

對蝦類對於白斑病毒之免疫反應 及相關基因標誌之探討

朱惠真、曾福生、林金榮

水產試驗所水產養殖組

前言

白蝦 (*Litopenaeus vannamei*) 是目前主要的對蝦養殖品種，每年都能高量產出，約佔所有對蝦類產量的 52%。然而在發展白蝦養殖的同時，疾病的重要性不可忽略，如 WSSV (White spot syndrome virus)、TSV (Taura syndrome virus) 和 IHNV (Infectious hypodermal and hematopoietic) 等疾病的爆發，均曾對產業造成重大損失，其中尤以 WSSV 最為嚴重。WSSV 為一種 DNA 病毒，主要侵犯中胚層以及外胚層的衍生組織細胞，不論是幼蝦或成蝦在感染後 7-10 日之內均會死亡。現今養殖環境日益惡化，可用來養殖的土地大幅縮減，再加上各地養蝦交流頻繁，許多病原體藉此擴散至世界各地，再經由水流的接觸而爆發大量的流行 (曾，2004)。WSSV 是一種對蝦類常見而且具有災害性的疾病，曾經於 1990's 年代在台灣爆發嚴重的感染，造成養殖戶莫大的損失。研究顯示，WSSV 除了危害對蝦類之外，尚會傳染給其他種類的甲殼類生物 (Chang et al., 1998)。雖然最近幾年研究無脊椎動物如何對抗細菌及真菌已經累積了相當多的知識，但是對於蝦體自身如何抵抗病毒的攻擊仍然不

是研究的十分透徹，因此，研究蝦體對於物理上緊迫性的反應以及增強免疫反應是研究的首要任務。

甲殼類的免疫機制

甲殼類的免疫系統以非專一性免疫系統為主，係藉由血淋巴球之原酚氧化酵素系統 (prophenoloxidase; proPO system) 來達成免疫。血淋巴球主要可以分為透明球、半顆粒球及顆粒球，透明球司細胞毒殺及吞噬作用，而半顆粒球及顆粒球會釋出顆粒中的原酚氧化酵素並產生非專一性免疫。原酚氧化酶系統其可以被真菌或是細菌細胞壁的多醣物質如 beta 1, 3 葡萄糖聚醣 (beta 1, 3 glucan)，脂多醣體 (lipopolysaccharide) 和肽聚醣 (peptidoglycan) 所活化 (Soderhall, 1982)，也同時受到環境因子及生理因子影響，如鈣離子濃度高低、pH 值的改變和溫度的驟變等皆可影響此酵素的活性 (Lai CY et al., 2005)。當致病物質進入蝦體內的血淋巴系統時，這些致病物質先會被透明球所吞噬，血淋巴球會產生一些抗細菌性物質稱為超氧化物，如超氧離子 (O_2^-)、氧化氫根離子 (OH^-)、過氧化氫等 (H_2O_2) 等，具有毒殺細胞的功

能。在白蝦的研究中，發現有 2 種的 proPO 基因存在，分別的被命名為 proPO-a 及 proPO-b。研究顯示，proPO-b 在白蝦受到 WSSV 的攻擊後，會在白蝦的中腸、鰓部、心臟、胃部等表現而不表現於肌肉組織和肝胰腺，但病毒攻擊試驗後，於蝦體中幾乎偵測不到 proPO-a，似乎 proPO 系統僅能於 WSSV 感染蝦體初期提供短暫的保護力 (Ai et al., 2008)。

運鐵蛋白的抑病機制

除了 proPO 系統之外，運鐵蛋白 (ferritin) 是無脊椎動物另一個快速而有效的非專一性免疫方式。運鐵蛋白在脊椎動物可以藉由螯合鐵離子的方式和病原菌競爭鐵，從而達到抑制病原菌的目的。甲殼類的血淋巴球會產生超氧化物來引發細胞毒殺作用，超氧化物過多時，生物體就會利用運鐵蛋白來降低超氧化物的作用。目前運鐵蛋白較為清楚的功能包括參與一連串的生物反應，例如解毒作用、發炎反應、演化調控以及神經分化作用 (Zhang et al., 2006)。運鐵蛋白是由 170 個胺基酸所構成，分子量約為 19.4 kDa，蛋白質的等電點為 4.94。研究顯示，利用已注入運鐵蛋白基因之白蝦作 WSSV 的攻擊試驗，發現白蝦之眼柄部、腦部神經節、胸部神經節、腹部神經節、鰓部、中腸腺、淋巴球、肌肉、心臟及肝胰腺等處均有運鐵蛋白的表現，其中淋巴球是運鐵蛋白表現最高的地方，顯示運鐵蛋白參與了蝦體被病毒攻擊時之防禦機制，但是其詳細的作用與機轉為何，內容目前仍未究明 (Hsieh et al., 2006)。

