

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00989

中国对虾对白斑综合征病毒的类免疫反应与验证

李战军^{1,2}, 孟宪红¹, 孔杰¹, 单从文³, 罗坤¹, 栾生¹, 常亚青²

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071;

2. 大连海洋大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023

3. 上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200040

摘要: 对中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)能否产生类免疫保护作用进行了初步探讨。将健康的中国对虾接种经不同辐照强度 γ 射线灭活的白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV), 连续投喂接种 20 d 后, 对其存活个体进行抗 WSSV 性能测试, 检验其存活情况。结果显示, 至 216 h 实验组(γ 射线辐照剂量分别为 5 kGy、10 kGy、15 kGy 和 20 kGy)存活率分别为 45.5%、54.2%、68%和 65.4%, 存活对虾的病毒携带量分别为 (14.0 ± 11.9) 、 (14.1 ± 4.3) 、 (24.5 ± 15.0) 和 (15.1 ± 7.8) copies/ng DNA, 死亡对虾病毒携带量分别为 $(2.1 \pm 2.0) \times 10^5$ 、 $(5.2 \pm 4.4) \times 10^5$ 、 $(3.8 \pm 4.4) \times 10^5$ 和 $(6.2 \pm 7.7) \times 10^5$ copies/ng DNA, 阳性对照组存活率为 20%, 其存活和死亡对虾病毒携带量分别为 $(24.7 \pm 7.4) \times 10^5$ copies/ng 和 $(5.8 \pm 6.9) \times 10^5$ copies/ng DNA。以上结果说明, 中国对虾可能存在类免疫保护作用, 而且通过接种经 γ 射线灭活的 WSSV 能够提高对虾后续抗感染能力。研究结果旨在为采用免疫学手段预防对虾白斑综合征提供参考。

关键词: 中国对虾; 类免疫; γ 射线; 白斑综合征病毒

中图分类号: S945

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)06-0989-05

通常认为对虾等无脊椎动物没有像脊椎动物那样的免疫系统, 其免疫防御属于非特异性免疫, 且没有免疫记忆力, 不能采用免疫学手段防治对虾疾病。但有报道认为对虾能够产生类似脊椎动物特异性的免疫保护, 即类免疫反应(Quasi-immune response)。Venegas 等^[1]对感染 WSSV 后存活的日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)进行再次感染, 发现其死亡率大大降低, 说明日本对虾能够产生类免疫保护反应; Namikoshi 等^[2]也发现经福尔马林灭活的 WSSV 能够使对虾产生类免疫保护效果。台湾国立成功大学的莊雅竹和王涵青^[3]2010 年报道了免疫球蛋白超家族分子(down syndrome cell adhesion molecule, Dscam)可能参与无脊椎动物的专一性免疫, 并指出 2009 年鉴定出第一个白虾的 Dscam(命名为 LvDscam), 在不同的 WSSV

感染状况下, 呈现特定变异型的表现趋势。另外, 还有关于对虾对弧菌可产生免疫保护的报道, 如曹剑香等^[4]应用溶藻弧菌灭活疫苗饲喂凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 结果发现投喂弧菌疫苗 20 d 时溶菌活力达到最高, 并对凡纳滨对虾具有很高的免疫保护性; 陶保华等^[5]应用副溶血弧菌疫苗接种斑节对虾(*Penaeus monodon*)和日本对虾, 结果发现在一定范围内对虾的免疫保护率随着疫苗浓度的增加而升高, 表明疫苗能提高对虾的成活率和抗感染能力, 证实了对虾弧菌灭活疫苗的有效性。目前国内尚未见中国对虾对病毒可产生类免疫保护的报道。本研究尝试以 γ 射线灭活的 WSSV 对健康中国对虾进行接种, 比较其再次感染 WSSV 后的存活率及对虾体内的病毒含量, 探究接种的对虾对 WSSV 侵染是否具有抗性, 以

收稿日期: 2012-01-06; 修订日期: 2012-04-22.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31072206); 山东省自然科学基金青年基金项目(ZR2009DQ002); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(20603022011010); 农业部 948 课题(2011-G12).

