

# 中国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\*

刘 萍 张 岩 孔 杰

黄 健 王 琼 杨丛海

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

**【摘要】** HHNBV 是 1993 年中国对虾暴发性流行病的主要病原之一。从纯化的病毒中提取 DNA, 用 EcoRI 限制性内切酶酶切成 DNA 片段, 与 PUC18 体外重组, 建立 HHNBV DNA 文库, 从中筛选出三个重组质粒 (5 $\mu$ 、8 $\mu$ 、9 $\mu$ ), 它们所插入的片段大小分别为: 2.8Kb、0.8Kb、1.6Kb, 它们分别用光敏生物素标记成探针, 与感染 HHNBV 的病虾 DNA 呈阳性反应, 以此利用制备的 HHNBV DNA 探针的高敏感性和特异性来检测虾病。

**关键词:** 中国对虾 DNA 探针 HHNBV 斑点杂交

1983 年 Lightener 等报道了 MBV 引起多种对虾的大量死亡<sup>[3]</sup>以来, 已发现 12 种病毒能引起对虾疾病或死亡。HHNBV 是我国发生的对虾暴发性流行病的主要病原, 当务之急是建立起快速诊断系统, 尽早采取预防措施, 隔离病原, 切断传播途径, 这对生产过程中预防病毒病的发生能起决定性作用。因为传统的组织切片, 显微镜观察, 对潜伏期及早期的病毒感染是无能为力的。应用核酸探针技术可以快速、准确地检测对虾的病毒病。

核酸探针技术是近年来发展起来的灵敏度高, 特异性强, 使用方便的检测方法和研究手段。通过对病毒 DNA 片段用放射性同位素或光敏生物素标记, 同病原生物 DNA 进行杂交, 由此来确定病毒传播者或携带者。我们利用 DNA 重组技术构建了 HHNBV DNA 文库, 从中筛选了三个 DNA 片段, 用光敏生物素标记成探针, 检测 1994 年虾样和其它样品, 取得满意结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 纯化的 HHNBV 来自黄海水产研究所虾病研究课题组。

1.1.2 酶及其它试剂 各种限制性内切酶和连接酶, 质粒及检测用试剂盒购至华美公

司和 Promega 公司, 琼脂糖购自 SIGMA。

## 1.2 实验方法

1.2.1 病毒 DNA 片段的获得 纯化的病毒 DNA 是由黄海水产研究所虾病研究组提供, 用过量的 EcoR1 酶切, 37℃ 水浴过夜, 酚: 氯仿 (1:1) 抽提, 然后无水乙醇沉淀, 干燥后用 ddH<sub>2</sub>O 溶解。

1.2.2 DNA 片段与载体 DNA 的体外重组 PUC18 质粒为病毒 DNA 片段的载体, PUC18 质粒同样用 EcoR1 酶切成线性分子, 并去磷酸化, 再与病毒 DNA 片段进行连接, 方法见文献<sup>[1]</sup>。

1.2.3 重组体转入受体细胞 将大肠杆菌 DH5 $\alpha$  按文献<sup>[1]</sup>中的方法制备成感受态。在 200 $\mu$ l 感受态中加入 0.1–1 $\mu$ l 的重组体, 混匀; 水浴 45min; 42℃ 水浴 2min; 迅速置冰水中冷却 2min; 加入 800 $\mu$ l LB 液体培养基, 37℃, 150RPM 振荡 45–60min; 2000g 收集细胞 7min; 涂平板 (含 Amp 平板上涂有 X-gal 和 IPTG) 并在 37℃ 生化培养箱中倒置过夜。

1.2.4 小规模提取质粒 DNA, 进行凝胶电泳 挑取白色菌落, 移植到含 Amp 的固体培养基上 37℃ 培养过夜, 在平板上挑取单菌落, 接种到液体 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养过夜, 按文献<sup>[2]</sup>以碱裂解法进行小规模制备质粒 DNA, 以无插入片段的 PUC18 为对照进行电泳鉴定。

1.2.5 探针的制备 含外源 DNA 的质粒, 可直接用光敏生物素标记成探针, 也可以用限制性内切酶 ECOR1 将插入的片段切下来, 经电泳用低熔点琼脂糖回收外源 DNA, 再标记成探针, 标记方法按马立人的杂交试剂盒使用说明。

1.2.6 斑点杂交 首先将 NC 膜水浸 15min, 20 $\times$  SSC 浸泡 10min, 放到点杂交点样器上; 然后取样品 (待检查样品 DNA) 20 $\mu$ l 加 20 $\mu$ l 0.4N NaOH 处理 5min, 再加入 40 $\mu$ l 20 $\times$  SSC, 混匀后加入点样孔, 真空抽滤。抽毕, 再加 80 $\mu$ l 10 $\times$  SSC 入点样孔, 抽滤完全, 取下 NC 膜, 用 2 $\times$  SSC 稍冲洗, 37℃ 温浴 30min, 80℃ 烘干 1–2h, 杂交方法按马立人的杂交试剂盒使用说明。

## 2 结果

2.1 HHNBV DNA 片段的克隆 HHNBV DNA 经 EcoR1 完全消化后, 与 EcoR1 酶切并去磷酸化的 PUC18 接连, 转染到 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态中, 经“ $\alpha$ ”互补筛选, 小规模制备质粒 DNA, 在 1.2% 琼脂糖电泳分析证明, 含外源 DNA 的质粒电泳速度比 PUC18 的泳动速度要慢, 见图版 I 示 5 $\pi$ 、8 $\pi$ 、9 $\pi$  三个质粒与空质粒的电泳结果。证明含有与病毒 DNA 片段大



图版 I  $\lambda$  DNA 标记 5 $\pi$ 、8 $\pi$ 、9 $\pi$  质粒分子量

1.  $\lambda$  DNA/HindIII 2. PUC18  
3. 5 $\pi$  质粒 4. 8 $\pi$  质粒  
5. 9 $\pi$  质粒

plate I. Molecular weight of 5 $\pi$ , 8 $\pi$  and 9 $\pi$  plasmids

小相应的外源 DNA 片段,见经 DNA 分子量标记:5 $\mu$ 质粒插入片段大小约为 2.8Kb;8 $\mu$ 质粒插入片段大小约为:0.8Kb;9 $\mu$ 质粒插入片段大小约为 1.6Kb。

2.2 斑点杂交 将 5 $\mu$ 、8 $\mu$ 、9 $\mu$ 病毒 DNA 片段标记成探针后,检测了 HHNBV 感染的生物样品,见表 1。

表 1  
Table 1. Dot blot results showing HHNBV infection

| 样品 Specimen | 对照虾<br>DNA<br>probe | HHNBV<br>DNA | 1  | 2  | 3 | 4 |
|-------------|---------------------|--------------|----|----|---|---|
| 5 $\mu$     | —                   | +++          | ++ | ++ | + | + |
| 8 $\mu$     | —                   | +++          | ++ | ++ | + | + |
| 9 $\mu$     | —                   | +++          | +  | ++ | + | + |

1. 寿光 104 号池中杂色蛤 Clams from 104 $\mu$  pond in Shou Guang 2. 即墨大潮后海区蛤蜊部 Wild caught Clams from jimo 3. 即墨发病池对虾 Infected shrimp from jimo 4. 即墨 18 $\mu$ 池蟹类 Crab collected from 18 $\mu$  pond in jimo

### 3 讨论

传染性的暴发性流行病已经严重地影响了我国对虾养殖业的发展,在预防对虾疾病发生的研究中,诊断技术的建立是非常重要的手段,利用核酸探针这一即敏感,又特异的技术,制备出 HHNBV DNA 片段的探针,为诊断病毒病提供了重要的手段。经斑点杂交证明:探针与 HHNBV DNA 杂交为阳性,与虾样 DNA 无交叉反应,与 HHNBV 感染的对虾呈阳性反应。用 5 $\mu$ 、8 $\mu$ 、9 $\mu$ 几个探针,可以用来检测养殖海区各种生物和虾池中各种生物是否是 HHNBV 的携带者和传播者,对于了解 HHNBV 的传播途径,及时断病原,具有一定的意义。

我们在本实验中筛选出了三个克隆,片段大小均不相同,5 $\mu$ 探针最长,大约 2.8Kb 左右,8 $\mu$ 片段最短,大约是 0.8Kb,我们可以根据片段的长短,用于检测的目的不同,因为随着探针长度的增加,特异性也增高。从原则上讲,长短探针在杂交率,敏感性和选择性方面是不同的,探针越长杂交率越高,但探针的高复杂度限制了其杂交率。短探针复杂度低,对杂交率限制较小,在同等条件下,短探针的杂交率相当于长探针几倍—十几倍,虽然如此,但短探针标记率低,也影响了其检测的敏感性,如表 1 中 4 号样。所以,为了增加杂交结果的特异性和稳定性,在同样条件下进行检测时,我们一般选用 5 $\mu$ 质粒探针。

我们在本试验中,所获得的 HHNBV DNA 片段克隆均是 ECOR1 酶切后的结果, PUC18 质粒载体也是 ECOR1 酶切,并经过除 5' 端磷基,防止了质粒自身环化,所以与 HHNBV DNA 片段连接率非常高。目前,只开发出三个克隆,用来检测 HHNBV DNA 感染,尚有许多克隆需进一步开发。从图版 1 中可以看出,第二泳道是 PUC18(分子量为 2.69kb)空质粒的电泳情况,分子量正好介于 2027—3530bp 之间,第三泳道的 5 $\mu$ 质粒的分子量在 4268—4973bp 之间,用 EcoR1 限制性内切酶酶切后电泳,电泳带在空质粒之后,分子量大于 2.69kb,约为 2.8kb 左右(见另文:张岩等,对虾病毒 HHNBV DNA 构

建质粒的研究与分析)。8#和9#的分子量也是根据电泳结果进行推算的,至于确切的数目有待于今后一步的研究。

在虾病检测中,所用的克隆DNA片段探针和质粒DNA探针,杂交结果是一致的,所以,插入质粒中的外源DNA片段可不必酶切回收,而直接标记成探针应用。

### 参 考 文 献

- 1 金冬雁,黎孟枫,等译.分子克隆实验指南,第二版.北京:科学技术出版社
- 2 刘伟民.生物技术,1991,1(2):46
- 3 Diseases of Culeured Penaeid Shrimp in Asia and the United Staqaates Edited Px Wendy Fulks and Kevan L. Main

## THE RESEARCHES AND APPLICATIONS OF HHNBV DNA PROBES IN *PENAEUS CHINENSIS*

Liu Ping Zhang Yan Kong Jie Huang Jie Wang Qing Yang Conghai

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071)

### Abstract

HHNBV is one of the main causative pathezens for shrimp cliseazes occurred in 1993. Virual genomic DNA was extracted from HHNBV purified from infected shrimp. The DNA was digested by ECOR1 and partial DNA fragments were inserted into PUC18 plasmid. From those inserts, 3 recombinants selected and the inserts, 2.8kb, 0.8kb and 1.6kb respectively were labelled by long arm light sensitive biotin and used as DNA probes. In dot blot test, these inserts could hybrid with infected shrimp and not with uninfected shrimps.

**Key words:** *Penaeus chinensis* DNA probe HHNBV Dot Blot