

DOI: 10.11758/yykxjz.20160123001

http://www.yykxjz.cn/

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)及虾肝肠胞虫(EHP)的荧光定量 PCR 检测*

刘宝彬^{1,2} 杨 冰^{1,2,3①} 吕秀旺^{1,2} 万晓媛^{1,3} 刘 珍^{1,2} 黄 健^{1,3}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 青岛 266071; 2. 上海海洋大学 上海 201306;
3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 2013 年,河北、天津等地区养殖的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)育苗期出现死苗、出苗率低的情况,生产上,仔虾个体大小差异较大,造成了严重损失。本研究采用荧光定量 PCR 方法(Real-time PCR)对天津大港地区采集的 108 尾凡纳滨对虾仔虾样品进行单尾病原检测。结果显示,传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHHNV)和虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)均有检出。IHHNV 阳性检出率 100%,每微克对虾组织 DNA 的病毒拷贝数为 10^3-10^7 ,且个体较大的样品(1.2-2.0 cm)携带病毒拷贝数偏高;EHP 阳性检出率为 49.1%,每微克对虾组织 DNA 的拷贝数为 10^3-10^5 ,且集中于个体较小样品(0.7-1.1 cm)。对 IHHNV 和 EHP 阳性凡纳滨对虾样品进行生物学体长与病毒载量指数相关性分析,显示 IHHNV 载量指数与对虾生长速率呈正相关,虾组织 IHHNV 平均载量达 8.51×10^4 copies/ μ g DNA,为较高的感染水平;EHP 的载量与对虾生长速率呈负相关关系,与较大个体阳性检出率较低相对应,虾组织 EHP 平均载量达到 2.19×10^4 copies/ μ g DNA,为较高的感染水平。由此,该批凡纳滨对虾仔虾患病为 IHHNV 和 EHP 的混合感染所致,本研究数据为 IHHNV 和 EHP 病原混合感染流行情况及其对养殖育苗期仔虾生长的影响提供科学依据。

关键词 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*); Real-time PCR; 传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV); 虾肝肠胞虫(EHP)

中图分类号 S945 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)02-0158-9

1981 年,在美国夏威夷地区细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)中发现的传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis

virus, IHHNV)是引起全球养殖对虾疾病的主要病原之一, IHHNV 感染的野生和养殖对虾遍布世界各地,世界动物卫生组织(World Organization for Animal

* 国家自然科学基金(31101935)、国家虾产业技术体系建设任务(CARS-47)、青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02)和‘泰山学者’建设工程专项共同资助 [This work was supported by the Project of National Natural Science Fund of China (31101935), China Agriculture Research System (CARS-47), the Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (No.2015ASKJ02), and the Construction Program for ‘Taishan Scholarship’]. 刘宝彬, E-mail: 943695389@qq.com

① 通讯作者: 杨 冰, 副研究员, E-mail: yangbing@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-01-23, 收修改稿日期: 2016-03-27

Health, OIE)将其收录为甲壳类重要疫病之一(OIE, 2015)。IHHNV 能够感染多种对虾, 对幼虾危害尤为明显(Kalagayan *et al*, 1991), 至今尚无有效防治方法。该病毒可使凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)患上慢性矮小残缺综合征(Runt deformity syndrome, RDS), 导致养殖规格参差不齐, 产量下降, 损失严重(Bell *et al*, 1984; Kalagayan *et al*, 1991; Primavera *et al*, 2000; Chayaburakul *et al*, 2004)。Yang 等(2007)首次检测并报道自2001年中国养殖凡纳滨对虾中就发现 IHHNV 的感染和流行。虾肝肠胞虫 (*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)是专性细胞内寄生的原生生物, 2009 年于泰国养殖池塘生长迟缓的斑节对虾 (*Penaeus monodon*)中发现(Chayaburakul *et al*, 2004; Tourtip *et al*, 2009)。Flegel(2012)报道, EHP 在泰国和越南出现白便综合征(White feces syndrome, WFS)的斑节对虾和凡纳滨对虾中有较高的检出率, 且严重感染虾肝肠胞虫。后虽证明, 该微孢子虫并不是引起对虾白便的病原微生物, 但无疑对凡纳滨对虾的生长和繁殖有负面影响, 且会加重其水平传播的可能性(Tangprasittipap *et al*, 2013)。2013 年以来, 本实验室自国内采集的养殖对虾样品中检测到 EHP, 表明 EHP 已在我国存在。该病原在泰国的对虾养殖中已经造成了一定的影响, 我国尚未有相关统计和报道。

实时荧光定量 PCR 用于检测对虾病毒是近期迅速发展起来的新技术, 其定量检测灵敏度高、特异性好, 已被广泛应用。现已有许多建立完善的实时荧光定量 PCR 体系用于对虾病毒的检测(韦信贤等, 2011)。Tang 等(2000)应用实时荧光定量 PCR 技术, 从感染 IHHNV 后 31 d 的红额角对虾(*Penaeus stylirostris*)中检测出 10^8 的病毒拷贝; 王忠发等(2007)应用实时荧光定量 PCR 技术检测 IHHNV, 灵敏度达到 50 个病毒拷贝。泰国学者报道了 PCR 法、地高辛标记核酸探针原位杂交法以及 LAMP 检测方法检测寄生于斑节对虾和凡纳滨对虾肝胰腺中的 EHP (Tangprasittipap *et al*, 2013; Suebsing *et al*, 2013; Tourtip *et al*, 2009), 本实验室根据 GenBank 中公布的 EHP-SU rDNA 序列设计 1 对特异性引物, 建立并优化了 EHP 实时荧光定量 PCR 检测方法, 检测灵敏度为 80 个拷贝。

2013 年, 河北、天津等地区养殖凡纳滨对虾出现育苗期死苗、出苗率低的情况, 损失严重。同时, 生产上还存在虾苗个体差异较大的现象。经病原检测发现, IHHNV 和 EHP 的感染率较高。为此, 本研究随机采集该发病群体仔虾样品, 并针对 IHHNV 和 EHP 单尾进行实时荧光定量 PCR 检测, 分析 IHHNV

