

## 扇贝养殖海区浮游生物携带 AVNV 的荧光定量分析

王娜<sup>1</sup>, 李赞<sup>1\*</sup>, 任伟成<sup>2</sup>, 蔡玉勇<sup>1,2</sup>, 王崇明<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 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:** 为了探明养殖海区浮游生物与 AVNV 流行传播的关系, 实验自 2009 年 5 月至 11 月, 分别从青岛沙子口和荣成桑沟湾两个扇贝养殖海区定期采取 50 和 300 cm 两个水层水样, 经 25、3 和 0.22  $\mu\text{m}$  3 个孔径的滤膜分级过滤收集 3 个粒径的浮游生物组分, 利用荧光定量 PCR 技术对浮游生物携带 AVNV 的情况进行了定量检测。结果表明两个海区浮游生物样品均检测到 AVNV, 检测的 AVNV 数量也均在 8 月份达到峰值, 沙子口海区每升海水中浮游生物携带  $4.11 \times 10^6$  拷贝的 AVNV, 桑沟湾海区浮游生物携带  $1.49 \times 10^5$  拷贝的 AVNV。两个海区 3 个粒径浮游生物组分携带 AVNV 的数量从高到低依次为 0.22 ~ 3  $\mu\text{m}$  组分、3 ~ 25  $\mu\text{m}$  组分和大于 25  $\mu\text{m}$  组分, 但两个水层(50 和 300 cm)浮游生物携带 AVNV 的数量则没有显著差异。结合养殖期间扇贝摄食浮游生物的特点, 研究认为, 扇贝在养殖期间可能会通过滤食携带病毒的浮游饵料而感染 AVNV, 海区浮游生物可能是导致 AVNV 流行的重要传播媒介。

**关键词:** 栉孔扇贝; 浮游生物; 急性病毒性坏死症; 荧光定量 PCR

**中图分类号:** S 946

**文献标识码:** A

栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 曾是我国北方沿海广泛养殖的重要经济贝类, 但自从 1997 年以来, 在养殖中后期发生的大规模死亡现象直接造成这一养殖业处于严重的停滞状态。流行病学、病原学、组织病理学、人工感染试验及免疫学研究证实, 一种球形病毒是引起养殖栉孔扇贝大规模死亡的直接病原, 现将这一病原引起的病症称为急性病毒性坏死症 (acute viral necrosis disease, AVNV)<sup>[1-8]</sup>。目前已经对该病原的流行病学<sup>[2]</sup>、病理组织学及细胞学特征<sup>[9]</sup>及侵染的靶器官<sup>[10]</sup>进行了研究, 并建立了包括荧光定量 PCR (FQ-PCR) 在内的多种病原检测技术<sup>[11-12]</sup>。为追踪该病原的流行传播过程奠定了技术基础。

扇贝是滤食性贝类, 只能摄取养殖海区一定大小的浮游生物。为了研究浮游生物携带 AVNV 的可能性, 本研究采用 FQ-PCR 检测技术, 对两个扇贝养殖海区多个月份浮游生物携带 AVNV 的

情况进行了定量检测, 目的在于探明浮游生物携带 AVNV 的情况及其季节性变化, 为认识 AVNV 的流行传播特点, 制定预防控制措施提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

2009 年 5 至 11 月定期在青岛沙子口和荣成桑沟湾扇贝养殖海区采集表层 50 cm 和下层 300 cm 深的海水 5 L, 在实验室立即用孔径为 25、3 和 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜进行逐级过滤, 从每升海水中收集的 3 个粒径大小 (0.22 ~ 3、3 ~ 25  $\mu\text{m}$  和大于 25  $\mu\text{m}$ ) 的浮游生物样品连同滤膜一起剪碎盛装在 5 mL 离心管中用于提取 DNA。一次采样每粒径浮游生物样品收集 5 管。

#### 1.2 浮游生物总 DNA 的提取

浮游生物样品的 DNA 提取参照张桂和等<sup>[13]</sup>

收稿日期: 2010-01-04 修回日期: 2010-07-27

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2006AA100307); 农业部公益项目“贝类养殖病害监测与防治技术研究”和现代农业产业技术体系建设专项资助 (nycytx-47)

