

白斑综合征病毒感染克氏原螯虾后的 PCR 检测 及组织病理学研究

朱 斐¹, 吕梦园¹, 许梓荣²

(1. 浙江农林大学林业与生物技术学院, 浙江临安 311300;

2. 浙江大学动物科学学院, 杭州 310058)

摘要: 采用投喂感染白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV) 对虾肌肉的方式, 对养殖克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) 进行人工感染, 以确定 WSSV 对养殖克氏原螯虾的易感性。结果发现, 投喂病虾感染组螯虾的死亡率达到 90%, 而对照组未出现死亡。采用 PCR 对试验组螯虾的肌肉进行 WSSV 检测, 发现投喂感染组的阳性检出率为 100%, 对照组的阳性检出率均为 0。PCR 检测结果发现, 濒死螯虾的肝胰腺、中肠、肌肉、鳃、性腺、心脏六种组织的 PCR 结果均为 WSSV 阳性, 而对照组的各组织检测结果均为阴性。组织切片的光镜观察也证实, 濒死螯虾的肝胰腺、中肠、肌肉、鳃、性腺、心脏及血淋巴等组织均发生了不同程度的病变。

关键词: 克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) ; 白斑综合征病毒; 人工感染; 组织病理学; PCR

中图分类号: S945.4⁺99

文献标识码: A

文章编号: 1000-6907-(2012)06-0043-06

PCR detection of White Spot Syndrome Virus infected *Procambarus clarkii* and histopathological study

ZHU Fei¹, LV Meng-yuan¹, XU Zi-rong²

(1. College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China;

2. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Experimental infection of crayfish, *Procambarus clarkii*, were conducted by feeding white spot syndrome virus (WSSV) infected shrimp, *Penaeus chinensis* to determine the susceptibility of crayfish to WSSV. The results showed that a cumulative mortality of 90% was observed in the infected crayfish, while no death in control group. Crayfish that dead in oral infection was positive for the presence of WSSV by PCR. PCR detection results also showed that six tissues including hepatopancreas, mid-intestine, muscle, gills, gonad and heart of dying crayfish were positive to WSSV, while those were negative in control group. Optical microscope observation also proved that hepatopancreas, mid-intestine, muscle, gills, gonad, heart and hemolymph of dying crayfish showed pathological variation to different degree.

Key words: *Procambarus clarkii*; white spot syndrome virus; artificial infection; histopathology; PCR

对虾白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV) 是对全球对虾养殖业危害最大、传播最广的病毒, 我国自 1993 年暴发此病以来, 对虾养殖业受到沉重的打击, 几乎所有养殖虾类皆可被其感染。WSSV 毒力较强, 3 ~ 10 d 内被感染的虾死亡率可达 100%^[1-3]。WSSV 还能感染包括虾蟹在内的许多甲壳动物, 已知的有 18 种对虾、8 种

长臂虾、38 种蟹、7 种龙虾、7 种螯虾能被 WSSV 感染^[4-6]。克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) 属甲壳纲十足目螯虾亚目刺蛄科原螯虾属, 是新兴的水产养殖品种, 但是近年来陆续有养殖的克氏原螯虾因感染 WSSV 而大量死亡的报道^[7]。本研究利用实验室保藏的中国对虾体内的 WSSV 对养殖的克氏原螯虾进行感染试验, 再进行 PCR 检测和组织病理

收稿日期: 2012-05-15; 修订日期: 2012-07-09

资助项目: 国家自然科学基金青年基金(31001127)

第一作者简介: 朱 斐, 男, 博士, 从事水产动物营养与免疫研究。E-mail: zhufei@zju.edu.cn

学研究, 以期了解 WSSV 在甲壳类不同经济动物的发病机理和感染机制的异同提供理论和实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

