

Detention Time of White Spot Syndrome Virus in the Body of *Aedes albopictus* Larva by Using Nest PCR Detection

Ziyan Wang, Xiongchao Ma, Fei Zhu

College of Animal Science and Technology, Zhejiang A & F University, Lin'an, Zhejiang
Email: zhufei@zju.edu.cn

Received: Nov. 21st, 2016; accepted: Dec. 10th, 2016; published: Dec. 13th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

White spot syndrome virus (WSSV), which causes high mortality in many economic shrimp aquaculture, and is widespread over the world, makes the large economic losses to the shrimp industry in China. In recent years, *Procambarus clarkii* farming is also threatened by WSSV. Gradually, there are many reports about the massive dead of *P. clarkii* because of the infection of WSSV. *P. clarkii* in aquaculture area around Hangzhou was found to carry WSSV through field sampling. Therefore, the route of transmission of WSSV in freshwater ecosystems is worth studying deeply. *Aedes albopictus* not only has very strong aggressivity, but also is an epidemiologically important vector for the transmission of many viral pathogens, including the dengue fever, Ross River virus and West Nile virus. Although *A. albopictus* is an important part of the fresh water ecological system, the research of *A. albopictus* larvae with white spot syndrome virus has not been reported. This test detects that the detention time of white spot syndrome virus in the body of *A. albopictus* larva is 48 h by using Nest PCR detection. This study provides new evidence for the transmission of WSSV in fresh water and provides a new scientific basis for the prevention *Procambarus clarkii* from white spot syndrome.

Keywords

Nest PCR, White Spot Syndrome Virus (WSSV), *Aedes albopictus*

巢式PCR检测白斑综合征病毒在白纹伊蚊幼虫体内的滞留时间

王紫燕, 马雄超, 朱 斐

浙江农林大学, 动物科技学院, 浙江 临安
Email: zhufei@zju.edu.cn

收稿日期: 2016年11月21日; 录用日期: 2016年12月10日; 发布日期: 2016年12月13日

摘要

白斑综合征病毒(WSSV)是对全球虾类养殖业危害最大, 传播最广的病毒之一, 至今已经造成了数十亿美元的损失。克氏原螯虾的养殖也受到WSSV的威胁, 陆续有养殖的克氏原螯虾因感染WSSV而大量死亡报道[1]。通过野外采样在杭州周边的养殖区均有发现克氏原螯虾携带有WSSV, 因此对WSSV在淡水生态系统中的传播途径值得深入研究。白纹伊蚊既是一种攻击性很强的蚊子, 也是一种重要的病毒媒介, 它可以传播很多病原体, 包括登革热、罗斯河病毒和西尼罗病毒。白纹伊蚊作为淡水水体生态系统中的重要一环, 其幼虫携带白斑综合征病毒的研究仍未见报道。本试验通过巢式PCR技术检测出白斑综合征病毒在白纹伊蚊幼虫体内的滞留时间在48 h左右。本研究为WSSV在野外淡水水体中的传播媒介研究提供了新的证据, 为防治克氏原螯虾感染白斑综合征提供了新的科学依据。

关键词

巢式PCR, 白斑综合征病毒, 白纹伊蚊

1. 引言

巢式 PCR (Nested-PCR)是一种变异的聚合酶链反应(PCR), 使用两对 PCR 引物来扩增目的片段。第一对 PCR 引物扩增片段和普通 PCR 相似, 第二对引物称为巢式引物在第一次 PCR 扩增片段的内部进行第二次 PCR 扩增, 其产物片段短于第一次扩增的产物片段。巢式 PCR 的优点在于其扩增的特异性非常高。

白斑综合征病毒(WSSV)是对全球虾类养殖业危害最大, 传播最广的病毒之一, 至今已经造成了数十亿美元的损失。WSSV 是 *Nimaviridae* 科的 *Whispovirus* 属的代表种[1], 具有囊膜, 核衣壳呈杆状, 电镜下其大小约为(70~150) nm × (250~380) nm, 无包涵体, 有尾状结构[2]。克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)俗称小龙虾, 属甲壳纲、十足目、螯虾亚目、刺蛄科、原螯虾属, 是有一定经济价值的水产养殖品种, 但是近年来克氏原螯虾的养殖也受到 WSSV 的威胁, 陆续有养殖的克氏原螯虾因感染 WSSV 而大量死亡报道[3] [4] [5]。通过野外采样在杭州周边的养殖区有均发现克氏原螯虾携带有 WSSV, 因此对 WSSV 在淡水生态系统中的传播途径值得深入研究。白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)也被称为亚洲虎蚊, 属于长角亚目蚊科, 中等大小的黑色蚊虫, 上面并具由白色鳞片形成的斑纹, 白纹伊蚊源于东南亚, 是东南亚和中国的常见蚊种[6]。白纹伊蚊既是一种攻击性很强的蚊子, 也是一种重要的病原媒介, 它可以传播很多病原体[7], 包括登革热、罗斯河病毒和西尼罗病毒[8] [9]。白纹伊蚊作为淡水水体生态系统中的重要一环, 其幼虫携带白斑综合征病毒的研究仍未见报道。

2. 材料和方法

2.1. 材料

WSSV 毒种分离自野外采集发病的克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*), -80℃保存。聚合酶链式反应(PCR)扩增用 Ex 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。白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)雌性成虫取自野外,于实验室内繁殖出幼虫后立即取用。

2.2. 方法

2.2.1. 白斑综合征病毒滞留试验

从野外捞取健康活泼的白纹伊蚊幼虫,经巢式 PCR 抽样检测肌肉组织样本全部为 WSSV 阴性,用作 WSSV 滞留试验。WSSV 感染螯虾的方法根据文献报道进行[10],取 10 g 感染 WSSV 致死的克氏原螯虾肌肉剪碎匀浆,加入 100 ml 纯净水中,将白纹伊蚊幼虫放入,于 3 小时后捞出放入洁净的纯净水中,分别在换水后 24、48 和 72 小时取幼虫样品作巢式 PCR 检测。

2.2.2. WSSV 的 PCR 检测

病毒 DNA 提取根据试剂盒的操作步骤来进行,提取出的 DNA 样品利用引物 VP28a (Forward: 5'-AACCTCCGCATTCTGTG-3', Reverse: 5'-GTGCCAACTTCATCTCATC-3') 和 VP28b (Forward: 5'-cgcacagAcaata-3', Reverse: 5'-GTCTCAGTGCCAGAGTAGGT-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 μ L; 10 \times PCR 扩增缓冲液 5 μ L; MgCl₂ (25 mM) 3 μ L; dNTPs 1 μ L; 上游引物(20 mM) 1 μ L; 下游引物(20 mM) 1 μ L; Taq 酶 1 μ L。加超纯水至总体积为 50 μ L(以上都在冰上操作),置于 PCR 仪内进行扩增。PCR 程序为: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 59 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 运行 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 10 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物加入琼脂糖凝胶中进行电泳,电泳结束后用 Immage master VDS 成像系统检测目的条带。

3. 结果与分析

3.1. WSSV 的 PCR 检测结果

利用引物 VP28a, VP28b, VP28a 和 VP28b 组合分别进行 PCR 反应扩增囊膜蛋白 VP28 基因片段,PCR 扩增结果显示,引物 VP28a, VP28b, VP28a 和 VP28b 组合在 1 倍稀释的病毒 DNA 样品均可扩增出清晰的条带,但是 VP28a 和 VP28b 组合能在病毒 DNA 样品稀释 12 倍后扩增出特异性条带,而 VP28a 在病毒 DNA 样品稀释 4 倍后扩增不出特异性条带,VP28b 在病毒 DNA 样品稀释 2 倍后扩增不出特异性条带(图 1)。

3.2. 白斑综合征病毒滞留试验结果

取接种 WSSV 后 24、48 和 72 小时的白纹伊蚊幼虫样品做巢式 PCR 检测,PCR 扩增结果显示,在接种 WSSV 后 24 h, 48 h 和 72 h 白纹伊蚊幼虫体内都能检测到 WSSV,其中以 48 h 的特异性条带最多,而 72 h 后仅能扩增出一条特异性条带(图 2)。结果说明,WSSV 在白纹伊蚊幼虫体内的滞留时间最多能维持到 72 h。

4. 讨论

将病毒 DNA 样品进行 1~12 倍的逐步稀释后,分别用普通 PCR 和巢式 PCR 进行检测,分别使用 VP28a 单引物、VP28b 单引物和 VP28a 与 VP28b 结合的巢式 PCR 引物。PCR 检测结果表明,相比于普通的 PCR,巢式 PCR 的灵敏度较普通 PCR 高很多,扩增效率更高(图 1)。

白斑综合征病毒滞留试验结果表明,白斑综合征病毒在白纹伊蚊幼虫体内的滞留时间集中在 48 h 左右(图 2),在 24 h 的时候 WSSV 在白纹伊蚊幼虫体内的量较大,条带较亮,与阳性对照的亮度一样,在 48 h 的时候 WSSV 在大部分幼虫体内都有残留,但条带的亮度较浅。在 72 h 的时候 WSSV 虽然在幼虫

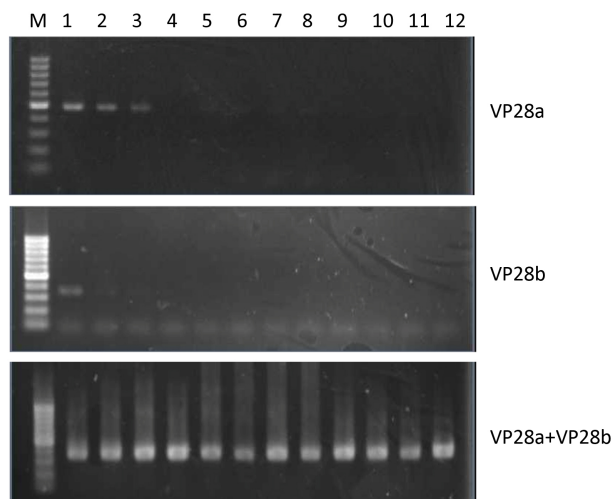


Figure 1. PCR amplification of VP28; marker indicates 100 - 1000 bp, 1 - 12 represented that the virus DNA samples were diluted 1 - 12 times respectively

图 1. VP28 的 PCR 检测结果; marker 为 100~1000 bp, 1~12 号分别代表病毒 DNA 样品进行 1~12 倍的稀释

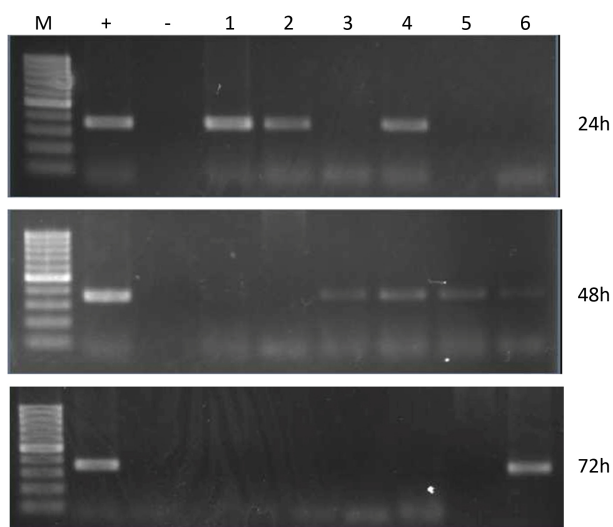


Figure 2. PCR amplification of detention time of white spot syndrome virus in the body of *Aedes albopictus* larva; marker indicates 100 - 1000 bp; 1 - 6 stand for 6 different *Aedes albopictus* larvae samples respectively

图 2. WSSV 在白纹伊蚊幼虫体内滞留时间的 PCR 检测结果放大; marker 为 100~1000 bp, 1~6 代表 6 个不同的白纹伊蚊幼虫样本

体内也有存在, 但是检测到的个体较少。由于克氏原螯虾是杂食动物, 又有同类相残和食腐的习性, 因此白纹伊蚊幼虫在水中可能成为传播 WSSV 的媒介, 进而造成克氏原螯虾的大量死亡。本研究为 WSSV 在野外淡水水体中的传播媒介研究提供了新的证据, 为防治克氏原螯虾感染白斑综合征提供了新的科学依据。

参考文献 (References)

- [1] Mayo, M.A. (2002) A Summary of Taxonomic Changes Recently Approved by ICTV. *Archives of Virology*, **147**,

1655-1663. <https://doi.org/10.1007/s007050200039>

- [2] Escobedo-Bonilla, C.M., Alday Sanz, V., Wille, M., *et al.* (2008) A Review on the Morphology, Molecular Characterization, Morphogenesis and Pathogenesis of White spot Syndrome Virus. *Journal of Fish Diseases*, **31**, 1-18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00877.x>
- [3] 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.
- [4] 兰江风, 代云佳, 林鑫. 养殖克氏原螯虾体内白斑综合征病毒的绝对定量分析[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 318-325.
- [5] 黄桦, 许永刚, 沈全华, 等. 白斑综合征病毒(WSSV)对不同规格克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)致病力及 ATPase 活性的影响[J]. 水产养殖, 2015, 36(1): 1-6.
- [6] 杨舒然, 刘起勇. 白纹伊蚊的全球分布及扩散趋势[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2013, 24(1): 1-4.
- [7] 宛庭利, 莫建初. 白纹伊蚊的危害现状及其防治[J]. 城市害虫防治, 2012, 2: 27-29.
- [8] 孟凤霞, 王义冠, 冯磊, 等. 我国登革热疫情防控与媒介伊蚊的综合治理[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2015, 26(1): 1-4.
- [9] 安继尧, 严格, 张学文, 等. 白纹伊蚊 - 登革热的重要媒介[J]. 医学动物防制, 2006, 17(8): 449-452.
- [10] 朱斐, 吕梦园, 许梓荣. 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[J]. 淡水渔业, 2012, 42(6): 43-48.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: ojfr@hanspub.org