

建立白斑综合症病毒在日本对虾体内潜伏性感染的方法研究*

刘波^{1,2} 俞志明^{1**}

(¹中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071)

(²中国科学院研究生院 北京 100039)

摘要 在 27 ℃, pH 8.0, 盐度 33 条件下, 用套式 PCR 方法和斑点杂交方法对日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 体内潜伏性感染 WSSV 的方法进行了研究。对健康日本对虾注射不同稀释倍数的白斑综合症病毒粗提液, 死亡率统计显示注射 10⁴, 10⁶ 倍稀释液组的日本对虾死亡率明显低于 10, 10², 10³ 倍组, 结合套式 PCR 方法和斑点杂交方法进行病毒检测结果发现, 仅 10, 10² 倍稀释液组斑点杂交和一步 PCR 结果呈阳性; 10³, 10⁴, 10⁶ 倍稀释液组经二步 PCR 检测为阳性、斑点杂交呈阴性, 该结果为建立或界定 WSSV 在日本对虾体内的潜伏性感染提供了方法学上的依据。

关键词 日本对虾 (*Penaeus japonicus*), 套式 PCR, 斑点杂交, 白斑综合症病毒, 潜伏感染
中图分类号 Q959.223*.63 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)08-0072-04

白斑综合症病毒 (White spot syndrome virus, WSSV) 自 20 世纪 90 年代初开始在亚洲北部各对虾养殖区发现, 尔后流传至北美, 其宿主范围广、流行广泛、危害严重、致病性强, 在开始发现症状的 3~10 d 内死亡率可达 100%, 成为目前限制对虾养殖业发展的重要因素, 如何预防和调控该疾病的发生是我国对虾养殖业所面临的重要问题。研究表明 WSSV 的暴发是病毒、宿主和环境三者共同作用的结果^[1], 有些携带病毒的对虾在适宜的环境条件下, 并不发病^[2], 这一阶段可称之为病毒潜伏期。在某些条件下, 这一阶段可持续很长时间, 直至对虾出池。但某些环境条件可以诱发处于潜伏期的对虾发病, WSSV 一旦暴发, 难以控制, 该阶段可称之为疾病暴发期。由此可见, 建立一个灵敏、能够诊断 WSSV 潜伏期的病毒检测方法, 研究环境因子对潜伏性感染 WSSV 的影响, 对预防 WSSV 的暴发具有十分重要的意义。但目前通过人工感染 WSSV、研究对染病对虾各方面的影响往往是在对虾出现急性症状, 即疾病暴发期进行的, 有关环境因子对 WSSV 潜伏性感染对虾的影响研究尚未见报道, 其主要原因是感染方法和诊断方法有待研究。为此, 本文通过套式 PCR 方法和斑点杂交方法相结合, 探讨了不同感染剂量对对虾发病及检测方法的影响, 为建立潜伏性感染和诊断方法进行了初步的探索。

1 材料和方法

1.1 实验动物及主要试剂

日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 购自即墨温泉镇, 经斑点杂交和 PCR 检测无病毒, 体长 7~8 cm, 暂养于 8 m³ 大缸内待用。蛋白酶 K 购自 Merck 公司, Taq 酶及琼脂糖均购自 Promega 公司, 引物序列参照参见 Lo 等^[3]对 WSBV PCR 的设计, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 套式 PCR 方法检测病毒

在谢树涛等方法^[4]的基础上, 进行一些改进。

1.2.1 模板制备 在冰块上取待检测对虾组织 0.1 g, 按 1/10 (W/V) 比例加入预冷 TN 缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH7.6, 0.4 mol/L NaCl) 1 mL, 冰浴匀

* 国家 973 项目“环境胁迫对对虾抗病力的影响和人工调控”G1999012011 号; 国家杰出青年基金项目 40025614 号; 中国科学院知识创新领域前沿项目 200223106 号。

