

文章编号:1005-8737(2001)04-0036-05

用DNA斑点杂交法检测对虾及其饵料和环境生物携带白斑综合症病毒状况的调查

宋晓玲, 史成银, 黄 捷, 张立敬

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:于1996~1998年采用DNA斑点杂交法,完成了共计836份养殖对虾,213份对虾饵料和环境生物样品的检测。结果显示,对虾在每年的4~10月都可检测出白斑综合症病毒(WSSV),6月出现最高峰,阳性检出率达到42.6%;其次,为7月和5月,分别达31.6%和24.5%。在对虾不同生长阶段(包括亲虾、各期幼体、仔虾、幼虾及成虾)均可检出WSSV,其中以仔虾的带毒率最高,达36.4%,其次为糠虾幼体,达34.6%。体长范围1.1~2.0 cm的仔虾阳性率最高,其次体长为5.1~6.0 cm的幼虾样品。检测的中国对虾样品(625份)带毒率为16.8%,日本对虾样品(211份)带毒率为45.0%。对虾主要饵料及环境生物类群包括鱼类、虾类、蟹类、桡足类、端足类、沙蚕、卤虫均可检出WSSV,其中小型虾类、端足类、桡足类、蟹类样品的WSSV检出率均高于20%。

关键词:中国对虾;日本对虾;饵料和环境生物;白斑综合症病毒;DNA斑点杂交
中图分类号:Q945.46 **文献标识码:**A

白斑综合症病毒(WSSV)是迄今为止危害最为严重的一种对虾病毒。中国对虾(*Penaeus chinensis*)、日本对虾(*P. japonicus*)、斑节对虾(*P. monodon*)等绝大多数养殖对虾品种都是该病毒的感染宿主。该流行病发生时对虾主要表现为活动缓慢、不摄食、胃空、头胸部甲壳易剥离并有白色斑点、血淋巴不凝结等。该病毒在对虾养殖期一经发生便开始迅速蔓延流行,使养殖池内对虾大量死亡,给生产带来严重损失^[1-3]。

免疫学的ELISA技术,分子生物学的核酸探针和PCR技术都已应用到白斑综合症病毒的检测^[4-8]。作者于1996~1998年用DNA斑点杂交法,对来自辽宁、河北、天津、山东、江苏和浙江的主

要对虾养殖区,涉及到从亲虾-幼体-仔虾-幼虾各个生长发育阶段对虾,以及对虾的主要饵料和环境生物等共计1049份样品,进行了携带WSSV状况的调查,为了解该病毒的分布积累资料,并为养殖对虾白斑综合病的预防及制定防病措施提供参考。

1 材料与方 法

1.1 样品采集与处理

采集的样品包括对虾及其饵料和海区生物。对虾幼体采集整体,幼虾、成虾和亲虾采集虾鳃、胃或附肢;其他小型对虾饵料和海区动物采集整体;贝类和蟹类等较大型动物采集内脏团。小型动物每份样品的采集数量约20尾,较大型动物每尾(只)为1份样品。采集的样品鲜活、冰冻或存于SEMP采样液(EDTA 70 mmol/L, 巯基乙醇 0.5%, Tris·HCl 10 mmol/L, 平衡酚饱和)中带回实验室。

1.2 WSSV DNA 探针的制备

见文献^[7]。

收稿日期:2001-01-08

基金项目:“九五”国家重点科技攻关计划项目(96-005-03-01);
国家重点基础研究规划资助项目(G1999012002)

作者简介:宋晓玲(1962-),女,副研究员,从事水生动物疾病学研究。

1.3 WSSV DNA 的斑点杂交

鲜活或冰冻保存的样品加入 $5 \times \text{SSC}$ 碾碎, SEMP 采样液保存的样品直接碾碎;上清煮沸变性后点样于硝酸纤维素膜, 80°C 交联 2 h 后在预杂交液(含 Blocking Reagent II 10 mg/ml, 0.1% Sarkosyl, 0.02% SDS 的 $5 \times \text{SSC}$ 1 ml)中 65°C 孵育 2 h, 加入变性的探针杂交液 65°C 孵育 12 h; $2 \times \text{SSC}/0.1\% \text{ SDS}$, $0.1 \times \text{SSC}/0.1\% \text{ SDS}$ 洗膜;膜在碱性磷酸酶标记的 DIG 抗体缓冲液中振荡 30 min;以 NBT/BCIP 为底物显色。

