

# 暴发性流行病病原对中国对虾亲虾人工感染及对子代影响的 PCR 检测\*

刘萍 孔杰 石拓 刘志鸿 李健 韩玲玲

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

**提要** 1997年4月在山东海阳市近海捕获10尾中国对虾,采用患暴发性流行病的虾池中的病虾为毒种,进行人工感染试验。采用两次聚合酶链反应(PCR)检测方法,对感染亲虾的胃、腮、卵巢,以及卵和各期幼体进行跟踪检测。对经人工感染的10尾亲虾组织的PCR检测结果表明,6尾虾的胃样呈阳性,其中4尾为第1次检测出阳性;1尾虾的腮样呈阳性;2尾虾的卵巢样呈阳性,且其所产的卵子也呈阳性;每尾亲虾产卵所孵化出来的各期幼体,经两次PCR检测均呈阴性。随着实验水温的上升,人工感染病毒的亲虾存活的时间缩短;卵子的孵化率随着对亲虾感染时间的增长而有大幅度降低的趋势。

**关键词** 病毒 人工感染 亲虾 子代 PCR检测

**学科分类号** S945.4

中国自70年代后期开始开展大规模对虾养殖,1992年全国对虾养殖面积已达16万公顷,总产量超过20万t。但从1993年起,由于受暴发性流行病害的影响,养殖对虾大面积死亡,产量大幅度降低,严重影响了经济效益。国内目前对虾病的病原、病理、检测技术及防治措施等进行了较多的研究(孔杰等,1997;刘萍等,1995;黄健等,1995a),对控制病害、减少经济损失及恢复生产起到了明显的促进作用。关于虾病的流行病学和传播途径等也有研究报道(宋晓玲等,1996;刘萍等,1998;蔡生力等,1994)。本文报告对海捕亲虾进行人工感染试验,并用感染病毒的亲虾进行育苗的研究结果,以期控制对虾暴发性流行病的传播途径、恢复对虾养殖生产提供资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 亲虾和毒种来源

中国对虾(*Penaeus chinensis*)亲虾于1997年4月捕自山东海阳市近海。毒种来源一部分为1995年7月山东省青岛市近郊对虾养殖场患暴发性流行病虾池的死亡中国对虾,经过电镜切片观察确认已感染病毒;其余毒种取自本所病研室,编号为HHNBV-957。

### 1.2 方法

**1.2.1 亲虾人工感染** 取10尾性腺发育到三期到四期的亲虾,按A—J编号,分别放入10个容积为100L的玻璃钢桶里进行单尾暂养,另设1尾亲虾作为阴性对照。玻璃钢桶上

\* 国家攀登计划B资助项目,PD B-6-6-1号。刘萍,女,出生于1962年12月,硕士,副研究员,E-mail: biogene@ns.qd.sd.cn

收稿日期:1998-03-26,收修改稿日期:1998-08-18

遮黑布,使用经过砂滤的海水,按常规方法进行管理。在自然水温(16℃)下暂养1天后,开始投喂毒种进行人工感染,每天早晚各投喂1次。试验分组如下:编号为A—F的6尾亲虾采用自然水温(16—17.5℃),G和H两尾亲虾保持恒温19℃,I和J两尾亲虾保持恒温20℃。温度控制采用RL-200N型自动控温加热棒(日本丸五工业株式会社制造)。

**1.2.2 幼体培养** 亲虾产卵后,取出亲虾,使卵继续进行培养孵化。当无节幼体孵出后,立即将幼体和未孵化的卵进行分离,弃去卵。幼体按常规方法进行育苗管理,育苗期间的水温为自然水温16—20℃,幼体的饵料按不同的发育阶段分别投喂单细胞藻类、轮虫和丰年虫幼体等,培养至仔虾体长为1cm以上。

**1.2.3 DNA提取** 将产过卵的亲虾立即取出解剖,分别取亲虾的胃、鳃、卵巢以及卵,提取基因组DNA。再定期采集各个不同发育时期的对虾幼体,每次取样均在30尾以上,且为头胸部分,提取基因组DNA。提取方法参照萨姆布鲁克等(1992)。

**1.2.4 PCR扩增** 病毒检测采用PCR方法,引物序列将在另文发表。PCR扩增仪为美国PE公司生产的PCR System 9600,程序设置为:94℃变性5min;94℃ 40s,53℃ 40s,72℃ 1min 40s,25个循环;72℃延伸5min;4℃保存。第1次PCR反应总体积为50μl,包括:模板(100ng / μl),5μl;缓冲液(自配:KCl,500mmol / L;Tris-Cl,100mmol / L,pH = 9.0;TritonX-100,1%),5μl;Mg<sup>2+</sup>(15mmol / L),5μl;Tag酶(5u / μl),0.2μl;dNTP(分别为2.5mmol / L),4μl;引物(15pmol / L),各为3μl;ddH<sub>2</sub>O,加至50μl。第2次PCR使用的模板为第1次PCR产物1μl,采用第1次PCR反应的程序。对于阴性对照的样品的处理也采用两次PCR检测的方法。每次反应均设一PCR的阳性对照。

