

传染性皮下及造血组织坏死病毒 对南美白对虾仔虾的人工感染研究

王静静,于吉悦,侯子豪,常林瑞,李 婷,闫冬春

(鲁东大学 农学院,山东 烟台 264039)

摘要: 传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV) 是危害对虾养殖产业的重要病原之一,其分布广泛,危害性大,感染性强,给对虾养殖造成巨大的经济损失。IHHNV 对宿主的致病性与宿主的年龄、大小密切相关。本文通过人工投喂的方式对健康南美白对虾仔虾进行室内感染实验,运用普通 PCR、荧光定量 PCR 检测 IHHNV 感染情况及病毒载量,结果表明仔虾能够通过人工投喂的方式感染 IHHNV,且 IHHNV 感染率为 43.3%,病毒载量最高为 $28.7 \text{ copies} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ DNA}$,此实验结果可为南美白对虾人工养殖中 IHHNV 的有效防治提供理论依据。

关键词: 传染性皮下及造血组织坏死病毒;南美白对虾仔虾;人工感染

中图分类号: S9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-8020(2021)02-0151-06

传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, IHHNV) 是一种危害严重且分布广泛的对虾病毒,它是已知最小的对虾病毒,具有 4.1kb 的线性单链 DNA 分子^[1]。IHHNV 在世界许多国家都有报道,如墨西哥、澳大利亚、新加坡、马来西亚、泰国、印度尼西亚、菲律宾、印度、韩国、巴西、阿根廷、委内瑞拉等^[2-3]。自 2001 年以来,中国沿海地区的对虾和蟹中均检测到 IHHNV^[4]。近年来, IHHNV 在广东、广西、海南、上海、浙江等省份的对虾养殖业中普遍存在^[5-8]。

IHHNV 可感染大多数野生和养殖虾,包括细角滨对虾(*Penaeus stylirostris*)、南美白对虾(*Penaeus vannamei*) 和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) 等。IHHNV 对宿主的致病性与宿主的年龄、大小密切相关,幼虾更容易感染 IHHNV 且 IHHNV 对幼虾有更强的致病性^[9]。细角滨对虾仔虾和稚虾容易感染 IHHNV 并具有较强的致病性,细角滨对虾成虾感染 IHHNV 后的致病性明显较轻^[10]。IHHNV 感染罗氏沼虾仔虾,可致其 80% 的死亡率^[11]。而 IHHNV 感染罗氏沼虾次成虾可致其生长缓慢,罗氏沼虾成虾感染 IHHNV 无

明显病理学变化,仅表现为 IHHNV 携带^[12]。南美白对虾作为对虾养殖产业最主要的养殖品种之一。为研究 IHHNV 对南美白对虾仔虾的感染性,本实验通过人工投喂的方式对南美白对虾仔虾进行室内感染实验,并采用 PCR 和荧光定量 PCR 方法对 IHHNV 感染情况进行检测分析,为明确南美白对虾感染 IHHNV 的敏感期、有效防治 IHHNV 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样本来源

用于攻毒实验的健康南美白对虾仔虾来自东营森森养殖场,平均体长为 $1.2 \pm 0.1 \text{ cm}$,平均重量为 $0.006 \pm 0.001 \text{ g}$,喂养在 150 cm 长、60 cm 高、80 cm 宽的水族箱中,养殖用水经消毒、过滤和沉淀,盐度为 20 ‰,暂养期间定时喂食,定期换水,投喂采用配合饲料。南美白对虾仔虾暂养 10 d 后,随机挑取 10 只经普通 PCR 方法进行常见对虾病原 IHHNV、白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)、虾肝肠胞虫

收稿日期: 2021-01-15; 修回日期: 2021-03-03

基金项目: 山东省自然科学基金面上项目(ZR2019MD020)

第一作者简介: 王静静(1991—), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生, 研究方向为动物学。E-mail: 1356779741@qq.com

通信作者简介: 闫冬春(1971—), 女, 山东菏泽人, 教授, 硕士研究生导师, 博士, 研究方向为水产动物病害。E-mail: yandongchun@ldu.edu.cn

(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP) 排除检测, 病原 IHNV 的检测方法见本文 1.5, 病原 WSSV 的检测依据闫冬春等^[13]建立的普通 PCR 检测方法。病原 EHP 的检测方法来源于本实验室研究设计的方法, 病原检测为阴性方可进行攻毒实验。

1.2 病料的制备

南美白对虾仔虾 IHNV 攻毒实验采用人工投喂的方式。病料来源为采自烟台地区只感染 IHNV 阳性的南美白对虾成虾, 去除头胸甲后, 取头部肌肉, 用剪刀剪碎或者研钵进行碾磨并充分混匀, 取混匀组织, 按照 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN, 目录号: DP324) 说明书步骤提取组织 DNA。经实时荧光定量 PCR 检测, 病料病毒载量为 6.52×10^3 copies $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ DNA, 将病料储存于 -80°C 超低温冰箱备用。

1.3 IHNV 人工感染实验设计

室内攻毒实验采取投喂的方式进行, 实验分为 3 组, 即空白对照组、阴性对照组、攻毒组。每组设 3 个平行小组, 即空白对照 1 组、2 组、3 组; 阴性对照 1 组、2 组、3 组; 攻毒 1 组、2 组、3 组。挑选个体大小均匀, 外观健康的南美白对虾仔虾, 每小组随机挑选 10 尾仔虾。攻毒实验第 1 至 3 天上午定时进行投喂, 空白对照组、阴性对照组、攻毒组分别投喂自身体重 10% 的正常饲料、健康虾肉、IHNV 病料。下午空白对照组、阴性对照组和攻毒组都投喂等量的正常饲料, 从第 4 天开始空白对照组、阴性对照组和攻毒组每日两次投喂正常饲料。攻毒实验持续 10 天, 海水温度为 27°C , 盐度为 20‰, 攻毒实验期间每日换水和吸底一次, 保持通气正常, 记录各组养殖情况。

1.4 DNA 提取

攻毒实验结束后, 取仔虾头胸部组织(因为南美白对虾的鳃是感染 IHNV 病毒的敏感器官, 位于虾头胸部)按照 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN, 目录号: DP324) 说明书步骤提取组织 DNA。

1.5 常规 PCR 检测 IHNV

常规 IHNV 的 PCR 检测按照世界动物卫生组织推荐的方案进行^[14]。该反应的引物是 IHNV 389F: $5' - \text{CGGAACACAACCCGACTTTA} -$

$3'$ 和 IHNV 389R: $5' - \text{GGCCAAGACCAAAATACGAA} - 3'$ 。扩增子的预测大小为 389 bp。PCR 反应体系见表 1, PCR 反应程序为 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 56°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环; 72°C 后延伸 5 min, 最后 4°C 保存。扩增结束后, PCR 产物用含 2% 溴化乙锭 (EtBr) 的琼脂糖凝胶电泳。电泳后, 将 EtBr 染色的琼脂糖凝胶紫外照射并拍照。

表 1 IHNV PCR 反应体系
Tab.1 System of IHNV PCR reaction

试剂	体积/ μL	终浓度
Takara Premix	10	1×
IHNV 引物 389	2	1 μM
DEPC 水	7	—
模板 DNA	1	—
总体积	20	

1.6 实时荧光定量 PCR 检测

采用 Chen 等^[15]基于荧光染料 SYBR Green 建立的实时荧光定量 PCR 检测方法, 该反应的引物是 IHNV 195F: $5' - \text{GGGAGTTACCTT TGCTGC} - 3'$ 和 IHNV 195R: $5' - \text{GGTCCGTCTACTGCGTCT} - 3'$ 。扩增子的预测大小为 195 bp。实时荧光定量 PCR 反应体系见表 2。荧光定量 PCR 反应程序为 95°C 预变性 30 s, 95°C 变性 5 s, 65°C 退火延伸 30 s, 40 个循环; 最后 4°C 保存。反应结束后用 Bio-Rad-CFX 管理器进行扩增、检测和数据分析。

表 2 IHNV 荧光定量 PCR 反应体系
Tab.2 System of IHNV real-time PCR reaction

试剂	体积/ μL	终浓度
SYBR Green	12.5	1×
IHNV 引物 195(10 μM)	1	0.4 μM
DEPC 水	9.5	—
模板 DNA	2	—
总体积	25	

2 实验结果

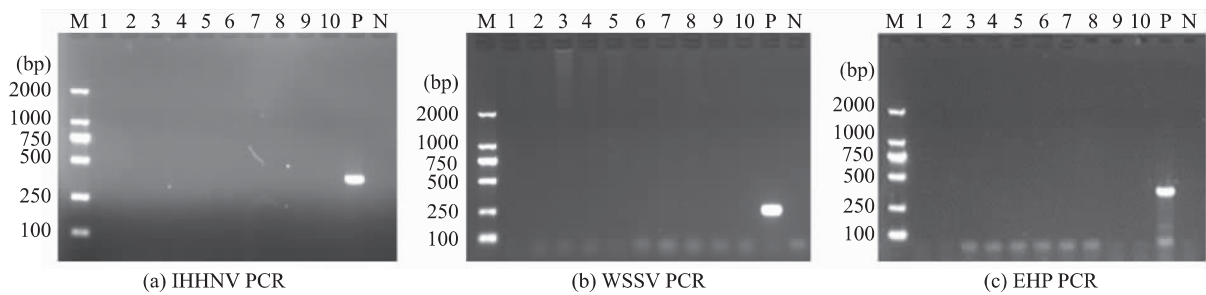
2.1 普通 PCR 检测结果

2.1.1 攻毒前常见对虾病原的普通 PCR 检测

南美白对虾仔虾 IHNV 攻毒实验前, 通过普通 PCR 进行常见病原 IHNV、WSSV、EHP 的检测, 10 尾南美白对虾仔虾的普通 PCR 检测结果

见图 1, 图 1(a) 中 10 尾南美白对虾仔虾样品在 389 bp 处无条带出现, 表明无 IHNV 感染。图 1(b) 中 10 尾南美白对虾仔虾样品在 235 bp 处无

条带出现, 表明无 WSSV 感染。图 1(c) 中 10 尾南美白对虾仔虾样品在 358 bp 处无条带出现, 表明无 EHP 感染。



1~10: 被检南美白对虾仔虾样品; N: 阴性对照; P: 阳性对照; M: Marker

图 1 IHNV, WSSV, EHP PCR 检测结果

Fig.1 PCR results of IHNV, WSSV and EHP

2.1.2 空白对照组普通 PCR 检测结果

空白对照组 30 尾南美白对虾仔虾的普通 PCR 检测结果见图 2, 阴性对照正常, 阳性对照条带位于 389 bp 处, 30 尾南美白对虾仔虾样品都无条带出现, 表明空白对照组无 IHNV 感染。

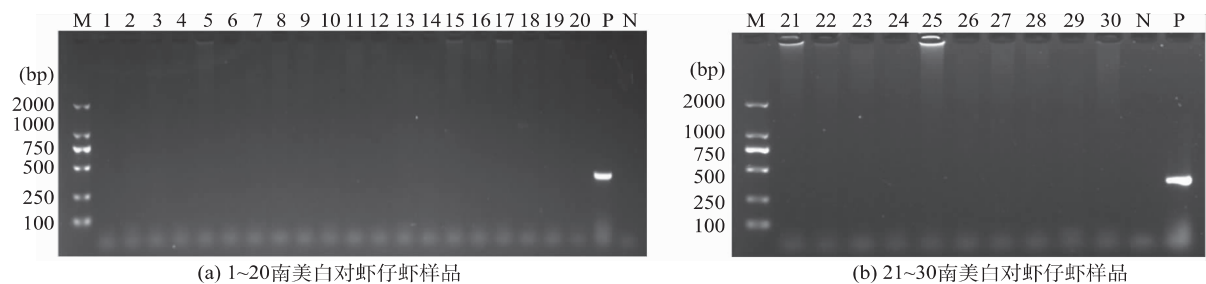
2.1.3 阴性对照组普通 PCR 检测结果

阴性对照组 30 尾南美白对虾仔虾的普通 PCR 检测结果见图 3, 阴性对照正常, 阳性对照条带位于 389 bp 处, 30 尾南美白对虾仔虾样品都无

条带出现, 表明阴性对照组无 IHNV 感染。

2.1.4 攻毒组普通 PCR 检测结果

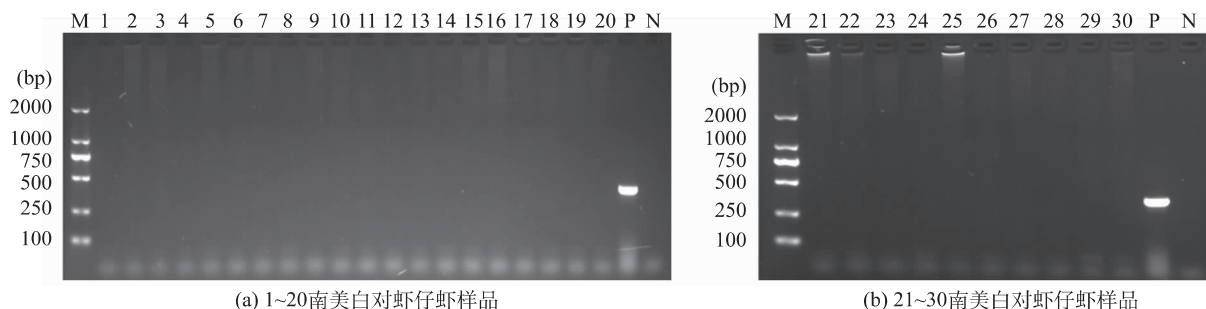
攻毒组 30 尾南美白对虾仔虾的普通 PCR 检测结果见图 4, 13 尾南美白对虾仔虾样品呈阳性, 分别为 2 号、6 号、7 号、11 号、12 号、13 号、14 号、17 号、18 号、23 号、24 号、25 号、30 号。阴性对照正常, 阳性对照条带位于 389 bp 处, 表明南美白对虾仔虾可通过人工投喂的方式感染 IHNV。



N: 阴性对照; P: 阳性对照; M: Marker

图 2 空白对照组 PCR 检测结果

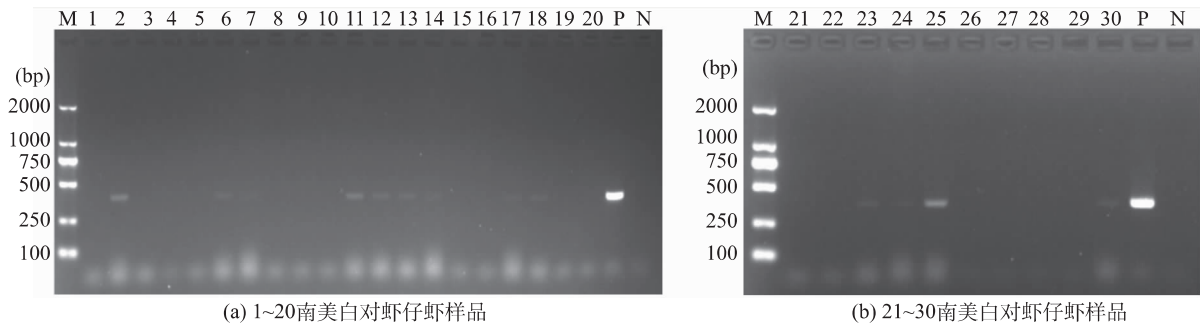
Fig.2 PCR results of control group



N: 阴性对照; P: 阳性对照; M: Marker

图 3 阴性对照组 PCR 检测结果

Fig.3 PCR results of negative control group



N: 阴性对照; P: 阳性对照; M: Marker

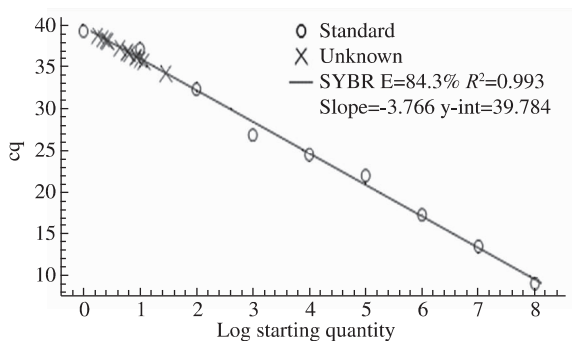
图 4 攻毒组 PCR 检测结果

Fig.4 PCR results of drug attack group

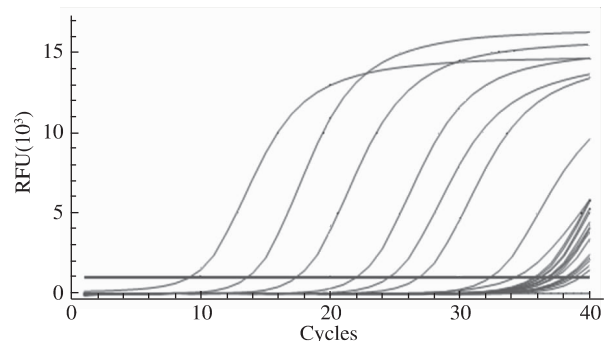
2.2 实时荧光定量 PCR 检测结果

在 2.1.4 中,攻毒组 30 尾南美白对虾仔虾经普通 PCR 检测发现 13 尾南美白对虾仔虾感染 IHNV,对这 13 尾南美白对虾仔虾样品进行实时荧光定量 PCR 检测,结果见图 5,图 5(a) 标准曲

线 $R^2 = 0.993$,表明南美白对虾仔虾样品扩增情况良好。图 5(b) 扩增曲线为南美白对虾仔虾病毒载量检测结果,13 个检测样品病毒载量具体数值见表 3,IHNV 病毒载量最高可达到 $28.7 \text{ copies} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ DNA}$,最低为 $1.7 \text{ copies} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ DNA}$ 。



(a) 标准曲线



(b) 扩增曲线

N: 阴性对照; P: 阳性对照; M: Marker

图 5 仔虾实时荧光定量 PCR 检测结果

Fig.5 Real-time PCR detection results of post larvae

表 3 南美白对虾仔虾病毒载量

Tab.3 Viral load of post larvae of *Penaeus vannamei*

样品编号	1号	6号	7号	11号	12号	13号	14号	17号	18号	23号	24号	25号	30号
单位拷贝	11.8	6.0	1.7	10.1	8.7	6.6	2.2	2.7	4.4	5.9	2.5	28.7	8.4

3 讨论

IHNV 是对虾的主要病毒病原之一,其传播速度快、流行广泛、防治困难,给对虾养殖业带来了巨大的经济损失,严重地制约了对虾养殖业的发展。IHNV 主要感染来源于外胚层(表皮角质层、前、后肠上皮、神经束和神经节)和中胚层(造血器官、触角腺、管上皮、性腺、淋巴器官、结缔组

织和横纹肌)的组织^[16]。已有研究证实感染 IHNV 的细角滨对虾其疾病的严重程度与个体的大小或者年龄有关,幼虾比成虾更容易感染^[17]。本实验通过人工投喂的方式对健康南美白对虾仔虾进行人工感染实验,攻毒实验经过短暂的 3 次投喂攻毒,攻毒组南美白对虾仔虾均无死亡现象,普通 PCR 检测结果显示南美白对虾仔虾 IHNV 感染率高达 43.3%,经过实时荧光定量 PCR 检测 IHNV 载量最高为 $28.7 \text{ copies} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ DNA}$,本实

验结果表明南美白对虾仔虾阶段较易通过摄食途径感染 IHHNV。此研究显示,携带 IHHNV 的南美白对虾仔虾用于养殖生产风险较大,对虾互相蚕食的习性会迅速加快 IHHNV 的传播。在南美白对虾仔虾养殖期间,要加强病毒检疫,防止携带病毒的南美白对虾仔虾用于养殖生产。在南美白对虾苗种培育期间,要加强对苗种的跟踪监测及水源、人工配合饲料的消毒处理,有效降低南美白对虾仔虾感染 IHHNV 的风险。

参考文献:

- [1] LIGHTNER D V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2011, 106: 110-130.
- [2] SAKSMERPROME V, PUIPROM O, NOONIN C, et al. Detection of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) in farmed Australian *Penaeus monodon* by PCR analysis and DNA sequencing [J]. Aquaculture, 2010, 298: 190-193.
- [3] KIM J H, CHORESCA J G H, SHIN S P, et al. Detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* shrimp cultured in South Korea [J]. Aquaculture, 2011, 313: 161-164.
- [4] YANG B, SONG X L, HUANG J, et al. Evidence of existence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp cultured in China [J]. Veterinary Microbiology, 2007, 120: 63-70.
- [5] 童桂香, 韦信贤, 吴伟军, 等. 广西凡纳滨对虾 IHHNV 感染情况的调查与分析 [J]. 南方农业学报, 2013, 44(12): 2089-2093.
- [6] 朱凝瑜, 孔蕾, 郑天伦. 2013 年浙江省南美白对虾苗病毒携带情况分析 [J]. 浙江农业学报, 2015, 27(5): 756-760.
- [7] 胡文娟, 房文红, 江敏, 等. 淡水养殖凡纳滨对虾 IH-HNV-WSSV 共感染率调查分析及其对免疫相关酶活性的影响 [J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(5): 685-693.
- [8] 郑晓叶, 许俊榆, 郑天伦, 等. 浙江省南美白对虾苗种五种流行病原检测与分析 [J]. 中国动物检疫, 2018, 35(8): 17-22.
- [9] RAI P, SAFEENA M P, KRABSETSVE K, et al. Genomics, molecular epidemiology and diagnostics of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus [J]. Indian Journal of Virology, 2012, 23 (2): 203-214.
- [10] BELL T A, LIGHTNER D V. IHHN disease of *Penaeus stylirostris*: effects of shrimp size on disease expression [J]. Journal of Fish Diseases, 1987, 10: 165-170.
- [11] HSIEH C Y, CHUANG P C, CHEN L C, et al. Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) infections in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Aquaculture, 2006, 258: 73-79.
- [12] HAZREEN-NITA M K, KUA B C, BHASSU S, et al. Detection and genetic profiling of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) infections in wild berried freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* collected for hatchery production [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39: 3785-3790.
- [13] 闫冬春, 黄健, 董双林, 等. PCR 检测对虾白斑综合征病毒(WSSV) 中使用 UNG 防遗留污染 [J]. 海洋水产研究, 2003(3): 29-33.
- [14] GB/T 25878-2010, 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV) 检测 PCR 法 [S]. 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局及中国国家标准化管理委员会, 2011.
- [15] CHEN B K, DONG Z, LIU D P, et al. Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) infection in freshwater crayfish *Procambarus clarkii* [J]. Aquaculture, 2017, 477: 76-79.
- [16] LIGHTNER D V, REDMAN R M, BELL T A. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1983, 42: 62-70.
- [17] PRAVEEN R, MUHAMMED P S, KJERSTI K, et al. Genomics, molecular epidemiology and diagnostics of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus [J]. Indian Journal of Virology, 2012, 23 (2): 203-214.

Artificial Infection of Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus to Post Larvae *Penaeus Vannamei*

WANG Jingjing, YU Jiyue, HOU Zihao, CHANG Linrui, LI Ting, YAN Dongchun

(School of Agriculture, Ludong University, Yantai 264039, China)

Abstract: Infectious hypodermic and hematopoietic tissue necrosis virus (IHHNV) is one of the important pathogens that harm the shrimp aquaculture industry. It is widely distributed, harmful, and highly infectious, causing huge economic losses to shrimp aquaculture. The pathogenicity of IHHNV is closely related to the age and size of the host. In this paper, we conducted IHHNV infection experiments on healthy *Penaeus vannamei* post larvae by artificial feeding, IHHNV infection and viral load were detected using ordinary PCR and fluorescence quantitative PCR. The results showed that the post larvae of *Penaeus vannamei* can be infected with IHHNV by artificial feeding, and the infection rate of IHHNV is 43.3%, and the maximum viral load is $28.7 \text{ copies} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ DNA. The results of this experiment provide a theoretical basis for the effective prevention and control of IHHNV in artificial culture of *Penaeus vannamei*.

Keywords: Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus; post larvae of *Penaeus vannamei*; artificial infection

(责任编辑 李维卫)

(上接第150页)

Abstract ID: 1673-8020(2021)02-0146-EA

Culture Optimization of *Bacillus* sp.B59 for the Production of Carboxymethyl-cellulase

ZHANG Qian¹, MA Ruimei¹, XIE Xiaoman², DONG Quanxing¹, Ge Yihe¹, Feng Zhibin¹, CHENG Shiwei¹

(1.School of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China; 2.Shandong Forest Germplasm Resources Center, Jinan 265709, China)

Abstract: Cellulase from *Bacillus* has excellent properties such as heat and alkaline resistance, that resulted in important applications in feed additives and other industries. In this study, using *Bacillus* sp.B59 isolated from the offshore soil, the influencing factors of carboxymethyl-cellulase (CMCase) producing was studied by optimizing carbon source, nitrogen source, metal salt, initial pH, culture temperature and inoculation amount, and then the orthogonal test was used to determine the optimum CMCase production process, which was $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ fructose, $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ peptone, $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ FeCl_3 , $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ZnSO_4 , $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ carboxymethyl-cellulose, pH 8.5, 1% (v/v) inoculation amount and culture temperature of 28°C. The maximum CMCase activity was obtained as $786.92 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ under optimal culture conditions for 40 h. This study lays a foundation for the subsequent scale preparation and application.

Keywords: *Bacillus* sp.; carboxymethyl-cellulase; culture optimization; fermentation production

(责任编辑 李维卫)