

# 鳊鱼病毒核酸的初步分析

李新辉 吴淑勤 李凯彬 潘厚军 黄志斌 石存斌

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

**摘要** 提取鳊鱼病毒核酸, 分别用 DNase、RNase 和绿豆芽核酸酶处理表明, 该病毒为双链 DNA 病毒, 用带 EcoR I 酶切位点的随机引物扩增病毒核酸, 获得扩增核酸带谱, 经低熔点琼脂糖回收 PCR 产物, 与质粒 pUC19 连接, 获得三个重组子, 已经对两个小插入片段进行了序列分析, 插入序列分别为 369bp 和 450bp。GenBank 检测显示, 尚未有类似的序列报导。

**关键词** 鳊鱼, 病毒, 核酸, 克隆, 序列

## Primary analysis for nucleic acid of *Siniperca chuatsi* virus

Li Xinhui, Wu Shuqin, Li Kaibin, Pan Houjun, Huang Zhibin, Shi Cunbin

(Pearl River Fisheries Research Institute, CAFS, Guangzhou 510380)

**ABSTRACT** The virus nucleic acid was isolated from disease *Siniperca chuatsi*, and extracted with RNase, DNase and Mung bean nuclease respectively. The tests indicated that the virus genome is dsDNA. Part of the genome of *Siniperca chuatsi* virus were successful amplified by random primer (contained the enzyme position of EcoR I). The PCR products were recovered from low melting-temperature agarose and cloned in pUC19 plasmid. Three kinds of recombinant plasmids have been identified with EcoR I. Two kinds of it have been sequenced. There were 369bp and 450bp in size. It was demonstrated that there were not homology sequences against those in GenBank.

**KEYWORDS** *Siniperca chuatsi*, virus, nucleic acid, clone, sequence

1994年以来, 广东省鳊鱼(*Siniperca chuatsi*) 养殖主产区, 每年在5~10月份暴发一种大规模的流行病, 造成严重的经济损失。吴淑勤等<sup>[1]</sup>、李新辉等<sup>[2]</sup>用病原排除方法, 结合流行病学和分子生物学检测外源核酸的方法对病原进行初步研究, 并通过电镜观察, 发现此类病鱼脾脏中存在一种截面直径为150 nm的六角型病毒。从而确定该病的主要病原为病毒, 并将病毒定名为鳊鱼病毒(*Siniperca chuatsi* virus, 简称SCV)。从已知资料中得知, SCV在鱼类中属于大型球状病毒。但根据现有资料, 仍无法对病毒进行分类。为此, 本文进一步对病毒核酸性质进行分析, 并用随机引物方法扩增SCV核酸, 对部分扩增片段进行了克隆及序列分析, 为开展病毒核酸分子生物学研究打下了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 病鱼来源

发病季节从珠江三角洲养殖鳊鱼塘取典型暴发病症状的病鱼。

## 1.2 试剂与仪器

Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、RNase、DNase、绿豆芽核酸酶、T<sub>4</sub>-DNA 连接酶、X-gal、IPTG、载体质粒 pUC19 购自华美生物工程公司。低熔点琼脂糖购自 Sigma 公司。固定引物 d(CCGAATTG-CGG) 和 d(CGGAATTCCG) 购自上海生物工程公司, 用灭菌无离子水配成 60 μmol 备用。其它化学试剂为国产 AR 级。PCR 采用 PE2400 核酸扩增仪。测序仪用 ABI PRISM™ 377DNA Sequencer, Ready Reaction Kit (PERKIN ELMER)、测序引物 R Primer(RV-M) GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG。

## 1.3 病毒核酸提取

病原核酸分离参照李新辉等<sup>[2]</sup>方法。取脾脏组织匀浆, 经分级离心在 20 000~30 000 r/min 区间收集病毒, 用酚、氯仿抽提获得病毒核酸。