通讯作者: 李赞, Tel: 0532-82032649, E-mail: sxsdwlw@ouc.edu.cn

和杨君等<sup>[14]</sup>的方法。具体操作:首先在 1 L 海水滤集的各粒径浮游生物样品中加入 65 °C 预热的提取缓冲液 [3% CTAB, 1% PVP, 1.4 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mol/L EDTA, 0.2%  $\beta$ -巯基乙醇] 500  $\mu$ L, 65 °C 水浴 1 h, 加入蛋白酶 *K* (终浓度为 0.2 mg/mL), 55 °C 温浴 30 min。随后加入 1/3 体积 5 mol/L 的 KAc (pH 8.0) 混匀, 放置 20 min, 加入等体积酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 混合液轻缓震荡 10 min, 经 10 000 r/min 离心 10 min。上清液移至新管, 加入 2/3 体积异丙醇, 4 °C 冰箱过夜, 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清沉淀即为提取的 DNA。提取的 DNA 经 70% 的乙醇洗涤 3 次, 风干后溶于 TE 缓冲液 (10 mmol Tris-HCl, 1 mmol EDTA) 中, 提取 DNA 的质量和浓度用核酸蛋白仪进行定量分析, 然后 -80 °C 保存备用。

### 1.3 FQ-PCR 检测

检测 AVNV 的 FQ-PCR 方法参照任伟成等<sup>[12]</sup>所用方法。用于 FQ-PCR 检测的引物包括, 扩增引物上游序列 c-f: 5'-AGC CTT TTA CAG AAT TTT GCA CCT T-3', 下游序列 c-r: 5'-TGT CGC ATG TTA ACC TCG TCT G-3', 扩增片段大小为 90 bp。Taq Man 探针序列为, 5'-FAM-AGC CAT CAC ATC AGC CAG CAA CGA CT-TAMRA-3'。引物和 Taq Man 探针均委托大连 TaKaRa 生物工程有限公司合成。

FQ-PCR 反应在 Rotor-Gene3000 扩增仪 (澳洲 Corbett Research 公司) 上进行。反应体系包括, 12.5  $\mu$ L 反应混合液, 10  $\mu$ mol/L 的引物 c-f 和 c-r 各 0.5  $\mu$ L, 3  $\mu$ mol/L 的探针 1  $\mu$ L, 样品 DNA 1  $\mu$ L, 加灭菌双蒸水至 25  $\mu$ L。扩增条件为 95 °C, 4 min; 95 °C, 10 s 变性, 60 °C, 30 s 退火延伸, 共 45 个循环。以质粒标准品的 DNA 拷贝数为  $10^8$ 、 $10^6$ 、 $10^4$ 、 $10^2$  制作标准曲线, 根据检测样品每  $\mu$ L DNA 含有的 AVNV 的拷贝数换算为每升海水中浮游生物携带病毒的拷贝数。以 3 次平行检测的平均值用于结果分析。实验数据采用 SPSS 统计分析软件进行单样本 *t* 检验, 分析不同时间采集样品携带的病毒量与相应平均值之间的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 滤集浮游生物总 DNA 的提取

提取 DNA 的 260/280 比值在 1.6 ~ 2.5, 260/230

比值在 1.7 ~ 2.0。图 1 和图 2 为青岛沙子口和桑沟湾海区各个月份每升海水不同粒径浮游生物的 DNA 总量。从图中可以看到, 沙子口海区上下层每升海水浮游生物总 DNA 含量在 8 月最高, 平均为 22.45  $\mu$ g, 桑沟湾海区比沙子口海区低, 在 7 月份最高, 为 17.44  $\mu$ g。两个海区总 DNA 含量最低值均出现在 11 月份, 分别为 3.63  $\mu$ g 和 4.36  $\mu$ g。

沙子口海区 25  $\mu$ m 以上粒径组分的 DNA 量均比较低, 9 月份最高仅为 2.37  $\mu$ g, 3 ~ 25  $\mu$ m 粒径组分 DNA 量次之, 8 月最高, 为 4.53  $\mu$ g, 0.22 ~ 3  $\mu$ m 粒径组分的 DNA 量各月份均比较高, 峰值也出现在 8 月份, 达 15.70  $\mu$ g, 这比 25  $\mu$ m 以上粒径组分 DNA 量的最高值还高 6 倍以上。桑沟湾海区样品测定的结果与此类似, 同样表现出 25  $\mu$ m 以上粒径组分的 DNA 量最低, 3 ~ 25 粒径组分 DNA 量次之, 0.22 ~ 3  $\mu$ m 粒径组分的 DNA 量最高。