**1.2.5 电泳** 取8μl PCR产物在1.0%琼脂糖凝胶上进行电泳,电压为3V / cm左右,用PGEM作为标准分子量(Marker)对照,在紫外透射仪上观察并照像。

## 2 结果

### 2.1 亲虾感染的死亡率、卵子孵化率及PCR检测结果

10尾亲虾经人工感染后,其死亡率、卵子孵化率和对亲虾组织及各期幼体的PCR检测结果见表1。在自然水温(16—17.5℃)条件下,除1尾死亡外,有5尾亲虾产卵。随着对

表1 人工感染亲虾情况及对亲虾组织及其幼体的PCR检测结果

Tab.1 Result of artificial infection and detection of tissues and postlarvae of *Penaeus chinensis* by PCR

培养温度(℃)	16—17.5						19		20		阴性对照	PCR 阳性对照
虾编号	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J		
感染持续时间(d)	3	4	5	7	8	6	3	4	2	2		
孵化率(%)	95	90	95	20	5	NO	60	NO	NO	NO	95	
胃 部	-	++	-	-	++	+	++	++	+	-	-	++
鳃 部	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	++
卵 巢	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	++
卵 子	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	++
无节幼体	-	-	-	-	-	NO	-	NO	NO	NO	-	++
蚤状幼体	-	-	-	-	-	NO	-	NO	NO	NO	-	++
仔 虾	-	-	-	-	-	NO	-	NO	NO	NO	-	++

++表示PCR检测第一次即为阳性;+表示PCR检测第二次为阳性;-表示PCR检测为阴性;NO表示亲虾未经产卵即死亡;“阳性对照”为投喂亲虾用的带毒对虾组织

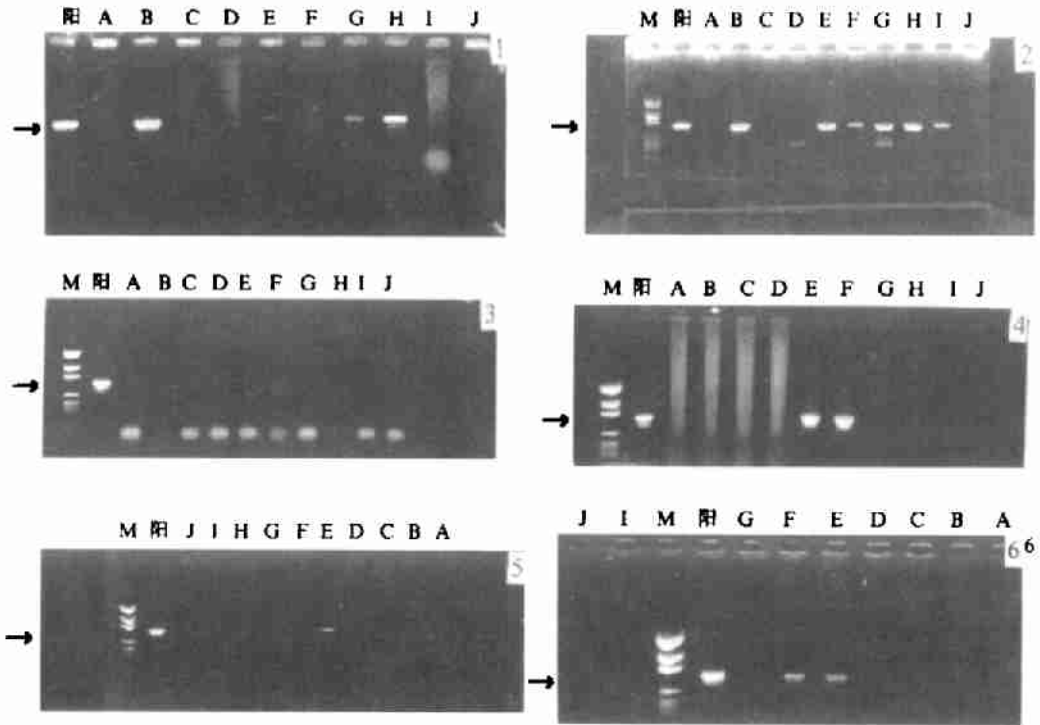


图 1 人工感染的中国对虾亲虾的 PCR 检测结果

Fig.1 The PCR detection result of in artificial infected parental prawn of *Penaeus chinensis*

