

脊尾白虾白斑综合征病毒耐受群体重要免疫相关酶的活性分析

冯宁宁^{1,2}, 孙玉苗¹, 温 荣^{1,2}, 张成松¹, 李富花¹

(1. 中国科学院 海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛, 266071; 2. 中国科学院大学, 北京, 100049)

摘要: 白斑综合征(white spot syndrome, WSS)的爆发已给虾类养殖业造成了严重经济损失, 寻找能够指示虾类群体抗白斑病能力的指标对虾类养殖业具有重要意义。本研究以脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda* Holthuis)为实验材料, 以人工注射白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)攻毒后稳定存活的脊尾白虾作为 WSSV 耐受群体(命名为 Rm), 以注射 PBS 的虾作为对照群体(命名为 Vm), 分析比较了 Rm 群体和 Vm 群体的酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)活性差异以探讨筛选对虾抗病免疫指标的可行性。Rm 群体的 ACP 和 AKP 活性均显著低于 Vm 群体($P < 0.05$), 而两群体在 SOD 活性上无显著差异。为进一步检验 WSSV 耐受群体是否比未经历过病毒感染的虾具有更高的抗 WSSV 的能力, 作者以实验室养殖过程中经过 WSSV 自然感染后存活的脊尾白虾作为抗性群体(命名为 Rn), 以未经历过 WSSV 感染的脊尾白虾作为普通群体(Vn), 进行 WSSV 人工注射攻毒, 观察它们在 WSSV 感染后的存活率, 结果显示 Rn 群体攻毒后存活率为 33.2%, 显著高于 Vn 群体的存活率 15.1%($P < 0.05$), 说明 ACP 和 AKP 有可能作为虾类抗 WSSV 能力的评价指标。

关键词: 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda* Holthuis); 白斑综合征病毒(WSSV); 酸性磷酸酶 ACP; 碱性磷酸酶 AKP; 超氧化物歧化酶 SOD

中图分类号: P735 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)03-0075-05
doi: 10.11759/hyhx20130301002

虾类养殖是中国水产养殖的支柱产业, 但随着养殖业的发展, 养殖密度的增高, 养殖环境的恶化以及种苗的退化, 虾类的病害问题越来越突出。其中, 白斑综合征(white spot syndrome, WSS)的爆发已给虾类养殖业造成了巨大损失^[1]。白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)主要感染十足目(Decapoda)甲壳动物, 其在虾类中的感染率和致死率极高, 自然感染的对虾在 3~9 d 即可达到 100%的死亡率^[2-3]。因此筛选能够指示虾类抗白斑综合征病毒能力的免疫指标, 在虾类养殖和苗种的抗性选育中具有重要意义。

虾类依靠由细胞免疫和体液免疫组成的非特异性免疫系统来实现自身的免疫防御。酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)和超氧化物歧化酶(SOD)都是虾类重要的体液免疫因子^[4]。ACP 和 AKP 是甲壳动物细胞内溶酶体的重要组分, 参与血细胞的吞噬和包囊反应^[5]。SOD 是生物体重要的抗氧化酶, 能够清除超氧阴离子自由基, 保护大分子不被氧化破坏^[6-7]。这 3 种酶常被认为可以作为衡量虾类免疫状态的指标, 用于评估虾类的健康状态、诊断病原感染阶段、评价免疫增强剂或其他抗病物质的免疫效果以及筛选抗病家系等^[4, 8-9]。然而, 大多相关报道着

重于研究病原感染状态下, 相关免疫酶类活性随时间的表达变化特征, 这些研究虽然一定程度上能反映虾的健康状况, 但是不能指示虾的抗病能力。另外, 虽然这些酶类被用来指示虾的免疫状态, 但是不同研究选取的酶的种类不同, 且对哪种酶更适合作为虾类免疫指标存在意见上的分歧。因此, 筛选能够指示虾类抗病能力的指标亟待进行。

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda* Holthuis), 属于甲壳亚门(Crustacea), 十足目(Decapoda), 长臂虾科(Palaemonidae), 白虾属(*Exopalaemon*), 是中国的养殖经济物种之一。由于其味道鲜美, 繁殖能力强, 因而具有广阔的养殖前景。同时, 基于脊尾白虾自身的一些生物学特点, 如环境适应力强, 易于养殖; 体型适中, 易于操作; 世代周期短, 可在人工条件下进行周年繁殖; 对 WSSV

收稿日期: 2013-03-01; 修回日期: 2013-05-20

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201103034); 国家科技支撑计划项目(2011BAD13B01); 国家虾产业体系项目(CARS-47)

作者简介: 冯宁宁(1987-), 女, 山东省潍坊人, 硕士研究生, 从事甲壳动物基础免疫学研究, 电话: 0532-82898570, E-mail: fn1867@163.com; 李富花, 通信作者, 研究员, 电话: 0532-82898571, E-mail: fhli@ms.qdio.ac.cn

敏感, 是 WSSV 的重要宿主^[10], 因而其具备作为甲壳动物的实验动物进行研究的潜力。作者以脊尾白虾作为实验动物, 通过 WSSV 感染实验获得了对 WSSV 耐受的群体, 分析了酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性, 探讨筛选虾类抗 WSSV 的免疫指标, 可为抗白斑综合征病毒苗种的选育提供参考, 促进虾类养殖业的健康发展。

1 材料和方法

1.1 实验动物和病毒的来源

实验所用脊尾白虾为连续多代在中科院海洋所水族楼实验室孵化养殖获得的, 平均体长(5.1 ± 0.7)cm, 体质量平均为(2.0 ± 0.5)g, 实验前经 real-time 定量 PCR 检测 WSSV 病毒含量, 证明其携带一定量的 WSSV, 为 WSSV 潜伏感染的虾。在饲养过程中未出现 WSSV 爆发的症状。

实验所用 WSSV 的制备按照 Sun 等^[10]描述的方法进行。所提取的病毒原液的浓度约为 1 × 10⁵ 拷贝/μL, 使用时用 PBS 缓冲液稀释至所需浓度。

1.2 WSSV 攻毒实验

1.2.1 WSSV 耐受群体的获得

将病毒原液用 PBS 稀释至 80 拷贝/μL 作为工作液备用。将脊尾白虾分为攻毒组和对照组两组, 攻毒组 1 200 尾, 对照组 200 尾。攻毒组采用人工肌肉注射的方式, 在每只虾最后一腹节的腹部注射 WSSV 悬液 10 μL (约 800 拷贝), 对照组注射 PBS 10 μL, 注射后按正常的管理方法进行换水投饵, 养殖温度控制在 23℃ 左右。每天观察虾的存活情况, 及时将死亡虾从养殖池内移走。为了解死亡的虾是否由于 WSSV 的感染引起, 分别采用一步 PCR 的方法, 使用引物对 VP28F(5'GGCCATATGATGGATCTTTC TTTCACTCTTTC3') 和 VP28R(5'CTCGAGCTCGG TCTCAGTGCCAG3') 对对照组死亡的虾和攻毒组死亡的虾进行检测。至攻毒后第 9 天, 攻毒组剩余的脊尾白虾存活情况稳定。

以攻毒组存活下来的脊尾白虾作为 WSSV 耐受群体(命名为 Rm 群体), 随机从对照组中取与 Rm 相同数目的存活虾作为对照群体(命名为 Vm 群体)。取 Rm 群体和 Vm 群体的头胸部和游泳足样品按个体进行标记后分别在液氮中保存备用。

1.2.2 WSSV 耐受群体的攻毒实验

为检验经历 WSSV 感染后的幸存虾是否比未经

历病毒感染的虾抗病能力较高, 并检验基于 Rm 和 Vm 所筛选的抗病指标的可靠性, 以实验室养殖的一批自然感染过 WSSV 并存活脊尾白虾作为耐受群体(命名为 Rn), 以未经历过 WSSV 感染的脊尾白虾作为易感群体(Vn), 进行攻毒实验如下:

Rn 和 Vn 脊尾白虾各取 120 只, 分别放于 8 个 40L 左右的塑料缸中养殖, 每缸 30 只, 每只虾注射等量的 WSSV 提取液(约 500 拷贝)。每个群体中的 3 缸用于记录死亡率, 另外 1 缸于感染前(0 h)、感染后 6 h 各取 10 只虾的头胸部样品于 -80℃ 保存备用。

