

用鸡胚培养对虾白斑综合症病毒(WSSV)的研究

刘 飞, 李登峰*

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为探索对虾白斑综合症病毒(WSSV)能否在鸡胚中培养, 基于稳定培养体系, 将 WSSV 接种到 SPF 鸡胚中. 收获接种 3 d 后死亡的鸡胚, 从中提取病毒; 将其再次接种到健康鸡胚中, 传代 5 次后, 由卵黄囊膜提取病毒, 将其经肌肉注射至克氏原螯虾, 结果实验组克氏原螯虾 100% 死亡, 而对照组无死亡情况. 对各代鸡胚及克氏原螯虾进行 PCR 和电镜检测, 实验组呈 WSSV 阳性; 电镜下, 死亡鸡胚细胞中可见大量正在组装的病毒粒子; 表明 WSSV 可用鸡胚进行培养.

关键词: 对虾白斑综合症病毒; 鸡胚; 培养

中图分类号: Q93-335

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2017) 01-0047-05

20 世纪 90 年代初期, 日本、中国、泰国、印度等亚洲和印度太平洋地区大多数对虾养殖场持续出现对虾暴发性死亡, 其典型症状是病虾头胸甲部位出现大量白色斑点, 因此被称为白斑综合症(WSS)[1-3]. 发生的罪魁祸首是对虾白斑综合症病毒(WSSV), WSSV 具有感染力强、发病快、致死率高等特点, 自被发现以来一直是全球水产和病毒界的研究热点[4-7]. 该病毒宿主范围非常广泛, 已发现和确定的有近 80 种. 目前, 试验用 WSSV 主要通过肌注克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*)来进行增殖培养[8]. 但克氏原螯虾(俗称小龙虾)的培养具有季节性限制、培养环境易受其他微生物的污染, 构建一个无潜在污染、便捷的、不受季节限制的培养体系非常重要. 为探索 WSSV 能否在鸡胚中培养, 本文建立一个稳定的培养体系开展研究.

1 材料与方法

1.1 材料

WSSV 由国家海洋局第三海洋研究所惠赠. 收集健康的克氏原螯虾, 于室内进行适应培养 3~5 d 后用于实验. 零日龄 SPF 鸡胚购自慈溪益大禽业有限公司. PCR 引物: WSSV 特异引物, F: 5'-TATTG

TCTCTCCTGACGTAC-3', R: 5'-CACATTCTTCA CGAGTCTAC-3', 目标条带 300 bp^[9], 由上海生工生物工程有限公司合成.

1.2 病毒增殖及提取

取病毒悬液经腹肌注射克氏原螯虾, 每只接种 0.1 mL. 接种后于 25~28 °C 条件下静养, 每日换水. 注射后 3~8 d 内收集垂死克氏原螯虾, 去壳后取肌肉, 按 1 g:10 mL 比例加入到 PBS(8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄, 溶于 1 L 蒸馏水中, 调整 pH 至 7.4, 高压灭菌)缓冲液中, 用电动匀浆器匀浆. 将匀浆液于 4 °C 条件下, 6 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 留含病毒的上清液. 将沉淀用 1~2 mL 0.1 mol·L⁻¹ 的 PBS 重悬, 再次匀浆, 将得到的匀浆液于 4 °C, 6 000 r·min⁻¹ 离心 20 min. 合并两次离心所得的上清液, 依次用 0.45, 0.22 μm 的滤膜抽滤, 每毫升过滤液中加入 1 000 单位青霉素和 1 000 μg 链霉素, 在 4 °C 温度下冰浴过夜处理, 即得到对虾白斑综合症病毒接种液. 另取健康克氏原螯虾去壳, 参照上述方法, 制备对照组接种液.

1.3 鸡胚预处理

利用气体熏蒸消毒法对鸡胚消毒, 照蛋划出气室后, 使气室朝上, 置于 38 °C, 75%RH 的恒温恒

收稿日期: 2016-01-10.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家科技部星火计划(2014GA701018); 宁波市科技局农业攻关项目(2011C10004); 浙江省教育厅项目(Y201327815); 浙江省重点学科开放基金(E02009124200); 宁波大学科研基金(XKZSC1519); 宁波大学王宽诚幸福基金.