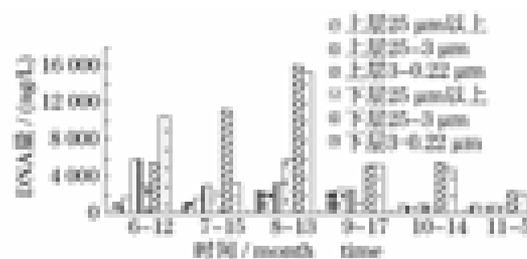


图 1 沙子口扇贝养殖区各个月份不同粒径浮游生物 DNA 量

Fig. 1 DNA content of different size plankton from 6 months Shazikou sea area for culturing scallop



图 2 桑沟湾扇贝养殖区各个月份不同粒径浮游生物 DNA 量

Fig. 2 DNA content of different size plankton from 6 months Sanggouwan sea area for culturing scallop

### 2.2 两个养殖海区水样中浮游生物携带 AVNV 的数量特征

FQ-PCR 检测结果显示 (图 3 和图 4), 从 2 个

栉孔扇贝养殖海区收集的浮游生物样品中均检测到 AVNV。沙子口海区,5、6、7 月份每升海水中浮游生物携带病毒的数量一直在  $10^3$  拷贝左右,而到了 8 月份,病毒数量急剧升高,达峰值  $4.11 \times 10^6$  拷贝,与均值相比达极显著水平 ( $t \leq 0.01$ ),9 月则开始下降,但仍与均值相比达显著水平 ( $t \leq 0.05$ ),而 10 月已降至  $3.41 \times 10^3$  拷贝,与均值相似,11 月则未检测到病毒。桑沟湾海区检测到的各月份 AVNV 的数量变动趋势也与此类似,但该海区浮游生物样品中检测到的 AVNV 数量最高仅为  $1.49 \times 10^5$  拷贝,比沙子口海区检测到的病毒数量少 1 个数量级。

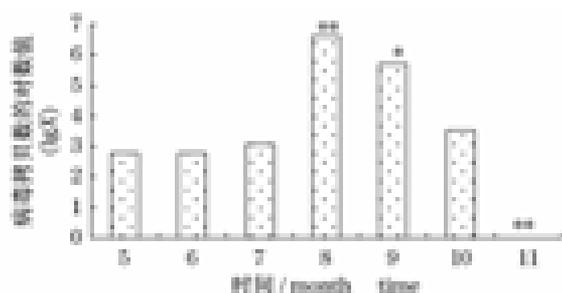


图3 沙子口养殖海区各月份浮游生物携带病毒的数量变化

Fig. 3 Variety of virus copy number carried by plankton in different months at Shazikou sea area for culturing scallop

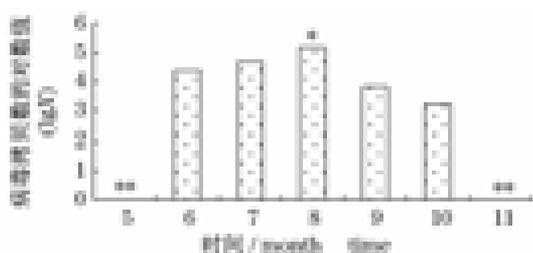


图4 桑沟湾养殖海区各月份浮游生物携带病毒的数量变化

Fig. 4 Variety of virus copy number carried by plankton in different months at Sanggouwan sea area for culturing scallop

### 2.3 浮游生物的粒径与其携带病毒数量的关系

分析两个海区不同粒径浮游生物携带 AVNV 的情况可以看到,两海区 3~25  $\mu\text{m}$  粒径组分均在 6、7、8 和 9 月份携带病毒,0.22~3  $\mu\text{m}$  粒径组分在 8、9、10 月份携带病毒,25  $\mu\text{m}$  以上粒径组分在 7、8、9、10 月份携带病毒(图 5 和图 6)。尽管沙子口海区 5 月份 25  $\mu\text{m}$  以上粒径组分检测

到病毒,桑沟湾海区在 6、7 月份的 0.22~3  $\mu\text{m}$  粒径组分检测到病毒,但两个海区 AVNV 在 3 个粒径浮游生物上的分布情况还是基本一致。

