

# 热灭活 WSSV 诱导的中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)在不同温度下的免疫致敏反应\*

曹家旺<sup>1,2,3</sup> 孔 杰<sup>1,2</sup> 罗 坤<sup>1,2</sup> 栾 生<sup>1,2</sup> 曹宝祥<sup>1,2</sup> 史晓丽<sup>1,2</sup>  
卢 霞<sup>1,2</sup> 冯亚萍<sup>1,2,3</sup> 王 军<sup>1,2,3</sup> 王明珠<sup>1,2,3</sup> 孟宪红<sup>1,2①</sup>

1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 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;
3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 本研究拟探究经热灭活的白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)能否诱导中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)产生免疫致敏反应。将具有典型白斑综合征症状的对虾肌肉剁碎后经 60℃ 灭活 1 h, 采用单尾定量口饲的方法, 连续 6 d 投喂不同水温条件(15℃、23℃、28℃、32℃)下的实验组对虾(E<sub>15℃</sub>、E<sub>23℃</sub>、E<sub>28℃</sub>、E<sub>32℃</sub>); 同时设置常温(23℃)条件下阳性对照组 C<sub>23℃</sub>(投喂未经灭活的 WSSV 毒饵)、对照组 CF<sub>23℃</sub>(只投喂商业配合饲料)。在实验第 13 天对存活个体进行第二次人工 WSSV 感染, 结果显示, WSSV 经 60℃ 处理 1 h 可彻底失活, 表现为连续投喂 6 d 至第二次人工感染期间无对虾死亡, 而阳性对照组 C<sub>23℃</sub> 死亡率为 100%。截止实验第 19 天, E<sub>15℃</sub>、E<sub>23℃</sub>、E<sub>28℃</sub>、E<sub>32℃</sub> 各组存活率分别为 80.41%、33.29%、8.47%、16.43%, CF<sub>23℃</sub> 组的存活率为 8.89%, E<sub>15℃</sub> 组与其他各实验组差异极显著( $P < 0.01$ ), E<sub>23℃</sub> 与 CF<sub>23℃</sub>、E<sub>28℃</sub>、E<sub>32℃</sub> 组差异显著( $P < 0.05$ ), E<sub>28℃</sub> 和 E<sub>32℃</sub> 组差异不显著( $P > 0.05$ ); 对各组实验材料进行 WSSV 绝对荧光定量检测, 结果显示, 经热灭活 WSSV 诱导的中国明对虾二次感染 WSSV 后, 28℃ 环境下病毒增殖速度最快, 高温(32℃)和低温(15℃)都会不同程度抑制 WSSV 的增殖速度。实验表明, 热灭活 WSSV 可以诱导中国明对虾产生免疫致敏反应, 对受 WSSV 感染的中国明对虾具有一定的保护作用; 温度与 WSSV 的增殖速度密切相关。

**关键词** 免疫致敏; 热灭活; 存活率; 绝对荧光定量; 白斑综合征病毒

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0128-09

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)又称东方对虾, 旧称中国对虾(*Penaeus chinensis*), 主要分布在黄、渤海海域, 是我国重要的土著海水养殖动物之一, 其养殖产业近十几年来一直受病原困扰。在诸多病原中, 白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)引起的白斑综合征发病快、破坏性强且防治困难。对虾感染 WSSV 后, 一般 3–10 d 内累积死亡率可达到

100% (Chou *et al.*, 1995; Hossain *et al.*, 2015), 成为危害对虾养殖业最大的病原之一, 对我国乃至全球范围内的对虾产业造成了重大经济损失, 严重阻碍了对虾产业的持续健康发展(衣启麟等, 2014)。经过育种学家不懈的努力, 我国已有“黄海 1 号”(2003 年)、“黄海 2 号”(2008 年)、“黄海 3 号”(2013 年)3 个中国明对虾养殖新品种, 一定程度上恢复了中国明对虾养殖业(李健

\* 国家自然科学基金(31372523)、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)和泰山学者良种工程项目共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31372523), the Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02), and Taishan Scholar Program for Seed Industry]. 曹家旺, E-mail: weifengchui555@yeah.net

① 通讯作者: 孟宪红, 研究员, E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-12-23, 收修改稿日期: 2016-02-04

等, 2005、2015; 孔杰等, 2012)。

对虾等甲壳类作为重要的水产养殖经济对象, 较脊椎动物缺少完善的免疫系统, 更容易受到暴发性疾病的影响而大面积患病或死亡(刘昂等, 2013; 曾祥兴等, 2009)。疾病的发生与对虾本身的免疫水平、感染方式和环境因素紧密相关(吴信忠, 2005; 孙成波等, 2006), 国内外学者用多种实验技术对 WSSV 展开研究, 涉及对虾免疫学、WSSV 感染机理及环境因素对疾病产生的影响等(李一宁等, 2010)。

普遍认为, 对虾等无脊椎动物缺少抗体这一类关键性的免疫分子, 因此相关研究主要以天然的免疫反应为主。然而, 随着研究的深入, 发现对虾血清同样存在与脊椎动物免疫球蛋白(Ig, Immunoglobulin)功能非常类似、能识别“异己”成分的特异性免疫分子(章跃陵等, 2001; 王雷等, 1995; 王伟庆等, 1998)。研究发现, 对虾等能够产生特异性的免疫保护, Venegas 等(2000)对感染 WSSV 后存活的日本囊对虾(*Marsupenaesu japonicus*)进行二次感染, 与对照相比, 其死亡率降低了 49%; 李战军等(2012)用  $\gamma$  射线照射含有 WSSV 的患病对虾肌肉, 连续饲喂 20 d 后进行二次感染, 存活率提高 45%以上。朱斐(2009)<sup>1)</sup>利用双乙炔亚胺(BEI)灭活 WSSV 病毒悬液, 注射诱导 7 d 后二次感染, 相对保护率达到 60%。有学者将这种再次受到相同病原感染后, 免疫保护作用显著增强、死亡率降低的现象, 称之为特异性的免疫致敏(Immune priming)(Tom *et al*, 2004; Schmid-Hempel *et al*, 2005), 也有学者称之为类免疫反应(Quasi-immune response)(Venegas *et al*, 2000)。

疾病的发生不仅与对虾的抗病力相关, 还与环境因子密切相关, 内外因共同作用, 才会促使疾病暴发(刘波等, 2003)。Hewitt 等(2001)研究发现, 温度作为对虾生存环境的重要因子, 影响对虾代谢、摄食、生长、存活和免疫力的强弱, 且与疾病的感染密切联系。Vidal 等(2001)和 Rahman 等(2007)研究发现, 高温可延长感染 WSSV 后对虾的存活时间; 宋晓玲等(1996)发现, 17–19℃是中国明对虾白斑综合征发生的最低温度, 17℃是 WSSV 在其体内增殖的最低温度。