作者简介: 李战军(1985-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产养殖学研究. E-mail: zhanjunli98766@163.com

通信作者: 孔杰, 研究员, 博士生导师. E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn.

期为对虾白斑综合症的防治提供新的思路和翔实的数据参考。

1 材料与方法

1.1 感染设施

采用 200 mm×110 mm×110 mm 的塑料盒,底部设置为窗格式通水孔,将全部塑料盒置于 1 个大水槽中,公用相同水源。水槽中的消毒、温度等全部自动控制。整个实验过程中水温为(24±1)℃,每天换水 30%。

1.2 免疫接种种源

免疫接种种源为 WSSV 感染致死的病虾肌肉组织,经切割后制作大小相同的肌肉组织块,经不同剂量的 γ 射线辐照,制作减毒或灭毒的免疫接种种源。辐照剂量分别为 5 kGy、10 kGy、15 kGy 和 20 kGy(青岛宝安辐照有限公司)。

1.3 免疫接种

免疫接种实验分为 6 组,分别为 4 个实验组(IE₀-5 kGy、IE₀-10 kGy、IE₀-15 kGy、IE₀-20 kGy)、1 个阳性对照组 IP₀ 和 1 个阴性对照组 IN₀,每组设置 2 个平行,每个平行测试 30 尾中国对虾(平均体质量 1~2 g)。4 个实验组每天分别投喂 1 次经 5 kGy、10 kGy、15 kGy、20 kGy 辐照灭活的毒饵和 2 次人工配合饲料;阳性对照组 IP₀ 每天投喂 1 次未经 γ 射线处理的毒饵和 2 次人工配合饲料;阴性对照组 IN₀ 每天投喂 3 次人工配合饲料。20 天后停止投喂毒饵,所有对虾均投喂 3 次人工配合饲料。从每组实验中随机选取 10 尾存活对虾于 -20℃ 保存检测病毒含量,其余存活对虾用于免疫效果测试实验。

1.4 免疫中国对虾的抗 WSSV 性能测试方法

将免疫接种的存活对虾分为 4 个测试实验组 IE-5 kGy($n=11$ 尾)、IE-10 kGy($n=24$ 尾)、IE-15 kGy($n=25$ 尾)和 IE-20 kGy($n=26$ 尾)。将免疫接种的阴性对照组 IN₀ 分成阳性对照组 IP($n=25$ 尾)和阴性对照组 IN($n=20$ 尾)。4 个实验组及阳性对照组 IP 分别同时进行 1 次 WSSV 感染。具体为每尾对虾分别置于隔离的塑料盒中投喂染病死亡的对虾肌肉组织(60±10) mg,对虾完全摄入后为感染完毕。

阴性对照组投喂配合饵料。

1.5 病毒含量检测方法

对抗 WSSV 性能测试前的存活对虾以及测试后所有的死亡对虾和存活对虾取附肢提取基因组 DNA, DNA 提取方法参照王馗等^[6]采用的煮沸乙醇沉淀法进行。病毒检测方法参考 Durand^[7]的 TaqMan 荧光定量方法。

1.6 数据分析

采用 SPSS17.0 软件进行数据统计分析,其中各组间存活率的比较和对虾样本病毒含量的比较分别采用 Kaplan - Meier 法和 ANOVA 进行分析。

2 结果与分析

2.1 免疫接种的实验结果

染病中国对虾组织虽然经 γ 射线辐照,但用于免疫接种实验仍然导致对虾的死亡。接种 20 d 后,实验组 IE₀-5 kGy、IE₀-10 kGy、IE₀-15 kGy 和 IE₀-20 kGy 分别有 22 尾、37 尾、41 尾和 40 尾存活,存活率分别为 36.7%、61.7%、68.3%和 66.7%。而同时进行的直接投喂未经辐照的病虾组织的中国对虾存活率仅为 10%,远远低于上述实验组中国对虾的存活率。