2 结果

2.1 探针的制备及灵敏度

以 $2 \text{ ng}/\mu\text{l}$ WSSV 混合 DNA 探针斑点杂交检测采集的对虾及其饵料和环境生物样品, 在硝酸纤

维素膜上显色呈蓝色斑点的是 WSSV 呈阳性的样品, 无显色斑点的是 WSSV 呈阴性的样品。检测 WSSV 的灵敏度为, 病毒 DNA $0.2 \sim 0.5 \text{ ng}$, 纯化病毒 10 ng , 检测病虾组织(胃或鳃)中 WSSV 的灵敏度为 $1 \mu\text{g}$ 。经测试该探针与健康对虾组织和健康对虾 DNA 无交叉反应。

2.2 养殖对虾样品检出 WSSV 的状况

2.2.1 不同月份采集的养殖对虾样品检出 WSSV 结果的比较 自 3~10 月采集了 836 份养殖对虾样品, 将检测的养殖对虾样品按采集的月份统计, 样品阳性检出率(阳性样品份数/总样品份数)见表 1。由表 1 可以看出, 除 3 月外, 4~10 月均有检测呈阳性反应的样品, 6 月份样品的阳性检出率最高, 其次分别为 7、5 和 9 月。

表 1 不同月份采集的养殖对虾样品的检测结果

Table 1 Detective results of WSSV in culture shrimp by dot-blot hybridization

项目 Item	月份 Month								合计 Total
	Mar.	Apr.	May	June	July	Aug.	Sep.	Oct.	
样品总数 Total numbers	13	157	163	251	95	105	38	14	836
阳性样品数 Positive numbers	0	10	40	107	30	5	7	1	200
阳性比率/% Positive rate	0	6.3	24.5	42.6	31.6	4.8	18.4	7.1	23.9

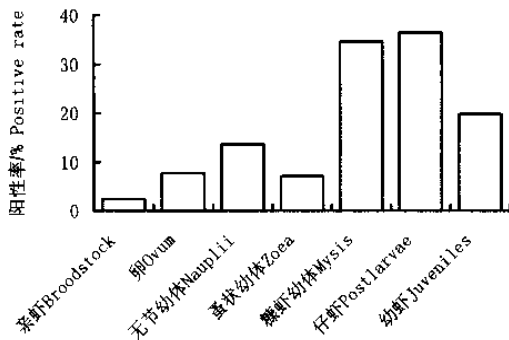


图 1 不同生长发育阶段的对虾样品 WSSV 阳性检出率

Fig.1 Comparison of positive rates of WSSV at different stages of culture shrimp

2.2.2 不同生长阶段的养殖对虾样品检出 WSSV 结果的比较 对养殖中国对虾样品包括亲虾、虾卵、各期幼体、仔虾、幼虾及成虾的检测结果见图 1。由图 1 可见, 每一生长发育阶段均有检测呈阳性的样品, 其中亲虾、卵、无节幼体和蚤状幼体阳性检出率较低, 糠虾幼体升为 34.6%, 仔虾升至最高值

36.4%, 养成阶段幼虾的平均阳性检出率为 19.7%。将采集的对虾样品自仔虾 1 期至养殖期末的成虾按不同的体长划分为不同的组别, 其阳性检出率的差别见图 2。由图 2 可见, 阳性检出率形成 2 个高峰, 1 个在 $1.1 \sim 2.0 \text{ cm}$ 的仔虾, 阳性检出率为 51.1%。另 1 个在体长 $5.1 \sim 6.0 \text{ cm}$ 的幼虾, 阳性检出率为 48.6%。 $3.1 \sim 8.0 \text{ cm}$ 体长幼虾的阳性检出率一直维持在较高数值。

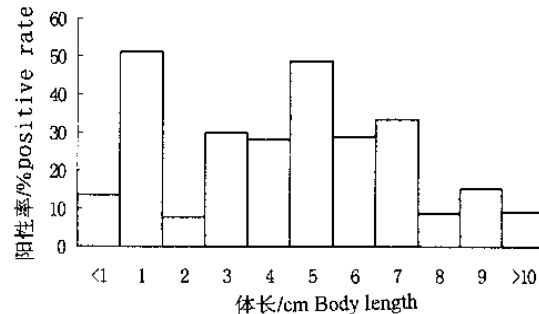


图 2 不同体长的对虾 WSSV 阳性检出率

Fig.2 Comparison of positive rates of WSSV at different body length of culture shrimp