目前, 针对对虾免疫致敏现象的研究还处在初步阶段, 本研究通过热灭活(60℃处理 1 h) WSSV 诱导对虾免疫致敏反应, 并设置不同的实验温度, 用实时荧光定量 PCR 方法(qRT-PCR)进行病毒载量的检测, 探究热灭活 WSSV 诱导免疫致敏反应的有效性及其温

度与 WSSV 增殖之间的关系, 以期对白斑综合征的预防提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用健康中国明对虾取自中国水产科学研究院黄海水产研究所遗传育种中心, 平均体重为(0.21±0.08) g, 平均体长为(24.71±3.90) mm。实验用水为经砂滤的自然海水, 盐度为 29±1。实验前随机取 3 尾对虾提取 DNA 后进行 WSSV 荧光定量 PCR 检测, 检测结果为阴性。

### 1.2 口饲感染毒饵的制备

取感染 WSSV 且症状明显的中国明对虾腹节肌肉, 剁碎成泥状后装入研钵中继续充分研磨, 加入适量食用红色素并混合均匀, -80℃冰箱冷藏。

### 1.3 热灭活 WSSV 饵料的制备

材料选择及破碎的方法同 1.2 所述, 参考 Balasubramanian 等(2006)的灭活方法, 将粉碎后的对虾肌肉于 60℃恒温培养箱中灭活处理 1 h, 充分研磨后加入适量可食用红色素并充分混合均匀, -80℃冰箱保存。

### 1.4 实验分组及管理

根据实验温度(低温 15℃、常温 23℃、高温 28℃、高温 32℃)及投喂的饵料(未经灭活的 WSSV 毒饵、热灭活饵料、商业配合饵料)的不同, 将实验用中国明对虾随机分成 6 组, 分别为阳性对照组 C<sub>23℃</sub>(投喂未经灭活的 WSSV 毒饵+商业配合饲料)、商业饵料对照组 CF<sub>23℃</sub>(只投喂商业配合饲料)、实验组 E<sub>15℃</sub>、E<sub>23℃</sub>、E<sub>28℃</sub>、E<sub>32℃</sub>(投喂热灭活饵料+商业配合饲料), 每组设置 3 个重复(30 尾/重复), 放入 26.5 cm×20 cm×16.5 cm 的整理箱。每个整理箱内安放一个气石, 然后将每组 3 个小整理箱放入 72 cm×52 cm×44 cm 大整理箱中, E<sub>15℃</sub>组放入泡沫箱中。实验期间自然水温为(23.0±1.8)℃, C<sub>23℃</sub>、CF<sub>23℃</sub>和 E<sub>23℃</sub>组维持自然水温, E<sub>28℃</sub>和 E<sub>32℃</sub>组放置加热棒控制温度, E<sub>15℃</sub>组通过调整常温海水与冰块配比来控制温度。分组后自然温度暂养 3 d, 随后开始升温或降温操作, E<sub>28℃</sub>和 E<sub>32℃</sub>组在自然水温基础上每天升高 1℃, E<sub>15℃</sub>组在自然水温的基础上每天降低 1℃, 升(降)至设定温度后保持此温度到实验结束。每

1) Zhu F. Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus with inactivated WSSV and polysaccharide. Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2009, 20–34 [朱斐. 对虾白斑综合征病毒(WSSV)灭活制剂及多糖对克氏原螯虾抗 WSSV 作用的研究. 浙江大学博士研究生学位论文, 2009, 20–34]

天吸底换水1次,每3h观察1次,捞出死虾并记录死亡时间。

### 1.5 热灭活饵料的饲喂及二次感染

对照组 CF<sub>23℃</sub>每天投喂4次配合饲料; C<sub>23℃</sub>组每天投喂1次未经灭活的 WSSV 毒饵(约5 mg/尾),其余时间投喂商业配合饲料。实验组在实验第1-6天每天投喂3次配合饲料及1次热灭活的 WSSV 毒饵(约5 mg/尾),日投喂总量约为体重的5%。在实验第12天对存活个体进行二次 WSSV 人工感染,投喂含 WSSV 毒饵时采用单尾定量口饲方法(授权专利号: ZL201210 107377.8),5 mg 毒饵含有 WSSV 约为  $8.24 \times 10^8$  copies。

### 1.6 样品采集及处理

在实验开始第2、4、6、10、12天及二次感染(12 d)后第6、12、24、48、72、120 h,共11个时间点取样,每重复、每取样点分别取1尾存活对虾(即每组取3尾),置于-80℃保存;实验共进行19 d,然后收集所有存活个体置于-80℃冰箱冻存,取肌肉组织用于提取基因组 DNA。

### 1.7 DNA 提取及实时荧光定量 PCR

DNA 提取参照王伟继(2008)<sup>1)</sup>的方法。DNA 经0.8%的琼脂糖凝胶电泳,利用 EC3 Imaging system 检测 DNA 完整性,使用超微量紫外分光光度计(Biodropsis Bo-2000)测定 DNA 质量及浓度,稀释至40 ng/μl 备用。WSSV 含量采用 TaqMan qRT-PCR 方法测定(Durand *et al.*, 2002),目标片段长度为69 bp,引物及探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

qRT-PCR 反应体系(20 μl): 1×Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Probe qPCR)、正反向引物各 0.25 μmol/L、ROX Reference Dye II 0.25 μmol/L、探针 0.125 μmol/L、病毒 DNA 模板 2 μl,灭菌双蒸水补足体积。PCR 反应程序: 95℃ 预变性 10 s; 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火及延伸 34 s, 共 40 个循环。以本实验室自行制备含有目的片段的重组质粒 PUCm-T/WSSV69 为标准品,将 WSSV 标准品进行 10 倍系列梯度稀释,共 7 个梯度,分别为  $(1.02 \times 10^2 - 1.02 \times 10^8)$  copies/μl, 无菌双蒸水作为阴性对照,每个稀释度设 3 个平行,用作阳性对照及标准曲线的构建。每个 DNA 样品平行检测 3 次,取其平均值作为该样品 WSSV 载量。

### 1.8 数据处理及分析

存活时间(h)从二次感染后(13 d)0 h 开始计算:

存活率=存活对虾数/初始对虾数×100%;

死亡率=对虾死亡数/初始对虾数×100%;

