

危機似弧！？

玻璃蝦苗之致病因子及分子檢測方法

利淑如、葉怡均、蘇義哲、吳豐成 摘譯 / 水產試驗所東港養殖研究中心

前言

白蝦 (*Litopenaeus vannamei*) 是 全 球 重 要 海 水 養 殖 蝦 種，然近年來新興疾病發生頻仍，包含引起急性肝胰腺壞死病 (acute hepatopancreas necrosis disease, AHPND) 的弧菌菌株 (Tran et al., 2013)、對蝦肝胰腺微孢子蟲 (*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP) (Chaijarasphong et al., 2020) 和十足目虹彩病毒 1 (decapod iridescent virus 1, DIV1) (Qiu et al., 2017; Xu et al., 2016) 等，造成養殖重大經濟損失，有必要建立蝦類疾病檢測方法，以即時防範疾病入侵蝦場。

在白蝦發育的幼體階段，從無節幼蟲期 (nauplius)、眼幼蟲期 (zoea) 及糠蝦期 (mysis)，進入後期蝦苗 (post-larval)，其形態、生理和生態都發生了深刻的變化，尤其是幼體到後期幼體階段，對蝦免疫力低下，容易受到多種病原體的感染，這可能會導致對蝦孵化場的大量死亡 (Zheng et al., 2016)。副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 是革蘭

氏陰性菌，對水生動物具有強致病性和高傳播性 (Velázquez-Lizárraga et al., 2019)。在蝦子成長的早期階段，特別是幼蟲期，副溶血性弧菌感染常常導致幼蟲大量死亡 (Angthong et al., 2021)，被稱為「半透明幼體後期病」 (translucent post-larvae disease, TPD) 或「玻璃後期幼體病」 (glass post-larvae disease, GPD) 的疾病，由一種新的高毒力副溶血性弧菌菌株所引起的 TPD，稱為的副溶血性弧菌 (VP_{TPD})，此病主要影響白蝦 P₅ – P₇ 後期幼體，爆發時間短，死亡率高 (He, 2020; Huang, 2020; Zou et al., 2020)，症狀出現 3 天內，發病率和死亡率可能高達 90%，該疾病具有高度傳染性，受感染的白蝦後期幼體表現出典型的臨床症狀 (圖 1)，如肝胰腺蒼白或無色，消化道空虛，使病個體變得透明或半透明，導致受影響的白蝦幼體停止進食並表現出活力下降，造成了重大的經濟損失，因此，這些患病個體被稱為「半透明蝦苗」或「玻璃蝦苗」 (Zou et al., 2020; Jia et al., 2024)。



圖 1 感染 VP_{TPD} 的白蝦後期幼體 (左) 表現出消化系統空虛綜合症和蒼白或無色的肝胰腺與健康的後期幼體 (右) 之臨床症狀比較 (圖片來源: Jia et al., 2024)



VP_{TPD} 關鍵致病因子

TPD 作為一種新興的對蝦疾病，自 2020 年春季以來嚴重影響我國對蝦養殖業，並造成了重大的經濟損失。劉等 (2023) 透過 VP_{TPD} 不同分子量蛋白，結合質譜分析、基因組分析、流行病學調查和攻毒試驗，對南美白蝦後期幼蟲的致病性分析原因。研究了 VP_{TPD} 的不同分子量蛋白對南美白對蝦後期幼蟲的致病性，根據 NCBI 網路上線上 Blastx 程式的多重序列比對結果，鑑定出新型毒力蛋白 - 弧菌高毒力蛋白 (vibrio high virulent protein, VHVP)，分別由 VP_{TPD} 中的 GE005140 和 GE005139 編碼兩種假定的毒力蛋白 VP_{TPD}_4-2-1 和 VP_{TPD}_4-2-2，被命名為假定的 VHVP-1 和 VHVP-2，作為 VP_{TPD} 的潛在關鍵毒力因子，它們具有 100% 和 99.49% 的胺基酸一致

性，其序列分別與殺蟲毒素蛋白 (GenBank: WP_269169668.1) 和毒力蛋白 (GenBank: APX09935.1) 相同。本研究表明，弧菌高毒力蛋白 -2 (VHVP-2) 是由位於 187791 bp 質粒上 *vhvp-2* 的毒力基因所編碼，蛋白質序列及其功能區塊 (圖 2)，被確定為 VP_{TPD} 的關鍵毒力因子，是副溶血性弧菌對蝦苗後期產生致命毒力的原因 (Liu et al., 2023)，與常見的副溶血性弧菌 (VP_{AHPND}) 菌株產生 Pir A / Pir B 毒素所引起急性肝胰臟壞死症 (AHPND) 之致命毒素不同 (Han et al., 2015; Kondo et al., 2015; Tran et al., 2013)。

