

文章编号:1000-0615(2009)06-1031-06

栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒(AVNV) 卵内的垂直传播途径

于佐安^{1,2}, 王崇明¹, 李赞², 任伟成^{1,2}, 蔡玉勇^{1,2}

(1. 中国水产科学院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003)

摘要:急性病毒性坏死病毒已被证实为是一种对养殖栉孔扇贝危害极大的病原体,探讨其传播途径是防控扇贝“大规模死亡症”的前提之一。将亲贝各放在一独立育苗水体内存卵、孵化,并进行幼虫培育。通过春季和秋季室内人工育苗,从40个独立育苗水体中,采获亲贝、卵各23个家系样品,受精卵、D形幼虫、壳顶幼虫各12个家系样品,眼点幼虫2个家系样品。采用间接ELISA法、间接免疫荧光技术和电子显微镜技术对亲贝、卵和发育各期的幼虫进行定性和定位的检测。结果发现,栉孔扇贝的性腺组织中存在病毒粒子,而卵、受精卵及各期发育幼虫体内均未检测到病毒。由此可以判断:AVNV可以感染栉孔扇贝的性腺,但并不存在卵内垂直传播的可能性。

关键词:AVNV;垂直传播;间接ELISA;间接免疫荧光;电子显微镜技术

中图分类号:S 941.41

文献标识码:A

自1997年以来,在北方养殖海区,已连续几年发生了栉孔扇贝大规模死亡(死亡率高达80%以上),给我国扇贝养殖业造成了重大损失,极大地阻碍了这一高效产业的持续发展,甚至直接威胁到现有产业的生存^[1]。自2000年起,通过流行病学、组织病理学、病原学以及环境理化、生物因子等方面的深入研究,经过全面的调查与排查,证实一种球形病毒是导致栉孔扇贝大规模死亡的直接病原^[2],并把由该病毒引起的栉孔扇贝“大规模死亡症”定名为“急性病毒性坏死症(acute viral necrotic disease, AVND)”^[3]。

研究病毒的垂直传播途径对于切断病毒传播途径,培育健康的种质资源具有重要理论和实践意义。Bootland等^[4]对大鳞大马哈鱼通过腹腔注射传染性胰脏坏死病毒(infectious pancreatic necrosis virus, IPNV),在生殖器官中发现了IPNV,因此认为该病毒有垂直传播的可能性。Emmerik^[5]等通过巢式PCR的方法认为对虾传

染性皮下及造血组织坏死病毒(infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHNV)主要感染雌虾的生殖腺,而雄虾的生殖腺并未感染IHNV。汝少国等^[6]应用电镜技术初步探讨了中国对虾杆状病毒的垂直传播途径。江世贵等^[7]初步研究了白斑综合症病毒对斑节对虾亲虾的感染和垂直传播。闫科青等^[8]认为牡蛎面盘病毒(oyster velar virus, OVV)是一种DNA病毒,并可能存在垂直传播。但是,关于栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒(AVNV)垂直传播途径的研究尚未见相关报道。

本文应用间接ELISA检测法、间接免疫荧光技术和电子显微镜技术,对采自40个独立育苗水体同一家系的亲贝、卵、受精卵和各期幼虫样品进行检测,探讨AVNV垂直传播的可能性,以期对养殖生产实践中该疾病的预防与控制、健康养殖模式的建立和健康苗种的培育提供理论依据和实践基础。

收稿日期:2009-05-22 修回日期:2009-06-12

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA100307);公益性行业(农业)科研专项课题(nyhyzx07-047);山东省科技攻关项目(2004GG2205115)

通讯作者:王崇明,E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

1 材料与方 法

1.1 人工育苗家系样品的采集

20个雌贝分成两组,按A1~A10,B1~B10编号,分别放入20个容积为50L的水槽中单个暂养,5个雄贝分别放入5个容积为50L水槽中单个暂养。

采用阴干法刺激雌贝产卵,雄贝排精,人工受精。使用300目的筛绢网过滤海水,并对过滤后海水进行消毒处理。培养等鞭金藻作为幼体饵料。按照常规方法进行室内人工育苗。收集亲贝,卵细胞,受精卵及其各期幼体(D形幼虫,中期壳顶幼虫,眼点幼虫),部分用电镜固定液固定,其余-80℃冻存。