数据处理分析使用 SPSS 19.0、Origin 9.0 等软件进行差异显著性分析和多重比较,分别在差异显著水平  $P < 0.01$  和  $P < 0.05$  进行分析。

## 2 结果

### 2.1 二次感染前死亡率及病毒载量变化

实验第1-12天各实验组(E<sub>15℃</sub>、E<sub>23℃</sub>、E<sub>28℃</sub>)以及 CF<sub>23℃</sub> 组未出现死亡个体,阳性对照 C<sub>23℃</sub> 在投喂未经灭活的 WSSV 毒饵后 35 h 开始出现死亡个体,至 126 h 累积死亡率达到 100%。表明 60℃ 处理 1 h 可以将 WSSV 完全灭活。

表 1 1-12 d 内(二次感染前)各组别中国明对虾病毒载量变化(copies/ng DNA)

Tab.1 The change of *F. chinensis* viral load between 1-12 d (before subsequent rechallenge) (copies/ng DNA)

时间 Time(d)	组别 Groups					
	C <sub>23℃</sub>	CF <sub>23℃</sub>	E <sub>23℃</sub>	E <sub>15℃</sub>	E <sub>28℃</sub>	E <sub>32℃</sub>
2	$4.54 \times 10^4 \pm 1.25 \times 10^2$ <sup>A</sup>	$9.32 \pm 1.62$ <sup>Ba</sup>	$6.31 \pm 2.58$ <sup>Ba</sup>	$2.54 \pm 0.99$ <sup>Ba</sup>	$11.89 \pm 5.65$ <sup>Ba</sup>	$12.79 \pm 7.55$ <sup>Ba</sup>
4	$1.55 \times 10^6 \pm 4.28 \times 10^3$ <sup>A</sup>	$14.68 \pm 3.15$ <sup>Ba</sup>	$8.12 \pm 0.98$ <sup>Ba</sup>	$8.28 \pm 1.26$ <sup>Ba</sup>	$17.10 \pm 3.34$ <sup>Ba</sup>	$6.35 \pm 2.56$ <sup>Ba</sup>
6	$4.10 \times 10^6 \pm 1.89 \times 10^3$ <sup>A</sup>	$54.12 \pm 2.86$ <sup>Ba</sup>	$15.34 \pm 6.75$ <sup>Bb</sup>	$5.75 \pm 4.24$ <sup>Bb</sup>	$7.14 \pm 4.78$ <sup>Bb</sup>	$4.93 \pm 1.67$ <sup>Bb</sup>
10	—	$71.99 \pm 15.66$ <sup>b</sup>	$25.67 \pm 6.22$ <sup>c</sup>	$6.31 \pm 2.53$ <sup>d</sup>	$109.64 \pm 45.32$ <sup>a</sup>	$10.77 \pm 3.21$ <sup>cd</sup>
12	—	$91.55 \pm 12.32$ <sup>d</sup>	$143.81 \pm 25.55$ <sup>c</sup>	$9.96 \pm 3.78$ <sup>e</sup>	$465.73 \pm 88.90$ <sup>a</sup>	$208.34 \pm 74.32$ <sup>b</sup>

注:同行标有不同大写字母者表示组间差异极显著( $P < 0.01$ );标有不同小写字母者表示组间差异显著( $P < 0.05$ );标有相同小写字母者表示组间差异不显著( $P > 0.05$ )

Note: Different capital letters within the same line showed highly significant difference between groups ( $P < 0.01$ ); different small letters showed significant difference between groups ( $P < 0.05$ ); same small letters indicated no significant difference between groups ( $P > 0.05$ )

1) Wang WJ. Genetic mapping of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* using AFLP markers and commercial traits QTL mapping. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2008, 66-73 [王伟继. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建以及相关性的 QTL 定位. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2008, 66-73]

实验开始后, 阳性对照组  $C_{23}^{\circ}$  在实验第 2 天病毒载量达到  $1.55 \times 10^6$  copies/ng DNA, 而  $CF_{23}^{\circ}$ 、 $E_{23}^{\circ}$ 、 $E_{15}^{\circ}$ 、 $E_{32}^{\circ}$  组对虾体内病毒含量一直处于较低水平  $[(2.54 \pm 0.99) - (465.73 \pm 88.90)$  copies/ng DNA], 与  $C_{23}^{\circ}$  组病毒载量差异极显著 ( $P < 0.01$ ) (表 1)。  $E_{32}^{\circ}$  组在 166 h 出现 1 尾死亡个体, 截至到二次感染前(12 d),  $E_{32}^{\circ}$  组共出现 6 尾死亡个体, 对 6 尾死亡个体进行病毒含量检测, 结果显示, 其平均病毒载量为  $(29.60 \pm 8.65)$  copies/ng DNA, 表明  $E_{32}^{\circ}$  组在二次感染前出现的死亡个体不是由 WSSV 导致。

## 2.2 不同条件下中国明对虾二次感染 WSSV 后存活时间的差异

$E_{23}^{\circ}$  组连续 6 d 饲喂热灭活 WSSV 饵料诱导免疫致敏,  $CF_{23}^{\circ}$  组在整个实验过程中只投喂商业配合饲料, 作为对照组, 在实验第 13 天对所有存活对虾进行二次感染。截止到实验第 19 天,  $E_{23}^{\circ}$  和  $CF_{23}^{\circ}$  组死亡个体的平均存活时间分别为  $(106.19 \pm 26.83)$  h 和  $(92.05 \pm 25.38)$  h, 2 组进行独立样本 T 检验, 结果显示, 2 组平均存活时间差异显著 ( $P < 0.05$ )。  $E_{15}^{\circ}$ 、 $E_{28}^{\circ}$ 、 $E_{32}^{\circ}$  与  $E_{23}^{\circ}$  组同样连续 6 d 饲喂经热灭活 WSSV 饵料, 平均存活时间分别为  $(136.00 \pm 9.80)$  h、 $(89.24 \pm 27.19)$  h、 $(84.53 \pm 26.70)$  h 和  $(106.19 \pm 26.83)$  h, 结果表明, 随着实验温度升高, 各温度组对虾感染 WSSV 后平均存活时间下降(图 1)。经过单因素方差分析,  $E_{23}^{\circ}$ 、 $E_{28}^{\circ}$ 、 $E_{32}^{\circ}$  与  $E_{15}^{\circ}$  组对虾的平均存活时间差异极显著 ( $P < 0.01$ ),  $E_{28}^{\circ}$ 、 $E_{32}^{\circ}$  与  $E_{23}^{\circ}$  组对虾的平均存活时间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 而  $E_{28}^{\circ}$  和  $E_{32}^{\circ}$  组平均存活时间差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

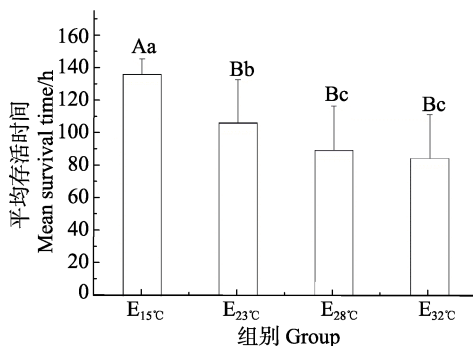


图 1 中国明对虾二次感染 WSSV 后不同温度组平均存活时间

Fig.1 The mean survival time of *F. chinensis* under different temperature after subsequent rechallenge

不同的大写字母表示极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 不同小写字母表示显著差异 ( $P < 0.05$ )

Different capital letters on the graph showed highly significant difference ( $P < 0.01$ ), different small letters on the graph showed significant difference ( $P < 0.05$ )

## 2.3 不同条件对中国明对虾二次感染 WSSV 后存活率、累积死亡率的影响

二次感染从第 13 天持续到第 19 天,  $CF_{23}^{\circ}$  和  $E_{23}^{\circ}$  组存活率分别为  $(8.89 \pm 3.85)\%$  和  $(33.29 \pm 2.02)\%$  (表 2)。经独立 T 检验, 2 组存活率存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。热灭活 WSSV 诱导的各实验组存活率随着实验水温的提高而逐渐降低, 其中,  $E_{28}^{\circ}$  组的存活率最低, 为  $(8.47 \pm 9.50)\%$ ;  $E_{15}^{\circ}$  组的存活率最高, 达到  $(80.41 \pm 5.84)\%$ ;  $E_{15}^{\circ}$ 、 $E_{23}^{\circ}$  组与其他各组之间的存活率具有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 而  $E_{28}^{\circ}$  和  $E_{32}^{\circ}$  组无显著性差异 ( $P > 0.05$ ) (表 2)。

表 2 中国明对虾二次感染 WSSV 后的存活率

Tab.2 The survival rate of *F. chinensis* after subsequent rechallenge

组别 Groups	存活数/总数(存活率) Survival number/Sum (Survival rate %)			平均存活率 Mean survival rate (%)
	1	2	3	
$CF_{23}^{\circ}$	1/15(6.67)	1/15(6.67)	2/15(13.33)	8.89±3.85
$E_{23}^{\circ}$	5/16(31.25)	6/17(35.29)	5/15(33.33)	33.29±2.02* <sup>b</sup>
$E_{15}^{\circ}$	16/19(84.21)	15/18(83.33)	14/19(73.68)	80.41±5.84 <sup>a</sup>
$E_{28}^{\circ}$	1/15(6.67)	3/16(18.75)	0/15(0)	8.47±9.50 <sup>c</sup>
$E_{32}^{\circ}$	1/10(10.0)	3/12(25.00)	2/14(14.29)	16.43±7.73 <sup>c</sup>

注:  $E_{23}^{\circ}$  与  $CF_{23}^{\circ}$  组进行独立样本 T 检验, 同列中标有 \* 表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ); 对  $E_{15}^{\circ}$ 、 $E_{28}^{\circ}$ 、 $E_{32}^{\circ}$  和  $E_{23}^{\circ}$  组进行多重比较, 同列中标有不同字母表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ )

Note: Using the independent samples T-test to  $E_{23}^{\circ}$  and  $CF_{23}^{\circ}$ , the means marked with "\*" within the same row were significantly different at the 0.05 probability level ( $P < 0.05$ ); Having multiple comparison to  $E_{15}^{\circ}$ 、 $E_{28}^{\circ}$ 、 $E_{32}^{\circ}$  and  $E_{23}^{\circ}$ , the means with different letters within the same row were significantly different at the 0.05 probability level ( $P < 0.05$ )

各实验组在二次感染后 48 h 前后出现死亡个体,  $CF_{23}^{\circ}$ 、 $E_{28}^{\circ}$  和  $E_{32}^{\circ}$  组在感染后 4 d 累积死亡率分别为 57.78%、54.35% 和 61.11%, 此时,  $E_{15}^{\circ}$  组和  $E_{23}^{\circ}$  组的累积死亡率仅为 5.36% 和 25.00% (图 2)。到实验结束,  $CF_{23}^{\circ}$ 、 $E_{28}^{\circ}$  和  $E_{32}^{\circ}$  组累积死亡率达到 91.11%、91.30% 和 83.33%,  $E_{15}^{\circ}$  和  $E_{23}^{\circ}$  组累积死亡率为 19.64% 和 66.67%。经热灭活 WSSV 诱导的  $E_{23}^{\circ}$  组比未经诱导的  $CF_{23}^{\circ}$  组累积死亡率低 24.44%。

## 2.4 二次感染后各实验组取样及存活个体病毒载量

二次感染后 12 h, 各实验组对虾体内病毒载量开始快速增加, 其中,  $E_{28}^{\circ}$  组增加速度最快,  $E_{23}^{\circ}$  和  $CF_{23}^{\circ}$  组次之,  $E_{15}^{\circ}$  组增加速度最慢, 而  $E_{32}^{\circ}$  组呈现先增加

后降低的趋势(图 3)。二次感染后 24 h, E<sub>28</sub>组病毒载量达到 2.37×10<sup>6</sup> copies/ng DNA, E<sub>32</sub>组病毒载量为 8.97×10<sup>5</sup> copies/ng DNA, E<sub>23</sub>和 CF<sub>23</sub>组病毒载量分别为 1.60×10<sup>4</sup>和 4.54×10<sup>4</sup> copies/ng DNA, 但 E<sub>15</sub>组病毒载量仅有 52 copies/ng DNA(表 3)。

对各实验组和对照组的存活个体进行病毒载量检测, 对照组 CF<sub>23</sub>的平均病毒载量为 1.59×10<sup>7</sup> copies/ng DNA, 而相同温度条件下的实验组 E<sub>23</sub>的平均病毒载量为 6.54×10<sup>6</sup> copies/ng DNA, 二者差异显著(P < 0.05)。