## 1.4 DNA 病毒核酸鉴定

利用 RNase 消解 RNA、DNase 消解 DNA 的特性, 将病毒核酸分别用 RNase; DNase 37℃处理 30 分钟, 然后进行琼脂糖凝胶电泳检测; 双链病毒核酸鉴定: 利用绿豆芽酶切割单链核酸的特性, 将病毒核酸用绿豆芽酶 37℃温育, 后用琼脂糖凝胶电泳检测。

## 1.5 PCR 核酸模板制备及病毒核酸扩增

分离的病毒核酸经低熔点琼脂糖电泳进行纯化回收, 用蒸馏水按 10 μg/mL 溶解备用<sup>[3]</sup>。PCR 参照林万明等<sup>[4]</sup>方法稍作修改, 模板 0.5 μL, 引物 0.5 μL, Taq DNA 聚合酶 1.5 u, 4xdNTP 各 20 mM, Mg<sup>2+</sup> 1 mM, 反应体积为 50 μL。反应条件为 95℃预处理 5 min, 后按 94℃ 30 s, 45℃ 30 s, 72℃ 1 min 循环 40 次。最后延伸 7 分钟。

## 1.6 扩增产物克隆

质粒 pUC19 用 EcoR I 酶切备用。PCR 产物经低熔点琼脂糖回收<sup>[3]</sup>。提纯扩增产物用 EcoR I 酶切, 纯化。纯化 PCR 产物与载体 pUC19/EcoR I 按 1:1 混合, 在 10 μL 体积中加入 5 u T<sub>4</sub>-DNA 连接酶, 12℃连接过夜。重组质粒按文献[3]的方法转化大肠杆菌 DH5α。

## 1.7 重组子鉴定及分析

转化质粒经 Amp 抗性和 x-gal/IPTG 培养基平板筛选白色菌落。白色菌落按文献[3]中质粒 DNA 提取方法提取质粒, 用限制性内切酶 EcoR I 酶切, 筛出重组质粒。重组质粒纯化后, 用 ABI PRISM™ 377DNA Sequencer; R Primer(RV-M) GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG 引物进行序列测定。将测定的序列通过 Internet 在 GeneBank 数据库进行同源序列分析。

## 2 结果

用不同的核酸酶处理病毒核酸, 结果如图 1。图中显示鳃鱼病毒核酸对 DNase 敏感, 对 RNase 和绿豆芽酶不敏感。由此, 可确定该病毒为双链 DNA 病毒。用带 EcoR I 酶切位点的引物扩增病毒核酸, 结果如图 2。扩增片段分子量范围在 0.1~2.0 kbp 之间, 其中左边为 10 碱基引物扩增产物, 右边为 12 碱基的引物扩增产物。在相同条件下引物增长, 扩增片段分子量区间增大; 引物缩短, 扩增片段分子量区间变小(图 3)。

本研究用带 EcoR I 酶切位点的固定引物对病毒核酸扩增, 获得理想的扩增片段。重组质粒转化大肠杆菌 DH5α, 经 Amp 和 x-gal/IPTG 筛选, 获得带重组子的白色菌落。经限制性内切酶 EcoR I 酶切, 初步筛出三种不同核酸片段大小的带病毒核酸的重组子。插入片段分子长度约为 0.4 (SCVE369)。

0.5 (SCVE450), 2.0 kbp。二个小程序列测定结果如下(大插入片段仍在分析中):

#### SCVE369

5' ctgtagtaagttgttatttgagtaggggacctattgcaggccccctttatgcccgcggtgattccggcacaaggcggcaatcgccattattcaggcaccggtcgggctcccactggtgaccttgcggcgcagcattaccaccataatagtggttggttggcggggcttgcctttacccttgggtcttcaatcgcaactcttgagggtattgaggaaatccaatgggtgctgttcaactccttaattacctctgatgcgggtcgttggccgttcagagaattgaggatgctccgcaaatctgcgggcttattgctcataataaatctctctatttagggttgggtggtggtgcttagttgccaaagggtgcta3'

