

文章编号: 1000- 0615(2000)03- 0263- 04

海捕中国对虾杆状病毒的检测

常青山¹, 包振民¹, 潘洁¹, 王伟继¹, 郭福生², 龚振华²
(1. 青岛海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 农业部动物检疫所, 山东 青岛 266032)

摘要: 以海捕中国对虾为材料, 利用多聚酶链反应(PCR)技术和核酸探针技术, 对从中国对虾杆状病毒核酸随机文库中筛选的 4 个片段(大小分别为 800, 1 100, 1 500, 2 500bp)用地高辛标记作为探针, 进行斑点杂交, 检测对虾杆状病毒。结果表明海捕中国对虾的鳃、中肠、肝胰腺、卵巢等组织检测为阳性, 肌肉组织为阴性。实验表明中国对虾杆状病毒存在垂直传播的可能性。

关键词: 中国对虾; 杆状病毒; 多聚酶链反应技术; 核酸探针; 斑点杂交

中图分类号: S945.4 文献标识码: A

Detection of baculovirus infection in wild-caught *Penaeus chinensis* by PCR and dot blot hybridization

CHANG Qing-shan¹, BAO Zher-min¹, PAN Jie¹, WANG Wei-ji¹, GUO Fu-sheng², GONG Zher-hua²
(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China;
2. National Institute of Animal Quarantine, Ministry of Agriculture, Qingdao 266032, China)

Abstract: Wild-caught *Penaeus chinensis* was detected for baculovirus by Polymerase Chain Reaction(PCR) and dot blot hybridization using DIG-labeled *Penaeus chinensis* Baculovirus (PCBV) fragment of nuclein lengthened 800, 1 100, 1 500 and 2 500bp. Positive reaction was found in gills, hepatopancreas, midgut and ovaries, but muscular tissue was negative. Our results demonstrated that the ovaries of shrimps were infected by the baculovirus that implied the virus may be transmitted vertically from parent to young generation.

Key words: *Penaeus chinensis*; baculovirus; Polymerase Chain Reaction; gene probe; dot-blot hybridization

自 1993 年中国大陆暴发对虾流行病以来, 对虾养殖业损失惨重。现已基本查明此病害的主要病原为一种具囊膜的非包涵体杆状病毒^[1~4]。该病毒病的病理学特点以及病毒粒子的特征等已有许多报道^[5,6]。关于该病毒的传播方式, 较一致的观点认为该病毒主要通过水平传播, 即通过水、饵料和底泥等介质的传播^[7,8]。而该病毒是否能垂直传播至今尚不明了。本文从海捕中国对虾的卵巢中检出杆状病毒, 说明该病毒存在垂直传播的可能性。此外, 以往对该病毒的研究多集中于养殖对虾, 本文报道从海捕中国对虾的不同组织检出杆状病毒, 对进一步研究对虾杆状病毒的传播感染途径有重要参考价值。现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

海捕中国对虾于 1998 年 4 月采集于青岛近海。

收稿日期: 1998- 12- 08

基金项目: 国家攀登计划 B 资助项目(PDB6- 7- 1)

作者简介: 常青山(1970-), 男, 硕士, 中国科学院等离子体物理研究所生物工程博士生。Tel: 0532- 2032059, E-mail: zmbao@ouqd.

中国对虾杆状病毒(PCBV)随机文库 pUC18/PCBV 由农业部动检所郭福生等^[9]构建。

PCR 扩增引物为郭福生等^[9]参照 PCBV 一段 400bp 左右的核苷酸序列两端的碱基序列合成,序列如下:

引物 1: 5' GAA CGC TAA GCG CAA GAA GC 3'

引物 2: 5' GGT GCG TCT GGT GCA AAC TCC 3'