第一作者: 刘波, 出生于 1978 年, 硕士研究生, 主要从事海洋生物免疫与疾病控制研究。

** 联系人, E-mail: zyu@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2003-04-29; 修回日期: 2003-05-19

浆,低温离心取上清液,加入蛋白酶 K 至终浓度为 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$,56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h,后沸水浴 10~15 min,立即冰浴 5 min,6 000 r/min 离心 10 min,再 8 000 r/min 离心 5 min,取上清液直接用作模板 DNA。对于不同稀释倍数的病虾组织 PCR 模板,依次用 TN 缓冲液 10 倍稀释待检组织的匀浆液,分别得到 $10^1 \sim 10^{10}$ 的稀释液,再按上述方法制备成不同稀释倍数的病虾 PCR 模板。

1.2.2 模板 DNA 的 PCR 反应及产物分析 反应体系为 50 μL ,其中含模板 DNA 1 μL 、Taq DNA 聚合酶 1 U、引物 20 pmol、dNTP 浓度 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、 Mg^{2+} 1.5 mmol/L,上层盖少许矿物油防止蒸发。扩增反应在 Biometra 公司梯度 PCR 仪中进行,条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min,然后进行 35 个循环,每个循环包括 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,最后一个循环结束后,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。取反应产物 8 μL 于含有溴化乙锭的 0.8% 琼脂糖凝胶中,电泳分离,使用 Pharmacia Biotech 公司 ImageMaster VDS 成像并分析。以第一次 PCR 扩增的产物 1 μL 为模板,按同样的 PCR 反应体系和条件,以内引物 P3 和 P4 代替原来的外引物 P1 和 P2,进行第 2 次 PCR 反应,即 nested-PCR。取扩增反应产物 8 μL ,经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶自动成像系统成像并分析。

1.3 斑点杂交检测方法

采用黄海水产研究所对虾暴发性流行病病原核酸探针点杂交检测试剂盒(I型),具体检测步骤参照文献[5]。

1.4 病毒感染剂量对对虾死亡率的影响实验

对虾在 8 m^3 缸中暂养 1 周后移入 70 L 小缸中,每缸 20 尾,2 d 后进行注射感染,病毒粗提液参照孔杰等方法^[6]。实验设 5 个实验组和一个对照组用于死亡率统计,每组均设一平行用作病毒检测,实验组依次注射稀释 $10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^6$ 倍的病毒粗提液 40 μL ,对照组注射等剂量的 PPB 溶液^[7]。注射后即日进行死亡率统计,每天换水 10%,早晚各投饵 1 次,及时清除死亡对虾,放至 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。 $10^1, 10^2, 10^3$ 倍组注射病毒后出现对虾急性发病症状,取 2 只发病期的对虾(注射后 3~4 d)进行病毒检测; $10^4, 10^6$ 倍及对照组一直未出现 WSSV 暴发病状,取 15 d 后仍然存活的对虾进行病毒检测。

2 结果

2.1 套式 PCR 灵敏度实验

图 1 为病虾肌肉组织不同稀释倍数匀浆液分别经一步 PCR 和第二步 PCR 对 WSSV 的扩增结果。该实

验显示:对一步 PCR 扩出的 1 447 bp 条带样品进行第二步 PCR 可进一步扩出 941 bp 的目的条带。其中,一步 PCR 呈阴性的、稀释 $10^3 \sim 10^8$ 倍的匀浆液经第二步 PCR 检测呈阳性。该实验结果说明,第二步 PCR 的灵敏度远远高于一步 PCR,约为一步 PCR 的 10^6 倍。

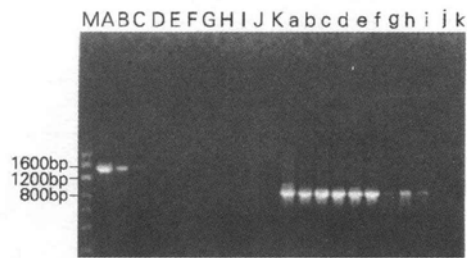


图 1 套式 PCR 灵敏度实验

Fig. 1 The sensitivity on detection of WSSV by nested-PCR

M 为 100 bp 分子量标准, A~K 分别为病虾 $1 \times$ 和稀释 $10^1 \sim 10^{10}$ 倍后的肌肉组织匀浆液一步 PCR 扩增结果; a~k 分别为病虾 $1 \times$ 和稀释 $10^1 \sim 10^{10}$ 倍后的肌肉组织匀浆液第二步 PCR 扩增结果

