

白斑综合征病毒 (WSSV) 灭活制剂对克氏原螯虾抗 WSSV 的研究

裘杰珂, 赖勇勇, 许英蕾, 朱 斐

(浙江农林大学 动物科技学院/动物医学院 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】研究经双乙炔亚胺 (BEI) 灭活的白斑综合征病毒 (WSSV) 灭活制剂保护克氏原螯虾 *Procambarus clarkii* 抗 WSSV 感染的效果, 以期为白斑综合征的防治提供有效的免疫方法。【方法】应用 BEI 对 WSSV 和 WSSV 超声破碎液进行灭活, 通过口服和注射分别对克氏原螯虾进行免疫, 再对其进行抗 WSSV 感染的效果研究。【结果】WSSV 在 BEI 处理 24 h 可以被完全灭活, 通过口服途径用灭活制剂免疫克氏原螯虾 7 d 后攻毒, 克氏原螯虾死亡率显著下降, 且口服免疫的效果要好于注射免疫。【结论】经 BEI 灭活 24 h 的 WSSV 灭活制剂对克氏原螯虾是安全的, 口服免疫后可以显著降低克氏原螯虾感染白斑综合征病毒的死亡率。图 2 表 3 参 19

关键词: 白斑综合征病毒; 双乙炔亚胺 (BEI); 灭活; 克氏原螯虾

中图分类号: S945.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2023)03-0680-05

Anti-WSSV effect of inactivated preparation of white spot syndrome virus (WSSV) on *Procambarus clarkii*

QIU Jieke, LAI Yongyong, XU Yinglei, ZHU Fei

(Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, College of Animal Science and Technology/College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] This study is to explore the protective effect of white spot syndrome virus (WSSV) preparation inactivated by binary ethyleneimine (BEI) on *Procambarus clarkii* against WSSV infection, so as to provide an effective immune method for the prevention of WSSV. [Method] Starting with the preparation of WSSV inactivation preparations, BEI was applied to inactivate WSSV, immunize *P. clarkii* by oral and injection methods, and then conduct anti-WSSV infection test. [Result] WSSV could be completely inactivated under BEI treatment for 24 hours. After 7 days of oral immunization with inactivated WSSV, the mortality rate of *P. clarkii* was significantly decreased. The effect of oral immunization was better than that of injection immunization. [Conclusion] The inactivated WSSV preparation inactivated by BEI for 24 hours is safe for *P. clarkii* and can significantly reduce its mortality infected with WSSV. [Ch, 2 fig. 3 tab. 19 ref.]

Key words: white spot syndrome virus (WSSV); binary ethyleneimine (BEI); inactivate; *Procambarus clarkii*

白斑综合征病毒 (WSSV) 是线头病毒科 Nimaviridae 白斑病毒属 *Whispovirus* 的唯一成员^[1]。在电子显微镜下可以观察到 WSSV 的核衣壳呈棒状, 核衣壳表面有 3 层膜交叉覆盖, 并形成阴影, 核衣壳的一

收稿日期: 2022-07-11; 修回日期: 2022-12-08

基金项目: 浙江省自然科学基金面上资助项目 (LY20C190001)

作者简介: 裘杰珂 (ORCID: 0000-0002-0613-4427), 从事水产动物免疫研究。E-mail: 2472723249@qq.com。通信作者: 朱斐 (ORCID: 0000-0003-1711-1914), 副研究员, 博士, 从事水产动物病害与免疫研究。E-mail: zhufei@zafu.edu.cn

