

中国对虾一种 C 型杆状病毒随机 扩增多态性 DNA 分析*

孔 杰 石 拓 刘 萍 韩玲玲[†] 徐怀恕[†] 相建海^{††}

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

[†](青岛海洋大学海洋生命科学学院, 青岛 266003)

^{††}(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 于 1994 和 1995 两年的 7 月从青岛崂山上马镇养虾场中染病的中国对虾中分离纯化出一种 C 型杆状病毒。为建立中国对虾病毒的鉴别和检测技术, 利用随机扩增多态性 DNA 技术对电泳纯化的病毒 DNA 进行分析和研究。将病虾匀浆、经差速离心和蔗糖密度梯度离心纯化获得完整病毒粒子; 从病毒中提取 DNA 后再进行电泳纯化, 收集长度完整、均一的病毒 DNA; 在其他参数保持不变的情况下, 对 Operon 生产的 10 碱基随机引物 K 试剂盒进行扩增试验。结果显示: 1. 病毒 DNA 有两种存在形式; 2. K 试剂盒中有 2 个引物能将病毒 DNA 扩增出长度不同的产物, 其中编号为 OPK-01 的随机引物可产生多态性 DNA 片段; 3. 1995 年中国对虾杆状病毒的 RAPD 分析结果与 1994 年相同, 证实 1994 和 1995 两年度引起中国对虾疾病的病原是同一种杆状病毒。由此可以认为: 随机扩增多态性 DNA 技术能将中国对虾 C 型杆状病毒扩增出多态性 DNA 片段而达到病毒鉴别和诊断的目的。

关键词 中国对虾 杆状病毒 随机扩增多态性 DNA

自 1990 年以来, 随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 技术在种类鉴别、遗传多样性分析等研究领域发展很快。从细菌 (Martin - Kearley et al., 1994)、真菌 (Fujimori et al., 1994)、酵母 (Anzai et al., 1994)、原生动物 (Murphy et al., 1994)、植物 (Grattapaglia et al., 1994)、鱼类 (Johnson et al., 1994) 直到人类 (Williams et al., 1990), 都有用随机扩增多态性 DNA 技术进行遗传鉴定等相关领域的研究报道。对虾病毒学是一门年轻学科, 研究结果多是建立在组织病理的观察和流行病学调查的基础上, 而有关对虾病毒基因组 RAPD 分析的研究尚未见报道。本项研究对分离纯化的中国对虾的一种 C 型杆状病毒基因组 DNA 进行 RAPD 分析, 以期建立对虾杆状病毒鉴别、诊断的新技术。

1 材料和方法

1.1 材料

典型发病症状的中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 分别于 1994 年 7 月和 1995 年 7 月取自

* 国家攀登计划“B”资助项目, PDB6-6-1号。孔杰, 男, 出生于1963年5月, 副研究员。

收稿日期: 1996年11月20日, 接受日期: 1997年2月24日。

青岛崂山上马镇对虾养殖场。*Tag* DNA 聚合酶, 电泳琼脂糖购自美国 Promega 公司; 低熔点琼脂糖, Sigma 公司; 四种脱氧核糖核苷酸, B. M. 公司。DNA 扩增仪, 中国科学院遗传研究所, PCR-90AD。RAPD 随机引物购自美国 Operon 公司生产的 10 碱基 K 试剂盒。随机引物的碱基组成见表 1。

表1 K试剂盒随机引物的碱基序列

Tab.1 Sequences of "Kit K" random primers

引物编码	碱基序列(5' -3')	引物编码	碱基序列(5' -3')
OPK-01	CATTTCGAGCC	OPK-11	AATGCCCCAG
OPK-02	GTCTCCGCAA	OPK-12	TGGCCCTCAG
OPK-03	CCAGCTTAGG	OPK-13	GGTGTACAC
OPK-04	CCGCCAAAC	OPK-14	CCCCTACAC
OPK-05	TCTGTCGAGG	OPK-15	CTCTGCCAA
OPK-06	CACCTTTCCC	OPK-16	GAGCGTCGAA
OPK-07	AGCGAGCAAG	OPK-17	CCCAGCTGTG
OPK-08	GAACACTGGG	OPK-18	CCTAGTCGAG
OPK-09	CCCTACCGAC	OPK-19	CACAGCGGGA
OPK-10	GTGCAACGTG	OPK-20	GTGTCGCGAG

1.2 方法

1.2.1 毒株来源和病毒纯化 去除头胸甲的中国对虾虾头 100 g, 加入 200 ml PPB 缓冲液¹⁾后以 6 000 r/min 的转速匀浆 5 min。匀浆混合液经离心机先进行差速离心, 分别以 3 000 r/min(1 090 g)转速离心 20 min, 6 000 r/min(4 350g)转速离心 30 min; 弃沉淀, 上清液以 10 000 r/min(15 300 g)转速离心 1 h, 沉淀。将沉淀悬浮于 3 倍体积 PPB 中, 铺于 10%—50% 蔗糖梯度上再进行密度梯度离心, 经 BECKMAN L8-80 离心机转子以 25 000 r/min 转速离心 3h, 吸取梯度中的乳白色区带, 用 PPB 充分洗涤后重悬于 PPB 中, 于 -70℃ 保存。

1.2.2 病毒 DNA 的提取与纯化 纯化的病毒悬液经台式高速离心机以 16 000 r/min 转速离心 15 min, 弃上清液, 沉淀加 10 倍体积的 TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L EDTA, pH=8.0) 重悬, 加入十二烷基磺酸钠 (SDS) 和蛋白酶 K 分别至 0.5% (W/V) 和 200 μg / ml, 于 55℃ 消化约 1.5 h, 至溶液澄清透明后经酚 / 仿抽提、酒精沉淀。提取的 DNA 经 0.7% 低熔点琼脂糖电泳、溴化乙锭染色并回收 DNA 主带, 电泳估算回收 DNA 含量, 每个反应取 50—100 ng 经纯化的病毒 DNA 为模板。

1.2.3 RAPD 扩增 反应体积为 25 μl, 其中包括 Tris - HCl, 10 mmol / L, pH = 8.3; KCl, 50 mmol / L; gelatin, 0.001%; dNTP, 200 μmol / L; MgCl₂, 2 mmol / L; 引物, 15 pmol; *Tag* DNA 聚合酶, 2 单位。RAPD 反应参数包括: 94℃, 1 min; 33℃, 1 min; 72℃, 1 min, 共进行 45 个循环。最终在 72℃ 充分延伸 10 min。

1.2.4 RAPD 电泳分析 取 20 μl RAPD 反应混合物, 于 1.5% 琼脂糖上电泳分析。电压为 4 V / cm, 电泳 1.5 h 后用溴化乙锭染色, 紫外灯下观察并摄影。

2 结果

2.1 病毒及病毒 DNA 的纯化结果

电子显微镜观察结果表明, 经过差速离心和密度梯度离心, 从染病的中国对虾组织

1) 黄捷等, 1993, 中国对虾生理无机盐缓冲液的组成研究。

匀浆液中可分离纯化出大量形态完整一致、大小均匀的杆状病毒(孔杰, 1997), 图版 I:1。

纯化的病毒粒子经 SDS 和蛋白酶 K 处理后可释放出病毒基因组 DNA。DNA 经酚:氯仿:氯仿抽提后, 在 0.7% 的低熔点琼脂糖凝胶中, 有 2 条紧挨在一起的电泳带(图版 I:2F, B), 准确分子量尚难确定。2 条带的溴化乙锭荧光强度相近, 表明两者 DNA 含量差别不大。切割下的 2 条电泳带回收后, 经 0.7% 的琼脂糖电泳检验为纯净的、分子量均一的 DNA 分子(图版 I:3A)。

2.2 病毒基因组 DNA 的扩增及 RAPD 指纹图谱

用于 RAPD 分析的 20 个随机引物只有 2 个引物产生扩增产物。其中 OPK-09 的产物只有 4 条电泳带, 产物长度从 500bp 到 1 500bp 不等。OPK-01 则产生 7 条以上的 DNA 电泳带, 产物长度在 400—2 000bp 之间(图版 I:4)。在同等实验条件下, 其余 18 个引物均未观察到扩增的 DNA 片段形成的电泳带。