第一作者: 刘飞(1991-), 女, 安徽滁州人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水生生物病毒. E-mail: lvphy0708@126.com

*通信作者: 李登峰(1975-), 女, 湖南双峰人, 副教授, 主要研究方向: 水产动物病害防治. E-mail: lidengfeng@nbu.edu.cn

湿培养箱中进行培养,每3~4h翻蛋1次。接种前照蛋,选出发育良好的活胚,划出胚的位置。挑选活胚依据:血管明显,可见血管搏动;有胚动;有绒毛尿囊膜发育界线,照检时可见胚胎极度弯曲并有黑眼珠。

1.4 病毒接种

选取健康、发育良好的6~7日龄鸡胚随机分组,每组10只。实验组1将WSSV接种液按 $0.15\text{ mL}\cdot\text{只}^{-1}$ 接种到鸡胚尿囊膜上;实验组2将WSSV接种液按 $0.15\text{ mL}\cdot\text{只}^{-1}$ 接种到鸡胚卵黄囊。对照组鸡胚用健康克氏原螯虾制备的接种液接种。接种好的鸡胚于 33°C 下培养,每日观测鸡胚情况,收集接种后2~10d死亡鸡胚,接种后第10天晚上终止培养。

1.5 鸡胚的收获

剔除注射后24h内死亡的,收集接种2d后死亡的鸡胚。收获前需置于 4°C 冰箱6h过夜,使血液凝固,以免收获时血细胞与尿囊液中病毒发生凝集,造成病毒滴度下降。然后在无菌条件下分别收集鸡胚的卵黄囊液、卵黄囊膜、尿囊液与尿囊膜。

1.6 传代

为验证该病毒是否可以在鸡胚中进行传代培养,分别取实验组攻毒4~6d后死亡的鸡胚和同期对照组鸡胚的卵黄囊膜和尿囊膜,按 $1\text{ g}:10\text{ mL}$ 比例加PBS匀浆,分别参照1.2节条件和1.4节方法,将其离心、过滤,制成接种液,接种到SPF鸡胚卵黄囊上。接种好的鸡胚置于恒温恒湿培养箱培养,每日照检鸡胚生长存活情况,收集接种后24h死亡的鸡胚即为二代鸡胚。用攻毒后4~6d死亡的二代鸡胚,制备接种液(方法同上),再次接种SPF鸡胚卵黄囊,如此依次传代5次。

1.7 病毒DNA的提取

在无菌条件下,分别取卵黄囊液、卵黄囊膜、尿囊液与尿囊膜,置 1.5 mL EP管中,加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ TE缓冲液,捣碎,混匀。经SDS和蛋白酶K消化处理后,用酚-氯仿和异戊醇反复抽提,然后用体积分数70%的乙醇洗涤,待乙醇挥发完,将析出的DNA溶于无菌去离子水中, -20°C 保存备用。

1.8 WSSV病毒的PCR检测

PCR扩增采用 $20\text{ }\mu\text{L}$ 体系: $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl ($\text{pH}9.0$), $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP,上下游引物各 $10\text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$,Taq酶 1 U 。在 95°C 下预

变性 2 min 后,按下列条件循环扩增32次: 94°C 30 s , 58°C 30 s , 72°C 30 s ,最后 72°C 延伸 2 min 。每管取 $5\text{ }\mu\text{L}$ PCR扩增产物,经质量分数2%的琼脂糖凝胶电泳,EB染色后紫外灯下观察结果。

1.9 回归感染

将75只健康的克氏原螯虾随机分成3组,分别取传代5次的实验组死亡鸡胚与对照组鸡胚的卵黄囊膜,制备接种液,经腹肌注射实验组1和实验组2的克氏原螯虾($0.1\text{ mL}\cdot\text{只}^{-1}$);此外,实验组3注射相同体积的PBS缓冲液。3组在同一条件下培养,观察并记录其活动、死亡情况。