1.3 总蛋白的提取及酶活检测

将所取脊尾白虾的头胸部样品分别在液氮中进行研磨, 相同群体中每 3 尾脊尾白虾的研磨粉末合为一组样品, 用于酶活性指标的检测。

蛋白提取试剂盒购于贝博生物技术有限公司。按照试剂盒提供的提取方法提取脊尾白虾的头胸部研磨样品的总蛋白, Bradford 法测定提取的总蛋白的浓度^[11]。

酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)和超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。分别按照试剂盒提供的说明书检测脊尾白虾中酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、超氧化物歧化酶的活性。

1.4 DNA 提取及病毒拷贝数检测

为比较 Rm 群体和 Vm 群体中 WSSV 的携带情况, 使用植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根生物科技有限公司)提取所保存的部分个体的游泳足样品的 DNA, DNA 样品的提取按照说明书进行。病毒拷贝数的检测按照 Sun 等^[10]描述的方法进行。

1.5 数据分析

使用 SPSS 17.0 软件, 采用 t 检验(以 P < 0.05 为显著性水平)对不同组样品的酶活差异进行显著性检验。

表 1 本研究中所用的引物

Tab.1 Primers used in this study

引物	序列 (5' to 3')	退火温度 (°C)
VP28F	GGCCATATGATGGATCTTTC TTTCACTCTTTC	57
VP28R	CTCGAGCTCGGTCTCAGTGCCAG	57
QVP28F	AAACCTCCGCATTCTGTGA	55
QVP28R	TCCGCATCTTCTTCCTTCAT	55
18SF	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA	55
18SR	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT	55

2 结果

2.1 脊尾白虾 WSSV 耐受群体的获得

攻毒组脊尾白虾于攻毒后 18 h 开始有虾出现死亡, 36 h 后出现大规模死亡, 96 h 后存活情况趋于稳定。至攻毒后第 9 天, 攻毒组脊尾白虾存活 45 只, 存活率约为 4%。使用一步 PCR 对死亡虾做 WSSV 检测, 结果表明, 攻毒组死亡的脊尾白虾随机抽取的 20 只虾进行检测都扩增到 WSSV 阳性条带, 对照组中有 20 只脊尾白虾在实验期间死亡, 病毒检测结果表明未检测到阳性条带, 说明其死亡原因并非 WSSV 感染。

2.2 Rm 和 Vm 群体 WSSV 载量的检测

使用 real-time PCR 方法, 检测 Vm 群体游泳足中携带 WSSV 的量为(297±163)拷贝/ng DNA。攻毒

组攻毒后第 9 天, 存活的 Rm 群体脊尾白虾游泳足中的病毒含量为(296±82)拷贝/ng DNA, 二者在统计学上无显著差异。

2.3 Rm 和 Vm 群体免疫相关酶类的酶活比较

利用酶活检测试剂盒对 Rm 群体和 Vm 群体的 ACP、AKP、SOD 的活性进行了检测, Rm 群体每克总蛋白中 ACP 的酶活为(18.94±11.62)U, Vm 群体每克总蛋白中 ACP 的酶活为(33.97±19.21)U, Rm 群体的酶活显著低于 Vm($P<0.05$)(图 1a)。Rm 群体每克总蛋白中 AKP 的酶活为(123.21± 43.44)U, 显著低于 Vm 群体 AKP 的酶活(158.65± 43.14)U($P<0.05$)(图 1b)。Rm 群体每克总蛋白 SOD 的酶活为(71.69± 21.04)U, Vm 群体为(80.11± 29.48)U, 二者无显著差异($P>0.05$)(图 1c)。