2.2 免疫接种中国对虾再感染 WSSV 的实验结果

对辐照病毒接种实验的存活中国对虾进行人工感染测试,216 h 内阳性对照组 IP 存活率为 20%(5/25),而实验组 IE-5 kGy、IE-10 kGy、IE-15 kGy 和 IE-20 kGy 组的存活率分别为 45.5%(5/11)、54.2%(13/24)、68%(17/25)和 65.4%(17/26)(图 1),比对照组存活率分别高 25.5%、34.2%、48%和 45.4%,随着灭活剂量的升高其存活率有升高的趋势。经 Kaplan - Meier 法分析,阳性对照组的存活率与各个实验组差异均显著($P<0.05$)。

2.3 病毒感染量的检测结果

免疫组中国对虾病毒含量见表 1。阳性对照组 IP₀ 和阴性对照组 IN₀ 存活对虾平均携带病毒量分别为(13.8±4.3)和(7.1±2.2) copies/ng DNA;测试组 IE-5 kGy、IE-10 kGy、IE-15 kGy 和 IE-20 kGy 感染测试前活体样本平均病毒含量分别为(4.2±2.4)、(8.4±5.2)、(5.6±28.)和(16.5±16.1) copies/ng DNA,

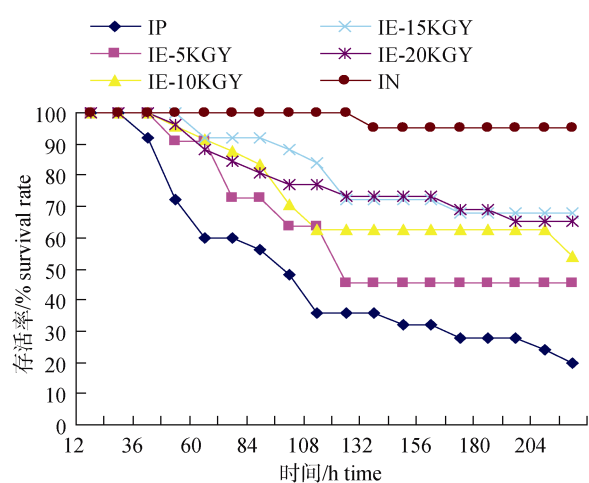


图 1 不同辐照剂量组接种对虾再次感染 WSSV 后的存活率

Fig 1 Challenged survival rate of shrimp vaccinated with inactivated WSSV by different dose of γ -ray

感染测试后存活个体平均病毒含量分别为(14.0±11.9)、(14.1±4.3)、(24.5±15.0)和(15.1±7.8) copies/ng DNA, 而阳性对照组 IP 和阴性对照组 IN 分别为(24.7±7.4)和(9.6±4.3) copies/ng DNA, 经 ANOVA 分析实验组存活个体病毒含量与阳性对照组、阴性对照组均差异不显著($P>0.05$), 感染测试后死亡个体平均病毒含量分别为 $(2.1\pm2.0)\times10^5$ 、 $(5.2\pm4.4)\times10^5$ 、 $(3.8\pm4.4)\times10^5$ 和 $(6.2\pm7.7)\times10^5$ copies/ng DNA, 而阳性对照组 IP 为 $(5.8\pm6.9)\times10^5$ copies/ng DNA。经 ANOVA 分析实验组死亡个体病毒含量与阳性对照组差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 免疫与对虾的类免疫

有关对虾的类免疫反应仅见少量报道, 但作

者均提出对虾可产生类免疫保护反应的观点^[1-2,8]。利用 γ 射线灭活 WSSV 接种对虾的实验中, 实验组 IE-5kGy、IE-10kGy、IE-15kGy 和 IE-20kGy 经感染测试存活率分别为 45.5%、54.2%、68%和 65.4%, 而阳性对照组 IP 存活率仅为 20%(图 1), 说明接种灭活 WSSV 可以产生类免疫作用。Venegas 等^[1]在日本对虾的类免疫实验中也得到了类似的结果, 中国对虾可能存在与日本对虾类似的类免疫保护机制。另外, γ 射线灭活剂量越高, 对虾再次侵染 WSSV 时存活率也越高, 提示对虾类免疫保护能力与接种病毒活力有关, Namikoshi 等^[2]也认为对虾类免疫抗病力可能受接种病毒活力影响。