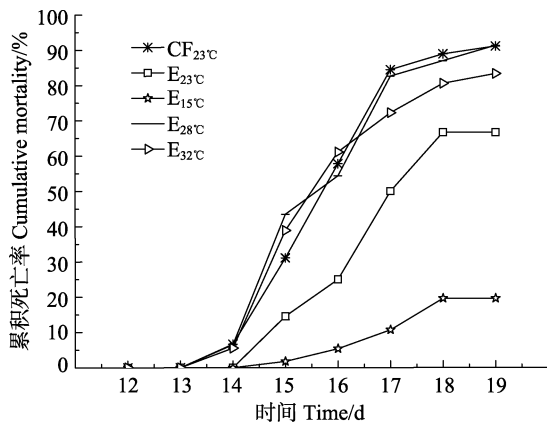


图 2 不同条件下中国明对虾的累积死亡率  
Fig.2 The cumulative mortality of *F. chinensis* under different conditions

典型特征之一就是无特异性免疫, 不能产生免疫记忆。但越来越多的研究发现, 无脊椎动物的免疫系统没有普遍认为的那么简单, 无脊椎动物在受到病原体的感染后也会启动复杂的免疫防御机制。在果蝇 (*Drosophila melanogaster*)(曹慧等, 2009)、长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)(张涛, 2014)<sup>1)</sup>以及日本囊对虾 (*Venegas et al, 2000*)等无脊椎动物中都曾发现, 经过特定病原免疫刺激后, 再次用同样病原二次感染, 其感染率和致死率均呈下降趋势。这一发现对无脊椎动物的疾病防控指引了新的方向, 也对饱受病害困扰的对虾等无脊椎动物的健康养殖带来了曙光。

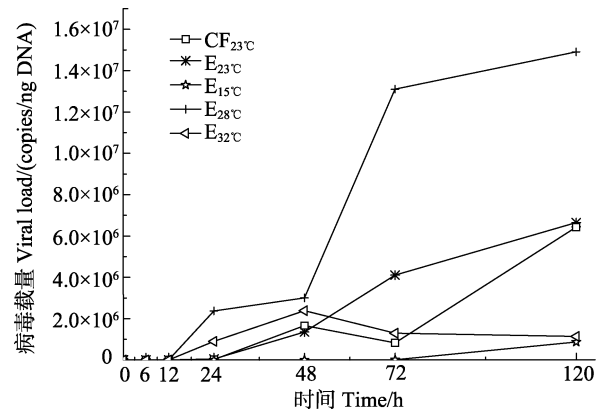


图 3 二次感染后不同组别的病毒载量变化  
Fig.3 The change of viral load after subsequent rechallenge in different groups

### 3 讨论

#### 3.1 免疫致敏对中国明对虾的保护

在以往的认识中, 无脊椎动物区别于脊椎动物的

白斑综合征是一种严重危害对虾健康养殖的病毒性疾病, 许多学者以 WSSV 为病原体感染对虾, 围绕着白斑综合征的囊膜蛋白与对虾自身的免疫防御机制展开了大量细致的研究。Witteveldt 等(2004)

表 3 不同组别中国明对虾二次感染 WSSV 后的病毒载量变化(copies/ng DNA)

Tab.3 The change of viral load of *F. chinensis* in different groups after subsequent rechallenge (copies/ng DNA)

组别 Groups	时间 Time (h)						存活 Survived
	6	12	24	48	72	120	
CF <sub>23</sub> c	2.32×10 <sup>2</sup>	1.31×10 <sup>3a</sup>	1.60×10 <sup>4b</sup>	1.66×10 <sup>6a</sup>	8.21×10 <sup>5c</sup>	6.42×10 <sup>6b</sup>	1.59×10 <sup>7a</sup>
E <sub>23</sub> c	2.28×10 <sup>2</sup>	1.39×10 <sup>3a</sup>	4.54×10 <sup>4b</sup>	1.35×10 <sup>6a</sup>	4.10×10 <sup>6b</sup>	6.64×10 <sup>6b</sup>	6.54×10 <sup>6b</sup>
E <sub>15</sub> c	3.88×10 <sup>1</sup>	4.29×10 <sup>1b</sup>	5.20×10 <sup>1c</sup>	8.52×10 <sup>2b</sup>	4.30×10 <sup>3c</sup>	8.60×10 <sup>5c</sup>	1.77×10 <sup>3c</sup>
E <sub>28</sub> c	7.91×10 <sup>2</sup>	1.67×10 <sup>3a</sup>	2.37×10 <sup>6a</sup>	3.00×10 <sup>6a</sup>	1.31×10 <sup>7a</sup>	1.49×10 <sup>7a</sup>	1.74×10 <sup>7a</sup>
E <sub>32</sub> c	2.17×10 <sup>2</sup>	2.56×10 <sup>2b</sup>	8.97×10 <sup>5b</sup>	2.38×10 <sup>6a</sup>	1.29×10 <sup>6bc</sup>	1.13×10 <sup>6c</sup>	8.41×10 <sup>5c</sup>

注: 同列中标有不同小写字母者表示组间差异显著(P<0.05); 标有相同小写字母者表示组间差异不显著(P>0.05)

Note: Different small letters within the same row showed significant difference between groups (P<0.05); the same small letters indicated no significant difference between groups (P > 0.05)

1) Zhang T. A preliminary study on the mechanism of immune sensitization of *Crassostrea gigas*. Master's Thesis of Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Institute of Oceanology, 2014, 17-33 [张涛. 长牡蛎免疫致敏机制的初步研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)硕士研究生学位论文, 2014, 17-33]

用原核表达系统表达出 WSSV 主要囊膜蛋白 VP28, 将该蛋白作为抗原免疫对虾, 取得了一定的效果。Jha 等(2006)用酵母细胞表达出了 VP28 和 VP19 蛋白, 发现将这 2 种蛋白组合免疫对虾, 免疫效果比单个免疫更为有效。但这些研究仅融合了一种或几种囊膜蛋白, 导致病毒的免疫原性降低。有学者对完整 WSSV 进行灭活, 朱斐(2009)<sup>1)</sup>利用双乙烯亚胺(BEI)灭活 WSSV 悬液后注射克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*), 免疫保护率高达 60%。但上述研究诱导对虾产生免疫反应均是通过注射诱导的方式, 而注射方式不适用于本研究中较小的对虾个体[平均体重为(0.21±0.08) g, 平均体长为(24.71±3.90) mm]。

