

# 自然养殖水体投喂 CpG ODN 和表面展示 VP28 的解脂耶罗维亚酵母对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)抗 WSSV 的免疫保护作用\*

衣启麟<sup>1,2</sup> 刘瑞<sup>1</sup> 孙瑞<sup>1,2</sup> 王玲玲<sup>1</sup> 刘聪辉<sup>1,2</sup>  
迟振明<sup>3</sup> 宋林生<sup>1①</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所 中国科学院实验海洋生物学重点实验室 青岛 266071; 2. 中国科学院大学 北京 100049; 3. 中国海洋大学海洋生命科学学院 海洋生物遗传育种教育部重点实验室 青岛 266003)

**摘要** 用添加 CpG 寡聚核苷酸(CpG ODN)和表面展示 VP28 的解脂耶罗维亚酵母(VP28-yl)的饵料投喂凡纳滨对虾,进行田间中试实验。投喂 30 d 后进行 WSSV 感染实验,评估其对凡纳滨对虾的免疫保护作用。投喂实验结束后,CpG ODN 投喂组对虾的相对增重率达到(65.8±7.8)% ( $P<0.05$ ),这暗示 CpG ODN 可能具有促生长作用。WSSV 攻毒后,CpG ODN 和 VP28-yl 投喂组对虾中 WSSV 拷贝数与对照组相比均显著降低( $P<0.05$ ),相对免疫保护率分别可达到 26.7%和 36.7%。在投喂结束和 WSSV 刺激后,CpG ODN 组对虾中的呼吸爆发水平显著升高( $P<0.05$ )。而在 VP28-yl 投喂组,WSSV 引起的细胞凋亡则显著受到抑制( $P<0.05$ )。此外,WSSV 刺激后,STAT 基因在 CpG ODN 组和 VP28-yl 组对虾中的表达水平显著上调( $P<0.05$ ),分别在第 5 天和第 3 天达到最大值,而对照组中则显著下调。研究结果表明,CpG ODN 和 VP28-yl 增强了凡纳滨对虾抗病毒免疫力,对养殖对虾病毒性疫病的防控具有显著作用,可以作为免疫增强剂添加在饵料中,具有在养殖生产中推广使用的前景。

**关键词** CpG ODN; 解脂耶罗维亚酵母; 外膜蛋白 VP28; 白斑综合征病毒; 抗病毒免疫  
**中图分类号** Q953 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)02-0077-10

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)原产于南美洲太平洋沿岸水域,1988 年引入我国并迅速成为我国对虾养殖的主导品种,在我国海水养殖业中发挥了重要作用(李玉宏等,2014)。但在近年来,对虾养殖业疫病频繁发生,尤其以白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)引起的白斑综合征(WSD)最为严重(罗展等,2007;孙凡等,2013)。而使用传统的抗生素和化学药物进行病害防控的手段则因为会引发产品质量安全和生态环境安全问题而逐渐被禁止

(Johnson *et al*, 2008; Haq *et al*, 2012),寻找有效的免疫防控措施,实现对虾抗病害能力的增强,已经成为白斑综合征免疫防控的主要研究方向。

CpG 基序(CpG motif)是一种富含非甲基化鸟嘌呤和胞嘧啶的寡聚脱氧核苷酸序列(CpG ODN)。已有研究证明,CpG 能够激活免疫系统、引发下游免疫效应,并能够增强机体免疫力(Sparwasser *et al*, 1998; Choudhury *et al*, 2002)。经过 CpG 寡核苷酸处理后,对虾血细胞活性氧簇(Reactive oxygen species, ROS)

\*国家 973 计划“海水养殖动物主要病毒性疫病爆发机理与免疫防治的基础研究”(2012CB114405 973)资助。衣启麟, E-mail: yql\_del13@hotmail.com

① 通讯作者: 宋林生, 研究员, E-mail: lshsong@qdio.ac.cn

收稿日期: 2014-05-31, 收修改稿日期: 2014-07-02

水平以及细胞凋亡和吞噬能力均显著提高(Sun *et al.*, 2013a)。注射 CpG ODN 可以增加凡纳滨对虾抗病毒相关基因的表达量,抑制 WSSV 在对虾体内的复制,提高对虾成活率(Chuo *et al.*, 2005; Sung *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010a)。但目前相关的结果都是在实验室养殖环境中获得的,尚没有把 CpG ODN 作为一种新型免疫增强剂添加在饲料中进行田间试验的报道。以灭活 WSSV 病毒或病毒囊膜蛋白免疫对虾,已经被证实能够增强对虾抗 WSSV 侵染的能力,发挥免疫保护作用(Kurtz *et al.*, 2006; Cong *et al.*, 2008)。VP28 是 WSSV 一个重要的囊膜蛋白,在病毒入侵和粘附过程中均发挥关键作用(Li *et al.*, 2006; Yi *et al.*, 2004)。研究表明,包括凡纳滨对虾、克氏螯虾和斑节对虾等多种甲壳动物均可以通过摄入 VP28 而显著降低 WSSV 侵染后的死亡率。目前,关于 VP28 的导入方式和途径也有较多报道,如注射 VP28 蛋白亚单位疫苗及口服 VP28 DNA 疫苗等(Witteveldt *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2012; Syed *et al.*, 2011)。解脂耶罗维亚酵母(*Yarrowia lipolytica*)是一种无免疫原性的安全微生物,且具有完善的外源基因表达系统、表面分泌蛋白量高等优点,是食品业和养殖业中的一种优良工程菌株(Madzak *et al.*, 2004; Yue *et al.*, 2008)。

本研究用添加 CpG ODN 和表面展示 VP28 的解脂耶罗维亚酵母的复合饲料投喂凡纳滨对虾,进行田间中试实验,经过 30 d 的投喂后进行 WSSV 攻毒侵染,分别测定投喂实验结束后和 WSSV 攻毒后对虾血细胞呼吸爆发和凋亡水平以及相关抗病毒基因 *STAT* 和 *proPO* 表达量的变化,统计攻毒后 WSSV 拷贝数的变化和累计死亡率,以评估在自然养殖水体中投喂 CpG ODN 和表面展示 VP28 的解脂耶罗维亚酵母对凡纳滨对虾的免疫保护效应,为将来在对虾养殖生产中的应用提供更详实的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 饲料制备

