

文章编号: 1000-0615(2016)03-0318-08

DOI: 10.11964/jfc.20150309752

## 养殖克氏原螯虾体内白斑综合征病毒的绝对定量分析

兰江风<sup>1,2</sup>, 代云佳<sup>1</sup>, 林 鑫<sup>1,2\*</sup>

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070;

2. 农业部淡水生物繁育重点实验室, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 近年来克氏原螯虾的养殖受到WSSV的威胁, 病毒在宿主组织中的绝对定量对于了解病毒的致病性具有重要意义, 但克氏原螯虾组织中WSSV的绝对定量分布还有待研究。实验调查了湖北省5个主养区克氏原螯虾WSSV的感染率, 结果表明80%以上克氏原螯虾都携带有WSSV。采用WSSV-VP28蛋白特异性抗体对克氏原螯虾提取蛋白进行Western Blot检测, 在WSSV-PCR阳性样品中可检测到VP28特异性条带, 在WSSV-PCR阴性样品中没有检测到相应条带。采用实验室建立的WSSV绝对定量PCR方法, 对携带病毒的克氏原螯虾6个组织(鳃、胃、肠、血淋巴细胞、肝胰腺和心脏)进行检测。结果表明, 在鳃、胃和肠可检测到较多病毒量(约 $10^8$ 拷贝/mg), 其次是血淋巴细胞( $10^7$ 拷贝/mg)、肝胰腺( $10^6$ 拷贝/mg), 在心脏中病毒的含量最低( $10^3$ 拷贝/mg), 表明病毒的复制存在组织特异性。结果显示WSSV主要存在于消化系统中, 预示着克氏原螯虾可能主要在摄食过程中感染WSSV; 不同地区克氏原螯虾组织病毒携带量表现出一定差异, 预示着WSSV感染可能受到环境因素的影响。

**关键词:** 克氏原螯虾; 白斑综合征病毒; 感染率; 组织分布

**中图分类号:** Q 786; S 917

**文献标志码:** A

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)俗称小龙虾, 属于节肢动物门、甲壳纲、十足目、螯虾科、原螯虾属。由于其味道鲜美, 深受国内外消费者喜爱, 已成为世界性经济虾类。克氏原螯虾原产于墨西哥北部和美国南部, 1918年首次被引进到日本, 随后约在20世纪30年代末期由日本引入我国养殖。由于克氏原螯虾有很强的适应力和繁殖力, 已在我国部分湿地形成自然种群, 为我国重要淡水虾类。长期以来, 我国克氏原螯虾产业主要靠捕捞。近年来, 由于天然资源量的不断下降, 同时国内外市场对克氏原螯虾需求增加, 各地掀起养殖克氏原螯虾热潮。2012年我国克氏原螯虾产量超过55万t, 产值100多亿元。但由于养殖密度不断提高、养殖水体污染日益严重及品种种质退化等原因, 克

氏原螯虾养殖也出现了疾病流行。比如, 2014年湖北潜江市发病水面有十多万亩, 给广大农户造成了巨大的经济损失。关于湖北克氏原螯虾患病的病原, 目前还没有统一结论。陈昌福等<sup>[1]</sup>研究认为, 病原可能是细菌和病毒的混合物, 之后鉴定了副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)为病原<sup>[2]</sup>。此外, 养殖的克氏原螯虾中检测到大量的白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)<sup>[3-4]</sup>。病毒在宿主组织中的绝对定量对于了解病毒的致病性具有重要意义。很多研究者建立了各种检测WSSV方法<sup>[5-12]</sup>, 并在一些虾类的组织中做了定量研究<sup>[10, 13-14]</sup>。但是, 养殖克氏原螯虾组织中WSSV的绝对定量分布还没有报道。鉴于此, 本研究对湖北主养区的克氏原螯虾进行WSSV感染率调查, 建立绝对定量方法研

收稿日期: 2015-03-07 修回日期: 2016-01-06

资助项目: 国家自然科学基金(31372563, 31572657, 34115185); 中央高校基本科研业务费专项(2013PY069, 2014PY035, 2662015QC019); 湖北省科技支撑计划(2015BBA228); 农业部渔用药物创制重点实验室开放课题(201401)

通信作者: 林鑫, E-mail: linli@mail.hzau.edu.cn

究该病毒在虾体内的分布情况,并对其防治和流行病学进行探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 克氏原螯虾的来源及其组织DNA的提取