Balasubramanian 等(2006)用 60℃灭活 WSSV 悬液, 注射感染印度对虾(*Penaeus indicus*), 感染后 20 d 死亡率为 0。本研究在 1–6 d 连续投喂 60℃灭活的 WSSV 毒饵, 未出现因感染 WSSV 而死亡的个体, 证明了灭活的有效性。通过热灭活方式处理患病对虾的肌肉, 人工饲喂热灭活 WSSV 诱导中国明对虾产生免疫致敏现象, 连续 6 d 投喂热灭活 WSSV 饵料的实验组与只投喂配合饵料的对照组相比, 平均存活时间和存活率有了显著性提高(表 2), 其死亡趋势也要比对照组 CF<sub>23℃</sub>更为缓慢(图 2)。对实验结束后存活个体的病毒载量检测发现, 饲喂商业配合饲料的 CF<sub>23℃</sub>组病毒载量要高于投喂灭活饵料的 E<sub>23℃</sub>组(表 3), 这可能是由于灭活 WSSV 进入对虾体内后, 使对虾血清中产生中和 WSSV 的物质, 抑制了 WSSV 的复制, 从而在一定程度上保护了感染 WSSV 的对虾(Venegas *et al.*, 2000)。Wu 等(2005)则认为, 免疫致敏的作用机制是前期免疫诱导阶段进入对虾体内 WSSV 囊膜蛋白抢占了 WSSV 与靶细胞的结合位点, 但不能否认还会有大量的 WSSV 可以进入宿主细胞。热灭活诱导免疫致敏的方法简单经济, 适合大规模应用, 尤其适合筛选在免疫致敏反应上有差异的群体或家系, 对进一步加速中国明对虾抗性遗传选育、实施 WSSV 的有效防治具有重要实际应用价值, 同时, 为进一步揭示免疫致敏现象的分子机制提供可能性。但热灭活的局限性在于其导致蛋白构象发生部分改变, 在一定程度上降低了免疫原性。实验也存在着诱导后二

次感染存活率不高的问题, 这可能与中国明对虾的 WSSV 易感性相关(江世贵等, 2000; 盖春蕾等, 2013)。

### 3.2 不同温度对 WSSV 增殖的影响

温度不仅直接影响对虾的新陈代谢、抗病能力、饲料转化率和生存发育, 还对病毒及细菌在对虾体内的增殖有重要影响(向赞等, 2014)。许多水产动物疾病的发生与季节有密切关系, 对虾白斑综合征的发生也有明显的季节性, 吴定虎等(1995)<sup>2)</sup>研究发现, 对虾流行病的高峰期是在 4–5 月和 9–10 月, 水温较低和水温较高时疾病不容易暴发, 许多病原体都需要较合适的增殖温度范围。本研究设置 15℃、23℃、28℃和 32℃共 4 个温度梯度, 研究结果显示, 中国明对虾经过热灭活 WSSV 诱导后, 28℃条件下 WSSV 致病力最强, 这表现 28℃组在实验结束时累积死亡率最高(图 2)。实验还通过 qRT-PCR 方法跟踪了各个温度条件下病毒的增殖情况, 发现 28℃条件下病毒复制速度最快(表 2 和图 3), 这与李侃等(2013)和张俊儒等(2008)在未经诱导直接感染 WSSV 病毒所得出的结论一致。本研究中, E<sub>15℃</sub>组存活率最高(80.41%)(表 2), 病毒载量变化(图 3)也揭示了此温度下病毒增殖速度要比 23℃、28℃和 32℃组要缓慢。这与张俊儒等(2008)和 Jiravanichpaisal 等(2004)的研究结论一致: 当水温低于 16℃时, 低温抑制了病毒的增殖从而使对虾体内的病毒载量处在一个比较低的水平, 从而使 WSSV 的致病力降低。

温度对 WSSV 影响研究更多集中在高温(30℃以上)对 WSSV 的抑制上, You 等(2010)设置 27℃和 31℃两个梯度对日本囊对虾幼虾和成虾分别感染, 发现 31℃条件下对虾死亡率大大降低。李侃等(2013)通过激光共聚焦显微镜发现, WSSV 进入宿主细胞的能力与温度密切相关, 33℃条件下进入细胞的病毒数明显比 27℃少。Wongmaneeprateep 等(2010)在研究水温对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)感染 WSSV 的影响时发现, 对虾持续在(32±1)℃下养殖或在此温度下养殖 7 d 后水温降至(28±1)℃, 感染了 WSSV 的对虾没有出现疾病症状和死亡, 大大提高了对虾的存活率。本研究中, 32℃组病毒载量的变化呈现先上升后下降的趋势(图 3), 说明

1) Zhu F. Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus with inactivated WSSV and polysaccharide. Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2009, 20–34 [朱斐. 对虾白斑综合征病毒(WSSV)灭活制剂及多糖对克氏原螯虾抗 WSSV 作用的研究. 浙江大学博士研究生学位论文, 2009, 20–34]

2) Wu DH, Chen XF. Epidemiological study on virus disease of cultured shrimp. Proceedings of the second national symposium on disease control and environmental management of cultured shrimp. Qingdao: Qingdao Ocean University Press, 1995, 84–87 [吴定虎, 陈细法. 养殖对虾病毒病的流行病学研究. 第二届全国人工养殖对虾疾病防治和环境管理学术研讨会论文集. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1995, 84–87]

高温抑制了 WSSV 的增殖。但本实验 32℃组在二次感染之前出现部分死亡个体,二次感染后最终累积死亡率也高达 83.33%(图 2),说明高温对中国明对虾并没有提供有效的保护。Rahman 等(2007)的研究证明,当以较高剂量感染对虾或者当对虾出现典型的白斑综合征症状后再将温度升到 33℃左右时,不仅不能对已感染的对虾提供保护,反而加速了 WSSV 病毒的增殖过程,加速了对虾死亡进程。这可能是由于以较大剂量感染时,WSSV 在较短的时间内就会侵入全身各组织,给对虾机体造成不可逆转的损伤;也可能是因为较高的水温造成了水体溶解氧含量减少、水质变坏、细菌滋生等,从而损伤对虾的身体机能(Limsuwan *et al.*, 2012),这说明高温对对虾的保护是条件性的、不确定性的。

综上所述,饲喂热灭活 WSSV 饵料可以诱导中国明对虾产生免疫致敏现象,但免疫保护强度较弱,仅在一定程度上增加了中国明对虾感染 WSSV 后存活的时间,需要对病毒的灭活方式以及如何高效诱导免疫致敏现象进一步探究。在实际生产中,温度作为一个重要的环境因子,应该引起足够的重视,适时地根据水体温度的变化采取有效措施,防止疾病的发生。