选取在哺乳动物和水生生物中被证实有免疫增强作用的 5 条 CpG ODN 序列(图 1),由上海生工公

司合成,连接于 pUc 57 载体上,转化于 DE3 感受态细胞中,采用碱裂法进行质粒的大规模提取(Zhu *et al.*, 2005),100℃水浴中处理 10 min,进行片段化处理后获得实验所需 CpG ODNs。采用酵母表面展示技术将 VP28 基因展示于解脂耶罗维亚酵母(*Y. lipolytica*)的表面(Liu *et al.*, 2010b),并用实验室前期制备的 VP28 多克隆抗体进行免疫荧光检测。通过大规模发酵获得拌饲所需的展示 VP28 的酵母菌。基础饲料配方见表 1, CpG ODN 和展示 VP28 的解脂耶罗维亚酵母的添加量分别为 40 mg/kg 和  $1 \times 10^{11}$  CFU/kg,饲料制备工作在天津市海发珍品实业发展有限公司进行。

### 1.2 对虾与病毒

凡纳滨对虾的饲养和投喂实验在天津市汉沽区水产局对虾养殖场进行。在 3 块 1.5 亩的虾池中投放虾苗,投放密度为 5 万尾/亩,先投喂基础饲料,待对虾体长达到(10.0±1.5) cm,在其中两块虾池中改投喂添加 CpG ODN 和表面展示 VP28 的解脂耶罗维亚酵母的复合饲料,设为实验组(CpG ODN 组和 VP28-y1 组),另一虾池仍然投喂基础饲料,作为对照组,每天投喂 5 次,共计 30 d,日摄食量控制在虾体重的 5%左右。

WSSV 病毒取自感染 WSSV 死亡的对虾,参考 Xie 等(2005)的方法进行病毒存储液的提取,并置于 -80℃ 备用。

### 1.3 生长参数测定

投喂实验结束后从不同实验组虾池中随机选取 50 尾对虾,分别测量各组对虾的体长、体重并计算相对增重率,计算公式如下:

$$\text{相对增重率} = [(\text{试验末体重} - \text{试验初体重}) / \text{试验初体重}] \times 100\%$$

### 1.4 WSSV 病毒侵染实验

通过 WSSV 病毒浓度滴定,确定 WSSV 提取液的半致死剂量约为  $5 \times 10^4$  copies/μl。在 30 d 饲喂实验结束后,从 CpG ODN 和 VP28-y1 添加投喂组中分别取 30 尾健康对虾,从基础饲料投喂对照组取 30 尾健康对虾转入消毒后的水循环系统,进行 WSSV 攻毒



图 1 CpG ODN 串联序列

Fig.1 Description of tandem CpG ODN sequences

表 1 饲料原料组成

Tab.1 Ingredient formulation of feeding diets (g/kg diet)

原料 Ingredients	添加 CpG ODN 饲料 Feed with CpG ODN	添加 VP28-y1 饲料 Feed with VP28-y1	基础饲料 Basic feed
鱼粉 Fish	300	300	300
虾粉 Shrimp	150	150	150
豆粕 Soybean	150	150	150
花生粕 Peanut	50	50	50
糊精 Dextrin	20	20	20
面粉 Wheat flour	150	150	150
油混料 Oil mixture	50	50	50
维生素混料 Vitamin mixture	10	10	10
卵磷脂 Lecithin	20	20	20
壳聚糖 Chitosan	50	50	50
海藻酸钠 Sodium alginate	50	50	50
CpG powder	0.04	-	-
VP28-y1 powder	-	10 <sup>11</sup> CFU	-

实验, 在 CpG ODN 和 VP28-y1 投喂组和基础饲料投喂对照组对虾中各注射 30 尾, 每尾虾尾部肌肉注射 WSSV 病毒存储液 100  $\mu$ l (10<sup>5</sup> copies/ $\mu$ l), 其中基础饲料投喂对照组剩余的 30 尾对虾尾部肌肉注射 100  $\mu$ l PBS 缓冲液, 作为攻毒实验的阴性对照组。实验期间水温条件为(20 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, 每天记录每组死亡对虾数, 以统计累计死亡率, 并计算相对免疫保护率(Relative Percent Survival, RPS):

$$RPS=(1-\text{免疫组死亡率}/\text{对照组死亡率})\times 100\%$$

### 1.5 血淋巴的收集

在开始饲喂实验前, 从虾池中随机抽取 6 尾对虾, 用一次性注射器(1 ml)吸入预冷抗凝剂, 然后从对虾围心腔抽取等量的血淋巴, 每两尾对虾血淋巴混置于同一离心管中, 共计 3 个重复, 4 $^{\circ}$ C 条件下 800 g 离心 10 min, 转移上层血清到新的离心管, 同时向血细胞中加入 TRIzol 试剂, 血清和血细胞分别冻存于 -80 $^{\circ}$ C。在 30 d 饲喂实验结束后, 从 CpG ODN 投喂组、VP28-y1 投喂组和基础饲料投喂对照组中各随机取 6 尾对虾, 进行血清和血细胞的收集。然后从上述 3 个组中分别取 30 尾健康对虾转入消毒后的水循环系统, 进行 WSSV 刺激实验, 每尾虾注射 WSSV 病毒存储液 100  $\mu$ l (10<sup>4</sup> copies/ $\mu$ l)。在攻毒实验开始后的 1、3、5 d, 从各组中随机取样 6 尾, 按照同样的方法收集血清和血细胞并冻存。同时在每个时间点, 每个实验组均取 6 尾虾的鳃组织放入离心管冻存于 -20 $^{\circ}$ C,

待提取基因组 DNA。

### 1.6 WSSV 病毒拷贝数检测

按照 Jang 等(2009)的方法进行对虾基因组 DNA 的提取和 Taqman 探针法实时荧光定量 PCR, 检测 WSSV 拷贝数, 操作步骤根据 Premix Ex Taq<sup>TM</sup> Probe qPCR(TaKaRa)来进行。

### 1.7 呼吸爆发水平检测

采用 NBT 还原法, 参考 Song 等(1994)的方法测定呼吸爆发水平。

### 1.8 细胞凋亡水平检测

细胞凋亡检测采用 Annexin V/PI 双染法, 步骤参考雷雯雯等(2012)的方法进行。在共聚焦显微镜下观察, Annexin-FITC 标记的细胞是凋亡早期细胞, 为绿色荧光, PI 标记的细胞是坏死细胞, 为红色荧光。统计得出 Annexin-FITC 阳性细胞数所占总细胞数的比值, 即为凋亡比率。

### 1.9 抗病毒相关免疫因子的实时荧光定量 PCR 检测

用 TRIzol Reagent (Invitrogen)进行血细胞总 RNA 的提取, 并用 DNase I (TaKaRa)清除基因组 DNA, 纯化获得待反转录的 RNA 样品, 用 MLV 反转录酶(Promega)进行 cDNA 第一链的合成以获得 cDNA 模板。实时荧光定量 PCR 参照 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II(TaKaRa)的步骤进行。所用引物见表 2。

### 1.10 数据统计

所有实验数据均采用 SPSS 19.0 软件进行处理, 对相同取样时间点的数据分别进行单因素方差(One-Way ANOVA)分析, 采用 Duncan 氏法进行多重比较,  $P < 0.05$  为显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 表面展示 VP28 的解脂耶罗维亚酵母

