

对虾病毒 HHNBV DNA 构建 质粒的研究与分析

张岩 刘萍 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】 用 PUC18 构建了对虾病毒 HHNBV DNA 重组质粒, 提取后经斑点杂交及酶切分析, 证实质粒中插入片段为病毒 DNA, 其中 05 质粒的插入片段大于 2Kb, 与质粒的分子量相近。对 05 质粒酶切后的 Southern 杂交亦取得了满意的结果。同时, 还对 05 质粒的插入片段进行了内切酶图谱分析, 共进行了 EcoRI、HindIII、Small、PstI、PvuI、HindII6 种限制性内切酶分析, 结果表明, 只有 PstI 在插入片段的一端有一个酶切位点, 酶切位点的确切位置有待于进一步确定。

关键词: 对虾病毒 质粒 内切酶

1993~1994 年全国发生的对虾暴发性流行病, 急需查清病原, 研究防治方法。我们的研究表明, 其病原是一种新的对虾病毒, 皮下及造血组织坏死性杆状病毒(HHNBV)^[1]。

根据病毒的遗传物质(RNA 或 DNA)制备 DNA 病毒检测探针, 是大家公认的特异性较强的检测技术。近十几年来, 随着分子生物学的不断发展和基因工程技术的广泛应用, 基因探针技术在传染病诊断, 流行病学调查, 食品卫生检验, 肿瘤及人类遗传病早期诊断等方面取得了可喜的成绩。目前, 疾病的基因探针技术正在临床医学诊断中得到全力开发和应用, 在水产疾病诊断上的应用也已展开, Bruce L. D. 等于 1993 年利用杆状病毒 DNA 探针进行了 BP 病毒传播途径的研究^[2], 美国 DiagXotics, Inc. 已开发出 IHNV(传染性皮下及造血组织坏死病毒)DNA 探针的实验性原位杂交试剂盒。

对虾病毒 DNA 探针的应用, 首先可以确定病毒的传播途径, 在目前尚无治疗措施的情况下, 确认病毒的携带者与传播者(如苗种、饲料生物等), 是尤其重要的。在此基础上, 根据养殖生产的具体情况, 清除病毒携带者或切断其传播途径, 以此达预防的目的。DNA 探针技术以其灵敏、准确、简便的特点, 将发展成为对虾 HHNBV 病的重要检测手段。

DNA 探针的制备, 需要大量的病毒 DNA 特异性片段, 这些片段的获得是通过将病

毒 DNA 片段连接到质粒载体上,然后转入大肠杆菌中,通过大肠杆菌的克隆及繁殖,达到复制病毒 DNA 的目的,组装后的质粒经复制后,再用内切酶将病毒 DNA 片段切下,经过进一步纯化及标记,就成为针对某种病毒的 DNA 探针,本文主要报道了重组质粒经复制后的 DNA 片段的提取及纯化研究。

1 材料与方法

1.1 重组质粒的构建和筛选

克隆片段为 HHNBV DNA 的 EcoRI 酶切片段,克隆载体为 PUC18 质粒,连接反应见 Sambrook 等的方法^[3]。经过重组的质粒转入 DH1 大肠杆菌中,转化的菌株经 α 互补 (LacZ 基因插入失活) 检验筛选重组克隆,在 LB 平板上划线后挑取单菌落进行质粒的提取及插入外源 DNA (即病毒 DNA 片段) 的纯化和酶切等分析。所用限制性内切酶、连接酶、低熔点琼脂糖等均购自 Promega 公司。

1.2 重组质粒的提取和酶切

提取方法选用碱裂解法^[3]。挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中培养,当其达到指数生长期 (OD_{600} 值约为 4.0) 时,进行质粒的提取,并用 PEG 纯化。提取后的重组质粒 DNA 经 EcoRI 酶切过夜,加 0.5M EDTA (pH8.0),使终浓度达 10mM/L 以终止反应,用 0.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果^[3]。

1.3 病毒 DNA 片段的回收

选用低熔点琼脂糖法及 DEAE 一纤维素膜法两种方法回收^[3]。

1.4 杂交

杂交采用斑点杂交 (Dot blot) 和 Southern 杂交两种方法。探针的标记及杂交方法参考试剂盒说明书。

2 结果与讨论

2.1 质粒的提取和酶切分析

碱裂解法提取的重组质粒 DNA 产量一般为 $3\mu\text{g}/1.5\text{ml}$ 培养液左右。有时由于提取过程中机械损伤等原因,未经酶切的质粒产物经电泳后会出现两条带,其中,前带荧光较强,为环状质粒,后带较弱,是质粒提取过程中断裂的环状 DNA 形成的线状 DNA 链。在质粒的构建时,病毒 DNA 和质粒 DNA 均用 EcoRI 酶切,因此提取的质粒经 EcoRI 酶切后形成分子量不同的两条带 (图 1),其中质粒载体约 2.6Kb,与空质粒 EcoRI 酶切后的电泳带一致,很容易判别,外源插入片段从几百个甚至两千多个碱基不等。

2.2 外源 DNA 片段的确定

为了证明转入的外源 DNA 是病毒 DNA,我们以病毒 DNA 为探针,与各重组质粒进行了斑点杂交,共选出 05 $\#$ 、9 $\#$ 、12 $\#$ 、13 $\#$ 4 个阳性克隆,并对 05 $\#$ 克隆的插入片段进行了酶切后的 Southern 杂交,杂交结果见图 2。为阳性,证明其所含外源 DNA 确为病毒 DNA。对于分子量十分接近空质粒的 05 $\#$ 质粒的插入片段, EcoRI 酶切后又经 PVUI 酶

切再次进行分析。经比较分析,05#质粒的后带为插入片段,前带为质粒DNA。质粒DNA经PVUI酶切后产生分子量不同的三条带,与PUC18产品的内切酶图谱相同,由此也证实了插入片段中没有PVUI酶切位点。

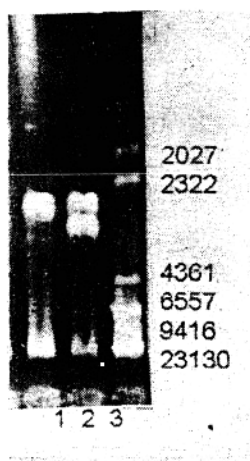


图1 EcoRI酶切后的05#质粒0.5%琼脂糖电泳
Fig. 1. The electrophoresis of 0.5% plasmid
1. 空质粒 1. PUC18 plasmid 2. 酶切后的
05#质粒 2. 05# plasmid restricted
3. λ -DNA/Hind III

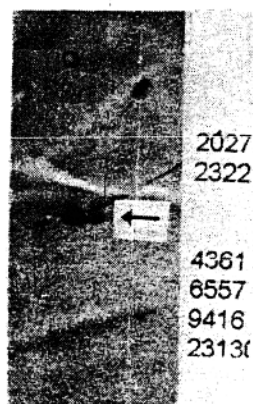


图2 05#质粒酶切后的Southern杂交
fig. 2. Southern blot of restricted 05# plasmid
→示杂交显示色后的电泳带
→the band after hybridization

2.3 内切酶分析

05#质粒插入片段的几种内切酶的分析情况见表1。在所选用的酶中,只有PstI有一个酶切位点,其位置约在插入片段一端的30个碱基对左右。

表1 05#质粒插入片段的几种内切酶分析
Table 1. Restriction map of 05# plasmid

酶	EcoRI	HindIII	Small	PstI	PVUI	Hind II
酶切位点	0	0	0	1	0	0

2.4 讨论

构建的质粒经EcoRI酶切,琼脂糖电泳后,用低熔点琼脂糖法及DEAE-纤维素膜法两种方法进行回收,两种方法的回收率均达50%以上。具体的选择,取决于实验目的。当收集的片段较多,目的DNA量较少时,常用DEAE-纤维素膜法,每次所回收的DNA量一般在100~500ng左右,常用于探针的标记。在目的DNA量较大的情况下,则采用低熔点琼脂糖法,所回收的DNA用于内切酶分析等,其回收量常达几个 μ g,但DEAE—

纤维素膜法方法简便,重复性强,低熔点琼脂糖法操作步骤繁琐,回收产量常受琼脂糖质量及操作水平的影响。我们认为需要特别注意:(1)所用低熔点琼脂糖纯度要高,以减少抑制剂对 DNA 的污染;(2)低熔点琼脂糖的凝固需在 4℃冰箱中进行,这样形成的 DNA 带窄,便于回收;(3)尽量缩小切下的 DNA 条带的体积,以减少 DNA 抑制剂的污染和 DNA 的损失。我们用低熔点琼脂糖法回收的 05# 质粒片段,一次回收量达 4μg 左右。

参 考 文 献

- 1 黄健等,杆状病毒的皮下及造血组织坏死——对虾暴发性流行病病原病理学研究,海洋水产研究,1995,16(1):1—10
- 2 Bruce L. D. et al. Dis. Aquatic. Org. 1993,17:215—221
- 3 J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning A Laboratory Manual 2ed ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

THE CLONE AND STUDY OF THE HHNBV DNA FRAGMENT

Zhang Yan Liu Ping Kong jie Huang jie Wang Qiong Yang Conghai
(Yellow Sea Fishery Research Institut, Qingdao 266071)

Abstract

The recombination clones of HHNBV was constructed using PUC18 Plasmid. The recombination plasmids was analysed with dot blot hybridization and restriction. The result showed that the foreign DNA fragments were parts of HHNBV DNA. The foreign fragments of 05# plasmid was larger than 2kb, similar to the PUC18 plasmid. The southern blot hybridization of the 05# plasmid was also successful. The restriction map of 05# plasmid has been constructed. In six enzymes; EcoRI, HindIII, SmaI, PstI, PvuII and HindII, only PstI has a restriction site near one end. The relative position of this restriction site was not determined yet.

Key words: Virus plasmid restriction enzyme