

研究简报

## 养殖乌鳢类立克次体分离纯化的初步研究

贾伟章 孙晓凤 郭琼林

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

### PRIMARY ISOLATION AND PURIFICATION OF RICKETTSIA-LIKE ORGANISM (RLO) FROM THE TISSUES OF *OPHIOCEPHALUS ARGUS*

JIA Wei Zhang, SUN Xiao Feng and GUO Qiong Lin

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词: 类立克次体; 分离; 纯化; 乌鳢

Key words: Rickettsia-like organism (RLO); Isolation; Purification; *Ophiocephalus argus*

中图分类号: S941.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)04-0448-02

1989年, Fryer等从导致智利海水养殖 Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) 90% 死亡率的病鲑组织感染的鲑细胞系中首次分离得到一种类立克次体(Rickettsia-like organism, RLO), 并命名为 *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov.<sup>[1,2]</sup>。近十年来, 这种被日益重视的、专性细胞内寄生的 RLO(细胞内的细菌), 已被证实为导致鱼类严重传染性疾病的致病因子<sup>[2]</sup>。2001—2002年, 作者首次发现湖北省某养殖场淡水养殖乌鳢(*Ophiocephalus argus* C.)突发性大规模发病死亡系 RLO 感染引起<sup>[3]</sup>。由于乌鳢细胞系的建立尚在进行之中, 因此从病变组织直接进行 RLO 的分离、纯化对进一步开展病原体分类及快速、准确的诊断技术等分子生物学研究至关重要。

#### 1 材料与方法

**1.1 材料** 感染乌鳢取自湖北省某养殖场, 病鱼体长40—60cm, 体重300—500g。常规细菌分离、培养未分离出菌株, 显微镜检查也未发现寄生虫。应用病理解剖、组织切片和电子显微镜技术<sup>[3,4]</sup>制备标本观察显示内脏呈现特征性乳白色或灰白色结节、肉芽肿性炎症和胞质泡内含 RLO<sup>[5]</sup>。同时取病变明显的肝、脾和肾脏并迅速置-18℃冻存。

**1.2 RLO 的初步分离** 将呈现上述病理变化的病鱼组织解冻, 分别加入无菌 PBS(pH 7.4), 用匀浆器反复匀浆, 经低速分级离心弃沉淀, 得到 RLO 的粗提液; 匀浆 2000r/min 离心 10min, 取上清; 上清部分 3000r/min 离心 10min, 再取上清;

3500r/min 进一步离心 8min, 上清液即为 RLO 的粗提液, 4℃保存。将 RLO 粗提液于 4℃ 条件 20500r/min 高速离心 30min (D-37520 型离心机; Heraeus Instruments, Osterode, Germany), 沉淀部分用 PBS 悬浮; 同条件再高速离心 30min, 沉淀用少许 PBS 悬浮, 得到 RLO 初步分离液, 4℃ 保存, 待用。

**1.3 RLO 的蔗糖密度梯度离心**<sup>[6]</sup> 配制 10%、20%、30%、40%、50% 和 60% 蔗糖溶液, 从高密度到低密度依次分别将 6 个蔗糖梯度液(各 1.5mL)加入离心管中, 将 RLO 初步分离液 1.5mL 小心滴加在梯度液上方, 最后加入少量 PBS 至离心管口。26700r/min 4℃ 超速离心 60min (Beckman 公司 Optima™ XL-100K 型离心机)。肉眼能分辨底部沉淀、距底部约 1cm 处出现明显的乳白色稠密物带(带约 5—7mm 厚)。除收集底部沉淀和乳白色稠密物带外, 其余以每 1cm 高度取样分装并编号。

**1.4 分离纯化物的透射电子显微镜负染及观察** 取密度梯度离心样品, 滴在 Formvar 膜覆盖的铜网上并喷一层碳, pH 6.8 磷钨酸负染, JEM-1230 型透射电子显微镜观察。

#### 2 结果与讨论

从肝、脾和肾组织匀浆中分离纯化的 RLO 经负染后电镜观察, 其形态为球形和椭球形, 直径 0.45—1.5μm, 并可见二分裂的 RLO(图 1)。在放大 2.5 万倍以上时, 可见形似液泡状的、能透过电子束的亮区, 相当部分的 RLO 表面可出现裂

收稿日期: 2003-06-18; 修订日期: 2003-08-26

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30371091)资助

作者简介: 贾伟章(1978—), 男, 山东枣庄人; 硕士生; 研究方向: 水生动物病理学与免疫学。本所袁秀平高级实验师和黄晓红同学承担电镜样品的负染工作。中国科学院病毒研究所方勤博士给予诸多帮助, 在此一并致谢!

通讯作者: 郭琼林, E-mail: qguo@ihb.ac.cn

痕。RLO 主要集中在距底部约 1 cm 处的乳白色稠密物带, 此带内 RLO 非常密集(图 1), 有极少量细胞组织碎片。距底部约 2—3 cm 处可见少而分散的 RLO, 无细胞组织碎片。底部