和 EHP 在此地区的感染水平, 为 IHHNV 和 EHP 的混合感染及流行情况提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 对虾及病毒样品

待检样品为 2013 年 5 月 14 日采自天津大港某育苗场的凡纳滨对虾仔虾活体样品 108 尾, 个体大小差异较大, 单尾对虾生物学体长的范围为 0.7–2.0 cm, 单尾样品重量 8–50 mg, 编号为 20130521001–20130521108。取单尾对虾个体样品提取组织 DNA。IHHNV 阳性、EHP 阳性、肝胰腺细小病毒(HPV)阳性、白斑综合征病毒(WSSV)阳性、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)阳性及无特定病原(Special pathogen free, SPF)的凡纳滨对虾组织 DNA, 均由本实验室保存并提供。

1.2 引物和探针

IHHNV 荧光定量 PCR 引物及探针参考 OIE 《水生动物疾病诊断手册》(2015 版)第 2.2.2 章的荧光定量 PCR 探针法中推荐的引物和探针: 上游引物(1608F): 5'-TACTCC-GGA-CAC-CCA-ACC-A-3'; 下游引物(1688R): 5'-GGC-TCT-GGC-AGC-AAA-GGT-AA-3'; 探针(TaqMan probe): 5'-FAM-ACC-AGA-CAT-AGA-CT-ACA-ATC-CTC-GCC-TAT-TTG-TAMRA-3'。EHP 的荧光定量 PCR 荧光染料法检测引物由本实验室设计(刘珍等, 2016), 上游引物 EnF: 5'-GTA-GCG-GAA-CGG-ATA-GGG-3'; 下游引物 EnR: 5'-CCA-GCA-TTG-TCG-GCA-TAG-3'; 扩增片段为 185 bp。以上引物、探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 试剂材料

DNA 提取试剂盒购自 TianGen 公司。pMD™ 18-T Vector Cloning Kit, Ex Taq 聚合酶(含 10 mmol/L MgCl₂、10×PCR Buffer、2.5 mmol/L dNTP each), 2×Premix Ex Taq(probe qPCR)聚合酶及 2×SYBR Green Premix Ex Taq 聚合酶均购自 TaKaRa (大连宝生物) 公司。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 IHHNV

1.4.1 标准品模板的制备 以 IHHNV 阳性样品的 DNA 为模板, 采用引物 1608F/1688R 进行常规 PCR 扩增获取目的产物, 用 pMD18-T 载体在 *E. coli* DH5α 中克隆, 克隆片段送生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证(目的片段为 81bp)。目的产物的克隆经扩大培养后, 用质粒提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取质粒 DNA。用核酸分析仪(Nanodrop 2000c, Thermo)测定重组质粒 DNA 浓度为

157.9 ng/ μl , 拷贝数为 5.20×10^{10} copies/ μl DNA, 将该重组质粒作为本实验标准品原液, -80°C 保存。

1.4.2 反应体系的优化 荧光定量 PCR-IHHNV 反应体系参照 Premix Ex TaqTM (Probe qPCR) 试剂盒说明书(TaKaRa, 大连), 冰上配制, 设计 5×5 矩阵法对引物及探针浓度进行优化, 引物终浓度梯度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\mu\text{mol/L}$, 探针终浓度梯度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 。2 \times Premix Ex Taq (probe 荧光定量 PCR) 12.5 μl , 5.20×10^3 copies/ μl 的标准品模板 1 μl 。荧光定量 PCR 反应程序: 95°C 10 min 预变性; 95°C 15 s 和 60°C 1 min, 40 个循环。

1.4.3 特异性实验 以 WSSV、HPV 的阳性样品 DNA 及 SPF 凡纳滨对虾组织 DNA 作为模板, 以超纯水为模板做空白对照(NTC)。使用优化后的体系进行荧光定量 PCR, 验证引物及探针特异性。

1.4.4 构建标准曲线 将构建好的质粒标准品进行 10 倍梯度稀释, 得到 5.20×10^9 – 5.2×10^0 copies/ μl 共 10 个梯度, 每组 3 个平行, 使用优化后的体系进行荧光定量 PCR, 建立质粒标准品拷贝数与 C_t 值对应的标准曲线。通过分析标准曲线相关系数以及扩增效率来判断标准曲线的质量。使用前述已建立的荧光定量 PCR 方法对天津大港 108 份单尾采集的样品分别进行 IHHNV 的检测。

对已检测的天津大港地区 108 份凡纳滨对虾样品, 进行 IHHNV 载量指数与对虾生长速率分析。以每微克 DNA 中 IHHNV 的相对拷贝数的对数为 IHHNV 载量指数(Exponential relative copies, ERC), 结合样品采集时测量的对虾单尾生物学体长, 分析 IHHNV 感染对对虾生长的影响, 利用 Excel 绘制对虾生物学体长与 IHHNV 载量指数的散点图, 分析样品体长与 IHHNV 载量指数二者之间的相关性。

1.5 荧光定量 PCR 检测 EHP

1.5.1 质粒标准品的制备 以 EHP 阳性样品 DNA 为模板, 用引物 ENF185/ENR185 进行常规 PCR 扩增获取目的产物, 用 pMD18-T 载体在 *E. coli* DH5 α 中克隆, 克隆的片段送上海生工测序验证(目的片段 185 bp)。目的产物的克隆经扩大培养后, 用质粒提取试剂盒(上海生工)提取质粒 DNA。用核酸分析仪(Nanodrop 2000c, Thermo)测定重组质粒 DNA 浓度为 26.3 ng/ μl , 换算成拷贝数为 8.3×10^9 copies/ μl , 将该重组质粒作为本实验标准品原液, -80°C 保存。

1.5.2 反应体系和条件优化 荧光定量 PCR-EHP 反应体系参照 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (TliRNaseH