虽然对虾的免疫系统是非特异性免疫系统, 但是已经有一些关于甲壳动物抵抗特定疾病尤其是细菌性疾病的类似特异性免疫的报道^[4-5]。类免疫保护作用并不等同于产生抗体的特异性免疫, 而是由作为免疫刺激物的“疫苗”引起的类似特异性免疫的非特异性免疫^[9]。关于对虾产生类免疫保护的作用机理可能包括两个方面: 一是进入体内的 WSSV 能使血清产生中和 WSSV 的物质^[10]。20 世纪 90 年代就有学者发现, 血清对对虾免疫功能起关键作用^[11], 后来又有研究发现, 天然发病和人工感染实验中幸存对虾的血清中产生了中和 WSSV 的物质, 进而抑制了病毒复制^[11], 进一步研究揭示, 这些中和性物质可能是由 WSSV 囊膜蛋白激发产生, 如 VP₂₈、VP₆₈、VP₂₈₁ 和 VP₄₆₆ 等囊膜蛋白产生的抗体可以降低对虾的死亡率^[12-13]。

另一原因是进入体内的 WSSV 囊膜蛋白可以中

表 1 灭活免疫组对虾样本病毒含量
Tab.1 WSSV copies of shrimp vaccinated with inactivated WSSV

组别 group	测试前活体对虾病毒含量/ (copies·ng ⁻¹ DNA) WSSV load of the survival shrimps before test	测试后存活个体病毒含量/ (copies·ng ⁻¹ DNA) WSSV load of the survival shrimps after test	感染测试后死亡个体病毒含量/ (copies·ng ⁻¹ DNA) WSSV copies of the dead shrimps after test
IE-5kGy	4.2±2.4	14.0±11.9	$(2.1\pm2.0)\times10^5$
IE-10kGy	8.4±5.2	14.1±4.3	$(5.2\pm4.4)\times10^5$
IE-15kGy	5.6±2.8	24.5±15.0	$(3.8\pm4.4)\times10^5$
IE-20kGy	16.5±16.1	15.1±7.8	$(6.2\pm7.7)\times10^5$
IP ₀	13.8±4.3	—	—
IP	7.1±2.2	24.7±7.4	$(5.8\pm6.9)\times10^5$
IN	7.1±2.2	9.6±4.3	816.6

和对虾靶细胞膜的 WSSV 结合位点, 因此阻止了二次感染中 WSSV 的进一步侵入。有研究发现, WSSV 囊膜蛋白(VP₁₉、VP₂₆ 和 VP₂₈ 等)能够与对虾细胞表面 WSSV 受体结合, 从而阻断 WSSV 的吸附作用^[14-15], 尤其是 VP₂₈ 作为 WSSV 的主要囊膜蛋白之一, 在病毒颗粒复制和细胞感染过程中可能起到了重要的作用^[16]。根据上述作用机理, γ 射线灭活接种的对虾所产生的类免疫保护作用, 可能是由于 γ 射线主要作用于核酸, 对蛋白质的作用较小^[17], 因此 γ 射线灭活后 WSSV 仍具有完好的囊膜, 该囊膜与对虾细胞表面 WSSV 受体结合而起到受体阻断剂的作用, 阻止了 WSSV 的再次入侵, 或者是由于 WSSV 的囊膜使对虾血清中产生了某种中和 WSSV 的物质来阻碍 WSSV 在体内的扩散, 从而达到类免疫的作用。Venegas 等^[1]和 Wu 等^[10]还认为血清并非是产生类免疫保护的唯一独立因素, 它可能是由于体液免疫和细胞免疫机制共同作用的结果。也有学者认为对虾对 WSSV 的抗性可能是由于遗传因素, 即幸存对虾带有与抗性相关的基因^[18-20]。莊雅竹和王涵青^[3]通过对 Dscam 的蛋白质特性研究, 所得结果显示 LvDscam 除似乎可见由液泡分泌外, 也参与细胞附着作用。这些观点还有待于进一步论证。

