

研究简报

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
ARTIFICIAL INFECTION OF BROOD SHRIMP OF
PENAEUS CHINENSIS WITH HYPODERMAL AND
HEMATOPOIETIC NECROSIS BACULOVIRUS

宋晓玲 黄 捷 王崇明 于 佳 陈碧鹃 杨丛海
(黄海水产研究所, 青岛 266071)

Song Xiaoling, Huang Jie, Wang Chongming, Yu Jia, Chen Bijuan and Yang Conghai
(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071)

关键词 中国对虾, 亲虾, 皮下及造血组织坏死杆状病毒, 人工感染, 温度效应

KEYWORDS *Penaeus chinensis*, Brood shrimp, HHNBV, Artificial infection, Temperature effective

自 1974 年 Couch 从墨西哥湾内的桃红对虾体内发现第一例对虾病毒始, 至今报道的对虾病毒已有 12 ~ 14 种, 病毒病的蔓延给全世界的对虾养殖带来极大的损失 [Lu 等, 1994]。1993 年, 前中国对虾仅见肝胰腺细小病毒和呼肠孤病毒的报导 [Couch, 1974; Lightner 等, 1985], 这两种病毒均未给对虾养殖带来大的损失。1993 年, 中国沿海暴发了大面积的对虾流行病, 对虾养殖损失巨大。我们确定该流行病的病原为一种新的对虾病毒: 皮下及造血组织坏死杆状病毒 (Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Baculovirus, HHNBV) [黄 捷等, 1995c]。并通过单抗酶标检测, 查出了该病毒的水平传播途径。本文用 HHNBV 毒种通过投喂和注射两种方式对中国对虾亲虾进行了感染研究, 以期对该病的垂直传播可能提供重要依据。

1 材料与方 法

1.1 毒种

毒种 HHNBV-946, 1994 年 6 月采集浙江乐清患病对虾, 保存于 -35°C 。取该样品虾头加 100mL PPB 对虾生理缓冲液 (黄 捷等, 1995), 15 000r/min 匀浆 10min, 5 000r/min 4°C 离心 10min, 上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤除菌, 作为暂养海捕亲虾注射感染实验的毒种。

毒种 HHNBV-957, 1995 年 7 月采集青岛市城阳区海西村的患病对虾, 保存于 -35°C 。按前述相同方法

收稿日期: 1996-01-31。

(1) 黄 捷等, 1995。中国对虾生理缓冲液的研究 (待刊)。

制备病毒上清除菌滤液,为养殖对虾及越冬前亲虾的注射感染实验毒种。

1.2 亲虾来源

越冬后亲虾购自日照市水产研究所对虾育苗场,体长约 12cm,体重约 20g;暂养海捕亲虾购自青岛市棘洪滩镇海西对虾育苗场,为暂养后产卵亲虾。体长约 17cm,体重约 60g;养殖对虾购自青岛市城阳区后楼村对虾养殖池,体长约 12cm,体重约 20g;越冬前亲虾来源于本所麦岛试验基地,均为交尾后雌虾,体长约 14~16cm,体重约 40g。

1.3 投喂感染

采用两个温度组进行投喂感染。升温投喂组:取越冬后亲虾 23 尾,暂养于 12℃,投喂 HHNBV-946。两日后每日升高水温 1℃,至水温 19℃时停止升温并使之恒定。低温投喂组:取越冬后亲虾 11 尾,第一阶段实验 15 天,水温恒定在 10~12℃,每日投喂 HHNBV-946,第 16 天进行第二阶段实验,移出亲虾,消毒实验容器,更换新水,移回亲虾,改投煮熟的新鲜蛤肉,并每日升高水温 1℃,至水温 18.5℃时停止升温并使之恒定。

1.4 注射感染

注射感染分为三个温度组进行。中温注射组:在 17~19℃中暂养 10 尾海捕亲虾,每尾于第二腹节注射 0.2mL 毒种 HHNBV-946。高温注射组:在 20~21℃暂养 120 尾养殖对虾成虾,每尾于第二腹节注射 0.1mL 毒种 HHNBV-957。低温注射组:在 12~16℃暂养 10 尾越冬前亲虾,每尾于第二腹节注射 0.1mL 毒种 HHNBV-957。注射后的第 11 天开始给水体升温,直至水温达 19℃时停止升温并使之恒定。

1.5 组织病理学

T-E 染色的光镜快速诊断:取刚死亲虾胃上皮用 T-E 染液进行压片染色,如观察到细胞核内空泡化,胞核肿大,即为阳性发病;如在全部视野中未观察到上述病变,为不是因发病而死亡的阴性结果[黄 捷等,1995a]。

组织切片光镜及电镜观察:死亡亲虾立即用 Davidson's AFA 固定,按常规方法进行光镜病理制片[芮菊生等,1980],石蜡切片经 Ehrlich's 酸性苏木精染色,1%伊红酒精(95%)溶液复染,中性树胶封片。取部分 T-E 染色呈阳性反应的死亡亲虾切卵巢、鳃及胃上皮用戊二醛-多聚甲醛固定液(多聚甲醛 4%;戊二醛 0.5%;0.4M 磷酸盐缓冲液;pH7.2)固定,按朱丽霞[1982]方法进行电镜制片。

1.6 核酸探针杂交

样品 DNA 抽提:取感染后对虾样品胃区或鳃组织,加 DNA 抽提液(10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, 0.5% SDS, 50 μg/mL 蛋白酶 K, pH8.0)研磨,经 37℃消化 30 分钟,用酚-酚氯仿、氯仿抽提,酒精沉淀,加入 301 × 10⁻⁶L 无菌水于 -35℃保存。

核酸探针的点杂交:取抽提的样品 DNA 以及 HHNBV-DNA (1.3ng/mL)、现场采集的 HHNBV-957 毒种、纯化的 HHNBV、SPF 南美白对虾 DNA(取自美国亚利桑那大学 Dr. Lighter 实验室)、1991 年采集的中国对虾肝胰腺(用于 HPV 的纯化, -35℃冻存)等样品,分别加入适量 TE 缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0),煮沸 10min,冰浴猝冷,每样品移取 1 × 10⁻⁶L 点样于尼龙膜,于 120℃ 30min 交连,blocking reagent 65℃预杂交 2 小时,加入 DIG 标记的 HHNBV 探针(Huang 等,1995)于 65℃水浴杂交过夜。第二天,膜清洗后加入碱性磷酸酶-抗 DIG 抗体,室温放置 30min,清洗,在暗处用底物(NBT+X-phos.)显影 2 小时。

(2)Huang, J., 1995. Study on the partial characteristics and clones of HHNBV.

2 结果

2.1 投喂感染

升温投喂组:在9天的升温过程中,水温从12℃升至18℃,共死亡亲虾4尾,经T-E染色诊断为HHNBV感染阴性;第10天,水温升至19℃,死亡的亲虾T-E染色呈阳性,恒温至第17天实验亲虾全部死亡,实验结果见图1。低温投喂组:投喂HHNBV-946期间,温度10~12℃,共死亡亲虾5尾,T-E染色呈阴性;更换养殖水体稳定两天水温后,开始以每天1℃的幅度升高水温,当升至18.2℃时,死亡的亲虾T-E染色呈阳性,至此不再升高水温,至第30天实验亲虾全部死亡,实验结果见图2。

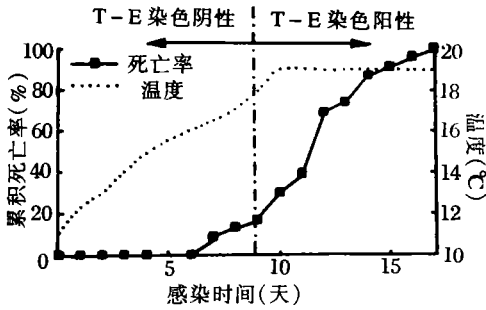


图1 用HHNBV病虾组织人工投喂感染中国对虾亲虾(升温投喂组)

Fig.1 Artificial infection of brood shrimp of *Penaeus chinensis* by feeding with HHNBV-diseased shrimp (Group of feeding with increasing temperature)

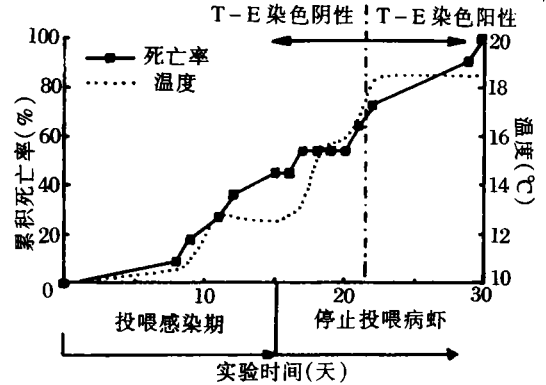


图2 用HHNBV病虾组织人工投喂感染中国对虾亲虾(低温投喂组)

Fig.2 Artificial infection of brood shrimp of *Penaeus chinensis* by feeding with HHNBV-diseased shrimp (Group of feeding at low temperature)

2.2 注射感染

中温注射组:在17~19℃下,注射感染的10尾海捕亲虾6天内全部死亡,除第一天死亡的亲虾T-E染色呈阴性外,其余均呈阳性(图3)。高温注射组:在20~21℃下,用HHNBV毒种注射感染的120尾养殖对虾成虾,在注射后的48~72小时内全部死亡,经T-E染色诊断全部为阳性。低温注射组:在12~16℃期间,注射感染的10尾越冬前亲虾无一死亡,水温升达17~19℃后,实验虾在6天内死亡(图4)。

2.4 病理学结果

人工感染死亡并经T-E染色证实为阳性的亲虾,在症状上表现为胃空,头胸甲极易剥离,眼球反光消失,某些感染的亲虾头胸甲可见白斑。亲虾肝胰腺组织切片经光学显微镜观察,在其囊管上皮细胞中未见任何病毒性的病变;但在肝胰腺血窦内可找到血淋巴细胞核的HHNBV病变[黄 捷等,1995c]。感染了HHNBV的亲虾其胃上皮及鳃上皮在电子显微镜下细胞核内有大量HHNBV,细胞质内也有零散HHNBV存在(图版)。在其卵巢内的卵母细胞中,未找到病毒粒子,但在结缔组织细胞核内发现有HHNBV。

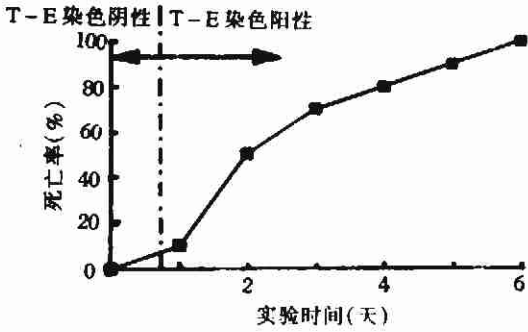


图3 用 HHNBV 毒种人工注射感染中国对虾海捕亲虾

Fig.3 Artificial infection of brood shrimp of *Penaeus chinensis* by injecting with HHNBV inoculum

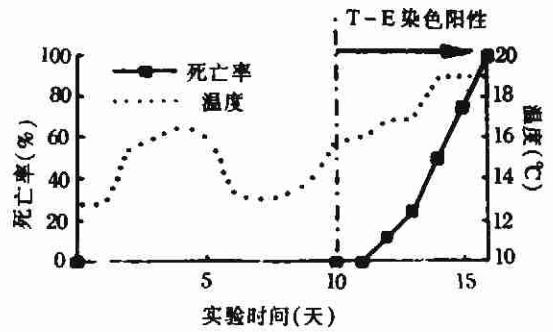
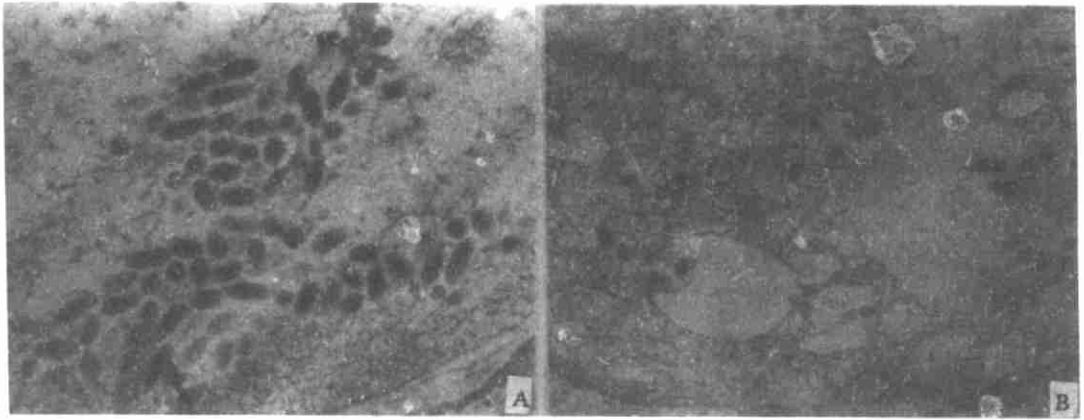


图4 用 HHNBV 毒种人工注射感染中国对虾越冬前亲虾

Fig.4 Artificial infection of brood shrimp of *Penaeus chinensis* by injecting with HHNBV inoculum



图版 投喂感染发病对虾鳃细胞电镜照片

Plate Electron microscopy of gill cells of diseased shrimp by feeding infection

A: 细胞核内的 HHNBV (20 000×); B: 细胞质内散在的 HHNBV (15 000×)。

2.5 核酸探针杂交结果

毒种 HHNBV-957, 高温注射组感染的养殖对虾及由其纯化的 HHNBV、HHNBV-DNA 等样品的杂交结果呈阳性, 低温投喂组在 10~12℃ 投喂感染的越冬后亲虾, 虽然其 T-E 染色及病理学结果呈 HHNBV 感染的阴性反应, 但杂交结果呈阳性; 升温投喂组在 18.2℃ 发病死亡的越冬后亲虾, T-E 染色及杂交结果呈阳性; SPF(即无特异病原)南美白对虾 DNA、1991 年采集的中国对虾肝胰腺样品和未感染的越冬前中国对虾亲虾样品, 杂交结果均呈阴性。

3 讨论

HHNBV 通过人工感染方式可感染健康的中国对虾亲虾, 在合适的条件下, 病毒在体内扩增, 导致亲虾发病死亡。人工投喂病虾组织感染亲虾死亡时间略长于注射感染亲虾的死亡时间, 其原因除了注射感染的饲养水温较高外, 主要是注射感染的病毒量大, 直接由肌肉注射入体内, 潜伏期短。

低温投喂组和低温注射组的 T-E 染色诊断、组织病理学及核酸探针杂交结果表明,17~18℃是 HHNBV 感染对虾后引起发病死亡的最低温度,低于此温度,对虾即使被病毒感染,也不会导致发病死亡。病毒的感染处于潜伏状态,温度升高后,已感染的对虾即可随之发病。高温注射感染的水温为 20~21℃,中温注射感染的水温为 17~19℃。高温注射感染的 120 尾养殖对虾在 72 小时内死亡,死亡时间与常规注射感染的死亡时间无明显差异[黄 捷等,1995b],而中温注射感染的 10 尾海捕亲虾在 6 天内死亡,明显缓于常规注射感染引起的死亡,17~19℃正是对虾受感染而导致死亡的最低温度,这一差异进一步证实 17~18℃上下的温度对于决定 HHNBV 在对虾体内的扩增与否起着重要作用。

在对虾人工育苗生产过程中,亲虾的饲养水温较低,一般不会超过 17~18℃,也就是说,即使亲虾携带了 HHNBV,由于不能使其发病致死,不易为生产者觉察,这一问题很值得重视。目前中国对虾人工育苗生产所用的亲虾有两个来源:一是秋末收虾时,挑选个体大、身体健壮的养殖对虾进行室内人工越冬,越冬期水温在 8~12℃;另一是春天从海上捕捞北上产卵游的野生亲虾,在海上越冬的水温也在 10~12℃左右。这两种亲虾都有携带 HHNBV 的可能性。亲虾是养虾生产的首要环节,如果带毒,就有可能通过粪便、分泌物等将病毒传播给幼体,形成 HHNBV 的垂直传播。

1995 年北方对虾苗种生产期间,黄海水产研究所、山东大学、山东省海水养殖研究所、沈阳应用生态研究所等单位应用单抗 ELISA、核酸探针、PCR 等检测手段,对亲虾、幼体及苗种做了大量现场检测;部分亲虾、糠虾幼体及仔虾呈阳性反应(据通讯交流),这表明,除了饵料可作为传播途径外,显然不能排除亲虾有可能携带病原,鉴于对虾暴发性流行病是一种急性传染病,应从各个生产环节切断病原的传播。做为首要环节的亲虾,长期处于 17~18℃以下的条件下生活,感染 HHNBV 不易发病死亡。显然带毒对虾不宜做为亲虾来源,因此加强亲虾检疫工作,应作为防止病毒传播的重要措施。

另一方面,本文用少量 HHNBV 毒种对大批亲虾及养殖对虾在实验室内进行注射感染,在 20~21℃条件下,72 小时内就可使所有对虾全部发病死亡,从感染的发病对虾中可纯化出大量的病毒。在对虾的细胞株尚未建立之时,这不失为一种对虾病毒实验室扩增的可行方法。

本文的电镜制片与操作得到青岛医学院电镜室侯颖一、谭金山老师的大力支持与帮助,石蜡切片由本所养殖病害研究室张立敬同志完成,青岛海洋大学海洋生命学院 95 届学生顾 闻、刘亚玲同学参加了部分实验工作,在此一并致谢。国家自然科学基金资助项目,编号为 39170606。

参 考 文 献

- [1] 朱丽霞,程乃谦,高信曾,1982. 生物学中的电子显微镜技术. 北京大学出版社。
- [2] 芮菊生等,1980. 组织切片技术. 人民教育出版社(京)。
- [3] 黄 捷等,1995a. T-E 染色法用于对虾暴发性流行病的现场快速诊断. 海洋科学,(1):29~33。
- [4] 黄 捷等,1995b. 对虾暴发性流行病病原的人工感染研究. 海洋水产研究,16(1):51~58。
- [5] 黄 捷等,1995c. 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研究. 海洋水产研究,16(1):1~10。
- [6] Couch, J. A., 1974. Free and occluded virus similar to baculovirus to baculovirus in hepatopancrease of pink shrimp. *Nature*, **247**: 229~231.
- [7] Lightner, D. V. et al., 1985. A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. *J. Invert Path.*, **45**:47~53.
- [8] Lu, Y. et al., 1994. Infection of the yellow head baculo-lick virus (YBV) in two species of penaeus shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.*, **17**:649~656.
- [9] Tsing, A. et al., 1987. A new viral disease of the shrimp. *Penaeus japonicus* Bate. *J. Fish Dis.*, **10**:139~141.