化检验法

现已有的证据表明,酚氧化酶原激活系统组成了对虾免疫反应中的一种补体途径。作为非己识别,酚氧化酶原激活酶可作为微生物和其它病原体表面存在的或释放出的非己信号的受体,由这种相互作用产生的生化变化接着启动细胞活性或自身发挥抗病原体作用[李光友 1995]。蔡完琪和陆宏达[1994]在研究感染病毒的中国对虾肝胰腺病理变化时,检测到病虾肝

胰腺的酯酶和超氧化物歧化酶的活性显著减弱,表明病虾代谢功能与免疫功能明显衰退。可见,通过某些特定生化物质的检测,在一定程度上可了解对虾被病毒感染与否及其应答状况。

2.5 免疫学方法

2.5.1 荧光抗体技术

早在80年代,Momoyama[1983]、Sano等[1984]就将荧光抗体(Fluorescent Antibody)技术用于BMNV的诊断。90年代Lu等[1994]制备了RV(弹状病毒)的单克隆抗体,利用免疫荧光技术研究发现,在早期生长条件下RV感染EPC(鲤鱼上皮乳头状瘤细胞)后3小时即可检测出该病毒病原;而Poulos等[1994b]也用单克隆抗体技术检测了对虾组织中的IHHNV。

2.5.2 酶联免疫吸附测定法(ELISA)

Lewis[1986]运用ELISA方法对对虾杆状病毒进行了检测。Chang和Chen[1994]运用ELISA方法,使虾体内MBV的最早检出时期达到蚤状幼体1期。于佳等[1995]研制成功了HHNBV单克隆抗体,黄捷等[1995b]则用单克隆抗体ELISA技术提前20~40天对池养对虾的发病可能性作出预报。最近,涂小林等[1995,1996]将提纯病毒免疫新西兰兔获得较高价价的抗血清,初步建立了病毒的间接ELISA检测方法,并可在6小时内完成对样品的检测。其检测灵敏度达50ng水平,大大高于一般免疫学技术的敏感性。

2.5.3 反向间接血凝法(RIHA)

薛清刚等[1995]用密度梯度离心纯化的HPV颗粒免疫家兔制备特异性抗血清,建立一种反向间接血凝法以诊断HPV感染。该法的敏感度可达ng/ml病毒蛋白的检测水平,适于现场推广。

2.5.4 免疫电镜技术

在免疫电镜技术中,利用葡萄球菌A蛋白与抗体、抗体与抗原的吸附作用,可以在病毒悬液很稀的情况下捕捉病毒粒子。这是实验室内检测的一种有效手段[石正丽等1996]。

对虾的防御反应是由循环系统血细胞以及存在于血浆或从细胞释放到血浆中的多种因子的活性而形成的。因此,对于对虾血液成分、细胞超微结构和类型进行分析,已引起人们浓厚的兴趣。Martin和Graves[1985]从形态上把中国对虾的血细胞分为透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞三类。近年,国内一些学者也展开了这方面的研究。叶淑芳[1991]曾尝试用测定人体免疫球蛋白的方法检测对虾体液中的类似物质,发现IgA、IgG和IgM均呈阳性。叶燕玲和陈宽智[1993]研究了我国对虾血细胞的超微结构、分类和计数。李光友[1995]就中国对虾疾病与免疫机制进行了探讨。可以肯定这些研究会促进免疫学方法在对虾病毒诊断中的应用。

2.6 细胞培养方法

细胞培养技术是病毒学研究的基础,也是用于病毒诊断的基本方法之一。对于对虾病毒的全面认识依赖于获得和培养病毒及其宿主细胞的实验技术的发展。然而到目前为止,还没有建立对虾的细胞系。所有的对虾细胞培养工作均处于原代培养阶段。

80年代中期,Chen等[1986]发现斑节对虾卵巢及心脏组织较好培养,并成功地将卵巢组织的原代培养细胞继代传了三代。Ellender等[1988]评价了几种生长促进因子和培养配方以及支撑物对肝胰腺细胞培养的效果。Chen和Kou[1989]培养了斑节对虾类淋巴器官原代细胞,并研究了MBV对其致病性。胡珂等[1991]对东方对虾肝胰腺细胞进行了培养[Hu等