#### SCVE450

5' attcttgggtgctcagattcgattccgaatcgattctcaattcaaaagtgattgttaattgagtaaatggaaaggagcactactttcaggctcttaactcccctgaaatgcaacatgaaacctaaactggcacttaagctaaactggcttgggttgaaaggctcactgtctgactcacaagaggaaacgcgggtcagtcattgtgaccgctctgattaaccgctggcttccagctccgcagctcccctccgggtttaagctgttttattgacttttagcbctgattcgaagctgctacgtagctgctgttccacagtcgggagttccagaagaagcgcgcagcaccgtcaatagacagggaacttttatttcttctctgtggcagcaaacacacacgcagccttactaactgttatactgcgccctgagctcagctgcacacttcatggctgactgac3'

将这两段序列分别通过 Internet 在 GenBank 数据库检索<sup>[5]</sup>, 在 tBlastn 数据库中, 按六种可能的翻译阅读框架查找, 尚未找到类似的同源序列。

### 3 讨论

鳊鱼暴发性传染病是严重影响鳊鱼养殖业发展的重要因素。疾病的暴发, 每年导致珠江三角洲养殖主产区损失超过 2 亿元。疾病的暴发除与细菌病<sup>[6]</sup>、水质因素<sup>[7]</sup>有关外, 引起鱼大量死亡最重要的病原是病毒<sup>[1]</sup>。由于该病毒尚未建立敏感的细胞培养体系, 给研究病毒带来极大的不便。为研究病毒, 我们在建立病毒敏感的细胞株的同时, 从核酸入手开展对病毒的研究。为解决生产中出现的问題, 几年来通过检测鳊鱼外源核酸, 结合临床分析手段建立了病毒核酸检测方法, 在防治鳊鱼病发生方面起到一定的作用。但是, 目前的检测手段在灵敏度上尚需改进, 才能更有利于对疾病的预测、预报工作。

PCR 检测是一个发展方向, 为此, 我们开展了病毒核酸的体外扩增工作, 筛选病毒特异性的核酸片段, 为 PCR 检测打基础。由于对鳊鱼病毒的遗传背景尚未知晓, 不可能设计特定引物。本试验用带 EcoR I 酶切位点的随机引物, 获得了病毒基因组的扩增产物。根据 RAPD 原理, 试验中, 复性温度越低引物与模板错配越大。在 36℃复性温度中, 仅获得约 100 bp 的扩增产物。随着复性温度升高, 扩增片段增长, 45℃时获得理想的结果。所以, 控制复性温度是获得理想结果的关键。RAPD 方法扩增核酸片段, 不要求知道扩增对象的核苷酸组成。如果用一般的随机引物扩增将不便于后面对克隆片段的分析。本试验选用带酶切位点的引物, 方便了对扩增片段的克隆、重组子的鉴别及以后的核酸分析工作。

根据 GenBank 数据库查询结果, 目前尚未发现与本文克隆的二段序列接近的同源序列。综合病毒电镜切片显示的颗粒形状、大小、基因组分子量等因素分析, 该病毒与目前已分类的鱼类病毒未见完全一致的资料报导<sup>[8]</sup>, 因此, SCV 极可能是鱼类病毒的一种新类型。通过对病毒核酸分析, 为进一步研究病毒的遗传结构以及研究新的检测手段打下了基础。另外, 通过本研究, 为尚未建立敏感培养细胞研究手段的鱼类病毒病研究开拓出一条新的研究途径。