2.2.3 2种养殖对虾样品检出 WSSV 结果的比较

对中国对虾样品 625 份,日本对虾样品 211 份的检测结果按照亲虾、仔虾和幼虾分别统计(表 2)。日

本对虾亲虾样品检出率为零,中国对虾亲虾样品的阳性率为 2.9%,而仔虾和幼虾样品的阳性检出率日本对虾均显著高于中国对虾。

表 2 不同养殖对虾品种 WSSV 检出结果的比较

Table 2 Detective results of WSSV between *P. chinensis* and *P. japonicus* by dot-blot hybridization

样品 Sample	检测数量 Total numbers	阳性数量 Positive numbers	阳性比率 Positive rate/%
亲虾 Broodstock	102	3	2.9
中国对虾 仔虾 Postlarvae	121	23	19.0
<i>P. chinensis</i> 幼虾 Juveniles	402	79	19.7
合计 Total	625	105	16.8
亲虾 Broodstock	21	0	0
日本对虾 仔虾 Postlarvae	162	80	49.4
<i>P. japonicus</i> 幼虾 Juveniles	28	15	53.6
合计 Total	211	95	45.0

2.3 对虾饵料和环境生物样品检出 WSSV 的状况

为查清病毒的传播途径,对对虾育苗期和养成期的部分鲜活饵料,育苗池、养殖池内浮游和底栖动物等共 213 份对虾饵料和环境生物样品进行了携带 WSSV 状况的调查,结果见表 3。15 份卤虫样品中,包括由冬眠卵孵化的无节幼体样品 6 份,无呈阳性的样品,成体样品 9 份,有 2 份呈阳性的样品。端足

是对虾的饵料生物,有些是对虾的竟食者。调查共采集小型虾类样品 48 份,阳性检出率为 31.3%,在被调查的生物中居第 2。其中呈阳性的种类有:糠虾 1/5(阳性数/阴性数,下同)、鼓虾 9/13 和美人虾 1/5,没有呈阳性的种类有鹰爪虾和虾蛄。调查还采集了虾池中的鱼类样品 21 份,有 5 份检出 WSSV 呈阳性,这是由于检测部位是其内脏团,有可能所检测的正是鱼摄食的甲壳类生物。

表 3 WSSV 在对虾饵料和环境生物中的存在状况

Table 3 Detective results of WSSV by dot-blot hybridization in animals collected inside or outside shrimp ponds

样品 Sample	检测数量 Total numbers	阳性数量 Positive numbers	阳性比率 Positive rate
轮虫 Rrotatoria	10	0	
卤虫 Artemia	15	2	13.3
沙蚕 Nereidae	21	4	19.0
桡足类 Copepoda	43	9	20.9
端足类 Amphipoda	23	9	39.1
虾类 Non-penaeid shrimp	48	15	31.3
贝类 Shellfish	3	0	
蟹类 Crab	29	9	31.0
鱼类 Fish	21	5	23.8
合计 Total	213	54	25.4

类是底栖甲壳生物,主要种类有钩虾和螺裸蜚,它们以有机碎屑及硅藻为食物,繁殖速度快、周期短,且活动能力弱、易被对虾捕食,不仅是对虾的良好天然饵料,还能维持虾池前、中期良好的生态环境。端足类的阳性检出率在所有调查的对虾饵料生物中最高,为 39.1%。小型虾类在虾池和海区中分布广,种类繁多。本次检测的种类分属于甲壳纲的糠虾目、十足目和口足目,其中以十足目的种类最多。有些

3 讨论

3.1 样本的采集

本项调查涉及的样本包括对虾养殖示范区定期采样、对虾育苗场和养殖场抽样及少量的生产单位送样,不包括任何试验样本。调查样本的抽样方法与系统流行病学调查中的随机样本的抽样方法不完全相同,因而调查的结果只能部分反映对虾及其环境生物携带对虾 WSSV 的现状,可了解该病毒在育苗池和养成池的分布状况,还可为生产中制定防病措施提供参考。

3.2 对虾检出 WSSV 的状况分析

3.2.1 WSSV 在对虾中的阳性检出率有季节高峰

对虾在不同的养殖月份检出病毒的状况不同,与病毒的适宜增殖温度有关,也与对虾本身的适宜生长温度有关。蔡生力等^[9]报道了 6~7 月是 1993~1994 年山东省对虾流行病的主要暴发时间,并报道有的地区在前一个峰值过后,幸存的虾池到 8 月底 9 月初有 1 次流行病发生,形成一个较小的峰值。吴定虎等^[10]对 600 多份对虾样品的显微和超微病理结果进行分析,认为 3~10 月都是对虾暴发性流