由上海细胞生物学研究所合成。PCR 反应试剂购自华美公司。

DIG 标记试剂盒购自德国 BM 公司。

病虾材料分别于 1994 年、1995 年采自青岛市上马镇对虾养殖场发病虾池, -70℃ 保存。

1.2 方法

1.2.1 感病对虾病毒核酸的提取及纯化

分别取 1994、1995 年采集的病虾 10 只, 去除头胸甲, 将头胸部剪碎, 于 PBS (pH7.2) 缓冲液中匀浆。匀浆液 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 25min, $6\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 25min。然后取上清, 上清液 $13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20min, 沉淀溶于适量 TE 中, 煮沸 3min, $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5min。去除沉淀, 上清用苯酚/氯仿抽提至无蛋白层, 再用氯仿抽提一次。上清用 2 倍体积乙醇沉淀(含 1/10 体积 3MNaAc, pH4.8)。沉淀经 70% 乙醇洗涤, 真空干燥, 溶于 50 μL TE (pH8.0) 中。

1.2.2 海捕中国对虾不同组织病毒核酸的提取及纯化

方法同上(1.2.1)

1.2.3 核酸探针的 DIG 标记

pUC18/PCBV 质粒的提取、EcoRI 酶切, 目的片段的回收等参考文献^[10]。

目的片段的 DIG 标记参照 DIG 标记试剂盒说明书。

1.2.4 海捕中国对虾不同组织的 PCR 检测

PCR 反应体系: 10 (buffer 5 μL , dNTP mixture 5 μL (终浓度各为 0.2mM), TaqDNA 聚合酶 1u, 引物 1 μL + 1 μL (终浓度 1 μM), 模板 1 μL , ddH₂O 36 μL)。循环参数: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 1min, 45℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min, 共 30 个循环, 循环结束 72℃ 延伸 10min。

1.2.5 核酸探针特异性检测

斑点杂交参考 DIG 应用手册进行。主要包括: 20 \times SSC 渗膜 1h, 点样, 80℃ 真空干燥 2h, 37℃ 预杂交 1h, 68℃ 杂交过夜。杂交液(5 \times SSC, Sarysol 0.1%, SDS 0.02%, 封闭液 1.0%)。显色参考 DIG 试剂盒说明书, 1: 10 000 稀释抗体。

1.2.6 海捕中国对虾不同组织杆状病毒的斑点杂交检测

预杂交、杂交及检测同(1.2.5), 点样量皆为 1.5 μL , 4 种探针浓度皆为 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2 结果与分析

2.1 PCR 检测

PCR 检测结果表明, 海捕中国对虾的鳃、肝胰腺、中肠和卵巢等组织中均扩增出一条 400bp 左右的特异带, 而肌肉组织中未有特异带扩增出, 对虾核酸本身亦未有特异带扩出(图 1)。表明所扩增的 400bp 条带为中国对虾杆状病毒核酸的扩增产物, 而非对虾核酸本身扩增而来。这与郭福生等^[9], 朱山等^[11]采用同一对引物对感病对虾所扩增的结果是一致的。肌肉组织检测阴性, 表明中国对虾杆状病毒不感染肌肉组织, 或感染较轻, 超出了 PCR 检测的灵敏度。

2.2 核酸探针的选择

从中国对虾杆状病毒核酸 pUC18/PCBV 随机文库中筛选出大小分别为 900, 1 100, 1 500, 2 500bp 4

个片段,用 DIG 标记,制备探针。酶切结果见图 2。

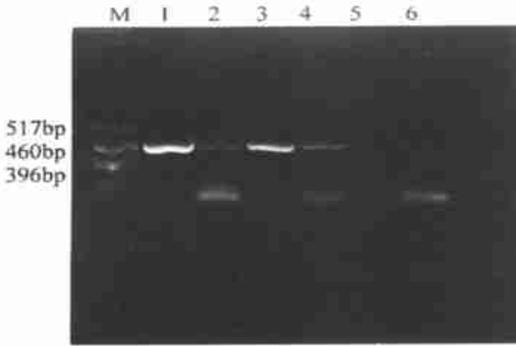


图 1 对虾不同组织 PCR 检测结果

Fig. 1 Detection of different tissues of prawn by PCR

M: 分子量标记, PGE7Zf(+) DNA/HaeIII.