端还有一个独特的尾状结构。WSSV 的核衣壳由 14 个环组成，其中包含 1 个约 300 kb 的圆形 dsDNA 基因组^[2]，是迄今为止被完全测序的最大动物病毒之一^[3]。在养殖条件下，感染 WSSV 的虾类可在 3~10 d 内死亡^[4]。另外，WSSV 还会感染其他甲壳类动物，其中就包括克氏原螯虾 *Procambarus clarkii*^[5-6]。WSSV 危害大、传播快，已对中国虾类养殖业造成了数十亿美元的经济损失。然而常规的化学和物理方法并不能有效地控制 WSSV 对虾类的感染。因此，找到并采取合理的预防手段才是控制该病毒病的关键。有关物理和化学消毒方法对 WSSV 的灭活作用已有较多报道^[7-10]，已确定了温度、紫外线、pH、臭氧、盐度、干燥和化学消毒剂等因素对 WSSV 灭活的影响。有研究发现：大部分化学试剂对 WSSV 灭活后，WSSV 的免疫原性会受到损害^[7, 9-11]，而双乙烯亚胺 (BEI) 对免疫原性的损害相对较小，因此 BEI 是对含有 DNA 或 RNA 基因组动物病毒的首选灭活剂^[12-14]。基于此，本研究从 WSSV 灭活制剂着手，用 BEI 灭活 WSSV，通过口服和注射途径分别建立克氏原螯虾的主动免疫体系，再对其进行抗 WSSV 感染的效果研究，分析 WSSV 灭活制剂对 WSSV 的防治效果，为防治 WSSV 提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验分组

LAI 等^[15]研究可知：超声破碎 WSSV 后获得的蛋白质和核酸可以感染克氏原螯虾并导致其死亡，其有效性与完整的 WSSV 病毒一样。因此，本研究对病毒进行超声破碎，之后进行 BEI 灭活，观察 BEI 灭活制剂是否具有与超声破碎制剂相同的抗 WSSV 效果。本研究分为口服和注射免疫，免疫 7 d 后再进行 WSSV 攻毒感染。具体分组如表 1 所示。克氏原螯虾购于安徽宣城，养殖于充气水箱中，水温为 25 ℃，每日投喂克氏原螯虾专用饲料。

表 1 WSSV 灭活制剂对克氏原螯虾抗 WSSV 的实验分组

Table 1 Experimental groups of anti-WSSV effects of WSSV inactivated preparation on *P. clarkii*

组别	实验内容	组别	实验内容
1	口服WSSV对照	6	注射BEI灭活WSSV破碎液12 h，免疫7 d后攻毒
2	注射WSSV对照	7	口服BEI灭活WSSV破碎液24 h，免疫7 d后攻毒
3	注射WSSV超声破碎液对照	8	口服BEI灭活WSSV破碎液1 h，免疫7 d后攻毒
4	注射BEI灭活WSSV破碎液24 h，免疫7 d后攻毒	9	口服BEI灭活WSSV破碎液12 h，免疫7 d后攻毒
5	注射BEI灭活WSSV破碎液1 h，免疫7 d后攻毒	10	磷酸盐缓冲溶液(PBS)阴性对照

1.2 超声破碎 WSSV

取经过 WSSV 感染的克氏原螯虾的尾部肌肉，参考 ZHU 等^[16]的方法提纯 WSSV。使用高速分散器将 WSSV 提纯液快速分散呈匀浆，用超高速冷冻离心机在 6 000 g 下离心 10 min，分离上清液后再次离心，重复 3 次。离心完成后，肌肉组织已基本去除，WSSV 病毒存在于上清液中。将上清液通过 300 目细胞筛过滤分散后，用离心机在 6 000 g 下离心 30 min。再将分离出的上清液通过 450 nm 的滤膜后，用离心机在 30 000 g 下离心 30 min，最后得到 WSSV 病毒粒子的白色沉淀。将提取到的病毒粒子用 10 mL 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 溶解后，使用 FS 200 T 超声波均质机 (上海盛溪) 破碎溶解的病毒颗粒。破碎完成后，在 30 000 g 条件下对超声破碎的病毒粒子离心 30 min，离心得到的上清液便是 WSSV 病毒粒子的破碎液，使用 100 nm 滤膜进行过滤，即为 WSSV 超声破碎液。