1990], 胡珂等[1991]又对中国对虾的6种组织进行了体外培养, 并发现卵巢、肝胰腺和肌肉组织在体外培养生长较其它组织好, 其中几种肝胰腺细胞分别传代了2~28代。Luedeman 和 Lightner[1992]改进了培养方法, 发现 Grace 昆虫培养基效果最佳, 对虾细胞在这种培养基中的最适生长条件是: 渗透压为700~750mmol/kg, 温度为25~28℃, 并应用该方法对蓝对虾和凡纳对虾的未成熟卵巢上皮细胞进行了培养, 其单层细胞层在2天中覆盖面积达80%。

Chen 等[1995]建立了对虾卵、心脏、淋巴组织和周围血细胞的单层原代细胞培养系统, 并研究了其对 MBV 的敏感性, 发现淋巴组织更易形成融合细胞层, 而与肌肉提取物和血淋巴能促进对虾离体细胞的生长。Hsu[1995]建立一种斑节对虾欧卡器(淋巴器官)细胞的分培方法, 并对基本培养介质的渗透性、血清浓度、血清来源、pH 值和几种生长因子进行了测定。

总之, 目前尚未建立对虾的细胞系。但有研究表明 IHNV 和 RV 能在鱼的非整倍体细胞系——鲤鱼上皮乳头状瘤细胞(EPC)以及虹鳟肝细胞(R1)中连续传代[Loh 1990, Lu 等 1991, Lu 和 Loh 1992, 邱玉环等 1997], 这为对虾病毒的离体增殖和鉴定开辟了新思路。

2.7 分子生物学方法

2.7.1 分子杂交技术

Lightner 实验室对 BPV 和 MBV 的基因片段进行了克隆及初步研究。该实验室用限制性内切酶得到了病毒核酸的部分片段, 并进一步将其克隆[Bonami 等 1992, Mari 等 1993, Bruce 等 1993, Poulos 等 1994a]。然后利用基因探针, 经原位杂交, 对固定组织的杆状病毒进行了检测; Bruce 等[1994a]用 BPV-DNA 片段作为分子探针, 经原位杂交, 在电镜下观察发现 BPV 定位于肝胰腺小管的上皮细胞和中肠粘膜处, 并且 Bruce 等[1994b]还将传统检测方法与分子生物学方法进行了比较。

1994年, Vickers 等[1994]提出了对虾杆状病毒基因与昆虫核形多角体(ACNPV)之间显著的同源性; 1995年, Machado 等[1995]利用圆斑杂交技术发现了 BPV 和 ACNPV 之间显著的同源性并建立了 BPV 基因库。经比较发现, ACNPV 和 BPV 的某一 DNA 片段能特异性地进行杂交。因此, 认为该 DNA 片段可作为探针检测对虾是否已受 BPV 感染。同时, Bonami 等[1995], Arimoto 等[1995]分别将对虾中分离到的 BPV 基因和 BMNV 基因进行了定性, 并克隆了部分基因。Lu 等[1995]利用原位杂交技术对感染 MBV 的斑节对虾进行了检测, 并进一步比较了对虾不同生活阶段对 MBV 的敏感性。在蚤状幼体、糠虾幼体、仔虾和成虾阶段都检测到了 MBV 基因, 而在受精卵和无节幼体上则未检出。

国内学者张岩等[1995]用 Puc18 构建了对虾病毒 HHNBV 的 DNA 重组质粒, 提取后经斑点杂交及酶切分析, 证实质粒中插入的片段为病毒 DNA。刘萍等[1995]制备了 HHNBV 的 DNA 探针, 以此来检测对虾 HHNBV 病确实具有高敏感性和特异性。

2.7.2 聚合酶链式反应(PCR)

