

文章编号: 1000- 0615(2005)04- 0524- 05

## 卤虫携带白斑综合征病毒的研究

邓 灯<sup>1,2</sup>, 王伟继<sup>2</sup>, 刘 萍<sup>2</sup>, 孟宪红<sup>2</sup>, 孔 杰<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 卤虫是虾、蟹苗种培育的关键动物性饵料, 查清其能否携带白斑综合征病毒, 对培育健康苗种至关重要。2002年7月至10月, 自盐田中取野生卤虫, 经暂养后选20尾抱卵雌虫, 每尾置1个烧杯中, 投喂单胞藻, 产卵后取出亲体; 20d后, 每个烧杯中取5尾子一代个体, 利用巢式体外DNA扩增技术对亲体和子一代成体进行WSSV病毒检测。检测结果显示: 卤虫中可扩增出特异性的、与引物设计吻合的DNA片段; DNA测序分析表明, 扩增片段的DNA序列与白斑综合征病毒序列一致; 野生卤虫携带白斑综合征病毒的阳性率为58%, 实验条件下野生卤虫后代的阳性率为43%; 同一家系中, 亲代与子代携带病毒的情况不完全一致, 不能确定白斑综合征病毒可否通过繁殖, 在卤虫世代间进行垂直传播。研究结果表明: 卤虫很可能是白斑综合征病毒的携带者, 苗种培育和养殖期间投喂卤虫可能造成虾、蟹感染白斑综合征病毒, 卤虫检疫是培育健康苗种的关键措施。

**关键词:** 白斑综合征病毒; 卤虫; 巢式聚合酶链式反应

**中图分类号:** S963.2 **文献标识码:** A

## Studies on *Artemia* sp. acting as a possible vector for WSSV

DENG Deng<sup>1,2</sup>, WANG Weijie<sup>2</sup>, LIU Ping<sup>2</sup>, MENG Xianhong<sup>2</sup>, KONG Jie<sup>2</sup>

(1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

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

**Abstract:** Brine shrimp *Artemia* is the key animal diet during the course of the penaeid shrimp and crabs larviculture. It is very important for healthy larvae culture to investigate whether it could carry white spot syndrome virus (WSSV). In this study, wild *Artemia* sp. with eggs and experimentally cultured children *Artemia* were detected using nested-PCR for the presence of WSSV. Wild adult *Artemia* sp. were sampled from brine pan from July to October, 2002. 20 control groups were set up after ten days nursery period, that is, one female *Artemia* with eggs in each 500ml beaker, feeding microalgae. Parents *Artemia* were taken out after spawning and then frozen at -20°C. About 20 days later, five children ones were taken out and detected by nested-PCR together with the parents, respectively. The results showed that WSSV positive products could be detected in *Artemia*, not only in wild adult *Artemia* but also the filial generation, and DNA sequence of the amplified product accords with the designed specific amplified one according to sequence analysis using sequence analysis software Bioedit 4.8.8. The positive rates of wild brine shrimp and the filial generation were 58% and 43%, respectively. In addition, there seems to have some relation between parents and filial generation's detecting results of the same genealogies. However, we could not tell whether WSSV could vertically transmit in *Artemia* or not, and there still needs some work to further verify this. In conclusion, the results showed that brine shrimp *Artemia* could possibly act as reservoir or mechanical vector for WSSV, thus, *Artemia* diet during shrimp or crabs larviculture might lead to WSSV infection. Therefore, it is necessary to quarantine the brine shrimp before being fed to shrimp or crabs in order to cultivate healthy larvae.

