

对虾一种杆状病毒多角体 蛋白基因的 PCR 扩增

孔 杰 张 岩 刘 萍

黄 捷 梁兴明 杨丛海

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

【摘要】 根据已发表的几种杆状病毒的多角体基因的序列比较与分析, 设计并合成两对 PCR 简并引物 P-60/P740 和 P164/P640, 从纯化的对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒提取 DNA 并进行 PCR 扩增, P-60/P740 的扩增片段较为复杂, 基中 1 条的长度为 800bp 的主带与设计的 DNA 片段长度相近。P164/P640 经优化 PCR 的反应条件后, 成功地扩增出与设计相同的约 480bp DNA 片段。进一步的实验表明, P-60/P740 扩增的分子量为 800bp 的片段可被 P164/P640 引物对扩增, 分子量与预期的相同, 初步研究结果显示, P-60/P740 可用于杆状病毒多角体蛋白全基因的克隆, P164/P640 对于对虾杆状病毒的调查和研究有实际应用价值。

关键词: PCR 多角体蛋白基因 HHNBV 对虾

杆状病毒(Baculoviridae)是十足目的重要病原体, 80 年代中期杆状病毒的分子生物学研究有很大吸引力, 研究的主要目的分两个方面, 其一是利用杆状病毒能引起昆虫流行病的特性, 制作生物杀虫剂的研究, 第二个研究方向是病毒基因载体^[1]。这些方面的研究工作, 特别是多角体蛋白基因序列的测定, 为后来的工作打下基础。1983 年, Lu 等根据多角体蛋白基因的 DNA 序列, 设计了一对简并引物 P35/P36^[2]。这一对引物已成功地扩增 MBV 多角体蛋白基因的一个片段。斑点杂交和序列测定的结果也证实扩增片段的准确性, 为 MBV 的检测打下基础。

1993 年, 我国的养虾业因大面积急性暴发病而遭受巨大损失, 经调查研究, 其主要病原为对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒(hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus, HHNBV)。我们参考 6 种昆虫杆状病毒和 MBV 的多角体蛋白基因的序列, 设计两对 PCR(Polymerase chain reaction)引物 P-60/P740 和 P164/P640。第一对引物之间的序列包括决定多角体蛋白表达水平的调控区和多角体全基因, 主要的目的是用于克

隆杆状病毒多角体蛋白的全基因。第二对专为初步检测用,引物设计在两个相对保守区。以纯化的病毒 DNA 为模板,这两对引物均扩增出与原设计相同长度的 DNA 片段,本文是研究初步结果的报道。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 HHNBV 毒种 实验用毒种是由 1993 年从山东寿光县病虾中纯化所得。

1.1.2 PCR 试剂盒 电泳琼脂糖, ϕ x174/Hea III DNA 标准分子量等分子生物学试剂分别购自华美生物工程公司和美国 PROMEGA 公司。

1.1.3 PCR 仪购自中科院遗传所,型号 PCR-90AD。

1.1.4 设计的 PCR 引物由中科院微生物所合成。

1.2 方法

1.2.1 HHNBV 的分离和纯化 HHNBV 的纯化:去除甲壳和肝胰腺的冰虾头 50g,加入 200ml 1×PPB,于 20000rpm 匀浆 10min,经 7000g 离心 15min,所得液相当于 200000g 离心 2h,取沉淀悬浮于 3 倍体积的 1×PPB 中,7000g 离心 5min,上清铺于蔗糖梯度(20%,30%,40%,50%,60%,W/V)上,100000g 离心 3h,取出梯度中的乳白色区带,再用 1×PPB 稀释 5 倍,270000g 离心 1h,沉淀重悬于 1ml 1×PPB 中,再铺于 NaBr 连续密度梯度($\rho=1.100-1.335\text{g/cm}^3$)上,100000g 离心 3h,分别吸取各带,按上法沉淀区带中的病毒组分,溶于 1×PPB 中 4℃ 保存。

1.2.2 HHNBV DNA 的提取 纯化的病毒悬液,经 100000g 离心,沉淀溶于 10 倍体积的 DNA 抽提液中(10mmol/L Tris, HCL, pH8.0 10mmol/ml EDTA, pH8.0, 20 μ g/ml 胰 RNA 酶, 0.5% SDS, 37℃ 温育 0.5h 后加入蛋白酶 K 至 200 μ g/ml, 50℃ 消化 3h, 其它操作均按经典 DNA 提取方法^[3]。提取的 DNA 以 1 μ g/ μ l 的浓度溶于无菌水中。

1.2.3 HHNBV 多角体蛋白基因片段的 PCR 扩增 依据已发表病毒多角体蛋白的基因序列,设计并合成两对引物, P-60/P740 和 P164/P640。四个引物的序列见表 1。待扩增的长片段,包括多角体蛋白基因及基因上游的高变异区,短片段的引物设计在多角体蛋白基因内的两个相对保守区(图 1)。

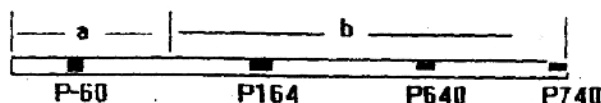


图 1 病毒多角体蛋白基因引物设计

a: 基因上游区 Upstream region b: 多角体蛋白基因 Polyhedrin gene

Fig. 1. Primers designed in polyhedrin gene

表 1 引物碱基(括号中是替代碱基)
Table 1. Primer sequences (in parentheses are substitute bases)