以细胞组织碎片为主, 其余部分 RLO 少见, 含不同程度的细胞组织碎片。因为超速离心后的 RLO 表面出现裂痕, 因此可能不宜用于实验感染。

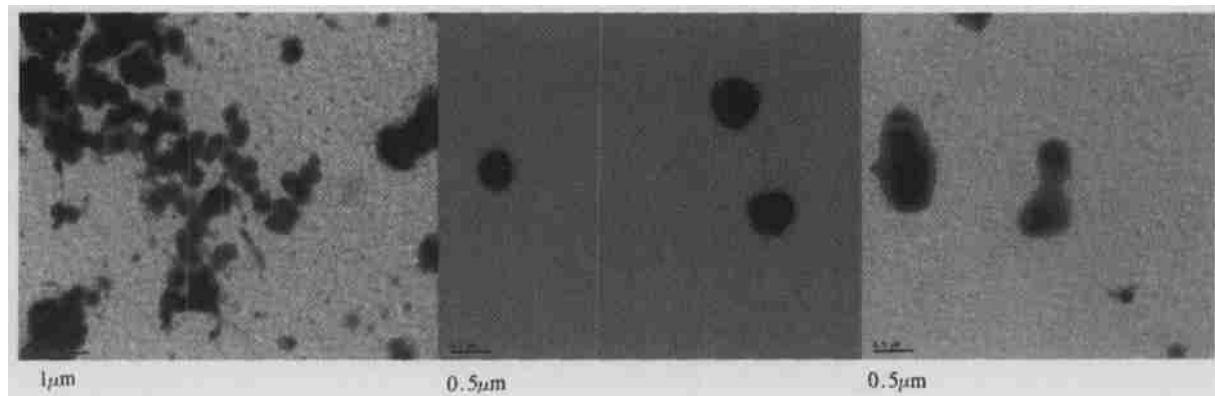


图 1 分离纯化的类立克次体电镜照片

Fig. 1 Electron micrographs of purified rickettsia-like organisms

Kuzyk 等应用 40% Percoll 密度梯度离心从感染的鲑鱼细胞系中纯化得到 *P. salmonis*, 并发现具 2 条带, 一个缺乏立克次体完整细胞的低密度带和一个由 *P. salmonis* 组成的高密度带<sup>[7]</sup>。Bames 和 Yuksel 等分别用 DMDS (Diatrizoate meglumine and diatrizoate sodium) 和 30% Percoll 密度梯度离心从感染的鲑鱼培养细胞系 (Chinook salmon embryo cell, CHSE-214) 中得到纯化的 *P. salmonis*, 这些纯化物中均存在宿主细胞和极少量细胞组织碎片<sup>[8,9]</sup>。Janett 等用 45% Percoll 密度梯度离心从感染的细胞培养中纯化得到 *P. salmonis*, 在出现的 2 条带中, 免疫荧光检测和电子显微镜观察显示高密度部分富含纯的 *P. salmonis*, 而低密度带显示较多的细胞碎片<sup>[10]</sup>。鱼类 RLO 的纯化主要来自感染的细胞系。由于贝类细胞系尚未建立, 张其中等用蔗糖密度梯度离心从近江牡蛎 (*Crassostrea ariakensis* Gould) 感染组织中分离纯化得到 RLO, 并未发现任何杂质<sup>[6]</sup>。这些分离纯化的 RLO 已应用于单克隆抗体的制备<sup>[10]</sup>和病原体分子分类学的研究(个人通讯)等。本次实验中, 应用蔗糖密度梯度离心法首次直接从淡水养殖乌鳢感染组织中分离纯化得到 RLO。纯化物负染电镜观察显示 RLO 高度密集, 但同大多数鱼类 RLO 的分离纯化一样, 存在少量细胞组织碎片。但尽管如此, 本实验为进一步开展乌鳢 RLO 的研究奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Fryer J L, Lannan C N, Garces L H, et al. Isolation of a rickettsiales like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile [J]. *Fish Pathol.*, 1990, **25**: 107—114
- [2] Mauel M J, Miller D L. Piscirickettsiosis and piscirickettsiosis like in-

- fections in fish: a review [J]. *Vet Microbiol.*, 2002, **87**: 279—289
- [3] Guo Q L, Chen Y X, Han X P. Pathology of haemorrhagic mouth opening disease of the eel, *Anguilla Japonica* [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 1997, **21**: 327—331 [郭琼林, 陈燕新, 韩先朴. 鳗鲡出血性开口病的病理学研究. 水生生物学报, 1997, **21**: 327—331]
- [4] Guo Q L, Lu Q Z. Histopathological studies on the Edwardsielliasis of the eel [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 1995, **19**: 56—60 [郭琼林, 卢全章. 鳗鲡爱德华氏菌病的组织病理学研究. 水生生物学报, 1995, **19**: 56—60]
- [5] Guo Q L, Jia W Z, Han X P, et al. Rickettsia-like organism infection in a freshwater cultured fish *Ophiocelphalus argus* C. in China [J]. *Prog Nat Sci*, 2004, **14**
- [6] Zhang Q Z, Wu X Z, Pan J P. Purification and morphology of rickettsia-like organism (RLO) from the tissues of *Crassostrea ariakensis* Gould [J]. *High Technol Letters*, 2002, **7**: 90—92 [张其中, 吴信忠, 潘金培. 近江牡蛎类立克次体的分离纯化及形态特点. 高技术通讯, 2002, **7**: 90—92]
- [7] Kuzyk M A, Thorton J C, Kay W W. Antigenic characterization of the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* [J]. *Infect Immun*, 1996, **64**: 5205—5210
- [8] Bames M N, Landolt M L, Powell D B, et al. Purification of *Piscirickettsia salmonis* and partial characterization of antigens [J]. *Dis Aquat Org*, 1998, **33**: 33—41
- [9] Yuksel S A, Thompson K D, Ellis A E, et al. Purification of *Piscirickettsia salmonis* and associated phage particles [J]. *Dis Aquat Org*, 2001, **44**: 231—235
- [10] Janett A, Aguayo J, Miquel A, et al. Characteristics of monoclonal antibodies against *Piscirickettsia salmonis* [J]. *J Fish Dis*, 2001, **24**: 205—215