2.2 PCR 方法确立 WSSV 最佳检测组织实验

用相同的模板处理,分别对同一只染病对虾的肝胰脏、附肢、复眼、鳃、肌肉和心脏进行 PCR 扩增后,结果如图 2 所示。该结果表明,肌肉和附肢扩增出 1 447 bp 的目的亮条带明显好于鳃、肝胰脏和心脏等其他组织的扩增结果,可作为 PCR 方法检测 WSSV 病毒的最佳检测组织。目前一些文献认为鳃作为病毒检测的理想组织^[4,8],但在作者实验中鳃部未见有条带的出现,说明鳃部并非该检测方法的最佳部位,作者的结论同石拓、吕玲等^[9,10]报道相符。

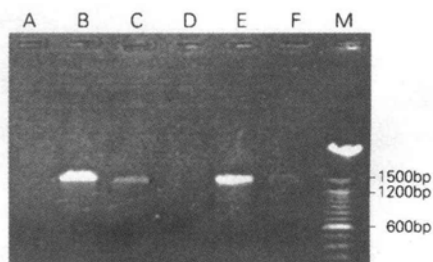


图 2 染病对虾不同组织的一步 PCR 扩增结果

Fig. 2 Detection of WSSV from different tissues of a shrimp infected with WSSV by one-step PCR

M 为分子量标准, A 肝胰脏, B 附肢, C 复眼, D 鳃, E 肌肉, F 心脏

2.3 不同病毒感染剂量对对虾死亡率的影响

图 3 为不同病毒感染剂量下的对虾累计死亡率

曲线。该结果表明,感染稀释 10 倍病毒粗提液的实验组存活时间最短、死亡率最高,在第 11 天死亡率达 100%;稀释 10^2 和 10^3 倍实验组的存活时间略长、死亡率略低,第 15 天死亡率为 80%。相比之下稀释 10^4 , 10^6 倍实验组死亡率很低,低于 30%,对虾存活率和日常行为状况几乎与未感染病毒的对照组对虾相同,并且在 15 d 之后生存状况一直比较稳定,无对虾死亡或对虾明显的行为异常现象。

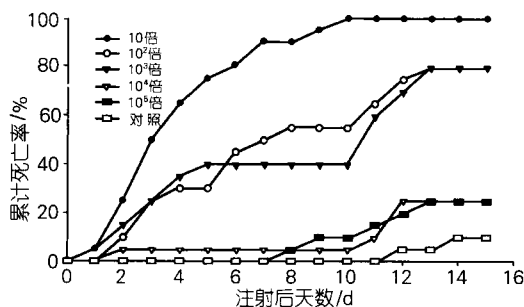


图 3 不同 WSSV 病毒感染剂量对对虾死亡率的影响
Fig. 3 The effect of WSSV infecting quantity on mortality rate of shrimps

2.4 对虾体内潜伏性 WSSV 的感染与检测方法

表 1 和图 4 分别是用斑点杂交方法和套式 PCR 方法检测相同实验对虾携带病毒的情况。结果显示注射稀释 10、 10^2 和 10^3 倍病毒粗提液的对虾经斑点杂交和一步 PCR 均能明显检出 WSSV 病毒,并且其病毒感染程度 10 倍组 $> 10^2$ 倍组 $> 10^3$ 倍组,与其累计死亡率相比较: 10 倍组 $> 10^2$ 倍组 $> 10^3$ 倍组(图 3),呈正相关。实验还发现,在该浓度范围内感染对虾进入白斑病暴发期的时间与感染量有关,感染量越大、时间越短: 10 倍和 10^2 倍组的感染对虾用斑点杂交方法在第 3 天就检测出病毒,而 10^3 倍组则在第 6 天才检测出,但无论哪个实验组,一经斑点杂交(或一次