3.2 对虾类免疫保护与抗病毒作用探讨

由表 1 可以看出, γ 射线灭活接种实验中, 各组存活中国对虾病毒携带量都比较低, 分别为(14.0±11.9)、(14.1±4.3)、(24.5±15.0)和(15.1±7.8) copies/ng DNA, 推测这可能是接种后中国对虾能够对再次侵染的 WSSV 产生抑制作用。这与 Wu 等^[10]的实验结果一致, 该研究也发现接种 WSSV 后的存活中国对虾再次感染 WSSV 时病毒含量并不高, 并由此提出对虾类免疫反应(抗病力)与提高对虾对病毒携带量(耐受性)不同的结论。不过本文阳性对照组(IP)最终存活中国对虾的病毒携带量也比较低, 为(24.7±7.4) copies/ng DNA, 这可能是实验材料的原因, 即本实验所用材料均为经黄海水产研究所多年选育的优良抗病品种中国对虾“黄海 2 号”, 优良的选育可能使得该对虾品种有一定的抗病能力^[21]。

通常认为对虾等无脊椎动物没有类似于脊椎动物的特异性免疫系统, 只能依赖非特异性免疫, 应用疫苗免疫还存在着很大的争议。目前关于对虾类免疫和疫苗的报道比较少, 主要是针对弧菌有过成功的报道^[4-5], 对白斑综合征报道也很少, 而且实验结果差别很大^[2,22-24]。但是以上实验结果说明, 对虾可能具有类免疫抗病力, 这为应用疫苗预防 WSSV 以及研究虾类的免疫反应开辟了新的领域。本文中 γ 射线灭活接种实验与 Namikoshi^[2]的实验结论一致, 都说明了对虾类免疫抗病力与接种疫苗的活力有关, 所以进一步探索疫苗的制作方法对于对虾类免疫的研究至关重要。

致谢: 本实验得到黄海水产研究所张庆文、曹宝祥、刘宁老师和肖广侠同学的大力支持与帮助, 在此一并致谢。

参考文献:

- [1] Venegas C A, Nonaka L, Mushiaki K, et al. Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV)[J]. Dis Aqu Org, 2000, 42: 83-89.
- [2] Namikoshi A, Wu J I, Yamashita T, et al. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus[J]. Aquaculture, 2004, 229: 25-35.
- [3] 莊雅竹, 王涵青. 白虾类专一性免疫作用分子 Dscam 之蛋白质特性分析[R]. 2010 台湾水产学会论文发表会.
- [4] 曹剑香, 简纪常, 吴灶和. 溶藻弧菌疫苗对凡纳滨对虾免疫功能的影响[J]. 湛江海洋大学学报, 2004, 6(24): 11-17.
- [5] 陶保华, 胡超群, 任春华. 弧菌疫苗对斑节对虾和日本对虾免疫预防的作用[J]. 水产学报, 2000, 6(24): 564-569.
- [6] 王旭, 史成银, 黄捷. 用于 PCR 检测对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒(HHNBV) 的一种快速提取 DNA 方法[J]. 海洋水产研究, 2000, 21(1): 8-12.
- [7] Durand S V, Lightner D V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp[J]. Journal of Fish Diseases, 2002, 25(7): 381-389.
- [8] Lightner D V, Redman R M. Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas[J]. Fish Pathol, 1998, 33: 165-180.
- [9] Takahashi Y, Itami T, Kondo M. Immunodefense system of crustacea[J]. Fish Pathology, 1995, 30: 141-150.
- [10] Wu J L, Nishioka T, Mori K, et al. A time-course study on the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus[J]. Fish Shellfish

