

行政院國家科學委員會專題研究計畫期末報告

蝦白點症病毒在細胞株的病原性分析及毒力

突變株之分離

The analysis of in vitro pathogenicity of WSSV

and the isolation of WSSV mutants

計畫類別： ☐ 個別型計畫 ☒ 整合型計畫

計畫編號： NSC 89-2313-B-002-101

執行期限： 88 年 08 月 01 日 ~ 89 年 07 月 31 日

主持人 ： 王重雄 教授

處理方式：☐ 對外提供參考

☐ 一年後可對外提供參考

☒ 不可對外提供參考

執行單位：國立台灣大學昆蟲學系

中 華 民 國 八 十 九 年 九 月

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號： NSC 89-2313-B-002-101

執行期限： 88 年 08 月 01 日～89 年 07 月 31 日

主持人： 王重雄 教授

執行單位：國立台灣大學昆蟲學系

一、中英文摘要

蝦白點症(white spot syndrome)之病原體稱為蝦白點症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)，屬於一「類不具包含體之桿狀甲殼類病毒」，其宿主範圍甚廣，傳播迅速且對蝦類呈系統性感染，因此死亡率極高。蝦白點症病毒在蝦類類淋巴結(lymphoid)初級培養細胞之體外增殖系統已建立，並且成功地將 4 株昆蟲細胞株(SL-A, SL-B, LD-652Y 及 SE-1)適應於高滲透壓(510 mOsm)及高 pH 值(7.2-7.5)之 L15 培養液中，嘗試利用這些細胞株以建立 WSSV 及其他蝦之類病毒體外增殖。本期計畫中亦發現蝦類病毒之混合感染很嚴重，在病蝦之類淋巴結中，除 WSSV 感染外，也發現有感染性下表皮和造血器官壞死病毒(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHHNV)及 Bunyavirus 之共同感染。Bunyavirus 是新記錄的蝦類病原性病毒。

關鍵詞：蝦白點症病毒、類淋巴結、昆蟲細胞株

Abstract

The causative agent of white spot syndrome (WSS) has been identified to be white spot syndrome virus (WSSV) that is a non-occluded rod-shaped-like

virus. WSSV has a wide host range and transfected rapidly in shrimp population. WSSV can cause a systematic infection of shrimp and lead to mass mortality. With an attempt to establish *in vitro* propagation of WSSV and other shrimp's viruses, first we had established *in vitro* propagation of WSSV in primary lymphoid organ cells of shrimp and we adapted and then cultured four insect cell lines (SL-A, SL-B, LD-652Y and SE-1) in L15 culture medium at high osmolarity (510 mOsm) and pH (7.2-7.5). In this project, we also found that the lymphoid organ of infected shrimp was not only infected with WSSV but also suffered by other virus infections: the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and Bunyavirus. Bunyavirus is a new record of shrimp pathogen.

Keywords: white spot syndrome virus, lymphoid, insect cell lines

二、計畫緣由與目的

蝦類白點症(white spot syndrome, WSS)屬病毒性疾病，罹病蝦之頭胸甲、附肢及身體之甲殼上普遍出現白點，故名白點症，目前為止尚未有任何一種蝦類對此疾病具有明顯的抗性，此病不僅造成台灣及其它亞洲地區

WSSV 之同物異名有 WSBV(white spot baculovirus) (Wang et al., 1995); PmNOB II(*P. monodon* NOB II) (Wongteerasupaya et al., 1995b); PRDV(penaeid rod-shaped DNA virus) (Inouye et al., 1996); CBV(Chinese baculovirus) (Lu et al., 1997);另外有 HHNBV(hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus) (Huang et al., 1995), 如此可見此病毒分布之廣, 肆虐養蝦業之重, 以及受到重視的程度, 然而許多瓶頸未能突破, 其因素不外如前所提之原因, 總之我們對此病毒的了解不夠深入, 因此本計劃為群體計劃, 經統籌後, 本研究室之研究主題乃承襲前期計劃, 利用體外增殖系統更深入研討此病原體與其他病原體之互動關係。

三、結果與討論

1. 蝦類類淋巴結(lymphoid)細胞株建立

目前之初級培養液為 2X L15 培養液, 加入 20% 胎牛血清、葡萄糖、NaCl、CaCl₂ 及 MgSO₄ 後, 以無菌二次蒸餾水調整各試驗組之滲透壓在 530±10 mOsm, pH 為 7.5, 再加入適量重金屬(Cu, Zn & Fe), 可維持類淋巴結初級培養細胞達 180 天以上。另添加生長因子如 basic fibroblast growth factor (bFGF), nerve growth factor (NGF)及 epidermal growth factor (EGF) 並無顯著之效果。

2. 蝦白點症病毒感染草蝦類淋巴初級培養細胞之試驗

蝦白點症病毒感染類淋巴初級培養細胞試驗中, 發現 2 天後會出現明顯的細胞病變 (cytopathic effect), 並隨時間增加, 其病變情形更嚴重。利用電子顯微鏡去觀察不同感染期之類淋巴初級培養細胞時, 發現其細胞種