## 参 考 文 献

- Balasubramanian G, Sudhakaran R, Syed Musthaq S, *et al.* Studies on the inactivation of white spot syndrome virus of shrimp by physical and chemical treatments, and seaweed extracts tested in marine and freshwater animal models. *Journal of Fish Diseases*, 2006, 29(9): 569–572
- Cao H, Li ZY, Wang QX. The progress of research on *Drosophila* innate immunity. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2009, 46(2): 196–202 [曹慧, 李宗芸, 王秋香. 果蝇先天性免疫研究进展. *昆虫知识*, 2009, 46(2): 196–202]
- Chou HY, Huang CY, Wang CH, *et al.* Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1995, 23(3): 165–173
- Durand SV, Lightner DV. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(7): 381–389
- Gai CL, Xu L, Ye HB, *et al.* Comparison of sensitivities of *Fenneropenaeus chinensis* and *Marsupenaeus Japonicus* to white spot syndrome virus (WSSV). *Fisheries Science and Technology Information*, 2013, 40(4): 207–209 [盖春蕾, 许拉, 叶海斌, 等. 中国对虾和日本对虾对白斑综合征病毒(WSSV)敏感性的比较. *水产科技情报*, 2013, 40(4): 207–209]
- Hewitt DR, Duncan PF. Effect of high water temperature on the survival, moulting and food consumption of *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* (Bate, 1888). *Aquaculture Research*, 2001, 32(4): 305–313
- Hossain A, Nandi SP, Siddique MA, *et al.* Prevalence and distribution of White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp. *Letters in Applied Microbiology*, 2015, 60(2): 128–134
- Jha RK, Xu ZR, Shen J, *et al.* The efficacy of recombinant vaccines against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii*. *Immunology Letters*, 2006, 105(1): 68–76
- Jiang SG, He JG, Ma ZM, *et al.* The infectivity of white spot syndrome virus (WSSV) to larvae and postlarvae of *Penaeus monodon*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2000, 39(S1): 172–176 [江世贵, 何建国, 马之明, 等. 白斑综合症病毒对斑节对虾幼体和仔虾的致病性. *中山大学学报(自然科学版)*, 2000, 39(S1): 172–176]
- Jiravanichpaisal P, Söderhäll K, Söderhäll I. Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, 17(3): 265–275
- Kong J, Luo K, Luan S, *et al.* The new variety of *Fenneropenaeus chinensis* “Huanghai No.2”. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(12): 1854–1862 [孔杰, 罗坤, 栾生, 等. 中国对虾新品种“黄海 2 号”的培育. *水产学报*, 2012, 36(12): 1854–1862]
- Li J, He YY, Wang QY, *et al.* Selective breeding of fast-growing and ammonia toxicity-resistant Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(1): 61–66 [李健, 何玉英, 王清印, 等. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)“黄海 3 号”新品种的培育. *渔业科学进展*, 2015, 36(1): 61–66]
- Li J, Liu P, He YY, *et al.* Artificial selection in the new breed of *Fenneropenaeus chinensis* named “Yellow Sea 1” based on fast growth trait. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(1): 1–5 [李健, 刘萍, 何玉英, 等. 中国对虾快速生长新品种“黄海 1 号”的人工选育. *水产学报*, 2005, 29(1): 1–5]
- Li K, Luo SY, Xu LM. A study on the mechanism of temperature impact on the proliferation of white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Applied Oceanography*, 2013, 32(1): 61–66 [李侃, 罗淑娅, 徐丽美. 温度影响对虾白斑综合症病毒增殖机制的研究. *应用海洋学学报*, 2013, 32(1): 61–66]
- Li YN, Liang Y, Huang J, *et al.* Research progress on the molecular pathogenic mechanism of white spot syndrome virus. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(7): 3533–3536 [李一宁, 梁艳, 黄捷, 等. 对虾白斑综合症病毒分子致病机制的研究进展. *安徽农业科学*, 2010, 38(7): 3533–3536]
- Li ZJ, Meng XH, Kong J, *et al.* Quasi-immune response of *Fenneropenaeus chinensis* to WSSV and its verification. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(6): 989–993 [李战军, 孟宪红, 孔杰, 等. 中国对虾对白斑综合症病毒的类免疫反应与验证. *中国水产科学*, 2012, 19(6): 989–