1—2. 胃样：1. 第一次 PCR 检测结果；2. 第二次 PCR 检测结果。3—4. 卵巢样：3. 第一次 PCR 检测结果；4. 第二次 PCR 检测结果。5. 鳃样的第二次 PCR 检测结果。6. 卵子的第二次 PCR 检测结果  
箭头所指为产物

亲虾感染持续时间的延长，幼体的孵化率有降低的趋势。A、B、C 三尾亲虾感染病毒的时间在 5 天以内，对卵的孵化率几乎没有影响；而 D 和 E 两尾亲虾感染病毒的时间分别为 7 天和 8 天，卵的孵化率大幅度降低，分别只有 20% 和 5%；F 亲虾感染病毒 6 天后死亡。在 19℃ 温控组中，G 亲虾感染 3 天后产卵，卵子孵化率为 60%；H 亲虾在感染 4 天后死亡。20℃ 温控组的 2 尾亲虾(I 和 J)在感染 2d 后均死亡。阴性对照的亲虾正常产卵，卵子孵化率为 95%。

### 2.2 亲虾组织及其幼体的 PCR 检测结果

由表 1 可知，阴性对照组的 7 个样品经第二次 PCR 检测均为阴性。在实验组的 10 尾亲虾中，胃样 DNA 有 4 尾(B、E、G、H)经第 1 次 PCR 检测即为阳性(图 1: 1)，而 F 和 I 为第 2 次检测出阳性，因此共有 6 尾虾的胃样 DNA 为阳性(图 1: 2)；卵巢样 DNA 第 1 次 PCR 检测的阳性结果很弱，第 2 次检测的阳性结果则很强(图 1: 3—4)；鳃样和卵样 DNA 均为第 2 次 PCR 检测出阳性，鳃样只有 1 尾(E)为阳性(图 1: 5)，卵样有 2 尾(E、F)为阳性(与卵巢相同)(图 1: 6)；而各期幼体第 1 次和第 2 次 PCR 检测的结果均为阴性。

## 3 讨论与结论

3.1 自从 Couch(1974)在产自墨西哥湾的桃红对虾(*P. duorarum*)体内发现第一例对虾

病毒开始,目前已有许多关于对虾病毒性的报道(Lu *et al*, 1994)。在1993年以前中国对虾中仅见肝胰腺细小样病毒(Hepatopancreatic parvo-like virus, HPV)和呼肠弧病毒(Reovirus, REO)的报道(Lightner *et al*, 1985)。1993年我国沿海地区暴发的大规模流行病,使对虾养殖业遭受了巨大的损失。国内对这场病害的水平传播已有一定研究(王文兴, 1996; 黄捷等, 1995b, 1995c),但有关该病的垂直传播方面的报道较少。亲虾的生殖系统能否被杆状病毒侵染一直是人们所关心的问题,对中国对虾越冬亲虾进行人工感染的研究发现卵母细胞中有大量的病毒粒子(宋晓玲等, 1996; 包振民等, 1997),表明该病毒可以通过生殖细胞进行垂直传播。本文的实验观察结果表明,亲虾的胃是杆状病毒侵染的最直接的靶组织,卵巢和鳃是间接的靶器官;PCR检测结果揭示,间接的靶器官中,亲虾的卵巢更敏感,推测因为亲虾卵巢的代谢最旺盛,发育也最快,病毒感染卵巢组织,进而感染卵母细胞,导致卵的带毒。但跟踪检测幼体时并没有发现阳性结果,说明病毒难以从卵直接向幼体进行传播,这与黄捷等<sup>1)</sup>关于中国对虾感染病毒是获得性垂直传播的推断相一致。

**3.2 感染杆状病毒性的亲虾在低温条件下的实验过程中并没有表现出发病的症状,呈隐性的感染状态(宋晓玲等, 1996),仍能进行正常的发育和产卵;但卵巢已感染病毒性的亲虾在产卵后,卵子孵化率降低。在实验水温为16—17.5℃时,亲虾感染3—5天时,对孵化率几乎没有影响,PCR检测结果也说明此时病毒尚未感染到鳃和卵巢等间接的靶器官。亲虾感染病毒7—8天后,PCR检测卵巢和卵均为阳性,说明病毒已经侵染到卵巢内的卵母细胞中,这时亲虾一旦产卵,孵化率将大幅度降低。实验水温为19℃时,1尾亲虾感染3天产卵,卵的孵化率为60%,另1尾亲虾在第4天时死亡;实验水温为20℃时,结果与在19℃时的相似,在感染2天时均已死亡。但这两组PCR检测结果却表明,只有胃样为阳性,其它组织均为阴性,作者认为可能是水温升高对将要产卵的亲虾具有刺激作用,造成孵化率降低并死亡,而非感染病毒所致。**

**3.3 值得注意的是,不论卵巢和卵是否感染病毒,后期的幼体经PCR检测均为阴性,原因可能是:(1)感染病毒性的卵根本不孵化;(2)由于本实验育苗的水温较低(<20℃),幼体发育进程加长,投喂的活体饵料(轮虫和丰年虫无节幼体)充足,基本不会以死的幼体为食,而且在育苗期间,坏卵和死卵经吸底换水换出,与幼体进行了分离,降低了再感染的可能性。因此,苗种生产厂家应杜绝带毒亲虾入池,将亲虾池与育苗池隔离,育苗的水温应在适温范围内尽可能控制在较低水平,防止幼体再感染的发生。**

## 参 考 文 献

王文兴, 1996. 脊尾白虾感染和传播中国对虾暴发性病毒性的初步研究. 见: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

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DNA分析. 海洋与湖沼, 28(4):

1) 黄 捷等, 1996. 国家“八五”应急攻关专题:对虾暴发性流行病防治及控制技术研究(山东寿光示范区)工作报告

394—398

包振民, 胡景杰, 姜 明等, 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

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): 1—10

刘 萍, 孔 杰, 李 健等, 1998. 暴发性流行病病原对中国对虾仔虾的人工感染实验研究. 海洋科学, 1: 1—4

宋晓玲, 黄 健, 王崇明等, 1996. 皮下及造血组织坏死杆状病毒对中国对虾亲虾的人工感染. 水产学报, 20(4): 374—378

黄 健, 宋晓玲, 于 佳等, 1995a. 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, 16(1): 1—10

黄 健, 于 佳, 宋晓玲等, 1995b. 1994 年对虾暴发性流行病病原及传播途径的初步调查. 海洋水产研究, 16(1): 91—97

黄 健, 于 佳, 王秀华等, 1995c. 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

蔡生力, 黄 健, 王崇明等, 1994. 1993—1994 年对虾暴发病的流行病学研究. 水产学报, 19(2): 112—119

萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 著, 金冬雁译, 1992. 分子克隆试验指南. 北京: 科学技术出版社, 463—468

Couch J A, 1974. Free and occluded virus similar to baculovirus in hepatopancrease of pink shrimp. Nature, 274: 229—231

Lighther D V, Redman R M, 1985. A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. J Invertd Path, 45: 47—53

Lu Y, Tapay L M, Brock J A *et al*, 1994. Infection of the yellow head baculo-lick virus (YBV) in two species of penaeus shrimp, *Penaeus stiirostris* (Sümpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). J Fish Dis, 17: 649—656

## PCR DETECTION OF ARTIFICIAL INFECTION OF BROOD SHRIMP *PENAEUS CHINENSIS* WITH THE PATHOGEN OF THE EPIDEMIC DISEASE AND THE EFFECT ON THE LARVA

LIU Ping, KONG Jie, SHI Tuo, LIU Zhi-hong, LI Jian, HAN Ling-ling  
(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

**Abstract** Artificial infection of 10 brood shrimps of *Penaeus chinensis* which were caught from inshore of Haiyang City, Shandong Province in April, 1997, was carried out by feeding with specimen affected by the virus of the epidemic disease. The shrimps were placed in 100L glass fiber reinforced plastic tanks individually, one of which was used as the control. After reared one day at 16°C, the shrimps were fed with specimen affected by the virus twice a day. After the brood shrimps spawned, the stomachs, gills, ovaries and eggs were taken out for the extraction of DNA. The eggs were hatched, and the nauplius, zoea, mysis and post-larva were sampled (above 30 each) periodically for the extraction of DNA. The Polymerase Chain Reaction (PCR) technique was employed to detect the existence of the virus in the stomachs, gills, ovaries, eggs and post-larva.

Among the 10 affected brood shrimps, positive results were obtained in 6 stomachs, 4 of them were positive in the first PCR test. Gills of the shrimp are positive. Ovaries of two shrimps and their eggs were also positive. All stages of the larva and the postlarva showed negative results. This virus can infect the ovaries which further infect the oocytes, but not larva. The virus could not spread from eggs to larva directly. As the experiment water temperature was 16—17.5°C, after the brood shrimp was infected for 3—5 days, the hatchery rate did not change, but for 7—8 days, the oocytes and eggs were all shown to be positive by PCR technique, and the hatchery rate decreased seriously; as the water temperature was over 19°C, only the stomachs was detected positive by the PCR technique. Thus, in response to water temperature rising, decrease in the death rate and hatchery rate here was not affected by the virus, but by the high temperature itself. With the water temperature rising, the survival time of the affected brood shrimps shortens. The hatching rate of nauplius decreased greatly with a prolonged brood shrimp affection time.

**Key words** Virus Artificial infection Brood prawn Postlarva PCR detection

**Subject classification number** S945.4