1.10 超薄切片制作与电子显微镜观察

分别取实验组、对照组鸡胚的卵黄囊膜与尿囊膜,取回接感染实验组与对照组的克氏原螯虾外壳膜、肠、肌肉等,用新双面刀片修成约 $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 的组织块,用质量分数2.5%戊二醛于 4°C 下避光固定2h,再用质量分数1%锇酸避光固定1h后,一次用冷PBS($\text{pH}7.4$)缓冲液漂洗20min,乙醇梯度脱水。脱水后的组织块用Epon812环氧树脂包埋,烤箱内烘干,制成包埋块。包埋块用超薄切片机切片,用醋酸铀-柠檬酸铅双染色(室温,15~20min),透射电镜(日立H-7650)下观察并拍照。

2 结果

2.1 鸡胚接种与回接感染

接种后对照组鸡胚无死亡情况。首代实验组1、2的鸡胚经卵黄囊、尿囊膜接种病毒后,3~10d死亡,死亡时间主要集中在第4~6天(表1),接种方式间无明显差异。电镜和PCR检测中,两组的检测结果均一致,卵黄囊接种法操作更简单,所以后续传代培养均采用卵黄囊接种法。传代接种实验中,每代实验设置同首代接种感染,结果类似。回归感染试验中,在鸡胚中传代培养5次后制备的病毒悬液接种克氏原螯虾3d后开始出现死亡(表2),10d内致死率为100%,而同期2个对照组的克氏原螯虾均没有发生死亡。

表1 WSSV接种首代鸡胚卵黄囊引起的死亡情况

组别	鸡胚/只	接种液来源	各鸡胚接种后死亡的天数(只数)
1	10	对照组	无死亡
2	10	实验组	4(1)、5(2)、6(4)、10(3)

表 2 鸡胚培养的 WSSV 回归感染克氏原螯虾情况

组别	样本/只	接种液来源	螯虾死亡的天数 (只数)	累积死亡 率/%
1	25	实验组鸡胚 卵黄囊液	3(1)、4(1)、6(4)、 7(10)、8(8)、10(1)	100
2	25	对照组鸡胚 卵黄囊液	无死亡	0
3	25	PBS	无死亡	0

2.2 WSSV 的 PCR 检测

用 WSSV 特异引物对对照组鸡胚样品进行 PCR 检测, 结果均为阴性(图 1(a): 泳道 1、3、5、7、9 模板来源于对照组卵黄囊膜; 泳道 2、4、6、8、10 模板来源于对照组卵黄囊液; M 为 DNA Maker)。实验组死亡鸡胚的卵黄囊液、卵黄囊膜、尿囊液与尿囊膜大多能检测到 300 bp 的目的条带(图 1(b): 泳道 1、3、5、7、9 模板来源于实验组卵黄囊膜; 泳道 2、4、6、8、10 模板来源于实验组卵黄囊液)。其中, 实验组各样品信号强弱有差异。如图 1(b)所示, 泳道 1、2、4、5、6、7、8 有明显目的条带; 而泳道 3 目的条带很弱, 泳道 9、10 无带, 这 3 条泳道扩增所用模板来源于第 10 天才死亡的实验组鸡胚。这可能与各鸡胚间存在 WSSV 感染、增殖能力的个体差异有关。所以如实验方法中所述, 我们选择每次鸡胚接种后培养至第 10 天终止试验, 选取 4~6 d 内死亡鸡胚用来制备传代液。传代至第五代后,

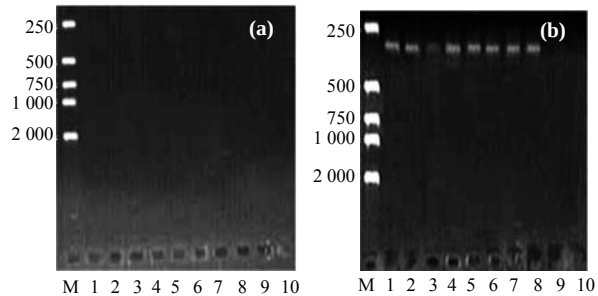


图 1 第一代鸡胚中 WSSV 的 PCR 扩增产物电泳结果

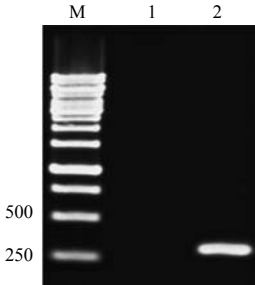


图 2 第五代鸡胚卵黄囊膜中 WSSV 的 PCR 检测结果

可能因为 WSSV 已适应鸡胚培养体系, PCR 扩增信号较强(图 2: 泳道 1 模板来源于对照组卵黄囊膜; 泳道 2 模板来源于实验组卵黄囊膜)。PCR 检测回归的实验组克氏原螯虾各组织结果与第五代鸡胚类似, 均呈强阳性, 而对照组呈阴性。

2.3 电镜检测结果

电子显微镜下, 实验组各样品均可见 WSSV 粒子。图 3 显示接种后第 6 天死亡的鸡胚卵黄囊膜中存在大量成熟(长箭头)和正在包装的(短箭头)病毒。鸡胚中所观察到 WSSV 多为短杆状或椭球状, 回归感染死亡的克氏原螯虾细胞中则存在大量典型的长杆状 WSSV 病毒粒子(图 4 箭头所示), 表明 WSSV 可在鸡胚中增殖, 并保留其对虾的致病力, 但在鸡胚中子代病毒粒子多为短杆状或椭球状, 回接感染虾后又可恢复到原有的形态特征。

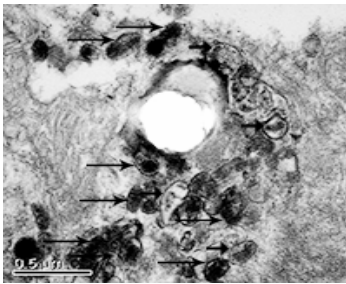


图 3 WSSV 接种组鸡胚卵黄囊膜超薄切片

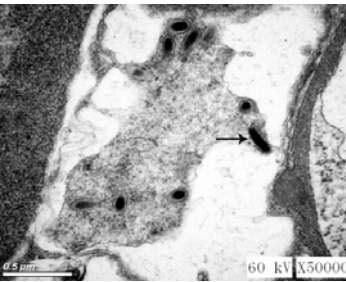


图 4 鸡胚增殖 WSSV 回接感染的克氏原螯虾肠道超薄切片

3 讨论

目前, 培养动物病毒的方法有组织细胞培养法、动物培养法和鸡胚培养法。与组织细胞培养法相比, 鸡胚培养法容易成功、操作简单; 与动物培养法相比, 鸡胚培养接种所需的载体来源容易、成本低廉、无饲养管理及隔离等的特殊要求, 无需特殊设备或条件^[10-11]。此外, 鸡胚一般无病毒隐性感染、敏感范围广、能适应多种病毒, 因此是常用的培养动物病毒的载体, 尤其在人、畜、禽等动物的

病毒培养方面应用广泛。此外,在禽类病毒的分离及鉴定,抗原和疫苗的制备,以及病毒性质的研究等方面应用也比较多^[12-13]。

水产病毒目前大多采用细胞培养,在鸡胚中培养的尝试极其罕见,迄今尚无有关水生甲壳动物病毒鸡胚培养的报道。此前,WSSV已建立细胞培养和动物培养体系^[8,14]。其中,细胞培养法条件苛刻,且目前尚无虾蟹类细胞培养体系,而原代细胞有存活时间短、不能体外有效增殖、有潜在其他病原污染等不利因素,因此很少使用。对于动物培养法,由于对虾价格昂贵,饲养不易,因而常用螯虾作为动物模型来增殖病毒^[8]。即将WSSV腹肌注射螯虾,使病毒在其体内增殖,然后再从组织中提取^[15]。此方法较简单,但螯虾生活环境复杂,WSSV在增殖、纯化过程中易受其他病原微生物的污染,且其培养具有季节性,会受到季节限制。本研究用SPF鸡胚作为病毒增殖载体,能克服上述缺点,为水产病毒培养提供新的思路和途径。

本文将WSSV接种到健康、发育良好的鸡胚中,收获实验鸡胚的卵黄囊膜和卵黄囊液并提取病毒,传代接种鸡胚5次后,回归感染克氏原螯虾,结果致死率达100%。电镜下实验组鸡胚和克氏原螯虾各组织均可见大量WSSV。而且,实验组鸡胚中存在大量正在组装的病毒粒子,表明WSSV可在鸡胚中大量增殖。对实验组鸡胚和回归的克氏原螯虾进行PCR检测,结果呈阳性。上述结果表明成功地建立了WSSV鸡胚培养体系,同时也是首个公开报道在鸡胚中培养的水生甲壳动物病毒。

病毒的鸡胚培养方法有卵黄囊接种法、羊膜腔接种法、尿囊接种法、脑内接种法、静脉接种法和绒毛膜接种法等^[10-11,16]。其中卵黄囊法较为简单,对操作者要求较低。不同病毒在鸡胚中的增殖部位也有所不同,如牛痘病毒适宜于在绒毛尿囊膜上生长,而鸡新城疫病毒则适宜接种在尿囊腔和羊膜腔内。本文中,首代尝试了卵黄囊接种法和尿囊接种法,二者鸡胚的死亡情况、电镜检测和PCR检测的结果相似,故后续操作均采用卵黄囊接种法。在文中的首代培养中,收集并检测了WSSV接种后3~10 d死亡的鸡胚,结果发现第10天才死亡的鸡胚中病毒量少,而4~6 d集中死亡时间收集的鸡胚中存在大量病毒,这可能是因鸡胚的个体差

异使得个别鸡胚对WSSV有较强的抗性所致。

电镜下,鸡胚卵黄囊膜细胞中可见大量的病毒堆积,其中不乏正在组装者,表明WSSV可在鸡胚中旺盛增殖。然而鸡胚中培养的WSSV与克氏原螯虾中典型WSSV形态存在差异。典型WSSV是一种无包涵体的长杆状病毒^[17],其完整病毒粒子长约250~380 nm,宽约70~150 nm,一端存在细长鞭毛状结构。本研究中,电镜下鸡胚卵黄囊膜细胞中WSSV粒子大多数呈短杆状或椭圆形,长度约为200~300 nm,宽约100~200 nm。而回归感染克氏原螯虾后,电镜观察到组织中可见典型WSSV粒子,即鸡胚中增殖的WSSV回归感染虾后,又可恢复其原来典型形态。这可能是由于WSSV本来就来源于生理生化条件、进化水平与陆生鸡胚存在很大差异的水生低等生物有关。此点在以后的水生低等生物病毒鸡胚培养研究中需要注意。同一种病毒在不同宿主中可能会呈现不同的形态特征,如Al-Mubarak等报道禽流感病毒A在鸡、鸭细胞中呈不同形态^[18]。该病毒在鸭细胞中较长,呈细丝状;而在鸡细胞中较短,呈球状。为分析否与病毒本身的基因突变有关,他们分别测定了经过鸡细胞增殖的和鸭细胞增殖的禽流感病毒A的基因组,结果发现序列一致。通过研究,他们发现宿主细胞组分actin等与该病毒形态有关,抑制鸭细胞中actin的表达后,细胞中增殖病毒变短,呈球状。结合实验结果和文献分析,Al-Mubarak等提出是宿主细胞们本身的特点决定病毒在其中呈现的形态差异。WSSV在鸡胚中较天然宿主中变短、变胖,这与Al-Mubarak等对禽流感病毒A的观察一致。已有文献报道水生低等动物变形虫的病毒可感染人类^[19-20],本研究成功地使水生低等生物病毒感染鸡胚,亦再次提示水、陆生物间以及高、低等生物间病毒的交叉感染界限并不绝对。

参考文献:

- [1] 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]. Journal of Fish Diseases, 2008, 31(1):1-18.
- [2] 王清印, 杨丛海. 中国对虾健康养殖的发展现状及展望[J]. 中国水产, 2005, (1):21-24.