**Key words:** white spot syndrome virus (WSSV); *Artemia* sp.; nested-polymerase chain reaction

自从对虾白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 1992 年首次报道以来<sup>[1, 2]</sup>,

收稿日期: 2004-03-09

资助项目: 国家高技术研究发展(863)计划(2003AA603021)

作者简介: 邓 灯(1978-), 女, 山东济宁人, 硕士, 主要从事海洋生物技术、海洋动物病害等工作。

通讯作者: 孔 杰, Tel: 0532-5823291, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

由于其传播速度快、杀伤力强, 一直是全球范围内导致养殖对虾死亡的头号病原, 但是目前仍没有有效的治疗措施。因此, 找到病毒的宿主及传播载体、切断其传播途径便成为有效抑制此病毒爆发的关键。研究结果表明, 对虾感染此病毒的主要方式为经口感染<sup>[3, 4]</sup>, 因而, 对虾生存环境生物及其饵料生物带毒与否是决定对虾养殖成败的关键因素。而 WSSV 水平传播的结论主要来源于对虾养殖期的饵料生物的检测结果, 有关对虾苗种培育期饵料携带病原的研究相对薄弱。鉴于对虾苗种携带病原对养殖产生更大的危害性, 苗种培育期活体饵料携带病毒的研究具有重要意义和必要性。

卤虫 (*Artemia* sp.) 是养殖虾类 状幼体后期至仔虾期的良好鲜活饵料, 而且是对虾幼体培育期间重要的共栖生物。同属甲壳动物, 卤虫一直被怀疑是包括病毒在内的许多病原的潜在载体, 并且已知卤虫是许多细菌病(如鳃弧菌等)病原的载体<sup>[5]</sup>, 因此, 其能否作为载体传播甲壳类病毒值得人们的广泛关注。目前, 国外对此研究较少, 还未见有在成体卤虫检测到 WSSV 的报道<sup>[6, 7]</sup>; 而国内对病毒传播途径及宿主调查中, 在小型甲壳类样品检测中, 卤虫检测有阳性表现<sup>[8]</sup>, 但其样本数较少, 还有待进一步的研究。本实验运用巢式 PCR 法对我国沿海盐田正常两性生殖卤虫虫体检测 WSSV 病毒, 并试图通过在实验控制条件下确认卤虫虫体的 WSSV 病毒能否垂直传播给子代, 以期为健康对虾苗种的生产打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验卤虫

2002 年 7 月采自青岛即墨大桥盐场的盐田成体卤虫暂养于 80 L 的水族箱中, 控温(28±1)℃, 并投喂单胞藻。暂养约一周后, 取 20 尾抱卵雌卤虫分别置于 20 个 500 mL 的烧杯中(烧杯中海水经 300 目筛绢过滤), 水温(28±1)℃, 并各自编号(20-n)。数日后待雌虫产卵后将其取出, 缓冲液冲洗两次, 并将其表面吸干后于 Eppendorf 管中冻存于-20℃。待卵孵化并生长至成虫, 各取子代约 5 尾按同样的方法冻存。

### 1.2 DNA 的提取、巢式 PCR 扩增与电泳检测

DNA 的提取参考文献[9]的方法。PCR 反应体系(25 LL)包含约 150ng 的基因组 DNA, 15

Lmol 引物<sup>[10]</sup>, 2.5 LL 10×缓冲液, 50 pmol Mg<sup>2+</sup>, 5 pmol dNTP, Taq 酶 1 U。PCR 反应条件为: 94℃ 5 min, 然后 94℃ 40 s, 53℃ 40 s, 72℃ 2 min, 共 25 个循环, 之后 72℃ 10 min, 4℃ 保存。第二次 PCR 使用的模板为第一次 PCR 产物 1 LL, 使用内引物, 采用相同的程序, 每次反应均设一阳性对照和阴性对照(清洗海水为模板)。PCR 产物 6 LL 通过 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 由 Gel Doc1000 紫外成像系统观察并照相。

### 1.3 扩增片段测序比较

从电泳中随机选取阳性扩增产物, 对 PCR 产物进行双向测序, 所用仪器为 ABI 公司 373A 自动核酸序列分析仪。测得序列经 Bioedit 4.8.8 软件进行同源性分析。

