

斑節蝦種苗大量生產技術改善之基礎研究

東港分所 劉柏興



一、目的

台灣的蝦類養殖事業，由民國77年開始因蝦病蔓延導致產量驟減以來，至今依然尚未尋求出確實有效的防疫解決辦法。各類養殖蝦種如草蝦、斑節蝦、紅尾蝦和砂蝦等仍舊年年大量暴斃，無法像以往一樣地順利養成。日本的斑節蝦養殖事業有長久的歷史，其間也曾遭遇過因病毒感染而導致的中腸腺壞死症，使養蝦產業蒙受極大威脅。然而因中腸腺壞死症的感染過程獲得完全解明，所以在種苗生產的過程中，運用洗卵的方法杜絕此一病毒的感染，使得斑節蝦的養殖事業在日本得以持續經營。

反觀台灣的斑節蝦養殖，雖然在水試所廖所長有意防止冒進下，平安地度過十幾年，但不幸抵擋不住一股取代草蝦養殖的風險，在宜蘭地區連續豐收2、3年，造成極大的轟動，

但是好景不常，也終於步向草蝦的後塵，使台灣的蝦類養殖業完全進入黑暗期。

斑節蝦在台灣不只是主要的養殖用蝦種之一，在栽培漁業體系中更被視為最主要的放流用蝦種。所以如何大量生產無病毒的健康蝦苗，可說是目前學術界和業界都極為關注的課題。使台灣地區斑節蝦蒙受極嚴重病害的病因目前還不十分明瞭，可能和日本的病毒性中腸腺壞死症不同。因此和斑節蝦疾病有關的病毒方面的研究，國內的學者還是必須從細胞培養技術的建立和病毒檢測方法的開發方面著手，使病毒感染的途徑能先獲得解明，才可改善斑節蝦種苗大量生產的技術，進而培育出無病毒並可供各養殖業界安心放養以及可供大量放流於天然海域的健康蝦苗。

二、過程

本人承蒙恩師永山文男教授大力推薦，榮獲財團法人日本國際教育協會之獎助，以及廖所長之首肯，於民國82年9月1日至82年11月29日為期90天，在母校東京水產大學進行斑節蝦種苗大量生產技術改善之基礎研究。其中，病毒性疾病診斷技術的建立是此項研究的主要重點。研究內容包括病毒的分離技術，細胞培養技術，病毒檢查技術和病毒的定量技術等。

(一)病毒的分離技術

- 1、儘速個別採取罹病個體的病灶部組織，個體太小時則整尾採取。檢體在處理過程中均需於冰冷低溫下進行。
- 2、所採取的樣品組織或個體要儘速的貯存於 -20°C 以下的冷凍庫中，以維持住樣品中病毒的感染力。
- 3、樣品組織約2 g置入滅菌過的磁研钵中，再加入少量滅菌砂和8 ml MEM-2 培養液後，用研杵研碎組織即可將病毒釋出。操作過程中為防溫度上升使病毒失去感染力，故需於低溫中進行。
- 4、以吸管將磨碎液置入離心管中，管口加蓋後，以 4°C 、3000rpm 離心15分。
- 5、離心後吸取上清液 0.2ml以抗生素進行滅菌或稀釋50倍後用微孔過濾器(口徑450nm)除菌。

(二)細胞培養技術

1、株化細胞的繼代培養

- (1)培養瓶在瓶蓋鬆開前需以70%酒精噴霧，充分消毒。
- (2)瓶內舊培養液以吸管吸除後用磷酸緩衝液清洗細胞單層面。
- (3)將分散液注入瓶內，使細胞全面均勻地浸於分散液中。細胞單層面經5~10分後會呈白濁狀，此時輕敲瓶底，即可見白濁細胞由瓶壁剝離而向下流。
- (4)加入新培養液，並以吸管吸吐培養液數次以分散細胞團塊。吸吐次數過多會使細胞產生致死性影響，吸吐次數不足則細胞的單離效果會不佳。
- (5)細胞分散操作完了時，即可將細胞浮游液分注於新的培養瓶中，或各式培養皿中。

分注後要靜置一小時以上使細胞可附著於瓶底或皿底。

- (6)繼代培養操作完了的新培養瓶或培養皿可依下式標籤給與標示。

繼代次數	株化細胞代號
培養液Lot No	繼代日期
細胞稀釋率	培養者姓名

2、初代細胞的培養

- (1)提供器官組織的個體殺死後，以清水充分洗淨體表，再置於600ppm的次亞鹽素酸鈉溶液中數分鐘。然後擦乾體表水份，移入解剖皿中，用70%酒精浸濕過的棉布擦拭魚體。
- (2)剖開腹腔，在無菌操作下摘出生殖腺、肝臟、脾臟、腎臟和心臟等要供做培養用的內臟諸器官，移置於培養皿中令其充分冷卻。樣品最少需數公克，所以必要時也可由同種魚，不同個體採集相同器官。
- (3)將摘出樣品器官置入50ml 燒杯中，加入1~2ml冷磷酸緩衝液，然後把樣品細切至2mm以下。
- (4)經細切之組織小塊再加入適量之磷酸緩衝液；待組織小塊沉澱後吸除上層磷酸緩衝液。反覆數次此操作即可洗淨組織小塊。
- (5)組織小塊沉澱中加入10倍量胰液酵素液，置 $5\sim 6^{\circ}\text{C}$ 低溫中，低速攪拌令其消化一夜。
- (6)經消化後的組織小塊液，用紗布過濾，再以500g以下離心力令單離細胞沉澱。
- (7)去除上層液後，細胞沉澱以100倍量培養液使細胞再懸浮，然後分注於培養瓶內，置 $15\sim 20^{\circ}\text{C}$ 溫度中，即可開始進行細胞之培養。