- [3] LEU J H, YANG F, ZHANG X, et al. Whispovirus[J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2009, 328:197-227.
- [4] DIEU B T M, MARKS H, ZWART M P, et al. Evaluation of white spot syndrome virus variable DNA loci as molecular markers of virus spread at intermediate spatiotemporal scales[J]. Journal of General Virology, 2010, 91:1164-1172.
- [5] REN Q, HUANG Y, HE Y D, et al. A white spot syndrome virus microRNA promotes the virus infection by targeting the host STAT[J]. Scientific Reports, 2015, 5:1-12.
- [6] LI Z, LI F, HAN Y, et al. VP24 is a chitin-binding protein involved in white spot syndrome virus infection [J]. Journal of Virology, 2015, 90(2):842-850.
- [7] PAZIR M K, AFSHARNASAB M, NIAMAYMANDI N, et al. Histopathological observation of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in shrimp farms, *Litopenaeus vannamei*, in Bushehr Province, Iran[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2012, 6(5):209-219.
- [8] 朱建中, 陆承平. 对虾白斑综合症病毒在螯虾动物模型的感染特性[J]. 水产学报, 2001, 25(1):47-51.
- [9] 徐丽美, 王玮, 杨丰. 对虾白斑杆状病毒(WSSV)定量PCR 检测技术研究[J]. 高技术通讯, 2001, 11(1):41-61.
- [10] 胡广洲. 中华鳖暴发性败血症的研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2010.
- [11] 张春杰, 程相朝. 不同途径接种鸡胚培养传染性法氏囊病病毒的比较研究[J]. 中国兽医科技, 1996, 26(4): 25-27.
- [12] GUY J S. Isolation and propagation of coronaviruses in embryonated eggs[J]. Methods in Molecular Biology, 2015, 1282:63-71.
- [13] NUÑEZ L F, PARRA S H, METTIFOGO E, et al. Isolation of chicken astrovirus from specific pathogen-free chicken embryonated eggs[J]. Poultry Science, 2015, 94(5):947-954.
- [14] 姜有声, 邢婧, 王世表, 等. 白斑综合症病毒的体外增殖研究[J]. 水产学报, 2004, 28:93-96.
- [15] XIE X X, LI H Y, XU L M, et al. A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles[J]. Virus Research, 2005, 108:63-67.
- [16] 中国医学科学院流行病防治研究所. 常见病毒实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1978:25-32.
- [17] 郭君君. 对虾白斑综合症病毒(WSSV)进入宿主细胞的方式及增殖情况[D]. 厦门: 海洋研究局第三研究所, 2013.
- [18] AL-MUBARAK F, DALY J, CHRISTIE D, et al. Identification of morphological differences between avian influenza A viruses grown in chicken and duck cells[J]. Virus Research, 2015, 199:9-19.
- [19] HSUEH T Y, GIBSON K E. Transfer of *Acanthamoeba* spp. to fresh produce from water and environmental surfaces[J]. Letters in Applied Microbiology, 2015, 61(2): 192-198.
- [20] LASCOLA B. Looking at protists as a source of pathogenic viruses[J]. Microbial Pathogenesis, 2014, 77:131-135.

Propagation of white spot syndrome virus (WSSV) in embryonated eggs

LIU Fei, LI Deng-feng*

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In order to establish a stable system of cultivating white spot syndrome virus (WSSV), the specific pathogen free chicken embryonated eggs are inoculated with WSSV suspensions. Both the yolk sac membrane and yolk sac fluid are harvested to prepare passage inoculation suspensions. Passages 2-5 are carried out by inoculating SPF CEE via the yolk sac route. Yolk sac membrane and yolk sac fluid are detected via transmission electron microscope (TEM) observation and PCR. A great deal of WSSV particles are identified in the ultra-thin sections of experimental groups. Positive PCR results in experimental groups inoculated with WSSV and negative results in control groups are obtained. In artificial infection, WSSV isolated from the fifth passage of experimental chicken embryo results in 100% mortality to *Procambarus clarkia*, which confirms the success of replication of WSSV in CEE.

Key words: white spot syndrome virus; chicken embryonated eggs; cultivation

(责任编辑 章践立)