PCR) 方法检测出 WSSV, 疾病暴发均无法控制, 实验组内的对虾在以后的几天之内死亡率可达 80% 以上。

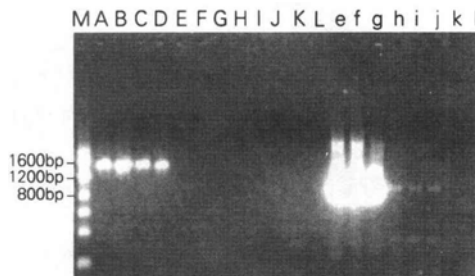


图 4 注射不同稀释倍数病毒粗提液的对虾的套式 PCR 检测结果

Fig. 4 Detection of WSSV from shrimps injected with serially 10-fold diluted WSSV stored solution by nested-PCR

M 为 100 bp 分子量标准, A ~ L 分别为注射稀释 10、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^6 倍病毒粗提液和对照组各取两个样的一步 PCR 检测结果; e ~ l 为注射稀释 10^3 、 10^4 、 10^6 倍病毒粗提液和对照组的二步 PCR 检测结果

注射稀释 10^4 和 10^6 倍病毒粗提液的对虾经斑点杂交和一步 PCR 方法均未检出携带病毒, 但二步 PCR 检测结果均呈阳性。对照感染对虾累计死亡率发现, 这两个组的累计死亡率均较低, 在实验过程中始终未发现 WSSV 暴发, 说明注射稀释 10^4 、 10^6 倍病毒粗提液的对虾携带少量病毒, 不出现急性症状, 病毒可能处于潜伏状态。实验结果还进一步表明, 一步 PCR 的灵敏度与斑点杂交方法基本相同, 而二步 PCR 的灵敏度远远高于一步 PCR 或斑点杂交方法。斑点杂交或一步 PCR 检测呈阳性的对虾已经处于白斑病毒的暴发期, 而二步 PCR 检测呈阳性、斑点杂交方法或一步 PCR 检测呈阴性的对虾生存状态与健康对虾相同, 此时病毒在其体内可能处于潜伏状态。

表 1 注射不同稀释倍数病毒粗提液的对虾在不同时间的斑点杂交检测结果

Tab.1 Detection of WSSV from shrimps injected with serially 10-fold diluted WSSV stored solution at various times by dot blot hybridization

检测时间	注射不同稀释倍数病毒粗提液的对虾					
	10	10^2	10^3	10^4	10^6	对照
第 3 ~ 4 天	+	+	-	-	-	-
第 6 天	-	-	+	-	-	-
第 24 天	-	-	-	-	-	-

3 讨论

如上所述,对虾疾病的发生是病原体、虾体及环境共同作用的结果。没有病原体,当然不会发生疾病;但是在有病原体的前提下疾病是否发生除了要看病原体的数量和致病力等内因,也要看虾体的抗病力和环境因素等外因的作用。丁美丽等^[1]研究发现环境因素不仅能影响虾体的抗病力,也能影响体内病原体的数量;已有实验结果表明,感染白斑综合症病毒的对虾是否出现临床症状与其感染病毒的数量有关,少量的病毒感染不会导致症状的发生,但一次大剂量的感染会使对虾出现急性症状^[2]。在一定的环境条件下,由于病毒可以通过内化模式存在于对虾体内而不被分解破坏,所以低剂量 WSSV 感染不一定会引起对虾出现急性临床症状,感染对虾的体表特征和行为与正常健康对虾相同^[12],病毒在对虾体内呈潜伏状态。如实验中注射稀释 10^{-4} 、 10^{-6} 倍病毒粗提液组对虾,其感染病毒只能通过套式 PCR 方法检出,但是这两个组对虾的死亡率要明显低于其他实验组,与对照组相比,除携带少量病毒外其他各方面与对照组对虾基本相同,可以认为这两个组中的白斑病毒处于潜伏状态,对于该感染状态的对虾可通过适当调控环境因子控制病情的发生。另外通过实验结果可以看出,该潜伏状态的病毒感染数量存在一定的范围,如作者实验中的 $\leq 10^{-4}$ 倍组。与实验中的 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 倍组比较,我们可以结合套式 PCR 的灵敏度高、特异性好和斑点杂交可以半定量、去除可能存在的假阳性的优点来诊断对虾 WSSV 疾病的感染状态:斑点杂交和一步 PCR 检测呈阳性的对虾已处于病毒的暴发期,而仅套式 PCR 检测呈阳性的对虾可以认为病毒在对虾体内呈潜伏状态,此时可以通过人工调控使病毒长时间处于这种状态而不暴发。