1.3 BEI 灭活 WSSV 破碎液

将 0.12 mol·L⁻¹BEI 溶液按 1:60 的体积比加入到病毒液中，使 BEI 的最终分子浓度为 2 mmol·L⁻¹。在 37 ℃ 下恒温灭活 3 个不同时间段 (1、12、24 h) 的病毒液，期间每 2 h 搅拌 1 次。经过规定时间后，剩余 BEI 以 50:1 的体积比例加入质量分数 2% 的硫代硫酸钠使灭活中止，制成 WSSV 灭活制剂。每 100 mL WSSV 灭活制剂中含 45 mg WSSV 粒子，WSSV 灭活制剂中 WSSV 的质量浓度为 0.45 g·L⁻¹。

1.4 免疫攻毒实验

克氏原螯虾养殖于 (25±1) ℃ 控温玻璃缸中，随机分成 10 组，每组 20 只，每组设 3 个重复，投喂配合饲料暂养 7 d。将 WSSV 超声破碎液与饲料混合均匀，混合 5 min 后用蜂胶液包被，风干 10 min 后投

喂受试克氏原螯虾。将 WSSV 提纯液与克氏原螯虾饲料混合均匀,混合 5 min 后用蜂胶液包被,风干 10 min 后投喂受试克氏原螯虾。7 d 后所有实验组进行攻毒研究,期间保证每组克氏原螯虾摄食等量的饲料,同时记录每日死亡率。

2 结果与分析

从表 2 可见:经 BEI 处理 WSSV 24 h 后,注射和口服免疫克氏原螯虾的死亡率为 0,说明没有感染性;而 BEI 灭活 WSSV 破碎处理液 1 h 的注射死亡率为 100.0%,口服死亡率为 10.0%,BEI 处理 12 h 的注射死亡率为 33.3%,口服死亡率为 0,说明口服免疫更安全,注射免疫危险性比较高,但是 BEI 处理时间过短也会使病毒没有完全灭活,因此 BEI 灭活 24 h 较为安全,后续实验均采用 BEI 灭活 WSSV 破碎液 24 h 的制剂。

从表 3 可见:WSSV 无论是通过口服感染还是注射感染,死亡率均为 100%。用 BEI 灭活 WSSV 破碎液 1 和 12 h 分别采用注射或口服免疫克氏原螯虾,虽然免疫过程中死亡了一些,但将活着的克氏原螯虾 7 d 后攻毒,口服的存活率为 30%~40%,注射的效果较差,最后的存活率为 20%(图 1)。以上结果说明灭活时间延长后,不但灭活更完全,而且灭活制剂的保护效果更好,因此在后续的研究中采用了 24 h 的灭活时间。用 BEI 灭活 WSSV 破碎液 24 h 制成灭活制剂,采用注射或口服免疫克氏原螯虾 7 d 后分别注射、口服攻毒,结果发现 WSSV 灭活制剂的口服免疫效果明显,比起注射 WSSV 组和口服 WSSV 组的 100% 死亡率,注射免疫的克氏原螯虾在攻毒后存活率为 40%,口服免疫的存活率为 50%(图 2);经灭活制剂免疫 7 d 后,再去感染 WSSV,极大地降低了死亡率,免疫效果比较明显。

表 2 BEI 灭活 WSSV 感染克氏原螯虾的死亡率

Table 2 Mortality of <i>P. clarkii</i> infected with BEI-inactivated WSSV		
组别	灭活时间/h	死亡率/%
注射BEI灭活WSSV破碎液	1	100.0
	12	33.3
	24	0
口服BEI灭活WSSV破碎液	1	10.0
	12	0
	24	0

表 3 BEI 灭活 WSSV 制剂免疫 7 d 后攻毒克氏原螯虾的死亡率

Table 3 Mortality rate of <i>P. clarkii</i> after 7 days of BEI-inactivated WSSV (ruptured ultrasonically) immunization		
组别	灭活时间/h	死亡率/%
PBS	0	0
注射WSSV	0	100
口服WSSV	0	100
口服BEI灭活WSSV破碎液	1	70
口服BEI灭活WSSV破碎液	12	60
注射BEI灭活WSSV破碎液	12	80
注射BEI灭活WSSV(7 d后注射攻毒)	24	60
口服BEI灭活WSSV(7 d后口服攻毒)	24	50