实验用克氏原螯虾源自湖北克氏原螯虾养殖区(武汉、潜江、荆门、仙桃和黄冈)5地的养殖户。每个地区采样3次,每养殖区采样100余尾,采集的克氏原螯虾外表无明显病变。之后对其组织DNA进行提取:在冰上分别采取虾血淋巴细胞、心脏、肝胰腺、鳃、胃和肠约100 mg,置于含有1.2 mL消化液(100 mM NaCl, 10 mM Tris-HC pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0, 5 g/L N-laurylsarcosine, 500  $\mu$ g/L蛋白酶K)的离心管中。在离心管中将组织充分匀浆,在65  $^{\circ}$ C孵育1 h。随后加入CTAB/NaCl混合液(1% CTAB 0.73 mol/L NaCl),继续在65  $^{\circ}$ C孵育10 min,用酚、氯仿和异戊醇的混合液(体积比25:24:1)抽提DNA;无水乙醇沉淀DNA,70%乙醇洗涤、干燥后,DNA溶于Tris缓冲液中(10 mM Tris-Cl,pH 8.0),-20  $^{\circ}$ C贮存备用。

### 1.2 WSSV的检测和绝对定量

实时定量PCR(qPCR)实验方法参考文献[15]:用Tris缓冲液将提取的组织DNA进行稀释,将DNA浓度调成一致。检测目的基因为WSSV-*vp28* (RT-VP28-F/R),使用18S rDNA作为内参(18S RT-F/R,表1)。反应混合物20  $\mu$ L,包含有2  $\mu$ L DNA,10  $\mu$ L 2 $\times$ SYBRGreen Master Mix (Roche),50 nM上游和下游引物各4  $\mu$ L。实验在LightCycle480 System (Roche)上进行。qPCR条件:95  $^{\circ}$ C 10 min,40个循环,94  $^{\circ}$ C、10 s,60  $^{\circ}$ C,1 min。随后在72  $^{\circ}$ C、10 min,65~95  $^{\circ}$ C每隔0.5  $^{\circ}$ C读取溶解曲线。扩增产物特异性采用溶解曲线进行分析。将*vp28*检测数值和18S rDNA比

较,可以比较各组织WSSV的相对含量。病毒在各拷贝组织中的绝对定量采用重组WSSV-*vp28*基因质粒作为计算标准。具体方法:将含有*vp28*基因的质粒pGEX-5x-1-*vp28*在大肠杆菌DH-5 $\alpha$ 中扩增,随后提纯,测定其浓度,根据其浓度和分子量,计算质粒的拷贝数。对已知含量的质粒,进行10倍系列稀释,用做模板。用上述检测WSSV-*vp28*相同的引物和方法,对不同稀释浓度的质粒进行实时定量PCR扩增,制作*vp28*拷贝数倒数的对数值和循环次数的标准曲线。将检测虾组织病毒*vp28*基因作定量PCR,其循环次数和标准曲线对比,便可计算出虾组织中的病毒拷贝数。实验重复3次。

### 1.3 病毒的Western Blot检测

Western Blot的实验步骤参照文献[16]。随机选5个地区已经感染WSSV病毒的克氏原螯虾,采用组织蛋白抽提试剂盒(北京康为),按照使用说明提取其鳃组织总蛋白。随后,按照标准Western Blot检测方法,将样品在10% SDS-PAGE胶上分离,用本实验室制备的兔抗WSSV-VP28血清进行检测。 $\beta$ -Actin做为内参标定总蛋白的使用量。实验重复3次。

## 2 结果

### 2.1 克氏原螯虾WSSV的感染率

对武汉、潜江、荆门、仙桃和黄冈5个地区来源的克氏原螯虾的染毒率进行检测,每次每市至少检测100尾,共检测3次。结果表明潜江克氏原螯虾感染率最高,为91.6%;其次为黄冈克氏原螯虾(89.5%)和仙桃克氏原螯虾(87.3%);荆门克氏原螯虾的感染率为86.6%;武汉克氏原螯虾的感染率最低(83.3%,图1)。可见目前这些养殖区的克氏原螯虾普遍携带有WSSV病毒。

表1 引物列表

Tab. 1 List of primers

引物名称 primer names	引物序列(5'-3') primer sequences(5'-3')
RT-VP28-F	CTC CGC AAT GGA AAG TCT GA
RT-VP28-R	GGG TGA AGG AGG AGG TGT T
18S RT-F	TCT TCT TAG AGG GAT TAG CGG
18S RT- R	AAG GGG ATT GAA CGG GTT A

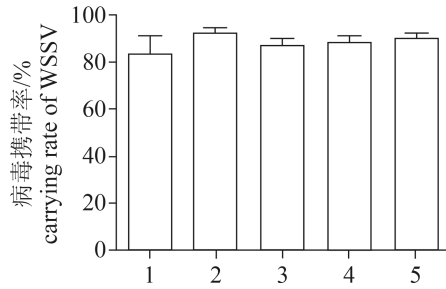


图1 湖北不同地域克氏原螯虾染毒率的检测

1. 武汉; 2. 潜江; 3. 荆门; 4. 仙桃; 5. 黄冈

Fig. 1 WSSV infection rate in *P. clarkii* from different areas of Hubei province

1. Wuhan; 2. Qianjiang; 3. Jingmen; 4. Xiantao; 5. Huanggang

## 2.2 克氏原螯虾感染病毒种类的进一步确定

根据上述PCR检测结果, 随机选取每地1尾携带病毒的克氏原螯虾, 进一步进行Western Blot检测。结果显示, PCR阴性样品中没有检测到WSSV-VP28特异性条带, 5尾PCR阳性克氏原螯虾体内均能检测到VP28特异性条带, 各个样品VP28条带强弱有差别(图2)。

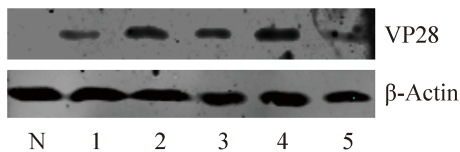


图2 Western Blot检测克氏原螯虾鳃内WSSV

提取克氏原螯虾鳃组织总蛋白后, 采用Western Blot进行检测, 一抗为WSSV囊膜蛋白VP28的特异性抗兔血清,  $\beta$ -Actin作为内参蛋白。N.PCR检测为WSSV阴性的样品。其他5组分别是各地区PCR检测WSSV阳性的样品(1. 武汉; 2. 潜江; 3. 荆门; 4. 仙桃; 5. 黄冈)

Fig. 2 Western Blot detection of WSSV in the gill of *P. clarkii*

Total proteins were extracted from the gill of *P. clarkii* and were subjected to Western Blot assay. Primary antibody was anti-WSSV-VP28 rabbit specific serum.  $\beta$ -Actin was used as internal control. N showed negative sample by PCR, 1-5 showed positive samples by PCR (1. Wuhan; 2. Qianjiang; 3. Jingmen; 4. Xiantao; 5. Huanggang)

## 2.3 不同主养区克氏原螯虾鳃中WSSV的绝对定量

鳃是检测WSSV的常用组织。提取鳃组织DNA, 比较5个不同主养区克氏原螯虾携带WSSV的含量。每一主养区随机选取8尾携带病毒的克氏原螯虾。结果表明各地克氏原螯虾鳃中携带WSSV量均在 $10^4$ 拷贝/mg以上。武汉克氏

原螯虾所有样品含病毒量均在 $10^5$ 拷贝/mg以上, 其中最高病毒含量达到 $10^{10}$ 拷贝/mg(1尾); 潜江克氏原螯虾所有样品含病毒量均在 $10^4$ 拷贝/mg以上, 其中最高病毒含量达到 $10^9$ 拷贝/mg(1尾); 荆门克氏原螯虾所有样品含病毒量均在 $10^6$ 拷贝/mg以上, 其中最高病毒含量达到 $10^8$ 拷贝/mg(2尾); 仙桃克氏原螯虾所有样品含病毒量均在 $10^5$ 拷贝/mg以上, 其中最高病毒含量达到 $10^9$ 拷贝/mg(2尾); 黄冈克氏原螯虾所有样品含病毒量均在 $10^5$ 拷贝/mg以上, 其中最高病毒含量达到 $10^8$ 拷贝/mg(3尾, 图3)。

## 2.4 虾不同组织中WSSV绝对定量

根据上述鳃中WSSV的定量结果, 分别从武汉、荆州、潜江、仙桃和黄冈5地各选取3尾携带WSSV量基本一致(鳃中约 $10^8$ 拷贝/mg)的克氏原螯虾, 分别提取其血淋巴细胞、心脏、肝胰腺、鳃、胃和肠的总DNA。随后检测每种组织的WSSV绝对含量。结果表明, 所有地区克氏原螯虾鳃、胃和肠中WSSV的含量较高, 约 $10^8$ 拷贝/mg, 其次为血淋巴细胞(荆门 $10^8$ 拷贝/mg, 武汉 $10^7$ 拷贝/mg, 潜江和黄冈 $10^6$ 拷贝/mg, 仙桃 $10^3$ 拷贝/mg); 再次是肝胰腺(潜江 $10^7$ 拷贝/mg, 武汉和荆门约 $10^6$ 拷贝/mg, 仙桃 $10^5$ 拷贝/mg, 黄冈 $10^4$ 拷贝/mg); 心脏中WSSV的含量最低, 其中潜江为约 $10^6$ 拷贝/mg, 其他地区 $10^2 \sim 10^3$ 拷贝/mg(图4)。

## 3 讨论

本研究调查了湖北省5个不同地区克氏原螯虾的WSSV携带率和病毒在组织中的绝对定量分布。从组织分布来看, 病毒主要存在于虾的鳃部和消化系统中, 病毒分布的排序为肠 > 胃 > 鳃 > 血淋巴细胞 > 肝胰腺 > 心脏。沈锦玉等<sup>[4]</sup>对江苏养殖的克氏原螯虾进行常规PCR检测, 结果发现在血淋巴细胞、鳃、胃、肠、肝胰腺中检测出WSSV阳性。莫照兰等<sup>[17]</sup>采用核酸探针点杂交检测人工感染克氏原螯虾的鳃、胃、血淋巴细胞, 阳性检出率分别为92%、86%~89%、75%~81%。虽然这些研究没有绝对定量病毒, 但是从组织分布来说, 和本实验的绝对定量结果比较一致。

关于WSSV在其他虾类中的组织分布研究, 李新苍等<sup>[10]</sup>采用绝对定量法研究WSSV自然感染脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)的组织分布,

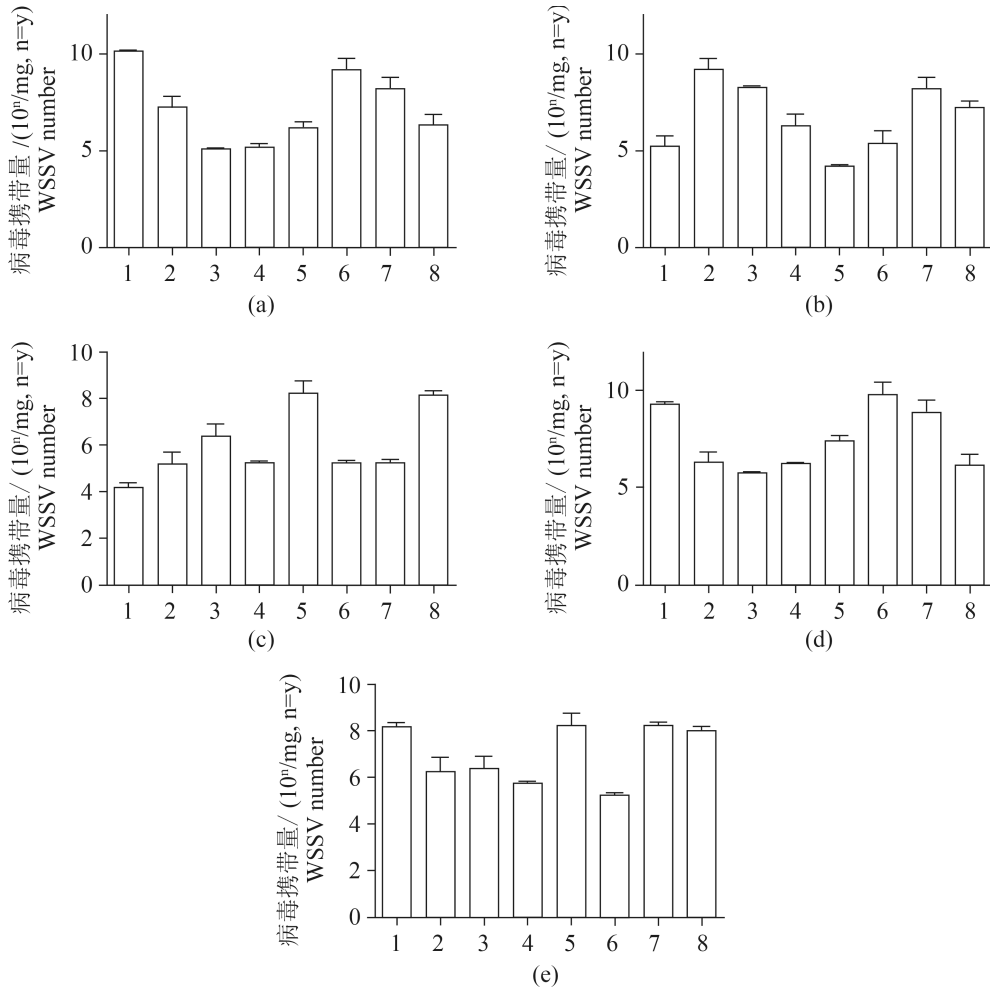


图3 5个养殖区克氏原螯虾鳃中WSSV携带量

实时绝对定量PCR检测5个养殖区克氏原螯虾鳃中WSSV的携带量; 1-8表示每组中实验虾编号; 实验重复3次; (a) 武汉; (b) 潜江; (c) 荆门; (d) 仙桃; (e) 黄冈; 下同

Fig. 3 The amount of WSSV in the gill of *P. clarkii* collected from five cities

Absolute quantitative real-time PCR was used to detect the amount of WSSV in the gill of *P. clarkii* collected from five cities; 1-8 showed the serial number of crayfish from each city; the experiment was repeated three times; (a) Wuhan; (b) Qianjiang; (c) Jingmen; (d) Xiantao; (e) Huanggang; the same below

结果表明组织病毒含量比例顺序为头胸甲下结缔组织 > 鳃 > 肝胰腺 > 肌肉; Durand等<sup>[13]</sup>也采用绝对定量方法研究WSSV人工感染凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*), 病毒在组织中的含量顺序为血淋巴细胞 > 鳃 > 肌肉 > 肝胰腺。可以看出, 病毒在不同虾类鳃部中的含量都比较高, 但还存在一些差异。比如在克氏原螯虾中, 血淋巴细胞中病毒含量比鳃部少, 而在凡纳滨对虾中, 病毒在鳃部比血淋巴细胞中少; 从病毒的绝对定量来说, 克氏原螯虾在鳃中检测的病毒量约  $10^8$  拷贝/mg, 但是在凡纳滨对虾鳃中组织病毒含量为  $4.1 \times 10^9$  拷贝/mg, 相差近十倍。上述这些差异可能是由于宿主种类不同造成的。

WSSV在不同地区克氏原螯虾的组织携带量表现出一定差异, 首先病毒在5个主养区克氏原螯虾鳃、胃和肠中的携带量均较高, 约为  $10^8$  拷贝/mg; 病毒在血淋巴细胞中的携带量在各地表现出差异, 荆门约  $10^8$  拷贝/mg, 武汉  $10^7$  拷贝/mg, 黄冈  $10^6$  拷贝/mg, 潜江  $10^5$  拷贝/mg, 仙桃  $10^3$  拷贝/mg; 病毒在肝胰腺中的携带量也表现出差异, 荆门  $10^8$  拷贝/mg, 潜江  $10^7$  拷贝/mg, 武汉  $10^6$  拷贝/mg, 仙桃  $10^5$  拷贝/mg, 黄冈  $10^4$  拷贝/mg; 病毒在心脏中的含量比较少, 但也表现出差异, 荆门  $10^6$  拷贝/mg, 武汉、潜江、仙桃  $10^3$  拷贝/mg, 黄冈  $10^2$  拷贝/mg。这些数据暗示着病毒感染和复制可能受到水质和底质等环境因

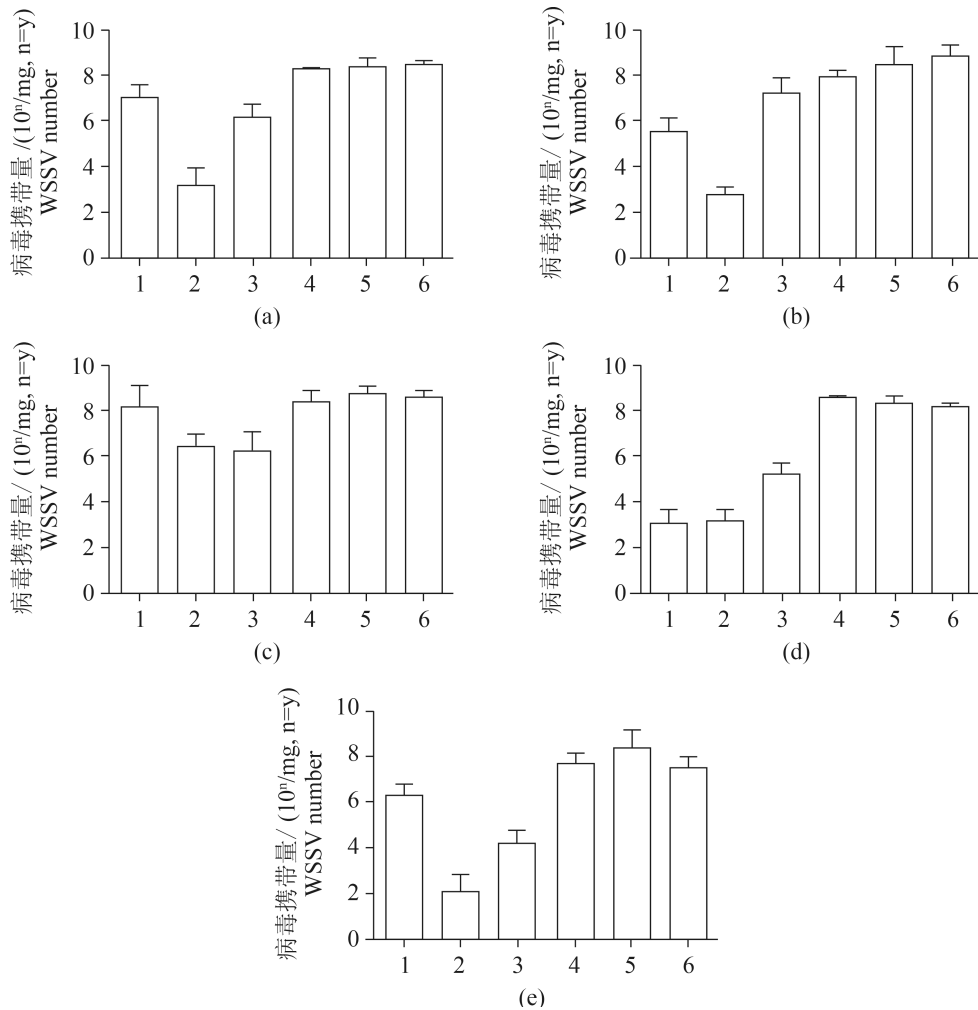


图 4 5个养殖区克氏原螯虾不同组织中WSSV的携带量

1. 血淋巴细胞; 2. 心脏; 3. 肝胰腺; 4. 鳃; 5. 胃; 6. 肠; 实验重复3次

Fig. 4 The amount of WSSV detected in the different tissues of *P. clarkii* collected from five cities

1. haemolymphocyte; 2. heart; 3. hepatopancreas; 4. gill; 5. stomach; 6. intestine; the experiment was repeated three times

子的影响, 因此从养殖环境入手防控WSSV可能是一种有效的方式。

从病毒携带率来看, WSSV已经普遍存在于养殖的克氏原螯虾之中(携带率80%以上, 图1)。这个结果将为防治克氏原螯虾WSSV疾病提供一些有益的启示。通过培育不携带WSSV的克氏原螯虾虾苗是一种防控WSSV的途径, 但是, 按照目前克氏原螯虾病毒高携带率来看, 获得不携带WSSV的亲虾难度很大。此外, 尽管培育了不携带WSSV的克氏原螯虾虾苗, 在原来已经暴发过WSSV疾病的池塘, 杀灭水体和环境中的病毒也有一定的难度。值得注意的是, 采集到的克氏原螯虾外表上并没有明显的发病症状,

表明WSSV在克氏原螯虾体内的发病是条件性的。也许在养殖环境恶化、营养不平衡等因素的作用下, 才能诱导克氏原螯虾暴发WSSV疾病。因此, 研究WSSV在克氏原螯虾体内潜伏和激活的环境和宿主机制, 将为防控WSSV提供新的思路。

目前关于克氏原螯虾WSSV的来源还不清楚。因此, 调查天然群体中克氏原螯虾携带WSSV情况, 并深入比较克氏原螯虾WSSV病毒株和沿海对虾类WSSV病毒株的分子漂变, 将为探究此病毒的起源提供依据, 也为预防WSSV的传播、评估引进外来物种带来疾病所造成的危害提供新的资料。

## 参考文献:

- [1] 陈昌福, 杨军, 刘远高, 等. 克氏原螯虾暴发性疾病病原及其传播途径的初步研究[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(6): 763-767.  
Chen C F, Yang J, Liu Y G, *et al.* Pathogenic organisms for explosive epidemic disease of red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2008, 27(6): 763-767(in Chinese).
- [2] 陈昌福, 刘远高, 何广文, 等. 克氏原螯虾暴发病细菌性病原的研究[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(2): 193-197.  
Chen C F, Liu Y G, He G W, *et al.* The bacterial pathogen of outbreak disease in *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2009, 28(2): 193-197(in Chinese).
- [3] 丁正峰, 薛晖, 夏爱军, 等. 白斑综合征病毒在养殖克氏原螯虾中感染流行研究[J]. 南京农业大学学报, 2008, 31(4): 129-133.  
Ding Z F, Xue H, Xia A J, *et al.* Study on the WSSV prevalence in the cultured crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2008, 31(4): 129-133(in Chinese).
- [4] 沈锦玉, 袁军法, 潘晓艺, 等. 红螯螯虾感染白斑综合征病毒[J]. 水产学报, 2007, 31(4): 556-560.  
Shen J Y, Yuan J F, Pan X Y, *et al.* White spot syndrome virus in *Cherax quadricarinatus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(4): 556-560(in Chinese).
- [5] 何建国, 邓敏, 龙紫新. 斑节对虾白斑综合征杆状病毒检测方法及其应用[J]. 中山大学学报论丛, 1996(增刊): 6-11.  
He J G, Deng M, Long Q X. Construction and application of PCR method for detecting white spot syndrome Baculovirus in *Penaeus* shrimp[J]. Supplement to the Journal of Sun Yatsen University, 1996(suppl.): 6-11(in Chinese).
- [6] 邓敏, 何建国, 吕玲, 等. 斑节对虾白斑综合征病毒部分基因组文库及核酸探针检测法[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 161-167.  
Deng M, He J G, Lv L, *et al.* Partial cloning of the genome library of white spot syndrome virus from *Penaeus monodon* and DNA probe detection methods[J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(2): 161-167(in Chinese).
- [7] 谢芝勋, 谢丽基, 庞耀珊, 等. WSSV和IHHNV二重实时荧光PCR检测方法的建立[J]. 水生生物学报, 2009, 33(1): 22-27.  
Xie Z X, Xie L J, Pang Y S, *et al.* Development of a multiplex real-time PCR assay for detection of WSSV and IHHNV[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(1): 22-27(in Chinese).
- [8] 乌日琴, 但学明, 刘中勇, 等. 多重RT-PCR体系检测4种虾病毒的方法[J]. 水产学报, 2011, 35(3): 438-445.  
Wu R Q, Dan X M, Liu Z Y, *et al.* A multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of four viruses of shrimp[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(3): 438-445(in Chinese).
- [9] 肖广侠, 李战军, 孟宪红, 等. 白斑综合征病毒(WSSV)3种PCR检测方法的灵敏度比较[J]. 中国水产科学, 2011, 18(3): 667-673.  
Xiao G X, Li Z J, Meng X H, *et al.* Sensitivity comparison of three PCR-based methods for white spot syndrome virus (WSSV) detection[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(3): 667-673(in Chinese).
- [10] 李新苍, 周俊芳, 房文红, 等. 实用WSSV定量检测方法的建立及其应用于脊尾白虾病毒感染规律的研究[J]. 水产学报, 2012, 36(10): 1554-1562.  
Li X C, Zhou J F, Fang W H, *et al.* Development and application of an economical real-time PCR for WSSV detection and quantification in ridgetail white prawns (*Exopalaemon carinicauda*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(10): 1554-1562 (in Chinese).
- [11] 何琳, 徐海圣, 王美珍, 等. 白斑综合征病毒环介导等温扩增快速检测方法的建立[J]. 水产学报, 2010, 34(4): 598-603.  
He L, Xu H S, Wang M Z, *et al.* Development of rapid detection for white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(4): 598-603(in Chinese).
- [12] 李红梅, 江晓, 刘助红, 等. 白斑综合征病毒实时荧光LAMP检测方法的建立及应用[J]. 水生生物学报, 2015, 39(1): 142-148.  
Li H M, Jiang X, Liu Z H, *et al.* Real-time fluorescence loop mediated isothermal amplification for the rapid detection of white spot syndrome virus[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(1): 142-148 (in Chinese).
- [13] 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.
- [14] 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.  
Zhu J Z, Lu C P. Characterization of shrimp white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Cambarus proclarkii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, 25(1): 47–51(in Chinese).
- [15] Lan J F, Li X C, Sun J J, *et al.* Prohibitin interacts with envelope proteins of white spot syndrome virus and prevents infection in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(23): 12756–12765.
- [16] Liu N, Lan J F, Sun J J, *et al.* A novel crustin from *Marsupenaeus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 49(2): 313–322.
- [17] 莫照兰, 雷质文, 杨冰, 等. 对虾WSSV人工感染螯虾及其检测[J]. *海洋科学*, 2002, 26(3): 43–46.  
Mo Z L, Lei Z W, Yang B, *et al.* Artificial infection of crayfish with WSSV of *Penaeid shrimp* and its detection[J]. *Marine Sciences*, 2002, 26(3): 43–46 (in Chinese).

## Quantitative analysis of white spot syndrome virus in the tissues of cultured red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)

LAN Jiangfeng<sup>1,2</sup>, DAI Yunjia<sup>1</sup>, LIN Li<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Fishery, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** In the recent years, the amount of wild-caught *Procambarus clarkii* has declined rapidly and it was under threat by white spot syndrome virus (WSSV). The absolute quantification of a virus in the host tissue is of great significance to understand the pathogenicity of the virus. However, quantitative analysis of WSSV in the tissues of infected *P. clarkii* was not reported. In this report, the epidemic of WSSV in red swamp crayfish from five cities in Hubei province was investigated. More than 80% of red swamp crayfish were WSSV positive when the DNA extracted from gills of red swamp crayfish were subjected to PCR assay. In addition, we also investigated the presence of WSSV antigen in the infected red swamp crayfish by Western blot using WSSV-VP28 protein specific serum generated in rabbit. The results showed that a specific band correlated with WSSV-VP28 was present in WSSV PCR-positive samples, but not in WSSV PCR-negative sample. To better quantify the amount of WSSV in the infected tissues, we established an absolute quantitative real-time PCR assay (qRT-PCR) for WSSV using recombinant plasmid pGEX-5x-1-VP28. Briefly, plasmid pGEX-5x-1-VP28 containing WSSV-VP28 gene was purified and quantified. Certain amount of pGEX-5x-1-VP28 was diluted serially and used as templates for qRT-PCR using primers specific for VP28 gene amplification. In doing so, a standard curve for the absolute quantification of WSSV was made. The amounts of WSSV genome that existed in the tissues were further measured by the qRT-PCR using the same above-mentioned primers specific for VP28 gene amplification. The absolute amounts of WSSV genomes in the tissues were obtained by comparison of the values of the qRT-PCR with those in the standard curve. Six tissues of red swamp crayfish, including gill, stomach, intestine, haemolymphocyte, hepatopancreas and heart, were sampled and used for WSSV quantification by the absolute qRT-PCR assay. The results showed that the highest most amounts of WSSV genome (about  $10^8$  copies /mg) were detected in the gill, stomach and intestine, followed by haemolymphocyte (about  $10^7$  copies /mg), hepatopancreas (about  $10^6$  copies /mg). The lowest amount of WSSV was observed in the heart of infected red swamp crayfish, indicating that the replication of WSSV was tissue dependent. The high infection rate of WSSV in the crayfish cultured in the ponds (more than 80% of red swamp crayfish were WSSV positive) indicated that the cultured red swamp crayfish was persistently infected with WSSV.

**Key words:** *Procambarus clarkii*; white spot syndrome virus; infection rate; tissue distribution

**Corresponding author:** LIN Li. E-mail: linli@mail.hzau.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31372563, 31572657, 34115185); Fundamental Research Funds for the Central Universities (2013PY069, 2014PY035, 2662015QC019); Special fund for Science and Technology from Hubei Province (2015BBA228); Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture(201401)