1.2 实验方法

间接 ELISA 法检测 将亲贝卵巢,卵和发育各期幼虫研磨,取上清液并用碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释作为包被抗原并测量其蛋白浓度,使微孔板每孔的蛋白含量在4~6 μg。4℃静置过夜,1%牛血清白蛋白封闭3h。通过连续梯度稀释法确定最佳一抗和二抗的稀释浓度均为1:50 000,稀释液为PBS(pH 7.4)缓冲液。第一抗体,37℃孵育2h,第二抗体,37℃孵育1h,加OPD底物溶液暗处显色15min后,加入2 mol/L H₂SO₄终止反应,用酶标仪测定波长492 nm处的OD值。

设健康扇贝的闭壳肌组织上清液作阴性对照,毒种1:10稀释液作阳性对照。ELISA分析中第一抗体为兔抗AVNV血清(本实验室制备),第二抗体为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG(IgG-HRP)。结果判定:用酶标仪分别测定波长492 nm处样品(P)和阴性对照孔(N)的OD值,计算P/N比值,并选定P/N≥2.1为阳性,1.5≤P/N<2.1为可疑,P/N<1.5为阴性。

电镜超薄切片制备与观察 将亲贝卵巢,卵,受精卵,担轮幼虫和D形幼虫切成1 mm³左右的小块,以2.5%戊二醛溶液作预固定,再以1%锇酸作后固定。24 h后放入70%乙醇中保存,梯度乙醇脱水,Epon812包埋,超薄切片,用JEM-1200EX透射电子显微镜观察并拍照。

间接免疫荧光检测 用实验室制备的AVNV粗提液感染健康扇贝,感染2 d,取濒临死亡的扇贝卵巢,常规石蜡包埋法制备组织切片(厚度3 μm)。多克隆抗体为本实验室用纯化的AVNV病毒免疫兔子得到的抗血清。

上述常规石蜡包埋法制备的组织切片经脱蜡,复水,用PBST冲洗3次,每次5 min,再通过高压加热法对切片进行抗原热修复,然后用3%的过氧化氢-甲醇溶液处理30 min,PBST冲洗,1%的BSA封闭1 h,PBST冲洗,滴加多克隆抗体(用1%BSA-PBS 1:5 000稀释),37℃湿盒内孵育1 h。PBST冲洗后,滴加FITC-羊抗兔IgG(用0.01%伊文氏兰溶液1:2 000稀释),37℃湿盒内孵育45 min。PBS冲洗后用50%的缓冲甘油封片,荧光显微镜下观察拍照。同时,用BSA代替抗血清作为空白对照。

2 结果

2.1 室内人工育苗及样品采集

2006年9月29日至2006年10月18日,进行秋季人工育苗。2007年5月10日至2007年6月2日,进行春季人工育苗。从40个独立育苗水体中,共采集亲贝、卵各23个家系样品,受精卵、D形幼虫、壳顶幼虫各12个家系样品,眼点幼虫2个家系样品。

2.2 间接 ELISA 法检测

间接ELISA法检测栉孔扇贝亲贝的性腺及其子代,以确定亲贝性腺、卵细胞、受精卵和它的幼体是否存在病毒。同时,应用间接ELISA法对红岛人工育苗场采集的大量样品进行检测,以便从生产实践中验证该病毒是否存在垂直传播途径。结果发现,亲贝卵巢中可以检测出阳性结果,而卵,受精卵,D形幼虫,壳顶幼虫和眼点幼虫的P/N值均小于2.1,结果为可疑或阴性。

2.3 透射电镜观察

通过电镜观察亲贝性腺,卵,受精卵,担轮幼虫和D形幼虫,结果发现:栉孔扇贝卵巢生殖小管结缔组织细胞的间质中存在病毒粒子(图版I-1,2),而卵,受精卵,担轮幼虫和D形幼虫中均未发现病毒粒子(图版I-3~10)。

表 1 秋季人工育苗家系样品的 ELISA 检测结果

Tab. 1 Samples of artificial breeding in autumn detected by ELISA

	性腺 gonad	卵细胞 egg	受精卵 spermovium	D 形幼虫 D larvae	壳顶幼虫 shell young	眼点幼虫 eyebot larvae
A2	2.010	1.330	-	-	-	-
A5	2.050	1.150	-	-	-	-
A6	2.280	1.030	-	-	-	-
A7	2.350	1.380	1.750	1.040	1.350	1.730
A8	1.920	1.250	-	-	-	-
A9	1.960	1.170	-	-	-	-
A10	2.280	1.310	-	-	-	-
B1	1.710	1.440	-	-	-	-
B2	2.440	1.210	-	-	-	-
B3	2.680	1.790	-	-	-	-
B4	2.490	1.350	-	-	-	-
B6	2.010	1.240	1.430	1.310	1.820	1.580
B7	3.180	1.480	-	-	-	-

