

爆发性流行病病原对中国对虾仔虾的人工感染实验研究*

EXPERIMENT ON THE LARVA *Penaeus chinensis* INFECTED WITH THE PATHOGENY OF EXPLOSIVE EPIDEMIC DISEASE

刘 萍 孔 杰 李 健 梁兴明 石 拓

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

* 为了探讨爆发性流行病病原——中国对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒(HHNBV)在仔虾阶段的传播途径和感染方式,同时为建立高健康无特异病原虾系统提供检测手段,探讨改善对虾苗种培育措施,为养成提供健康苗种,作者对中国对虾仔虾进行了爆发性流行病原人工投喂感染试验以及检测方法的研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 病虾的来源 发病对虾来源于1994年山东青岛郊区患爆发性流行病虾池的对虾,并经过电镜切片观察确认为感染HHNBV。

1.1.2 毒种分离 取发病的对虾头胸甲部分约200 g,去掉甲壳和肝胰腺,剩余部分加入 1×10^{-9} 溶液(NaCl 24 g/L, K₂SO₄ 1.1 g/L, CaCl₂ 0.8 g/L, Mg-SO₄ • 7H₂O 1.6 g/L, NaH₂PO₄ • 2H₂O 1.35 g/L, NaHCO₃ 0.05 g/L, pH 6.8) 2 000 ml,经匀浆机20 000 r/min匀浆5 min,将匀浆液50 000 g离心10 min,去沉淀物,上清液为 10^{-1} (g组织/ml)。

1.1.3 毒饵的制备 将提纯病毒液注射健康成虾肌肉,使感染病毒死亡。取第3天死亡个体的头部,去掉肝胰腺和甲壳,剪碎后作为毒饵。

1.1.4 试验用水 试验用海水均用脱脂棉过滤(含 2×10^{-6} 青霉素)。

1.2 试验方法

1.2.1 中国对虾仔虾幼体的人工投喂感染试验 (1)试验1,取体长1.5~2.0 cm仔虾40尾,放入10 L的玻璃钢水槽中,进行投喂感染实验,实验水温17~18℃(室温条件下)。每天投喂两次毒饵,对照组也为40尾,投喂饵料为海马牌人工配合饵料。日常管理按常规方法。(2)试验2,取体长2.6 cm的仔虾,设置一试验组和一对照组,试验组为30尾幼虾,每尾放入

盛有1 500 ml海水的烧杯中,每天投喂两次毒饵。对照组仔虾数量也为30尾,投喂饵料为海马牌人工配合饵料。实验水温控制在21~22℃,在实验过程中,一发现死亡个体立即取出,将其头胸部,用戊二醛进行单独固定。剩余的腹节按照文献[5]的方法逐个提取DNA, DNA溶于50 μl灭菌蒸馏水中。

1.2.2 病原检测方法 (1)电镜观察,用于电镜切片的样品用多聚甲醛-戊二醛固定液(4%多聚甲醛、0.5%戊二醛、用pH 7.2的0.4 mol/L磷酸盐缓冲液配制),按经典方法进行固定^[1],并用常规方法进行电镜病理切片^[2]。观察后,进行拍照。(2)核酸探针检测,核酸探针的制备见文献[3],硝酸纤维素膜的处理方法是:首先在膜上用铅笔划小格,然后用双蒸水浸泡10 min,20x SSC溶液(175.3 g NaCl, 88.2 g 柠檬酸钠,加水至1 000 ml, pH 7.0)浸泡10 min,取出后夹在滤纸中,37℃温浴15 min。点样前DNA样品煮沸10 min,在冰浴中骤冷3 min,用毛细玻璃管蘸取DNA样品进行点样,然后,将膜放入80℃烘箱中处理2 h。用文献[3]中克隆HHNBV片段作为探针,采用地高辛(Digoxigenin)杂交系统进行检测,探针标记及杂交方法见文献[4]。

2 结果

2.1 试验1 结果

仔虾体长1.5~2.0 cm组的试验从1995年5月3日开始到5月20日结束,共进行18 d。对照组仔虾成活率为100%。试验组除两尾被同类吃掉外,无一死亡。用腹节提取DNA,采用地高辛-抗体-碱性磷酸酶显色体系杂交证明了阳性结果,见图3中1。同时,

* 本文为攀登计划PB-6“海水增殖优良种质和抗病力的基础研究”项目内容。
收稿日期:1996-12-11

电镜固定液固定的幼体头部样品, 随机抽取 2 尾, 经电镜切片观察, 发现了大量的杆状病毒粒子, 见图 1, 证明幼体均感染 HHNBV。

2.2 试验 2 结果

仔虾体长 2.6 cm 组的投喂感染, 试验共进行 9 d。试验组 30 尾仔虾全部死亡, 即死亡率为 100 %, 对虾每日死亡情况见表 1。对照组没有发现仔虾死亡, 成活率为 100 %。

表 1 平均体长 2.6 cm 仔虾的人工感染试验结果

感染天数 (d)	死亡数 (尾)	死亡率 (%)
1	0	0
2	0	0
3	2	6.6
4	4	13.4
5	6	20
6	6	20
7	5	16.7
8	5	16.7
9	2	6.6

用腹节提取 DNA, 采用地高辛-抗体-碱性磷酸酶显色体系杂交证明了每尾都是阳性结果, 见图 3 的 2 ~ 31。同时, 电镜固定液固定的幼体头部样品, 第 3 天死亡的幼体抽取 1 尾, 第 9 天死亡的幼体抽取 1 尾, 经电镜切片观察, 发现了大量的杆状病毒粒子, 证明幼

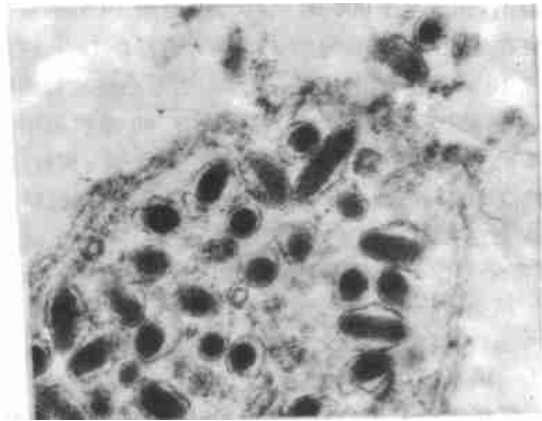


图 1 水温 17~ 18 ℃ 条件下仔虾感染 HHNBV 的电镜照片 (30 000×)

体均感染 HHNBV, 见图 1。

3 讨论

自 1974 年 Couch J. A. 在墨西哥湾的桃红对虾中发现第一例病毒病起, 至今已发现 12~ 14 种对虾病

毒病。据叶效经等 1990 年报道, 中国对虾曾经患有胰腺细小病毒和呼肠弧病毒病, 但未造成对虾的大面积死亡。然而, 受 1993 年以来发生的对虾暴发性流行病的影响, 我国人工养殖对虾发生大面积死亡, 产量大幅度降低, 严重影响了我 国对虾养殖的经济效益。有关学者对对虾暴发性流行病进行了较多的研究, 确定病原是一种新的杆状病毒, 暂定名为 (Hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus, HHNBV)。

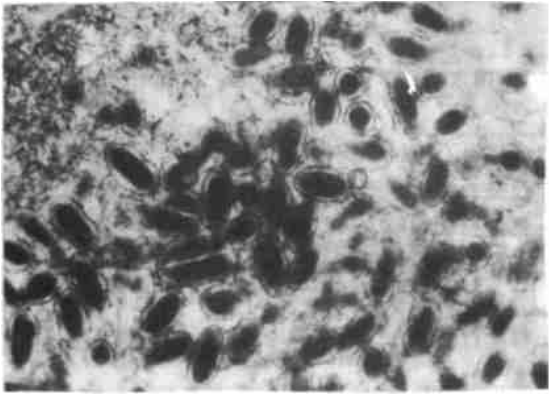


图 2 水温 21~ 22 ℃ 条件下平均体长 2.6 cm 仔虾感染 HHNBV 的电镜照片 (28 000×)

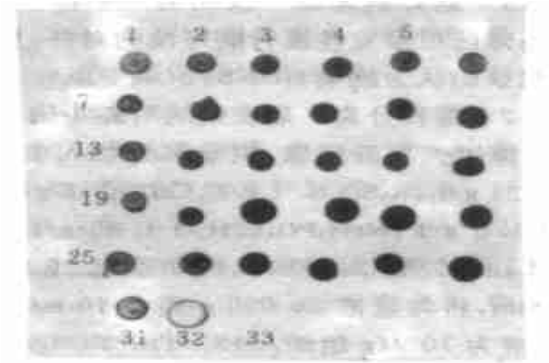


图 3 用斑点杂交方法检测人工投喂感染仔虾照片
1 为试验 1 中的虾样 DNA; 2~ 31 为试验 2 中的单尾虾样 DNA; 32 为阳性对照(HHNBV 的 DNA); 33 为试验 2 中的阴性对照(对照组虾样 DNA)

据黄 等报告, 对虾暴发性流行病的病原可通过投喂进行感染, 体长 7 cm 的对虾感染病毒后 2~ 9 d 死亡^[7]。在试验 2 中, 感染后仔虾死亡情况与黄 等报告的情况相似。结合电镜和核酸探针的检测结果, 可以认为作者采用的感染方法是可行的。

本试验证明了采用人工投喂的方式可使健康的仔虾感染 HHNBV, 说明在仔虾阶段病毒也可以通过消化道摄食感染。值得一提的是在试验 1 中体长

1.5~2 cm 的仔虾虽证实已感染病毒,但在18 d 的试验过程中幼体并不表现出患病症状,也一直未发生死亡,分析原因可能与试验用仔虾的体长大小和试验温度有关。在试验1中使用仔虾体长1.5~2 cm,试验水温17~18℃,在试验2中使用仔虾体长2.6 cm,试验水温21~22℃。据黄海所对对虾育苗生产苗种检测结果,目前养殖用的虾苗相当一部分带有暴发性流行病毒,但虾苗同样能够存活,只是到了养成池经一段时间后,随着养殖池水温的升高和虾苗的生长陆续开始大量死亡。因此可以推断个体较小的虾苗在温度较低时对暴发性流行病毒敏感性较低。建议在生产上利用这一特点,在对虾苗种培育阶段采取措施,如使用防治病毒药物、优化养殖环境减少对虾应激反应及强化营养提高苗种抗病能力等,培育出健康苗种供养成生产使用。

参考文献

- 1 芮菊生、杜懋琴等。组织切片技术。北京:人民教育出版社,1980。3~108
- 2 朱丽霞、程乃乾等。生物学中的电子显微镜技术。北京:北京大学出版社,1982。1~62
- 3 刘 萍等。海洋水产研究,1995,16(1):59~62
- 4 王申五。基因诊断技术——非放射性操作手册。北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1992。124~125
- 5 金冬雁、黎孟枫等译。分子克隆实验指南。第二版。北京:科学技术出版社,1992。463~468
- 6 黄 、宋晓玲等。海洋水产研究,1995,16(1):1~10
- 7 黄 等。海洋水产研究,1995,16(1):51~58