结合浮游生物携带 AVNV 的数量进行分析,可以看到,桑沟湾海区,大于 25  $\mu\text{m}$  粒径的浮游生物,病毒数量最高为  $9.7 \times 10^2$  拷贝。0.22~3  $\mu\text{m}$  粒径浮游生物,病毒数量最高为  $1.14 \times 10^5$  拷贝。3~25  $\mu\text{m}$  粒径浮游生物组分携带 AVNV 的最高拷贝数则在前述两个粒径组分之间。沙子口海区 3 个粒径组分携带的 AVNV 数量尽管比桑沟湾海区相应的浮游生物组分高,但趋势基本相似。结果显示 3 个粒径浮游生物携带的病毒数量从高到低依次为 0.22~3  $\mu\text{m}$  粒径组分、3~25  $\mu\text{m}$  粒径组分和大于 25  $\mu\text{m}$  粒径组分。

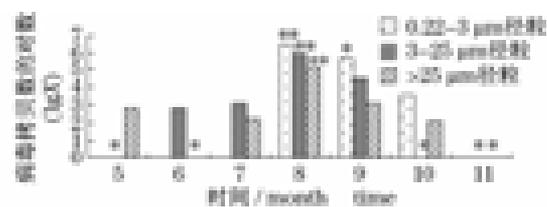


图5 沙子口养殖海区不同粒径浮游生物携带病毒情况

Fig. 5 Virus copy number carried by different size of plankton at Shazikou sea area for culturing scallop

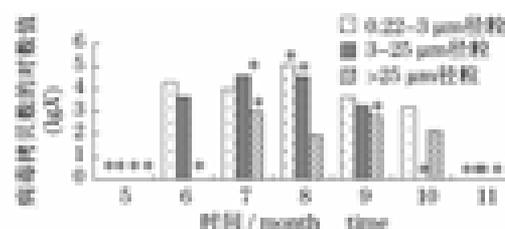


图6 桑沟湾养殖海区不同粒径浮游生物携带病毒情况

Fig. 6 Virus copy number carried by different size of plankton at Sanggouwan sea area for culturing scallop

### 2.4 两个采样深度浮游生物携带 AVNV 的数量特征

表层 50 cm 和下层 300 cm 深水层浮游生物携带 AVNV 的检测结果表明(图 7 和图 8),虽然在沙子口海区 6、7 月份表层浮游生物检测到不足  $10^3$  拷贝的病毒,桑沟湾海区 6 月份也在 300 cm 深水层的浮游生物样品中检测到大于  $10^4$  拷贝的

病毒,但是在桑沟湾海区 4 个月份(7、8、9、10 月)、沙子口海区 3 个月份(8、9、10 月)两个水层浮游生物携带的病毒数量均没有显著差异。结果说明表层 50 cm 和下层 300 cm 深水层浮游生物携带 AVNV 的数量没有显著差异。

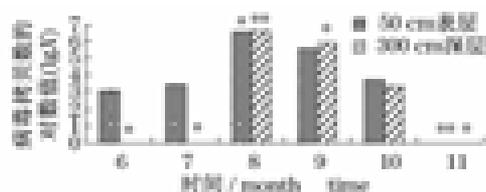


图 7 沙子口海区两个水层浮游生物携带的病毒数量比较

Fig. 7 Virus copy number carried by plankton at 50 cm and 300 cm depth of Shazikou sea area for culturing scallop

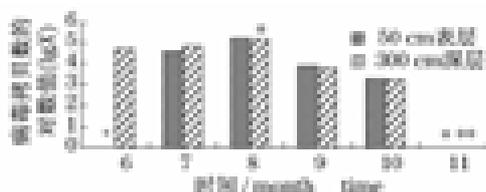


图 8 桑沟湾海区两个水层浮游生物的病毒数量比较

Fig. 8 Virus copy number carried by plankton at 50 cm and 300 cm depth of Sanggouwan for culturing scallop

### 3 讨论

流行病学调查表明,栉孔扇贝的大规模死亡集中发生在海区养殖期的 7、8 月份,此时的死亡率占到总死亡率的 90% 以上<sup>[1]</sup>。组织病理学及病原学研究表明,濒死扇贝外套膜、肾、消化盲囊等功能器官分布有大量的病毒<sup>[9]</sup>。人工感染试验证实,该病毒是造成扇贝发病死亡的直接病原<sup>[5-6]</sup>。通过电镜负染技术<sup>[10]</sup>及多抗免疫技术<sup>[4]</sup>进行病原的检测结果表明,养殖扇贝各组织在 5 月份即已侵染病毒粒子,病毒感染强度在 8 月份达到最大值。本研究从 2 个海区 1 L 海水中分级过滤的 3 个粒径浮游生物 DNA 含量的测定结果显示,8 月份也是养殖海区浮游生物丰度最高的时期,FQ-PCR 检测 AVNV 被浮游生物携带情况,结果首次证实,养殖海区的浮游生物可以携带 AVNV,2 个海区浮游生物携带 AVNV 数量的

