

文章编号:1005-8737(2000)01-0051-04

聚合酶链反应(PCR)检测 养殖对虾的白斑症病毒(WSSV)感染

战文斌¹, 邢 婧¹, 王远红¹, 铃木信一², 福田颖穗²

(1. 教育部水产养殖重点实验室 青岛海洋大学, 山东 青岛 266003; 2. 水族病理研究室 东京水产大学, 日本)

摘 要:对虾 WSSV 病是亚洲对虾养殖业中的一个棘手问题。本研究采用 Kimura 引物, 用 PCR 技术对不同生长期的中国对虾(*Penaeus chinensis*)进行了 WSSV 的检测, 同时也检测了对虾发病时养殖池中多见的野生厚蟹(*Helice* sp.)和矛尾刺鲷虎鱼(*Acanthogobius hasta*)。检测结果表明:分别在检测的 5 尾亲虾中的 1 尾, 6 尾仔虾中的 1 尾, 5 尾稚虾中的 3 尾及所检测的 5 尾病虾和 2 只厚蟹中获得到 982 bp 的 PCR 扩增产物, 说明为 WSSV 感染阳性。在检测的 2 尾矛尾刺鲷虎鱼中均未获得 PCR 扩增产物, 说明为 WSSV 感染阴性。在亲虾、虾苗以及虾池内的野生厚蟹中检测到 WSSV 感染的阳性结果表明:WSSV 感染的亲虾有可能是病毒的宿主, WSSV 感染的野生厚蟹有可能是病毒中间宿主或病毒的携带者, 它们在对虾 WSSV 病的感染、传播中起了重要的作用。

关键词:对虾; 白斑症病毒; 聚合酶链反应

中图分类号:S945.19

文献标识码:A

1992 年以来, WSSV 病已在 4 种以上的对虾中发现, 并遍布亚洲各养虾国。该病的主要症状是在头胸甲上有白斑, 病原是一种无包涵体、杆形、具有囊膜的病毒, 称为白斑症病毒, 它的致病性很强, 普遍引起养殖对虾的大量死亡^[1,2]。自 WSSV 病发生 6 年来, 该病一直是对虾养殖业的棘手问题, 根据有关研究报告 WSSV 的感染范围还在不断扩大^[3-5]。因此, 对不同生活阶段的对虾以及对虾生活环境中的有关生物进行病毒检测, 对了解病毒的感染与传播, 进而控制该病毒的继续蔓延意义重大。

本文应用 PCR 技术检测了亲虾、仔虾、稚虾等以及对虾发病时养殖池中多见的野生厚蟹(*Helice* sp.)和矛尾刺鲷虎鱼(*Acanthogobius hasta*)的

WSSV 感染。

1 材料和方法

1.1 检测样品

从对虾育苗厂采集仔虾、稚虾、海捕亲虾, 从对虾养殖厂采集养殖期病虾及养殖池中的野生厚蟹和矛尾刺鲷虎鱼作为 PCR 检测样品。检测样品的种类和数量见表 1。

1.2 PCR DNA 模板的提出

从样品的组织匀浆中提出 DNA 作为 PCR 扩增的模板。提出方法:在 1 ml 的 Eppendorf 管中分别将 50 μ l 组织匀浆悬浮于 450 μ l 的消化缓冲液(50 mmol/L Tris, 20 mmol/L EDTA, 0.5% SDS, pH 8.5)中, 每管再加入 10 μ l 蛋白酶 K 溶液(20 mg/ml)在摇床上 55℃ 过夜, 然后 95℃ 孵育 10 min 灭活蛋白酶 K。以等体积氯仿、异戊醇提出 2 次, 再分别用等体积的酚、氯仿、异戊醇提出 2 次, 用 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA, 用 70% 的乙醇进行洗涤。

收稿日期:1999-04-30

基金项目:863 海洋领域海洋生物技术资助项目(819-Q-08);
国家重点基础研究规划项目(G1999012002)和教育部分留学回国人员
科研启动基金资助项目

作者简介:战文斌(1960-), 男, 山东莱阳人, 青岛海洋大学教授, 博士生导师, 从事水产养殖病害研究。

提出的 DNA 沉淀溶解于适量的蒸馏水中, 4℃ 储藏备用。

1.3 PCR 引物

本文采用 Kimura^[6] 的一组引物:

P1: 5'-ATCATGGCTGCTTCACAGAC-3'

P2: 5'-GGCTGGAGAGGACAAGACAT-3'

表 1 PCR 检测的样品

Table 1 Samples detected by PCR

样品 Sample	样品数 Number of samples	检测的组织 Detected tissues	白斑有无 White spots	采集时间 Time of sampling
亲虾 Spawner shrimp	5	鳃 Gills	-	四月 April
仔虾 Postlarva	6	整虾 Whole body	-	五月 May
稚虾 Juvenile	5	鳃 Gills	-	六月 June
蟹 Crab	2	鳃 Gills	-	六月 June
鰕虎鱼 Javelin goby	2	鳃、血 Gills, blood	-	六月 June
病虾 Diseased shrimp	5	鳃 Gills	+	七月 July

1.4 WSSV 的 DNA 扩增

PCR 扩增仪为 GeneAmp PCR 9700 (Perkin, Elmer)。30 μl 的 PCR 扩增液中包含 10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 1.5 单位的 Taq DNA 聚合酶, 2 μmol/L 引物以及 DNA 模板。PCR 的反应条件: 第 1 循环为 93℃, 3 min; 57℃, 1.5 min; 72℃, 5 min。第 2 循环以后为 93℃, 1 min; 57℃, 1.5 min; 72℃, 1 min。第 30 循环后在 72℃ 增加 5 min 的延长。最后 4℃ 保温。

1.5 PCR 产物的琼脂糖电泳

将 PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖胶上进行电泳, 电泳液为 0.5% TBE (Tris, Boric acid, EDTA)。λHind III DNA 标准分子量、阳性和阴性对照也同时进行电泳, 电泳后经溴乙锭处理, 紫外照射观察拍照。

①战文斌. 对虾白斑症病毒(WSSV)对蟹类的感染. 见: 中国动物学会, 海洋湖沼学会, 甲壳动物学会. 学术讨论会论文摘要汇编. 河北承德: 1998.

2 结果

2.1 亲虾

从 500 尾产卵亲虾中取 5 尾进行了 PCR 检测。在检测的 5 尾亲虾中有 1 尾获得 982 bp 的 PCR 扩增产物(图版 I-1), 说明五分之一的亲虾为 WSSV 携带阳性。

2.2 仔虾

检测的仔虾规格为 1.5 cm, 是由上述 500 尾亲虾所产卵培育的。在检测的 6 尾中有 1 尾获得 982 bp 的 PCR 扩增产物(图版 I-2), 为 WSSV 感染阳性。

2.3 稚虾、厚蟹和矛尾刺鰕虎鱼

样品采自对虾养殖池。在检测的 5 尾稚虾中的 3 尾(图版 I-3), 全部的 2 只厚蟹(图版 I-4)获得 PCR 扩增产物, 但在 2 尾鰕虎鱼中都没有获得 PCR 扩增产物(图 I-4)。

2.4 发病期对虾

在对虾 WSSV 病发期, 从养殖虾池中采的 5 尾虾, 经 PCR 检测全部获得 982 bp 的 PCR 扩增产物(图版 I-5), 均为 WSSV 感染阳性。

3 讨论

对虾养殖所用虾苗全部来自对虾育苗厂, 育苗用亲虾或从自然海区捕获, 或人工越冬, 在育苗前对亲虾进行 WSSV 检测, 为生产健康无病毒的虾苗提供保证。本研究应用 PCR 法检测海捕亲虾有 WSSV 感染的阳性个体, 由此批虾产的卵培育出的仔虾也检测有 WSSV 感染的阳性个体, 因此, 存在病毒由亲虾传播给虾苗的感染途径。目前虽然垂直传播尚不明, 但亲虾的粪便等排泄物污染了海水, 通过海水进行水平传播的可能性非常大。Zhan 等^[2]通过对 WSSV 病的流行病学调查认为海水是 WSSV 的传播媒介。

在对虾养殖池内, 除了养殖的对虾外还有一些野生蟹类和鱼类, 它们随换水进入虾池内。在对虾发病的虾池中野生蟹类(主要为厚蟹)也呈现病态, 当靠近它们的时候, 并不逃避, 并且在虾池边经常能看到死蟹。已有报道蟹类对这种病毒是易感的, Lo 等^[3]利用 PCR 对野生的蟹类和对虾进行了 WSSV 检测, 结果为病毒感染阳性。战文斌等^①对三疣梭子蟹进行了 WSSV 的感染实验并用电泳进行了观察, 用荧光抗体和 PCR 进行了检测。本研究对养殖

虾池中野生的厚蟹进行了 PCR 检测,结果也为 WSSV 感染阳性。因此,蟹类可能在 WSSV 病的传播感染中起了中间宿主或病毒携带者的作用,而养殖虾池中野生鰕虎鱼经 PCR 检测为病毒感染阴性,说明 WSSV 不感染该鱼类。

WSSV 的感染途径目前并不十分清楚,但是已有的资料为今后的防治提供了思路,首先应用未受病毒感染的亲虾生产虾苗;其次在放苗前,彻底清除养虾池中病毒携带生物;再次由于病毒可经海水传播^[2],因此在发病期采用封闭式的养殖系统是必要的;最后必须注意应用 PCR、核酸探针、单克隆抗体等技术进行病毒的经常性检测。

1992 年以来,WSSV 病在亚洲养虾国引起养殖对虾的大量死亡。自然发病的养殖对虾有:中国对虾(*Penaeus chinensis*),日本对虾(*P. japonicus*),斑节对虾(*P. monodon*),长毛对虾(*P. penicillatus*),刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)。人工感染引起发病的对虾有:万氏对虾(*P. vannamei*),蓝对虾(*P. stylirostris*)。养殖实践表明,中国对虾对 WSSV 最易感,日本对虾和斑节对虾对 WSSV 具有一定的抗性。最近 Lightner 等^[7]对西半球的对虾进行了 WSSV 的感染实验,结果表明,WSSV 可引起白对虾(*P. setiferus*)和万氏对虾的严重感染,累积死亡率高达 100%;可引起褐对虾(*P. aztecus*)的中度感染,累积死亡率在 27%;对桃红对虾(*P. duorarum*)并不表现出感染症状,死亡率为 0。这

说明 WSSV 对不同种类的对虾感染力不同,反过来就是说,不同对虾对 WSSV 的抵抗力不同。这为寻找对虾的抗病毒基因和培育抗病毒病的对虾提供了新思路。

参考文献:

- [1] 战文斌,俞开康,孟庆显. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)杆状病毒病的研究[J]. 中国水产科学,1995,2:(2)22-28.
- [2] Zhan W B, et al. White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1998, 10: 405-410.
- [3] Lo C F, et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1996, 27:215-225.
- [4] Zhan W B, et al. Production of monoclonal antibodies against white spot syndrome virus [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1999a, 11:17-22.
- [5] Zhan W B, et al. Using developed monoclonal antibodies for detection of *Penaeus chinensis* WSSV infection [A]. In: Proceedings of International Symposium on Progress and Prospect of Marine Biotechnology[C]. Qingdao: 1999b, 156-161.
- [6] Kimura T, et al. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR[J]. Fish Pathology, 1996, 31:93-98.
- [7] Lightner D V, et al. Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1998, 10:271-281.

Detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured shrimp by PCR

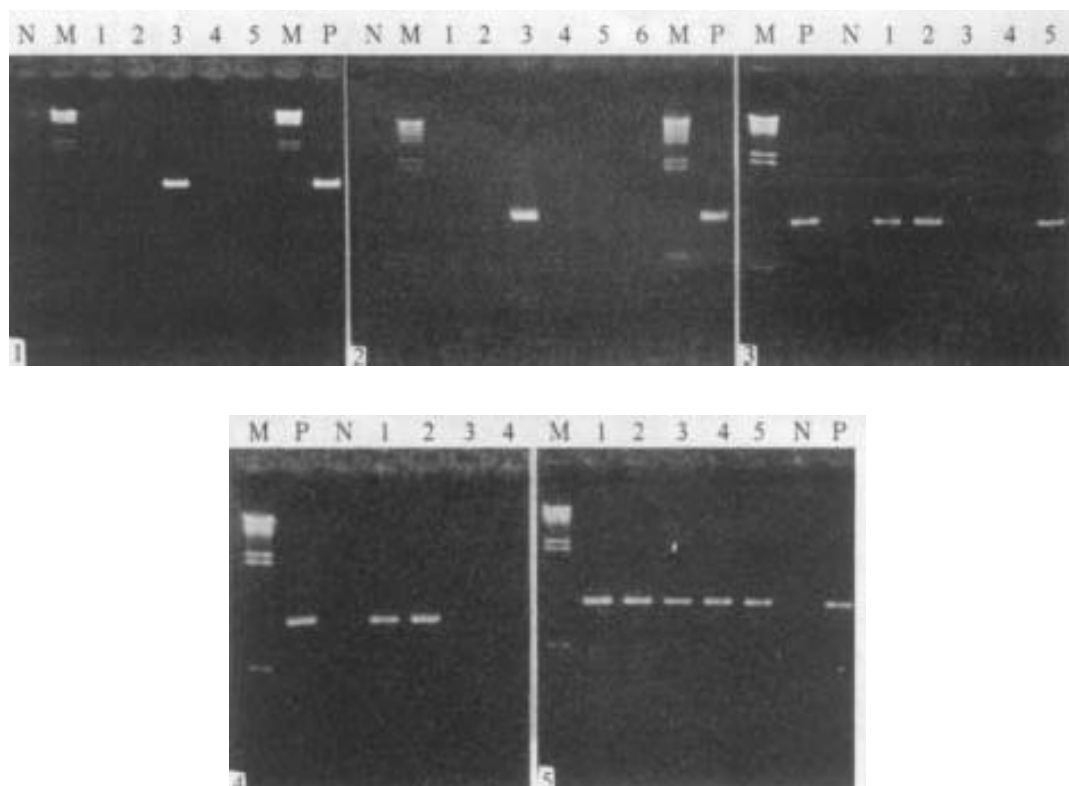
ZHAN Wen-bin¹, XING Jing¹, WANG Yuan-hong¹, Suzuki S², Fukuda H²

(1. Aquaculture Research Laboratory, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003 China;

2. Tokyo University of Fisheries, Konan, Minato Tokyo, Japan)

Abstract: White spot syndrome virus (WSSV) disease is a key problem in shrimp culture industry in Asian countries. The present study attempted to detect the WSSV infected in some developmental stage of *Penaeus chinensis* by PCR using Kimura primer. And wild crab (*Helice* sp.) and javelin goby (*Acanthogobius hasta*) captured from shrimp culture pond were also detected. The detecting results showed that one out of five shrimp spawners, one out of six postlarvae, three out of five juveniles, all of five diseased shrimps and all of two crabs yielded a 982 bp PCR product while two javelin goby no PCR product appeared. WSSV positive was obtained from the spawners, seedlings and wild crabs in shrimp culture ponds. It was indicated that WSSV-infected spawners maybe the virus reservoir and the wild crabs maybe the virus inter-host or carrier probably. They play an important role in transmission and spreading of shrimp WSSV disease.

Key words: *Penaeus chinensis*; WSSV; PCR



图版 I Plate I

M: λ Hind III DNA 标准分子量(Marker); P: WSSV 阳性对照(Positive control), N: WSSV 阴性对照(Negative control)

1. 泳道 1~5 分别为亲虾样品。Lines 1~5: Samples of shrimp spawner individually. 2. 泳道 1~6 分别为仔虾样品。Lines 1~6: Samples of postlarva individually. 3. 泳道 1~5 分别为稚虾样品。Lines 1~5: Samples of juvenile shrimp individually. 4. 泳道 1~2 分别为蟹样品;泳道 3~4 分别为蝦虎鱼样品。Lines 1~2: Samples of crab individually, lines 3~4: Samples of javelin goby individually. 5. 泳道 1~5 分别为病虾样品。Lines 1~5: Sample of diseased shrimp individually.