分子檢測 VP_{TPD}

劉等 (2023) 為了建立 VP_{TPD} 的聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

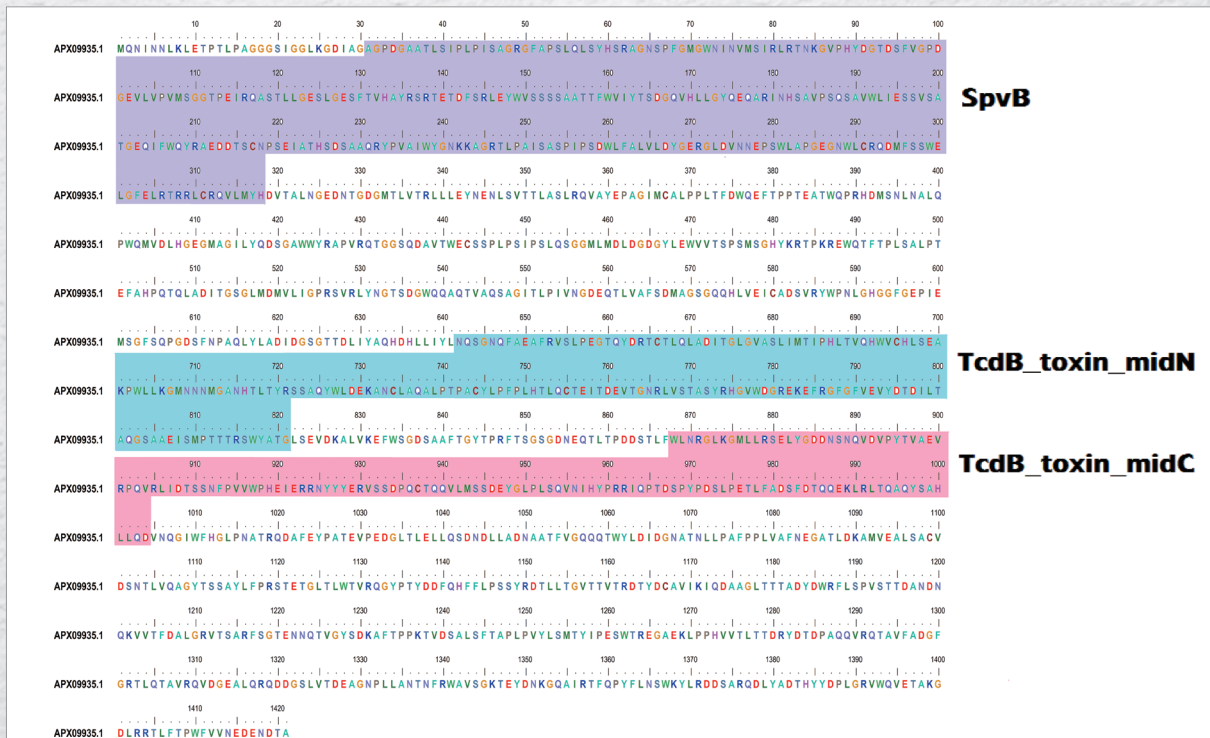


圖 2 VHVP-2 蛋白質序列及其功能區塊

檢測方法，設計了針對 *vhvp-1* 和 *vhvp-2* 基因的 PCR 引子 (圖 3a、表 1)。三組 PCR 引子 (VP_{TPD}-*vhvp-1*-F1/R1、VP_{TPD}-*vhvp-2*-F1/R1 和 VP_{TPD}-*vhvp-2*-F2/R2) 皆在檢測 VP_{TPD} 菌株中 *vhvp* 的毒力基因。從 VP_{TPD} 樣本中提取的核酸 DNA 作為 PCR 測定的模板，其反應混合物配置含有 1 μ L 核酸 DNA、10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、4 mM MgCl₂、1.5 mM dNTP、0.4 μ M 引子 (VP_{TPD}-*vhvp-1*-F1/R1、VP_{TPD}-*vhvp-2*-F1/R1 或 VP_{TPD}-*vhvp-2*-F2/R2)，2.5 U TaKaRa EX Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa)。PCR 反應條件，在 94°C 進行 4 分鐘，然後 94°C，30 秒、58°C，30 秒和 72°C，40 秒，進行 35 個循環，最後以 72°C，7 分鐘結束。接著將 PCR 產物注入於 1.5% 瓊脂糖凝膠中進行電泳膠體分析，並使用分別來自非 VP_{TPD} 菌株的 DNA 樣本進行引子的特異性分析，包括副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*-0421B)、黃質交替單胞菌 (*Pseudoalteromonas flavipulchra*)、引起 AHPND 的副溶血弧菌 (VP_{AHPND})、溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)、哈維

表 1 VP_{TPD} 的 PCR 檢測引子 (整理自 Liu et al., 2023; Jia et al., 2024)

標的基因	引子名稱	引子序列 (5' – 3')
<i>vhvp-1</i>	VP _{TPD} - <i>vhvp-1</i> -F1	GAGGAGAGTGTGACCGAAATC
	VP _{TPD} - <i>vhvp-1</i> -R1	CTGCGCCAGTAGTAACGATAAG
<i>vhvp-2</i>	VP _{TPD} - <i>vhvp-2</i> -F1	GGAGTATTGGTGGGCTGAAA
	VP _{TPD} - <i>vhvp-2</i> -R1	GGTAGGCATGGACCGTAAAG
<i>vhvp-2</i>	VP _{TPD} - <i>vhvp-2</i> -F2	CTAAGCCTTGGCTCCTGAAA
	VP _{TPD} - <i>vhvp-2</i> -R2	CGGTCAGAATATCGGTATCGTAAA
qPCR	VP _{TPD} - <i>vhvp</i> -F	TGGTCGCAGCACTCGAAGAGG
	VP _{TPD} - <i>vhvp</i> -R	AACTCCCGAAATCCGTCAG
	VP _{TPD} - <i>vhvp</i> -P	ACACCCAATACTCCAAACGAC

氏弧菌 (*V. harvey*)、歐文氏弧菌 (*V. owensii*) 和坎貝氏弧菌 (*V. campbellii*)。結果顯示三組引子皆可擴增 VP_{TPD} 蝦組織的 DNA 樣本，其長度分別為 362 bp、351 bp 和 303 bp，以非 VP_{TPD} 菌株的 DNA 為模板時，沒有擴增出預期的 PCR 產物，顯示 PCR 引子組僅對 VP_{TPD} 具有特異性 (圖 3b) (Liu et al., 2023)。

Jia 等 (2024) 發表 VP_{TPD} 即時定量聚合酶連鎖反應 (Quantitative real-time PCR, qPCR) 引子對進行反應 (表 1)，從 NCBI 資料庫比對找到基因序列並標記其引子設計位點 (圖 4)，片段大小為 140 bp，反應混合物含 20 μ L 含有 10 μ L iTaq Universal probes