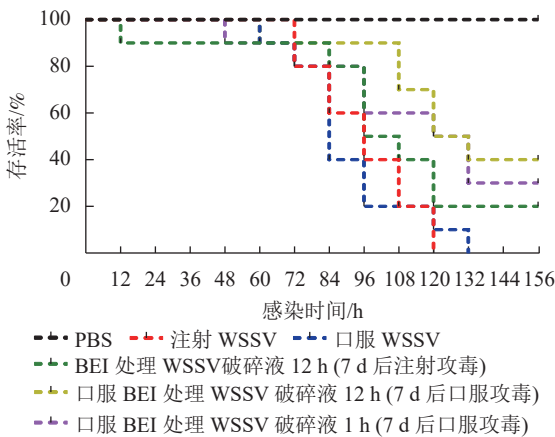


图 1 BEI 灭活 WSSV 破碎液免疫 7 d 后攻毒克氏原螯虾的存活率
Figure 1 Survival rate of *P. clarkii* after 7 days of BEI-inactivated WSSV (ruptured ultrasonically) immunization

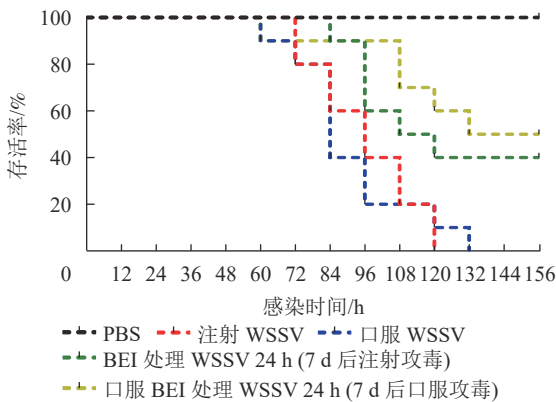


图 2 BEI 灭活 WSSV 制剂免疫 7 d 后攻毒克氏原螯虾的存活率
Figure 2 Survival rate of *P. clarkii* after 7 days of BEI-inactivated WSSV immunization

3 讨论与结论

已有研究表明: WSSV 囊膜蛋白可以诱导甲壳动物对 WSSV 产生抵抗力, 从而大幅提高 WSSV 攻毒后的成活率; 多糖 (如葡聚糖、壳聚糖、甲壳素) 也被认为能提高甲壳动物的免疫力, 并被广泛用于提高甲壳动物抗细菌性和病毒性疾病的研究^[6-8]。由 BEI 灭活的 WSSV 灭活制剂, 可以保护 WSSV 囊膜蛋白的完整性^[16], 使其免疫原性最大限度不受破坏。

本研究表明: 用 BEI 灭活的 WSSV 灭活制剂免疫接种克氏原螯虾 7 d 后, 可在一定程度上保护克氏原螯虾免受 WSSV 的侵害。克氏原螯虾对 WSSV 非常敏感, 通过口服和注射途径的克氏原螯虾死亡率都超过 90%^[17]。在本次研究中, 随着灭活时间的延长, 注射和口服 2 mmol·L⁻¹ BEI 灭活 WSSV 制剂的克氏原螯虾存活率越来越高, 说明只要灭活时间足够, 使用 BEI 灭活的 WSSV 灭活制剂可以成功地保护克氏原螯虾免受 WSSV 的侵害。NAMIKOSHI 等^[11]使用甲醛灭活的 WSSV 也获得了类似的结果, 受免疫保护的对虾 *Penaeus japonicus* 在 WSSV 攻毒实验中存活率显著升高。同样, 紫外线灭活的 WSSV 对日本对虾 *Marsupenaeus japonicus* 也有一定的免疫保护效果^[18]。这就引发了甲壳动物中是否存在免疫记忆的猜想^[19], 但要证实其中的免疫机制还有待更深入的研究。

综上所述, BEI 灭活的 WSSV 免疫克氏原螯虾的效果十分明显, 并且口服免疫的保护效果优于注射免疫。与 BEI 的灭活纯病毒液 24 h 相比, BEI 灭活的 WSSV 破碎液减少了灭活时间, 但最终也是口服免疫的效果较好。用 BEI 灭活的 WSSV 灭活制剂饲喂克氏原螯虾后, 可以有效地降低克氏原螯虾感染病毒的死亡率, 说明用 BEI 灭活的 WSSV 灭活制剂对克氏原螯虾抗 WSSV 具有保护性效果, 可成为抗白斑综合征的一种免疫策略。