Plus)试剂盒(TaKaRa, 大连)说明在冰上配制, 25 μl 的反应体系含 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II, 不同终浓度(0.1–1.0 $\mu\text{mol/L}$)的引物 ENF185/ENR185 和标准品 (8.3×10^3 copies)为模板。 95°C 预变性 30 s 后, 进行 95°C 10 s 和 $X^\circ\text{C}$ 45 s (X 为退火温度梯度, 设定范围 50 – 65°C)的 40 个循环扩增, 选择最佳退火温度。扩增完成后测定产物的熔解曲线。

1.5.3 特异性实验 使用 EHP 阳性样品 DNA、IHHNV、WSSV、HPV 的阳性样品 DNA 及 SPF 凡纳滨对虾组织 DNA 作为模板, 以超纯水为模板做空白对照(NTC)。使用优化后的体系进行荧光定量 PCR, 验证其特异性。

1.5.4 构建标准曲线 已明确标准质粒单位体积拷贝数约为 8.3×10^9 copies/ μl DNA, 经梯度稀释后, 分别以 8.3×10^8 – 8.3×10^1 copies/ μl DNA 共 8 个梯度作为模板, 实验设置 NTC, 每组 3 个平行, 使用优化后的体系进行荧光定量 PCR, 生成标准曲线。使用前述已建立的荧光定量 PCR 方法对天津大港 108 份单尾采集的样品分别进行 EHP 的检测。

对已检测的天津大港地区 108 份凡纳滨对虾样品, 进行 EHP 载量指数与对虾生长速率分析。以每微克 DNA 中 EHP 的相对拷贝数的对数为 EHP 载量指数, 结合样品采集时测量的对虾单尾生物学体长分析 EHP 感染对对虾生长的影响, 利用 Excel 绘制对虾生物学体长与 EHP 载量指数的散点图, 分析样品体长与 EHP 载量指数二者之间的相关性。

2 结果与分析

2.1 IHHNV 的荧光定量 PCR 技术的建立

2.1.1 荧光定量 PCR-IHHNV 扩增条件的建立 采用 5.2×10^3 copies/ μl 含有 IHHNV 目的基因的质粒标准品为模板, 确定了荧光定量 PCR-IHHNV 扩增体系, 其中, 引物 1608F 和 1688R 的最佳浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 探针的最佳浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$, 即 25 μl 荧光定量 PCR-IHHNV 体系中, 含 2 \times Premix Ex Taq (probe 荧光定量 PCR) 12.5 μl 、10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 1608F 和 1688R 各 1.25 μl 、5 $\mu\text{mol/L}$ 探针 2 μl 、5–50 ng/ μl DNA 模板 1 μl 。

2.1.2 特异性实验 荧光定量 PCR 引物及探针特异性实验结果显示(图 1-a), IHHNV 阳性样品 DNA 的 C_t 值为 28, WSSV 阳性、HPV 阳性凡纳滨对虾组织 DNA 和 SPF 凡纳滨对虾组织 DNA 与 NTC 均未检测到荧光信号。产物琼脂糖凝胶电泳结果(图 1-b)进

一步证实了特异性实验结果,说明此方法引物及探针
对 IHHNV 的检测方法特异性强,无非特异性扩增。

2.1.3 标准曲线的建立 将构建好的质粒 DNA(浓度为 5.2×10^{10} copies/ μl)进行 10 倍梯度稀释作为模板,分别为 10^9 – 10^0 copies/ μl DNA,共 10 个梯度。在已优化的体系条件下进行扩增。标准曲线显示,质粒浓度为 10^0 时仍可以检测到荧光信号,达到阈值线(图 2),由此本实验优化的方法检测下限可低至 5 copies/ μl DNA。

2.2 EHP 的荧光定量 PCR 技术的建立

2.2.1 荧光定量 PCR-EHP 扩增条件的建立 采用 8.3×10^3 copies/ μl 的含有 EHP 目的基因的 DNA 标准品为模板,确定了荧光定量 PCR-EHP 扩增体系,其中,引物 ENF185 和 ENR185 的最佳浓度为 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 。即 25 μl qPCR-EHP 体系中,含 $2 \times \text{SYBR}^{\text{®}}$ Premix Ex TaqTM II 12.5 μl 、 $10 \mu\text{mol/L}$ 引物 ENF185 和 ENR185

各 0.5 μl , 5–50 ng/ μl DNA 模板 1 μl 。退火温度为 60°C 时,扩增效率和引物特异性最佳,确定荧光定量 PCR-EHP 反应条件: 95°C 30 s 预变性, 95°C 10 s 和 60°C 45 s, 40 个循环。

2.2.2 特异性实验 荧光定量 PCR 引物及探针特异性的实验结果显示(图 3),除 EHP 阳性样品 DNA 在 21 循环处起峰外, WSSV 阳性、IHHNV 阳性、HPV 阳性、副溶血弧菌阳性和 SPF 凡纳滨对虾组织 DNA 与 NTC 均未检测到荧光信号,说明引物及探针针对 EHP 的特异性强。

2.2.3 标准曲线的构建 将构建好的质粒 DNA(浓度为 8.3×10^9 copies/ μl)10 倍梯度稀释作为模板,分别为 10^8 – 10^1 copies/ μl DNA 共 8 个梯度,在已优化的体系条件下进行扩增。标准曲线显示,质粒浓度在 10^1 处可检测到荧光信号(图 4),由此本实验优化的方法检测下限为 80 copies/ μl DNA。

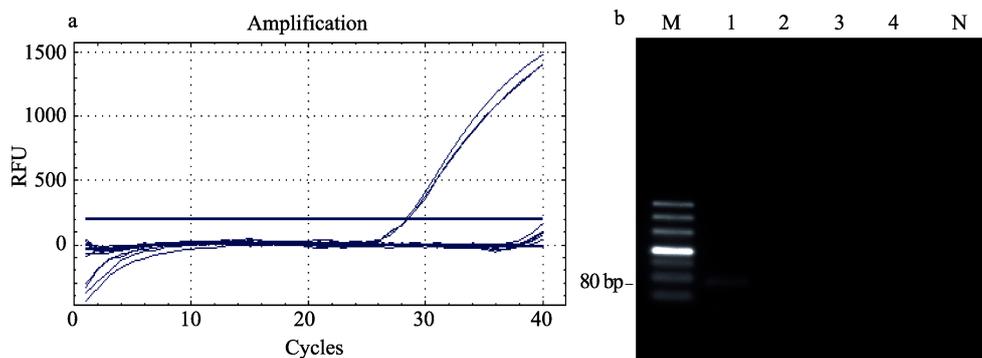


图 1 IHHNV 荧光定量 PCR 特异性
Fig.1 Specificity of IHHNV real-time PCR

a. 扩增曲线; b. 扩增产物电泳结果

M: DL500 DNA Marker (TaKaRa); 泳道 1–4 分别为 IHHNV DNA、HPV DNA、WSSV DNA 和 SPF 对虾组织 DNA; N: 对照
a. Amplification plots; b. Gel electrophoresis of real-time PCR products

