

核酸斑点杂交分析法检测对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒(HHNBV)*

史成银 宋晓玲 黄 健 杨丛海

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业部海水增养殖病害与生态重点开放实验室 青岛 266071)

提要 于1995年7月在青岛市城阳对虾养殖场采集患暴发性流行病的中国对虾样品,提纯HHNBV并研制了一组地高辛标记的HHNBV核酸探针。采用核酸斑点杂交方法研究了此组核酸探针的灵敏度和特异性。结果表明,此组探针检测HHNBV DNA的灵敏度为62.5pg,对469ng病虾胃中的病毒可以检出;此组探针与3.75 μ g健康对虾组织和2ng健康对虾DNA均无交叉反应。1997年,应用此组特异性核酸探针检测了发病虾池对虾及紧急抢捕虾,检测结果显示为强烈的HHNBV阳性,表明此组核酸探针在对虾杆状病毒的检测、对虾暴发性流行病的诊断和抗特种病原对虾育种等方面具有很高的应用价值。

关键词 中国对虾 核酸探针 斑点杂交 检测 杆状病毒

学科分类号 Q789

从1993年开始的对虾病毒性暴发病是危害对虾养殖的最严重的病害,其病原已查明是皮下及造血组织坏死杆状病毒(Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Baculovirus, HHNBV)(黄健等,1995a)。在养殖生产实践中迫切需要对病原作出快速、准确、简便的诊断。核酸斑点杂交法是通过探针(标记的病毒DNA片断)与病毒DNA进行分子杂交来检测病毒,具有快速、准确、简便易行等特点。本文报告核酸斑点杂交分析法检测HHNBV的实验结果,以期对对虾暴发性流行病的快速诊断和抗特种病原对虾的选育提供一种可靠、实用的方法。

1 材料与方法

1.1 菌株、病毒和对虾

含重组pUC18质粒的*E. coli*菌株C12、C44于1995年由本实验室提供。C12和C44各含有不同的重组pUC18质粒,这些重组质粒含有不同的HHNBV DNA持有序列片断。

HHNBV由本实验室1995年自患病对虾中提取,经负染、电镜观察确认,以常规方法自HHNBV中提纯HHNBV DNA。

病虾于1995年7月采集自青岛市城阳对虾养殖场,冻存于-35 $^{\circ}$ C。经单抗ELISA检测呈HHNBV阳性。取3只病虾的胃部,以SEMP-SSC采样液¹⁾匀浆,离心、取上清液待用。

* 国家“八五”科技攻关项目(95年度加强),85-021-03-06号。史成银,男,出生于1971年10月,硕士,E-mail: aquadis@public.qd.sd.cn

1) 史成银,黄 健,1998.一种新型的核酸探针采样液SEMP-SSC

收稿日期:1998-01-04,收修改稿日期:1998-09-21

健康海捕虾采集于1992年7月,经单抗ELISA检测呈HHNBV阴性。取健康虾的胃部以SEMP-SSC采样液匀浆,离心,取上清液待用。

1.2 含重组pUC质粒的 *E. coli* 的扩增与HHNBV基因组片断的分离提纯

在Terrific肉汤培养基中扩增C12、C44菌株,采用碱裂解、PEG法纯化质粒DNA,分光光度法测其浓度,以限制性内切酶酶切2.5h,取少量酶切产物以0.8%琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果;继续酶切1h后以0.6%琼脂糖凝胶电泳分离切出的插入片断,并将其分离提纯(萨姆布鲁克等,1995)。

1.3 地高辛标记HHNBV DNA 探针的制备及其产量测定

地高辛DNA标记和检测试剂盒由德国宝林曼公司出品(批号:83324821 25)。分别以提纯的C12、C44酶切回收片断作模板,按试剂盒使用说明书以随机引物法标记探针,并测定标记探针产量。