峰值也出现在 8 月份,与扇贝大规模死亡发生的时期完全重合。

病毒的传播需要借助合适的途径。在浮游生物携带病毒方面,有研究表明几种浮游微藻可以携带并传播 WSSV<sup>[15-17]</sup>,并证实了卤虫在 WSSV 传播过程中的作用<sup>[18]</sup>。Tsuneo 等<sup>[19]</sup>认为,微藻细胞表面的化学成分对 WSSV 是否附着至关重要。扇贝是滤食性贝类,在养殖期间移动有限,通过滤食大小合适的浮游生物作为饵料,对饵料的性质没有明显的选择性。王如才等<sup>[20]</sup>研究表明,栉孔扇贝的食料以硅藻为主,易摄食的主要微藻有舟型藻、圆筛藻、骨条藻、曲舟藻和金藻,兼食一些绿藻、桡足类、无脊椎动物卵和幼虫及有机碎屑。本研究在 2 个海区扇贝养殖笼上层和下层 2 个水层滤集的 3 个粒径浮游生物中均检测到 AVNV,表明扇贝通过滤食携带 AVNV 的饵料生物可以感染 AVNV。

比较 2 个海区不同粒径组分携带 AVNV 的结果,本研究发现 2 个海区浮游生物携带 AVNV 的数量存在一定的差异,而且不同粒径浮游生物携带 AVNV 的数量也有所不同。仅以 2 个海区不同月份 AVNV 数量的检测结果进行初步分析,发现在海区温度较高的 6、7 和 8 月份,浮游生物及其携带病毒的数量均比较高,说明温度可能是影响 AVNV 数量变动的一个重要因素,这似乎与感病扇贝在此温度下大规模死亡存在一定的相似性<sup>[2,6]</sup>,表明较高的海水温度是 AVNV 数量增长的必要条件。

比较不同粒径浮游生物携带 AVNV 的数量发现,浮游生物携带 AVNV 的最高丰度均出现在 0.22 ~ 3  $\mu\text{m}$  和 3 ~ 25  $\mu\text{m}$  的粒径组分,说明这 2 个组分的浮游生物组分是携带 AVNV 的主要成分。沙子口海区检测的结果还显示,大于 25  $\mu\text{m}$  的浮游生物在检测的月份普遍携带低丰度的病毒,3 ~ 25  $\mu\text{m}$  组分在 7 月份检测到携带较高丰度的 AVNV,而 10 月份只有 0.22 ~ 3  $\mu\text{m}$  组分携带 AVNV,桑沟湾海区也存在类似变化,如 10 月份仅在 0.22 ~ 3  $\mu\text{m}$  和大于 25  $\mu\text{m}$  组分检测到病毒。这表明携带病毒的浮游生物可能在不同粒径间存在转换。有关不同月份携带 AVNV 浮游生物的确切种类以及这些携带病毒的浮游生物的动态变化还有待进一步研究。