M: DL500 DNA Marker (TaKaRa); Lane 1–4: IHHNV DNA, HPV DNA, WSSV DNA, and SPF shrimp DNA respectively; N: NTC (No template control, distilled water)

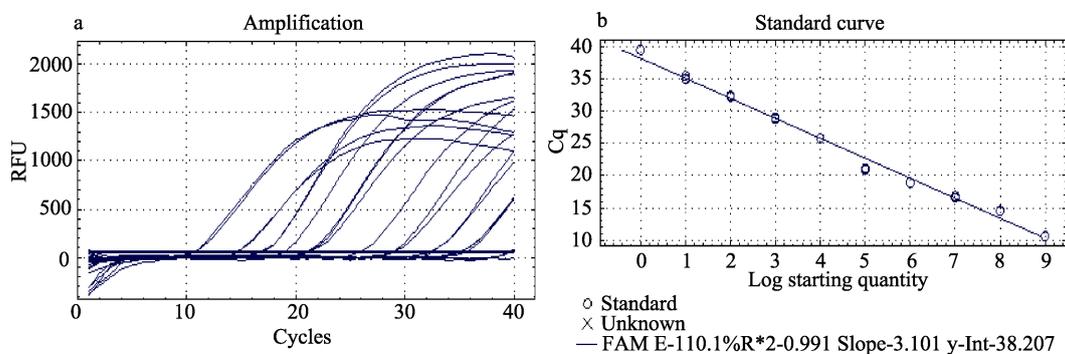


图 2 IHHNV 荧光定量 PCR 标准曲线构建
Fig.2 Generation of IHHNV real-time PCR standard curve

a. 10×梯度质粒扩增曲线; b. 标准曲线

a. 10×gradient of plasmid amplification plots; b. Standard curve

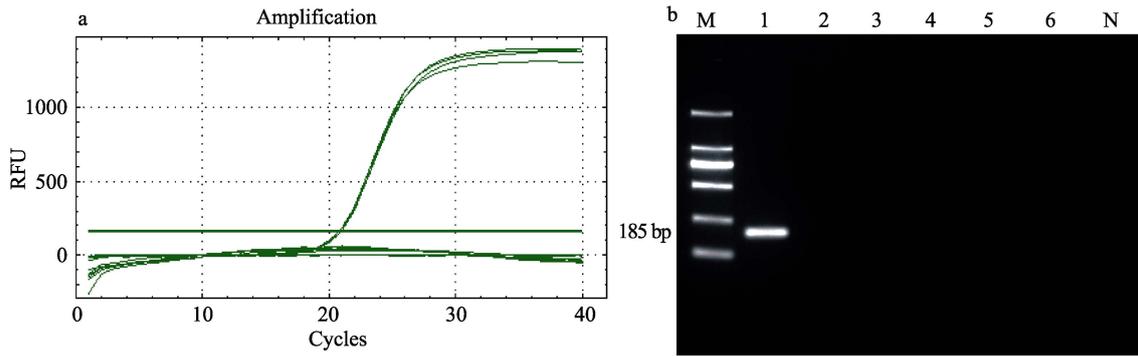


图 3 EHP 荧光定量 PCR 特异性
Fig.3 Specificity of EHP real-time PCR

a. 扩增曲线; b. 扩增产物电泳结果

M: DL500 DNA Marker (TaKaRa); 泳道 1-6 分别为 EHP DNA、WSSV DNA、IHNV DNA、HPV DNA、副溶血弧菌 DNA 和 SPF 对虾组织 DNA; N: 空白对照

a. Amplification plots; b. Gel electrophoresis of real-time PCR products

M: DL2000 DNA Marker (TaKaRa); Lane 1-6: EHP DNA, WSSV DNA, IHNV DNA, HPV DNA, *Vibrio Parahaemolyticus* DNA, and SPF shrimp DNA respectively; N: NTC (No template control, distilled water)