OPK-09 和 OPK-01 随机引物 RAPD 分析结果显示, 从纯化病毒中提取的两种电泳特征不同的 DNA 高度相似。其中 OPK-09 扩增产物的电泳片段, 无论是数量还是扩增片段的长度, 两种 DNA 所产生的多态性 DNA 片段均相同。OPK-01 对两种 DNA 所产生的电泳图谱比较复杂。扩增片段长度在 400bp 和 1 000bp 之间的图谱无明显差别, 但扩增片段在 1kb 以上的 RAPD 图谱, 两种病毒的 DNA 则不完全相同。其中长度为 2 000bp 的 RAPD 产物, 构成电泳速度稍慢的病毒 DNA 分子的特征图谱。

2.3 1994 年病毒 DNA 和 1995 年病毒 DNA 的 RAPD 扩增结果比较

两年度的病毒 DNA 的 RAPD 结果表明, 从病毒 DNA 电泳中回收的后带和前带均分别相互对应地产生相同的 RAPD 电泳图谱。由此可以推断, 1994 年和 1995 年从染病的中国对虾中分离纯化的 C 型杆状病毒是同一种病毒。

3 讨论与结语

3.1 RAPD 方法学的研究表明, 影响 RAPD 的因素比较多, 如复性温度, 引物、dNTP 和 Mg^{2+} 浓度, 模板 DNA 的数量, 等等(Kernodle et al., 1993); 并且表明, 影响 RAPD 的重要因素之一是模板 DNA 的纯度, 模板 DNA 越纯, 产生多态性 DNA 越具代表性, 实验的可重复性越强。杆状病毒的基因组小, DNA 长度一般在 80—100kb 之间, 因此保证 DNA 的纯度是杆状病毒 RAPD 的先决条件。为此, 在病毒的纯化过程中采用低速匀浆、低速离心等措施, 保证纯化的病毒粒子的完整性。提取的病毒 DNA 又经低熔点琼脂糖电泳分离和回收, 获得长度完整而又均一的中国对虾杆状病毒的 DNA, 使得多批次回收 DNA 的 RAPD 实验结果, 均产生相同的扩增片段的电泳图谱。

3.2 实验结果表明, 无论是 OPK-01 随机引物还是 OPK-09 随机引物, 其所产生的 RAPD 均证实纯化病毒中提取的两条 DNA 电泳带具有很高的同源性。虽然两者的 OPK-01 的 RAPD 不完全相同, 但两者的相似程度很高, 为此可以认为, 从纯化病毒中提取的电泳速度相近的两种 DNA, 均属同一种病毒的基因组 DNA。纯化病毒离子的电镜观察结果, 也支持这个结论, 即纯化的病毒离子无论是大小还是外部形态都基本相同, 是一种病毒。杆状病毒的基因组 DNA 大小在 80—100kb, DNA 的完整性或结构必然影响 RAPD 结果。从病毒 DNA 的电泳情况看, 同一 DNA 分子在电泳中形成运动速度不

同的 DNA 带说明病毒基因组 DNA 分子或者有两种结构, 或者有两种形状(线状和环状), 因此也可能正是这种差别造成病毒基因组 DNA 的 RAPD 的不同。

3.3 对虾病毒的研究始于 1974 年, 由于缺少合适的细胞株繁殖从对虾中分离的病毒, 对虾病毒学的研究进展缓慢, 迄今为止, 只有 *Baculovirus penae* (Bonami et al., 1990.) 得到国际病毒学会的认可。自 1993 年我国中国对虾养殖流行病毒性病害以来, 已有多家研究机构从染病中国对虾中分离纯化出杆状病毒, 研究的核心也集中在病理学和病毒形态学等方面, 而观察结果或测量数据的误差造成了研究结果或结论的差别。本研究表明, RAPD 技术可以将微量的样品扩增, 并且对不同的模板 DNA 产生完全不同的图谱, 因此 RAPD 将成为对虾病毒鉴别和检测重要技术。

参 考 文 献

- 孙 杰等, 1997, 海洋与湖沼, **28**(3): 233—237.
- Anzai, Y. et al., 1994, *J. Antibiot.* (Tokyo), **47**: 183—193.
- Bonami, J. R. et al., 1990, *J. of General Virology*, **71**: 2 647—2 664.
- Fujimori, F. et al., 1994, *J. Antibiot.* (Tokyo), **47**: 173—182.
- Grattapaglia, D. et al., 1994, *Genetics*, **137**: 1 121—1 137.
- Johnson, S. L. et al., 1994, *Genetics*, **19**: 152—156.
- Kernodle, S. P. et al., 1993, *BioTechniques*, **14**(3): 362—364.
- Martin-Kearley, J. et al., 1994, *Can. J. Microbiol.*, **40**: 446—455.
- Murphy, N. B. et al., 1994, *Gene*, **141**: 53—61.
- Williams, J. G. K. et al., 1990, *Nucleic Acids Res.*, **18**: 6 531—6 535.

RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA OF A KIND OF C TYPE BACULOVIRUS PURIFIED FROM *PENAEUS CHINENSIS*

Kong Jie, Shi Tuo, Liu Ping, Han Lingling[†], Xu Huaishu[†], Xiang Jianhai^{††}

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

[†](College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003)

^{††}(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract A kind of type C baculovirus was detected and purified from diseased shrimps, *Penaeus chinensis* collected from Laoshan shrimp farms, Qingdao in July 1994 and 1995. In order to establish the identification and detection technique, randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) was used to analyze the virus DNA extracted from the virus itself.

Morphologically intact baculovirus and nucleocapsids were isolated and purified by different centrifugations of 6 000r / min to 10 000r / min and density gradient

centrifugations on 10%—50% sugrose at 25 000 r / min from cephalothorax homogenate. Viral genomic DNA was extracted from purified virions with a TE buffer (10 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol / L EDTA, pH = 8.0) containing 0.5% (W / V) SDS and 200 μ g / ml proteinase K, at 55 $^{\circ}$ C for 1.5h, followed by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. The DNA was electrophoresed in 0.7% low-melting point agarose gels (Sigma) to recover the main band. The DNA concentration was estimated by electrophoresis.

Ten base random primers of Operon kit K were tested individually under the same experimental conditions. Random amplification of viral DNA was performed in a 25 μ l reaction mixture containing 50—100 ng template DNA, 10 mmol / L Tris-HCl, pH = 8.3, 50 mmol / L KCl, 2 mmol / L MgCl₂, 0.001% gelatin, 200 μ mol / L of each deoxynucleotide triphosphate, 15 pmol of each primer, and 2 units of *Taq* DNA polymerase. The reactions were performed by 45 cycles of 94 $^{\circ}$ C denaturation, 33 $^{\circ}$ C annealing and 72 $^{\circ}$ C polymerization, respectively, for 1 min. A complete extension was done by 72 $^{\circ}$ C for 10 min. An aliquot of 20 μ l of the prepared samples was electrophoresed at 4 V / cm for 1.5 h in a 1.5% agarose gel, followed by staining with ethidium bromide. DNA fragment was visualized and photographed under ultraviolet light.

The results show that : 1) the viral DNA extracted from the baculovirus existed in 2 forms; 2) two random primers in Operon kit K could produce different products in length from viral DNA, and one of which, designated OPK-01 primer, could produce polymorphic and reproducible fingerprint; and 3) RAPD provided the same results for viral DNA. The front and back bands recovered from electrophoresing viral DNA respectively produced similar RAPD fingerprints corresponding to the two separate years. It is concluded that the baculoviruses purified from diseased *P. chinensis* in 1994 and 1995 are the same species. The results of this study indicate that RAPD is a potentially powerful technique for shrimp baculovirus identification and diagnosis because of its polymorphism and reproducibility.

Key words *Penaeus chinensis* Baculovirus RAPD