Chang 等[1993b]首次报导用 PCR 成功地进行了 MBV-DNA 的扩增实验。同年, Lu 等[1993]从感染 MBV 的斑节对虾的肝胰腺中分离提纯了这种病毒, 提取 MBV 的 DNA 作为 PCR 扩增的模板, 引物来自 ACNPV 基因的保留区。经过 PCR 扩增后, 一个 DNA 片段(674个 bp)被放大, 由 PCR 的产物测得的氨基酸排列顺序与 ACNPV 的多肽之间有65%的同源性。分析核苷酸的序列, 发现被放大的 DNA 片段是 MBV 的基因的开放阅读框。在蛋白质分子杂交中, 用该647个 bp 的 DNA 片段做探针, 可与提纯的 MBV 的 DNA 和感染 MBV 的斑节对虾的

DNA 杂交,但不能与未感染 MBV 的斑节对虾的 DNA 杂交。孔杰等[1995]对已发表的几种杆状病毒的多角体基因的序列进行比较分析,设计并合成两对 PCR 简单引物 P₆₀/P₇₄₀和 P₁₀₄/P₆₄₀,从纯化的幼对虾 HHNBV 中提取 DNA,并进行了 PCR 扩增,其初步研究表明 P₆₀/P₇₄₀可用于杆状病毒多角体蛋白全基因的克隆。郭福生等[1996]也根据昆虫杆状病毒多角体基因保守片段设计引物对中国对虾杆状病毒进行了检测,并证明加热法处理待检样品检出率最高。

然而,这种以昆虫杆状病毒基因组已知的保守序列作为合成引物依据来进行检测的方法,专一性较差,易造成误导。周国瑛等[1996]从上海河口地区患病毒病的对虾中分离获得病毒制剂后,首次用回接试验证明此种杆状病毒是该病毒病病原。在测定病毒基因组600bp的一个片段的序列基础上,合成了两个引物,建立了一套测定该病毒基因组片段的 PCR 方法。这种应用杆状病毒本身基因组序列来合成引物建立 PCR 的方法,在国际上尚属首次。

3 结语

目前,由于很难得到大量的纯净对虾病毒,致使对虾病毒学的研究进展缓慢。在已发现的对虾病毒中只有 Baculovirus penaei(BPV)得到国际病毒学分类委员会的正式定名[陈细法等 1997]。对大部分的动物病毒而言,随时获取大量纯净病毒的方式是细胞培养。因此,在较短的时间内建立起可以大量繁殖对虾病毒的适宜细胞株成为本领域研究工作者共同奋斗的目标。

同时,对虾病毒病是对虾疾病中最难确诊的一种病。其诊断一般采用组织学方法检测病毒包涵体或用组织超薄切片进行病毒的电镜观察[Sinderman 和 Lightner 1988, Thurman 1990]。对于无病症的病毒携带者还需配合“生物测定法”才能鉴别[薛清刚和王文兴,1992]。这些方法耗时费力。由于对虾患病后很难医治,为了通过早期诊断来指导疾病的预防,建立快速、简便、敏感和特异的病毒检测技术仍将是今后对虾病毒研究领域的重点研究内容之一。