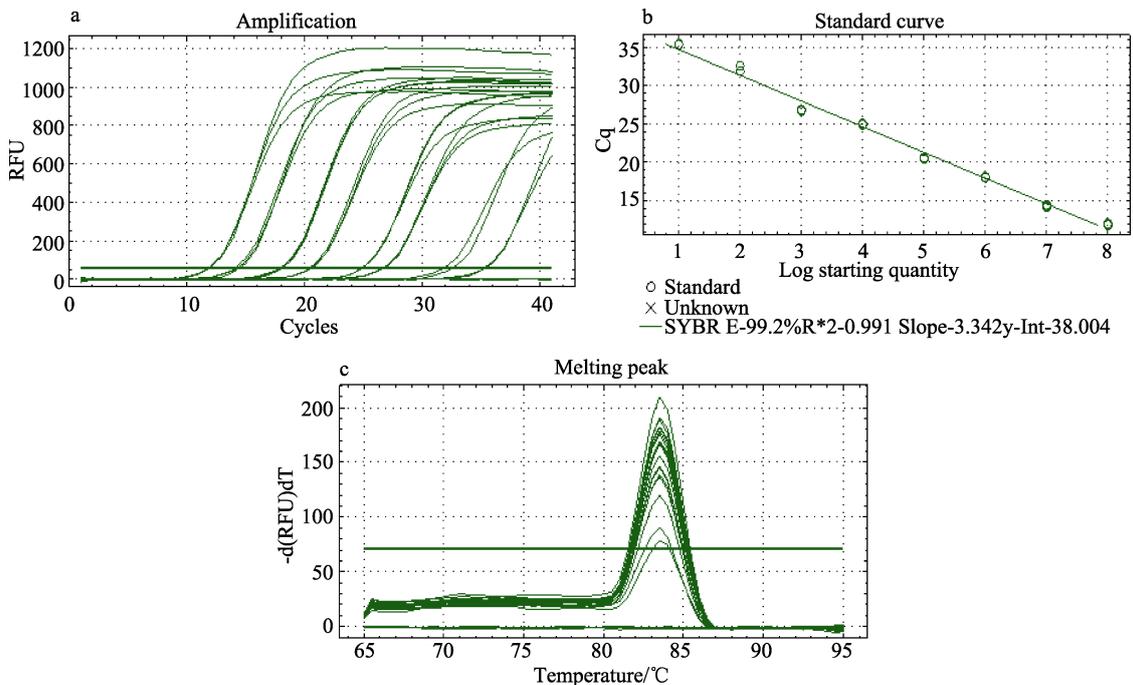


图 4 EHP 荧光定量 PCR 标准曲线构建
Fig.4 Generation of EHP real-time PCR standard curve

a. 10×梯度质粒扩增曲线; b. 标准曲线; c. 熔解曲线

a. 10×gradient of plasmid amplification plots; b. Standard curve; c. Melting curve

2.3 对虾样品荧光定量 PCR 检测结果

IHNV 荧光定量 PCR 检测结果以每微克对虾组织 DNA 所含病毒拷贝数(copies/μg DNA)表示。结果显示, IHNV 的阳性率为 100%, 病毒拷贝数最低为 1.01×10^3 copies/μg DNA(体长 0.9 cm 对虾), 最高为 3.07×10^7 copies/μg DNA(体长 2.0 cm 对虾), 个体较

小的样品(54 尾, 体长 0.7-1.1 cm 对虾)每微克对虾组织 DNA 中病毒拷贝数在 10^3-10^5 copies/μg DNA 之间; 个体较大的样品(54 尾, 体长 1.2-2.0 cm 对虾)拷贝数则在 10^4-10^7 copies/μg DNA 之间。EHP 的阳性率为 49.1%, EHP 拷贝数最低为 3.26×10^2 copies/μg DNA(体长 1.4 cm 对虾), 最高为 1.25×10^6 copies/μg DNA(体

长 0.8 cm 对虾)。EHP 阳性的样品每微克 DNA 的拷贝数在 10^3 – 10^5 copies/ μ g DNA 之间,且阳性主要集中在个体较小(体长 0.7–1.1 cm)的对虾样品中(表 1)。

2.4 对虾生长速率与 IHHNV、EHP 载量关系

对采集自天津大港 108 份凡纳滨对虾样品进行逐尾体长测定和对虾组织中 IHHNV、EHP 的 qPCR 检测,该批凡纳滨仔虾样品来源于同时放苗的样品,但批内体长大小不均匀、生长缓慢。108 份样品中,荧光定量 PCR-IHHNV 阳性检出率为 100%,平均体长(1.19 ± 0.32) cm,分布在 0.7–1.8 cm 范围。荧光定量 PCR 检测结果见表 1,平均 IHHNV 载量指数(Exponential relative copies of IHHNV, ERC_{IHHNV})为 4.93 ± 0.90 ,平均拷贝数为 8.51×10^4 copies/ μ g DNA,与对虾体长呈正相关性($R=1.1419$)(图 5)。

从表 1 可知,108 份凡纳滨样品中,有 55 尾对虾在 40 个循环的荧光定量 PCR-EHP 检测中未出现扩增信号,检出率为 49.1%,对 53 份阳性凡纳滨对虾样品进行 EHP 载量指数(ERC_{EHP})与对虾体长的相关性分析,其中,平均体长为(1.00 ± 0.24) cm 对虾的平均 EHP 载量指数(ERC_{EHP})为 4.34 ± 0.81 ,拷贝数为 2.19×10^4 copies/ μ g DNA,两者呈轻微的负相关性($R=-0.4791$)。体长分布在 0.7–1.1 cm 对虾的 EHP 阳性率最高,且平均 EHP 载量指数达到(4.42 ± 0.78),平均拷贝数为 2.63×10^4 copies/ μ g DNA(图 6)。

3 讨论

凡纳滨对虾以其盐度适应范围广、生长速度快、抗病力强等优点已成为国内主要对虾养殖品种。然而,种苗及亲虾的大量引进增加了疾病传入我国的机率,且造成了一定经济损失。Yang 等(2007)针对 2001–2004 年国内 299 份养殖对虾 IHHNV 流行情况进行分析,该病毒阳性检出率为 51.4%,在国内一直呈流行趋势。童桂香等(2013)根据广西凡纳滨对虾养殖情况,分别在北海市、钦州市、防城港市设立监测区,应用 PCR 对采集样品进行 IHHNV 检测,2010–2012 年 IHHNV 阳性率分别为 62.1%、44.3%和 32.1%。通过严格控制亲虾品质及引进无病毒感染种苗,凡纳滨对虾品质已得到提升,IHHNV 感染呈逐年下降的趋势。EHP 近年来已成为导致对虾生长缓慢的主要病原性因素之一,且在亚洲多个国家检出。我国针对 2013–2015 年的养殖对虾 EHP 携带情况进行调查,显示其具有较高的风险水平。