## 2 结果

### 2.1 卤虫亲、子代 WSSV 检测结果

无论使用外引物还是使用内引物, 单独使用 1 对引物, 卤虫的亲体和子代均呈阴性, 电泳检测不到扩增产物, 表明卤虫携带病毒的数量少。

通过巢式 PCR 检测, 卤虫亲代和子代都能检测到病毒的存在。共检测卤虫亲本 19 个, 阳性检出率为 58%; 子代共检测 58 个个体, 阳性检出率为 43%。虽然强度不一, 但巢式 PCR 产物在电泳中的电泳条带清晰可辨, 迁移位置与阳性对照一致, 扩增片段的长度也与实验设计吻合。亲代与子代携带病毒的研究结果表明, 亲代携带病毒与子代携带病毒具有一定的相关关系。20 组样品, 6 组样品子代、1 组样品亲代和子代因取样失败而无检测结果。统计 13 组样品, 9 个亲代呈阳性的亲体, 8 个亲体的后代检测出阳性, 1 个呈阴性, 后代的阳性率高低不一, 且未发现所有后代都是阳性的实验组; 4 个阴性亲体组别中, 2 个的后代检测阴性, 另外 2 个发现阳性后代。

将 19 组亲本与子代的凝胶电泳阳性检测结果总结为表 1, N<sub>0</sub>(n=1, 2, 3... 19) 表示第 1~19 号亲本雌卤虫, N<sub>1-5</sub> 表示第 1~5 尾子代卤虫。

### 2.2 扩增片段测序对比结果

巢式 PCR 原设定扩增片段长度为 982 碱基, 实验实测 949 个碱基。通过比较, 扩增片段与目的特异性碱基序列同源性达 99.9%, 可以认为特异性扩增(图 2)。

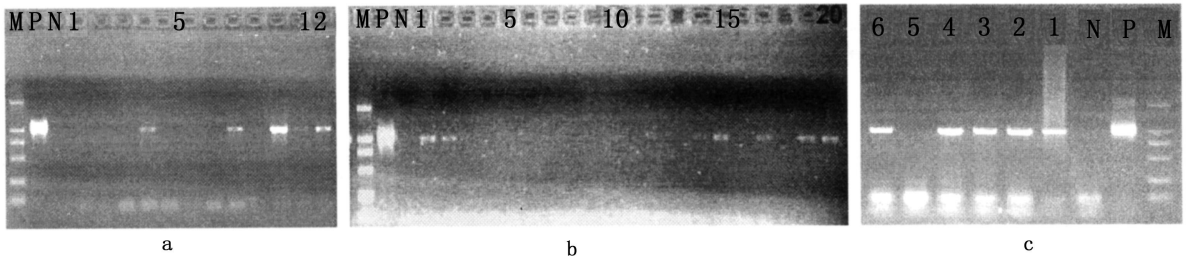


图1 卤虫亲后代 WSSV 检测电泳

Fig. 1 Electrophoretograms of nested PCR products of parents and children Artemia

(a): 1- 12: 7<sub>a</sub>, 7<sub>1</sub>, 7<sub>3</sub>, 19<sub>a</sub>, 1<sub>5</sub>, 11<sub>4</sub>, 11<sub>5</sub>, 12<sub>5</sub>, 12<sub>b</sub>, 19<sub>3</sub>, 12<sub>1</sub>, 12<sub>3</sub> 巢式 PCR 检测结果; (b): 1- 20: 18<sub>1</sub>, 19<sub>1</sub>, 7<sub>2</sub>, 11<sub>2</sub>, 11<sub>3</sub>, 5<sub>4</sub>, 17<sub>0</sub>, 7<sub>5</sub>, 8<sub>5</sub>, 8<sub>4</sub>, 11<sub>1</sub>, 8<sub>3</sub>, 1<sub>4</sub>, 1<sub>3</sub>, 2<sub>1</sub>, 19<sub>2</sub>, 12<sub>2</sub>, 6<sub>4</sub>, 19<sub>5</sub>, 12<sub>4</sub> 巢式 PCR 检测结果; (c): 1- 6: 16<sub>0</sub>, 16<sub>1</sub>, 16<sub>2</sub>, 16<sub>3</sub>, 16<sub>4</sub>, 16<sub>5</sub>;