引物 Primers	序列 sequences
P-60	5'-C(TAG)A(TG)A(TCG)A(C)TA(TC)A(T)ATAAGT(G)AT-3'
P740	5'-ATAC(AT)GCC(GT)GGA(GT)CCA(GT)GT(A)G(A)A(T)A-3'
P164	5'-AC(AC)AGTACAT(GA)GTC(GA)C(TC)GA(GA)GATC-3'
P640	5'-ACGTAA(G)ACGAT(G)AGGCC(T)TGTA(G)GAAGT-3'

PCR 反应体积为 50 μ l,其中 Tris-HCl(pH9.0,25 $^{\circ}$ C)50mM,MgCl₂ 1.5mM,4 种脱氧核苷酸混合物 0.2mM/种,各种引物浓度为 50pmol,TaqDNA 聚合酶 1 单位,反应混和液加盖 50 μ l 矿物油后,置 PCR 仪上循环 35 次,P-60 与 P740 循环参数为 94 $^{\circ}$ C,1min;42 $^{\circ}$ C,3min;72 $^{\circ}$ C,2min,P164 与 P640 的循环参数为 94 $^{\circ}$ C,1min,46 $^{\circ}$ C,2min;72 $^{\circ}$ C,1min,吸取 5 μ l 的 PCR 扩增产物于 2% 的琼脂糖凝胶中电泳检查。

2 结果

两对引物均能从纯化的病毒中扩增出原设计长度的 DNA 片段。其中 P-60 和 P740 引物对所产生的带较多,共计有 5 条,2 条主带分别为 1000bp 和 800bp,其中 800bp 的片段为原设计长度。其余 3 条带的分子量都比较小,长度分布在 600~300bp 之间,上述结果在多次 PCR 扩增试验中无变化,并且在对照 PCR 试验中为阴性,即单引物和病毒 DNA,双引物无病毒 DNA 的 PCR 反应中均无扩增条带出现,与 P-60,P740 不同,P164 和 P640 引物对扩增的 DNA 片段为单一的条带,分子量均为 480bp,与原设计吻合,在进行的不同退火温度的实验中,所扩增的带无变化。

在 P164,P640 为引物的 PCR 反应中,分别回收 P-60,P-740 的各条带为模板,长度为 800bp 的 DNA 片段也同样被扩增出分子量为 480bp 的 DNA 片段(图 2),而其它片段为模板的 PCR 反应均无相应的条带出现。因此,PCR 的结果不仅吻合原 PCR 引物设计的长度,同时也符合原设计引物的空间位置。

3 讨论

根据已发表的 7 种杆状病毒的多角体蛋白基因所设计的两对引物,无论是扩增片段的长度,还是引物的位置关系,实验结果均显示 PCR 扩增片段与原设计相符,虽然 P-60/P740 引物对的 PCR 产物较复杂,但其中分子量为 800bp 的主带与原设计相近,并且该产物再经 P164/P640 引物对扩增,结果也与预期相同。P-60/P740 引物的设计目的在于克隆多角体蛋白基因的全基因序列,引物的设计区域,特别是 P-60 的设计区域不是该段 DNA 序列的最保守区,所设计的引物简并程度高,同时,P-60 引碱基组成中 T/A 碱基的比例过大,导致该引物碱基分布的随机性较差及 T_m 值较低。因此,P-60/P740 引物对的 PCR 反应退火温度低(42 $^{\circ}$ C),在 PCR 产物电泳中,除特异性的扩增带外,还有非特异性的扩增带出现,但由于 P-60/P740 能扩增杆状病毒多角体蛋白的全基因及基因

上游区的部分 DNA 片段,因而对该基因的直接克隆及其进一步的研究具有重要意义。与 P-60/P740 引物相反, P164/P640 的设计区域选择在多角体蛋白基因的保守区,所设计的引物优化程度较高,PCR 反应的特异性较强,产物的电泳显示分子量为 480bp 的单一一条带,计算机分析结果表明, P164/P640 引物对碱基组成,引物内与引物间的互补等均较理想,PCR 的结果也显示该引物的可靠程度较高。其次,该对引物是针对多种杆状病毒而设计,可用于检测养殖对虾中的杆状病毒,具有实际应用价值。

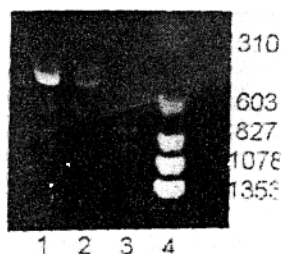


图2 P-60/P740 与 P164/P640 扩增 HHNBV DNA 的 PCR 产物

1. P-60/P740 产生的分子量 800bp DNA 片段为模板,经 P164/P640 再扩增后的 PCR 产物

1. The PCR products amplified by P164/P640 the template was 800bp PCR products produced by P-60/P740

2. P164/P640 扩增病毒基因组 DNA 的 PCR 产物 2. The HHNBV PCR products by P164/P640

3. P-60/P740 扩增病毒基因组 DNA 的 PCR 产物 3. The HHNBV PCR products by P-60/P740

4. 标准分子量 ΦX174/HaeIII 4. Standard DNA marker ΦX174/HaeIII

Fig. 2. Electrophoresis of PCR products amplified by primers P-60/P740 and P164/P640 from HHNBV DNA

参 考 文 献

1. Lu, C. C., Tang K. F. J., Kou G. H., and Chen S. N., 1993. Development of a *Penaeus monodon* type baculovirus (MBV) DNA probe by polymerase chain reaction and sequence analysis. *Journal of Fish diseases* 16
2. Rohrmann, G. F., 1986. Review: Polyhedrin structure. *Journal of General Virology* 67: 1499-1513
3. Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T., 1989 *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 2nd Cold Spring Harbor Laboratory Press