参 考 文 献

- 于佳,黄捷,宋晓玲等. 1995. 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒单克隆抗体的研制. 海洋水产研究,16(1):24~30
- 王安利,王维娜,郭明申等. 1997. 杆状病毒侵染中国对虾鳃、胃和肝胰脏的电镜观察及感染途径的探讨. 动物学报,43(增刊):45~48
- 王克行,马笠,钱鸣亮等. 1994. 肝胰腺细小样病毒对对虾养殖危害性的研究——兼论黄河三角洲地区对虾养殖减产的原因与对策. 饲料工业,15(6):18~21
- 王金星,刘昌彬,张卫红等. 1997. 中国对虾暴发性流行病病原体研究Ⅱ. 病原体的分离纯化. 海洋学报,19(2):95~98
- 王维娜,王安利,郭明申等. 1997. 中国对虾肝胰腺类丝状病毒的电镜观察. 动物学报,43(增刊):132~133
- 王斌,姜静颖,李华等. 1996. 中国对虾一种病原病毒负染法电镜检测. 大连水产学院学报,11(1):22~27
- 孔杰,张岩,刘萍等. 1995. 对虾一种杆状病毒多角体蛋白基因的 PCR 扩增. 海洋水产研究,16(1):63~67
- 孔杰,石拓,刘萍等. 1997. 中国对虾一种 C 型杆状病毒随机扩增多态性 DNA 分析. 海洋与湖沼,28(4):394~398
- 石拓,孔杰,包振民等. 1998. 从中国对虾分离纯化的一种杆状病毒及其超微结构的研究. 海洋学报,20(2):60~64
- 石正丽,肖连青,陈棣华. 1996. 中国对虾两种病毒的免疫检测. 第二届全国人工养殖对虾疾病综合防治和环境管理学术研讨会论文集. 青岛:青岛海洋大学出版社. 102~104
- 包振民,胡景杰,姜明. 1997. 杆状病毒感染越冬亲虾(*Penaeus chinensis*)的研究——越冬亲虾感染及其垂直传播的可能性. 青岛海洋大学学报,27(3):347~351
- 叶淑芳. 1991. 中国对虾体液免疫实验方法的探讨. 海洋科学,(6):66~67
- 叶燕玲,陈宽智. 1993. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)血细胞超微结构,分类计数. 青岛海洋大学学报,23(2):35~42
- 刘萍,张岩,孔杰等. 1995. 中国对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒(HHNBV)DNA 探针的制备及应用. 海洋水产研

- 究,16(1):59~62
- 汝少国,姜明,李永祺等. 1996. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)肝胰腺上皮细胞质中杆状病毒增殖的电镜观察. 青岛海洋大学学报,26(1):127~129
- 邱玉环,黎诚耀,杨盛华等. 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
- 陈秀男,张朴性,张启清等. 1990. 草虾繁殖场去除杆状病毒(MBV)感染的方法. 养鱼世界(台湾),(3):45~49
- 陈细法,吴定虎,黄槐等. 1995. 斑节对虾杆状病毒的超微结构. 水产学报,19(3):203~209
- 陈细法,吴定虎,陈平等. 1996. 养殖对虾病毒性流行病的病理学共性、特性及其诊断价值的评述. 第二届全国人工养殖对虾疾病综合防治和环境管理学术研讨会论文集. 青岛:青岛海洋大学出版社. 97~101
- 陈细法,陈平,吴定虎等. 1997. 养殖对虾一种新杆状病毒研究. 中国科学(C辑),27(5):415~420
- 李光友. 1995. 中国对虾疾病与免疫机制. 海洋科学,(4):1~3
- 严隽箕. 1995. 养殖对虾一种似痘症状病毒的电镜观察及其传播途径的推测. 水产科学,14(1):3~4
- 张岩,刘萍,孔杰等. 1995. 对虾病毒 HHNBV DNA 构建质粒的研究与分析. 海洋水产研究,16(1):68~71
- 张立人,张建红,陈棣华等. 1994. 东方对虾杆状病毒在宿主细胞内的装配. 电子显微学报,13(5):354
- 张建红,陈棣华,肖连春等. 1994. 中国对虾非包涵体杆状病毒在体内的感染与发生. 中国病毒学,9(4):326~366
- 张建红,黄灿华. 1996. 电镜诊断快速制样方法在对虾病害检测中的应用. 第二届全国人工养殖对虾疾病综合防治和环境管理学术研讨会论文集. 青岛:青岛海洋大学出版社. 105~106
- 邹国祥,谭金山,侯颖一等. 1994. 对虾肝胰腺肌上皮细胞杆状病毒. 电子显微学报,13(5):358
- 孟庆显. 1992. 对虾疾病防治手册. 青岛:青岛海洋大学出版社. 31~39,80~87
- 杨丰,林斌,陈细法等. 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
- 周国瑛,沈菊英,彭宝珍等. 1996. 上海河口地区对虾病毒病原鉴定及 PCR 检测方法的建立. 第二届全国人工养殖对虾疾病综合防治和环境管理学术研讨会论文集. 青岛:青岛海洋大学出版社. 1~6
- 胡珂,王立平,段爱梅等. 1991. 中国对虾的组织培养. 水产学报,15(4):328~331
- 姜明,汝少国,谢嘉琳等. 1996. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)病害暴发流行期间杆状病毒显微形态的电镜观察. 海洋科学,(1):49~52
- 郭福生,朱山,孙淑芳等. 1996. 应用聚合酶链反应(PCR)检测中国对虾杆状病毒. 第二届全国人工养殖对虾疾病综合防治和环境管理学术研讨会论文集. 青岛:青岛海洋大学出版社. 107~110
- 涂小林,钟江,高双城等. 1995. 中国对虾一种杆状病毒的 ELISA 检测方法. 水产学报,19(4):315~321
- 涂小林,王丙琦,高双城等. 1996. 上海河口地区中国对虾暴发性传染病病原及检测技术研究. 第二届全国人工养殖对虾疾病综合防治和环境管理学术研讨会论文集. 青岛:青岛海洋大学出版社. 34~45
- 徐利生,陈福华,胡佐楚等. 1993. 斑节对虾杆状病毒(MBV)病诊断研究. 热带海洋,12(4):95~99
- 黄捷,杨丛海,于佳等. 1995a. T-E 染色法用于对虾暴发性流行病的现场快速诊断. 海洋科学,(1):29~34
- 黄捷,于佳,王秀华等. 1995b. 单克隆抗体酶联免疫技术检测对虾皮下及造血组织坏死病的病原及其传播途径. 海洋水产研究,16(1):40~50
- 黄捷,于佳. 1995. 一种可用于现场观察对虾病毒包涵体的染色法. 海洋水产研究,16(1):31~39
- 蔡完琪,陆宏达. 1994. 患暴发性病毒病的中国对虾肝胰腺病理变化. 上海水产大学学报,3(1/2):27~32
- 薛清刚,王文兴. 1992. 对虾疾病的病理与诊治. 青岛:青岛海洋大学出版社. 28~32,60~74
- 薛清刚,钱鸣亮,王文兴等. 1995. 反向间接血凝法检测对虾肝胰腺细小病毒的方法研究. 水产学报,19(3):210~216
- 薛清刚,官云浩,王文兴. 1996. 中国对虾肝胰腺细小病毒的纯化与鉴定. 海洋与湖沼,27(3):308~313
- Arimoto M, Yamazaki T, Mizuta Y, et al. 1995. Characterization and partial cloning of the genomic DNA of a baculovirus from *Penaeus japonicus* (PjNOB equals BMNV). Aquac,132(3~4):213~220
- Bell T A, Lightner D V. 1987. An outline of penaeid shrimp culture methods including infectious disease problems and priority drug treatment. Vet Hum Toxicol, 29(1):37~43
- Bonami J R, Brehelin M, Mari J, et al. 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. J Gen Virol, 71:2657~2664
- Bonami J R, Lightner, D V, Redman R M, et al. 1992. Partial characterization of a togavirus (LOVV) associated with histopathological changes of the lymphoid organ of penaeid shrimp. Dis Aquat Org, 14(2):145~152
- Bonami J R, Bruce Ld, Poulos B T, et al. 1995. Partial characterization and cloning of the genome of PvSNPV (=BP-type

- virus) pathogenic for *Penaeus vannamei*. *Dis Aquat Org*, 23(1):59~66
- Bruce L D. 1991. Methods for viral isolation and DNA extraction for a penaeid shrimp baculovirus. *J Virol Methods*, (34): 245~254
- Bruce L D, Redman R M, Lightner D V, et al. 1993. Application of gene probes to detect a penaeid shrimp baculovirus in fixed tissue using in situ hybridization. *Dis Aquat Org*, 17(3):215~221.
- Bruce L D, Redman R M, Lightner D V, et al. 1994a. Application of gene probes to determine target organs of penaeid shrimp baculovirus using in situ hybridization. *Aquac*, 120(1~2):45~51
- Bruce L D, Lightner D V, Redman R M, et al. 1994b. Comparison of tradition and molecular detection methods for baculovirus penaei infectious in larval *Penaeus vannamei*. *J Aquat Anim Health*, 6(4):355~359
- Chang P S, Wang Y C, Lo C F, et al. 1993a. Purification and biochemical characteristics of occlusion body of *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV). *Fish Pathol*, 27(3):127~130
- 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
- Chang P S, Chen S N. 1994. Effect of *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV) on survival and growth of larval *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquacult Fish Manage*, 25(3):311~317
- Chen S N, Chi S, Kou G H, et al. 1986. Cell culture from tissues of grass prawn, *Penaeus monodon*. *Fish Pathol*, (21): 161~166
- Chen S N, Kou G H. 1989. Infection of cultured cells from the lymphoid organ *Penaeus monodon* Fabricius by monodon baculovirus (MBV). *J Fish Dis*, 12(1):73~76
- Chen S N, Chang P S, Kou G H, et al. 1989. Studies on virogenesis and cytopathology of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in the giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) and the red tail prawn (*Penaeus penicillatus*). *Fish pathol*, 24(4): 89~100
- Chen S N, Shih H H, Kou G H. 1995. Primary cell cultures from tissues of penaeid shrimps and their susceptibilities to monodon-type baculovirus (MBV). *Rep Fish Dis Res*, (16):1~14
- Couch J A. 1974. Free and occluded virus, similar to baculovirus, in hepatopancreas of pink shrimp. *Nature*, 247:229~231
- Ellender R D, Middlebrooks B L, McGuire S L. 1988. Evaluation of various growth enhancement factors media formulation and support matrices for the development of primary and established cells lines from *Penaeus hepatopancreas*. In: US Marine Shrimp Farming Program Progress Report, Volume 1. US Department of Agriculture, Washington DC, pp. 167
- Hsu Y L. 1995. Development of an in vitro subculture system for the Oka organ (Lymphoid tissue) of *Penaeus monodon*. *Aquac*, 136:43~55
- Hu K, Wang L, Duan Y, et al. 1990. Studies on a cell culture from the hepatopancreas of the oriental shrimp, *Penaeus orientalis* Kishinoue. *Asian Fish Sci*, (3):299~307
- Lewis D H. 1986. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting penaeid baculovirus. *J Fish Dis*, 9: 519~522
- Lightner D V, Redman R M. 1981. A baculovirus-caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. *J Invertebr Pathol*, 38:299~302
- Lightner D V, Redman R M, Bell T A. 1983a. Observations on the geographic distribution, pathogenesis and morphology of the baculovirus from *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquac*, 32:209~233
- Lightner D V, Redman R M, Bell T A, et al. 1983b. Detection of IHNV virus *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei* imported into Hawaii. *J World Mariculture Soc*, (14):212~225
- Lightner D V, Redman R M, 1985. A parvo-like disease of penaeid shrimp. *J Invertebr Pathol*, (45):47~53
- Lightner D V, Hedrick R P, Fryer J L, et al. 1987. A survey of cultured penaeid shrimp in Taiwan for viral and other important diseases. *Fish Pathol*, 22:127~140
- Lightner D V, Redman R M, Moore D W, et al. 1993. Development and application of a simple and rapid diagnostic method to studies on hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. *Aquac*, 116:15~23
- Loh P C. 1990. Growth of the penaeid shrimp virus infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in a fish cell line. *J Virol Meth*, (28):273~280

- Lu Y, Nadala E C B, Brock J A. 1991. A new virus isolate from infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-infected penaeid shrimps. *J Virol Meth*, 31:189~196
- Lu Y, Loh P C. 1992. Some biological properties of a rhabdovirus isolated from penaeid shrimps. *Arch Virol*, 127(1~4): 339~343
- Lu C C, Tang K F J, Kou G H. 1993. Development of a *Penaeus monodon* type baculovirus (MBV) DNA probe by polymerase chain reaction and sequence analysis. *J Fish Dis*, 16(6):551~559
- Lu Y, Loh P C, Nadale E C P. 1994. Serological studies for the rhabdovirus penaeid shrimp (RPS) and its relationship to three other fish rhabdovirus. *J Fish Dis*, 17(4):303~309
- Lu C C, Tang K F J, Kou G H, et al. 1995. Detection of *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV) infection in *Penaeus monodon* Fabricius by in situ hybridization. *J Fish Dis*, 18(4):337~345
- Luedeman R A, Lightner D V. 1992. Development of an in vitro primary cell culture system from the penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquac*, 101(3~4):205~211
- Machado C R, Bueno S L, Menck C F M, et al. 1995. Cloning shrimp baculovirus penaei DNA and hybridization comparison with antographa californica nuclear polyhedrosis virus. *Rev Bras de Gen*, 18(1):1~6
- Mari J, Bonami J R, Poulos B T, 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
- Martin G G, Graves B L. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemolytes. *J Morph*, 185:339~348
- Momoyama K. 1983. Studies on baculoviral mid-gut gland necrosis of Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). II. Presumptive diagnostic techniques. *Fish Pathol*, 17:263~268
- Momoyama K. 1988. Infection source of baculoviral mid-gut gland necrosis (BMV) in mass production of Kuruma shrimp larvae, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol*, (23):105~110
- Nash G. 1988. Baculovirus infection in brackishwater pond Cultured *Penaeus monodon* Fabricius in Indonesia. *Aquac*, 73: 1~6
- Overstreet R M, Stuck K C, Krol R A, et al. 1988. Experimental infections with *Baculovirus penaei* in the white shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea:Decapoda), as a bioassay. *J World Aquac Soc*, 19:175-187
- Poulos B T, Mari J, Bonami J R, et al. 1994a. Use of non-radioactivity labeled DNA probes for the detection of a baculovirus from *Penaeus monodon* in situ hybridization on fixed tissue. *J Virol Meth*, 49(2):187~194
- Poulos B T, Lightner D V, Trumper B, et al. 1994b. Monoclonal antibodies to the penaeid shrimp parvovirus, infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV). *J Aquat Anim Health*, 6(2):149~154
- Roubal F R. 1989. Electron microscopic observation of hepatopararecreatic parvo-like virus (HPV) in the penaeid prawn, *Penaeus merguensis* de Man, from Australis. *J Fish Dis*, (12):199~201
- Sano T, Nishimura T, Fukuda H, et al. 1984. Baculoviral mid-gut gland necrosis (MNV) of Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*) larvae in Japanese intensive culture systems. *Helgolander Meeresunters*, 37:255~264
- Sinderman L J, Lightner D V. 1988. Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture. Elsevier Science Publishing Co, 11~37
- Sun X Q, Wang W X, Zhou H M, et al. 1993. Studies on immunodiagnosis of hepatopancreatic parvo-like virus disease of the Chinese penaeid, *Penaeus chinensis*; Purification of the virus. *Chin J Ocean Lim*, 11(2):189~192
- Thurman R B. 1990. Unique physicochemical properties of the occluded penaeid shrimp baculovirus of their use as diagnosis of infection. *J Aquat Anim Health*, 2(2):128~131
- Vickers J E, Lestor R J G, Spradbrow P B, et al. 1994. Evidence for homology between polyhedrin genes of baculoviruses of a prawn and an insect. *J Invertebr Pathol*, 63(2):207~208
- Wang A L, Wang W N. 1996. The polytechnic study on prevention and cure of viral disease of *Penaeus chinensis*. *J Hebei Univ (Natural Science Edition)*, 16(4):52~53
- Zhang Q Y. 1995. Isolation and characterization of nucleocapsids and enveloped virions of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV). *Annual of FEBL*, 35~41