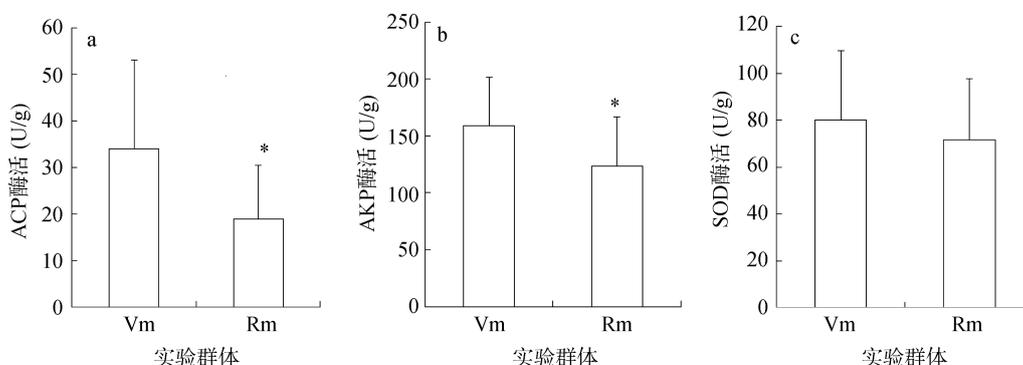


图 1 Vm 群体和 Rm 群体酸性磷酸酶、碱性磷酸酶及超氧化物歧化酶活性的比较

Fig.1 Comparison of ACP, AKP and SOD activity between group Vm and Rm(图 2 同)

a. 酸性磷酸酶; b. 碱性磷酸酶; c. 超氧化物歧化酶; * 两组之间存在显著性差异($P<0.05$)

a. ACP; b. AKP; c. SOD; *. significant difference between two groups ($P < 0.05$) (the same in Fig.2)

2.4 Rn 群体和 Vn 群体 WSSV 攻毒后存活率的比较

为验证 WSSV 耐受群体与未经历过病毒感染的虾是否在对 WSSV 的抗性上存在差异, 我们对 Rn 群体和 Vn 群体重新进行攻毒实验。攻毒后 Rn 群体和 Vn 群体的存活率如图 2 所示。Rn 群体攻毒后存活率为 33.2% 显著高于 Vn 群体的存活率 15.1% ($P<0.05$)。

2.5 Rn 群体和 Vn 群体 ACP 和 AKP 酶活的比较

对 Rn 和 Vn 群体在 WSSV 感染后 6 h 的 ACP 和 AKP 的酶活进行分析的结果表明, 在 WSSV 感染后 6 h, Rn 群体 ACP 的酶活为(78.85±24.60)U/g 蛋白, 显著低于 Vn 群体 ACP 的酶活(126.67±34.41)U/g 蛋白 ($P<0.05$); Rn 群体 AKP 的酶活为(854.39± 533.01)U/g 蛋白, 显著低于 Vn 群体 AKP 的酶活

(1705.56±991.77)U/g 蛋白($P<0.05$)(图 3a 和图 3b)。

3 讨论

本研究以人工感染的方式将易感 WSSV 的个体

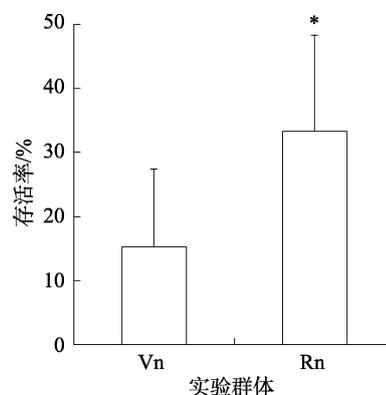


图 2 Vn 群体和 Rn 群体在 WSSV 感染后的存活率比较

Fig.2 Comparison of survival rate between group Rn and Vn

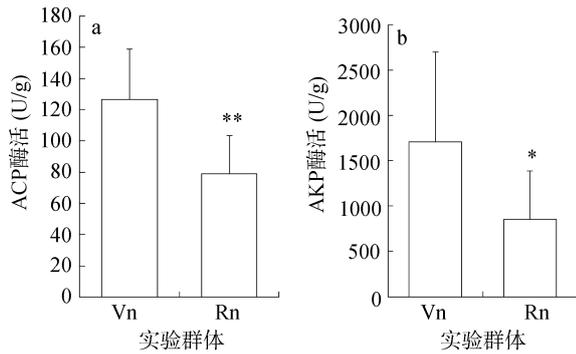


图3 Vn 群体和 Rn 群体在 WSSV 攻毒 6 h 后酸性磷酸酶和碱性磷酸酶酶活的比较

Fig.3 Comparison of ACP and AKP activity between group Rn and Vn at 6 h

a. 酸性磷酸酶; b. 碱性磷酸酶; *. 对照组与实验组酶活有显著性差异 ($P < 0.05$); **. 对照组与实验组酶活有极显著性差异 ($P < 0.01$)

a. ACP; b. AKP; *. significant difference ($P < 0.05$); **. extremely significant difference ($P < 0.01$)

淘汰, 剩余存活的个体被认为对 WSSV 有耐受性, 通过此种方法获得了脊尾白虾 WSSV 耐受群体。尽管口服感染是 WSSV 感染的最佳方式, 但是考虑到口服感染难以控制每尾虾感染的剂量, 因而本研究采用了人工注射感染的方式。人工注射可以保证存活虾确实都经历过和死亡虾同等剂量 WSSV 的感染。Rm 群体中病毒含量和 Vm 群体没有显著差异, 提示 Rm 群体中动物体反应已经恢复到感染前状态, 相关酶活能够反映脊尾白虾的正常生理水平。Rm 群体的 ACP 和 AKP 酶活均显著低于 Vm 群体, 而两者在 SOD 酶活上无显著差异, 说明 ACP 和 AKP 酶活的差异有可能作为评价虾类对 WSSV 耐受性的指标。在哺乳动物中, ACP、AKP 可以被用作早期检测山羊急性肾损伤的指标^[12], 牛乳液中的 ACP 和 AKP 酶能够作为乳腺细胞被细菌感染的潜在指标^[13]。在无脊椎动物, 如扇贝、虾和蟹类中, ACP 和 AKP 曾被用作潜在的免疫能力相关指标^[14-17]。在日本对虾抗病子三代与对照组的 WSSV 攻毒实验中, 0~24 h 子三代和对照组的 ACP 活力都是上升的, 但对照组增长较快, 而 AKP 在攻毒之后先上升后下降, 且子三代酶活最终低于对照组, 该结果暗示抗病子三代能够更好地平衡机体内 ACP 和 AKP 的代谢水平, ACP 和 AKP 酶活的稳定可能是虾具有更高的 WSSV 耐受性的一个代表^[9]。投喂铁线草(*Cyanodon dactylon*)的提取物能够增强斑节对虾抵抗 WSSV 的能力, 但是投喂过该提取物的虾和不投喂该提取物的虾在 SOD 活力上并无显著差异^[18]。日本囊对虾抗 WSSV 子三代和普通日本囊对虾在 SOD 活性上也无显著差异^[9]。

这些研究表明, ACP 与 AKP 活力高低有可能作为衡量虾类抗 WSSV 能力的潜在指标。

对 Rn 群体和 Vn 群体在 WSSV 感染后的存活率比较的结果表明, Rn 群体在 WSSV 感染后的存活率明显高于 Vn 群体。酶活检测的结果表明, Rn 群体和 Vn 群体在感染后 6 h, ACP 和 AKP 的酶活也存在显著差异且 Rn 群体酶活低于 Vn 群体, 与之前检测结果相似, 进一步说明 ACP 和 AKP 作为对虾抗 WSSV 耐受性检测指标具有一定可行性。

本研究筛选得到 ACP 和 AKP 可以作为指示虾类抗 WSSV 能力的免疫指标, 可为虾类抗病家系选育提供参考。然而由于酶活力会受到环境条件及机体生理活动等各种因素的影响, 建立对虾相关酶活的检测标准, 进一步确定对虾抗病性能定量检测的指标将作为下一步研究的重点。

参考文献:

- [1] Li F H, Xiang J H. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China[J]. *Developmental and comparative immunology*, 2012, 39(1-2): 11-26.
- [2] 黄捷, 杨丛海, 于佳, 等. T-E 染色法用于对虾暴发性流行病的现场快速诊断[J]. *海洋科学*, 1995, 19(1): 29-33.
- [3] 何建国, 周化民, 姚伯, 等. 白斑综合征杆状病毒的感染途径和宿主种类[J]. *中山大学学报*, 1999, 38(2): 65-69.
- [4] 王专伟, 黄建华, 杨其彬, 等. 感染白斑综合征病毒的斑节对虾免疫酶变化特征[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(9): 1852-1854.
- [5] 魏克强, 许梓荣. 对虾的免疫机制及其疾病预防策略的研究[J]. *中国兽医杂志*, 2004, 38(9): 25-29.
- [6] Fridovich I. Superoxide dismutases-an adaptation to a paramagnetic gas[J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(14): 7761-7764.
- [7] 姚翠鸾, 王维娜, 王安利. 水生动物体内超氧化物歧化酶的研究进展[J]. *海洋科学*, 2003, 27(10): 18-21.
- [8] 刘晓云, 张志峰, 马洪明. 中国明对虾血细胞酶细胞化学的初步研究[J]. *青岛海洋大学学报*, 2002, 32(2): 259-265.
- [9] 纪荣兴, 邹文政, 鄢庆彬, 等. 日本对虾抗白斑病子三代的抗白斑综合征病毒感染能力及免疫特性[J]. *水产学报*, 2008, 32(1): 98-104.
- [10] Sun Y M, Li F H, Chi Y H, et al. Enhanced resistance of marine shrimp *Exopalaemon carinicauda* Holt-huis to WSSV by injecting live VP28-recombinant bacteria[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2013, 32(2): 52-58. in press

- [11] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1-2): 248-254.
- [12] Marja R R, Elise M K, Minna M R, et al. Early detection of ketoprofen-induced acute kidney injury in sheep as determined by evaluation of urinary enzyme activities[J]. *American journal of Veterinary Research*, 2010, 71(10): 1246-1252.
- [13] Larsen T, Rontved C M, Ingvarsten K L, et al. Enzyme activity and acute phase proteins in milk utilized as indicators of acute clinical *E. coli* LPS-induced mastitis[J]. *Animal: an International Journal of Animal Bioscience*, 2010, 4(10): 1672-1679.
- [14] Zhang Z F, Shao M Y, Kang K H. Changes of enzyme activity and hematopoiesis in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck) induced by white spot syndrome virus and zymosan A[J]. *Aquac Res*, 2005, 36(7): 674-681.
- [15] Chen J H, Mai K S, Ma H M, et al. Effects of dissolved oxygen on survival and immune responses of scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 22(3): 272-281.
- [16] Sung H H, Lin Y H, Hsiao C Y. Differential immune responses of the green neon shrimp (*Neocaridina denticulate*) to dipropyl phthalate[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 31(3): 511-515.
- [17] Qin Q, Qin S J, Wang L, et al. Immune responses and ultrastructural changes of hemocytes in freshwater crab *Sinopotamon henanense* exposed to elevated cadmium[J]. *Aquatic Toxicology*, 2012, 106/107: 140-146.
- [18] Balasubramanian G, Sarathi M, Venkatesan C, et al. Studies on the immunomodulatory effect of extract of *Cyanodon dactylon* in shrimp, *Penaeus monodon*, and its efficacy to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25(6): 820-828.

Analysis on the activity of immune related enzymes in survived *Exopalaemon carinicauda* from WSSV infection

FENG Ning-ning^{1, 2}, SUN Yu-miao¹, WEN Rong^{1, 2}, ZHANG Cheng-song¹, LI Fu-hua¹

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Mar., 1, 2013

Key words: *Exopalaemon carinicauda*; WSSV; ACP; AKP; SOD

Abstract: The white spot syndrome(WSS)had caused great economic loss to shrimp aquaculture. Seeking effective indicator for anti-WSSV ability in shrimp is very important to aquaculture industry. In the present study, *Exopalaemon carinicauda* was chosen as a investigation target. The activities of different enzymes, including acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP) and superoxide dismutase (SOD), in the individuals survived from WSSV injection (WSSV tolerance population, Rm), and individuals subject to PBS injection (control population, Vm) were examined and compared in order to screen shrimp anti-virus indicators. The data showed that the activities of ACP and AKP in Rm were significantly lower than those in Vm, while the activity of SOD showed no difference between them. In order to explore whether individuals survived from WSSV infection showed higher anti-WSSV ability than normal shrimp, we took another batch of shrimp survived from natural WSSV infection as WSSV tolerance population (Rn), and shrimp without WSSV infection as control population (Vn) to perform WSSV injection. The cumulative mortality and survival rate were compared between Rn and Vn, and the data showed that Rn had significantly higher survival rate than Vn. These data suggest that ACP and AKP have the potential to be developed as indicators for evaluation of the anti-WSSV ability of shrimp.

(本文编辑: 谭雪静)