PCR 技术在水产养殖病原检测中的应用已非常广泛,相对于传统的组织学方法省时省力。现已建立

和报道了多种检测 IHHNV 的 PCR 方法,并且被 OIE 收录和推荐使用(Shike *et al*, 2000; Tang *et al*, 2000、2001、2007; Nunan *et al*, 2000; Krabsetsve *et al*, 2004)。荧光定量 PCR 技术以其特异性和准确性高等特点逐渐被广泛应用于水产动物病原的检测,其灵敏度高于普通 PCR,解决了常规 PCR 无法对扩增反应进行实时监测和对起始模板准确定量的问题(钟江华等, 2011),作为一种新的成熟核酸检测方法广泛用于基因检测、传染病诊断等诸多领域。任聪等(2009)建立了 IHHNV 实时荧光定量 PCR 检测方法,并优化了体系和退火温度,检测灵敏度能达到 10 个病毒拷贝。徐丽美等(2013)建立的实时荧光定量 PCR 方法检测灵敏度能达到 10 个病毒拷贝。本研究中,采用 OIE 推荐的 Real-time PCR 检测 IHHNV,在进行体系优化后,其检测灵敏度可低至 5 个病毒拷贝。本研究建立的荧光定量 PCR 检测 EHP 的灵敏度为 80 个拷贝。

荧光定量 PCR 检测 IHHNV,阳性检出率为 100%,个体较小的样品病毒拷贝数(10^3 – 10^5 copies/ μ g DNA)低于个体较大的样品病毒拷贝数(10^4 – 10^7 copies/ μ g DNA)。IHHNV 会造成养殖凡纳滨对虾患矮小残缺综合征,导致个体大小参差不齐,检测结果表明自然状态下感染 IHHNV 的同一批凡纳滨对虾仔虾中,个体较大的 IHHNV 的带毒量比个体较小的高 1 个数量级,研究认为 IHHNV 在宿主体内的复制取决于宿主生长的年龄阶段,IHHNV 的病毒粒子极小,其携带基因量很有限,所以病毒主要依靠其宿主细胞来进行复制增殖(Tang *et al*, 2001),结果使得个体生长较大的仔虾带毒量会高,这与本实验的检测结果相符合;EHP 阳性检出率为 49.1%,每微克 DNA 的拷贝数在 10^3 – 10^5 之间,阳性主要集中在个体较小的样品中。而通过对对虾体长与 IHHNV 载量指数分析显示 IHHNV 载量指数与对虾体长呈正相关性,平均 IHHNV 载量指数为 4.93 ± 0.90 ,拷贝数达到 8.51×10^4 copies/ μ g DNA 左右时,对天津大港地区凡纳滨对虾养殖造成严重经济损失,达到较高的风险水平;而对虾体长与 EHP 载量指数成轻微的负相关性,平均 EHP 载量指数为 4.34 ± 0.81 ,拷贝数达到 2.19×10^4 copies/ μ g DNA,达到较高的风险水平。这与对虾生长速率与 EHP 载量关系的荧光定量 PCR-EHP 验证结果相一致(刘珍等, 2016)。通过本实验数据,造成天津大港地区凡纳滨对虾生长缓慢参差不齐的原因,为 IHHNV 和 EHP 协同感染凡纳滨对虾仔虾造成,而两种病原相关性差异的原因可能与病原感染时间早晚、虾体对不同病原抵抗力的差异,虾苗健康状况等综合因素有关。

本实验随机采集天津大港某养殖场 108 份凡纳滨仔虾样品,IHHNV 阳性率为 100%,表明 IHHNV

表1 荧光定量PCR检测天津大港凡纳滨仔虾 IHNV 和 EHP

Tab.1 Real-time PCR result of IHNV and EHP detection for *L. vannamei* from Tianjin Dagang