表 2 春季人工育苗家系样品的 ELISA 检测结果

Tab. 2 Samples of artificial breeding in spring detected by ELISA

	性腺 gonad	卵细胞 egg	受精卵 spermovium	D 形幼虫 D larvae	壳顶幼虫 shell young	眼点幼虫 eyebot larvae
A1	1.740	1.320	1.240	1.420	1.150	-
A3	2.040	1.470	1.430	1.320	1.270	-
A6	1.740	1.040	1.370	1.150	1.500	-
A8	2.590	1.470	1.420	1.380	1.450	-
A9	1.570	1.260	1.010	1.250	1.330	-
B1	1.940	1.210	1.540	1.370	1.200	-
B4	2.340	1.330	1.390	1.180	1.490	-
B5	1.940	1.280	1.360	1.440	1.460	-
B7	1.960	1.150	1.390	1.340	1.220	-
B9	1.770	1.260	1.370	1.310	1.260	-

2.4 间接免疫荧光法检测

通过间接免疫荧光技术对栉孔扇贝亲贝的卵巢进行定位检测,以确定 AVNV 病毒粒子能否感染亲贝性腺及感染的具体部位。结果发现阳性信号主要分布在卵巢的外膜中(图版 II-1)和生殖小管壁的连接组织基膜上(图版 II-3),而卵巢生殖上皮结构中并未发现阳性信号。

3 讨论

根据世界动物卫生组织《水生动物卫生法典》确定的定义,垂直传播为传染物通过卵内感染或通过单倍体生殖细胞表面、受精卵或幼虫的污染由亲代向后代的传播^[9]。即水生动物病原的垂直传播应该包括卵内传播和卵外(因污染)传播两个途径。目前针对对虾或贝类的病毒垂直传播途径的研究中,难以将这一概念明显区分,这主要是因为卵外传播途径的不可控性强,单纯通

过检测手段即使检测出病毒感染了卵或子一代,也很难说明该病毒是通过卵内传播或卵外传播感染的。因此,通过电镜和间接免疫荧光检测方法对病毒感染的具体组织位置进行定位,再结合定性检测的方法,可以比较好的解决这一问题。本文通过这一方法对 AVNV 病毒的卵内垂直传播途径进行了研究。

目前栉孔扇贝苗种主要来源于养殖海区半人工采苗的野生苗,仅凭栉孔扇贝繁殖季节对产卵场 AVNV 的调查检测,难以辨别亲贝、卵、幼体、稚贝的一一对应关系。因此,为了确定病原体来源的准确途径,本实验在室内人工育苗的过程中将亲贝各放在一独立育苗水体内产卵、孵化,并进行幼体培育而获取家系。这样每个独立的水体内收集的卵细胞,受精卵及其子代都能直接确定其亲本,一旦子代检测出病毒,即可和亲本的情况直接对应,从而清晰而准确地判定病原体的来

源。刘萍等^[10]为研究对虾暴发性流行病的传播途径,也采取了将10尾亲虾分别放入10个玻璃钢桶里进行家系培育的方法,然后进行病原感染并应用PCR技术对同一家系子一代进行了跟踪检测。本文通过电镜技术、间接ELISA检测和间接免疫荧光检测3种方法研究了AVNV卵内垂直传播途径,通过室内人工育苗获取家系并采取消毒处理等方法最大限度的屏蔽外来因素的干扰,以保证实验结果的准确性。

扇贝的卵巢是由外膜及其内的生殖小管构成,覆盖于肝胰腺表面。外膜由单层立方上皮及其内的环肌和结缔组织等组成;生殖小管壁由结缔组织基膜和生殖上皮构成。生殖上皮不断向腔内分裂生成滤泡细胞和卵原细胞,后者进一步分裂成各期卵母细胞,并形成生发带^[11]。