WSSV 毒种分离自 2003 年宁波象山发病的中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*), -80°C 保存。试验用螯虾购自杭州水产批发市场, 平均体重约 20 g, 体长约 8 cm, 在实验室暂养一周以上。试验用螯虾饲料由江苏大江饲料有限公司提供。聚合酶链式反应 (PCR) 扩增用 *Taq* 酶、dNTP 等购自宝生物公司。病毒 DNA 提取试剂盒购自上海生工公司。100 bp DNA Ladder Marker 购自 Fermentas 公司。

1.2 方法

1.2.1 白斑综合征病毒感染螯虾

在实验室暂养一周以上, 健康存活的虾用作 WSSV 攻毒试验。用口服病虾肉感染 WSSV 致死的对虾进行口服感染螯虾, 攻毒后观察 7~10 d, 从垂死的螯虾取肝胰腺、中肠、肌肉、鳃、性腺、心脏六种组织作 PCR 检测, 将确定为 WSSV 感染的螯虾收集并于 -80°C 保存。

1.2.2 WSSV 的 PCR 检测

病毒 DNA 根据试剂盒操作步骤进行提取, 提取出的 DNA 样品利用引物 (Forward: 5'-CTTT-CACTCTTTCGGTCGTG-3', Reverse: 5'-TTCTGC-CCCACAGTCACTTC-3') 进行 PCR 反应扩增囊膜蛋白 VP28 基因片段。PCR 反应体系: DNA 模板 (WSSV DNA) 1 μL ; $10\times$ PCR 扩增缓冲液 5 μL ; MgCl_2 (25 mmol/L) 3 μL ; dNTPs 1 μL ; 上游引物 (20 mmol/L) 1 μL ; 下游引物 (20 mmol/L) 1 μL ; *Taq* 酶 1 μL 。加超纯水至总体积为 50 μL (以上都在冰上操作), 置于 PCR 仪内进行扩增。PCR 程序为: 94°C 2 min; 94°C 1 min 59°C 1 min 72°C 1 min, 运行 30 个循环; 72°C 10 min; 10°C 5 min。PCR 产物加入琼脂糖凝胶中进行电泳, 电泳结束后用 Image master VDS 成像系统检测目的条带。

1.2.3 血涂片的制作及观察

配制抗凝剂 称取 10 mg 肝素钠溶于 1 mL 双蒸水中。用 1 mL 一次性无菌注射器吸取 500 μL , 再从螯虾靠近心脏处抽取等量的血淋巴, 滴在已消毒的载玻片上, 另取一片载玻片作推片, 将推片自血滴左侧向右移动, 当血滴均匀地附着在两片之间后, 再将推片向左平稳地推移 (两片成 $30\sim45^{\circ}$ 夹

角) 推出均匀的血膜。在 Leica Qwin 图像分析仪上观察并拍照。

1.2.4 光镜组织切片制作与观察

于口服攻毒 3 d 后分别取口服感染组和阴性对照组螯虾, 从螯虾腹足基部抽取血淋巴, 用于制作血涂片进行光镜观察。另取肝胰腺、中肠、肌肉、鳃、性腺、心脏组织样品用甲醛固定过夜, 将固定好的组织样品置于组织脱水机 (Leica TP1020) 进行乙醇系列脱水及二甲苯透明, 在组织包埋机 (Leica EG1160) 上进行石蜡包埋。用石蜡切片机 (Leica RM2135) 进行连续切片, 厚约 6 μm , 用毛笔将切片移至展片机 (Leica HI1210) 内展片和沾片, 再置于染色机 (Leica Autostainbr XL) 内, 按文献 [6] 的方法进行 HE 染色, 中性树胶封片, 在 Leica Qwin 图像分析仪上观察并拍照。