- Immunol, 2002, 13: 391–403.
- [11] Smith V J, Chisholm J R S. Non-cellular immunity in crustaceans[J]. Fish Shellfish Immunol, 1992(2): 1–31.
- [12] 林颖博. 中国对虾血细胞发生、功能及其白斑综合征病毒受体蛋白研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- [13] Van Hulten M C W, Wittevelde J, Snippe M, et al. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp[J]. Virology, 2001, 285: 228–233.
- [14] 贾启军, 孟小林, 徐进平, 等. 对虾白斑综合征病毒囊膜蛋白 VP19 的融合表达及其抗病毒感染作用[J]. 中国病毒学, 2006, 21(6): 585–588.
- [15] Wu W, Wang L, Zhang X. Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection[J]. Virology, 2005, 332(2): 578–583.
- [16] 李咏梅, 黎铭, 陈晓汉, 等. RNA 干扰南美对虾白斑病毒 VP28 基因的体外研究[J]. 西南农业学报, 2010, 23(6): 2083–2087.
- [17] 张印法, 耿彦生, 袁志勤. 电离辐射灭菌研究进展[J]. 中国公共卫生, 1994, 10(11): 522–523.
- [18] 张庆文, 刘萍, 王伟继, 等. 中国对虾抗病选育的初步研究[J]. 海洋水产研究, 2002, 23(2): 53–57.
- [19] 刘庆慧, 黄健, 杨冰, 等. 人工选育中国对虾两个群体 WSSV 感染相关免疫与生化因子的变化[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(6): 22–27.
- [20] 纪荣兴, 邹文政, 鄢庆彬, 等. 日本对虾抗白斑子三代的抗白斑综合征病毒感染能力及免疫特性[J]. 水产学报, 2008, 32(1): 98–104.
- [21] 孟宪红. 中国对虾“黄海 2 号”对 WSSV 的抗病性分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- [22] Bright Singh I S, Manjusha M, Pai S S, et al. *Fenneropenaeus indicus* is protected from white spot disease by oral administration of inactivated white spot syndrome virus[J]. Dis Aqu Org, 2005, 66(3): 265–270.
- [23] Zhu F, Du H H, Miao Z G, et al. Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus using inactivated WSSV[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26: 685–690.
- [24] 朱建中, 陆承平. 对虾白斑综合征病毒在螯虾动物模型的感染特性[J]. 水产学报, 2001, 25(1): 47–51.

Quasi-immune response of *Fenneropenaeus chinensis* to WSSV and its verification

LI Zhanjun^{1,2}, MENG Xianhong¹, KONG Jie¹, SHAN Congwen³, LUO Kun¹, LUAN Sheng¹,
CHANG Yaqing²

1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Resources Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. College of Life Sciences and Biotechnology, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;
3. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200040, China

Abstract: In order to explore the quasi-immune response of *Fenneropenaeus chinensis*, healthy shrimps were vaccinated with inactivated white spot syndrome virus (WSSV). WSSV was inactivated using varying doses of γ -ray irradiation. After 20 days of continuous feeding with inactivated WSSV, the surviving shrimps were exposed to active WSSV to test their survival rates. It was shown that over 216 hours, the survival rates attributable to IE-5 kGy, IE-10 kGy, IE-15 kGy and IE-20 kGy were 45.5%, 54.2%, 68%, and 65.4%, respectively; the mean WSSV loads of the surviving shrimps were (14.0 ± 11.9) , (14.1 ± 4.3) , (24.5 ± 15.0) and (15.1 ± 7.8) copies/ng DNA, compared with that of dead shrimps of $(2.1 \pm 2.0) \times 10^5$, $(5.2 \pm 4.4) \times 10^5$, $(3.8 \pm 4.4) \times 10^5$ and $(6.2 \pm 7.7) \times 10^5$ copies/ng DNA, respectively. Within the positive control group, the survival rate was 20%, and the mean WSSV copies of surviving and dead shrimps were (24.7 ± 7.4) and $(5.8 \pm 6.9) \times 10^5$ copies/ng DNA, respectively. It is suggested that the presence of a quasi-immune response system in *F. chinensis* is possible, and exposure to WSSV inactivated by γ -ray irradiation can improve the anti-virus resistance of the shrimps. These data show that WSSV can be prevented by vaccination, thereby providing data references for developing a healthy culture system for *F. chinensis*.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; quasi-immune response; γ -ray; white spot syndrome virus (WSSV)

Corresponding author: KONG Jie. E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn