

对虾 WSSV 人工感染螯虾及其检测 *

莫照兰¹ 雷质文² 杨冰² 黄捷² 张培军¹

(¹ 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放实验室 青岛 266071)

(² 中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部增养殖病害与生态重点开放实验室 青岛 266071)

摘要 用对虾白斑综合症病毒(WSSV)人工感染淡水克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*),感染组螯虾3~6 d内全部死亡。核酸探针点杂交两次检测感染螯虾的鳃、胃、血淋巴,阳性检出率分别为92%(92%),89%(86%),81%(75%),对照为11%(3%),5%(5%),0(0);光镜下可观察到感染螯虾的胃、鳃组织的靶细胞核肿大、嗜酸性着染,电镜下病变组织细胞核可见形态大小与WSSV一致的病毒粒子;病毒核酸原位杂交两次检测感染螯虾的胃、鳃,阳性检出率均为100%,对照阳性检出率均为0。结果表明:对虾WSSV可感染淡水克氏原螯虾,病毒核酸原位杂交是一种敏感特异的病毒检测方法。

关键词 WSSV, 人工感染, 克氏原螯虾, 核酸探针点杂交, 核酸原位杂交

对虾白斑综合症病毒(WSSV)是养殖对虾爆发性流行病主要病原,具有较广泛的宿主,在海洋近岸及虾池中几乎所有的甲壳类、挠足类均可检出阳性。到目前为止,由于适合对虾病毒的细胞系尚未建立,以对虾为实验材料成本较高,且带毒者多,不宜作为实验动物,寻找适合该病毒的廉价的近缘动物作为研究对虾病毒的动物模型是十分必要的。螯虾是淡水甲壳动物,一年四季均可取材,价格低廉,本文进行了WSSV对螯虾的人工感染,并进行了组织细胞病理变化的观察和病毒的检测。

1 材料和方法

1.1 螯虾

实验螯虾购自市场,平均体重约20 g,挑选活力强的个体暂养于水槽中,饲养温度24~25℃。

1.2 WSSV 毒种

WSSV感染发病致死的中国对虾,保存于-35℃。取病虾头胸部,去头胸甲和肝胰腺,称取10 g加少许PPB缓冲液(376 mmol/L NaCl, 7.5 mmol/L K₂SO₄, 12.8 mmol/L CaCl₂·2H₂O, 6.5 mmol/L MgSO₄·7H₂O, 50 mmol/L Tris·HCl, pH 7.2)冰浴研磨匀浆;10 000 r/min 4℃离心15 min;上清液于24 000 r/min 4

℃离心2 h;沉淀悬浮于3倍体积的PPB,10 000 r/min 4℃离心5 min;上清液经35%(W/W)蔗糖垫100 000 r/min 4℃离心3 h,沉淀溶于100 ml PPB,作为注射感染实验的病毒液。

1.3 注射感染

暂养后的螯虾随机分组,分别于第1,2腹节肌肉注射0.1 ml的病毒液,对照组注射PPB。

1.4 病毒核酸点杂交

点杂交探针为DIG标记的700 bp大小的WSSV特异性DNA片段。取螯虾的鳃、胃区组织和血淋巴,以SEMPSSC采样液①匀浆,离心取上清,参照宋晓玲

* 国家“九五”重点科技攻关资助项目96-005-03-01-03号;中国科学院海洋研究所调查研究报告第4210号;海洋生物学开放实验室研究报告第267号。

第一作者:莫照兰,出生于1967年,博士,副研究员,在研课题为“鱼类病原菌致病因子的作用过程”。E-mail: devbird@ms.qdio.ac.cn

① 史成银、黄捷。1998。一种新型的核酸探针采样液SEMPSSC。

收稿日期:2000-11-01;修回日期:2001-05-11

等的方法,将样品 DNA 煮沸变性,每样取 1 μg 点样于硝酸纤维膜上,120 °C 交连 30 min,65 °C 预杂交 2 h,加入 DIG 标记 WSSV 探针 (20 μg/L) 杂交过夜,与碱性磷酸酶-抗 DIG 抗体反应,洗涤、显色、观察。

1.5 病理观察

取螯虾的鳃和胃用 Davidson's FAA 液固定,按常规方法制备石蜡切片,在显微镜下观察。同时用 2.5% 戊二醛固定螯虾的鳃和胃,制备超薄切片,进行电镜观察。

1.6 病毒核酸原位杂交

原位杂交探针为 DIG 标记的 547 bp 的 WSSV 特异性 DNA 片段。石蜡切片贴附于带正离子的载玻片上烘干,于二甲苯脱蜡,复水,经蛋白酶 K 消化,用冷甲醛终止反应,取出与杂交缓冲液孵育后加入 DIG 标记的 WSSV 探针杂交过夜,洗涤,封闭液封闭,与碱性磷

酸酶-抗 DIG 抗体反应,显色,封片后以显微镜观察。

2 结果

2.1 人工感染及症状观察

感染螯虾于 3~6 d 内全部死亡。发病螯虾初期无明显症状,后期不摄食,反应迟钝,螯肢无力,濒死螯虾血淋巴不凝固、微红,头胸甲易剥离,肝胰腺颜色淡黄,腹节肌肉苍白。对照组螯虾全部存活,无异常症状。

2.2 点杂交

用核酸探针点杂交方法对感染组螯虾的鳃、胃组织和血淋巴进行两次检测(表 1),在硝酸纤维膜上,出现黑褐色的斑点为阳性,无显色反应的为阴性(图 1-5)。结果表明核酸探针点杂交具有较高的重复性;在进行杂交检测时,鳃和胃是较适宜的组织。

2.3 组织病理观察

表 1 WSSV 的核酸探针点杂交检测结果

Tab.1 WSSV detection by DNA dot hybridization

组织	样品数	第 1 次检测				第 2 次检测			
		阳性		阳性率(%)		阳性		阳性率(%)	
		感染组	对照组	感染组	对照组	感染组	对照组	感染组	对照组
鳃	36	33	4	92	11	33	1	92	3
胃	36	32	2	89	5	31	2	86	5
血淋巴	36	29	0	81	0	27	0	75	0

濒死螯虾的鳃和胃经 H.E 染色后在显微镜下观察,可观察到上皮细胞、结缔组织细胞以及血管内皮细胞、血细胞的细胞核均显著肿大,核内有均匀的嗜酸性物质,染色质与核仁消失;细胞胞质浑浊,细胞膜轮廓模糊,组织结构松散残缺,呈现组织坏死状态(图 1-4)。对照组螯虾鳃、胃组织细胞中未观察到均匀着色的病变细胞,细胞核形态瘦狭,核内染色质、核仁呈网状结构,与核质反差明显,核膜、细胞膜结构清楚,细胞形态清晰可辨,组织结构完整。

在电镜下,感染螯虾的胃、鳃组织细胞核可观察到杆状病毒粒子。病毒粒子横切面为圆形,纵切面为杆状而略带椭圆,外被囊膜,囊膜为双层结构,有些病毒顶端有乳头状结构(图 1-2)。其形态大小与描述的 WSSV 一致。某些病变严重的细胞核几乎被杆状粒子充满,并有长晶格状物出现,核内染色质消失(图 1-1)。胞质核糖体颗粒脱落,线粒体、高尔基体、内质网等结构溃散,仅见膨大裸露的细胞核;有的核膜破裂,病毒粒子释放出来;在有些细胞的细胞质内可见有细菌的混合感染。对照组

螯虾细胞结构和形态完整,未见有杆状病毒粒子。

2.4 病毒核酸原位杂交

对螯虾病理组织石蜡切片进行病毒核酸原位杂交检测,细胞核均匀着紫蓝色者为阳性病变细胞,未着色细胞为阴性。经过两次检测,在检测的 10 个样品中,发病螯虾的胃、鳃均为阳性(图 1-3),对照组均为阴性。

3 讨论

本文采用光镜、电镜进行组织病理学观察,同时应用核酸点杂交和原位杂交检测病毒的特异性,结果均表明了 WSSV 可感染淡水螯虾。螯虾可作为进一步研究 WSSV 的模式动物。用于检测病毒的方法很多,光镜和电镜方法是观察组织病理变化和病毒作用过程常用的方法,这两种方法都是在病毒感染、大量增殖后才能观察到,当感染早期或潜伏期病毒量较少时,难以观察到病毒的存在。将病毒粒子的特异性核酸片段进行标记,在硝酸纤维膜上与组织中提取的病毒核酸杂交,可提高病毒检测的灵敏度,但由于核酸探针点杂交分析法是对

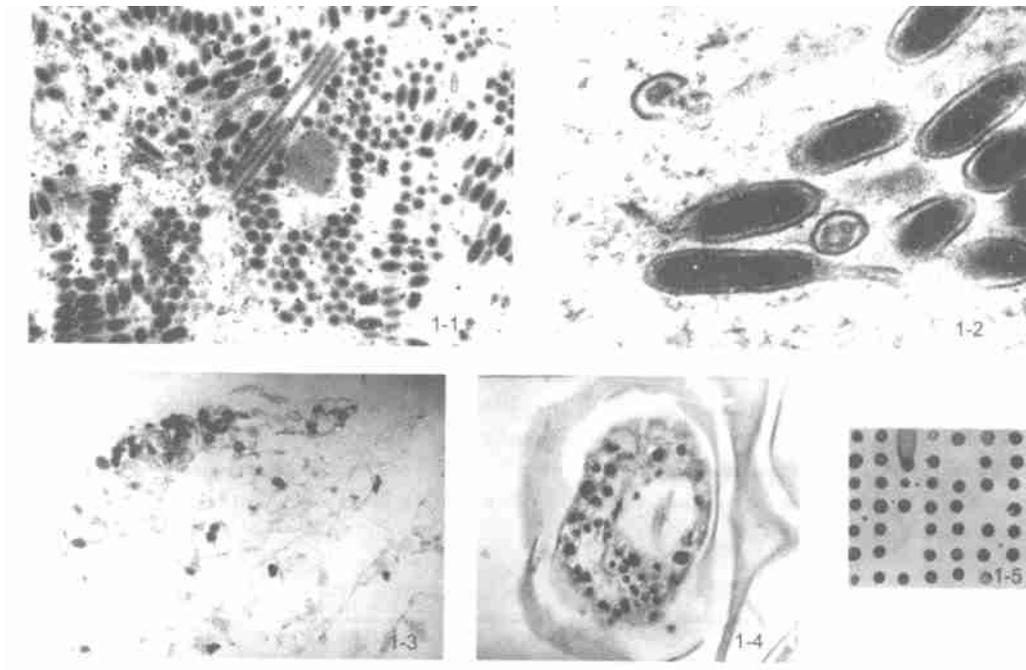


图1 WSSV人工感染螯虾的组织病理观察和核酸杂交检测

1-1. 晶格状排列的病毒粒子及长晶格状物(40 000×); 1-2. 一端具乳突状结构的病毒粒子(60 000×); 1-3 固定组织核酸原位杂交, 箭头上皮细胞和结缔组织细胞核染紫蓝色, 组织结构松散坏死(100×); 1-4. H.E.染色, 箭头示上皮细胞和结缔组织细胞核膨大, 核内嗜酸性着色(100×); 1-5. 核酸探针点杂交。

Fig.1 Histopathological examination and DNA hybridization assay of crayfish infected by WSSV

1-1 Baculovirus arranged in crystallite and the long crystalline could be seen (40 000×); 1-2 Magnification of baculovirus with tail (60 000×); 1-3 Section of tissue *in situ* hybridized with DIG DNA of WSSV, the nuclei of epithelial cells and connective tissue cells indicated by the arrows were precipitated with black blue color, the structure of tissues loosened and became necrosis (100×); 1-4 H.E. staining of tissue, the nuclei of epithelial cells and connective tissue cells indicated by the arrows were inflated and stained acidophilically (100×); 1-5 Dot DNA hybridization of diseased crayfish with the tissue of gill, stomach and haemolymph.

从发病螯虾组织提取的病毒 DNA 进行检测, 病毒 DNA 的含量直接影响检测的灵敏度, 特别是病毒量少的带毒者更难检测到。因此为了提高病毒检测的特异性和灵敏度, 目前普遍采用固定组织核酸原位杂交方法, 这种方法无需提取组织的病毒 DNA, 依然保持组织与细胞形态的完整性, 用核酸探针直接检测细胞内的靶核酸序列, 对细胞中含量极低的靶序列有极高的敏感性。实验结果也表明了核酸原位杂交方法比点杂交具有较高的灵敏度。

此外, 免疫学检测方法和将 PCR 技术与原位杂交结

合的原位 PCR 技术也广泛地被人们用于病毒的检测, 特别是后者能在完整的细胞标本上检出单拷贝的 DNA 序列。因此特异敏感的检测手段为定位病毒感染的组织和器官, 深入地研究病毒感染途径提供可行的方法。

辅助参考文献

- 宋晓玲, 黄捷, 王崇明等. 皮下及造血坏死杆状病毒对中国对虾亲虾的人工感染, 水产学报, 1996, 4: 374~378
Lo C. F. *et al.*. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimps, crabs and other arthropods, *Disease of Aquatic Organisms*, 1996, 27: 215~225

研究论文 ·  ARTICLE

ARTIFICIAL INFECTION OF CRAYFISH WITH WSSV OF PENAEID SHRIMP AND ITS DETECTION

MO Zhao lan¹ LEI Zhi wen² YANG Bing² HUANG Jie² ZHANG Pei jun¹

(¹ Experimental Marine Biological Lab, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Qingdao, 266071)

(² Marine Cultural Disease & Ecology Lab, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao, 266071)

Received: Nov. 1, 2000

Key Words: WSSV, Infection, *Procambarus clarkii*, Dot blot hybridization, *In situ* hybridization

Abstract

Healthy freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*) were infected with the virus of white spot syndrome virus (WSSV) of penaeid shrimp, and the diseased crayfish died within 3-6 days. Histopathological studies of light and electronic microscopy examination indicated that the tissues of gill and stomach in diseased crayfish were infected by baculovirus, whereas DNA dot blot hybridization and *in situ* hybridization assay confirmed that the gill, stomach and hemolymph of diseased crayfish were positively infected by WSSV. So the crayfish were certainly infected by WSSV, and it is demonstrated that *in situ* hybridization assay was specific and sensitive to detect WSSV.

(本文编辑:刘珊珊)