1.2.5 WSSV 透射电镜观察

在口服攻毒 3 d 后分别取 WSSV 攻毒组和阴性对照组螯虾, 取肝胰腺、中肠、肌肉、鳃的组织样品。各组织样品大小约 1 mm^3 , 样品在 2.5% 戊二醛溶液中 4°C 固定过夜; 倒掉固定液, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 漂洗样品 3 次, 15 min/次; 1% 的锇酸溶液固定样品 1~2 h; 倒掉固定液, 以 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 漂洗样品 3 次, 15 min/次; 用梯度浓度 50%、70%、80%、90%、95% 的乙醇进行脱水处理, 每种浓度处理 15 min, 再用 100% 的乙醇处理 20 min, 最后过渡到纯丙酮处理 20 min; 以包埋剂与丙酮的混合液 (体积比 = 1:1) 处理样品 1 h; 以包埋剂与丙酮的混合液 (体积比 = 3:1) 处理样品 3 h; 纯包埋剂处理样品过夜; 将经过渗透处理的样品包埋, 70°C 加热过夜后, 即得到包埋好的样品; 超薄切片染色: 柠檬酸铅液和醋酸双氧铀 50% 乙醇饱和液染色, JEM-1200EX 型透射电镜观察和拍照。从螯虾体内抽取的血淋巴用 2% 磷钨酸 (pH 7.0) 负染后, 也在透射电镜下观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 WSSV 感染后螯虾的死亡率及 PCR 检测结果

WSSV 口服感染螯虾 15 d 后, 投喂病虾组螯虾的死亡率达到 90%。而对照组未出现死亡。PCR 检测结果显示投喂病虾组的病毒阳性检出率为 100% (30/30), 而阴性对照组的阳性检出率为 0% (0/20)。死亡率 = 死亡个数 / 总个数 $\times 100\%$ 。PCR 检测结果显示, 病死螯虾的肝胰腺、中肠、肌肉、

鳃、性腺、淋巴六种组织的 PCR 结果均为 WSSV 阳性, 而对照组健康螯虾的各组织 PCR 检测结果均为阴性。光镜和电镜观察也发现与健康螯虾比较病死螯虾的肝胰腺、中肠、肌肉、鳃、性腺、淋巴等组织均发生了不同程度的病变并发现有 WSSV 病毒粒子存在。

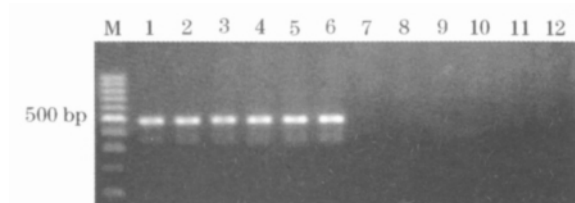


图1 WSSV 感染螯虾与健康螯虾6种组织的 PCR 检测结果

Fig. 1 WSSV DNA detected by PCR in five organ extracts from *P. clarkii* exposed to WSSV by oral infection
M: 分子标准, 1: 中肠, 2: 血淋巴, 3: 肝胰腺, 4: 肌肉, 5: 鳃, 6: 性腺, 7-12: 健康螯虾中肠、血淋巴、肝胰腺、肌肉、鳃、性腺

2.2 组织病理学分析

对照组健康螯虾肝小管外壁由单层扁平细胞包围, 各肝小管之间有结缔组织与脂肪组织包裹与分隔, 并伴有血管分布(图 2a-1)。攻毒濒死螯虾的肝胰腺组织病理学变化十分明显, 光镜下可见肝胰腺组织广泛受损, 吸收与分泌细胞大量地解体并空泡化(图 2a-2)。肝小管的管腔扩大或破裂, 肝小管之间的结缔组织发生缺失, 脂肪细胞大量溶解, 血管大多破碎。对照组健康螯虾的肌肉组织肌纤维规则均匀, 细胞核大小一致分布均匀, 未发现异常症状(图 2b-1)。而攻毒濒死螯虾的肌肉组织呈现波浪化纹理, 细胞核大量减少, 且固缩变形(图 2b-2)。健康螯虾的中肠内壁为高柱状上皮组织, 具纤毛刷状缘, 肠内壁向肠腔突起许多皱褶。肌肉层与肠内壁之间有大量结缔组织与脂肪组织填充(图 2c-1)。与健康螯虾的中肠组织相比, 攻毒后濒死螯虾的中肠组织病变主要表现为肠内壁高型柱状上皮组织严重损伤和坏死, 上皮细胞大量萎缩、细胞核大量减少, 脱落高型柱状上皮组织与结缔组织相剥离, 攻毒后期肠腔中可发现有崩落的上皮组织块、坏死的上皮细胞和大量的空白区域(图 2c-2)。性腺和心脏也被认为是 WSSV 感染的主要器官, 光镜下攻毒螯虾的性腺和心脏组织细胞核肿胀, 核浓染并固缩, 细胞致密变化, 细胞排列杂乱无章, 界限消失(图 2d, e-2)。而在对照健康螯虾