本研究的结果同时还显示,沙子口海区浮游

生物的数量及检测到的病毒数量均比桑沟湾海区高,这可能与2个海区养殖模式有关,桑沟湾海区一直将贝藻混养模式作为改善养殖海区生态环境的主要措施,而沙子口海区则仍然采用单一的贝类养殖模式,因此,2个海区的生态环境可能存在差异。目前,建立有效的 AVNV 预防控制措施一直是提高养殖栉孔扇贝经济效益的重要内容,本研究的结果显示,改善养殖生态环境可能是一条有效的途径。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] 王秀华,王崇明,李筠,等. 胶州湾栉孔扇贝大规模死亡的流行病学调查[J]. 水产学报,2002,26(2): 149-152.
- [3] 李贇,贺桂珍,王秀华,等. 急性病毒性坏死症病毒感染 ELISA 检测[J]. 高技术通讯,2003,13(7): 90-92.
- [4] 王秀华,贺桂珍,李贇,等. 栉孔扇贝的急性病毒性坏死症(AVND)病毒多克隆抗体的制备及 ELISA 分析[J]. 高技术通讯,2003,13(9):84-88.
- [5] 艾海新,王崇明,王秀华. 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.
- [6] 贺桂珍,李贇,宋微波,等. 栉孔扇贝病原感染与病害发生关系探讨[J]. 水产学报,2003,27(3): 273-277.
- [7] 王崇明,王秀华,宋晓玲,等. 栉孔扇贝一种球形病毒的分离纯化及其超微结构观察[J]. 水产学报, 2004,26(2):180-184.
- [8] 王崇明,王秀华,艾海新,等. 栉孔扇贝大规模死亡致病病原的研究[J]. 水产学报,2004,28(5): 547-553.
- [9] 付崇罗,宋微波,李贇,等. 栉孔扇贝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.
- [10] 贺桂珍,王秀华,李贇,等. 急性病毒性坏死症病毒在栉孔扇贝不同器官的感染状况[J]. 高技术通讯,2003,13(7):93-96.
- [11] Ren W C, Wang C M, Cai Y Y. Loop-mediated isothermal amplification(LAMP) for rapid detection of acute viral necrobiotic virus in scallop *Chlamys farrei*[J]. Acta Virologica,2009,53(3):165-171.
- [12] 任伟成,王崇明,孙世春,等. 栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立和应用[J]. 中国水产科学,2009,16(4):564-571.
- [13] 张桂和,徐碧玉,王珺. 几种海洋微藻基因组 DNA 的分离提取及 PCR 检测[J]. 热带海洋学报,2007, 26(1):68-72.
- [14] 杨君,王茜,刘美华,等. 一种简便的海藻 DNA 提取方法[J]. 生物技术,1999,9(4):39-42.
- [15] 张家松,董双林,田相利,等. 浮游微藻携带和传播 WSSV 的研究[J]. 海洋环境科学. 2007,26(3): 221-224.
- [16] Liu B, Yu Z M, Song X S, et al. Studies on the transmission of WSSV(white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae[J]. Invertebrate Pathology, 2007, 95: 87-92.
- [17] 张婧宇,李贇,任伟成,等. 主要浮游微藻携带急性病毒性坏死症病毒(AVNV)的研究[J]. 水产学报,2010,34(8):1254-1259.
- [18] Zhang J S, Dong S L, Dong Y W, et al. Assessment of the role of brine shrimp *Artemia* in white spot syndrome virus(WSSV) transmission[J]. Veterinary Research Communications,2009.
- [19] Honjo T. Overview on bloom dynamics and physiological ecology of heterosigma akashiwo[M] //Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier Science Publishers, Amsterdam,1993:33-41.
- [20] 王如才,兰锡禄,刘丽辉,等. 栉孔扇贝的食料分析[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版),1989,S2: 43-55.

## Detection of acute viral necrosis virus (AVNV) in plankton using FQ-PCR during a molecular epidemiology survey

WANG Na<sup>1</sup>, LI Yun<sup>1\*</sup>, CAI Yu-yong<sup>1,2</sup>, REN Wei-cheng<sup>2</sup>, WANG Chong-ming<sup>2</sup>

(1. Key Lab of Mariculture of the Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

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

**Abstract:** AVNV (acute viral necrosis virus) is the pathogen leading to mass mortality of cultured *Chlamys farreri*, but the transmission of the virus is unknown. In order to clarify the relationship between the plankton and transmission of AVNV, and to afford proof for tracing transmission track, the sea water samples were fetched from 50 cm and 300 cm depths in the sea area for culturing *Chlamys farreri* at Shazikou of Qingdao and Sanggouwan of Rongcheng regularly from May to November in 2009, and the plankton was collected by 25  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ , 0.22  $\mu\text{m}$  pore size filter, respectively. The AVNV carried by the plankton was identified by FQ-PCR. The results showed that the virus could be carried by the plankton, and the virus number in the plankton from both sea areas arrived at the peak in August. The highest number of AVNV identified for the samples from Shazikou sea area was  $8.21 \times 10^6$  copies per litre sea water, and that was  $2.98 \times 10^5$  copies for the samples from Sanggouwan sea area. Based on the number of AVNV carried, the plankton group with different particle sizes was 3–0.22  $\mu\text{m}$ , 25–3  $\mu\text{m}$  and  $>25 \mu\text{m}$  from high to low in turn. The number of AVNV carried by the plankton from 50 cm and 300 cm depths was not different significantly. This is the first report about AVNV carried by the plankton from the sea area for cultured scallop. These results implied that the scallop could be infected by taking the plankton that carried AVNV as food, and the plankton was crucial carrier of AVNV.

**Key words:** *Chlamys farreri*; acute viral necrosis virus (AVNV); FQ-PCR; plankton

**Corresponding author:** LI Yun. E-mail: sxsdlwl@ouc.edu.cn