類至少有六種, 包括類纖維母細胞 (fibroblast-like cells)、吞噬細胞 (phagocytes)、顆粒細胞 (granulocytes)、網狀細胞 (reticular cells)、固縮核細胞 (cells with a pyknotic nucleus)及脂肪細胞 (adipose cells), 各類細胞之數量佔所有初級培養細胞數目的比例分別為 3.4%、31.8%、37.2%、9.4%、4.7%及 13.5%, 經體外感染結果發現除吞噬細胞及固縮核細胞不呈細胞病變外, 其餘部份細胞皆有細胞變圓、核腫大、細胞質內胞器萎縮並形成大的多泡體 (multivesicular bodies) 現象。病毒粒子在核內增殖及組裝過程, 可分為兩種方式, 第一種方式先形成成熟的核蛋白質鞘 (nucleocapsid), 再覆上被膜 (envelope), 此一方式類似一般的桿狀病毒複製方式。另一種方式則與犀角金龜病毒 (*Oryctes virus*) 相類似, 其先形成不完全的蛋白質鞘 (capsid) 及覆上不完全被膜, 再填充入纖維狀的核蛋白質 (nucleoprotein) (Wang et al., 2000)。

3. 昆蟲細胞之馴化

未馴化昆蟲細胞對蝦白點症病毒之感受性很低, 因此將昆蟲細胞由培養在低滲透壓之 TNM-FH 培養液慢慢馴化至較高滲透壓之 L-15 培養液, 而後再以這些馴化之細胞株進行感染試驗, 以期能使細胞對蝦白點症病毒之感受性增強, 進一步能對蝦白點症病毒致病機制有更深之瞭解。目前已成功將兩株本研究室所建立的細胞株 (SL-A; SL-B) 以及 LD-652Y 和 SE-1, 從 TNM-FH 培養基, pH 6.2, 滲透壓 375 ± 10 mOsm, 適應到 L15 培養基, pH 7.2-7.5, 滲透壓 510 ± 10 mOsm。蝦與昆蟲同屬節肢動物, 昆蟲細胞株之高滲透壓、高 pH 值適應株除將可提供蝦類細胞培養之條

件培養液(condition medium)外，將在未來的計劃內進行蝦類病毒接受性的試驗中，尤其對 WSSV 病毒的研究，相信將會有相當的貢獻。

4. 病蝦類淋巴結之病理觀察

由病蝦類淋巴結之病理觀察發現，其細胞不僅僅受到 WSSV 感染外，亦受到 IHNV 及 Bunyavirus 之共同感染，因此，會感染蝦類病毒應共有 8 種。

四、參考文獻：

- Bedford CO (1981) Control of the rhinoceros beetle by baculovirus. In: Burges HD (ed) Microbial Control of Pests and Plant Diseases. Academic Press, New York, p 409-426
- Bonami JR, Lightner DV, Redman RM, Poulos BT (1992) Partial characterization of a togavirus (LOVV) associated with histopathological changes of the lymphoid organ of penaeid shrimps. Dis Aquat Org 14:145-152
- Boonyaratpalin S, Supamattaya K, Kasornchandra J, Direkbusaracom S, Aekpanithanpong U, Chantanachookin C (1993) Non-occluded baculo-like virus the causative agent of yellowhead disease in the black tiger shrimp. Gyobyo Kenkyu 28:103-109
- Chang PS, Lo CF, Wang YC, Kou GH (1996) Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in shrimp, *Penaeus monodon*, by *in situ* hybridization. Dis Aquat Org 27:131-139
- Chou HY, Huang CY, Wang CH, Chiang HC, Lo CF (1995) Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Dis Aquat Org 23:165-173
- Crawford A (1994) Nonoccluded baculoviruses. In: Webster RG, Franoff A (eds) Encyclopedia of Virology. Academic Press, New York, p 133-139
- Flegel TW (1997) Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. In: Inui Y (ed) New approaches to viral diseases of aquatic animals. NRA International Workshop proceedings. National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Watarai, Mie 516-01, Japan, p 167-187
- Flegel TW, Fegan DF, Kongsom, Vuthikornudomkit S, Sriurairatana S, Boonyaratpalin S, Chantanachookin C, Vickers JE, Macdonald OD (1992) Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand. In: Fulks W, Main KL (eds) Disease of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States. The Oceanic Institute, Honolulu, p 57-112
- Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown F (1991) Classification and nomenclature of viruses. Archives of virology. Springer-Verlag, Vienna
- Hsu YL, Yang YH, Chen YC, Tung MC, Wu JL, Engelking MH, Leong JC (1995) Development of an *in vitro* subculture system for the oka organ (lymphoid tissue) of *Penaeus monodon*. Aquaculture 136: 43-55
- Huang J, Yu J, Song XL, Kong J, Yang CH (1995) Studies on fine structure, nucleic acid, polypeptide and serology of hypodermal and hematopoietic

- Spann KM, Vickers JE, Lester RJG (1995) Lymphoid organ virus of *Penaeus monodon* from Australia. *Dis Aquat Org* 23:127-134
- Takahashi Y, Itami T, Kondo M, Maeda M, Fujii R, Tomonaga S, Supamattaya K, Boonyaratpalin S (1994) Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Fish Pathol* 29(2):21-125
- Wang CH, Lo CF, Leu JH, Chou CM, Yeh PY, Chou HY, Tung MC, Chang CF, Su MS, Kou GH (1995) Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 23:239-242
- Wang CH, Yang HN, Tang CY, Lu CH, Kou GH, Lo CF (2000) Ultrastructure of white spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures. *Dis Aquat Org* 41:91-104.
- Wongteerasupaya C, Sriurairatana S, Vickers JE, Akarajamorn A, Boonsaeng V, Panyim S, Tassanakajon A, Withyachumnarnkul B, Flegel TW (1995a) Yellow - head virus of *Penaeus monodon* is RNA virus. *Dis Aquat Org* 22:45-50
- Wongteerasupaya C, Vickers JE, Sriurairatana S, Nash GL, Akarajamorn A, Boonsaeng V, Panyim S, Tassanakajon A, Withyachumnarnkul B, Flegel TW (1995b) A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 21:69-77