样品编号 Sample No.	体长 Body length(cm)	IHNV (copies/ μ g DNA)	EHP (copies/ μ g DNA)	样品编号 Sample No.	体长 Body length(cm)	IHNV (copies/ μ g DNA)	EHP (copies/ μ g DNA)
20130521001	1.10	5.29×10^4	3.43×10^4	20130521055	1.40	3.79×10^4	—
20130521002	0.90	1.06×10^4	3.88×10^4	20130521056	1.30	1.48×10^6	—
20130521003	0.80	7.43×10^4	1.23×10^5	20130521057	1.30	4.46×10^5	—
20130521004	0.90	1.41×10^4	2.60×10^5	20130521058	1.30	6.14×10^5	—
20130521005	0.70	1.19×10^4	4.07×10^5	20130521059	1.20	3.67×10^5	—
20130521006	0.90	8.76×10^3	1.08×10^5	20130521060	1.20	4.20×10^5	—
20130521007	0.90	9.19×10^3	3.21×10^5	20130521061	2.00	3.07×10^7	—
20130521008	0.70	2.45×10^3	2.46×10^5	20130521062	1.50	8.64×10^5	—
20130521009	0.90	1.82×10^4	1.79×10^4	20130521063	1.40	7.25×10^4	—
20130521010	0.90	6.52×10^3	5.19×10^4	20130521064	1.30	6.89×10^4	—
20130521011	1.00	6.43×10^3	1.77×10^4	20130521065	1.20	1.30×10^5	—
20130521012	0.90	8.71×10^3	6.20×10^4	20130521066	1.80	1.11×10^5	—
20130521013	1.00	1.06×10^4	4.43×10^4	20130521067	1.80	6.68×10^6	—
20130521014	0.80	3.66×10^3	3.78×10^4	20130521068	1.80	2.11×10^6	—
20130521015	0.90	1.01×10^3	3.79×10^4	20130521069	1.30	2.95×10^6	—
20130521016	0.80	1.38×10^3	—	20130521070	1.30	2.53×10^5	—
20130521017	1.00	8.47×10^3	—	20130521071	1.30	3.20×10^5	—
20130521018	1.00	1.60×10^4	2.81×10^3	20130521072	1.20	2.70×10^5	—
20130521019	1.00	1.87×10^4	3.34×10^4	20130521073	1.20	2.20×10^5	—
20130521020	0.90	1.46×10^3	1.98×10^5	20130521074	1.80	9.30×10^5	—
20130521021	0.90	5.84×10^3	1.04×10^5	20130521075	1.80	9.58×10^5	—
20130521022	0.90	3.82×10^5	5.70×10^3	20130521076	1.70	4.81×10^4	—
20130521023	0.80	3.74×10^3	1.25×10^6	20130521077	1.80	3.14×10^4	—
20130521024	0.90	2.14×10^3	4.53×10^4	20130521078	1.50	8.81×10^5	—
20130521025	0.80	4.70×10^4	5.62×10^3	20130521079	1.60	6.08×10^4	—
20130521026	0.90	1.11×10^3	5.94×10^4	20130521080	1.40	5.78×10^5	—
20130521027	0.80	8.19×10^4	3.84×10^4	20130521081	1.50	3.41×10^4	—
20130521028	0.90	6.78×10^4	1.81×10^3	20130521082	1.60	8.96×10^4	—
20130521029	0.80	2.20×10^4	5.39×10^2	20130521083	1.70	1.15×10^5	—
20130521030	0.90	6.08×10^4	2.90×10^3	20130521084	1.50	8.23×10^5	—
20130521031	0.90	3.09×10^4	6.50×10^3	20130521085	1.40	6.33×10^4	—
20130521032	0.90	6.04×10^4	1.79×10^4	20130521086	1.50	1.40×10^4	—
20130521033	0.90	3.91×10^4	1.28×10^3	20130521087	1.70	5.59×10^4	—
20130521034	1.00	1.33×10^4	3.84×10^5	20130521088	1.60	2.48×10^5	—
20130521035	0.80	5.94×10^4	9.14×10^2	20130521089	1.80	1.77×10^4	2.97×10^5
20130521036	0.90	4.20×10^3	2.79×10^3	20130521090	1.70	1.04×10^6	—
20130521037	0.90	3.98×10^5	1.33×10^4	20130521091	1.70	4.77×10^4	—
20130521038	0.90	2.45×10^5	6.17×10^4	20130521092	1.50	6.90×10^4	—
20130521039	1.00	1.72×10^5	3.75×10^3	20130521093	1.60	9.77×10^4	1.15×10^4
20130521040	1.00	1.60×10^6	2.35×10^4	20130521094	1.60	4.78×10^5	—
20130521041	0.80	4.43×10^5	6.09×10^3	20130521095	1.70	3.96×10^5	—
20130521042	1.10	1.90×10^6	6.34×10^3	20130521096	1.50	2.46×10^4	3.76×10^5
20130521043	0.80	5.95×10^5	3.21×10^4	20130521097	1.70	3.98×10^4	1.08×10^4
20130521044	0.90	3.05×10^5	—	20130521098	1.40	2.77×10^5	4.27×10^4
20130521045	0.90	1.30×10^6	—	20130521099	1.40	2.76×10^5	1.42×10^4
20130521046	1.10	7.52×10^5	—	20130521100	1.30	7.12×10^5	—
20130521047	1.10	2.21×10^5	—	20130521101	1.30	2.57×10^5	—
20130521048	1.00	1.25×10^6	—	20130521102	1.40	3.14×10^5	3.26×10^2
20130521049	1.00	4.82×10^4	—	20130521103	1.30	6.77×10^4	1.92×10^4
20130521050	0.90	2.36×10^4	—	20130521104	1.20	1.36×10^5	—
20130521051	1.00	1.99×10^6	5.14×10^4	20130521105	1.40	4.18×10^5	5.18×10^3
20130521052	0.80	1.28×10^5	—	20130521106	1.50	3.37×10^5	—
20130521053	1.00	4.35×10^4	—	20130521107	1.30	3.92×10^5	6.48×10^2
20130521054	1.00	4.57×10^5	5.40×10^5	20130521108	1.30	2.82×10^5	—

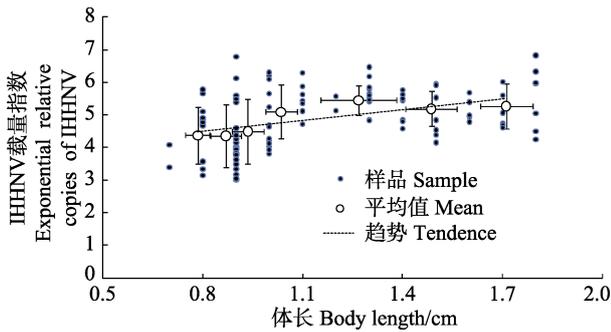


图5 凡纳滨对虾中 IHHNV 载量指数与对虾体长的相关性

Fig.5 Correlation of body length and exponential relative copies of IHHNV (ERC_{IHHNV}) in *L. vannamei*

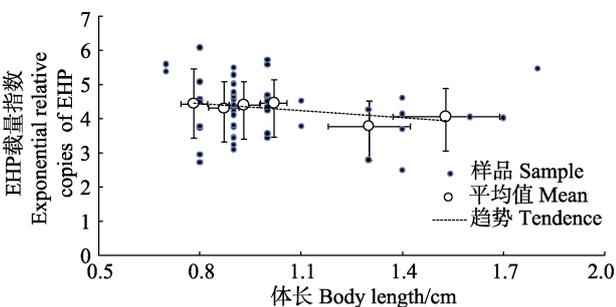


图6 凡纳滨对虾中 EHP 载量指数与对虾体长的相关性
Fig.6 Correlation of body length and exponential relative copies of EHP (ERC_{EHP}) in *L. vannamei*

在该批次养殖对虾中流行非常严重,因此,对 IHHNV 的防控应引起更多的重视。EHP 对对虾生长和繁殖的危害尚无确切的研究结果,但其感染导致对虾生长缓慢的问题应给予更多关注。近年来, EHP 在我国对虾养殖中已存在并流行,本研究通过定量的方法对对虾体长与 EHP 载量关系的荧光定量 PCR-EHP 进行了验证,对其更多的检测和研究十分必要。本研究首次提供 IHHNV 和 EHP 同时进行定量检测的数据,河北、天津地区的育苗期死苗及出苗率低的情况与两种病原的混合感染有极大相关性。研究显示,两种病原同时感染,其载量存在一定的相关性,即体长相对较小的个体 EHP 载量较 IHHNV 偏高,而体长较大则反之。导致同一批的养殖对虾个体偏小、生长缓慢的现象是由于单一病原作用还是两种病原共同导致,以及对于两种病原感染的相互作用机制和混合感染的危害评估等还需要更深入的研究。