4 致谢

感谢浙江杭州康德权科技有限公司的经费支持。

5 参考文献

- [1] FAUQUET C M, MAYO M A, MANILOFF J, *et al.* *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* [M]. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.
- [2] 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.
- [3] van HULTEN M C, WITTEVELDT J, PETERS S, *et al.* The white spot syndrome virus DNA genome sequence [J]. *Virology*, 2001, **286**: 7 – 22.
- [4] LIGHTNER D V. *A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp* [M]. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1996.
- [5] HOSSAIN S, CHAKRABORTY A, JOSEPH B, *et al.* Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction [J]. *Aquaculture*, 2001, **198**: 1 – 11.
- [6] LO Chufang, HO Chinghui, PENG Shaoen, *et al.* White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1996, **27**: 215 – 225.
- [7] CHANG Pohshing, CHEN Lijing, WANG Yuchi. The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus [J]. *Aquaculture*, 1998, **166**(1/2): 1 – 17.
- [8] WANG Yuchi, LO Chufang, CHANG Pohshing, *et al.* Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan [J]. *Aquaculture*, 1998, **164**: 221 – 231.
- [9] BALASUBRAMANIAN G, SUDHAKARAN R, MUSTHAQ S S, *et al.* Studies on the inactivation of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp by physical and chemical treatment, and seaweed extracts tested in marine and freshwater animal models [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2006, **29**(9): 569 – 572.
- [10] OSEKO N, CHUAH T T, MAENO Y, *et al.* Examination for viral inactivation of WSSV (white spot syndrome virus) isolated in Malaysia using black tiger prawn (*Penaeus monodon*) [J]. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 2006, **40**(1):

93 – 97.

- [11] NAMIKOSHI A, WU Jinlu, YAMASHITA T, *et al.* Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus [J]. *Aquaculture*, 2004, **229**: 25 – 35.
- [12] BAHNEMANN H G. Binary ethylenimine as an inactivant for foot and mouth disease virus and its application for vaccine production [J]. *Archives of Virology*, 1975, **47**(1): 47 – 56.
- [13] BAHNEMANN H G. Inactivation of viruses in serum with binary ethyleneimine [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1976, **3**(2): 209 – 210.
- [14] AARTHIA D, RAOA K A, ROBINSONB R, *et al.* Validation of binary ethyleneimine (BEI) used as an inactivant for foot and mouth disease tissue culture vaccine [J]. *Biologicals*, 2004, **32**(3): 153 – 156.
- [15] LAI Yongyong, ZHU Fei, XU Yinglei. WSSV proteins and DNA genome released by ultrasonic rupture can infect crayfish as effectively as intact virions [J/OL]. *Journal of Virological Methods*, 2020, **283**: 113917[2022-07-01]. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.113917.
- [16] ZHU Fei, DU Huahua, MIAO Zhiguo, *et al.* Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus using inactivated WSSV [J]. *Fish Shellfish Immunology*, 2009, **26**(5): 685 – 690.
- [17] JHA R K, XU Zirong, PANDEY A. Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus using vaccine expressed in *Pichia pastoris* [J]. *Fisheries Science*, 2006, **7**: 1011 – 1019.
- [18] ZANG Shaoqing, LÜ Lixia, LIU Chenfei, *et al.* Metabolomic investigation of ultraviolet ray-inactivated white spot syndrome virus-induced trained immunity in *Marsupenaeus japonicus* [J/OL]. *Frontiers in Immunology*, 2022, **13**: 885782 [2022-07-01]. doi: 10.3389/fimmu.2022.885782.
- [19] CHANG Yuhuan, KUMAR R, NG T H, *et al.* What vaccination studies tell us about immunological memory within the innate immune system of cultured shrimp and crayfish [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2018, **80**(1): 53 – 66.