除了淋巴球的防禦機制，運鐵蛋白被認為是甲殼類防疫系統一個重要的因子，經研究證明，運鐵蛋白在白蝦的免疫功用是用來抵禦 WSSV 的攻擊，同時運鐵蛋白可以視為是一個氧化作用的抑制劑，其目的為減少自由基 (free radical) 所造成的傷害。研究證實運鐵蛋白的重鏈 (heavy-chain) 位置可以和 DNA 產生鍵結，這樣的特色使運鐵蛋白可以防止宿主的體基因被自由基攻擊而使 DNA 遭受破壞。除了運鐵蛋白之外，曾等利用人類的乳鐵蛋白 (lactoferrin) 以轉基因的方式植入草蝦體內，轉殖草蝦的子代亦能具有抵抗白斑病毒的能力 (曾, 2004)。

對蝦類抗 WSSV 的微隨體研究

目前尚沒有較為有效且符合經濟成本的方法來阻止 WSSV 的感染，因此除了添加免疫激活物質來提高對蝦對病原菌的抗性外，便是利用育種的方式產生大量的抗疾病子代。學者首先研究中國對蝦 (*Fenneropenaeus chinensis*) 的染色體，並確認和 WSSV 相關之微隨體基因標誌後，同時連結 DNA 和 QTL (quantitative trait loci)，再利用此等遺傳標誌，篩選合適的蝦體。QTL 的對偶基因之聯結是以種內的蝦子的基因來加以建立，主要的方法是利用成熟的母蝦以及大量表現此 QTL 之對偶基因的子代作為選別個體的基礎 (Hallerman and Beckmann, 1988)。基因輿圖 (genetic mapping) 的建立可以作為族群結構的研究以及基因遺傳疾病之相關 QTL 的搜尋 (Schlotterer et al., 1991; Kwiatkowski et al., 1992; Hall et al., 1992)。這種基因標誌被廣泛

的應用於中國對蝦的研究，同時期許能產生很多具高多樣性的遺傳標誌 (Liu et al., 2004; Zhang et al., 2005)。在這個研究中，利用第二代子代的中國對蝦找尋和具 WSSV 抗性相關的微隨體基因標誌。第二代子代總共有 163 個樣本，利用室內養殖池做初步的 WSSV 感染。18 組的引子被利用於 80 個個體的 PCR 檢測，以 ANOVA 的統計來評估個體的基因遺傳標誌和 WSSV 的抗性，結果顯示，RSO622 基因座中的對偶基因和抗 WSSV 的能力具有高度相關性，而其他多數的 DNA 標誌也和抗 WSSV 相關，將被建立於中國對蝦之基因標誌選種之用。

在草蝦 (*Penaeus monodon*) 的抗病相關基因標誌的篩選研究中也指出，微隨體基因座 AF077565，可以用來辨識容易感染 (disease susceptible) WSSV 的草蝦及可抵抗 (disease resistant) WSSV 感染的草蝦。經由聚合酶鏈鎖反應的結果顯示，317 個核苷酸 (base-pair) 長度的 DNA 片段會同時出現於易於被感染 WSSV 的草蝦及可抵抗 WSSV 感染的草蝦，而 71 bp 長度的 DNA 片段僅會出現於易於被感染 WSSV 的草蝦，顯示草蝦和白蝦對於抵抗 WSSV 的遺傳標誌並不相同，也說明了對蝦類抵抗 WSSV 的能力並不是由單一的基因座所控制 (Mukherjee et al., 2009)。而在另一項報告中指出，RAPD 的標誌和 WSSV 的抗性有關 (Meng et al., 2005)。不過因為 RAPD 是屬於顯性的遺傳標誌 (dominate marker)，不能藉以區別同型合子 (homozygotes) 和異型合子 (heterozygotes)，是較為可惜之處。

結語

以分子生物學的技術防治 WSSV 的嘗試大致可以分為兩種，第一種是利用基因轉殖的方式，將免疫的基因轉殖入母蝦中，以增加蝦苗對 WSSV 的抵抗力，然而在施行過程中若沒有加入育種的觀念，轉殖的基因容易因為繁殖而被稀釋，且基因轉殖的成功率也會受到研究人員的經驗與技術的影響。另一種方式則是利用遺傳育種的方式，藉由 QTL 的繁殖方式選取可抗疾病及不可抗疾病的成蝦交配，取得雜交子代，再利用 F₂ 的雜交子代進行回交或是自交，便能夠保留抗病基因在生物體中的累積，不會因為繁殖而被稀釋。利用遺傳的方式所養成的蝦子，除了有較好的抗病力，也較無抗生素或是外來基因的累積，對於養蝦業者，以及水產的相關研究無疑是較為適當的做法。

本文主要引用自：

- Kuntal, M. and M. Nripendranath (2009) A microsatellite DNA Marker Developed for Identifying disease-resistant population of Giant black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Journal of the world aquaculture society, 274-280.
- Shirui, D., K. Jie, M. Xianhong, Z. Qingwen and W. Rucai (2008) Microsatellite DNA markers associated with resistance to WSSV in *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis*. Aquaculture, 282: 138-141.
- Hua, S. A., C. H. Yong, D. L. Se, P. W. Shao, Q. Y. Xiao and G. H. Jian (2009) Characterization of a phenoloxidase from hemocytes of the shrimp *Litopenaeus vannamei* that is down-regulated by white spot syndrome virus. Fish Shellfish Immunol, 25: 28-39.
- 曾福生 (2004) 豬乳鐵蛋白基因轉殖草蝦可行性及基因表現研究。台灣大學博士論文。