## 参 考 文 献

- 1 吴淑勤,李新辉,潘厚军等. 鳊鱼暴发性传染病病原研究. 水产学报, 1997, 21(增刊): 56~ 60
- 2 李新辉,吴淑勤,潘厚军等. 一种快速检测鳊鱼病毒方法. 中国水产科学, 1997, 4(5): 112~ 114
- 3 金冬雁,黎孟枫. 分子克隆(第二版). 北京: 科学出版社. 1993, 42~ 69, 322
- 4 林万明,杨瑞馥,黄尚志等. PCR 技术操作和应用指南. 北京: 人民军医出版社. 1995, 8~ 147
- 5 Zhang J H, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 3389~ 3402
- 6 陈昌福,李 静. 翘嘴鳊细菌性败血症病原菌的分离及其致病力的研究. 华中农业大学学报, 1996, 15(4): 370~ 373
- 7 赖子尼,吴淑勤,石存斌等. 气候突变影响池塘水环境因子及诱发鳊鱼疾病的研究. 华南师范大学学报(自然科学版), 1998, (增刊): 64~ 69
- 8 谢天恩. 病毒的分类与命名进展概况. 中国病毒学, 1992, 7(4): 375~ 382

## 中国水产学会简介

中国水产学会是由与水产有关的科技工作者自愿结合的全国性学术团体,具有社会团体法人资格。

中国水产学会举办各种水产学术会议和跨学科、跨行业、形式多样的学术交流活动,以促进水产科学技术的繁荣与发展;致力与国外学术团体和科学工作者之间的友好往来,积极参与国际间的学术交流,促进国际间的合作;组织各种形式的科学普及活动和技术咨询服务,以促进新技术的应用和普及;举办不同规模、不同专业的国际、国内展览会,促进技术与贸易的结合。本会还致力于维护水产科技工作者的合法权益,向政府有关部门反映科技工作者的意见和建议。

中国水产学会下设 16 个专业委员会,有工程师以上会员 15 000 余人,单位会员 50 余个,并与亚洲水产学会、世界水产养殖学会、美洲水产学会、澳大利亚鱼类生物学会、世界观赏鱼联合会及其他一些国际组织建立了友好关系。我会出版刊物有《水产学报》、《海洋渔业》、《淡水渔业》、《科学养鱼》等。我会还不定期组织出版发行国内外学术讨论会的论文集及普及性的科学丛书。我会设有 INFOYU 项目办公室,作为联合国粮农组织渔业信息及技术服务网络的一员,负责国内外渔业信息的收集、处理、汇编与发布,编辑出版《INFOYU 快讯》,为商家提供渔业方面的贸易咨询服务。我会举办各种不同层次、不同类型的培训班、研讨会、进修班,开展继续教育培训,提高科技人员及普通技术人员的专业水平。同时我会还接待各国专家来访讲学、进修。也希望同各国和地区建立继续教育网络,互派专家,相互交流。北京科洋渔业咨询服务公司隶属于中国水产学会。主要开展国内外有关水产技术的咨询、开发、服务,转让,开展技贸结合和观赏鱼进出口服务、水族器材的经营活动。

中国水产学会愿与世界各国朋友交流与合作!



图版 不能抱卵蟹[A×5 000]和正常成熟蟹[B×5 000]卵细胞中卵黄体[Y]和脂滴[L]的比较

Plate Comparison yolk bodies & lipid droplets in the oocytes of normal mature crab(A) and of mature crab that could not spawn (B)

李新辉等:鳊鱼病毒核酸的初步分析



图1 鳊鱼病毒核酸经不同核酸酶处理结果

Fig.1 The result of SCV nucleic acid extracted with enzymes

a. RNase 处理, b. 绿豆芽酶处理  
c. DNase 处理, d. 未处理对照



图2 PCR 扩增 SCV 核酸结果  
Fig.2 The result of amplification SCV DNA with PCR

a. 引物 d(CGGAATTCCG)扩增结果  
b. 引物 d(CCGGAATTCCGG)  
c. DNA 分子量标准(278,365,594,672,771,1167,1972,2799,3681bp)



图3 用 EcoR I 筛选到的带 SCV PCR 扩增片段的重组子

Fig.3 Screen recombinant plasmid with EcoR I  
a, b, c 为带插入片段的重组  
d 为 DNA 分子量标准 (λDNA/Hind III, EcoR I)