

虾的致病菌侵染实验

Experiment on the infection of pathogenic bacteria in Shrimp

王永明^{1,2}, 丁维^{1,*}

¹ 海洋生命学院与海洋生物遗传与育种教育部重点实验室, 中国海洋大学, 青岛, 山东省, 中国

² 三亚海洋研究院与海南省热带水产种质重点实验室, 中国海洋大学, 三亚, 海南省, 中国

*通讯作者邮箱: dingwei@ouc.edu.cn

摘要

虾是我国重要的水产养殖物种。其中, 由于高密度集约化养殖的快速发展, 近年来加剧了南美白对虾细菌性疾病的发生, 从而造成了水产养殖行业严重的经济损失。因此, 研究病原菌的致病性和致病机理, 对于有效控制南美白对虾养殖业中病原菌的爆发具有重要的意义。本文介绍了病原菌侵染对虾的两种实验方法, 包括模拟自然条件的浸浴及注射侵染。这为研究病原菌对南美白对虾的致病机制提供了技术方法支持。

关键词: 南美白对虾, 致病菌, 浸浴侵染, 注射侵染

材料与试剂

1. Marine broth 2216E 培养基（海博生物，目录号：HB0132-1）
2. PBS 缓冲液（生工，目录号：E607020）
3. 75%酒精（沪试，目录号：80176961）
4. 无菌研磨杵（生工，目录号：F619072）
5. 无菌手术剪（生工，目录号：F519233）
6. 无菌镊子（生工，目录号：F519022）
7. 1 mL 无菌注射器（王冠）
8. 无菌水
9. 海水

仪器设备

1. 多功能酶标仪（BioTek，型号：Cytation5M）
2. 超净工作台（海尔，型号：HCB-1300V）
3. 恒温培养箱（上海博迅，型号：BXP-280）
4. 气泵（海利，型号：ACO-9730）
5. 养殖缸（定制，亚克力玻璃）
6. PCR 仪（Thermo Fisher，型号：4375305）
7. 离心机（Eppendorf，型号：Eppendorf 5420）

实验步骤

一、致病菌的分离与鉴定

1. **虾肠道组织取样**: 在爆发大规模南美白对虾死亡的养殖区域广泛收集死亡南美白对虾。通常细菌感染对虾后，会大量聚集在肠道组织中。因此，将收集完的南美白对虾置于无菌操作台上，用蘸有 75%酒精的无菌棉擦拭虾体。用无菌手术剪沿虾线部位剪开虾背（如图 1 所示），用镊子取出对虾肠道组织，并置于含有 200 μ L 1 $\times$ PBS 缓冲液的无菌 1.5 mL 离心管中备用。
2. **致病细菌的分离与纯化**: 用无菌研磨杵对肠道组织进行研磨，在肠道组织充分破碎后释放组织内的细菌。随后，使用无菌海水将上述研磨液进行梯度稀释（ 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 ），并涂布于 marine broth 2216E 固体培养基平板上，于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 96 小时。要注意的是，虽然目前大部分的对虾致病菌，如弧菌，发光杆菌，假单胞菌等，都可以使用 marine broth 2216E 进行培养，但其并非对所有对虾致病菌都适用。因此在分离对虾致病菌时，可以使用多种培养基，以分离培养更多样化的潜在致病菌。待菌落长出后，用无菌接种环挑取不同颜色形态的单菌落，于 marine broth 2216E 固体培养基平板上进行细菌的分离培养，将单菌落进行连续 9–10 次的传代后获得纯化菌株。
3. **致病细菌的物种鉴定**: 从 marine broth 2216E 固体培养基平板上挑取单菌落作为 PCR 扩增的模板。对于细菌的鉴定，采用细菌 16S rRNA 基因的通用引物，为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTTC-3'。PCR 扩增体系(25 μ L)包含: 15 μ L Q5 2 $\times$ Master Mix (NEB)、1 μ L F/R 引物、8 μ L 无菌水和致病菌的单菌落。PCR 扩增程序为: 98 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 2 min。将扩增后的产物送往生工生物工程有限公司进行 Sanger 测序。将测序获得的 16S rRNA 基因序列在 RDP classifier 和 NCBI 数据库中进行检

引用格式: 王永明, 丁维. (2024). 虾的致病菌感染实验. *Bio-101* e1011015. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011015.

How to cite: Wang, Y. M. and Ding, W. (2024). Experiment on the infection of pathogenic bacteria in Shrimp. *Bio-101* e1011015. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011015. (in Chinese)

索比对, 对分离的细菌进行物种分类。通过物种注释与进一步的基因组分析, 将本实验中从对虾肠道中分离得到的一株致病菌 LvS-8n3, 命名为 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* LvS-8n3。

二、致病菌的侵染实验

1. **致病细菌生长量确定:** 将纯化后的致病菌 *P. damsela* subsp. *damsela* LvS-8n3 单菌落接种到 5 mL marine borth 2216E 液体培养基中, 于 28 °C 摇床中培养 96 小时。使用多功能酶标仪在 595 nm 波长下测定致病细菌培养菌液的吸光度值。将菌液进行梯度稀释 (10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7) 并均匀涂布在 marine borth 2216E 固体培养基平板上, 置于 28 °C 恒温培养箱中培养 48 小时。对上述平板进行菌落计数, 并计算 1 mL 菌液中的菌落形成单位 (CFU/mL)。
2. **侵染实验中致病细菌菌液制备:** 根据所需的细菌细胞浓度制备菌液。将致病细菌按上述条件进行培养 24 h 后, 以 8,000 rpm 离心 10 min 后收集菌体, 然后加入等量无菌海水重悬后备用。
3. **南美白对虾的养殖:** 从厂里取回对虾后首先置于大体系的养殖水体 (100 L 养殖缸内含 80 L 无菌海水) 中进行稳定养殖。养殖条件为盐度 30‰、pH 7.5–8.0、温度 28 ± 2 °C、溶解氧 > 5 mg/L。每天早中晚喂食无菌饵料三次, 投饵量为对虾体重的 5%。待对虾达到稳定的生存状态时, 即可进行侵染实验。
4. **细菌侵染实验:**
 - a. **浸浴侵染实验:** 随机选择 30 只同等规格的南美白对虾分别置于两个 30 L 养殖缸中 (内含 25 L 无菌海水)。实验分为对照组和侵染组, 每组设置三个平行。将制备好的实验菌液按 3×10^8 CFU/mL 加入到侵染组对虾养殖水体中并混匀[1] (如图 2 所示), 对照组添加等量的无菌海水。实验期间控制养殖条件为盐度 30‰、pH 7.5–8.0、温度 28 ± 2 °C、溶解氧 > 5 mg/L。每天早中晚喂食无菌饵料三次, 投饵量为对虾体重的 5%。每天更换养殖缸中全部海水并吸出残余的饵料和对虾粪便, 同时为侵染组对虾添加新鲜的实验菌液。每隔 12 小时记录两组对虾的死亡数量, 直到对虾达到稳定的存活状态, 从而制作致病细菌侵染后一定时间内, 南美白对虾的存活率曲线。另外, 实验结束后取两组对虾的肠道和肝胰腺进行固定, 可随后用于扫描电镜和组织病理切片染色等实验, 进一步观察致病菌造成的组织损伤状态。
 - b. **注射侵染实验:** 随机选择 30 只同等规格的南美白对虾分别置于两个 30 L 养殖缸中 (内含 25 L 无菌海水)。实验分为对照组和侵染组, 每组设置三个平行。用 1 mL 无菌注射器吸取 40 μ L 菌液 (浓度为 3×10^8 CFU/mL), 对侵染组南美白对虾腹部第三肌节处进行注射[2] (如图 3 所示)。对照组对虾注射等量的无菌海水。实验期间控制养殖条件为盐度 30‰、pH 7.5–8.0、温度 28 ± 2 °C、溶解氧 > 5 mg/L。每天早中晚喂食无菌饵料三次, 投饵量为对虾体重的 5%。每天更换养殖缸中全部海水, 并吸出残余的饵料和对虾粪便。每隔 12 小时记录两组对虾的死亡数量, 直到对虾达到稳定的存活状态, 从而制作致病细菌侵染后一定时间内, 南美白对虾的存活率曲线。另外, 实验结束后取两组对虾的肠道和肝胰腺进行固定, 可随后用于扫描电镜和组织病理切片染色等实验, 进一步观察致病菌造成的组织损伤状态。
5. **侵染后对虾状态:** 与健康南美白对虾相比, 侵染致病细菌后, 南美白对虾的活动能力下降, 随后死亡。细菌侵染后死亡对虾呈现出不同的状态, 如尾部、足部和触须变红, 肠道呈现完全空肠的状态, 肝胰腺组织裂解等 (如图 4 所示)。



图 1. 南美白对虾肠道和肝胰腺的解剖及取样

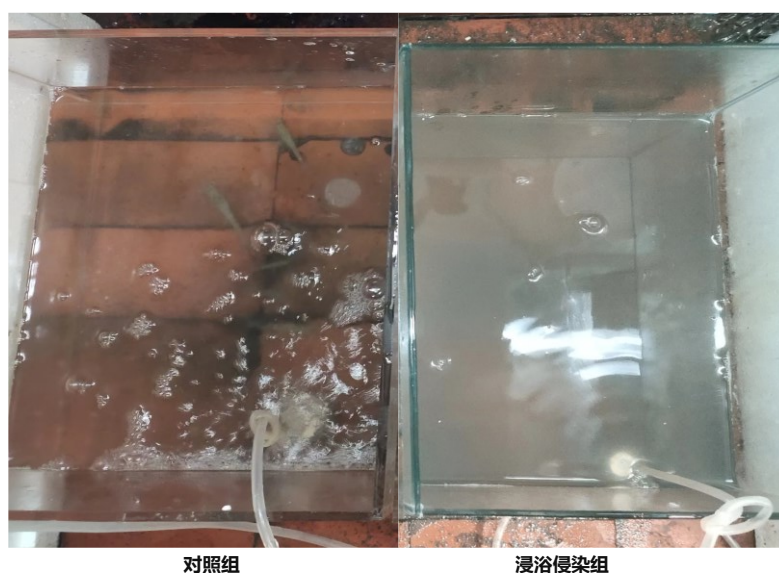


图 2. 致病细菌对南美白对虾的浸浴感染实验

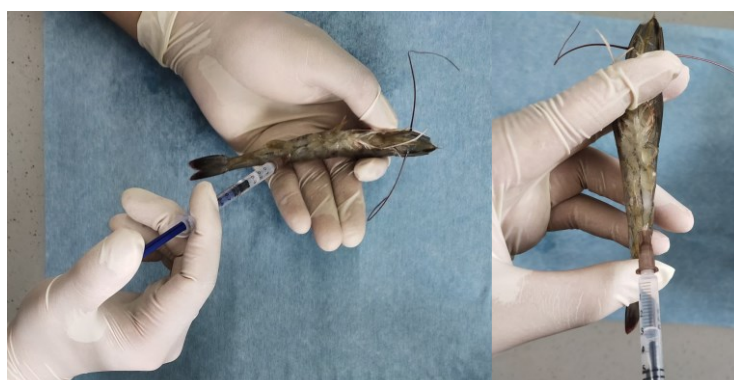


图 3. 致病细菌对南美白对虾的注射感染实验

引用格式: 王永明, 丁维. (2024). 虾的致病菌感染实验. *Bio-101* e1011015. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011015.

How to cite: Wang, Y. M. and Ding, W. (2024). Experiment on the infection of pathogenic bacteria in Shrimp. *Bio-101* e1011015. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011015. (in Chinese)

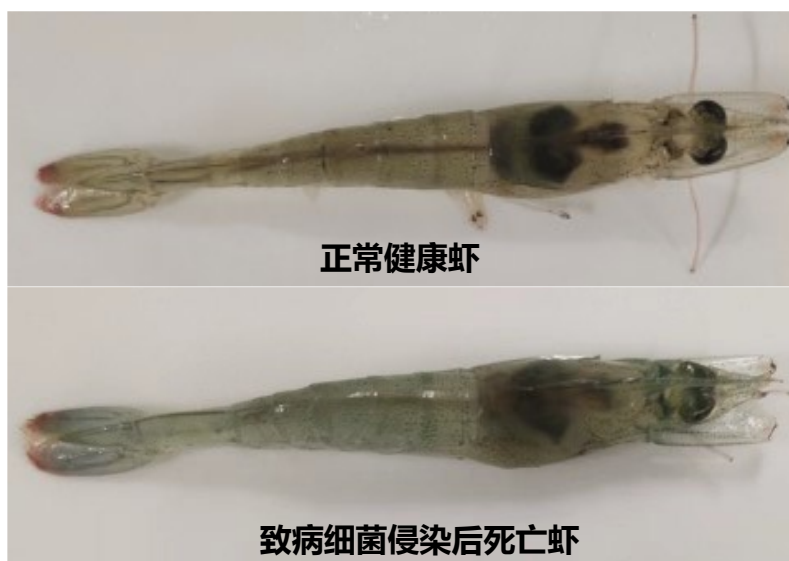


图 4. 致病细菌对南美白对虾的侵染表型

溶液配方

1. Marine broth 2216E 培养基
称取 Marine broth 2216E 培养基粉末 37.4 克，溶解在 1000 mL 蒸馏水中，121 °C 高压灭菌 20 分钟，冷却备用。
2. 无菌水
取 100 mL 蒸馏水，121 °C 高压灭菌 20 分钟，冷却备用。

参考文献

1. Gao, N., Shu, Y., Wang, Y., Sun, M., Wei, Z., Song, C., Zhang, W., Sun, Y., Hu, X., Bao, Z., et al. (2024). Acute Ammonia Causes Pathogenic Dysbiosis of Shrimp Gut Biofilms. *Int J Mol Sci.* 25(5): 2614. <https://doi.org/10.3390/ijms25052614>
2. Joshi, J., Srisala, J., Truong, V. H., Chen, I. T., Nuangsaeng, B., Suthienkul, O., Lo, C. F., Flegel, T. W., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S., et al. (2014). Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*: 297–302. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.030>