利用酵母表面展示技术, 将 VP28 成功展示于解脂耶罗维亚酵母表面。免疫荧光结果显示, 在展示 VP28 的解脂耶罗维亚酵母表面有明显的绿色荧光(图 2-b), 而空白组酵母表面则无阳性信号(图 2-d)。

### 2.2 投喂 CpG ODN 和 VP28-y1 对凡纳滨对虾生长参数的影响

经过 30 d 投喂后, CpG ODN 投喂组、VP28-y1 投喂组和对照组的对虾体长分别达到(13.872 $\pm$ 0.932) cm、(13.325 $\pm$ 1.393) cm、(12.916 $\pm$ 1.104) cm (表 3),

表 2 实验中用到的引物序列

Tab.2 Sequences of primers used in the present study

引物名称 Primer	序列 Sequence(5'-3')	用途 Usage
WSSV-RT-F	CCAGTTCAGAATCGGACGTT	WSSV 拷贝数检测
WSSV-RT-R	AAAGACGCCTACCCTGTTGA	WSSV 拷贝数检测
WSSV-Taqman (probe)	TCCATAGTTCCTGGTTTGTAATGTGCCG	WSSV 拷贝数检测
Oligo(dT)-adaptor	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(G) <sup>17</sup>	cDNA 模板合成
VP28-1F	ACCACCATGGATCTTCTTTC	酵母表面展示 VP28
VP28-1R	TTACTCGGTCTCAGTGCCA	酵母展示展示 VP28
STAT-F	AGCCCCTGTCTGAGCGAAA	荧光定量 PCR 检测 STAT 表达
STAT-R	GGTGTCTCTTGTAACCTTCATCA	荧光定量 PCR 检测 STAT 表达
proPO-F	TCCATTCCGTCCGTC	荧光定量 PCR 检测 proPO 表达
proPO-R	GGCTTCGCTCTGGTTAGG	荧光定量 PCR 检测 proPO 表达
EF- $\alpha$ -F	CATCAAGGAGAAACTGTGCT	荧光定量 PCR 检测内参基因表达
EF- $\alpha$ -R	GATGGAGTTGTAGGTGGTCT	荧光定量 PCR 检测内参基因表达

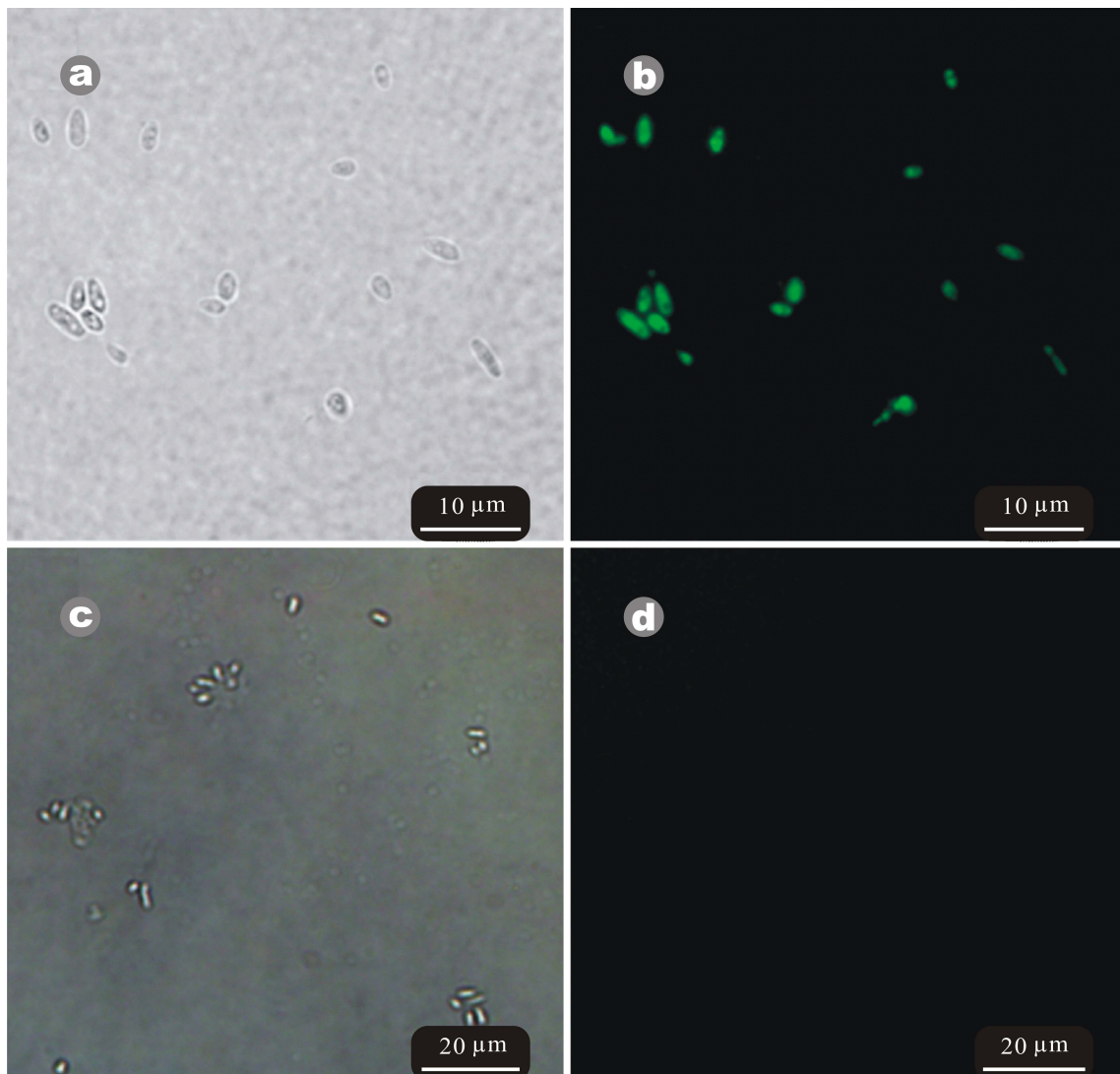


图 2 表面展示 VP28 的解脂耶罗维亚酵母的免疫荧光观察

Fig.2 Immunofluorescence of VP28 on the surface of *Yarrowia lipolytica*

a、b 为表面展示 VP28 的解脂耶罗维亚酵母, a 为可见光视场, b 为荧光视场; c、d 为对照组解脂耶罗维亚酵母, bar=10  $\mu$ m  
The surface-display VP28 in *Y. lipolytica* was presented in the green color (b), the control group was no signal (green) detected (d), bar=10  $\mu$ m

其中 CpG ODN 组对虾较对照组相比, 差异显著 ( $P<0.05$ )。相对增重率分别为  $(65.8\pm 7.8)\%$ 、

$(51.1\pm 9.3)\%$ 和 $(47.9\pm 5.3)\%$ , CpG 组与其他投喂组对虾相比, 差异显著( $P<0.05$ )。

表 3 CpG 和表面展示 VP28 的解脂耶罗维亚酵母对凡纳滨对虾生长指标的影响

Tab.3 The effects of CpG and VP28-yl on the growth performance of *L. vannamei*

组别 Group of shrimp	终体长 Final length(cm)	起始体重 Initial weight(g)	终体重 Final weight(g)	相对增重率 Relative weight gain(%)
CpG 投喂组	13.872±0.932 <sup>a</sup>	12.186±0.897 <sup>a</sup>	20.109±0.911 <sup>a</sup>	65.8±7.8 <sup>a</sup>
VP28-yl 投喂组	13.325±1.393 <sup>ab</sup>	12.318±1.522 <sup>a</sup>	18.925±2.826 <sup>ab</sup>	51.1±9.3 <sup>b</sup>
对照组 Control	12.916±1.104 <sup>b</sup>	12.293±1.152 <sup>a</sup>	17.909±2.452 <sup>b</sup>	47.9±5.3 <sup>b</sup>

注: 同列中的上标字母不同表示差异显著( $P<0.05$ ), 字母相同表示差异不显著( $P>0.05$ )

Note: Data with different superscript letters are statistically significant from each other in the same line ( $P<0.05$ ), Data with same superscript letters are not statistically significant from each other in the same line ( $P>0.05$ )

### 2.3 WSSV 攻毒后对虾的死亡率

在中试投喂实验结束后, 注射 WSSV 感染凡纳滨对虾, 并统计攻毒后 10 d 内的死亡对虾。各投喂组对虾在 WSSV 攻毒后第 3 天出现了死亡, 在第 10 天, CpG ODN 和 VP28-yl 投喂组对虾的累计死亡率分别为 73.3%和 63.3%, 免疫保护率达到了 26.7%和 36.7%, 而对照组对虾已经全部死亡(图 3)。

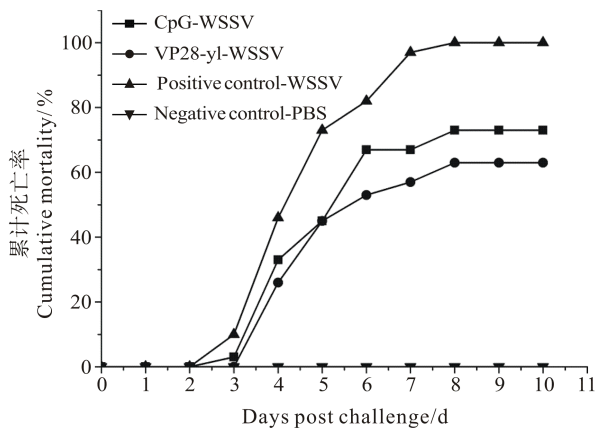


图 3 WSSV 攻毒后对虾累计死亡率

Fig.3 Cumulative mortality of shrimps after the WSSV challenge

### 2.4 投喂 CpG 和 VP28-yl 对 WSSV 拷贝数的影响

投喂 CpG ODN 和 VP28-yl 的对虾在感染 WSSV 后的第 3 天和第 5 天, WSSV 拷贝数均显著低于对照组( $P<0.05$ ) (图 4), 说明在 WSSV 刺激后 CpG ODN 和 VP28-yl 组对虾中 WSSV 的复制受到抑制。在 WSSV 侵染后的第 1 天, CpG ODN 组、VP28-yl 组和对照组对虾的 WSSV 拷贝数分别达到 23.41、12.53 和 19.23 copies/ng DNA, 各组之间没有显著性差异。而在第 3 天 CpG 组和 VP28-yl 组对虾的 WSSV 拷贝

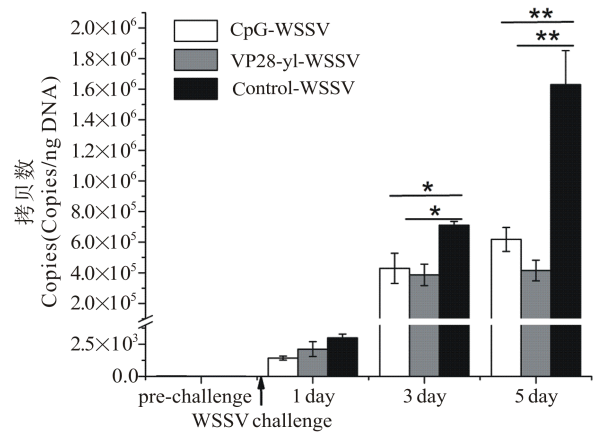


图 4 攻毒后对虾体内 WSSV 拷贝数统计

Fig.4 Quantification of WSSV viral copies number in CpG, VP28-yl and control groups post WSSV challenge

数据以 Mean ± SD ( $n=3$ )表示, 在每个时间点\*代表显著性差异( $P<0.05$ ), \*\*代表极显著性差异( $P<0.01$ )

Each symbol and vertical bars represented the means of triplicate assays with standard deviation (SD). Significant differences of WSSV copies number between the two supplemental feeding shrimps and the control feeding ones were indicated with \* at  $P<0.05$ , Highly significant differences were indicated with \*\* at  $P<0.01$

数分别为  $4.29\times 10^5$  和  $3.86\times 10^5$  copies/ng DNA, 显著低于对照组对虾中的  $7.15\times 10^5$  copies/ng DNA ( $P<0.05$ )。在第 5 天, CpG ODN 组和 VP28-yl 组对虾的 WSSV 拷贝数只有缓慢增长, 分别达到  $6.19\times 10^5$  和  $4.15\times 10^5$  copies/ng DNA, 而对照组对虾则达到  $1.62\times 10^6$  copies/ng DNA, 为 CpG ODN 组和 VP28-yl 组的 2.6 倍和 3.9 倍( $P<0.01$ )。

### 2.5 CpG ODN 和 VP28-yl 投喂后和 WSSV 攻毒后对虾呼吸爆发活性的变化

在投喂实验结束后, CpG 投喂组对虾的呼吸爆发水平显著升高( $P<0.05$ ), 而 VP28-yl 组和对照组未有

明显变化。在 WSSV 刺激后, CpG 投喂组一直保持着较高的呼吸爆发活性, 并一直显著高于 VP28-yl 组和对照组( $P<0.05$ ) (图 5)。

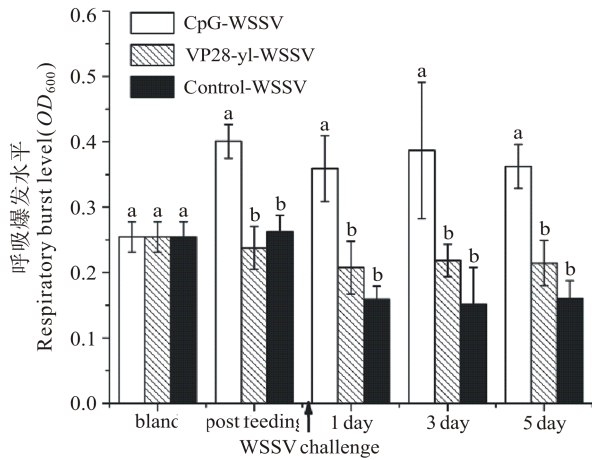


图 5 投喂后和攻毒后对虾呼吸爆发水平的变化

Fig.5 The respiratory burst level in CpG, VP28-yl and control groups post feeding and WSSV challenge 数据以 Mean  $\pm$  SD ( $n=3$ )表示, 在每个时间点不同字母表示存在显著性差异( $P<0.05$ )

Each symbol and vertical bars represented the means of triplicate assays with standard deviation (SD). Bars with different letters are statistically significant from each other in the same sampling point ( $P<0.05$ )

## 2.6 CpG ODN 和 VP28-yl 投喂后和 WSSV 攻毒后对虾凋亡水平变化

在投喂实验结束后, CpG ODN 投喂组对虾血细胞的凋亡水平显著高于 VP28-yl 组和对照组( $P<0.05$ ) (图 6), 这说明 CpG ODN 具有促细胞凋亡的作用。在 WSSV 刺激前后 5 d, 对照组对虾血细胞的凋亡水平一直持续升高, 并在第 3 天和第 5 天显著高于 CpG 组和 VP28-yl 组( $P<0.05$ ), 而 CpG ODN 组和 VP28-yl 组投喂组对虾则均未有明显变化, 同时发现 VP28-yl 组对虾血细胞的凋亡水平一直都显著低于 CpG ODN 组和对照组( $P<0.05$ )。结果表明, VP28-yl 可以显著降低 WSSV 侵染而引起的细胞凋亡。

## 2.7 对虾相关抗病毒因子 mRNA 的表达

从图 7 可以看到, 在 WSSV 刺激后, 对照组对虾中 *STAT* 的相对表达量一直在降低, 这说明 WSSV 感染严重抑制了 *STAT* 的表达; 而 CpG ODN 组对虾 *STAT* 的表达量一直保持升高的趋势, 到第 5 天达到最高, 为空白组表达量的 11.56 倍, 显著高于对照组( $P<0.05$ ); 而 VP28-yl 投喂组对虾 *STAT* 表达量也明显上调, 但保持相对稳定, 在第 3 天达到最高值, 为对照组的 2.61 倍, 显著高于对照组( $P<0.05$ )。

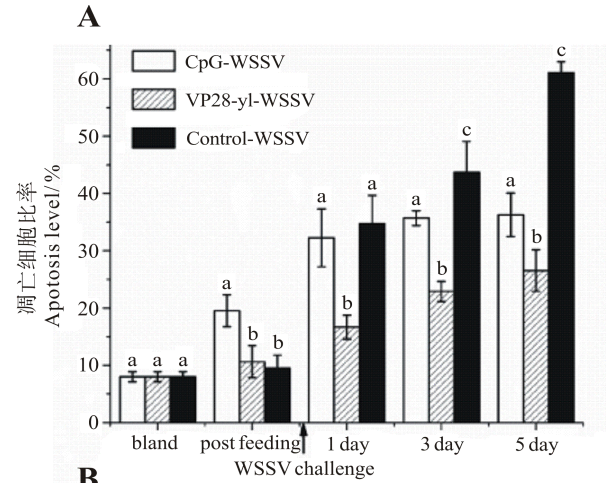


图 6 投喂后和攻毒后对虾血细胞凋亡水平的变化

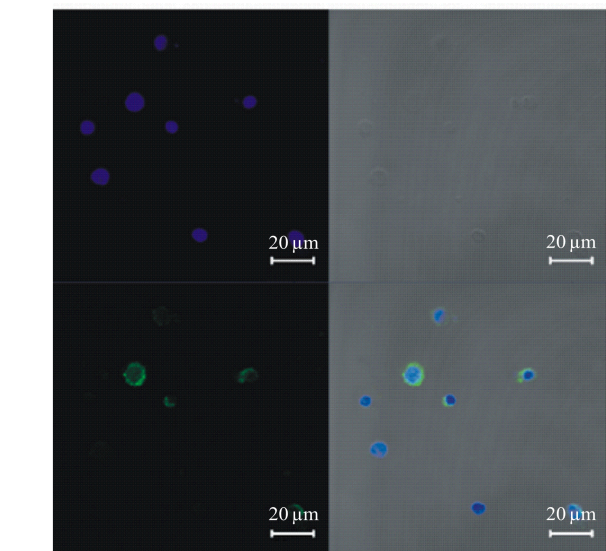


Fig.6 The apoptosis of haemocytetes in CpG ODN, VP28-yl and control groups post feeding and WSSV challenge

数据以 Mean  $\pm$  SD ( $n=3$ )表示, 在每个时间点不同字母表示存在显著性差异( $P<0.05$ )

Each symbol and vertical bars represented the means of triplicate assays with standard deviation (SD). Bars with different letters are statistically significant from each other in the same sampling point ( $P<0.05$ )

从图 8 可看到, 在 WSSV 刺激后, *proPO* 在各个投喂组对虾中均呈先上调再下调的表达趋势。CpG 投喂组对虾 *proPO* 相对表达量在第 1 天和第 3 天均显著高于对照组对虾( $P<0.05$ ), 分别是空白组表达量的 3.40 倍和 5.87 倍; 而 VP28-yl 组和对照组对虾 *proPO* 表达量变化趋势基本相同, 无显著性差异( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

投喂实验结束后, CpG ODN 投喂组凡纳滨对虾相对增重率为(65.8 $\pm$ 7.8)%, 显著高于其他投喂组, 说

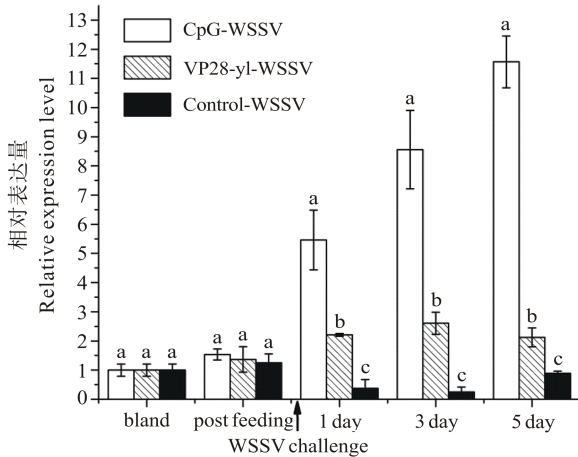


图 7 投喂后和攻毒后对虾 *STAT* 基因 mRNA 相对表达量的变化

Fig.7 The expression of *STAT* mRNA relative to *EF- $\alpha$*  gene in CpG ODNs, VP28-yl and control groups post feeding and WSSV challenge

数据以 Mean  $\pm$  SD ( $n=3$ )表示, 在每个时间点不同字母表示存在显著性差异( $P<0.05$ )

Each symbol and vertical bars represented the means of triplicate assays with standard deviation (SD). Bars with different letters are statistically significant from each other in the same sampling point ( $P<0.05$ )

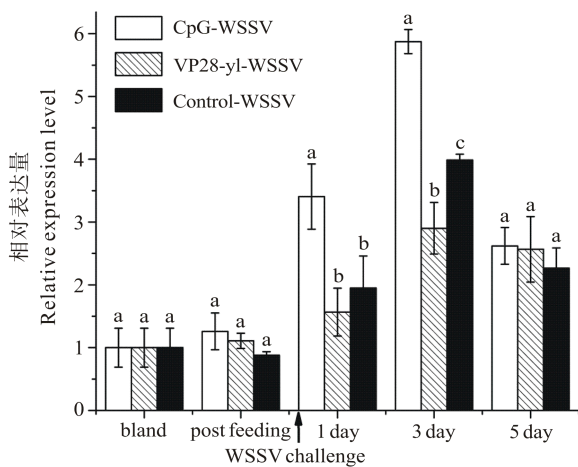


图 8 投喂后和攻毒后对虾 *proPO* 基因 mRNA 相对表达量的变化

Fig.8 The expression of *proPO* mRNA relative to *EF- $\alpha$*  gene in CpG ODNs, VP28-yl and control groups post feeding and WSSV challenge

数据以 Mean  $\pm$  SD ( $n=3$ )表示, 在每个时间点不同字母表示存在显著性差异( $P<0.05$ )

Each symbol and vertical bars represented the means of triplicate assays with standard deviation (SD). Bars with different letters are statistically significant from each other in the same sampling point ( $P<0.05$ )

明其有着良好的促生长作用。在罗氏沼虾中的研究表明, CpG ODN 可以显著升高参与蛋白质合成和能量

代谢相关的基因的表达(Lu *et al.*, 2007), 这或许可以解释本研究中投喂 CpG ODN 可以使凡纳滨对虾生长更快的现象。CpG ODN 投喂组对虾的呼吸爆发水平一直显著高于其他投喂组, 这一实验结果与其他饲料添加免疫增强剂的效果是类似的。如葡聚糖和海带多糖均有效增强了对虾呼吸爆发活性(Muñoz *et al.*, 2000; Campa-Córdova, 2002), 而这又被证实与对虾的抗病原侵害的能力是相关的(Tassanakajon *et al.*, 2013)。

WSSV 攻毒后, CpG ODN 投喂组和 VP28-yl 投喂组对虾都表现出抵抗 WSSV 侵染的能力, 相对免疫保护率分别达到了 26.7%和 36.7%, 而且在 WSSV 刺激后的第 3 天和第 5 天, 该两种投喂组对虾的 WSSV 拷贝数均显著低于对照组对虾( $P<0.05$ ), 说明 CpG ODN 和 VP28-yl 有效抑制了 WSSV 的复制。在哺乳动物中, CpG ODN 往往被作为优良的免疫佐剂用来增强疫苗或其他免疫活性物质的免疫效果(Mosca *et al.*, 2008), 而由于 CpG ODN 具有刺激白介素、生长因子等细胞因子分泌的能力, 其单独使用也能够发挥抗病毒效应。CpG ODN 已被证实可以触发各种免疫应答反应, 并增强机体免疫功能, 因而它可以作为一种候选的免疫增强剂(Carrington *et al.*, 2006)。在水产动物中, 也有 CpG ODN 单独使用增强机体抗病毒及细菌性疫病能力的报道(Sung *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010b)。在中华绒螯蟹幼蟹中投喂 CpG ODN 后, 对嗜水气单胞菌侵染的抵抗力有了显著增强, 免疫保护率上升(Sun *et al.*, 2013b)。而凡纳滨对虾用 pUC57-CpG 处理后, 在感染 WSSV 后, 也发现处理组的对虾存活率显著高于对照组, 这说明 CpG 能够诱发对虾对 WSSV 的免疫保护作用(Zhang *et al.*, 2010a)。

虽然对虾作为典型的无脊椎动物, 被认为缺乏获得性免疫, 但是免疫致敏现象的发现为采用获得性免疫手段来进行对虾免疫防控的研究提供了有力的理论支持(Bachère, 2000; Venegas *et al.*, 2000)。本研究证实 WSSV 攻毒后, 经田间中试投喂后的 VP28-yl 投喂组对虾表现出抗 WSSV 侵染的能力, 说明 VP28-yl 有效地抑制了 WSSV 的复制。同时, 观察到 VP28-yl 投喂组对虾中各种酶活和免疫指标的响应并不如 CpG ODN 投喂组对虾, 这可能是由于 VP28-yl 起到的是一种类似于疫苗的作用, 并没有激活相关的免疫酶活, 其发挥作用是通过 VP28 的免疫作用, 阻断病毒入侵细胞, 从而降低了 WSSV 侵入机体的概率。通常认为病毒侵入细胞的机制有两种, 一是由膜上受体介导的内吞反应, 另一种则是膜融合(Sieczkarski *et al.*, 2002)。Mu 等(2012)认为, VP28 发挥免疫保护作用

通过占据细胞膜表面受体,起到封闭受体的作用,从而阻碍 WSSV 侵入细胞。还有人推测 VP28 刺激后能够使得机体血清产生中和病毒分子的免疫物质,而不仅仅是影响了免疫相关酶活力(袁军法等, 2005)。本研究证实了表面展示 VP28 的解脂耶罗维亚酵母能够有效地起到免疫保护作用,然而关于 VP28 的作用机制则仍需进一步的研究去证实。同时解脂耶罗维亚酵母本身也可能作为一种有效的免疫增强剂(Gomez-Gil *et al*, 2000),发挥着提高非特异性免疫力的作用,而 VP28-y1 投喂组对虾的免疫保护率达到 36.7%,或许也存在这方面的原因。

在病毒侵染早期,细胞凋亡作用有效抑制了 WSSV 的复制(Wang *et al*, 2008),而本研究发现,CpG ODN 投喂组对虾在投喂实验结束后的细胞凋亡率较高,说明 CpG 促进了细胞凋亡的发生。有研究证实 CpG ODN 能够增强对虾体内的活性氧水平,并促进细胞新生(Sun *et al*, 2013a; Carrington *et al*, 2006),这提示 CpG ODN 的促细胞凋亡作用可能与其促细胞新生作用是相关的。同时根据 WSSV 攻毒后 CpG ODN 投喂组对虾 WSSV 拷贝数显著低于对照组对虾的结果,推测 CpG ODN 可能在 WSSV 侵染早期通过增强细胞凋亡作用来抑制 WSSV 的复制,从而起到一定的免疫保护作用。同时发现对照组对虾的细胞凋亡水平一直呈现逐渐上升的趋势,而 VP28-y1 投喂组对虾则保持相对较低的细胞凋亡率。有报道表明,VP28 能够通过结合宿主细胞受体,以减少 WSSV 进入细胞的可能性(Sritunyalucksana *et al*, 2012)。由此推测 VP28-y1 可能通过抑制 WSSV 诱导产生的细胞凋亡而对凡纳滨对虾起到免疫保护作用。

STAT 作为一种重要的转录因子,具有激活细胞内抗病毒通路的能力(Darnell, 1997)。本研究发现,在 WSSV 刺激后,CpG ODN 和 VP28-y1 投喂组对虾中 STAT 的表达量均呈现出显著性上调的趋势,而对照组对虾的 STAT 表达量则显著性下调。这暗示 CpG ODN 和 VP28-y1 可能通过抑制 WSSV 侵染引起的 STAT 表达量下降,而发挥抗病毒的免疫保护作用。有研究发现预处理 CpG ODN 的对虾在受到 WSSV 刺激后,血淋巴中 STAT mRNA 的表达量显著增加,表明 CpG 可能是 STAT 调节抗病毒免疫反应的诱导物(Zhang *et al*, 2010b)。WSSV 刺激后, *proPO* 的 mRNA 表达量在 CpG ODN 和 VP28-y1 投喂组对虾中均呈现先上升后下降的表达趋势,而雷质文等(2001)对感染 WSSV 的不同群体对虾免疫指标的分析表明,高酚氧化物酶活力的对虾个体在 WSSV 侵染后,其存活率高,而本研究观察到 *proPO* 基因表达量在 WSSV 侵

染后升高与这一结果相符。

综上所述,本研究中将 CpG ODN 和表面展示 VP28 的解脂耶罗维亚酵母添加到饲料中,在自然养殖水体中进行凡纳滨对虾投喂实验,WSSV 侵染实验和相关免疫指标的检测证实 CpG ODN 和表面展示 VP28 的解脂耶罗维亚酵母在生产条件下应用于对虾养殖生产,增强了凡纳滨对虾抗 WSSV 病毒免疫力,具有产业应用价值。

## 参 考 文 献

- 孙凡,刘庆慧,黄健. 白斑综合征病毒感染对凡纳滨对虾热休克蛋白 60 和 90 表达的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(2): 90-95
- 李一宁,梁艳,黄健等. 对虾白斑综合征病毒分子致病机制的研究进展. 安徽农业科学, 2010, 38(7): 3533-3536
- 李玉宏,柴鹏程,胡修贵,等. 应用 RFLP 和 DGGE 技术分析工厂化养殖凡纳滨对虾肠道微生物群落特征. 渔业科学进展, 2014, 35(2): 83-89
- 张敬艳,刘庆慧,黄健. vp28 重组核酸疫苗对凡纳滨对虾抗 WSSV 感染的免疫反应和保护效果. 渔业科学进展, 2012, 33(3): 77-82
- 罗展,黄健,周丽. 抗白斑综合征病毒(WSSV)感染途径研究进展. 海洋水产研究, 2007, 28(5): 116-123
- 袁军法,李莉娟,谷万港等. 对虾白斑综合征病毒 VP28 免疫后克氏原螯虾血清酶活性及中和活性. 武汉大学学报(理学版), 2005, 51(S2): 253-258
- 雷雯雯,徐团,王兰. 镉诱导长江华溪蟹(*Sinopotamon yangtsekiense*)心肌细胞凋亡的研究. 海洋与湖沼, 2012, 43(2): 299-305
- 雷质文,黄健,杨冰,等. 感染白斑综合征病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究. 中国水产科学, 2001, 8(4): 46-51
- Bachère E. Shrimp immunity and disease control. Aquaculture, 2000, 191(1-3): 3-11
- Campa-Córdova A. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to  $\beta$ -glucan and sulphated polysaccharide. Fish Shellfish Immunol, 2002, 12(4): 353-366
- Carrington AC, Secombes CJ. A review of CpGs and their relevance to aquaculture. Vet Immunol Immunopathol, 2006, 112(3-4): 87-101
- Choudhury BK, Wild JS, Alam R, *et al*. In vivo role of p38 mitogen-activated protein kinase in mediating the anti-inflammatory effects of CpG oligodeoxynucleotide in murine asthma. J Immunol, 2002, 169(10): 5955-5961
- Chuo CP, Liang SM, Sung HH. Signal transduction of the prophenoloxidase activating system of prawn haemocytes triggered by CpG oligodeoxynucleotides. Fish Shellfish Immunol, 2005, 18(2): 149-162



- Cong M, Song L, Wang L, *et al.* The enhanced immune protection of Zhikong scallop *Chlamys farreri* on the secondary encounter with *Listonella anguillarum*. *Comp Biochem Physiol Part B: Biochem Mol Biol*, 2008, 151(2): 191–196
- Darnell JE. STATs and gene regulation. *Science*, 1997, 277(5332): 1630–1635
- Du HH, Hou CL, Wu XG, *et al.* Antigenic and immunogenic properties of truncated VP28 protein of white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii*. *Fish & Shellfish Immunol*, 2012, 34(1): 332–338
- Gomez-Gil B, Roque A, Turnbull JF. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 2000, 191(1–3): 259–270
- Haq MAB, Vignesh R, Srinivasan M. Deep insight into white spot syndrome virus vaccines: A review. *Asian Pacific J Trop Dis*, 2012, 2(1): 73–77
- Jang IK, Meng XH, Seo HC, *et al.* A TaqMan real-time PCR assay for quantifying white spot syndrome virus (WSSV) infections in wild broodstock and hatchery-reared postlarvae of fleshy shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture*, 2009, 287(1–2): 40–45
- Johnson KN, van Hulten MC, Barnes AC. "Vaccination" of shrimp against viral pathogens: phenomenology and underlying mechanisms. *Vaccine*, 2008, 26(38): 4885–4892
- Kurtz J, Armitage SA. Alternative adaptive immunity in invertebrates. *Trends Immunol*, 2006, 27(11): 493–496
- Li LJ, Yuan JF, Cai CA, *et al.* Multiple envelope proteins are involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection in crayfish. *Arch Virol*, 2006, 151(7): 1309–1317
- Liu CS, Sun Y, Hu YH, *et al.* Identification and analysis of a CpG motif that protects turbot (*Scophthalmus maximus*) against bacterial challenge and enhances vaccine-induced specific immunity. *Vaccine*, 2010a, 28(25): 4153–4161
- Liu XY, Chi Z, Liu GL, *et al.* Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surface-engineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase. *Metabolic Engineering*, 2010b, 12(5): 469–476
- Lu KY, Sung HJ, Sung HH. Genes expression in hemocytes of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) elicited by CpG oligodeoxynucleotide by suppression subtractive hybridization. *臺灣水產學會刊*, 2007, 34(3): 275–290
- Madzak C, Gaillardin C, Beckerich JM. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J Biotechnol*, 2004, 109(1–2): 63–81
- Mosca F, Tritto E, Muzzi A, *et al.* Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30): 10501–10506
- Muñoz M, Cedeño R, Rodríguez J, *et al.* Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2000, 191(1–3): 89–107
- Mu Y, Lan JF, Zhang XW, *et al.* A vector that expresses VP28 of WSSV can protect red swamp crayfish from white spot disease. *Dev Comp Immunol*, 2012, 36(2): 442–449
- Sieczkarski SB, Whittaker GR. Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol*, 2002, 83(7): 1535–1545
- Song YL, Hsieh YT. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. *Dev Comp Immunol*, 1994, 18(3): 201–209
- Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, *et al.* Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol*, 1998, 28(6): 2045–2054
- Sritunyalucksana K, Utairungsee T, Sirikharin R, *et al.* Virus-binding proteins and their roles in shrimp innate immunity. *Fish Shellfish Immunol*, 2012, 33(6): 1269–1275
- Sun R, Qiu L, Yue F, *et al.* Hemocytic immune responses triggered by CpG ODNs in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*, 2013a, 34(1): 38–45
- Sun R, Yue F, Qiu L, *et al.* The CpG ODNs enriched diets enhance the immuno-protection efficiency and growth rate of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol*, 2013b, 35(1): 154–160
- Sung HH, Yang CW, Lin YH, *et al.* The effect of two CpG oligodeoxynucleotides with different sequences on haemocytic immune responses of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 26(2): 256–263
- Syed M S, Kwang J. Oral vaccination of baculovirus-expressed VP28 displays enhanced protection against White Spot Syndrome Virus in *Penaeus monodon*. *PLoS One*, 2011, 6: e26428
- Tassanakajon A, Somboonwivat K, Supungul P, *et al.* Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34(4): 954–967
- Venegas C, Nonaka L, Mushiaki K, *et al.* Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Dis Aqu Organ*, 2000, 42: 83–89
- Wang W, Zhang X. Comparison of antiviral efficiency of immune responses in shrimp. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25(5): 522–527
- Witteveldt J, Cifuentes CC, Vlask JM, *et al.* Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *J Virol*, 2004, 78(4): 2057–2061
- Xie X, Li H, Xu L, *et al.* A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles. *Virus Res*, 2005, 108(1–2): 63–67
- Yi G, Wang Z, Qi Y, *et al.* Vp28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells. *J Biochem Mol Biol*, 2004, 37(6): 726–734
- Yue L, Chi Z, Wang L, *et al.* Construction of a new plasmid for surface display on cells of *Yarrowia lipolytica*. *J Microbiol*

- Meth, 2008, 72(2): 116–123
- Zhang Y, Song L, Zhao J, *et al.* Protective immunity induced by CpG ODNs against white spot syndrome virus (WSSV) via intermediation of virus replication indirectly in *Litopenaeus vannamei*. *Dev Comp Immunol*, 2010a, 34(4): 418–424
- Zhang Y, Wang L, Zhao J, *et al.* The effects of CpG-C oligodeoxynucleotides on innate immune responses in *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards, 1853). *Aquacul Res*, 2010b, 41(10): 656–666
- Zhu K, Jin H, Ma Y, *et al.* A continuous thermal lysis procedure for the large-scale preparation of plasmid DNA. *J Biotechnol*, 2005, 118(3): 257–264

(编辑 冯小花)

## Oral Administration of CpG ODNs and *Yarrowia lipolytica* Harboring VP28 in Farm Ponds to Protect Shrimp From White Spot Syndrome Virus Infection

YI Qilin<sup>1,2</sup>, LIU Rui<sup>1</sup>, SUN Rui<sup>1,2</sup>, WANG Lingling<sup>1</sup>, LIU Conghui<sup>1,2</sup>,  
CHI Zhenming<sup>3</sup>, SONG Linsheng<sup>1①</sup>

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049; 3. College of Marine Life Science, Ocean University of China; Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education, Qingdao 266003)

**Abstract** Frequent outbreaks of viral and bacterial diseases have caused severe economic loss in shrimp farming that has been an important part in aquaculture. The white spot syndrome is one of the most harmful diseases in shrimp culture. It is crucial to develop novel strategies that efficiently protect shrimp against WSSV. In this study, we performed oral administration of diet supplemented with CpG ODNs prepared with large-scale fermentation and *Yarrowia lipolytica* harboring VP28 (VP28-yl) to farmed *Litopenaeus vannamei*. After 30-day feeding we challenged the shrimp with WSSV to evaluate the protective effects of CpG ODN and VP28-yl. Shrimp fed with CpG ODN displayed a relative weight gain of  $(65.8 \pm 7.8)\%$  ( $P < 0.05$ ), indicating that CpG ODN might promote the growth of shrimp. After the WSSV challenge, the copies of WSSV in shrimp fed with CpG ODN and VP28-yl were both significantly less compared to the control ( $P < 0.05$ ), and the RPS were 26.7% and 36.7% respectively. The respiratory burst level of shrimp fed with CpG ODN was increased after feeding trial and WSSV challenge. After the WSSV challenge, there was a gradual increase in the apoptosis of haemocytes in the control shrimp. In the contrast, the apoptosis of haemocytes in shrimp fed with VP28-yl was significantly suppressed. Moreover, the expression of *STAT* mRNA in shrimp fed with CpG ODN and VP28-yl was significantly increased post the WSSV challenge ( $P < 0.05$ ), and there was an opposite trend in the control group ( $P < 0.05$ ). These results suggested that oral administration of CpG ODN and VP28-yl could enhance the antiviral immunity against WSSV, and thus help control viral diseases. These two immunoactive substances could be potentially new therapies in shrimp aquaculture industry.

**Key words** CpG ODN; *Yarrowia lipolytica*; Envelope protein VP28; White Spot Syndrome Virus (WSSV); Antiviral immunity

① Corresponding author: SONG Linsheng, E-mail: lshsong@qdio.ac.cn