行病的流行季节,其中流行病高峰期在 4~5 月和 9~10 月。本检测结果从 4 月起逐渐递增,到 6 月达最高峰 42.6%,7 月有所降低为 31.6%,到 8 月达最低值 4.8%,9 月又上升一小高峰为 18.4%,10 月又递减到 7.1%,与对虾暴发性流行病流行季节基本一致。由于本项调查的地区包括了我国自南到北的 5 个沿海省市,因此与各个具体地区的流行季节不完全一致。

3.2.2 对虾中病毒阳性检出率随着生长发育阶段的不同有所不同 本文检测的产卵前亲虾 123 尾(包括海捕亲虾和越冬亲虾)中有 3 尾检出 WSSV,亲虾带毒的途径一是亲虾在入池前即已带毒,另一途径是亲虾在产卵前的暂养期感染带毒。亲虾带毒不仅可通过卵传播给子一代,也可通过其分泌物或排泄物将病毒传播给子一代。何建国等^[11]曾报道,虾的排泄物通过肌肉注射及投喂回接感染,使健康虾发病致死。卵和无节幼体样品带毒有 2 种可能,一是卵或无节幼体本身带毒,二是卵或无节幼体表面的附着物带毒,这些附着物以亲虾的排泄物为主。仔虾较对虾各个生长阶段相比阳性检出率最高,原因之一是部分仔虾样品中每份样品不是单尾仔虾,而是多尾仔虾组成 1 份样品,相对提高了以份为单位的样品阳性的检出率;另一原因是,仔虾多由育苗池采样,由于充气的混合作用,采集的样品较为均匀,而幼虾为养成池采样,多是用旋网捕获,对虾数量相对稀少,体弱或带病虾相对难以采集。养殖对虾放养苗种的规格多为 1~3 cm 的仔虾,因而仔虾带毒如发病就会给育苗生产带来损失,如未发病放养到养殖池中也会给养虾生产带来隐患。本项调查中从体长为 3 cm 开始到养成期末的幼虾样品的平均阳性检出率为 19.7%。不同的体长,检出病毒的状况差异较大,其中以体长 5.1~6.0 cm 的幼虾阳性检出率最高。吴定虎^[10]利用显微和超微病理技术检查了包括 5 种对虾的 600 多份对虾样品,结果是带毒对虾多在体长为 4~6 cm 的幼虾,与本文结果相近。

3.2.3 不同养殖品种 WSSV 阳性检出状况不同

虽然对虾养殖主要品种多为 WSSV 的感染对象,但不同的养殖品种流行情况不完全相同。吴定虎^[10]报道斑节对虾亲虾和仔虾的病毒感染率分别为 30% 和 40%~60%。Lo 等^[6]1996 年报道 75.8% 野生斑节对虾感染 WSBV,60.9% 的野生日本对虾感染 WSBV。本文调查结果是日本对虾的阳性率高于中

国对虾,北方地区的一些虾农常在第 1 次放养的中国对虾发病死亡后,在原池再放养日本对虾苗种,这也可能是日本对虾阳性检出率高于中国对虾的原因。

3.3 饵料和环境生物检出 WSSV 的状况分析

自 WSSV 发生流行以来,多位学者对来源于虾池和海区的多种生物进行了电镜观察或 ELISA、PCR 检测,结果在甲壳类生物如桡足类、卤虫、白虾、糠虾、螯蛄虾和蟹类中均检查到 WSSV 的存在,认为甲壳类动物是 WSSV 的介体和传染源^[11~15]。

本项调查中检出阳性的生物也以甲壳类生物为主,其中浮游种类主要有桡足类和虾类,底栖种类主要有端足类及蟹类。这 4 类生物种群是虾类的主要摄食对象,尤其是底栖穴居类生物,不仅在养殖期内可感染健康虾,还可在非养殖期的冬季在虾池内越冬,给来年的养殖生产带来隐患。近岸海区和虾池中的大部分环境生物可检出 WSSV,也是其难以彻底根除的主要原因之一。

参考文献:

- [1] 黄 健,宋晓玲,于 佳,等. 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[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1):1-10.
- [2] 战文斌. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)杆状病毒病的研究[J]. 中国水产科学, 1995, 2(3):22-28.
- [3] Nunan L N, Lighter D V. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV)[J]. Virol Meth, 1997, 63:193-201.
- [4] 黄 健,于 佳,王秀华,等. 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[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1):40-49.
- [5] Durand S, Lighter D V, Nunan L M, et al. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp [J]. Dis Aquatic Org, 1996, 27(1):59-66.
- [6] Lo C F, Ho C H, Peng S E, et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods[J]. Dis Aquatic Org, 1996, 27(3):215-225.
- [7] 史成银,宋晓玲,黄 健,等. 核酸斑点杂交分析法检测对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒(HHNBV)[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(5):486-490.
- [8] 史成银,黄 健,宋晓玲,等. 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒单克隆抗体的 ELISA 快速检测[J]. 中国水产科学, 1999, 6(3):116-118.
- [9] 蔡生力,黄 健,王崇明,等. 1993-1994 年对虾暴发性流行病学研究[J]. 水产学报, 1995, 19(2):112-118.
- [10] 吴定虎,陈细法,黄 槐,等. 养殖对虾病毒病的流行病学研究 [A]. 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[C]. 青岛:青岛海洋大学出版社, 1996. 84 - 85.
- [11] 何建国, 周化民, 江静波, 等. 白斑综合症杆状病毒致病性特征[J]. 热带海洋, 1999, 18(1): 59 - 67.
- [12] 王文兴, 罗挽涛, 宋庆云, 等. 脊尾白虾感染和传播中国对虾暴发性病毒病的初步研究[A]. 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[C]. 青岛:青岛海洋大学出版社, 1996. 89 - 92.
- [13] 国际翔, 王丽霞, 李文清, 等. 对虾病毒感染螃蟹组织的电镜观察[J]. 应用生态学报, 1995, 6(3): 305 - 307.
- [14] Minoru Maeda, Toshiaki Itami, Atsushi Furumoto, et al. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) in wild-caught shrimp and other crustaceans [J]. Fish Pathology, 1998, 33(4): 373 - 380.
- [15] Chang P S, Lo C F, Wang Y C, et al. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization[J]. Aquaculture, 1998, 164: 233 - 242.

Investigation and study on carrying status of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in shrimps and other aquatic animals by dot-blot hybridization

SONG Xiao-ling, SHI Cheng-yin, HUANG Jie, ZHANG Li-jing

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

Abstract: About 836 samples of *Penaeus chinensis* (625 inds), *P. Japonicus* (211 inds) and 213 other aquatic animal samples were collected from the cultural farms in Liaoning, Hebei, Tianjin, Shandong, Jiangsu and Zhejiang Provinces during 1996~1998. The method of dot-blot hybridization was employed and a digoxigenin-labelled probe was used to detect the White Spot Syndrome Virus (WSSV) in the samples. The results show that the WSSV can be detected in the shrimp samples collected from April to November each year and the detectable peak appears in June that the positive rate gets to 42.6% and the secondary peak is in July and May when the positive rates get to 31.6% and 24.5%, respectively. Otherwise, WSSV can be detected at different stages of the shrimps, including the parents, ovum, larvae, postlarvae, mysis, juveniles and adults, among which the positive rate is the highest in the postlarvae (36.4%) and the second highest in the mysis (34.6%). On the basis of body length of shrimp, the positive rate is the highest in the group of body length 1.1~2.0 cm and the second highest in the group of 5.1~6.0 cm. The positive rate is 16.8% for *P. Chinensis* and 45.0% for *P. japonicus*. Among the other animal samples, WSSV can be detected in artemia, nereidae, copepoda, amphipoda, non-penaeid shrimp, crabs and fishes and the positive rate of WSSV is more than 20% in copepoda, amphipoda, amphipoda, non-penaeid shrimp and crabs.

Key words: *Penaeus chinensis*; *Penaeus japonicus*; feeding animal; WSSV; dot-blot hybridization

《中国水产科学》声明

为了加强信息交流和扩大期刊影响,本刊已于1996年首批加入了《中国学术期刊(光盘版)》,1998年12月入网“ChinaInfo(中国信息)网络资源系统(电子期刊)”。这对我们充分利用信息交流的集团化优势,提高期刊及其作者的知名度和扩大国内国际影响有着重大意义。本刊作为光盘版的人编期刊,充分尊重作者的著作权益。在此本刊提请所有来稿作者注意,除非作者来稿时另有声明,一般均视为已同意来稿由本刊代向《中国学术期刊(光盘版)》投稿,本刊支付的稿费中亦已包括这部分稿费。凡有不同意见将自己稿件纳入上述系统交流的作者,请事先告知并请另投他刊。

《中国水产科学》编辑部