1. 鳃, 2. 肝胰腺, 3. 中肠, 4. 卵巢, 5. 肌肉, 6. 对虾组织核酸

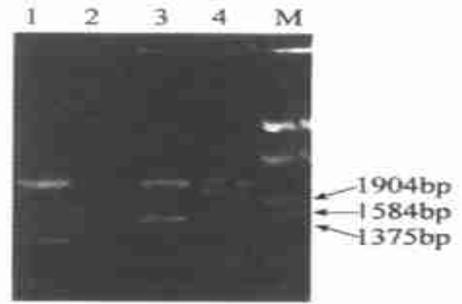


图 2 目的质粒酶切示探针

Fig. 2 Cloned plasmid digested with EcoR I

M: λ DNA EcoR I /Hind III

1: 1 100bp, 2: 900bp, 3: 1 500bp, 4: 2 500bp

2.3 核酸探针特异性检测

4个探针分别与两份感病对虾杂交,均出现很强的杂交信号,而海捕中国对虾肌肉组织检测为阴性,对虾核酸杂交亦呈阴性(图3)。表明4个作为探针的核酸片段均来自杆状病毒本身且有较好的特异性。4个探针检测海捕中国对虾肌肉组织为阴性亦说明了肌肉组织病毒感染较轻,这与2.1的结果是一致的。

2.4 海捕中国对虾不同组织杆状病毒的斑点杂交检测

4个探针(浓度皆为 $5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)分别与对虾的鳃、肝胰腺、中肠和卵巢等组织的斑点杂交皆呈阳性。鳃、肝胰腺、中肠中的杂交信号明显强于卵巢中的杂交信号(图4)。表明卵巢组织中的病毒感染程度较其他3种组织轻。

3 讨论

鉴于对虾病毒病尚未有有效的治疗措施及药物,因此,培养无特定病原体(SPF)种苗,成为控制对虾病毒病暴发的重要措施之一。近年来,美国采用培养无特定病原(SPF)虾,生产不带IHHNV,HPV,BP等病毒,微孢子虫,簇虫,线虫和绦虫等特异性病原体南美白对虾种苗,使对虾产量在不扩大面积的前提下,增加了一倍^[12]。过去,主要是采用海捕虾作为SPF种苗生产的亲虾。本文的检测结果表明,海捕对虾也存在中国对虾杆状病毒的感染,因此,用海捕对虾作亲虾来培育SPF种苗时,也应进行严格的检测。

另外,本文除从海捕中国对虾的鳃、中肠、肝胰腺中检出病毒外,还从对虾的卵巢中检出病毒的存在,从而证明该病毒有可能通过垂直方式传播。目前,对虾杆状病毒的垂直传播问题尚无定论,陈秀南等^[13]在斑节对虾、长毛对虾卵中检测到MBV的存在,感染率为50%~80%,而Fegan等^[14]利用光镜、电镜观察检查了MBV感染的雌虾卵母细胞、成熟的卵及无节幼体,未发现病毒粒子,表明MBV不能通过卵传播,Lu等^[15]利用核酸探针原位杂交技术在斑节对虾肠、肝胰腺中检测到MBV,而在生殖系统中未检测到MBV的存在。对于对虾杆状病毒(BP)的垂直传播问题,Bruce等^[16]应用固定组织原位杂交技术未在生殖系统中检测到BP的存在,认为BP不能垂直传播。而中国对虾杆状病毒的垂直传播问题,研究结果亦不一致。陈细法等^[17]的流行病学研究表明,在感病对虾的生殖腺、卵细胞中未发现病毒,而包振民等^[18]、汝少国等^[19]利用电镜技术均在在对虾的卵巢中检测到杆状病毒的存在。本文的研究结果表

明中国对虾杆状病毒存在垂直传播的可能性。

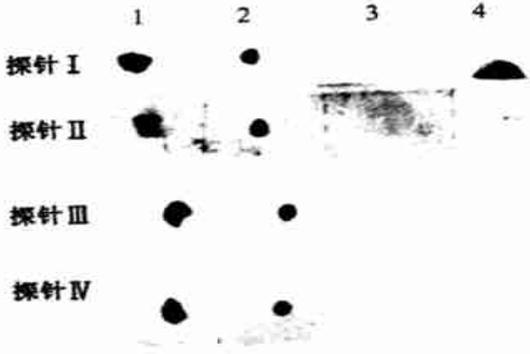


图3 探针特异性检测

Fig. 3 Detection of probes specificity

- 1. 病毒核酸(摘自 1994 年病虾组织),
- 2. 病毒核酸(摘自 1995 年病虾组织),
- 3. 病毒核酸(摘自海捕中国对虾肌肉组织),
- 4. 对虾组织核酸(摘自海捕中国对虾)