- 993]
- Limsuwan C, Ching CA. Temperature affects shrimp survival, feed conversion. *Global Aquaculture Advocate*, 2012(4): 17-19
- Liu A, Cha GC, Zhang ZX, *et al.* Research progress of immunity systems and regulatory mechanisms of penaeid shrimps. *Journal of Hanshan Normal University*, 2013, 34(3): 60-66 [刘昂, 查广才, 张振霞, 等. 对虾免疫系统及调控机制的研究进展. *韩山师范学院学报*, 2013, 34(3): 60-66]
- Liu B, Yu ZM. A method research of establishing the latent infection of white spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus japonicus*. *Marine Sciences*, 2003, 27(8): 72-76 [刘波, 俞志明. 建立白斑综合症病毒在日本对虾体内潜伏性感染的方法研究. *海洋科学*, 2003, 27(8): 72-76]
- Rahman MM, Corteel M, Dantas-Lima JJ, *et al.* Impact of daily fluctuations of optimum (27°C) and high water temperature (33°C) on *Penaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, 2007, 269(1): 107-113
- Rahman MM, Corteel M, Wille M, *et al.* The effect of raising water temperature to 33°C in *Penaeus vannamei* juveniles at different stages of infection with white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, 2007, 272(1-4): 240-245
- Schmid-Hempel P. Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annual Review of Entomology*, 2005, 50: 529-552
- Song XL, Huang J, Wang CM, *et al.* Artificial infection of brood shrimp of *Penaeus chinensis* with hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus. *Journal of Fisheries of China*, 1996, 20(4): 374-379 [宋晓玲, 黄捷, 王崇明, 等. 皮下及造血组织坏死杆状病毒对中国对虾亲虾的人工感染. *水产学报*, 1996, 20(4): 374-379]
- Sun CB, He JG, Li ZL, *et al.* Sensitivity difference to WSSV of *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 2006, 26(3): 17-20 [孙成波, 何建国, 黎子兰, 等. 凡纳滨对虾和斑节对虾对 WSSV 敏感性的比较. *湛江海洋大学学报*, 2006, 26(3): 17-20]
- Tom JL, Alex RK. Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends in Ecology and Evolution*, 2004, 19(2): 58-60
- Venegas CA, Nonaka L, Mushiake K, *et al.* Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 42(2): 83-89
- Vidal OM, Granja CB, Aranguren F, *et al.* A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2001, 32(4): 364-372
- Wang L, Li GY, Mao YX. Measuring methods and variations of some haemolymph factors in *Penaeus chinensis* after their oral ingestion of immuno drugs. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1995, 26(1): 34-41 [王雷, 李光友, 毛远兴. 口服免疫药物后中国对虾某些血淋巴因子的测定及方法研究. *海洋与湖沼*, 1995, 26(1): 34-41]
- Wang WQ, Li AJ, Lan CX, *et al.* Measuring immune factors in the serum of *Penaeus chinensis* with the method of nephelometry. *Journal of Fisheries of China*, 1998, 22(2): 75-79 [王伟庆, 李爱杰, 兰翠霞, 等. 用免疫消浊比浊法测定中国对虾血清中的免疫因子. *水产学报*, 1998, 22(2): 75-79]
- Witteveldt J, Cifuentes CC, Vlak JM, *et al.* Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *Journal of Virology*, 2004, 78(4): 2057-2061
- Wongmaneeprateep S, Chuchird N, Baoprasertkul P, *et al.* Effects of high water temperature on the elimination of white spot syndrome virus in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Magic Publication Co Ltd*, 2010, 34(2): 13-26
- Wu DH, Chen XF. Epidemiological study on virus disease of cultured shrimp. *Proceedings of the second national Symposium on disease control and environmental management of cultured shrimp*. Qingdao: Qingdao Ocean University Press, 1995, 84-87 [吴定虎, 陈细法. 养殖对虾病毒病的流行病学研究. 第二届全国人工养殖对虾疾病防治和环境管理学术研讨会论文集. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1995, 84-87]
- Wu XZ. Mainstream research progress of Chinese marine disease. *Pacific Journal*, 2005(10): 49-59 [吴信忠. 中国海洋病害学主流研究的进展. *太平洋学报*, 2005(10): 49-59]
- Wu W, Wang L, Zhang X. Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. *Virology*, 2005, 332(2): 578-583
- Xiang Y, Wang G, Yang SW, *et al.* The pathogenicity of *Micrococcus lysodeikticus* and white spot syndrome virus to *Litopenaeus vannamei* under different temperature conditions. *Journal of Zhejiang Ocean University(Natural Science)*, 2014, 33(4): 304-310 [向赞, 王刚, 杨绍文, 等. 不同温度条件下溶壁微球菌和白斑综合症病毒对凡纳滨对虾的致病性. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2014, 33(4): 304-310]
- Yi QL, Wang LL, Song LS, *et al.* White spot syndrome in shrimp and its immunological prevention and control. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2014, 26(9): 903-911 [衣启麟, 王玲玲, 宋林生. 对虾白斑综合征及其免疫防控. *生命科学*, 2014, 26(9): 903-911]
- You X, Su Y, Mao Y, *et al.* Effect of high water temperature on mortality, immune response and viral replication of WSSV-infected *Marsupenaeus japonicus* juveniles and adults. *Aquaculture*, 2010, 305(1-4): 133-137
- Zeng XX, Zhang C, Li KS. The study advance on cellular immunity of invertebrates. *International Journal of Immunology*, 2009, 32(5): 354-358 [曾祥兴, 张驰, 李康生. 无脊椎动物细胞免疫研究进展. *国际免疫学杂志*, 2009, 32(5): 354-358]
- Zhang JR, Liu P, Wang QY, *et al.* Effect of water temperature on the infectivity of white spot syndrome virus to the brooders



of *Fenneropenaeus chinensis*. Periodical of Ocean University of China (Natural Science), 2008, 38(3): 395–400 [张俊儒, 刘萍, 王清印, 等. 温度对 WSSV 感染中国对虾越冬亲虾的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2008, 38(3): 395–400]

Zhang YL, Peng XX, Wang SY. Study on three classes of immunoglobulin-like components in *Penaeus japonicus*. Marine Sciences, 2001, 25(5): 37–41 [章跃陵, 彭宣宪, 王三英. 日本对虾血清三类免疫球蛋白样物质的研究. 海洋科学, 2001, 25(5): 37–41]

(编辑 冯小花)

## Immune Priming Response Induced by Heat-Inactivated WSSV on *Fenneropenaeus chinensis* at Different Temperature

CAO Jiawang<sup>1,2,3</sup>, KONG Jie<sup>1,2</sup>, LUO Kun<sup>1,2</sup>, LUAN Sheng<sup>1,2</sup>, CAO Baoxiang<sup>1,2</sup>, SHI Xiaoli<sup>1,2</sup>, LU Xia<sup>1,2</sup>, FENG Yaping<sup>1,2,3</sup>, WANG Jun<sup>1,2,3</sup>, WANG Mingzhu<sup>1,2,3</sup>, MENG Xianhong<sup>1,2</sup>①

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao;

3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** This study was designed to explore whether the heat-inactivated WSSV could induce immune priming response on *Fenneropenaeus chinensis*. During the initial 6 days, four experiment groups (E<sub>15°C</sub>, E<sub>23°C</sub>, E<sub>28°C</sub>, and E<sub>32°C</sub>) were fed with typical symptoms of WSSV prawn muscle, which was dealt with at 60°C for 1 h using the equivalent and quantitative test method. At the same time, we set a positive control group C<sub>23°C</sub> (fed with the unheat-inactivated WSSV muscle) and a control group CF<sub>23°C</sub> (fed with commercial compound feed only). At the 13th day of the experiment, all shrimps were infected with WSSV again. The result showed that 60°C could decrease the activity of WSSV absolutely, there were no dead shrimp in the initial 12 d, but the mortality of positive control group C<sub>23°C</sub> was 100%. The survival rates of different experiment (E<sub>15°C</sub>, E<sub>23°C</sub>, E<sub>28°C</sub>, and E<sub>32°C</sub>) and control groups were 80.41%, 33.29%, 8.47%, 16.43% and 8.89%, respectively, after 19 days. The survival rate of E<sub>15°C</sub> showed highly significant difference from other experiments ( $P < 0.01$ ). In addition, there was a significant difference between E<sub>23°C</sub> experiment group and other experiment groups ( $P < 0.05$ ). Nevertheless, there was no significant difference between E<sub>28°C</sub> and E<sub>32°C</sub> groups ( $P > 0.05$ ). Compared to the results of absolute quantitation, it was found that the multiplication rate of WSSV was the highest under 28°C, high (32°C) and low (15°C) temperature would inhibit the multiplication of WSSV in the shrimps which accepted the subsequent rechallenge of WSSV after the heat-inactivated WSSV induced. Experimental results showed that heat-inactivated WSSV could induce immune priming response and provide some protection to the infected shrimp by WSSV. The multiplication rate of WSSV is closely related to temperature.

**Key words** Immune priming; Heat-inactivated; Survival rate; Absolute quantitation; WSSV

① Corresponding author: MENG Xianhong, E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn