维普资讯 http://www.cqvip.com

第15卷第3期 中国病毒学 Vol.15 No 3
2000年9月 VIROLOGICA SINICA Sep. 2000

用简并寡核苷酸探针筛选对虾白斑综合征病毒DNA多聚酶基因片段

石正丽[1,2], Durand Stephanie[2], Bonami Jean-Robert[2]

[1](中国科学院武汉病毒研究所,武汉 430071)

[2](UMR 219, UMII, CNRS/IFREMER, CC-80, Plane E. Bataillon, 34095, Montpellier CEDEX 5, France)

摘要:根据一些病毒的DNA多聚酶氨基酸序列中特有的保守序列VYGDTD设计的简并寡核苷酸,经地高辛标记后与对虾白斑综合征病毒基因库克隆杂交,筛选出一段长度为707 bp的*Eco*R 1基因片段,该片段在一个开放阅读框内。并含DNA多聚酶B家族特有的保守序列YGDTDS。经与基因库比较,其氨基酸序列与藻类DNA病毒科(Phycodnaviridae)的几株藻类病毒的DNA多聚酶片段有部分相似,因此推测该核苷酸片段为对虾白斑综合征病毒DNA多聚酶基因的部分序列。

关键词:白斑综合征病毒;DNA多聚酶

中图分类号:S945.479 **文献标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2000)03-0302-06

DNA多聚酶是生物体内不可缺少的酶,越相近的生物家族,其氨基酸序列同源性越高。有作者(Ito & Braithwaite 1991)将现有的44种之多的DNA多聚酶归纳为A B C三个家族,分别与大肠杆菌(E.coli)的DNA多聚酶Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ相对应。其中,大多数原核生物的DNA多聚酶属于B族,大多数真核生物的DNA多聚酶则属于C族。由于DNA多聚酶的这种保守性,它常常被用来作为基因发育的一个重要的标记基因[1]。

对虾白斑综合征病毒是1993-1994造成对虾大面积死亡的主要病毒病原[2~5]。该病毒感染力强,宿主范围广,已成为危害对虾乃至甲壳类动物养殖业的病害[6,7]。该病毒为无包涵体杆状具囊膜的双链DNA病毒[8,9]。人们根据病毒的形状曾把它归为杆状病毒科的C亚属。但第六次国际病毒分类与命名委员会取消了C亚属,所有C亚属的病毒被归为无分类地位的病毒[10]。为了进一步弄清对虾白斑综合征病毒的本质,给予应有的分类地位,需要寻找更多的证据。本文报道的是利用一些病毒DNA多聚酶的氨基酸高度保守序列设计简并寡核苷酸来筛选对虾白斑综合征病毒DNA多聚酶基因,并与其它生物的DNA多聚酶相比较的结果。

1 材料与方法

1.1 对虾白斑综合征病毒基因库

由中国科学院武汉病毒研究所与法国蒙彼利埃(Montpellier)第二大学海洋无脊椎动物防御实验室病毒组合作建立[11]。

收稿日期:1999-12-26,修回日期:2000-04-04

作者简介:石正丽(1964年-),河南省人,女,研究员,博士,主要从事海洋生物的病毒学及分子生物学的研究

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 简并寡核苷酸的设计与标记

从基因库(Genbank)中筛选出 B 族 DNA 多聚酶特有的保守序列 YGDTDS 序列，并结合一些主要病毒的 DNA 多聚酶氨基酸序列，如腺病毒(Adenovirus)、禽痘病毒(Fowlpox virus)，牛痘病毒(Vaccinia virus)，苜蓿银纹夜蛾颗粒体病毒(Autographa califonia nuclear polyhedrosis virus)等[12]设计并人工合成了氨基酸序列为 VYGDTD 的简并寡核苷酸序列：5′GTNTAYGGNGAYACNGAY3′(Y = T/C, H = T/C/A, R = A/G, S = G/C, W = T/A, N = A/T/G/C)3′。然后用 3′末端标记法加入标记有地高辛的 2′3′-双脱氧尿苷 5′-三磷酸(Dig-ddUTP, Boehringer Manheim)。方法如下：4 μL 5×反应液(reaction buffer)，4 μL 氯化钴($CoCl_2$)，2 μL 简并寡核苷酸，1 μL Dig-ddUTP，1 μL 末端转移酶，8 μL 双蒸水，混匀后 37 ℃反应 30 min，然后放置于冰浴上，加 1 μL 0.5 mol/L EDTA 中止反应。

1.3 筛选克隆

用标记好的寡核苷酸和对虾白斑综合征病毒基因文库克隆杂交。方法如下：在带正电荷的尼龙膜上点 1 μL 的一定浓度的克隆质粒 DNA，UV(254 nm)固定 3 min，预杂交 1 h，预杂交液为 5×SSC，0.1% N-lauroylsarcosine sodium salt (w/v)，0.02% SDS，1%封闭液(blocking reagent)；然后在预杂交液内加入标记好的寡核苷酸探针，53 ℃ 36-48 h；室温 5×SSC 洗涤二次，每次 5 min；2×SSC，0.1%SDS，53 ℃洗涤两次，每次 5 min；1%封闭液孵育 30 min；加入抗地高辛的抗体(buffer Ⅰ 1∶5 000 稀释)，孵育 30 min，buffer Ⅰ清洗两次，每次 15 min；NBT 与 BCIP(10 μL buffer Ⅲ中加入 45 μL 的 75 mg/mL NBT，35 μL 的 50 mg/mL BCIP)显色 1 h 至 16 h 后用 TE 中止反应。(Buffer Ⅰ：100 mmol/L maleic acid，150 mmol/L NaCl，pH 7.5；Buffer Ⅲ：100 mmol/L Tris，100 mmol/L NaCl，pH 9.5；NBT：Nitroblue tetrazolium salt；BCIP：5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)。

1.4 测序与序列分析

核苷酸序列测定由法国 ESGS-group CYBERGENE 完成，序列翻译与分析用网上软件处理，氨基酸序列比较用 FASTA，BLAST 和 CLUSTAL W(1.8)软件处理。

2 结果

用点杂交的方法从对虾白斑综合征病毒的基因库中筛选出一个阳性 *Eco*R Ⅰ克隆，经双向测序得到 707 核苷酸序列，经翻译后它的第二阅读框出现一个编码 235 个氨基酸的开放阅读框，前后无中止子，说明该片段处于一开放阅读框的中间，同时找到了 B 族 DNA 多聚酶的氨基酸保守序列 YGDTDS，但是一个用来设计简并核苷酸的缬氨酸(V)在筛选出的病毒序列中是苏氨酸(T)(图 1)。

所得到序列用 FASTA 和 BLAST 软件与基因库比较，发现该推断的对虾白斑综合征病毒的 DNA 多聚酶氨基酸序列与藻类 DNA 病毒科的几株藻类病毒的 DNA 多聚酶氨基酸序列有部分相似(Fig.2)，其相似程度分别为：OTU3，34%(100 aa)；OTU4，31%(93 aa)；MPV-SP1，34%(85 aa)；MPV-SP2，34% (85 aa)。其中，OTU3，OTU4 为藻类病毒 DNA 多聚酶特异性引物扩增的类藻类病毒核苷酸克隆片段的氨基酸序列，MpV-SP2，MpV-SP1 为单细胞微型鞭毛藻病毒(*Micromonas pusilla* virus)DNA 多聚酶片段[13,14]。我们根据所得的结果而推断该序列为对虾白斑综合征病毒的 DNA 多聚酶基因片段。

3 讨论

用氨基酸保守序列设计寡核苷酸或通过杂交，或通过 PCR 从基因库中来筛选同类基因是分子生物学技术中常用的。设计寡核苷酸的关键首先是寻找相近家族中某些蛋白的保守氨基

维普资讯 http://www.cqvip.com


```
 N   S   M   Y   G   H   L   A   L   R   A   R   S   S   R   F   E   F      18
AAT TCC ATG TAT GGT CAT TTG GCC CTA AGA GCA CGT TCG AGC CGT AAA GAG TTT     54
 A   S   G   S   A   N   T   A   S   S   I   S   N   M   S   A   T   G      36
GCG TCT GGA TCT GCC AAT ACT GCC TCA AGT ATT TCC AAC ATG TCA GCC ACC GGA    108
 G   I   G   G   G   T   R   H   S   V   T   A   N   Q   I   T   E   N      54
GGA ATT GGA GGA GGC ACA AGG CAC TCG GTG ACG GCC AAT CAG ATT ACA GAA AAT    162
 A   R   C   V   F   G   N   I   G   C   G   L   Q   M   A   L   P   G      72
GCT CGA TGT GTA TTT GGC AAT ATT GGT TGT GGA TTA CAG ATG GCT CTT CCT GGT    216
 T   K   Q   T   Y   G   D   T   D   S   V   F   C   V   H   N   I   V      90
ACT AAG CAG ACG TAC GGG GAT ACA GAT TCT GTA TTC TGC GTG CAT AAT ATT GTA    270
 G   D   G   G   M   I   P   E   Y   D   E   Q   T   G   K   Y   Y   Y     108
GGT GAT GGA GGA ATG ATA CCA GAA TAT GAT GAA CAA ACT GGC AAA TAT TAT TAT    324
 V   M   D   I   A   L   K   N   K   M   A   A   I   I   P   I   L   V     126
GTG ATG GAT ATT GCT CTA AAA AAT AAA ATG GCT GCA ATT ATT CCC ATC CTA GTC    378
 N   S   L   T   K   G   I   Q   F   V   E   R   R   D   A   G   V   G     144
AAC TCG TTA ACA AAG GGC ATC CAG TTT GTA GAG CGC CGA GAC GCT GGT GTG GGC    432
 M   M   N   I   A   H   E   R   L   A   V   A   G   L   L   F   A   K     162
ATG ATG AAT ATC GCC CAT GAA CGT CTA GCT GTC GCT GGT CTT TTG TTT GCC AAG    486
 K   T   Y   H   M   L   H   F   N   E   N   S   A   A   F   N   D   M     180
AAA ACA TAC CAT ATG CTT CAC TTT AAT GAA AAT AGT GCA GCG TTC AAT GAC ATG    540
 I   K   L   K   S   T   D   N   N   N   K   F   A   S   F   I   K   R     198
ATA AAA TTG AAA TCA ACC GAT AAC AAT AAT AAG TTT GCA TCC TTT ATC AAG AGA    594
 P   S   H   A   D   G   Y   V   V   P   H   N   P   S   L   I   L   R     216
CCT AGC CAC GCA GAT GGG TAT GTT GTT CCC CAT AAT CCT TCA TTG ATT CTT AGA    648
 A   A   E   G   P   A   G   K   K   L   K   S   F   L   E   E   E   G     234
GCG GCC GAA GGA CCC GCT GGT AAG AAA TTG AAA AGC TTT TTG GAA GAG GAA GGA    702

 I                                                                         235
ATT
```

图1 推断的对虾白斑综合征病毒DNA多聚酶核苷酸序列和氨基酸序列

划线部分为保守区序列

Fig. 1 The putative DNA polymerase sequence

The motif sequence is underlined.

酸序列，然后是寻找氨基酸序列中核苷酸简并程度低的序列。在我们的工作中，我们根据基因文库已有的大量的DNA多聚酶氨基酸序列，筛选出B族DNA多聚酶的保守序列YGDTDS并结合一些病毒的DNA多聚酶保守序列而选择出核苷酸简并程度相对低的序列VYGDTD。在这里，丝氨酸有六个简并核苷酸，缬氨酸有四个简并核苷酸并且是一些病毒的DNA多聚酶特有的。

用转移酶进行3′末端标记时，我们采用了在3′末端加入一个标记核苷酸的方法，这种方法的优点是专一性高，缺点是灵敏度低。因此我们加入过量的探针来弥补它的不足。同时对探针的杂交温度，洗脱条件加以调整，取得了满意的结果。所利用的对虾白斑综合征病毒基因

维普资讯 http://www.cqvip.com

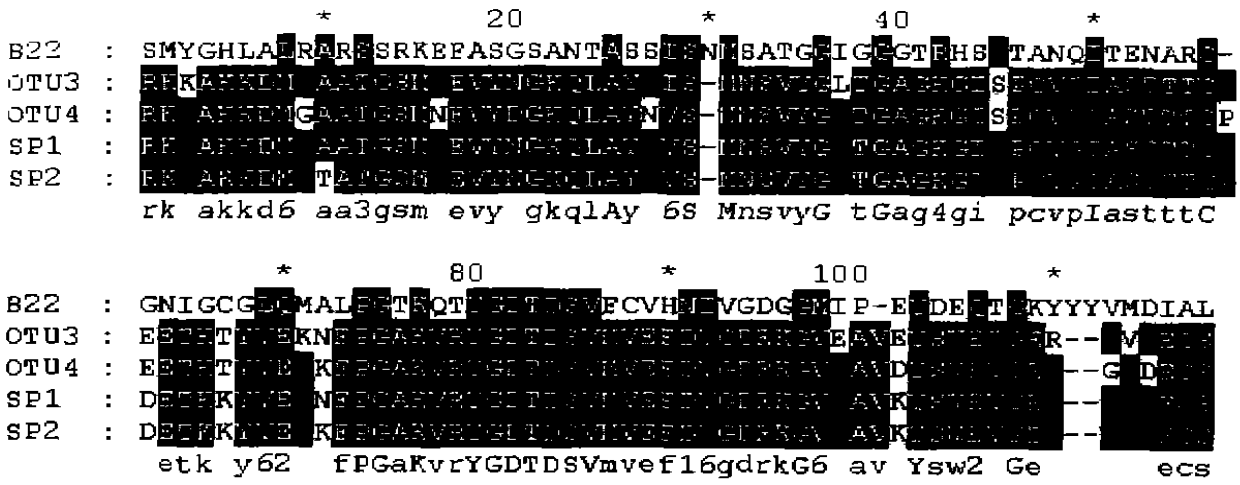

图2　推断的对虾白斑综合征病毒DNA多聚酶氨基酸序列与GenBank比较的结果

OTU3,OUT4为藻类病毒DNA多聚酶特异性引物扩增的类藻类病毒核苷酸克隆片段的氨基酸序列;MpV-SP2,MpV-SP1为单细胞微型鞭毛藻病毒(*Micromonas pusilla* virus)DNA多聚酶片段(Chen & Suttle, 1996, Chen等1996)。黑色为100%相同,深灰色为80%,浅灰色为60%。

Fig.2　Alignment of putative WSSV DNA polymerase sequence with GenBank

OTU4, OTU3 are the sequences amplified from algae-like virus by using algal-virus-specific PCR primers. MpV-SP2, MpV-SP1 are partial DNA polymerase sequences of *Micromonas pusilla* virus (Chen F & Suttle, 1996, Chen *et al*., 1996)。Black represent 100% identity, deep grey 80%, light grey 60%.

库克隆经点杂交证明为病毒的DNA基因组片段,排除了污染宿主DNA的可能性。序列测定采用双向测定,保证了序列的准确性。

在筛选出的病毒片段氨基酸序列中,我们发现B族DNA多聚酶具有的保守序列YGDTDS,该DNA多聚酶保守序列在DNA复制过程中参与结合dNTP,从而推断该片段为对虾白斑综合征病毒的DNA多聚酶。同时在筛选的病毒氨基酸序列中没有用来设计寡核苷酸的一些病毒特有的缬氨酸(V),这个结果说明对虾白斑综合征病毒的DNA多聚酶属于DNA多聚酶B族,但是与其它病毒家族相距较远。

从筛选的对虾白斑综合征病毒DNA多聚酶序列和与GenBank的比较结果知道,对虾白斑综合征病毒的DNA多聚酶氨基酸序列只与新的病毒家族藻类DNA病毒科(Phycodnaviridae)的几株病毒的DNA多聚酶氨基酸序列有部分相似,并且集中在保守序列YGDTDS区域。而与其它病毒科的病毒没有任何有意义的相似序列。根据我们对已有的对虾白斑综合征病毒核苷酸和氨基酸序列的认识,认为对虾白斑综合征病毒的基因组序列与其它病毒的基因相似程度低的特征是正常的,说明对虾白斑综合征病毒是一个新病毒。同时由于该片段只是DNA多聚酶的一部分,其它部分的完成将会给予更完整的证据。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

[1] Bulach DM, Kumar CA, Zaia A, *et al*. Group Ⅱ nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequence [J]. J Invertr Pathol, 1999, 73:59－73

[2] 黄捷,于佳,宋晓玲,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[J].海洋水产研究, 1995, 16(1):11－19

[3] Takahashi Y, Itami, T, Kondo M, *et al*. Electron microscopy evidence of bacilliform virus infection in Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*) [J]. Fish Pathol, 1994, 29:121－125

[4] Wongteerasupaya C, Vickers JE, Sriuairatana S, *et al*. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon* [J]. Dis Aquat Org, 1995, 21:69－77

[5] Wang CH, Lo CF, Leu JH, *et al*. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon* [J]. Dis Aquat Org 1995, 23:239－242

[6] Lo CF, Ho CH, Peng SE, *et al*. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods [J]. Dis Aquat Org, 1996, 27:215－225

[7] Lightner DV. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp [M]. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1996

[8] Durand S, Lightner DV, Redman RM, *et al*. Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV) [J] Dis Aquat Org, 1997, 29:205－211

[9] Durand S. Etude d'une baculovirose (WSS) des crevettes penaeides: caracterisation et construction d'outils de diagnostic [D]. Thesis de doctorat, Université Monpellier Ⅱ. 1997

[10] Murphy F A, Fauquet CM, Bishop DHL, *et al*. Virus taxonomy. Archives of Virology, Springer-Verlag, Vienna, 1995, pp586

[11] 石正丽,黄灿华,陈楙华.中国对虾杆状病毒基因克隆及探针制备与检测[J].中国病毒学, 1998, 13(3):263－267

[12] Ito J & Braithwaite DK. Compilation and alignment of DNA polymerase sequences [J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19 (15):4045－4057

[13] Chen F, Suttle CA, Short SM. Genetic diversity in marine algal virus communities as revealed by sequence analysis of DNA polymerase genes [J] Appl Environ Mocrobiol, 1996, 62(8):2869－2874

[14] Chen F & Suttle CA. Evolutionary relationship among large double-stranded DNA viruses that infect microalgae and other organisms as inferred from DNA polymerase genes [J]. Virology, 1996, 219:170－178

Screening of DNA Polymerase Gene from White Spot Syndrome Virus (WSSV) by Using Degenerated Oligonucleotides

SHI Zheng-li[1,2], Durand Stephanie[2], Bonami Jean-Robert[2]

[1](*Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430071, *China*)

[2](*UMR* 219, *CNRS/IFREMER, UMII, Place E. Bataillon*, 34095 *Montpellier, CEDEX5, France*)

Abstract: Degenerated oligonucleotides were designed from one motif VYGDTDS of several viral DNA polymerases and were labelled with Digoxigenin to screen DNA polymerase gene in a White

维普资讯 http://www.cqvip.com

Spot Syndrome Virus (WSSV) DNA library. One *Eco*R I fragment of 707 bp was selected and contains a putative open reading frame in which the motif YGDTDS of family B of DNA polymerase was found. This selected sequence was subsequently compared with GenBank data. The results showed that this deduced amino acids sequence has some similarities with several algal-like virus of the family Phycodnavirus. So we deduced that this is one DNA polymerase gene fragment of WSSV.

Key words: White Spot Syndrome Virus (WSSV); DNA polymerase

3500种期刊联合征订暨国际互联网网站开通启事

本刊已参加"全国非邮报刊联合征订"并入编《全国非邮发报刊联合征订目录》。该目录编入了70%以上的非邮发报刊,覆盖了自然科学和社会科学的全部领域,分综合版、社科版、科技版和电脑版四种版本出版。电脑版又称"电子订单",供计算机采编用,最好从网上下载。综合版即为社科版、科技版之和,需要者请向全国非邮发报刊联订服务部免费函索,一般读者,科技版、社科版择一提供,去信时务请注明之。

联订服务部在国际互联网上的网站已开通(网址:www.LHZD.com),《联订目录》及本刊均已上网,该网站乃中国期刊的大型超市,集全面展示与统一收订为一体,含3500种期刊。欢迎上网查阅期刊、下载"电子订单"并订阅期刊。

《联订目录》中所列期刊均已全权委托该部收订,所有刊物均不破季订阅。本刊特此通告读者,请直接汇款向该部订阅,不必先索取《联订目录》,只须在汇款单附言栏注明即可。本刊全年订价40元。该部的地址及银行账号如下:

户头全称:联合征订服务部
账　　号:605248-1046196
开户银行:工商行天津市尖山分理处
邮政编码:300220
电　　话:(022)23973378,23962479;传真:23973378
地　　址:天津市陈塘庄岩峰路5号联合征订服务部
网址:www.LHZD.com Email: LHZD@public.tpt.tj.cn

读者也可以通过电话、电子邮件或信函直接与本刊编辑部联系订阅,可破季订,本刊尚有少量历年留存的样本,欢迎选购(单价5.40元/期)

订购款汇寄方式:邮局汇款、信汇(请勿电汇)
收款单位:中国科学院武汉病毒研究所《中国病毒学》编辑部
地址:湖北省武汉市武昌小洪山
开户行:中国建设银行武汉市小洪山分理处　帐号:85493892261014460
邮政编码:430071
电话:(027)87641157　电子邮件:bjb@pentium.whiov.ac.cn