

间接免疫荧光法检测栉孔扇贝急性病毒性坏死症病毒

王秀华,王崇明,黄 健

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所,山东 青岛 266071)

摘要:用纯化栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)急性病毒性坏死症病毒(AVNV)免疫兔子,以兔抗血清为一抗,荧光标记的羊抗兔抗体为二抗,采用冰冻切片技术,建立了栉孔扇贝 AVNV 的间接免疫荧光检测方法。用该方法分析栉孔扇贝和海湾扇贝(*Argopecten irradians*)体内 AVNV 感染强度,并对感染率进行统计。结果表明,栉孔扇贝的肾脏、肝胰腺中,AVNV 阳性信号最强,呈现中度到重度感染,其 AVNV 感染率 100%。鳃丝、性腺及闭壳肌中未检测到阳性信号。在海湾扇贝的肝胰腺及肾中 AVNV 的感染率也较高。提示 AVNV 感染扇贝的靶器官主要是肾脏、肝胰腺。对与栉孔扇贝同一海区养殖的海湾扇贝在栉孔扇贝发病期间存活率较高的原因进行了讨论。

关键词:栉孔扇贝;栉孔扇贝急性病毒性坏死症病毒;间接免疫荧光检测

中图分类号:S944.43 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)01-0038-05

1997 年以来,我国北方沿海养殖的栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)在夏季连年暴发大规模死亡^[1],给扇贝养殖业造成了巨大的经济损失^[2],并严重制约了该产业的发展。通过流行病学调查、病原排查,发现病毒感染是引起栉孔扇贝大规模死亡的直接原因,并将该病暂称为栉孔扇贝急性病毒性坏死症(Acute Viral Necrobiosis Disease; AVND)^[3-6]。鉴于,建立 AVND 病毒(Acute Viral Necrobiosis Virus, AVNV)的快速、灵敏的检测方法,对研究栉孔扇贝急性病毒性坏死症流行病的发生、传播途径以及寻找有效的控制措施均具有重要意义。

AVNV 为新近发现的一种扇贝病毒,前期病原检测技术主要依靠电镜观察实现,由于该方法耗时长、费用高,作者运用分离纯化的 AVNV 免疫兔子获得了抗血清,并建立了 ELISA 检测方法^[7]。在此基础上,本研究对 AVNV 间接免疫荧光检测技术进行了探讨,并应用于海区养殖扇贝病原 AVNV 的检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品贝 2003年9月27日从青岛太平角扇贝养殖场取2龄栉孔扇贝(17月龄),壳高(6.1±0.6)cm;3龄栉孔扇贝(29月龄),壳高(7.5±0.8)cm;当年

海湾扇贝(*Argopecten irradians*) (5月龄),壳高(3.7±0.3)cm。

1.1.2 抗体 抗血清由本实验室制备保存,制备及纯化方法见文献[6],荧光标记二抗(羊抗兔 IgG 标记 FITC)购自北京鼎国生物技术有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 间接免疫荧光检测方法 取待检样品,冰冻切片机制片,样品厚 4 μm,置于载玻片上风干后,95%酒精中固定 10 min,用 5% 过氧化氢甲醇溶液处理 5 min 后,室温干燥 20~30 min, PBS(Na₂HPO₄ 0.04 mol/L, NaH₂PO₄ 0.01 mol/L, NaCl 0.1 mol/L, KCl 0.0125 mol/L)冲洗 5 min×2 次,置于湿盒内,滴加一抗,37℃ 孵育 30 min; PBS 冲洗 5 min×2 次,滴加荧光标记二抗 37℃ 孵育 30 min, PBS 冲洗 5 min×2 次。最后,甘油缓冲液(20 mL 甘油与 0.5 mol/L pH 9.5 碳酸缓冲液 20 mL 混匀)封片,荧光显微镜观察,以出现黄绿色荧光剂为阳性结果。

1.2.2 抗体最佳工作浓度选择 二抗稀释倍数按产品说明进行(体积比 1:10),一抗以 1:10, 1:100, 1:1 000, 1:10 000, 1:100 000 进行稀释,确定一抗最佳工作浓度。