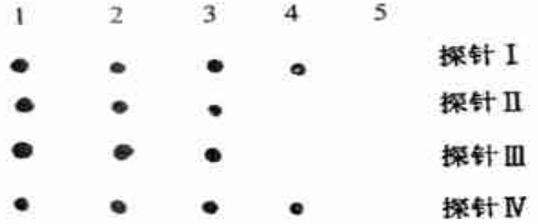


图4 海捕中国对虾不同组织病毒检测

Fig. 4 Detection of different tissues of

- prawn by dot blot hybridization
- 1. 鳃, 2. 肝胰腺, 3. 中肠, 4. 卵巢, 5. 阴性对照

参考文献:

- [1] 王云祥, 李秀梅, 孙金生. 天津地区对虾暴发流行病的病因病理及传播途径的初步研究[J]. 海洋科学, 1994, (6): 1~ 5.
- [2] 张立人, 张建红, 陈棣华等. 东方对虾杆状病毒在宿主细胞内的装配[J]. 电子显微学报, 1994, (5): 354.
- [3] 彭宝珍, 任家鸣, 沈菊英等. 急性致死性对虾病的杆状病毒病原研究[J]. 病毒学报, 1995, 11(2): 151~ 157.
- [4] 黄, 蔡生力, 宋晓玲等. 对虾暴发性流行病原的人工感染研究[J]. 海洋水产研究, 1995a, 16(1): 55~ 62.
- [5] 国际翔, 王丽霞, 李文清等. 对虾杆状病毒感染宿主细胞的超微结构观察[J]. 海洋科学, 1994, (6): 38~ 42.
- [6] 孔杰, 石拓, 刘平等. 中国对虾一种C型杆状病毒的纯化技术及形态特征研究[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(3): 233~ 237.
- [7] 黄, 蔡生力, 宋晓玲等. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死一对虾暴发性流行病的病因和病理学[J]. 海洋水产研究, 1995b, 16(1): 1~ 10.
- [8] 吴友吕, 王方国, 陈金震. 脊尾白虾杆状病毒病研究[J]. 水产科技情报, 1995, 22(1): 8~ 9.
- [9] 郭福生, 朱山, 吴时友等. 用PCR检测对虾的杆状病毒[J]. 动物检疫, 1994, 11(6): 4~ 6.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M] (2nd ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 16~ 34.
- [11] 朱山, 郭福生, 陆承平等. 用聚合酶链反应和酶联免疫吸附试验检测无包涵体对虾病毒[J]. 南京农业大学学报, 1998, 21(2): 86~ 91.
- [12] 相建海, 吴长功. 海洋生物技术的应用及前景[J]. 科技前沿与学术评论, 1998, 20(4): 67~ 71.
- [13] 陈秀南. 养虾全集[M]. 台湾: 养殖世界杂志社, 1990. 72~ 81.
- [14] Fegan D F, Flegel T W, Siurairatana S, et al. The occurrence, development and histopathology of monodon baculovirus in *Penaeus monodon* in Southern Thailand[J]. Aquatec, 1991, 96: 205~ 217.
- [15] Lu C C, Tang K F J, Chen S N, et al. Detection of *Penaeus monodon* type baculovirus (MBV) infection in *Penaeus monodon* Fabricius by in situ hybridization[J]. J Fish Disease, 1995, 18: 337~ 345.
- [16] Bruce L D, Redman R M, Lightner D V, et al. Application of gene probe to the detection of a fanged organs of a penaeid shrimp baculovirus using in situ hybridization[J]. Aquatec, 1994, 120: 45~ 51.
- [17] 陈细法, 吴定虎, 黄槐等. 养殖对虾一种病毒的超微结构特点[J]. 电子显微学报, 1994, 13(5): 357.
- [18] 包振民, 胡景杰, 姜明等. 杆状病毒感染越冬亲虾的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1997, 27(3): 347~ 351.
- [19] 汝少国, 姜明, 李永祺等. 中国对虾杆状病毒垂直传播途径的初步探讨[J]. 水产学报, 1998, 22(1): 47~ 53.