

文章编号: 1000- 0615(2005)01- 0074- 05

中国对虾几个产卵场群体携带白斑综合征病毒状况调查

邓 灯^{1,2}, 张庆文², 王伟继², 刘 萍², 孟宪红², 孔 杰², 孔晓瑜¹

(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: 白斑综合征可以导致养殖对虾短时间内大面积死亡, 是迄今为止对虾养殖业面临的巨大挑战。本试验采用巢式 PCR 法对 2001 年采自黄渤海的中国对虾几个产卵场群体进行白斑综合征病毒检测, 旨在较全面地了解黄渤海野生中国对虾携带病毒状况。各群体的阳性检出率分别为: 朝鲜半岛南海岸群体 55%; 渤海湾群体 35%; 辽东湾群体 94.7%; 海州湾群体 47.4%。结果显示, 中国对虾几个产卵场群体均不同程度地携带白斑综合征病毒。辽东湾产卵场群体阳性检出率明显高于其他群体, 推测人工孵化苗种放流、海湾的地理和水质条件与中国对虾的 WSSV 感染率相关。而中国对虾野生群体携带病毒对于对虾养殖业的影响是不容忽视的, 笔者认为, 只有从无特异病原(SPF)及抗特异病原(SPR)对虾养殖群体的建立着手才能从根本上避免由于对虾携带病毒而可能导致的病毒性疾病的暴发。同时, 应该重视海区污染的治理, 减少病毒病暴发的诱因。本试验建立了快速检测 WSSV 的 PCR 方法, 1pg 病毒核酸仍可检测到, 为白斑综合征病毒病的防治及早期诊断提供了有效的手段。

关键词: 中国对虾; 巢式 PCR; 白斑综合征病毒

中图分类号: S945.4

文献标识码: A

Investigation on status carrying WSSV in several spawning ground populations of *Fenneropenaeus chinensis*

DENG Deng^{1,2}, ZHANG Qing-wen², WANG Wei-ji², LIU Ping²

MENG Xian-hong², KONG Jie², KONG Xiao-yu¹

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

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

Abstract: White spot syndrome (WSS) is a disease that has caused high shrimp mortality in a short period and severe damage to shrimp culture industry up to date. The purpose of this study was to comprehensively investigate the virus carrying conditions of wild *Fenneropenaeus chinensis* in Yellow Sea and Bohai Sea. Four spawning ground populations of *P. chinensis* collected from Yellow Sea and Bohai Sea in 2001 were examined by nested PCR (polymerase chain reaction) for the detection of white-spot syndrome virus (WSSV). The virus positive rate of the several populations were: the south coast of Korea population 55%; Bohai Bay population 35%; Liaodong Bay population 94.7% and Haizhou Bay population 47.4%, respectively. As a result, the several populations were all carrying WSSV at different levels. Among those, Liaodong Bay population shows the highest WSSV infective rate, which is significantly higher than those of other populations. It may be due to the severe environmental problems and geographical conditions of the bay. Furthermore, the releasing of hatchery seedlings which may carry WSSV during culturing could be related to prawns' high WSSV infective rate. However, the effects of wild shrimp carrying virus on the shrimp culture industry were obvious and should not be ignored. Therefore, it can be concluded that the establishment of the specific pathogen free(SPF) and specific pathogen resistance (SPR) cultured population was the only way to avoid the outbreak of the disease, which may be induced by the virus carried by shrimp. At the same time, something should be done to deal with the pollution in order to decrease the inducement that leads to the

收稿日期: 2003-10-20

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, 主要从事海洋动物遗传育种等工作。E-mail: dengdeng1224@163.com

通讯作者: 孔 杰(1963-), Tel: 0532-5823291, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

outbreak of virus disease. In this study, a method for the detection of WSSV by PCR was developed, a high sensitivity about 1pg WSSV DNA could be seen with nested-PCR, which provided an effective method to diagnose WSSV ahead of time.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; nested-PCR; white-spot syndrome virus(WSSV)

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是我国重要的增养殖对象。1993 年全国范围内的对虾养殖场大面积暴发白斑综合征(White-spot syndrome virus, WSSV) 流行病, 使我国养虾业蒙受了巨大损失。目前虾病问题仍没有从根本上得以解决。研究表明, 在人工孵化条件下, 白斑综合征病毒可由亲虾传染子代^[1], 携带病毒的苗种便成为爆发性流行病的根源之一。为解决病毒垂直传染的问题, 美国于 1989 年用凡纳对虾开展无特定病原(specific pathogen free, SPF) 的生产技术研究, 根据自然群体携带病毒的调查结果, 从墨西哥湾选取不携带病毒的野生亲虾进行繁育, 于 1991 年建立凡纳对虾的 SPF 群体并在养殖生产中取得明显效果^[2]。国内黄海水产研究所和日照水产研究所合作从 1997 年开始率先进行无特定病原中国对虾种群选育的研究, 连续 6 年的养殖结果也证

明 SPF 对养殖生产的重要性^[3]。中国对虾主要分布于我国黄、渤海海域, 对黄渤海中国对虾不同地理群体携带病原的状况进行调查研究显得迫切而必要。

PCR 以其特异性、有效性、忠实性已经应用于对虾病毒病的快速检测^[4-6], 而巢式 PCR 比常规 PCR 灵敏度、特异性均增强^[6-8]。本文利用巢式 PCR 法对黄、渤海几个产卵场群体的 WSSV 检测, 对其感染状况进行评估, 以期为中国对虾养殖生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

中国对虾的采样地点、时间、样品数量详见表 1, 活体取样后经液氮储运, 保存于实验室超低温冰箱中(-80℃)。

表 1 中国对虾各群体采样情况

Tab. 1 Collection of *Fenneropenaeus chinensis* samples

样品来源 source of samples	采集地点 sampling location	采集时间 sampling time	样品数量 number
朝鲜半岛南海岸 the south coast of Korea	朝鲜半岛南海岸 the south coast of Korea	2001-09	20
渤海湾 Bohai Bay	天津(118°E, 38.5°N) Tianjin	2001-09	20
辽东湾 Liaodong Bay	营口外海(123°E, 40.5°N) Yingkou	2001-07	19
海州湾 Haizhou Bay	日照(120°E, 35°N) Rizhao	2001-09	19

1.2 方法

基因组 DNA 的提取 取约 50mg 对虾肌肉, 加入 475 μL TE 缓冲液(10mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 100 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8.0), 剪碎, 稍研磨, 加入终浓度分别为 0.5% 的 SDS 和 200mg·L⁻¹ 的蛋白酶 K, 55℃水浴消化 3h, 至溶液澄清后经等体积酚/酚: 氯仿/氯仿抽提, 酒精沉淀, 过夜并风干后溶于适当 TE 缓冲液中(10mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 0.1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 7.6), DNA 浓度通过紫外分光光度计测定。

PCR 引物 由于中国对虾白斑病毒的序列与 PRDV(penaeid rod-shaped DNA virus) *EcoR* iv 片段的序列完全同源, 内引物 P1/P2 是直接引用对 PRDV 的研究结果^[9], 引物 P1 覆盖 WSSV *EcoR* iv 片段 212 至 231 的碱基, P2 覆盖 1174 至 1193 的

碱基, 扩增产物长度为 982 碱基。PB/PE 是新设计的引物, 引物 PB 覆盖 60 至 80 的碱基, PE 覆盖 1281 至 1302 的碱基, 扩增产物长度为 1221 碱基(图 1)。

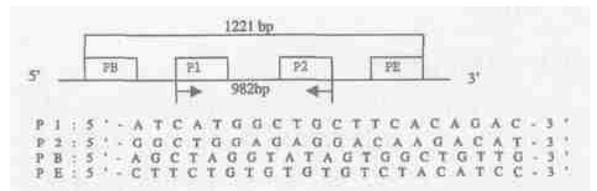


图 1 PCR 引物设计示意图及 4 个引物序列

Fig. 1 Schematic representation of the PCR layout and sequences of the four primers

DNA 的 PCR 扩增 实验用美国 PE 公司生

产的 PCR System9600 扩增仪,反应在扩增仪上经 94℃ 变性 5min 后进行 25 个循环,每个循环包括: 94℃ 40s、53℃ 40s、72℃ 2min,最后 72℃ 延伸 10min,4℃ 保存。25 μL 的反应总体积包括:模板 150ng; 10 × 缓冲液 (10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 9.0; 50mmol·L⁻¹ KCl; 0.1% TritonX-100) 2.5 μL; Mg²⁺ 25mmol·L⁻¹, 2 μL; Taq DNA 聚合酶 1U; dNTP2.5mmol·L⁻¹, 2 μL; 引物各 15 μmol; 双蒸水加至 25 μL。第二次 PCR 使用的模板为第一次 PCR 产物 1 μL,使用内引物 P1/P2,采用相同的程序,每次反应均设一阳性对照和阴性对照。

电泳 取 6 μL PCR 产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,电压为 3V·cm⁻¹ 左右,用 DL2000 (2000, 1000, 750, 500, 250, 100bp) 作为 DNA 分子量标记 (Marker),在紫外透射仪上观察并照像。

PCR 扩增试验 为证明两对引物在模板上的嵌套式位置,将阳性模板 (由黄海水产研究所病研室提供) 由引物对 PB/PE、P1/P2; 交叉反向引物对 PB/P2、P1/PE; 顺向引物 PB/P1、P2/PE 分别扩增并电泳。

PCR 法的检出界限 选取有明显白斑综合征症状的病虾,提纯病毒参照文献 [10] 的方法进行,提纯的病毒按照文献 [11] 的经典方法提取病毒 DNA,通过紫外分光光度计确定病毒 DNA 的浓度,然后以无菌双蒸水将其稀释至 10ng·μL⁻¹、1ng·μL⁻¹、100pg·μL⁻¹、10pg·μL⁻¹、1pg·μL⁻¹、100fg·μL⁻¹、10 fg·μL⁻¹、1 fg·μL⁻¹ 各浓度梯度,再如上述扩增条件取 1 μL 各梯度模板以外引物 PB/PE 进行 PCR 反应,然后再以 1 μL 的 PCR 产物为模板以 P1/P2 引物进行巢式 PCR 扩增,PCR 产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上进行电泳并照像。

2 结果

2.1 引物的嵌套位置

由两对引物扩增阳性模板的结果显示 (如图 2), 内外两对引物均可扩增出相应大小的阳性产物,交叉反向引物对 PB/P2、P1/PE 也可以得到扩增产物,而两对顺向引物 PB/P1、P2/PE 均无法对模板进行扩增。由此可得出 PB/PE、P1/P2 确实为嵌套式引物。

2.2 PCR 法的检出灵敏度

PCR 法的检出界限如图 3 所示,由图看出,以

PB/PE 1 次 PCR 扩增 WSSV DNA 模板在 10ng、1ng、100pg 时均清晰可见 1221bp 的扩增产物,而经过巢式 PCR 扩增后,模板在 1pg 时仍可见 982bp 的扩增产物。



图 2 各引物对阳性样品扩增结果 (示 PB/PE、P1/P2 在模板上的嵌套式位置)

Fig. 2 The amplified results of several primer pairs, showing the nested position of primer pair PB/PE and P1/P2

1&3: PB/PE、P1/P2 的扩增子; 5: PB/PE、P1/P2 巢式 PCR 扩增子; 6-9: 引物对 PB/P2、P1/PE、PB/P1、P2/PE 的扩增结果; 2&4: 阴性对照; M: DL2000 Marker

1&3: amplicons obtained with primer pair PB/PE、P1/P2;

5: product of nested-PCR; 6-9: amplicons of primer pair PB/P2、P1/PE、PB/P1 and P2/PE;

2&4: negative control; M: Marker

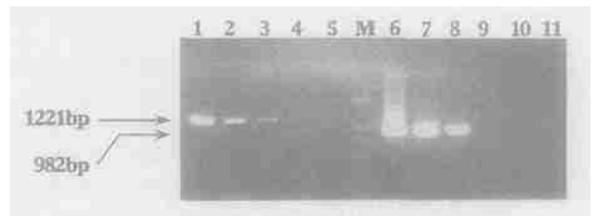


图 3 巢式 PCR 灵敏度检测结果

Fig. 3 Electrophoretograms showing sensitivity of nested-PCR

1-5: WSSV DNA 模板为 10ng、1ng、100pg、10pg、1pg 各梯度时以 PB/PE 引物对进行 PCR 反应; 6-11: WSSV DNA 模板为 100pg、10pg、1pg、100fg、10fg、1fg 时, 经巢式 PCR 扩增结果; M: Marker

1-5: 10ng、1ng、100pg、10pg、1pg WSSV DNA amplified by primer pair PB/PE; 6-11: 100pg、10pg、1pg、

100fg、10fg、1fg WSSV DNA amplified

by nested-PCR; M: Marker

2.3 各群体病毒检测结果

4 个群体第 1 次 PCR 扩增后,电泳检测不到特异性扩增产物,第 2 次 PCR 扩增经电泳可清晰地看到 982bp 的特异性扩增产物,与设计长度和阳性扩增条带的位置吻合 (图 4),说明群体中有病毒感染。统计结果显示,所调查的 4 个群体都不

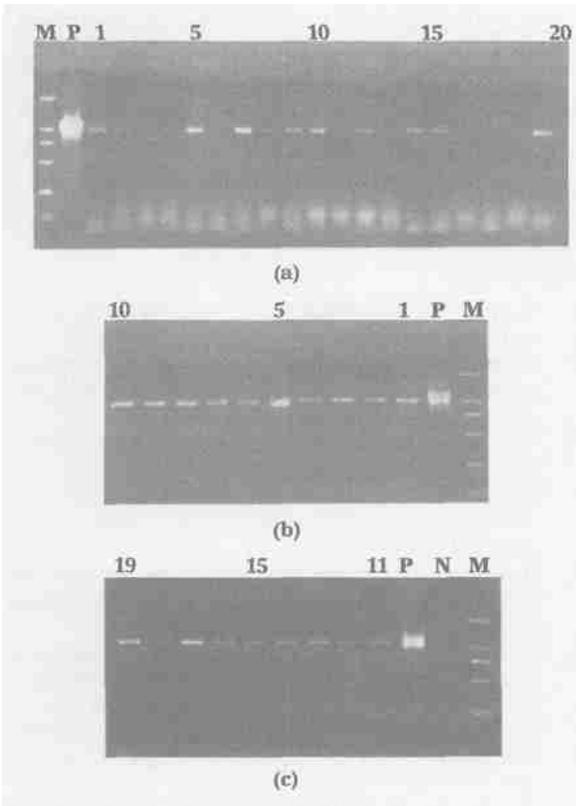


图 4 朝鲜半岛南海岸群体、辽东湾群体二次扩增电泳图

Fig. 4 Electrophoretograms of nested-PCR products of the south coast of Korea population and Liaodong Bay population
a: 朝鲜半岛南海岸群体; b, c: 辽东湾群体;
P: 阳性对照; N: 阴性对照 M: DL2000
a: the south coast of Korea population; b, c: Liaodong Bay population; P: positive control;
N: negative control; M: Marker

同程度的存在 WSSV 感染, 感染率最高的为辽东湾, 达 94.7%; 感染率最低的为渤海湾群, 感染率为 35%; 朝鲜半岛南海岸和海州湾群体居中, WSSV 阳性检出率分别为 55% 和 47.4% (表 2)。

3 讨论

对虾养殖业曾是我国海水养殖业中普及面广、发展速度快、产值高的产业, 上世纪 80 年代全国对虾养殖年产量为 20 多万吨位居世界第一。1993 年对虾暴发流行性病毒以来, 全国对虾总产量一度跌至 6 万~8 万吨, 至 1997 年才逐渐恢复至 10 万吨左右。期间, 许多学者对白斑综合征的病原、生化特性、致病机理、传播方式等方面进行了细致的研究, 并建立了血清学检测、PCR 检测、核酸探针检测、生化检测等 WSSV 快速检测技术^[5, 10]。研究表明, 病毒可通过水、饵料、底泥、粪便等在对虾个体间进行水平传播^[12-14], 为了防止隐患, 应禁止带病亲虾进入苗种孵化系统^[15, 16]。目前我国对虾养殖主要为野捕家养, 为了更好地阻断病毒的各种感染途径、保证养虾业的健康稳定发展, 亲虾来源是关键环节。

3.1 地理、环境条件对对虾带病率的影响

我国中国对虾主要分布于黄、渤海海区。黄渤海的对虾有两个种群, 一为朝鲜半岛西海岸群, 一为黄渤海沿岸群^[17]。根据产卵场划分, 我国沿海中国对虾又可分为辽东湾、渤海湾、莱州湾、胶州湾、海州湾、朝鲜半岛西海岸群及朝鲜半岛南海

表 2 不同群体 WSSV 阳性感染检测结果

Tab. 2 Results of WSSV infective rate by nested-PCR of different populations

群体 population	阳性个体数 WSSV positive number	阴性个体数 negative number	阳性感染率 (%) infective rate
朝鲜半岛南海岸 the south coast of Korea	11	9	55
渤海湾 Bohai Bay	7	13	35
辽东湾 Liaodong Bay	18	1	94.7
海州湾 Haizhou Bay	9	10	47.4

岸群等。本实验利用巢式 PCR 法对黄、渤海几个中国对虾产卵场群体的 WSSV 检测, 结果显示四个野生群体感染病毒的概率均较高, 其中感染率最低渤海湾群体亦达 35%, 最高的辽东湾群体几乎全部感染病毒。

从检测结果来看, 中国对虾几个产卵场群体均不同程度携带 WSSV (虽然仅用巢式 PCR 法方

能检测呈阳性), 而辽东湾群体阳性检出率又明显高于其他群体为 94.7%, 这可能与辽东湾的地理位置及近几年的水环境条件有关。辽东湾属三面环陆、一面环海的封闭式海湾, 海水交换能力很弱, 又紧靠近岸高密度养殖场, 是养殖污水及沿岸工农业和生活污水的直接容纳体, 水质污染严重^[18]。另外, 从 1984 至今近 20 年在辽东湾放流

人工培育苗种,由于苗种缺乏检验检疫,暂养期间很可能携带病原从而导致辽东湾近岸海域对虾带病率较高。

对虾染病状况及抗病力与其体质有关^[19,20],渤海湾入海河流较多,是对虾的主要产卵场,相对于黄渤海的其他诸湾,天然虾苗密集,饵料丰富,对虾个体较大。饵料是对虾生长发育及维持其抗病力的物质基础,海鲜饵料能够较好的满足对虾的蛋白质摄入,降低发病率^[21],良好、稳定的环境可以抑制病原的孳生,因此检测阳性率最低。

3.2 SPF 和 SPR 群体的建立是关键

通过以上检测结果,我们应当认识到:由于目前还没有有效防治 WSSV 的具体措施,而中国对虾野生资源东部朝鲜半岛南海岸群、西部渤海湾群、南部海州湾群、北部辽东湾群均存在 WSSV 感染。因此,野捕亲虾需通过严格检疫方可用于人工育苗,否则很易造成病毒从亲虾到仔虾的垂直传播或传染,成为对虾养殖的隐患。另外,由于过度捕捞及环境污染等原因,黄渤海中国对虾亲体数量严重短缺,对虾放流增殖和移植无疑是增加种群补充量的重要途径,而人工放流的苗种来源又反过来依赖于养殖业,忽视了病毒的传染就容易造成病毒的传播从而导致病害流行。因此笔者认为只有从 SPF 对虾的培育及 SPR 养殖群体的建立着手,才能从根本上解决这一矛盾。1989 年美国首先提出 SPF 对虾,并在 1992-1993 年开始个体选育,SPF 虾苗养殖产量比非 SPF 虾苗产量高出 30% 以上。继而法国、澳大利亚、哥伦比亚等国家也相继进行了诸如抗病品种的选育,取得了良好的效果^[3]。国内黄海水产研究所率先进行抗 WSSV 群体选育,目前已经培育至第 6 代,我们期待能够在近几年内培育出我国特有的中国对虾 SPR 群体并应用于生产,以保证我国的中国对虾资源的持续稳定发展。

3.3 黄渤海海域污染问题应受到重视

渤海水环境污染问题也应受到我们的重视,黄渤海海域富营养化指数高达 4.4,其中辽东湾的富营养化指数高达 29.36,已处在严重的富营养状态,极易引发赤潮,这说明渤海水质导致的环境灾害已到了必须控制的程度。因此只有从近海域渔业生态环境治理、加强生物资源状况的监督监测出发,才能从根本上保护中国对虾资源。

本文利用巢式 PCR 法对中国对虾野生群体进行 WSSV 检测,实验证明,本方法具有良好的特异性和灵敏度,可以检出 1pg 的 WSSV 病毒 DNA,为 WSSV 的早期发现和诊断提供了有力的技术手段。

参考文献:

- [1] 杨丛海. 对虾健康养殖研究的几个动态[J]. 科学养鱼, 2000, (7): 5-6.
- [2] Wyban J A, Swingle J S, Sweeney J N, et al. Specific pathogen free *Penaeus vannamei*[J]. World Aquac, 1993, 24: 39-45.
- [3] 李健, 牟乃海, 孙修涛, 等. 无特定病原中国对虾种群选育的研究[J]. 海洋科学, 2001, 25(12): 31-33.
- [4] 战文斌, 邢婧, 王远红, 等. 聚合酶链反应(PCR)检测养殖对虾的白斑病病毒(WSSV)感染[J]. 中国水产科学, 2000, 7(1): 51-54.
- [5] Tang Kathy F J, Lightner D V. Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction[J]. Aquac, 2000, 189: 11-21.
- [6] Hossain M S, Chakraborty A, Joseph B, et al. Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction[J]. Aquac, 2001, 198: 1-11.
- [7] 谢数涛, 何建国, 杨晓明, 等. 套式 PCR 检测斑节对虾白斑症病毒[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(2): 220-224.
- [8] 夏春, 黄. PCR 法检测对虾皮下和造血器官坏死杆状病毒[J]. 微生物学报, 1999, 39(2): 171-17.
- [9] 木村武志, 山野惠, 中野平二, 等. PCR 法による PRDV の検出[J]. 鱼病研究, 1996, 31(2): 93-98.
- [10] 黄, 于佳, 宋晓玲, 等. 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒的精细结构、核酸、多肽及血清学研究[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 11-23.
- [11] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1996. 954-956.
- [12] 黄, 于佳, 王秀华, 等. 单克隆抗体酶联免疫技术检测对虾皮下及造血组织坏死病的病原及其传播途径[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1): 40-50.
- [13] 宋晓玲, 黄, 王崇明, 等. 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[J]. 水产学报, 1996, 20(4): 374-378.
- [14] 宋晓玲, 史成银, 黄, 等. 用 DNA 斑点杂交法检测对虾及其饵料和环境生物携带白斑综合征病毒状况的调查[J]. 中国水产科学, 2001, 8(4): 36-40.
- [15] 包振民, 胡景杰, 姜明, 等. 杆状病毒感染越冬亲虾的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1993, 27(3): 347-351.
- [16] Mohan C V, Sudha P M, Shankar K M, et al. Vertical transmission of white spot baculovirus in shrimps-a possibility? [J]. Current Science, 1997, 73: 109-110.
- [17] 邓景耀, 康元德, 朱金声. 渤、黄海秋汛对虾标志放流试验[J]. 海洋学报, 1983, 5(1): 108-114.
- [18] 方志刚, 穆云侠. 渤海辽东湾富营养化的趋势研究[J]. 环境保护科学, 2001, 27(3): 15-17.
- [19] 李凡, 马琳, 易世红, 等. 渤海西岸急性致死性对虾病的病毒病原研究[J]. 微生物学杂志, 1999, 19(3): 27.
- [20] 解承林. 对虾病毒病害的预防[J]. 齐鲁渔业, 1997, 14(2): 24-27.
- [21] 孙刚, 王振堂, 王妮. 近岸生物资源的超强开采及其对虾病大流行的影响[J]. 东北师大学报自然科学版, 1995, (3): 72-76.