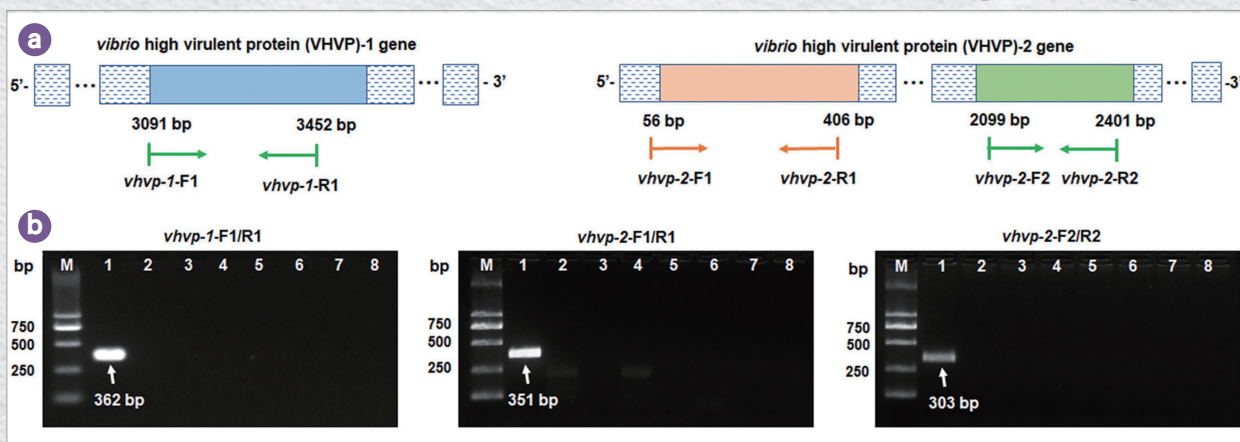


圖 3 VP_{TPD} 毒力因子基因 PCR 引子位點示意圖及以 VP_{TPD} 之 *vhvp* 基因分子檢測電泳圖

a : VP_{TPD} 毒力因子基因 PCR 引子位點示意圖。b : VP_{TPD} 之 *vhvp* 基因分子檢測電泳圖；Lane 1: 引起 TPD 的副溶血弧菌 (VP_{TPD})、lane 2: 副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*-0421B)、lane 3: 黃質交替單胞菌 (*Pseudoalteromonas flavipulchra*)、lane 4: 引起 AHPND 的副溶血弧菌 (VP_{AHPND})、lane 5: 溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)、lane 6: 哈維氏弧菌 (*V. harvey*)、lane 7: 歐文氏弧菌 (*V. owensii*) 和 lane 8: 坎貝氏弧菌 (*V. campbellii*)、lane M: 分子量標記 (bp) (圖片來源：Liu et al., 2023)



圖 4 VP_{TPD} 之 qPCR 引子設計位置

supermix '6 μL ddH₂O、1 μL 引子和探針 (各 0.3 μM) 和 1 μL 基因組 DNA 或標準品 DNA，混合均勻後，置入 StepOne Real-Time PCR 機器中，反應參數包括初始變性溫度 95°C，10 分鐘，然後進行 40 個循環的 95°C 變性 10 秒，以及溫度 55.7°C 引子黏合和延伸 25 秒，完成後以 StepOne software v2.1 軟體進行分析。訂購 VP_{TPD} 之引子其標準曲線之建立，在一定範圍內連續稀釋 10 倍 VP_{TPD} 陽性標準品 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 拷貝數 (copies/ μL)，進行 qPCR 分析。根據 VP_{TPD} 陽性標準品稀釋液的增幅曲線 (圖 5a) 和已知拷貝數的 Ct 值繪製標準曲線 (圖 5b)， $R^2 = 0.996$ ，擴增效率 (Eff%) 為 107%。

■ 弧菌疾病治療

生物製劑的使用：養殖期間適當使用生物製劑 (如益生菌) 來改善池塘中的有益微生物，可以幫助抑制致病細菌的生長。環境調整：維持良好的水質環境及增加曝氣等改善環境措施；另，池塘過度使用氯來抑制弧菌，孰不知氯會消滅環境中大量的天然微生物菌叢，養殖過程應維持「健康」的微生物相，可以使用益生菌來平衡腸道微生物群或入侵病原體細胞等抗菌物質來調節免疫系統 (Bermudez-Brito et al., 2012)，使之達到生態平衡並可降低發病的風險。

■ 結語

建立蝦類疾病分子檢測方法，所參照使用之標的基因引子具有專一性，可以有效診斷和監測水產養殖中的 VP_{TPD} 等新型病原菌，並且有利於養殖漁業部門對 VP_{TPD} 的出現，進行早期預警並製定預防策略，從長遠來看，處理這些病原體的最佳方法就是重視種苗階段之親蝦選育及疾病篩選，合併養殖環境之監控來達到疾病之控制，創造有利於蝦子的生產環境，並培育出耐受高，甚至抵抗毒素影響的蝦子品種，以減少 VP_{TPD} 嚴重爆發造成的經濟損失至關重要。

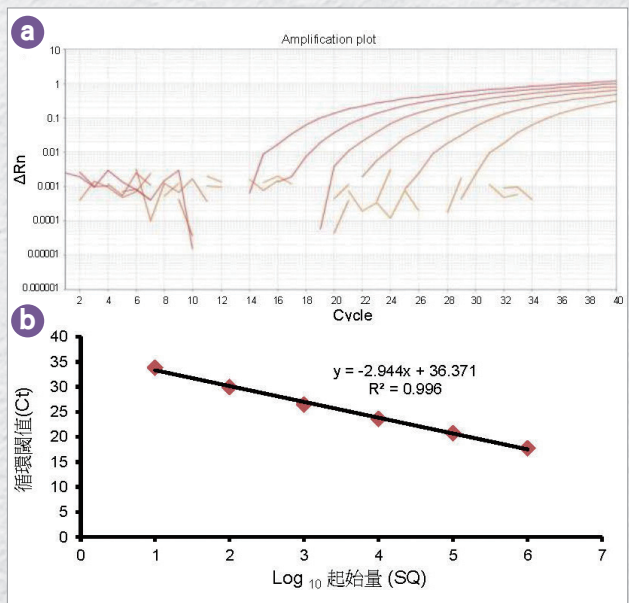


圖 5 VP_{TPD} 陽性標準品稀釋液 (10^6 - 10^1) 的增幅曲線 a 和標準曲線 b