1.4 用制备的HHNBV地高辛探针检测各样品

将各样品分别稀释成如下浓度梯度:HHNBV DNA $0.5\text{ng}/\mu\text{l}$, $6.25 \times 10^{-1}\text{ng}/\mu\text{l}$, $7.81 \times 10^{-2}\text{ng}/\mu\text{l}$;病虾胃匀浆上清液 $3.75 \times 10^1\text{ng}/\mu\text{l}$, $4.69 \times 10^0\text{ng}/\mu\text{l}$, $58.59\text{ng}/\mu\text{l}$;健康虾组织匀浆上清液 $3.75 \times 10^1\text{ng}/\mu\text{l}$, $4.69 \times 10^0\text{ng}/\mu\text{l}$, $58.59\text{ng}/\mu\text{l}$;健康虾DNA $2.0\text{ng}/\mu\text{l}$, $1.0\text{ng}/\mu\text{l}$; $0.5\text{ng}/\mu\text{l}$ 。

将各样品煮沸变性,冰浴2min,每样取 $1\mu\text{l}$ 点样于硝酸纤维素杂交膜上, 80°C 烤膜2h, 65°C 预杂交2h,加入制备的HHNBV地高辛探针($20\text{ng}/\text{ml}$)杂交过夜,洗涤,显色。

1.5 用制备的HHNBV地高辛探针检测发病虾池对虾和紧急抢捕虾

1997年6月,自山东乳山养殖场发病池1号、2号、3号分别采集22尾、10尾、5尾具有典型暴发病症状的病虾头部,以SEMP-SSC采样液保存,充分研磨后取上清液待测。1997年7月,另一养殖池中对虾出现发病预兆,立即实施紧急抢捕。取7尾紧急抢捕虾胃部,以SEMP-SSC采样液保存,充分研磨后取上清液待测,测定方法同1.4。

2 结果

2.1 HHNBV基因组片断的分离提纯

用PEG法纯化扩增的含HHNBV基因组片断的重组质粒DNA后,分别将其100倍和200倍稀释,于260nm和280nm处测其OD值,计算出C12质粒DNA和C44质粒DNA浓度分别为 $3.96\text{mg}/\text{ml}$ 和 $3.35\text{mg}/\text{ml}$, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 分别为1.735和1.701,说明样品纯度很高。以PEG法纯化得到的质粒DNA,其限制性内切酶酶切和电泳结果见图1。

由图1可知,经2.5h的酶切后,C12和C44质粒DNA均已被完全切开,其中C12质粒DNA被切出的小片断介于1018bp和1636bp之间,约为1.3kb;大片断介于2036bp和3054bp之间,约为2.6kb。C44质粒DNA被切出的小片断也介于1018bp和

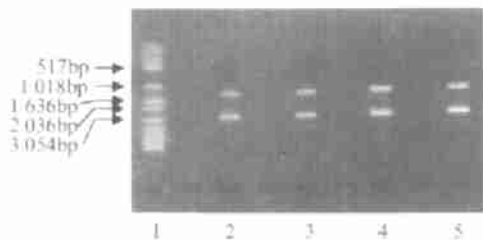


图1 经限制性内切酶酶切后的纯化质粒的电泳图

Fig.1 Electrophoretogram of purified plasmid digested by restriction endonuclease
1:1kb分子量标准(B.M.); 2,3:C12质粒酶切结果;4,5:C44质粒酶切结果

1 636bp 之间,约为 1.2kp; 大片断也介于 2 036bp 和 3 054bp 之间,约为 2.5kb。因此,两个小片断应为 HHNBV DNA 插入片断,而两个大片断应为被切开的 pUC18 载体。以 EB 法测定的回收插入片断的浓度, C12 回收片断为 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$, C44 回收片断为 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

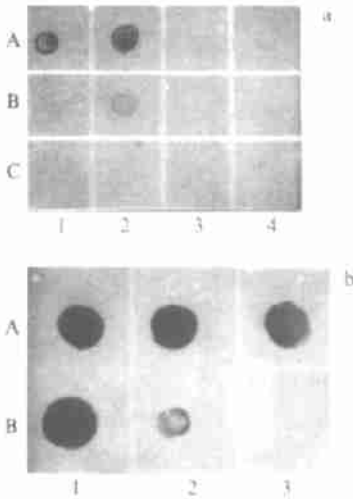


图2 HHNBV DNA探针对各样品(a)、发病虾池对虾和紧急抢捕虾(b)的检测结果

Fig.2 The detection results of specimens (a), diseased shrimps in ponds and urgent harvest shrimps (b) by HHNBV DNA probes.

2.2 地高辛标记 HHNBV DNA 探针的产量

经测定,以 C12 回收片断作模板合成的探针浓度为 45ng/ μl ,以 C44 回收片断作模板合成的探针浓度为 40ng/ μl 。

2.3 用 HHNBV DNA 探针检测各样品的结果

用制备的 HHNBV DNA 地高辛探针检测不同浓度梯度的 HHNBV DNA、病虾胃、健康虾组织、健康虾 DNA 等样品,检测结果见图 2a。图中, A1、B1、C1 为 HHNBV DNA,分别为 0.5ng、62.5pg、7.81pg; A2、B2、C2 为病虾胃匀浆上清液,分别为 3.75 μg 、469ng、58.59ng; A3、B3、C3 为健康虾组织匀浆上清液,分别为 3.75 μg 、469ng、58.59ng; A4、B4、C4 为健康虾 DNA,分别为 2ng、1ng、0.5ng。

由图 2a 可知,采用特异性地高辛探针检测 HHNBV DNA,其检出灵敏度为 62.5pg,可以检出 469ng 病虾胃中的病毒;探针与 3.75 μg 健康虾组织和 2ng 的健康虾 DNA 均无交叉反应。

2.4 对发病虾池对虾和紧急抢捕虾的检测结果

应用地高辛探针检测发病虾池对虾和紧急抢捕虾,结果显示,发病池 1 号、2 号和紧急抢捕池对虾样品的检测结果均呈强烈的阳性,发病虾池 3 号对虾样品检测结果也呈明显的阳性,见图 2b。图中, A1、A2、A3、B1 分别为发病虾池 1 号、2 号、3 号和紧急抢捕池对虾样品的检测结果; B2 为阳性对照 (0.25 ng HHNBV DNA); B3 为阴性对照 (0.5ng 健康对虾 DNA)。

3 讨论

目前,除传统的组织切片观察法之外,还有 T-E 染色法 (黄健等, 1995b)、多抗及单抗 ELISA (于佳等, 1995; 涂小林等, 1995)、PCR (周国瑛等, 1996) 及核酸探针斑点杂交 (Durand *et al.*, 1996)、原位杂交 (Chang *et al.*, 1996) 等方法被应用于检测对虾暴发性流行病原。其中地高辛探针核酸斑点杂交分析法检测对虾病毒操作简便,所需试剂和仪器简单,一次可以对大量样品 (可达上百个) 进行测定,不需提取 DNA,易于推广使用。本文报道的对发病对虾和紧急抢捕虾的检测,较 PCR 检测更为简便。由于易于大量制备标记探针,因此较抗血清检测法更易推广使用。故核酸斑点杂交分析法检测对虾病毒适宜于生产实践上用来诊断对虾暴发性流行病,也可用于抗特定病原 (SPR) 对虾育种。

核酸探针方法检测病毒 DNA,其检测灵敏度较 PCR 方法低。因为核酸探针方法是直接检测存在于病虾体内的相对较低拷贝数的病毒 DNA,而 PCR 方法对病毒 DNA 进行了大量扩增。然而,用常规 PCR 检测病毒 DNA,容易出现假阳性。核酸探针方法的阳性结果

比之更为可靠。

本文报道的 C12、C44 HHNBV DNA 片断,目前作者已经获得了其碱基序列,并根据此序列设计了几对 PCR 引物。在实验室研究中可以用这些引物先对样品进行 PCR 反应,然后再用核酸探针方法进行检测,在不降低检测可靠性的基础上,检测灵敏度会大大提高。另外,有学者应用套式 PCR(Lo *et al*, 1996)检测对虾病毒,也可提高检测的灵敏度和可靠性。

参 考 文 献

于 佳,黄 健,宋晓玲等,1995. 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒单克隆抗体的研制. 海洋水产研究,16(1): 24—29

周国瑛,沈菊英,彭宝珍等,1996. 上海河口地区对虾病毒病原鉴定及 PCR 检测方法的建立. 见:王震纲,刘瑞玉,杨丛海等编,第二届全国人工养殖对虾疾病综合防治和环境管理学术研讨会论文集. 青岛:青岛海洋大学出版社, 1—6

涂小林,钟 江,高双诚等,1995. 中国对虾一种杆状病毒的 ELISA 检测方法. 水产学报,19(4): 315—321

黄 健,宋晓玲,于 佳等,1995a. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死——对虾暴发性流行病的病原和病理学. 海洋水产研究,16(1): 1—7

黄 健,杨丛海,于 佳等,1995b. T-E染色法用于对虾暴发性流行病的现场快速诊断. 海洋科学,1: 29—34

萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T 著,金冬雁,黎孟枫,张 励等译,1995. 分子克隆实验指南(第二版). 北京:科学出版社,24—28, 309—322

Chang Poh-Shing, Chu-Fang Lo, Yu-Chi Wang *et al*, 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. Dis Aquatic Org, 27(2): 131—139

Durand S, Donald V L, Linda M *et al*, 1996. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. Dis Aquatic Org, 27(1): 59—66

Lo Chu-Fang, Ching-Hui Ho, Shao-En Peng *et al*, 1996. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. Dis Aquatic Org, 27(3): 215—225

DETECTION OF HYPODERMAL AND HEMATOPOIETIC NECROSIS BACULOVIRUS (HHNBV) BY DIG-DNA PROBE DOT-BLOT HYBRIDIZATION

SHI Cheng-yin, SONG Xiao-ling, HUANG Jie, YANG Cong-hai

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Marine cultural Disease & Ecology Laboratory, Ministry of Agriculture, Qingdao, 266071)

Abstract Diseased shrimps, *Penaeus chinensis*, were collected during an occurrence of explosive epidemic disease at a shrimp farm of Chengyang, Qingdao in July 1995. The hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus (HHNBV) was isolated from these shrimps. Two different digoxigenin (DIG) labeled DNA probes were constructed. The sensitivity and specificity of these probes were detected by DNA dot-blot hybridization assay. The results show that the sensitivity was

62.5pg to HHNBV DNA; these probes were able to hybridize with 469ng stomach tissues of HHNBV-infected *Penaeus chinensis*, but not with HHNBV-uninfected *P. chinensis* tissues and DNA. These probes were used to detect the shrimps in diseased ponds and an urgent harvest pond in 1997. The detecting results were intensely positive. In contrast to PCR method, DIG DNA probe dot-blot hybridization had less procedures, which only needs simple reagents and apparatus, can detect hundreds specimen at one time, and there is no need to extract DNA from specimen. So it was easy to use. We have made a kind of dot-blot hybridization kit for HHNBV. As probes were easily synthesized the method of DNA probe can spread more easily than anti-serum method. Compared with PCR method, the DNA probe method has a lower sensitivity but higher specificity. The sequences of HHNBV DNA in clone C12 and C44 were known. We have designed several pairs of PCR primers according of these sequences. So we can amplify HHNBV DNA segments in specimen with PCR, then hybridize those products with DNA probe. The sensitivity would highly increase and the specificity remains well. So these DIG labeled DNA probes have a high-applied value in detecting HHNBV, diagnosing explosive epidemic disease and specific pathogen resistant (SPR) shrimp breeding.

Key words *Penaeus chinensis* DNA probe Dot-blot hybridization Detection Baculovirus

Subject classification number Q789

2000 年度《上海水产大学学报》征订启事

《上海水产大学学报》是上海水产大学主办的水产科学技术的学术性刊物。主要反映本校各学科科研成果,促进学术与教学研究的交流与繁荣。主要刊载渔业资源、水产养殖和增殖、水产捕捞、水产品保鲜与综合利用、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器、渔业经济与技术管理以及水产基础研究、水产教学经验等的论文、调查报告、研究简报、综述与评述、简讯等,并酌登学术动态和重要书刊评介等。

本刊为季刊,国内外公开发行人。每期单价 6.00 元,全年共 24 元。国内统一刊号: CN31-5028/S。邮发代号 4-604。读者可在当地邮局订阅,也可直接汇款到编辑部订阅。编辑部地址:上海市军工路 334 号,上海水产大学 38 号信箱。邮编 200090。

联系电话: 65710892

E-mail: zhningk@online.sh.cn 传真: (021)65680965