由此可见,套式 PCR 在对虾白斑症的潜伏感染状态的研究方面具有十分重要的作用^[3,4,9],由于它是以一步 PCR 的产物为模板、以外引物预期扩增片段之内的短核苷酸序列为内引物,所以出现假阳性的

几率大大减少,在病原体检测的特异性和灵敏度方面有质的提高^[13]。如上述实验结果表明套式 PCR 的灵敏度明显优于一步 PCR,最高可达一步 PCR 的 10^6 倍。正是套式 PCR 的上述优点,使我们诊断 WSSV 潜伏期对虾成为可能。

参考文献

- 1 Lightner D V, Redman R M. Shrimp disease and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 1998, 164: 201-220
- 2 相建海. 海水养殖生物病害发生与控制. 北京: 海洋出版社, 2001. 195-196
- 3 Lo Chu-Fang, Ho Ching-Hui, Peng Shao-En, et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis Aqu Org*, 1996, 27: 215-225
- 4 谢树涛, 何建国, 杨晓明, 等. 套式 PCR 检测斑节对虾白斑症病毒 (WSSV). *青岛海洋大学学报*, 2001, 31(2): 220-224
- 5 史成银, 宋晓玲, 黄捷, 等. 核酸斑点杂交分析法检测 HHNBV. *海洋与湖沼*, 1999, 30(5): 486-490
- 6 孔杰, 石拓, 刘萍, 等. 中国对虾一种 C 型杆状病毒的纯化技术及形态特征研究. *海洋与湖沼*, 1997, 28(3): 233-236
- 7 Huang J, Song X L, Yu J, et al. The components of an inorganic physiological buffer for *Penaeus chinensis*. *Methods in Cell Science*, 1999, 21: 225-230
- 8 战文斌, 王远红, 铃木信一, 等. 白斑症病毒在日本对虾体内的感染增殖. *水产学报*, 1999, 23: 278-282
- 9 石拓, 孔杰, 刘萍, 等. 对虾一种无包涵体杆状病毒病原的 PCR 检测. *海洋学报*, 2000, 22(4): 96-100
- 10 吕玲, 何建国, 谢树涛, 等. 白斑综合症杆状病毒 (WSBV) PCR 检测方法的改进及应用. *热带海洋*, 2000, 19(2): 90-96
- 11 丁美丽, 林林, 李光友, 等. 有机污染对中国对虾体内环境的影响研究. *海洋与湖沼*, 1997, 28(1): 7-22
- 12 雷质文, 黄捷, 梁成珠, 等. 白斑综合症的生物学特征. *海洋科学*, 2002, 26(3): 26-30
- 13 林万明. PCR 技术操作和应用指南. 北京: 人民军医出版社, 1995. 304-305

A METHOD RESEARCH OF ESTABLISHING THE LATENT INFECTION OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS(WSSV) IN *Penaeus japonicus*

LIU Bo^{1,2} YU Zhi-Ming¹

(¹*Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

(²*Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039*)

Received: Apr., 29, 2003

Key Words: *Penaeus japonicus*, Nested-PCR, Dot blot hybridization, White spot syndrome virus, Latent infection

Abstract

Under conditions of 27 °C, pH 8.0 and salinity 33, we studied the method of latent infection of white spot syndrome virus(WSSV) in *Penaeus japonicus* by nested-PCR and dot blot hybridization. Healthy *Penaeus japonicus* were injected with serially 10-fold diluted WSSV stored solution. Results show that accumulated mortality rates of shrimps which were injected with stored solution diluted 10⁴, 10⁶ times are more less than that of shrimps injected with solution diluted 10, 10², 10³ times. After detection of nested-PCR and dot blot hybridization, only 10, 10² groups show positive results by one-step PCR and dot blot hybridization. 10³, 10⁴, 10⁶ groups are positive by two-step PCR, but they are negative by dot blot hybridization. This experiment provides methodological evidence for establishing or seeking boundaries of latent infection of WSSV in *Penaeus japonicus*.

(本文编辑:刘珊珊)