M: DL2000 分子量标准; P: 阳性对照(982bp); N: 阴性对照

(a): 1- 12: the results obtained with nested PCR performed on 7<sub>a</sub>, 7<sub>1</sub>, 7<sub>3</sub>, 19<sub>a</sub>, 1<sub>5</sub>, 11<sub>4</sub>, 11<sub>5</sub>, 12<sub>5</sub>, 12<sub>b</sub>, 19<sub>3</sub>, 12<sub>1</sub>, 12<sub>3</sub>; (b): 1- 20: products obtained with nested PCR performed on 18<sub>1</sub>, 19<sub>1</sub>, 7<sub>2</sub>, 11<sub>2</sub>, 11<sub>3</sub>, 5<sub>4</sub>, 17<sub>0</sub>, 7<sub>5</sub>, 8<sub>5</sub>, 8<sub>4</sub>, 11<sub>1</sub>, 8<sub>3</sub>, 1<sub>4</sub>, 1<sub>3</sub>, 2<sub>1</sub>, 19<sub>2</sub>, 12<sub>2</sub>, 6<sub>4</sub>, 19<sub>5</sub>, 12<sub>4</sub>; (c): 1- 6: nested PCR products of 16<sub>0</sub>, 16<sub>1</sub>, 16<sub>2</sub>, 16<sub>3</sub>, 16<sub>4</sub>, 16<sub>5</sub>

M: DL2000 Marker(2000, 1000, 750, 500, 250, 100); P: positive control; N: negative control

表1 卤虫亲后代 WSSV 检测情况

Tab. 1 WSSV carrying condition of parents and filial brine shrimp

亲本 parents	子代 filial generation					亲本 parents	子代 filial generation					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5	
1 <sub>0</sub>	+	+	-	+	-	11 <sub>0</sub>	-	-	-	-	-	
2 <sub>0</sub>	+	+	/	/	/	12 <sub>0</sub>	-	+	+	++	+	++
3 <sub>0</sub>	+	+	+	+	/	13 <sub>0</sub>	-	/	/	/	/	/
4 <sub>0</sub>	+	/	/	/	/	14 <sub>0</sub>	-	-	-	-	-	-
5 <sub>0</sub>	+	++	+++	-	-	15 <sub>0</sub>	-	/	/	/	/	/
6 <sub>0</sub>	+	+	++	+++	-	16 <sub>0</sub>	++	++	++	-	++	++
7 <sub>0</sub>	++	-	-	-	-	17 <sub>0</sub>	-	/	/	/	/	/
8 <sub>0</sub>	-	+	+	-	-	18 <sub>0</sub>	+	+	/	/	/	/
9 <sub>0</sub>	-	/	/	/	/	19 <sub>0</sub>	+	+	-	+++	++	+
10 <sub>0</sub>	+	/	/	/	/							

注:+++ 检测强阳性;++ 阳性较强;+ 阳性较弱;- 检测阴性;/ 未取样

Notes: +++ means strong positive results; ++ means relatively strong positive results; + means relatively weak positive results; - means negative results; / means undetermined

### 3 讨论

自1992年斑节对虾、日本对虾暴发有史以来规模最大、感染力最强的病毒流行病,至今尚未发现治疗该病的有效措施,因此,对白斑综合征病毒的宿主及传播途径的研究就成为有效预防和抑制该病蔓延的唯一切入点。已知白斑综合征病毒宿主非常广泛,大多数甲壳纲十足目种类如糠虾、白虾、毛虾、武氏厚蟹、带纹相手蟹等都是其敏感宿主<sup>[3,4,11,12]</sup>,甚至某些淡水种类也可以被其感染<sup>[13]</sup>。而对于病毒传播媒介的环境生物的研究结果大多集中于桡足类及底栖穴居甲壳类<sup>[8,11,14]</sup>。卤虫携带WSSV的调查资料较少。也有人在对WSSV宿主调查过程中,曾检测到卤虫

阳性<sup>[8,11,12]</sup>,但由于其样本数少,并没有明确的定论;Chang等<sup>[7]</sup>利用巢式PCR发现5种商业品牌的卤虫卵WSSV检测均呈阳性,但是其孵化的无节幼体及摄食无节幼体的实验虾WSSV检测均呈阴性;Sahul Hameed等<sup>[6]</sup>用一次PCR法检测卤虫呈阴性,与本实验一次PCR检测结果吻合,本实验仅能通过巢式PCR才可检测阳性,表明实验卤虫对WSSV的携带量少。依据本文的研究结果:卤虫亲本及子代样本70余个,阳性率达40%以上,测序结果进一步确认病毒的存在,可以认为:卤虫,无论是成体还是其后代,携带WSSV病毒;尽管卤虫携带病毒的量少,在苗种培育期和养殖期使用携带WSSV病毒的卤虫,可能导致对虾感染WSSV病毒,病毒再通过其它的传播载体,

如粪便、个体间残食等, 进一步发展为 WSSV 病毒病的流行, 成为对虾养殖的隐患。

近几年, 卤虫作为一种水生动物病原体的传播媒介受到关注<sup>[15]</sup>。卤虫已经被发现是鳃弧菌的传播载体, 用细菌微生态调节剂可以控制养殖卤虫身上携带的弧菌<sup>[16]</sup>; 卤虫还被证明是野田村病毒 (nodavirus) 及鱼类感染性胰腺坏死病毒 (IPNV) 的机械性载体<sup>[17, 18]</sup>。本文实验表明, 病毒检测呈阳性的卤虫并没有表现出生理、活动异常, 病毒存在于卤虫体内的可能性较大, 但病毒在卤虫体内的增殖受到限制, 多数情况下表现为携带病毒量少。由此推测, 卤虫很有可能如同其携带 nodavirus 一样, 仅是 WSSV 的机械性载体<sup>[17]</sup>。

到目前为止, WSSV 在卤虫中是如何传播的还没有研究。本文的研究结果表明, 近 90% 的阳性的亲体的后代也有阳性, 50% 阴性亲本的后代是阴性, 亲代与子代携带 WSSV 相关程度较高, 估计 WSSV 在卤虫中存在亲代与子代间的传染机制。但由于病毒侵染卤虫的何种部位以及其在卤虫体内的繁殖机制尚不清楚, 依据本文的研究结果还不能确定 WSSV 可否通过生殖细胞进行纵向的传播。

在亲代和后代都进行检测的 13 组实验中, 有 2 组出现意外的实验结果, 即亲本检测呈阴性、子代呈阳性的情况, 推测亲本漏检的可能性较大, 实验使用的巢式 PCR 灵敏度测试为 1pg, 亲代卤虫的 WSSV 携带量也可能低于 1pg<sup>1</sup> 而未被检出, 但携带病毒的卤虫能否对虾起作用则需要卤虫投喂实验来进一步确认。

## 参考文献:

- [1] Nakano H J, Koube H, Umezawa S, et al. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Epizootiological survey and infection trials [J]. *Fish Pathol*, 1994, 29 (2) : 135- 139.
- [2] Takahashi Y, Itami T, Kondo M, et al. Electron Microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*) [J]. *Fish Pathol*, 1994, 29 (2) : 121- 125.
- [3] 刘 萍, 孔 杰, 孟宪红, 等. WSSV 在对虾养殖过程中传

- 播途径的调查 [J]. *海洋水产研究*, 2000, 21(3): 9- 12.
- [4] 何建国, 周化民, 姚 伯, 等. 白斑综合征杆状病毒的感染途径和宿主种类 [J]. *中山大学学报*, 1999, 38(2): 65- 69.
- [5] Bergh O, Lisbeth V, Makridis P, et al. Uptake and processing of a *Vibrio anguillarum* bacterin in *Artemia franciscana* measured by ELISA and immunohistochemistry [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2001, 11(1) : 15- 22.
- [6] Sahul Hameed A S, Murthi B L M, Rasheed M, et al. An investigation of *Artemia* as a possible vector for WSSV transmission to *Penaeus indicus* [J]. *Aquac*, 2002, 204 : 1- 10.
- [7] Chang Y S, Lo C F, Peng S E, et al. WSSV PCR2positive *Artemia* cysts yield PCR2negative nauplii that fail to transmit WSSV when fed to shrimp postlarvae [J]. *Dis Aquat Org*, 2002, 49 : 1- 10.
- [8] 黄 杰, 于 佳, 王秀华, 等. 单抗- Elisa 检测对虾 HHNBV 的病原及其传播途径 [J]. *海洋水产研究*, 1995, 16 (1) : 40- 50.
- [9] 石 拓, 孔 杰, 刘 萍, 等. 中国对虾遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. *海洋与湖沼*, 1999, 30(6) : 609- 615.
- [10] 孔 杰, 刘 萍, 石 拓, 等. 中国对虾杆状病毒一个 DNA 片段序列测定 [J]. *海洋学报*, 2003, 25: 185- 189.
- [11] 雷质文, 黄 杰, 史成银, 等. 白斑综合征病毒 (WSSV) 的宿主调查 [J]. *海洋与湖沼*, 2002, 33 (3) : 250- 258.
- [12] Chang P S, Chen H C, Wang Y C. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization [J]. *Aquac*, 1998, 164 : 233- 242.
- [13] Pramod Kiran R B, Rajendran K V, Jung S J, et al. Experimental susceptibility of different life stages of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), to white spot syndrome virus [J]. *J Fish Dis*, 2002, 25 : 201- 207.
- [14] 宋晓玲, 史成银, 黄 杰, 等. 用 DNA 斑点杂交法检测对虾及其饵料和环境生物携带 WSSV 状况的调查 [J]. *中国水产科学*, 2001, 8 (4) : 36- 40.
- [15] 王传斌, 王维志. 进境卤虫卵检疫结果分析 [J]. *中国进出口动植物检*, 1998, (1) : 39- 40.
- [16] Villamil L, Figueras A, Planas M, et al. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics [J]. *Aquac*, 2003, 219: 43- 56.
- [17] Skliris G P. Assessment of the susceptibility of the brine shrimp *Artemia salina* and rotifer *Brachionus plicatilis* to experimental nodavirus infections [J]. *Aquac*, 1998, 169 : 133- 141.
- [18] Mortensen S H, Evensen O, Rodseth O M, et al. The relevance of IPNV in farmed Norwegian turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Aquac*, 1993, 115 : 243- 252.

<sup>1</sup> 邓 灯, 张庆文, 王伟继, 等. 中国对虾几个产卵场群体携带 WSSV 状况调查. 2004.

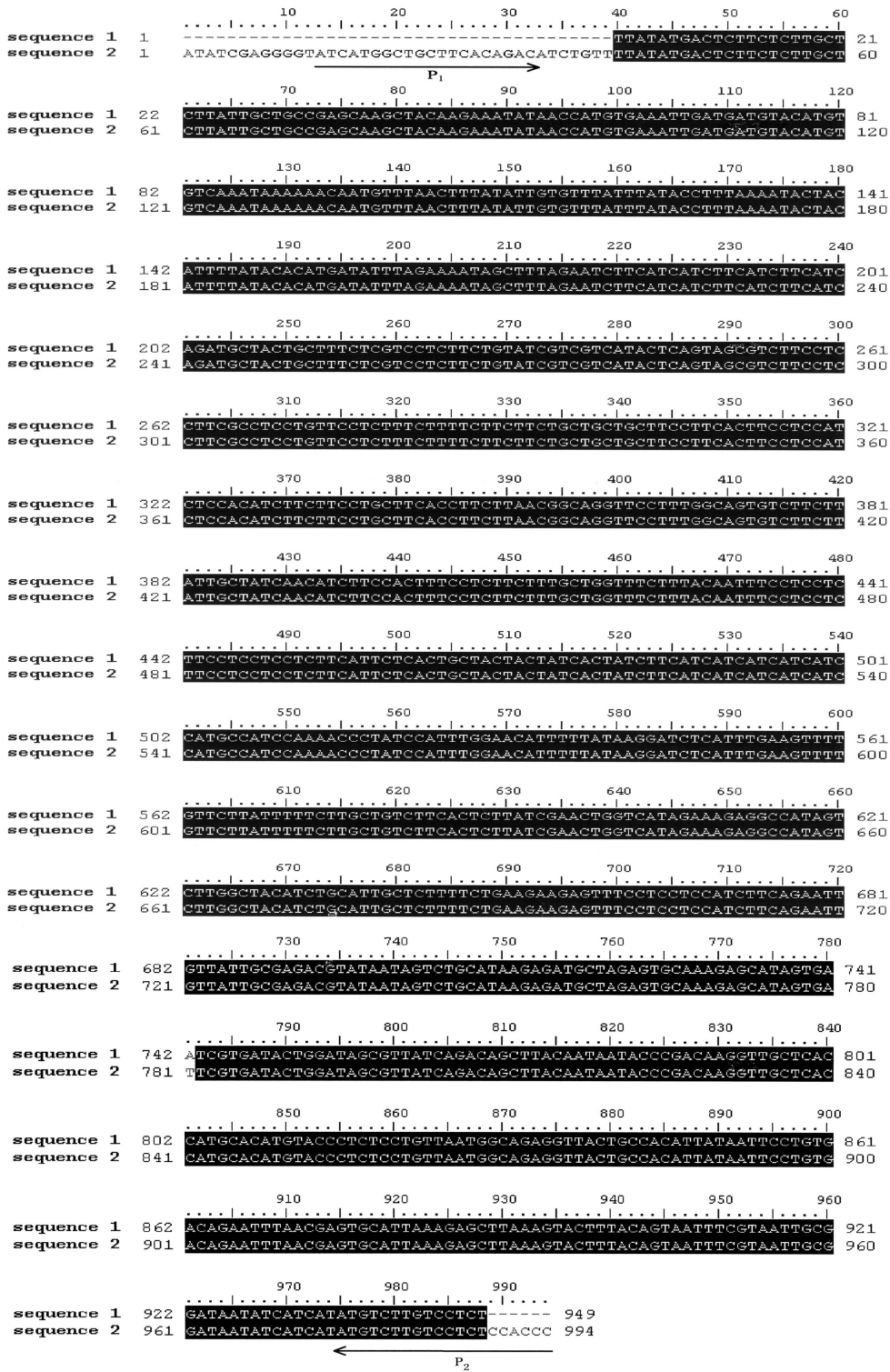


图2 扩增产物测序结果与WSSV中同源区段的比较分析(阴影部分为相同的碱基)

Fig. 2 Alignments of WSSV sequence and the amplified sequence( gray shadows denote identical base)

sequence1: 扩增产物序列; 2. 病毒特异序列(982bp); 箭头所示 PCR 引物 P1、P2 的位置

sequence1: Amplified sequence; sequence2: WSSV sequence; the position of the PCR primer P1, P2 are showed by arrows