的两种组织内细胞排列有序, 细胞界限分明, 细胞器完整(图 2d, e-1)。对照组健康螯虾的鳃组织细胞分布均匀, 细胞器十分完整, 细胞核很规则, 染色质分布均匀(图 2f-1)。而攻毒后濒死螯虾的鳃组织发生严重病变, 核染色质发生碎裂、边缘化, 核仁的形态很模糊, 细胞的分布也不均匀(图 2f-2)。

在光镜下发现, 健康螯虾的血淋巴中含有大量的颗粒细胞和透明细胞, 细胞结构完整, 分布均匀。而攻毒螯虾的血淋巴中透明细胞和颗粒细胞消失, 只有少量细胞碎屑, 细胞核碎片化(图 3a, b)。透射电镜下观察从病虾体内抽取的血淋巴, 发现有 WSSV 粒子存在于血淋巴里(图 3c)。

电镜观察发现, 在攻毒螯虾体内, 肝胰腺组织内细胞器的大量损伤、坏死使细胞质中呈现大片空洞, 在肝胰腺细胞内未发现病毒粒子, 但周围的结缔组织内却发现大量病毒粒子(图 4a), 说明病毒粒子主要侵染结缔组织。肌肉的结缔组织内出现少量的病毒粒子, 大量结缔组织空泡化(图 4b)。攻毒后螯虾的中肠组织病变主要表现为上皮细胞大量萎缩, 细胞核大量减少, 细胞内有大量的病毒粒子, 并伴随着细菌的大量滋生。说明螯虾在受到病毒侵染后, 自身机体的抵抗力下降, 细菌乘机在肠道细胞内繁殖(图 4c)。鳃组织被严重感染, 大量的病毒在细胞内增殖, 细胞膜内外可见大量的黑色粒子, 染色质消失, 细胞核膨胀, 细胞质崩溃(图 4d)。

3 讨论

与对虾感染白斑综合征病毒不同的是, 克氏原螯虾感染后的死亡率为 90%, 而阳性检出率却是 100%, 说明有 10% 的螯虾是存活的白斑综合征病毒携带者。现有的研究成果也表明, 克氏原螯虾是南美白对虾白斑综合征病毒的中间宿主和越冬宿主, 也就是说池塘里的克氏原螯虾能携带白斑综合征病毒越冬, 并且在来年再传染给南美白对虾^[8]。因此在实际养殖生产中, 特别是发生过白斑综合征病害的池塘, 要充分利用冬闲处理的时机, 彻底清除池塘里的克氏原螯虾。

有研究指出 WSSV 先感染宿主血细胞, 再通过血液循环将病毒粒子传播到宿主体内的其它组织^[9]。本研究也发现 WSSV 可以感染螯虾的血细胞, 并使血细胞大量减少, 这与李钊等^[10]的研究结果相同。WSSV 感染的细胞主要分布在外胚层和

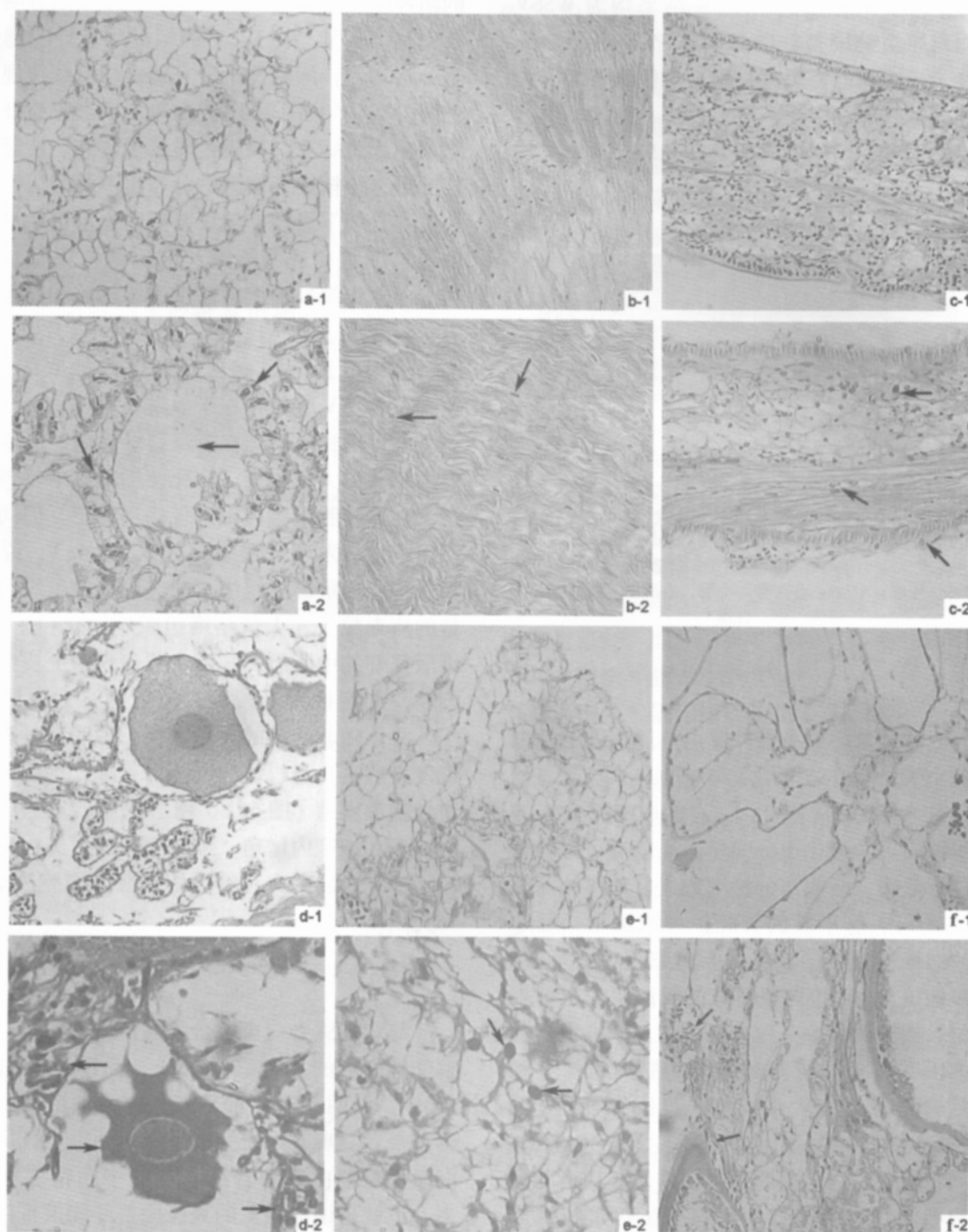


图2 肝胰腺(a)、肌肉(b)、中肠(c)、性腺(d)、心脏(e)、鳃(f)切片光镜观察(400×)
Fig. 2 Optical microscope observation of hepatopancreas (a), muscle (b), mid-intestine (c), gonad (d), heart (e) and gills (f) tissues (400×)
-1 组分别为阴性对照组的组织切片, -2 组分别为 WSSV 感染组的组织切片, 箭头所示为各组织病毒感染的病理变化。

