

3 种市售养殖对虾白斑综合征病毒 (W SSV) 的核酸探针检测

闫冬春, 杨 雪, 于谨磊, 刘路清, 杜中梅, 时 良, 王 芳

(鲁东大学生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘要: 对虾白斑综合征病毒是对虾养殖业危害最为严重的病毒, 每年给对虾养殖造成很大经济损失, 已成为对虾养殖业可持续发展的严重障碍。在过去的十几年中, 人们采取各种方法防止白斑综合征病毒的传播。中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 是我国主要的对虾养殖品种, 也是白斑综合征病毒的敏感宿主。按照煮沸-乙醇沉淀法快速、简便提取市售 30 只中国明对虾、28 只凡纳滨对虾、29 只日本囊对虾 DNA, 然后用地高辛标记的核酸探针进行斑点杂交检测白斑综合征病毒, 从而了解市场中养殖对虾携带白斑综合征病毒的情况。检测结果显示, 所有样品均未感染白斑综合征病毒, 说明目前白斑综合征病毒在一定程度上得到了有效控制。

关键词: 中国明对虾; 凡纳滨对虾; 日本囊对虾; 白斑综合征病毒; 核酸探针

中图分类号: S9481.41 文献标志码: A 文章编号: 1674-3075(2008)02-0058-04

对虾白斑综合征是由白斑综合征病毒 (White Spot Syndrome Virus, WSSV) 引起的一种对虾传染性疾病。白斑综合征病毒宿主广泛, 它不但感染各年龄对虾, 而且多种非对虾甲壳动物、水生昆虫幼虫、浮游动物等均可携带 WSSV (战文斌等, 2000; Rajendran K V et al 1999; Yan DC et al 2004)。对虾感染该病毒后可终身携带, 并可通过繁殖途径垂直传播给下一代, 通过摄食途径水平传播给其它种群, 是全世界养殖对虾危害最为严重的病毒之一, 感染该病毒后对虾死亡率在 80% 以上 (谢芝勋等, 2005; Li Q et al 2003)。据美国亚利桑那大学估计, 白斑综合征病毒给世界对虾养殖业造成的损失每年在 40 亿~80 亿美元 (李秉鸿, 2002)。由于其危害的严重性和广泛性, 已被世界动物卫生组织 (OIE) 列为必报疾病之一。近些年来, 人们在生产上采用培育健康虾苗、养殖用水消毒、高位池养殖等措施, 使得养殖生产得到了一些恢复。

中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 是我国常见的对虾养殖品种, 三者均为 WSSV 的敏感宿主。本文对市售的这 3 种对虾进行白斑综合征病毒的核酸探针检测, 以了解目前

收稿日期: 2007-09-29

基金项目: 国家自然科学基金 (30371111); 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室开放课题 (2004); 鲁东大学 (原烟台师范学院) 博士基金 (043301) 资助项目。

作者简介: 闫冬春, 1971 年生, 女, 山东菏泽人, 博士, 副教授, 主要从事水产养殖生态学研究。E-mail: yandch@tom.com

养殖对虾携带 WSSV 的情况, 为对虾养殖生产提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料为中国明对虾、凡纳滨对虾、日本囊对虾 3 种常见的市售养殖对虾, 购于山东烟台世回尧海鲜市场和红利海鲜市场, 取样时间及情况见表 1。

表 1 实验材料

Tab 1 Samples					
品种	数量 / 只	状态	均重 / g	产地	购买时间
中国明对虾	10	死	50	蓬莱	2006-10-21
	10	死	33	芝罘岛东口村	2006-11-12
	10	死	45	荣成	2006-11-12
凡纳滨对虾	8	死	15	芝罘岛东口村	2006-10-02
	10	活	15	蓬莱山后里村	2006-10-04
	10	活	15	乳山白沙滩	2006-10-14
日本囊对虾	15	活	16	乳山海洋所	2006-10-04
	14	活	18	长岛	2006-10-04

1.2 DNA 的提取

取样品的鳃 (SEM P-Tris 保存), 经离心后去液体, 然后加入 TE 约 0.3 mL, 研磨后 100℃ 煮沸 10~15 min, 经 10 000 r/min 离心 8~10 min, 取上清液 180 μL 置于新 1.5 mL 离心管中, 编号; 然后依次加入 20 μL 2M NaCl, 400 μL 冰乙醇, 混匀稍离心后在 -20℃ 环境下放置 2 h, 10 000 r/min 离心 8~10 min, 去上清液, 加入 800 μL 70% 乙醇洗涤, 再经 10 000 r/min 离心 8 min, 取上清液, 晾干。最后加入 36 μL TE 溶解沉淀, 4℃ 放置备用 (王旭等, 2000)。

©1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3 核酸探针斑点杂交检测

应用合成的探针, 按样品数量, 沿框线将所用 NCM(硝酸纤维素膜)剪下, 在 NCM 的左上角做标记(闫冬春等, 2004)。将 NCM 漂浮于双蒸水表面, 待其吸水沉入水后, 捞出, 浸泡于 $20 \times \text{SSC}$ 中 5 min , 再将膜放置于滤纸上晾干。

样品 DNA 在 100°C 水浴中煮沸 10 min 再迅速置于冰水浴中 2 min 以上(使其变性), 直到点样, 阴性、阳性对照也同时处理。每样取 1 L 点样于硝酸纤维素膜上, 80°C 交联 2 h 后, 在预杂交液中 65°C 孵育 $0.5 \sim 2 \text{ h}$ 加入变性的 DIG 标记探针, 于 65°C 孵育 $6 \sim 16 \text{ h}$ $2 \times \text{SSC}/0.1\% \text{ SDS}$ $0.1 \times \text{SSC}/0.1\% \text{ SDS}$ 洗膜; 膜在碱性磷酸酶标记的 DIG 抗体缓冲液中振荡 30 min 以 NBT/BCIP 为底物显色。在阳性对照明显出现颜色、而本底刚刚有所变化时停止显色, 取出膜, 置于 50 mL 水中或 TE 缓冲液中 $15 \sim 30 \text{ min}$ 停止显色。将膜置于滤纸上晾干, 对光观察结果并照相, 将膜封装于干的杂交袋中备查(史成银等, 1999)。

实验过程中, 以不加探针、其余处理与实验膜相同的膜作对照膜。

2 结果

2.1 中国明对虾检测

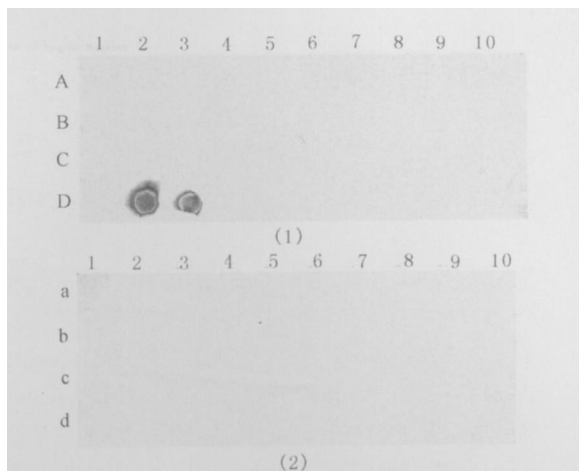
结果如图 1。(1)为实验膜, 其中 A1~C10 为检测的 30 例样品, D1 为阴性对照(蒸馏水), D2、D3 为阳性对照。阳性对照中标记有地高辛的核酸探针与 WSSV DNA 进行了杂交, 结果显现蓝紫色斑点, 阴性对照及检测的 30 例样品均未显色; (2)为对照膜, 因未加探针没有出现颜色变化。阴性对照、阳性对照及对照膜的显色情况说明实验结果是可信的, 即检测的 30 例中国明对虾样品均呈 WSSV 阴性。

2.2 凡纳滨对虾检测

结果如图 2。(1)为实验膜, 在实验膜中, 阳性对照(H2、H3)显蓝紫色, 阴性对照(H1)及 28 例凡纳滨对虾样品(E1~E8、F1~F10、G1~G10)均未显色; (2)为对照膜, 未显色。结果表明, 检测的 28 例凡纳滨对虾样品均呈 WSSV 阴性。

2.3 日本囊对虾检测

结果如图 3。(1)为实验膜, 在实验膜中, 阳性对照(L1、L3)显蓝紫色, 阴性对照(L5)及 29 例日本囊对虾样品(I1~K9)均未显色; (2)为对照膜, 未显色。结果表明检测的 29 例日本囊对虾样品均呈 WSSV 阴性。

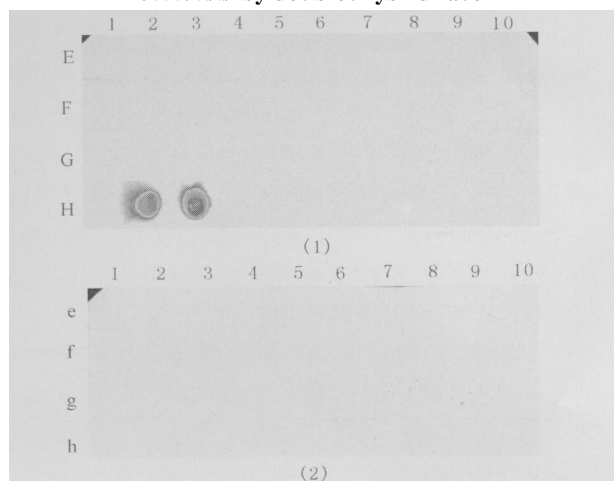


(1) A1~A10 来自蓬莱的样品; B1~B10 来自荣成的样品; C1~C10 来自芝罘岛东口村的样品; D1 阴性对照; D2、D3 阳性对照; 其余为空白; (2) 对照膜, 点样顺序同(1)。

图 1 中国明对虾核酸探针斑点杂交检测

(1) A1~A10 = samples from Penglai B1~B10 = samples from Rongcheng C1~C10 samples from Dongkou village Zhifu Islands D1 = negative control D2~D3 = positive control others = blank (2) Control membrane. The sample sequence is the same as (1).

Fig 1 WSSV Detection in *Fenneropenaeus chinensis* by dot blot hybridization



(1) E1~E8 烟台芝罘岛东口村样品; F1~F10 蓬莱山后里村样品; G1~G10 威海乳山白沙湾样品; H1 阴性对照; H2、H3 阳性对照; 其余为空白; (2) 对照膜, 点样顺序同(1)。

图 2 凡纳滨对虾核酸探针斑点杂交检测

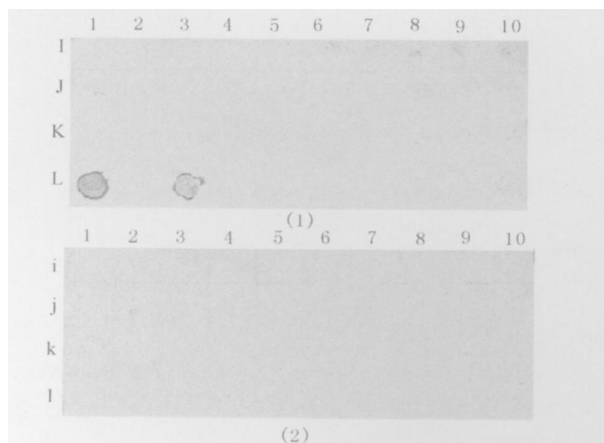
(1) E1~E8 = samples from Dongkou village, Zhifu islands F1~F10 = samples from Shanhouli village Penglai G1~G10 = samples from Baishatan Rushan H1 = negative control H2~H3 = positive control others = blank (2) Control membrane. The sample sequence is the same as (1).

Fig 2 WSSV Detection in *Litopenaeus vannamei* by dot blot hybridization

3 讨论

本实验采用核酸探针斑点杂交法对来自不同产地的 30 只中国明对虾、28 只凡纳滨对虾、29 只日本囊对虾进行了白斑综合征病毒检测, 结果全部为

WSSV 阴性,说明目前养殖生产上对虾携带 WSSV 的几率较低。



(1) I~I10 J1~J5 乳山海洋所样品; J6~J10 K1~K9 长岛样品; L1, L3 阳性对照; L5 阴性对照; 其余为空白; (2) 对照膜, 点样顺序同 (1)。

图 3 日本囊对虾核酸探针斑点杂交检测

(1) I~I10 J1~J5 = samples from Haiyangsuq Rushan J6~J10 K1~K9 = samples from Chang Islands L1, L3 = positive control L5 = negative control others = blank. (2) Control membrane. The sample sequence is the same as (1).

Fig 3 WSSV Detection in *Marsupenaeus japonicus* by dot blot hybridization

白斑综合征病毒自 20 世纪 90 年代初流行以来,引起了全世界对虾养殖业的高度重视。各地科学家纷纷致力于该领域的研究,相关研究报道很多。如今,白斑综合征病毒的研究已取得了较大的进展,很多预防措施已被广泛应用,这对降低白斑综合征的发病率起到了很好的作用。

多年来,人们对 WSSV 的传播途径进行了大量研究,发现 WSSV 的传播途径主要包括: (1) 携带 WSSV 的亲虾能产出携带 WSSV 的卵子,这些卵子可发育成部分携带 WSSV 的幼体 (江世贵等, 1999)。 (2) 池塘中健康对虾摄食带病毒环境生物或饵料生物 (Rajendran K V et al 1999)。 (3) 从外地引进携带 WSSV 的养殖活对虾,不同地区间冻虾贸易等 (Nunan L M et al 1998)。 (4) 海鸟和海区昆虫的粪便可能导致 WSSV 在不同地区间相互传播 (Lightner D V, 1999)。针对这些传播途径,养殖生产上分别采取了一些应对措施。在生产上除采用养殖抗病力强的种类 (如凡纳滨对虾) 外,还采用培育健康虾苗、限制一些鲜活饵料的使用、养殖用水消毒、池塘周边隔离防蟹等措施,以切断 WSSV 的传播途径,使得养殖生产得到了一些恢复。另外,增强对虾体质提高对虾抗病能力、选育抗性品种、调整养殖模式、药物防治、在 WSSV 感染高峰期增氧及降低其

它有害化学因子等都不失为有效措施 (闫冬春, 2006)。这些措施的采用使得白斑综合征病毒得到了有效的控制,养殖对虾的带毒率大大降低。

参考文献:

- 江世贵, 翁少萍, 吕玲, 等. 2003 对感染白斑综合症病毒的亲虾子代的跟踪检测 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 42(1): 66-69
- 李秉鸿. 2002 对虾的白斑综合症病毒研究进展 [J]. 畜牧兽医科技信息, (4): 10-11
- 史成银, 宋晓玲, 黄健, 等. 1999 核酸斑点杂交分析法检测对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒 (HHNBV) [J]. 海洋与湖沼, 30(5): 486-490
- 王旭, 史成银, 黄健. 2000 用于 PCR 检测对虾皮下及造血组织坏死病毒 (HHNBV) 的一种快速提取 DNA 方法 [J]. 海洋水产研究, 21(1): 8-12
- 谢芝勋, 庞耀珊, 邓显文, 等. 2005 多重 RT-PCR 同时检测鉴别三种对虾病毒的研究与应用 [J]. 病毒学报, 21(5): 393-396
- 闫冬春, 董双林, 黄健, 等. 2004 PCR-核酸探针斑点杂交法检测白斑综合征病毒 (WSSV) [J]. 高技术通讯, 14(3): 33-36
- 闫冬春. 2006 防治对虾白斑综合征病毒 (WSSV) 的主要措施 [J]. 水产科学, 25(4): 202-204
- 战文斌, 邢婧, 王远红, 等. 2000 聚合酶链反应 (PCR) 检测养殖对虾的白斑症病毒 (WSSV) 感染 [J]. 中国水产科学, 7(1): 51-54
- Li Q, Zhang JH, Chen Y J Yang F. 2003 White spot syndrome virus (WSSV) infectivity for *Artemia* at different developmental stages [J]. Diseases of aquatic organisms, 57: 261-264
- Lightner D V. 1999 The Penaeid shrimp viruses TSV, HHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods, and management strategies [J]. Journal of Applied Aquaculture, 9(2): 27-52
- Nunan L M, Pouls B T, Lightner D V. 1998 The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp [J]. Aquaculture, 160: 19-30
- Rajendran K V, Vijayan K K, Santiago T C, et al 1999. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crabs and lobsters from India [J]. Journal of Fish Diseases, 22: 183-191
- Rajendran K V, Vijayan K K, Santiago T C, et al 1999. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crabs and lobsters from India [J]. Journal of Fish Diseases, 22: 183-191

Yan DC, Dong SL, Huang J et al. 2004 White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments [J]. Diseases of A-

quatic Organisms 59(1): 69-73

(责任编辑 万月华)

White Spot Syndrome Virus (WSSV) Detection with Nucleic Probe in Three Cultured Shrimps

YAN Dong-chun, YANG Xue, YU Jin-lei, LIU Lu-qing, DU Zhong-mei, SHI Liang, WANG Fang

(Department of Life and Science, Ludong University, Yantai Shandong 264025, China)

Abstract White spot syndrome virus (WSSV) was considered the most serious virus for shrimp aquaculture. This virus has brought great yearly economic losses in world shrimp farming and has become a major deterrent in the growth and sustainability of shrimp aquaculture. In the past more than 10 years, many techniques have been used to prevent this virus' transmission. *Fenneropenaeus chinensis*, *Litopenaeus vannamei*, *Marsupenaeus japonicus* are three kinds of popular cultured shrimp in China. They are also WSSV acute hosts. In this paper, DNA of 30 *Fenneropenaeus chinensis*, 28 *Litopenaeus vannamei*, 29 *Marsupenaeus japonicus* bought from seafood market were extracted rapidly by applying the method of boiling-ethanol precipitation, and then detected by digoxigenin-labeled nucleic probe dot blot hybridization for white spot syndrome virus carrying status. The results showed that all of the samples were WSSV negative, which indicated that WSSV was controlled effectively to some degree in China.

Key words *Fenneropenaeus chinensis*, *Litopenaeus vannamei*, *Marsupenaeus japonicus*, white spot syndrome virus (WSSV); nucleic probe