1.2.3 阻断试验 染色时先用非荧光标记的羊抗兔抗体,替代二抗与一抗结合进行染色,再用荧光标记的特异性抗体进行染色反应。

收稿日期:2004-05-11; 修订日期:2004-07-05。

基金项目:国家“973”课题项目资助(G1999012001);山东省科技攻关项目(2004GG2205115)。

作者简介:王秀华(1969-),男,副研究员,主要从事水产养殖动物病害及免疫学研究, E-mail: wqxiaohua@public.pd.sd.cn

1.2.4 吸收实验 用经过过量纯化 AVNV 吸收过的兔抗血清为一抗,进行染色反应。

1.2.5 阳性对照 进行样品固定时,取平行样品,一份用电镜固定液固定,并进行电镜观察,以电镜检测出 AVNV 的样品即为阳性样品,另一份组织进行的免疫组化检测结果即作为阳性对照。

1.2.6 阴性对照 用未免疫的正常兔血清替代一抗,进行染色反应作为替代对照,同时用 PBS 代替一抗进行染色作为空白对照。

1.2.7 感染率 指相同组织中,可检测出 AVNV 的样品数占总样品数的百分比。

1.2.8 感染强度 轻度感染:10×40 倍视野可见阳性信号 10 个以下;中度感染:10×40 倍视野可见阳性信号在 10~100 个;重度感染:10×40 倍视野可见阳性信号 100 个以上。

2 结果

2.1 二抗最佳工作浓度

按检测步骤,分别取栉孔扇贝外套膜、鳃、肾脏、肝胰腺、后肠、闭壳肌及性腺进行冰冻切片,二抗按 5 个稀释梯度进行染色观察,确定最佳反应条件。结果表明,二抗按体积比 1:100、1:1 000、1:10 000 的 3 个稀释梯度染色时,均能得到清晰的荧光观察效果。实验确定二抗的工作浓度按 1:1 000 稀释。

2.2 扇贝各器官 AVNV 检测结果

取 2 龄栉孔扇贝、3 龄栉孔扇贝及海湾扇贝各 10 只,分别对其外套、鳃、肾脏、肝胰腺、后肠、闭壳肌及性腺 7 个部位的组织进行冰冻切片、染色,荧光显微镜观察,并对结果进行统计。扇贝不同组织的感染强度及感染率统计结果见表 1。被检测的栉孔扇贝组织中部分样品阳性与阴性显色结果见图版 I。

表 1 扇贝各组织中 AVNV 感染强度、感染率统计结果

Tab.1 Statistic results of intensity and infection rate of AVNV in scallop tissues

项目 Item	外套 Mantle	鳃 Gill	肾 Kidney	肝胰腺 Digestive gland	后肠 Rare intestine	性腺 Gonad	闭壳肌 Adductor muscle
感染强度 Infection intensity	- + ++ +++	- + ++	++ +++	++ +++	- + ++	- -	- -
2 龄栉孔扇贝 (n=10) Two-year-old <i>C. farreri</i>	不同感染强度 占百分比/% Percentage of each intensity	20 40 30 10	60 20 20	50 50	30 70	40 30 30	100 100
感染率/% Infection rate	80	40	100	100	60	0	0
3 龄栉孔扇贝 (n=10) Three-year-old <i>C. farreri</i>	感染强度 Infection intensity	- +	- +	+++	+ +++	- +	- -
不同感染强度 占百分比/% Percentage of each intensity	70 30	90 10	100	20 80	70 30	100 100	100 100
感染率/% Infection rate	30	10	100	100	30	0	0
海湾扇贝 (n=10) <i>A. irradian</i>	感染强度 Infection intensity	- +	-	+ ++ +++	- +	-	- -
不同感染强度 占百分比/% Percentage of each intensity	90 10	100	30 30 40	20 80	100	100 100	100 100
感染率/% Infection rate	10	0	100	80	0	0	0

注:“-”未见感染;“+”轻度感染;“++”中度感染;“+++”重度感染。

Note:“-”means negative;“+”means infection with slight degree;“++”means infection with middle degree;“+++”means infection with high degree.

2.2.1 2 龄栉孔扇贝 从表 1 结果可知,从 2 龄栉孔扇贝的外套、鳃、肾脏、肝胰腺及后肠中均可检测

到 AVNV 阳性信号,肾脏及肝胰腺中 AVNV 感染率最高,均为 100%,外套、后肠及鳃的感染率依次

为80%、60%和40%。性腺及闭壳肌中未检测到阳性信号。在鳃中,所有的阳性信号均来自于鳃丝的基部,而在鳃丝中未检出。

2.2.2 3龄栉孔扇贝 从表1结果可知,对同批采集的10只3龄栉孔扇贝,从其外套、鳃、肾、肝胰腺及后肠中均可检测到阳性信号,尤以肾和肝胰腺的AVNV感染率最高,均为100%;外套、后肠的AVNV感染率相同,均为30%;鳃的AVNV感染率最低,仅为10%(在鳃中,所有的阳性信号均来自于鳃丝的基部,而在鳃丝中未发现),性腺和闭壳肌中未检测出。