中胚层起源的组织,如表皮、鳃、肌肉、前肠、后肠、胃、性腺、淋巴组织、心脏、触角腺以及神经系统的相关细胞等^[11-13]。由于甲壳动物特殊的摄食方式,感染 WSSV 病虾的肌肉等组织很容易被其它甲壳动物摄食并在水中释放出病毒粒子,病毒粒子可以经鳃

部感染宿主,而鳃也被公认是 WSSV 感染较严重的部位。本研究也发现 WSSV 在鳃组织的细胞内大量增殖,同时中肠的细胞内也发现有 WSSV 的大量增殖,中肠是螯虾肠道中与消化、吸收密切相关的部位,也被认为是 WSSV 感染螯虾的主要部位^[14]。

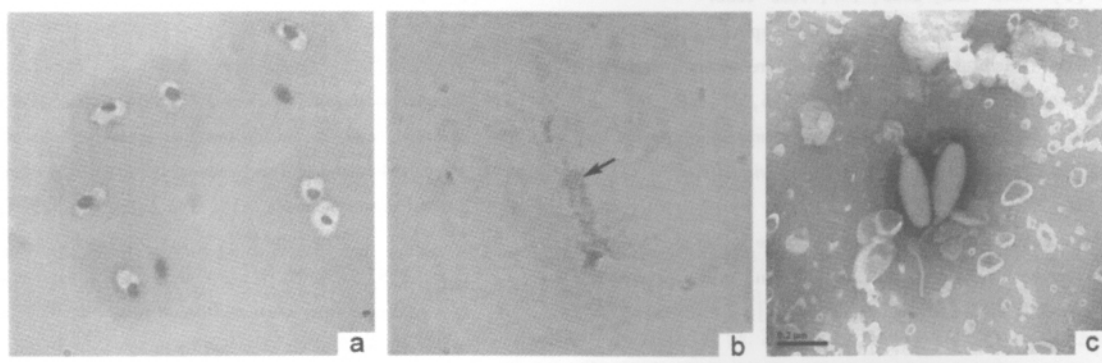


图 3 健康螯虾与感染 WSSV 螯虾血淋巴的光镜(400×)和电镜观察

Fig. 3 Optical microscope observation (400×) and transmission electron micrograph (negative staining, PTA, Bar, 0.2 μm) of haemolymph of *P. clarkii*

