维普资讯 http://www.cqvip.com

第13卷第3期 中 国 病 毒 学 Vol.13 No.3
1998年9月 VIROLOGICA SINICA Sep 1998

中国对虾杆状病毒基因克隆及探针制备与检测

石正丽 黄灿华 陈棣华

(中国科学院武汉病毒研究所,武汉 430071)

J.R.Bonami S.Durand

(*UMR219, CNRS - IFREMER, DRIM, Place E. Bataillon, cp* - 80, 34095 *Montpellier, Cedex 5, France*)

摘 要 从收集的中国对虾(*Penaeus chinensis*)病虾样品中分离到一种杆状病毒,经负染在电镜下观察,完整病毒粒子大小为110×280～320 nm。病毒核酸经EcoRI酶切,克隆到pUC18质粒上,经筛选得到两个克隆L46、M13,克隆片段分别为2.14 kb和3.58 kb。将这两个基因片段和对虾白斑综合征杆状病毒(White Spot Syndrome Baculovirus,简称WSSV)基因克隆片段A26制备探针,共同用点杂交法对我国沿海地区的病虾样品进行检测,以了解我国沿海地区对虾杆状病毒的分布,并确定中国对虾杆状病毒与WSSV的同源性。

关键词 中国对虾,杆状病毒,基因克隆,核酸探针

自1993年对虾爆发性流行病发生后,在中国对虾体内发现的无包涵体杆状病毒被确认为主要的致病病原。张立人、陈棣华、黄捷等对该病毒的形态结构、病理变化、生化特性、检测方法等方面做了大量工作[1~4]。黄捷曾将此病毒暂命名为皮下及造血组织坏死杆状病毒(Hypodermal and Hematopoitic Necrosis Baculovirus, HHNBV)。近年来在泰国、印度尼西亚、日本、韩国等亚洲及太平洋海岸国家,相继也发现了一种毒力强、造成对虾死亡率很高的杆状病毒。研究人员根据病理症状分别将它们命名为:日本对虾杆状病毒(Rod-Shaped Virus of Penaeus Japonicus, RV-PJ)[5];系统性的外胚层和中胚层杆状病毒(Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus, SEMBV)[6],白斑杆状病毒(White Spot Baculovirus, WSBV)[7],白斑综合征杆状病毒(White Spot Syndrome Baculovirus, WSSV)[8,9]。所有这些病毒均被认为属于杆状病毒科的无包涵体杆状病毒亚群。在最近的第六次国际病毒分类会议(ICTV)报告中,取消了以上传统的命名,具体的命名还有待进一步确定。按照Lightner[10]的意见,这种杆状病毒暂时命名为白斑综合征杆状病毒(White Spot Syndrome Baculovirus, WSSV)。

本文报道的是从中国对虾(*Penaeus chinensis*)中提取的杆状病毒,进行克隆和制备探针检测病虾的工作。

材料和方法

1 **材料** 病虾于1996年从河北乐亭收集。

2 **病毒的分离和提纯**

将病虾组织在TN(0.02 mol/L Tris-HCl, 0.4 mol/L NaCl, pH7.4)缓冲液中捣碎,低速离心弃粗渣,上清液经25 000 r/min (113 000 g)离心45 min。沉淀用TN悬浮,并用1,1,2Trichloto-1,2,2Trifluoroethane抽提2

收稿日期:1998-02-26,修回日期:1998-04-07

维普资讯 http://www.cqvip.com

次，取含病毒的上清液经25 000 r/min离心45 min。沉淀用TN悬浮，经20～50%蔗糖梯度28 000 r/min离心1 h，取出沉淀带，洗去蔗糖，病毒用TN(pH7.4)缓冲液悬浮。

3 病毒DNA的提取

病毒悬液用Proteinase K (100 μg/μL)37 ℃消化2 h, N-Lauroylsarcosine Sodium Salt (0.5%) 65 ℃保温2 h，或55 ℃过夜。Tris-HCl饱和酚抽提2次，上清经酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提1次，氯仿:异戊醇(24:1)抽提2次，水相用0.3 mol/L NaAc，2倍体积的乙醇沉淀，－20 ℃过夜。14000 r/min沉淀15 min，沉淀经70%乙醇洗2次，0.1 × TE溶解，溴化乙锭荧光法测定DNA浓度，1%琼脂糖电泳。

4 病毒DNA酶解和克隆

病毒DNA经EcoR I酶切，用Rapid Ligation Kit (Boehinger Mannheim)连接到pUC18上并转化到感受态细胞 *E. coli* DH5α内，在含氨苄青霉素、X-gal和IPTG的LB培养基筛选白色克隆菌落。

5 限制性内切酶

以下限制性内切酶被用来做克隆片段的内切酶图谱：Acc Ⅰ、Aoc Ⅰ、EcoRV、Hind Ⅱ、Hind Ⅲ、Hpa Ⅰ、Sac Ⅰ、Sal Ⅰ、Sph Ⅰ、Xba Ⅰ、Bgl Ⅱ、Apa Ⅰ、BamH Ⅰ、Cla Ⅰ、Not Ⅰ、Pst Ⅰ、Sma Ⅰ，均为Boehringer Mannheim产品。

6 探针的制备和检测

6.1 A26克隆株由法国Monipellier Ⅱ海洋无脊椎动物病理实验室S. Durand提供(从WSSV中克隆得到)。

6.2 被检测的病虾样品分别采自江苏、浙江、河北、海南等地。

6.3 用适当的内切酶从质粒A26 L46 M13中切下病毒基因片段，并用Dig-11dUTP标记。杂交方法按照Boehinger Mannheim High Prime Kit操作。

6.4 取病虾组织，经TN(pH7.4)研磨，低速离心弃粗渣，上清液按10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}梯度稀释、分别取1 μL滴加在尼龙膜上，依Boehinger Mannheim的探针检测盒的说明操作。

结 果

1 病毒DNA

提纯的病毒DNA经1%琼脂糖电泳，显示出一条清晰的DNA带，见图1。

2 克隆片段的内切酶图谱

经筛选得到L46, M13克隆，其插入片段分别为2.14 kb和3.58 kb。图2～3为内切酶图谱电泳图。L46的插入片段内切酶位点有：Hind Ⅲ、Hind Ⅱ、EcoR V、Sal Ⅰ、Acc Ⅰ、Xba Ⅰ。M13的插入位点有：Hind Ⅲ、Bgl Ⅱ、Hind Ⅱ、EcoR V、Acc Ⅰ、Sac Ⅰ、Xba Ⅰ、Cla Ⅰ、Hap Ⅰ、Aoc Ⅰ。

L46、M13的内切酶图谱如图4所示。L46用EcoR Ⅰ切割得一片段2.14 kb；M13用Hpa Ⅰ + Sac Ⅰ切割得一片段2.1 kb。A26为S. Durand所克隆的WSSV基因片段，长度约8 kb左右，经Hind Ⅱ酶切后得5个片段。所有克隆片段经点杂交证实均为病毒的DNA片段。

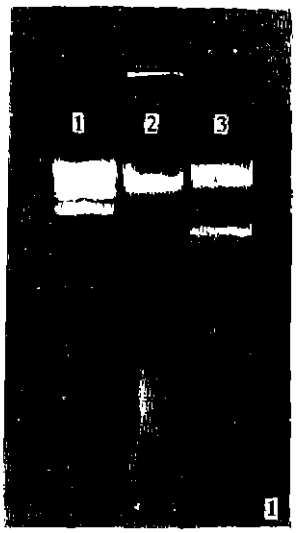
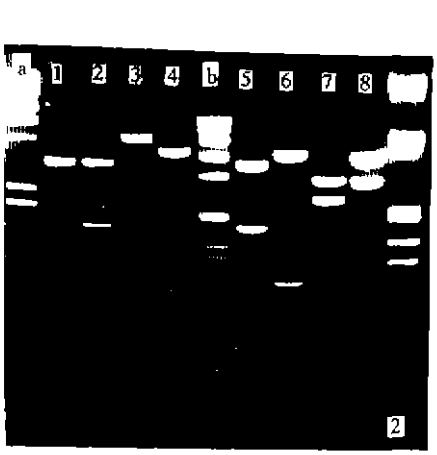


图1 病毒DNA1%琼脂糖电泳

Fig 1 1% Agarose gel electrophoresis of viral DNA
Lane 1: Marker Ⅱ (λ DNA/HindⅢ), Lane 2: Virus DNA, Lane 3: Marker Ⅲ (λ DNA/HindⅢ + EcoR Ⅰ)



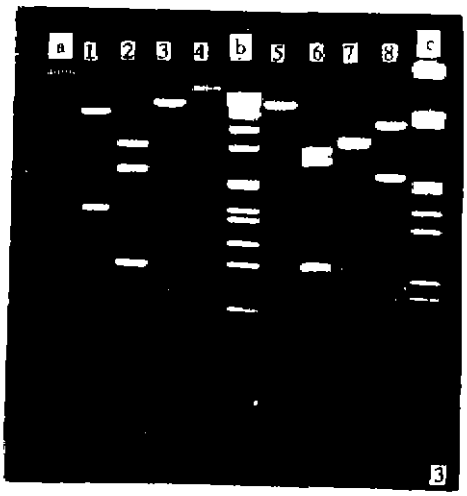


图 2　L46 克隆被 Acc Ⅰ-1, Hind Ⅱ-2, Sph Ⅰ-3, Hind Ⅲ-4, Sal Ⅰ-5, Xba Ⅰ-6, EcoR Ⅰ-7 酶切, M13 被 EcoR Ⅰ-8 酶切的 0.8% 琼脂糖电泳图

Fig. 2　0.8% Agarose electrophoresis of the digestion of clone L46 by Acc Ⅰ-1, Hind Ⅱ-2, Sph Ⅰ-3, Hind Ⅲ-4, Sal Ⅰ-5, Xba Ⅰ-6, EcoR Ⅰ-7, M13 by EcoR Ⅰ-8, Marker Ⅱ-a, Marker Ⅲ-c, Marker Ⅵ-b

图 3　M13 克隆被 Acc Ⅰ-1, Hind Ⅱ-2, Sph Ⅰ-3, EcoRV-5, Hind Ⅲ-6, Sac Ⅰ-7, Xba Ⅰ-8 酶切及 M13 质粒 -4 的 0.8% 琼脂糖电泳图

Fig. 3　0.8% Agarose electrophresis of the digestion of clone M13 by Acc Ⅰ-1, Hind Ⅱ-2, Sph Ⅰ-3, EcoRV-5, Hind Ⅲ-6, Sac Ⅰ-7, Xba Ⅰ-8, native clone M13 -4 Marker Ⅱ-a, Marker Ⅲ-c Marker Ⅵ-b

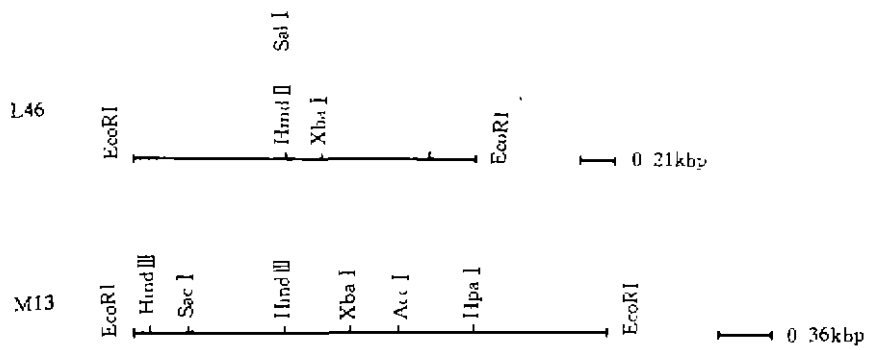


图 4　克隆质粒 L46 和 M13 的酶切图谱

Fig. 4　Restriction map of L46 and M13

3　样品检测结果

被检测病虾样品分别采自沿海地区发病对虾，或人工感染的发病对虾，经与探针 A26、L46、M13 杂交，结果如图 5(a: A26, b: L46, c: M13)所示。14 号是健康虾组织，6 号是从唐海未发病虾池中采集的虾样，检测结果为阴性；其它样品分别从不同地区发病虾池中采集，检测结果呈阳性反应。实验结果还反映出不同地区的病虾样品由于受病毒感染的程度不同，阳性反应强弱不一样。本实验采用 3 个探针检测所得的结果保持一致性，为说明不同的海域，中国对虾均不同程度地存在被病毒感染的状况提供了一个科学的依据。

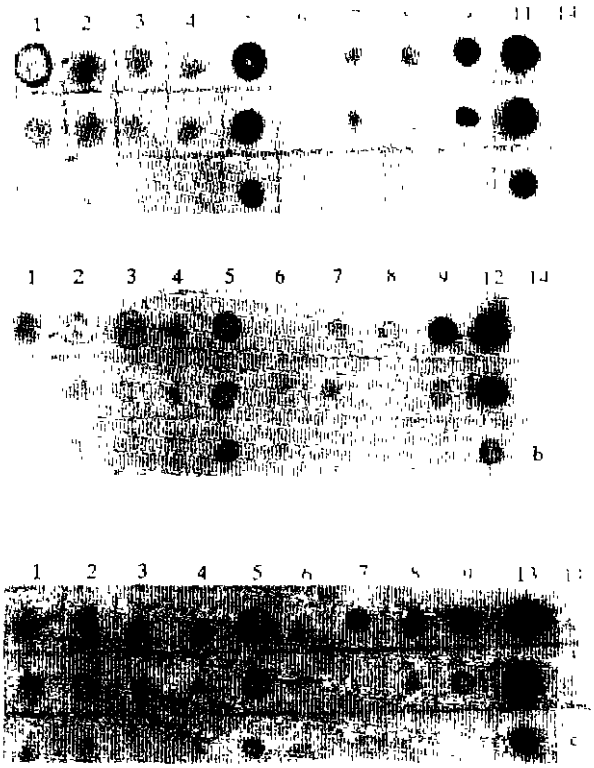


图5 点杂交(Dot-blot)检测结果：a:A26;b:L46;c:M13

1号:宁波;2号:舟山;3号:大丰;4号:乐亭;5号:人工感染发病对虾;6号:健康对虾;7－8号:唐海;9号:病毒DNA;11－13号:分别为A26, L46, M13的克隆质粒;14号:阴性对照(健康虾组织)。

Fig 5 The results of dot-blot with the probe A26-a, L46-b, and M13-c.

The shrimp samples: 1 – Ningbo; 2 – Zhoushan; 3 – Dafeng; 4 – Laoting; 5 – Shrimp infected by purified baculovirus; 6 – healthy shrimp from Tanghai; 7, 8 – Tanghai; 9 – Purified DNA of Virus; 11, 12, 13 – plasmids of clone A26, L46, and M13; 14 – Negative control (healthy shrimp tissue).

讨 论

1 A26为Universite Montpelier Ⅱ海洋无脊椎动物实验室S. Durand所克隆的感染 *P. monodon* 的对虾白斑综合征杆状病毒(WSSV)。同时，S. Durand在检测她所克隆的基因片段时，发现37个克隆与中国对虾杆状病毒呈现阳性反应，这说明中国对虾杆状病毒与WSSV有很大程度的相似性，至于是否为同一种病毒，还需要进一步的工作加以证实。根据片段大小和内切酶图谱，作者所克隆的两个基因片段与S. Durand[9]、刘萍[4]等人克隆的基因片段没有重复性。

2 众所周知，对虾病毒性流行病的发生给养虾业造成巨大的经济损失，在目前针对病毒病尚无特效药物防治的情况下，早期检测与预防已成为当务之急。斑点杂交(Dot-blot)技术以其特异性强、灵敏度高而成为核酸杂交技术中常用方法，如能与PCR等技术一起使用，将在对虾病毒病的早期预测与诊断中发挥重要作用。

3 对虾无包涵体杆状病毒(WSSV)是一种基因组较大的杆状病毒，据估计DNA长度约为150kb左右。由于该病毒DNA难以被内切酶酶解，所以要获得全部的病毒DNA信息有待今后进一步研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

1 张建红，陈棣华，高学兴等 中国对虾非包涵体杆状病毒在体内的感染与发生．中国病毒学，1994，9 (4)：364－366

2 张立人，张建红，陈棣华等．东方对虾杆状病毒在宿主细胞内的装配．电子显微学报，1994 (5)：354－355

3 黄倢，于佳，宋小玲等．对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒的精细结构、核酸、多肽及血清学研究．海洋水产研究，1995，16 (1)：11－19

4 刘萍，张岩，孔杰等．对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒(HHNBV) DNA 探针的制备及应用．海洋水产研究，1995，16 (1)：59－62

5 Inouye K, Miwa S, Oseko N *et al*. Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: Electron microscopic evidence of the causative virus. Fish. Pathol 1994, 29: 149－158

6 Wongteerasupaya C, Vickers JE, Sriuraitatana S *et al*. A non-occluded, systematic baculovirus that occurs in cell of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. Dis Aquat Org, 1995, 21: 69－77

7 Wang CH, Lo CF, Leu JH *et al*. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. Dis Aquatic Org, 1997, 23: 239－242

8 Durand S, Lightner D V, Redman R M *et al* Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV) dis. Aquat Org, 1997, 29: 205－211

9 Durand S, Lightner D V, Nunan L M *et al*. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot syndrome baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. Dis Aquat Org, 1996 27: 59－66

10 Lightner D V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedure for disease of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 1995

Partial Cloning of the Genome of Non-occluded Baculovirus from *Penaeus chinensis* and Preparing the Probe for Detection

Shi Zhengli　　Huang Canhua　　Chen Dihua

(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071*)

J. R. Bonami　　S. Durand

(*UMR219, CNRS-IFREMER, UMII, Place E. Bataillon*, 34095 *Montpellier, Cedex* 5, *France*)

Abstract　Viral particles similar to non-occluded baculoviruses were isolated from penaeid shrimp *Penaeus chinensis* in China. The size of enveloped virion is 250－300 × 110 nm. After extraction, the viral DNA was digested by EcoR I and cloned into the pUC 18. Two clones, L46 and M13, containing inserts of 2.14 kb and 3.58 kb in size respectively, were obtained. The inserts were labeled by Digoxingenin. Diseased shrimp samples issued from different regions of China were investigated by dot-blot hybridization with the previously preparing probes L46, M13 and with A26 probe. All the probes reacted with the tested samples showing baculovirus infection. It indicated that baculovirus from *P. chinensis* is very close to the WSSV.

Key words　*Penaeus chinensis*, Baculovirus, Gene cloning, DNA probe