(三)病毒的檢查技術

1、各株化細胞的病毒感受性檢查

病毒無法像細菌一樣，可於人工培養基中進行增殖，只可在活細胞內進行自我複製。因病毒本身所擁有的遺傳基因太少，而且病毒粒子內也不含能量合成體系和蛋白質合成體系，病毒本身要自我複製，即必須借宿主細胞的這些合成體系才可進行。所以病毒的檢查要用對此病毒具感受性的培養細胞才可實施。

2、盲繼代檢查法

在檢查不明病毒的感染及檢查種用動物是否保有病毒時，培養細胞接種後經過一段時日，雖未觀察到有細胞變性效果（Cytopathic effect: CPE）的發生，此時也必須進行盲繼代檢查。即將觀察2週後的已接種培養細胞，進行分散處理再做繼代培養，或將其培養液直接接種於另一新的培養細胞中進行培養。進行種用動物無病證明時，盲繼代檢查必須反覆實施2次。

(四)病毒的定量技術

病毒的存在雖無法以肉眼或光學顯微鏡觀察得到，然而經由感染細胞的形態變化和死亡現象的產生是可加以辨識的。所以感染病毒以後細胞所產生的變化，即細胞變性效果是可應用於病毒的定量。

1、50%感染終末點法（感染價法）

病毒樣品經數段稀釋後接種於培養細胞中，然後由產生細胞變性效果的稀釋倍率即可算出病毒的感染價。

- (1)將病毒樣品以10倍稀釋成數段。
- (2)把各段稀釋液以一定量(0.05ml或0.1ml)接種於96孔的各培養細胞中。
- (3)經一段期間培養後觀察各孔中培養細胞有無顯示細胞變性效果。
- (4)以下式算出其感染價(Behrens-Karber法)。
感染價 = $D + (h_1 + h_2 + \dots) d + 0.5 \times d$
D = 全培養孔中細胞均呈陽性的稀釋倍率的常用對數。
 $h_1, h_2, \dots$ = 培養細胞只部份呈陽性的各稀釋倍數的陽性率(陽性孔數/接種孔數)。
d = 樣品稀釋倍率的常用對數(10倍為1, 百倍為2)。

以上式所算出之感染價值，只表示每孔中接種液量的病毒感染價。所以如要換算成每ml液量的感染價時則需再乘上接種量的倍數，如每孔只接種0.05ml時乘20倍，0.1ml時乘10倍。

2、斑點法

正常細胞是以單層進行增殖。所以病毒接種後再以甲基纖維素(methyl cellulose)等覆蓋行疊層培養，則病毒的增殖擴散即可被適當的抑制住，而使其僅局限於最初被感染細胞的相鄰各細胞。經數日培養後，培養細胞的單層面上即可形成肉眼可見之圓形斑點。此即所

謂之斑點法，是病毒定量的最佳方法。

- (1)被檢病毒以一定倍率稀釋成數段。
- (2)將各段稀釋液接種於各孔培養細胞中。
- (3)待病毒被吸附於培養細胞後，吸除接種液。
- (4)加入含甲基纖維素的疊層用培養基，置一定溫度中培養一段期間。
- (5)以顯微鏡觀察，確定斑點已充分形成時，用含1%結晶紫的30%福馬林液行數小時固定和染色。然後以清水洗淨即可很清楚算出斑點數。
- (6)由接種液量換算成每ml液量後，病毒含量即可用pfu/ml表示。

三、心得

細胞培養技術和病毒性疾病的診斷技術，是最近幾年才被重視而運用於水產科技方面的研究。許多魚類的組織細胞，已被培養成功為株化細胞，甲殼類方面則還在起步階段。因水產生物種類繁多，合乎經濟效益而被運用於產業化養殖的也為數不少。所以有待各研究機關開發培養建立成株化細胞的還很多。細胞培養技術不只可運用於病毒性疾病的診斷上，在目前許多生物科技的研究上更發揮了它還不十分為人所知的潛力。如利用病毒寄生培養細胞的特性，確立了病毒的複製增殖法，使病毒的增殖機構因而獲得解明。其中探索病毒增殖和發癌現象的相互關係，更成了以分子科學來研究高等生物生命現象的最先端研究領域。細胞培養技術中細胞融合現象的發現，又拓展出體細胞遺傳學這門新的研究領域。其中利用融合細胞開發單株抗體的成功業績，並實際被運用於產業化生產的豐碩成果，在生物科技研究上獲得了最高評價。此外具生理活性的高分子物質，因導入細胞內的技術被研發成功，所以使用培養細胞，即可很簡便的直接觀察生理活性物質對生物的影響作用。以往以細菌和酵母等做為宿主所進行的一些實驗，在技術上碰到的瓶頸，目前也認為有必要改用培養細胞來加以突破。因這次在東京水產大學水族病理學講座進行3個月短期研究，才能有機會對細胞培養的研究領域，有更深一層的認識。非常感謝福田穎穗助教授在這段期間的熱心指導和傾囊相授。希望細胞培養技術，在台灣的水產科技研究上能被廣泛運用，受各界肯定。