a, 阴性对照; b, 感染 WSSV 螯虾光镜观察; c, 感染 WSSV 螯虾电镜观察, 箭头所示为病变部位。

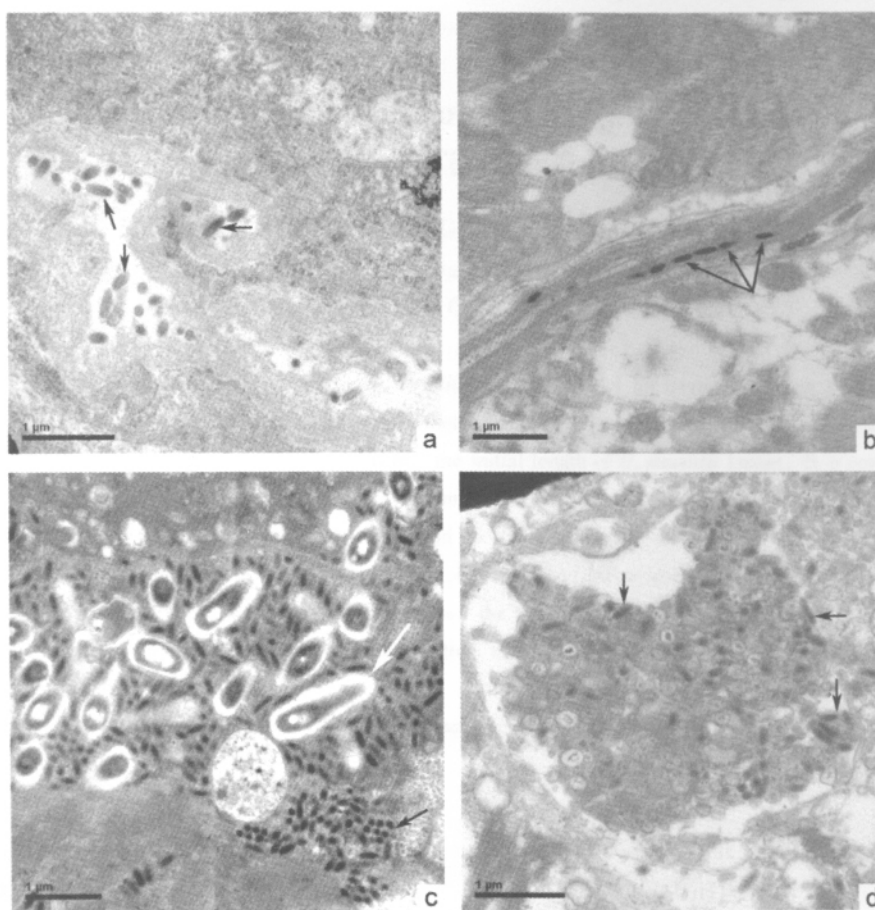


图 4 肝胰腺(a)、肌肉(b)、中肠(c)、鳃(d)切片电镜观察

Fig. 4 Transmission electron micrograph (Bar, 1 μm) of hepatopancreas (a), muscle (b), intestine (c), and gills (d) tissues respectively

黑箭头所示为白斑综合征病毒粒子, 白箭头所示为大肠杆菌。

参考文献:

- [1] Chou H Y, Huang C Y, Wang C H, et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan [J]. Dis Aquat Org, 1995, 23: 165-173.
- [2] Chang P S, Chen H C, Wang Y C. Detection of white spot syndrome associated baculovirus WSBV in experimentally infected wild shrimps, crabs and lobsters by in situ hybridization [J]. Aquaculture, 1998, 164: 23-43.
- [3] Mayo M A. A summary of taxonomic changes recently approved by

- ICTV [J]. Arch Virol, 2002, 147: 1655-1656.
- [4] Lo C F, Ho C H, Peng S E, et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods [J]. Dis Aquat Org, 1996, 27: 215-225.
- [5] Corbel V, Zuprisal Z, Shi Z, et al. Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV) [J]. J Fish Dis, 2001, 24: 377-382.
- [6] Escobedo-Bonilla C M, Alday-Sanz V, Wille M, et al. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus [J]. J Fish Dis, 2008, 31: 1-18.
- [7] 丁正峰, 薛 晖, 夏爱军, 等. 白斑综合征病毒在养殖克氏原螯虾中感染流行研究 [J]. 南京农业大学学报, 2008, 31(4): 129-133.
- [8] Bell T A, Lightner D V. A handbook of normal penaeid shrimp histology [M]. Baton Rouge USA: World Aquaculture Society, 1988.
- [9] Di L V A, Bonnichon V, Roch P, et al. Comparative WSSV infection routes in the shrimp genera *Marsupenaeus* and *Palaemon* [J]. J Fish Dis, 2005, 28: 565-569.
- [10] 李 钊, 杨 丰. 对虾白斑综合征病毒对螯虾血淋巴原代细胞的感染 [J]. 高技术通讯, 2002, 12: 74-77.
- [11] Wongteerasupaya C, Vickers J E, Sriairatana S, et al. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon* [J]. Dis Aquat Org, 1995, 21: 69-77.
- [12] Chang P S, Lo C F, Wang Y C, et al. Identification of white spot syndrome virus associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization [J]. Dis Aquat Org, 1996, 27: 131-139.
- [13] Wang Y G, Hassan M D, Shariff M, et al. Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation [J]. Dis Aquat Org, 1999, 39: 1-11.
- [14] 何建国, 周化民, 姚 伯, 等. 白斑病杆状病毒的感染途径和宿主种类 [J]. 中山大学学报, 1999, 14(4): 358-361.