2.2.3 海湾扇贝各器官 AVNV 检测结果 从10只海湾扇贝的外套、肾及肝胰腺中均可检测到AVNV,且在肾中的感染率最高(100%),肝胰腺次之(80%),外套感染率低(10%),其他组织中未检测到(结果见表1)。在检测的所有组织中,只有肾脏具有较强的感染强度,重度感染的样品占40%,其他存在感染的部位均为轻度感染。

2.3 对照染色

在阻断实验、吸收实验、阴性对照(替代对照、空白对照)中,染色结果均为阴性;阳性对照中,电镜超薄切片中发现病毒的组织(本文未提交图片),用间接免疫荧光检测可检测到阳性信号。

3 讨论

应用免疫荧光技术检测生物体内病毒在国内外已有较多的报道^[8-10];应用该技术检测水产养殖动物体内病毒,国内也有成功报道^[11]。间接免疫荧光法为免疫组织化学法中的一种,是利用病原(抗原)与一抗结合后,再用荧光素标记的二抗与一抗结合,荧光素受激发光照射后产生荧光,通过荧光信号间接进行病原检测的技术。在本实验中,应用间接免疫荧光法检测栉孔扇贝体内的AVNV具有以下优点:耗时短(4~5 h)、成本低,不但可以检测出宿主组织中的病原,而且可对体内的病原准确进行定位,还可指示各组织器官的感染强度。

在检测的所有栉孔扇贝样品中,AVNV感染强度最强的组织是3龄栉孔扇贝的肾脏、肝胰腺,2龄栉孔扇贝的肝胰腺、肾脏次之,再者为2龄贝外套膜。在3龄栉孔扇贝的外套膜、鳃、后肠中,AVNV的感染强度与感染率均比2龄栉孔扇贝低,而在所有闭壳肌及性腺样品中未检测出AVNV。表明AVNV感染具有一定的组织特异性,肾脏与肝胰腺

为适宜AVNV感染的主要靶器官。贺桂珍等^[12]用电镜技术结合ELISA方法研究了AVNV在栉孔扇贝不同器官中的感染状况,发现肝胰腺、肾脏及外套膜均是AVNV感染的重要靶器官。鳃、肠的感染强度相对低,在闭壳肌的电镜超薄切片中未发现有AVNV。尽管该研究与本研究所用的样品不同,但两者结果表现出高度的相似性。

扇贝流行病学调查资料显示,与栉孔扇贝同海区养殖的海湾扇贝在高温期不出现发病死亡^[4]。本研究结果证实,与栉孔扇贝同海区养殖的海湾扇贝各组织中,AVNV感染强度与感染率远低于栉孔扇贝相应器官的感染强度,推测这种较低的感染强度与感染率不足以造成海湾扇贝发病死亡。引起两种扇贝感染强度与感染率差异的原因,可能是由于扇贝种间对AVNV抗感染免疫力存在差异,而这种差异又可能与环境温度有关,由环境温度变化诱发水生生物免疫力变化的研究已有较多的报道^[13-15]。海湾扇贝适应的水温高于栉孔扇贝的适应水温,当夏季水温达到25℃以上时,正是海湾扇贝生长的最适温度,此时,海湾扇贝的抵抗力强,而该温度对栉孔扇贝的生长有一定的胁迫作用,栉孔扇贝对AVNV的免疫抵抗力会下降,从而导致同一养殖海区中的这两种扇贝发病率存在差异。

参考文献:

- [1] 张福绥,杨红生. 山东沿海夏季栉孔扇贝大规模死亡原因分析[J]. 海洋科学, 1999, 22(1): 44-47.
- [2] 相海建. 海水养殖生物病害发生与控制[M]. 北京: 海洋出版社, 2001: 176.
- [3] 王崇明, 王秀华, 宋微波. 国家“973”项目子课题“扇贝大规模死亡的流行病学研究”取得重要进展[J]. 海洋科学, 2001, 24(4): 24.
- [4] 王秀华, 王崇明, 李 嵩, 等. 胶州湾栉孔扇贝大规模死亡的流行病学调查[J]. 水产学报, 2002, 26(2): 149-152.
- [5] 艾海新, 王崇明, 王秀华. 栉孔扇贝急性病毒性坏死症病原人工感染研究[J]. 中国水产科学, 2003, 10(5): 388-391.
- [6] 宋微波, 王崇明, 王秀华, 等. 栉孔扇贝大规模死亡的病原研究新进展[J]. 海洋科学, 2002, 25(12): 23-26.
- [7] 王秀华, 贺桂珍, 李 嵩, 等. 栉孔扇贝的急性病毒性坏死症(AVND)病毒多克隆抗体的制备及ELISA分析[J]. 高技术通讯, 2003, 13(9): 84-88.
- [8] 赵玉强, 李 文, 董言德, 等. 免疫荧光技术检测室内感染蚊虫体内登革病毒的研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2002, 15(4): 251-253.
- [9] Drén C, Farkas T, Németh I. Serological survey on the prevalence of chicken anemia virus infection in Hungarian chicken flocks

- [J]. Veterinary Microbiology, 1996, 50: 7-16.
- [10] Garcia-Rosado E, Castro D, Cato I, et al. Serological techniques for detection of lymphocystis virus in fish[J]. Aquat Living Resour, 2002, 15: 179-185.
- [11] 谢 简, 李正秋, 张奇亚, 等. 免疫组化法检测美国青蛙组织中的蛙虹彩病毒[J]. 水生生物学报, 2002, 26(5): 438-443.
- [12] 贾桂珍, 王秀华, 李 贤, 等. 急性病毒性坏死症病毒在栉孔扇贝不同器官的感染状况[J]. 高技术通讯, 2003, 13(7): 93-96.
- [13] 张奇亚. 水生低等脊椎动物病毒生态学[J]. 病毒学报, 2001, 17(3): 277-281.
- [14] Chu F E, La Peyre J F. *Perkinsus marinus* susceptibility and defense-related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica*: temperature effects[J]. Dis Aqu Org, 1993, 16: 223-234.
- [15] Carballal M J, López C, Azevedo C, et al. *In vitro* study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. hemocytes[J]. Fish Shellf Immun, 1997, 7: 403-416.

Serological detection of acute viral necrobiotic virus (AVNV) in scallop *Chlamys farreri* and *Argopecten irradians* by indirect immunofluorescence(IIF)

WANG Xiu-hua, WANG Chong-ming, HUANG Jie

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China)

Abstract: A virus (acute viral necrosis virus, AVNV) was firstly discovered in the moribund *Chlamys farreri* sampled from the scallop farms along the coasts of Shandong Province during the period of high mortality, and the emergence of AVNV has been associated with mass death of *C. farreri* causing important economic losses. This severe scallop disease was temporarily named Acute Viral Necrobiotic Disease (AVND). Assays to detect AVNV in short time are necessary. In this study, a technique of detecting AVNV by indirect immunofluorescence (IIF) assay based on frozen section with polyclonal antibody is described. The samples including two- and three-year-old *C. farreri*, and bay scallop *Argopecten irradians* bred in the current year, cultured in Taipingjiao Gulf, Qingdao, Shandong Province, were collected after the burst of AVND in September 2003. Frozen section of main organ including gill, mantle, kidney, digestive gland, rear intestine, adductor muscle and gonad were prepared. The infection intensity of AVNV was detected by IIF assay, and infection rate was statistically analyzed. The results indicated that AVNV could infect gill, mantle, kidney, digestive gland and rear intestine of two- and three-year-old *C. farreri*, however, gonad and adductor muscle were negative, and the infection was the most serious in kidney and digestive gland with infection rate of 100%. The infection intensity was negative in mantle, and from negative to middle degree was found in gill and rear intestine in two-year-old *C. farreri*. The differences of infection intensity and infection rate between two- and three-year-old *C. farreri* were that three-year-old *C. farreri* had lower infection intensity and infection rate than that of two-year-old *C. farreri*, except the infection intensity in kidney of three-year-old *C. farreri* which was higher than that of two-year-old *C. farreri* ($n=10$). In *Argopecten irradians*, kidney, digestive gland, and mantle were also affected by AVNV at infection rate of 100%, 80% and 10%, respectively ($n=10$). Furthermore, the infection intensity of each organ is quite different. The percentages of infection intensity of slight degree, middle degree and heavy degree in kidney were 30%, 30%, and 40%, respectively ($n=10$), whereas only slight infection degree was found in mantle and digestive gland. Gill, rear intestine gonad and adductor muscle were negative to AVNV.