参 考 文 献

Bell TA, Lightner DV. IHHN virus infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 1984, 38(3): 185-194
Chayaburakul K, Nash G, Pratanpipat P, *et al.* Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon*

cultivated in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 60(2): 89-96
Flegel TW. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 110(2): 166-173
Kalagayan H, Godin D, Kanna R, *et al.* IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1991, 22(4): 235-243
Krabetsve K, Cullen BR, Owens L. Rediscovery of the Australian strain of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, 61(1-2): 153-158
Liu Z, Zhang QL, Wan XY, *et al.* Development of real-time PCR assay for detecting microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* and the application in shrimp samples with different growth rates. *Progress in Fishery Science*, 2016, 37(2): 119-126 [刘珍, 张庆利, 万晓媛, 等. 虾肝肠胞虫 (*Enterocytozoon hepatopenaei*) 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及对虾样品的检测. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 119-126
Nunan LM, Poulos BT, Lightner DV. Use of polymerase chain reaction for detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Marine Biotechnology*, 2000(4): 319-328
OIE, World Organisation For Animal Health. *Diagnostic manual for aquatic animal diseases*, Paris, France, 2014, 119-137
Primavera JH, Quintio ET. Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal of Crustacean Biology*, 2000, 20(4): 796-802
Ren C, Chen XZ, Gong YQ, *et al.* Real-time fluorescence quantitative PCR for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Chinese Journal of Animal Quarantine*, 2009, 26(2): 38-41 [任聪, 陈信忠, 龚艳清, 等. 实时荧光定量 PCR 法检测对虾皮下和造血器官坏死病毒. *中国动物检疫*, 2009, 26(2): 38-41]
Shike H, Dhar AK, Burns JC, *et al.* Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito brevidenso viruses. *Virology*, 2000, 277(1): 167-177
Suebsing R, Prombun P, Srisala J, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric nanogold for detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* in penaeid shrimp. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114(5): 1254-1263
Tang KFJ, Durand SV, White BL, *et al.* Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, 2000, 190(3-4): 203-210
Tang KFJ, Navarro SA, Lightner DV. PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 74(2): 165-170
Tang KFJ, Lightner DV. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2001, 44(2): 79-85
Tangprasittipap A, Srisala J, Choudee S, *et al.* The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *BMC Veterinary Research*, 2013(1): 1-10
Tong GX, Wei XX, Wu WJ, *et al.* Investigation and analysis of

- infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection in *Penaeus vannamei* in Guangxi. Journal of Southern Agriculture, 2013, 44(12): 2089–2093 [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. 南方农业学报, 2013, 44(12): 2089–2093]
- Tourtip SS, Wongtripop GD, Stentiford KS, *et al.* *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. Journal of Invertebrate Pathology, 2009, 102(1): 21–29
- Wang ZF, Wang JY, Lu YY, *et al.* Development and application of a Real-time PCR-based diagnostic for IHHNV. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2007, 17(9): 1591–1593 [王忠发, 王建跃, 卢亦愚, 等. 实时荧光定量 PCR 快速检测对虾 IHHNV 载量方法的建立和应用. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(9): 1591–1593]
- Wei XX, Li XZ, Tong GX. Technique and application of real-time fluorescent quantitative PCR in diagnosis of aquatic animal virosis: A review. Fisheries Science, 2011, 29(11): 681–687 [韦信贤, 黎小正, 童桂香, 等. 实时荧光定量 PCR 技术及其在水生动物病毒病定量检测中的应用. 水产科学, 2011, 29(11): 681–687]
- Yang B, Song XL, Huang J, *et al.* Evidence of existence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp cultured in China. Veterinary Microbiology 2007, 120(1–2): 63–70
- Zhong JH, Zhang GZ, Liu XY. Development of real-time fluorescent quantitative PCR and its application. Amino Acids and Biotic Resources, 2011, 33(2): 68–72 [钟江华, 张光萍, 柳小英. 实时荧光定量 PCR 技术的研究进展与应用. 氨基酸和生物资源, 2011, 33(2): 68–72]

(编辑 冯小花)

Detection and Quantification of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) and *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) of *Litopenaeus vannamei* by Real-Time PCR

LIU Baobin^{1,2}, YANG Bing^{1,2,3①}, LÜ Xiuwang^{1,2}, WAN Xiaoyuan^{1,3}, LIU Zhen^{1,2}, HUANG Jie^{1,3}

(1. Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) is one of the pathogens causing the significant diseases of crustaceans listed by the OIE (Office international des épizooties) Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Infection with IHHNV does not produce any pathognomonic gross clinical signs, although runt-deformity syndrome (RDS) has been noted in infected juvenile *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon*. *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) was first found and isolated in Thailand in 2009, which caused slow growth of *P. monodon*. IHHNV and EHP were found in the samples of *L. vannamei* postlarvae which were collected from hatchery farms in Tianjin and Hebei Province in 2013. The diseased shrimps showed some clinical signs with high mortality, slow growth and difference of individual growth rate. The IHHNV and EHP individual detection was conducted on these samples using the real-time PCR technique. In total, 108 out of 108 (100%) *L. vannamei* postlarvae samples were IHHNV positive, and 53 out of 108 (49.1%) *L. vannamei* postlarvae samples were EHP positive. Positive samples contained approximately 10^3 – 10^7 copies/(μ g DNA) of IHHNV and big size of individual shrimp carried higher number of virus copies. Positive samples contained approximately 10^3 – 10^5 copies/(μ g DNA) of EHP and mainly the small sized individual shrimp. The analysis showed that the IHHNV loads were positively correlated with the shrimp growth rate. IHHNV loads above 8.51×10^4 copies/ μ g DNA represented a high risk level. EHP loads were negatively correlated with the shrimp growth rate. EHP loads above 2.19×10^4 copies/ μ g DNA represented a high risk level. Our study showed that the diseased *L. vannamei* postlarvae samples occurred in the hatchery farms of Tianjin and Hebei Province infected with shrimp pathogens of IHHNV and EHP. Data provides scientific basis on the effects of pathogens infection on the growth of cultured penaeid shrimp.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Real-time PCR; Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV); *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)

① Corresponding author: YANG Bing, E-mail: yangbing@ysfri.ac.cn