Chang等^[12]通过原位杂交在虾和蟹的生殖腺组织中观察到了WSSV阳性信号,因此认为存在垂直传播可能性,但阳性信号的发现是在生殖腺的结缔组织中,WSSV能否感染卵母细胞或通过病毒基因传递给生发细胞仍不清楚。Lo等^[13]应用电子显微镜和原位杂交的方法观察检测对虾的生殖腺,结果发现WSSV阳性细胞主要分布在精囊的肌肉组织和结缔组织中,精子并未被感染。在卵巢中,滤泡细胞,卵原和卵母细胞以及结缔组织中发现WSSV阳性细胞,但是没有发现被感染的成熟卵细胞,所以认为,WSSV不能从亲虾经卵传播给子一代。因此,确定病毒感染宿主生殖腺组织的具体部位对于其能否进行卵内垂直传播具有很重要的意义,只有感染宿主生殖腺实质细胞,才有可能通过生殖活动感染子一代,只感染宿主生殖腺间质细胞,并不一定存在卵内垂直传播的可能性。本文通过电镜观察在卵巢的电镜超薄切片中发现存在病毒粒子,而间接免疫荧光和间接ELISA也在亲贝生殖腺中检测到了阳性结果。说明AVNV能够感染栉孔扇贝的卵巢组织,因此病毒存在垂直传播的可能性。但病毒感染的具体位置,电镜观察显示,AVNV存在于生殖小管壁结缔组织的间质细胞中。间接免疫荧光结果同样显示,阳性信号主要分布在外膜和生殖小管壁的结缔组织基膜上,AVNV并未感染实质细胞。付崇罗等^[14]通过单抗间接免疫荧光法检测生殖腺也发现:雌雄生殖腺的外膜均可检测到AVNV阳性细胞。上述实验结果表明,AVNV主要分布在

外膜和内部生殖小管壁的结缔组织中,并未感染生殖上皮(实质细胞),从而解释了本实验AVNV不能通过卵内传播的途径感染卵细胞和各期幼虫的原因。因此,虽然AVNV能够感染栉孔扇贝的性腺组织,但不能通过卵内传播的途径感染子一代。

参考文献:

- [1] 王运涛,相建海. 栉孔扇贝大规模死亡的原因探讨[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(6):770-774.
- [2] 艾海新,王崇明,王秀华,等. 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):386-391.
- [3] 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, 2001, 25(12):23-26.
- [4] Bootland L M, Dobos M P, Roselynn M, et al. The IPNV carrier state and demonstration of vertical transmission in experimentally infected brook trout [J]. Dis Aquat Org, 1991, (10):13-21.
- [5] Emmerik M, Edwin Y, Huan L, et al. Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Aquaculture, 2003, (219):57-70.
- [6] 汝少国,姜明,李永祺,等. 中国对虾杆状病毒垂直传播途径的初步探讨[J]. 水产学报, 1998, 22(1):49-55.
- [7] 江世贵,何建国,吕玲,等. 白斑综合症病毒对斑节对虾亲虾的感染及垂直传播的初步研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39(Suppl.):164-171.
- [8] 闫冬春,魏福强. 水产养殖动物病毒传播途径的研究现状[J]. 水利渔业, 2006, 26(1):110-112.
- [9] 苏巴辛格 R P, 麦格拉德利 S E, 希尔 B J. 粮农组织渔业技术文集[C]. 罗马:粮农组织, 2004:73.
- [10] 刘萍,孔杰,石拓,等. 暴发性流行病病原对中国对虾亲虾人工感染及对子代影响的PCR检测[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(2):139-144.
- [11] 冷春玲,李春茂,迟庆宏. 贻贝雌性生殖系统的组织学研究[J]. 水产科学, 1999, 18(3):26-29.
- [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]. Aquaculture, 1998, 164:233-242.
- [13] Lo C F, Ho C H, Chen C H, et al. Detection of

tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSSV) in penaeid brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs[J]. Dis of Aquat Org, 1997,30:53-72.

[14] 付崇罗,宋微波,李 赞,等.栉孔扇贝感染急性病毒性坏死症病毒的组织病理学与免疫荧光检测[J].微生物学报,2004,44(6):741-744.

Study on AVNV vertical transmission sensu stricto in scallop *Chlamys farreri*

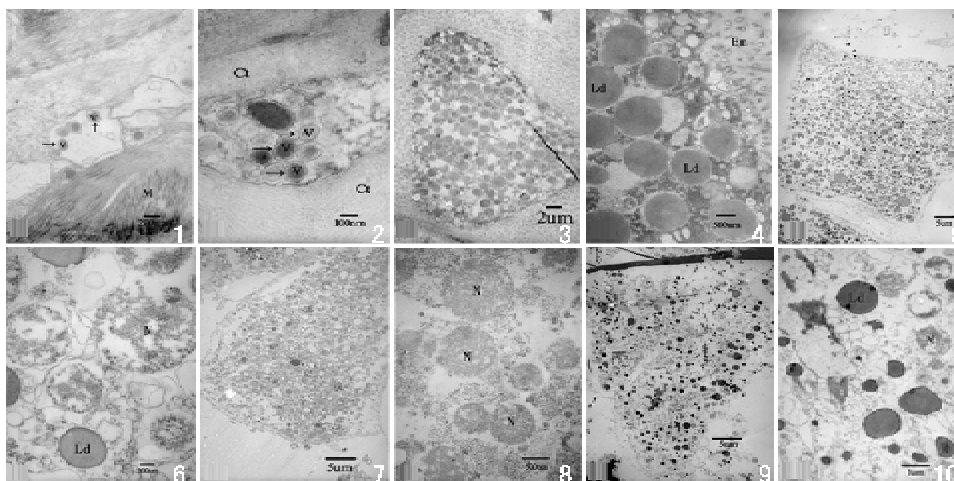
YU Zuo-an^{1,2}, WANG Chong-ming¹, LI Yun², REN Wei-cheng^{1,2}, CAI Yu-yong^{1,2}

(1. Yellow Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The virus named AVNV (acute viral necrotic virus) can cause the mass mortality in cultured scallops *Chlamys farreri*. So the research of AVNV vertical transmission is necessary. In the experiment, the study put the parental scallops into the separate breeding waters, then spawning, hatching, and cultivating larvae. According to the artificial spring and autumn seed of scallop indoors, from the forty separate breeding water bodies, 23 parental scallops, 23 eggs, 12 spermoviums, D larvae and shell young, 2 eyebot larvae were obtained. For the qualitative and localized detection, the methods of Indirect ELISA, IFA and Electron microscope were used to detect parental scallops, eggs and the larvae with different development phases. The result shows that the virus can be detected in the gonad of the parental scallops, but it can not be detected in the eggs, spermoviums, D larvae, shell young, and eyebot larvae. This indicates that AVNV can infect the gonad of scallop (*Chlamys farreri*), but there does not exist the route of vertical transmission sensu stricto. For further study, the research of horizonatal transmission is essential.

Key words: acute viral necrotic virus (AVNV); vertical transmission; indirect ELISA; IFA; technology of electron microscope

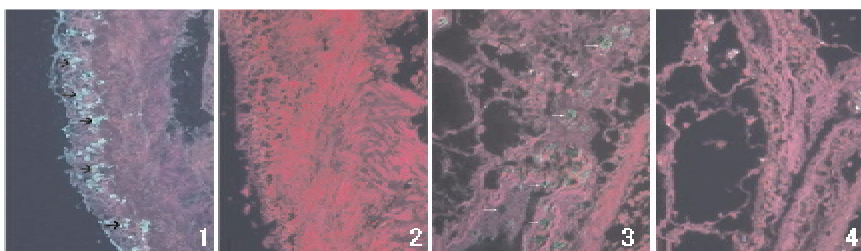


图版 I

1. 雌性卵巢内的病毒粒子;2. 雌性卵巢结缔组织细胞的间质中的病毒粒子;3. 卵细胞电镜超薄切片 ×2 000;4. 卵细胞电镜超薄切片 ×12 000;5. 受精卵电镜超薄切片 ×1 200;6. 受精卵电镜超薄切片 ×20 000;7. 担轮幼虫电镜切片 ×1 500;8. 担轮幼虫电镜切片 ×15 000;9. D 形幼虫电镜切片 ×1 500;10. D 形幼虫电镜切片 ×8 000
V 为病毒粒子,Ld 为脂滴,N 为细胞核,M 为肌肉组织,Ct 为结缔组织,Em 为细胞膜

Plate I

1. The virus detected in the ovary; 2. The virus detected in the connective tissue of the ovary; 3. The ultrastructure of the egg ×2 000; 4. The ultrastructure of the egg ×12 000; 5. The ultrastructure of the spermovium ×1 200; 6. The ultrastructure of the spermovium ×20 000; 7. The ultrastructure of the trochelmynth larva ×1 500; 8. The ultrastructure of the trochelmynth larva ×15 000; 9 The ultrastructure of the D larvae ×1 500; 10. The ultrastructure of the D larvae ×8 000;



图版 II

1. 卵巢生殖小管外膜阳性信号(箭头所指处); 2. 阴性对照; 3. 卵巢生殖小管壁(阳性); 4. 卵巢生殖小管壁(阴性)

Plate II

1. The positive cells distributed in subcutaneous of the ovary reproductive duct; 2. The negative control;
3. The wall of the ovary reproductive duct(positive) 4. The wall of the ovary reproductive duct(negative)