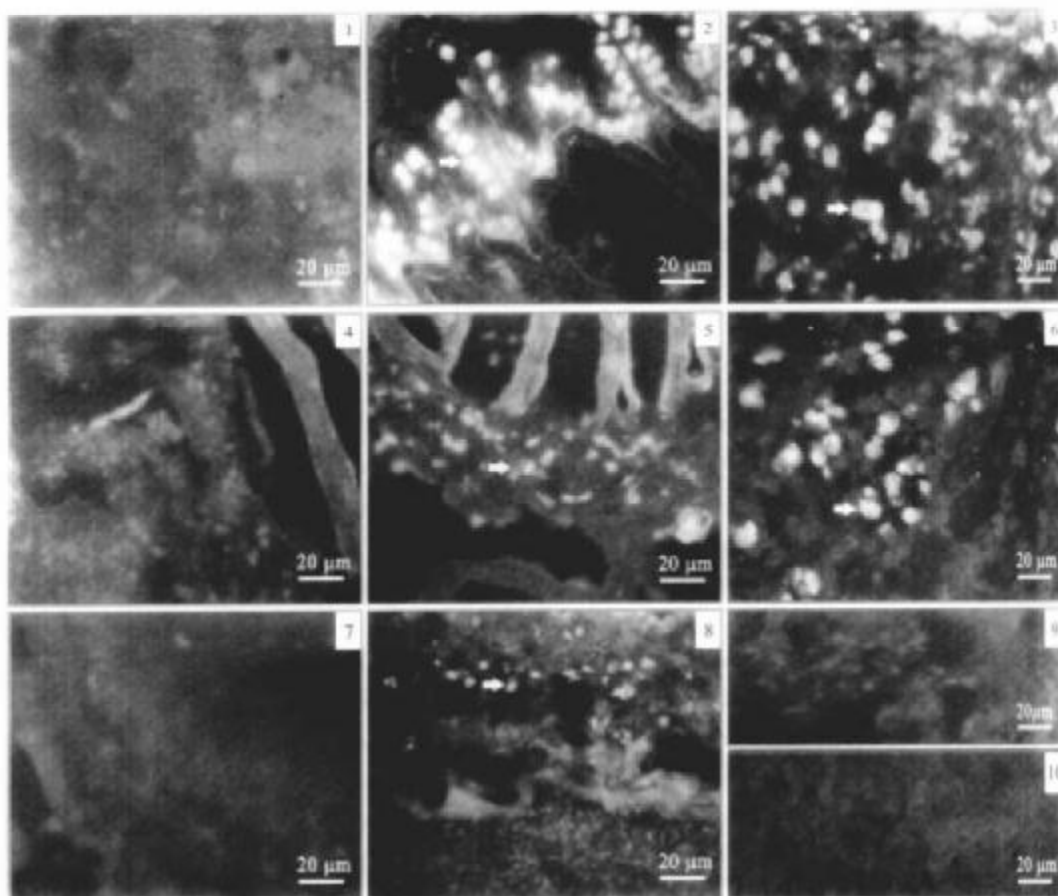
Both *C. farreri* and *A. irradians* were the host of AVNV, and kidney and digestive gland of these two species were the main target tissues of AVNV. The reason why *A. irradians* kept healthy while massive death happened to *C. farreri* in summer was discussed.

Key words: *Chlamys farreri*; *Argopecten irradians*; acute viral necrobiotic virus (AVNV); indirect immunofluorescence (IIF)

* This study is supported by the National Basic Research 973 Project (No. G1999012001), Project of Shandong Key Technologies R & D Program.

王秀华等:间接免疫荧光法检测栉孔扇贝急性病毒性坏死症病毒

WANG Xiu-hua et al: Serological detection of acute viral necrobiotic virus (AVNV) in scallop *Chlamys farreri* and *Argopecten irradians* by indirect immunofluorescence(IIF)



图版 I 栉孔扇贝组织冰冻切片间接免疫荧光检测结果

1:外套膜阴性(-); 2:栉孔扇贝外套膜阳性(+++); 3:肾脏阳性(+++); 4:栉孔扇贝鳃阴性(-); 5:栉孔扇贝鳃阳性(++); 6:栉孔扇贝肝胰腺阳性(++); 7:栉孔扇贝后肠阴性(-); 8:栉孔扇贝后肠阳性(++); 9:栉孔扇贝性腺阴性(-); 10:栉孔扇贝闭壳肌阴性(-); 箭头示阳性信号。

Plate I Results of AVNV detection by IIF assay based on frozen section in *Chlamys farreri*

1: Mantle (negative); 2: Mantle (heavy infection); 3: Kidney (heavy infection); 4: Gill (negative); 5: Gill (middle infection); 6: Digestive gland (middle infection); 7: Rear intestine (negative); 8: Rear intestine (middle infection); 9: Gona (negative); 10: Adductor muscle (negative). Arrows indicate the highly specific fluorescence of inner structures