

文章编号: 1000- 0615(2001)01- 0043- 04

鳊鱼病毒 PCR 诊断方法的建立

李新辉, 吴淑勤, 李凯彬, 白俊杰, 潘厚军, 罗建仁, 简清
(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510380)

摘要: 从 RAPD 扩增的鳊鱼病毒(SCV)核酸电泳带中回收了二个片断, 克隆子 pUC19 质粒(称为 SCVE369 和 SCVE450)。序列分析表明插入片段分别为 369bp 和 450bp 与 GenBank 序列没有显著的同源。根据克隆序列设计两对引物 P₁/P₂ 和 P₃/P₄, 在健康鳊鱼、病鳊以及提纯的 SCV 核酸中进行 PCR 试验。结果表明, P₁/P₂ 组引物在 SCV 基因组中扩增出特异性核酸片段, 可作为鳊鱼病毒 PCR 诊断, 检测片段为 369bp。

关键词: 鳊; 鳊鱼病毒; 多聚酶链反应; 快速诊断

中图分类号: S94 文献标识码: A

Polymerase chain reaction (PCR) amplification on diagnosis of *Siniperca chuatsi* virus disease

LI Xir hui, WU Shu-qin, LI Kai-bin, BAI Jur-jie, PAN Hou-jun, LUO Jian-ren, JIAN Qing
(Pearl River Fishery Research Institute, CAFS, Guangzhou 510380, China)

Abstract: Two RAPD fragments of *Siniperca chuatsi* virus (SCV) genome DNA recovered from agrose gel were inserted into plasmid pUC19 (called SCVE369 and SCVE450). The sequences reported the length of cloned fragments were 369bp and 450bp. It doesn't show significant homology sequences against to those in GenBank. According those sequence two oligonucleotide primersets (P₁/P₂ and P₃/P₄) were designed and used to amplify genome DNA of SCV by the method of Polymerase Chain Reaction (PCR). The results showed primer (P₁/P₂) could specially amplify 369bp in size's fragment in SCV genome. Furthermore, this primer set was used to test the DNA samples including the normal mandarin fish, cultured fish naturally infected with SCV and the fish artificially infected by SCV. The 369bp in size PCR product was only obtained in the mandarin fish carried SCV. Primer (P₁/P₂) can been used to diagnose SCV disease of mandarin fish.

Key words: *Siniperca chuatsi*; *Siniperca chuatsi* virus; polymerase chain reaction(PCR); rapid diagnosis

1994 年以来, 广东省是鳊(*Siniperca chuatsi*) 的养殖主产区, 每年在 5 月~ 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^[1]、李新辉等^[2]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 的六角型球状病毒。从而确定该病的主要病原为病毒, 并首先将病毒定名为鳊鱼病毒(*Siniperca chuatsi* virus, SCV)。从已知资料中得知, SCV 为双链 DNA 病毒, 并进行了部分病毒核酸序列分析^[3]。根据 GenBank 数据库查询结果, 目前尚未发现与本实验室克隆的二段序列接近的同源序列。综合病毒电

收稿日期: 2000 04 06

资助项目: 农业部和广东省科委以及广东省自然科学基金资助(980907)

第一作者: 李新辉(1964), 男, 广东兴宁人, 副研究员, 主要从事分子生物学和鱼类病害防治研究。E-mail: lxhui01@163.net

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^[4],因此,SCV极可能是鱼类病毒的一种新类型。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,才能更好地应用于对疾病的预测、预报工作。为此,我们在SCV核酸克隆、DNA序列分析基础上设计PCR引物,进行鳊鱼病毒PCR诊断研究。

1 材料和方法

1.1 试验鱼来源

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。

健康鱼来源:健康鱼来自湖南省汨罗江野生鳊。

1.2 试剂与仪器

Taq DNA聚合酶、dNTP购自上海生物工程公司;DNase、RNase为华美生物工程公司产品;低熔点琼脂糖购自Sigma公司。其它化学试剂为国产AR级。PCR采用PE2400核酸扩增仪。

1.3 病毒核酸提取

病原核酸分离参照李新辉等^[2]方法。取脾脏组织匀浆,经DNase、RNase处理后,分级离心在10 000~20 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 区间收集病毒,用酚、氯仿抽提获得病毒核酸。

1.4 人工病鱼感染

体重200g的健康鱼,每尾注射1.3提取的病毒悬液(1:10稀释)0.5mL,于水池中喂养,使鱼人工感染病毒。

1.5 鳊DNA提取

总DNA提取参照文献^[5]并稍作修改。取鱼肝脏,按1:10(w/v)加入TE缓冲液,剪碎后用玻璃器匀浆。匀浆液用保和酚缓慢抽提,于6 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心。上清液用保和酚再抽提一次,后用1:1保和酚/氯仿、氯仿各抽提一次。用二倍体积的乙醇沉降核酸。

1.6 PCR引物的设计

根据SCVE369克隆序列分析结果(GenBank_Ac ce AZ014999)^[3],5'引物P₁(5' ctgtagtaagttgtattg 3')由SCV369克隆子5'端第1~25bp区域设计;引物P₂(5' tagcaccttggaactaagccac 3')根据SCVE369克隆子5'端第345~369bp区域设计(图1)。5'引物P₃(5' ctgaattctggtgtcagcattgatcc 3')根据克隆子SCVE450(GenBank_Ac ce AZ015000)5'端第1~25bp区域设计,5'端添加了克隆用的EcoR I酶切位点;引物P₄(5' atggatcgcgtcagtcagccatgaagtgtgcag 3')根据克隆子SCVE4505'端第427~450bp区域设计,在5'端添加了克隆用的BamH I酶切位点(图2)。

1.7 PCR反应试验

分离的核酸分别用蒸馏水按10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶解作为模板备用。PCR参照林万明等^[6]的方法稍作修改,模板0.5 μL ,引物0.5 μL ,Taq DNA聚合酶1.5U、4xdNTP各20mmol $\cdot\text{L}^{-1}$,Mg²⁺1mmol $\cdot\text{L}^{-1}$,反应体积为50 μL 。反应条件为95 $^{\circ}\text{C}$ 预处理5min,后按94 $^{\circ}\text{C}$ 30s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1min循环25次。最后延伸7min。PCR结果电泳及分析。

```

5' ctgtagtaagttgttatttgagtaggggccc
tattgcaggccccctttatgcccgggtga
ttccggcaagggcggaategcacattatc
aggcaatggctcgggctcccaatggtagc
ttgcggcgccagcattaccaccataatagtg
gctgggtgttttgcgggggcttgcctttt
accttggcttcaatgcacactcttgagggtt
atlgaggaatccaatgggtgctgttcaactc
cttaattacctctgatgcccgtcttggtcc
gttcagagaatlgaggatgctccgcaatc
tgcgggcttattgctcataataatctctc
tatttaggtttgtgtggttagttgccca
aagggtgcta3'

```

图 1 鳜鱼病毒核酸 SCVE369 序列

Fig.1 The nsequence of SCVE369

注: 黑体部分为引物 P₁/P₂ 配对区域

```

5' attcttgggtcaacgattccgaatc
gattctcaattcaaaagtgattgttaattga
gtaaaggaaggaggcaactcttcaggct
cttactccctgaaatgcaacatgaaacct
actggcaactaaagctaacctgttctgttga
gtcactgtctgactcacaagaggaaacgcg
gtcagtcagtgtgaccgctctgattaccggtg
cttccagctccgcaagctccccctccgggtt
taagctgttttattgactttagcctgattcg
aagctgctacgtagctgctgttcacagtcgg
gagttccagaagacggcgagcaccgtcaca
tagacagggaactttttattcttctctgtgg
cagcaaacacaacacgcagccttcaactaac
tgtttatactgcgcccctgagctcagctgcaca
cttcatggctgactgac3'

```

图 2 鳜鱼病毒核酸 SCV E450 序列

Fig.2 The sequences of SCV 450

注: 黑体部分为引物 P₃/P₄ 配对区域

2 结果

质粒 SCVE369 和 SCVE450 来自本实验室。这两个质粒是由 SCV 核酸经随机引物扩增产生的片段, 插入 pUC19 载体的 EcoR I 位点。序列分析结果表明, 插入片段大小为 369bp 和 450bp(图 3)。

图 4 示以鳜鱼病毒核酸、鳜鱼核 DNA 为模板, 引物 P₁/P₂ 和引物 P₃/P₄ 扩增的结果。图 5 示以 P₁/P₂ 为引物, 健康鱼核酸、人工感染病毒鱼核酸、暴发病鳜鱼核酸为模板的试验结果。

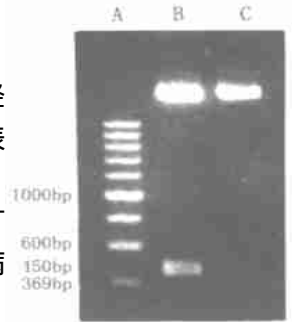


图 3 两个克隆的 PCR 片段

Fig.3 The cloned fragments of SCV PCR productions

注: a 为 DNA 分子量标准; b 为插入片段分子长度 450bp; c 为插入片段分子长度约为 369bp

3 讨论

鳜的爆发性传染病是严重影响鳜养殖发展的重要制约因素。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^[7]、水质因素^[8]有关外, 引起鱼大量死亡最重要的病原是病毒^[1]。根据张奇亚和李正秋^[9]的报导, 病毒出现的种类还有增多的趋势。生产上, 鱼病毒病的暴发尚未有针对性治疗药物。目前, 解决病毒病最有效的办法是采取预防措施, 而实施这一措施最重要的环节是对疾病实行预测、预报。李新辉等^[2]通过检测鳜鱼外源核酸, 结合临床分析手段建立了病毒核酸检测方法, 在防治鳜鱼病发生方面起到一定的作用。但是, 检测手段在灵敏度上尚需改进。

PCR 检测是一个发展方向, 水产动物病毒病检测已经得到发展, 如虾类的杆状病毒病^[10]、斑点叉尾的疱疹病毒病^[11]、鲷科鱼类的虹彩病毒病^[12]等。我国在上述病毒病 PCR 检测方面开展了类似的工作。鳜鱼病毒是本实验室首先发现的病毒^[1], 尽管分类方面的工作仍有待进一步深入, 但建立该病毒的快速、准确的检测技术无论在生产上和理论上均具有重要意义。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。在克隆的二个鳜鱼病毒核酸片段中, 进行序列分析, 并在 GenBank 数据库查询, 未发现与所克隆的二段序列接近的同源序列^[3, 13]。根据这些序列设计了两对引物, 它们对应的核酸分子量为 P₁/P₂- 369 bp; P₃/P₄- 450 bp。应用这两对引物进行 PCR 扩增试验, P₁/P₂引物总能够在以鳜鱼病毒核酸为模板的反应中扩增出单一的 369 bp 片段, 与鳜鱼核 DNA 样品为

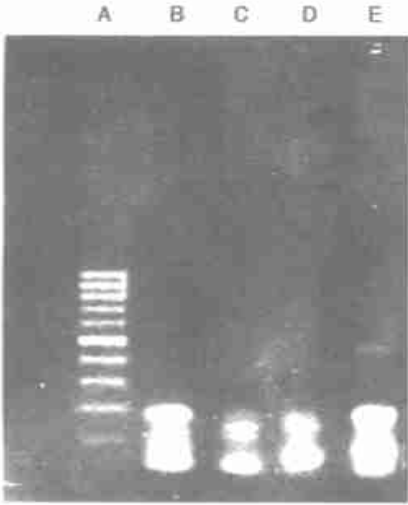


图4 引物 P₁/P₂ 和引物 P₃/P₄ 扩增的结果

Fig. 4 The differences between mandarin fish nuclei DNA and SCV DNA in PCR using primer P₁/P₂ and P₃/P₄

A. DNA 分子量标准(200bp Ladder); B. SCV 模板;

C. 鳊鱼核 DNA 模板用引物 P₁/P₂ 扩增的结果;

D. SCV 模板; E. 鳊鱼核 DNA 模板用引物 P₃/P₄ 扩增的结果

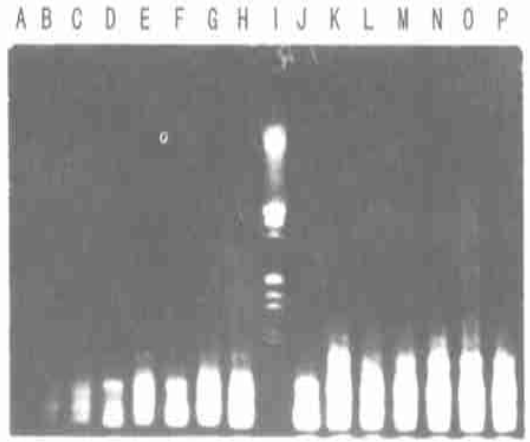


图5 以 P₁/P₂ 为引物扩增不同 DNA 模板的结果

Fig. 5 The PCR results using primer P₁/P₂ to

amplification different DNA templates

A, B. 健康鱼; C- H. 人工感染病毒鱼;

K- P. 暴发病鳊鱼总 DNA;

I. DNA 标准 *M* Hind III; J. 鳊鱼病毒核酸

模板的扩增结果不同。这表明,在 SCV 基因组中 369bp 核酸片段是一个单拷贝序列,也是 SCV 特异性序列,与 GenBank 数据库查询结果相吻合。因此,认为 P₁/P₂ 引物扩增出单一的 369bp 片段可以作出 SCV 存在的结论。P₁/P₂ 引物 PCR 试验中,使用的模板包括提纯的鳊鱼病毒核酸、克隆鳊鱼病毒核酸片段的二个质粒、健康鱼和感染病毒鱼的核酸。试验结果全部与试验设计相符。使用引物 P₃/P₄ 进行 PCR 试验,未获得试验预期的试验结果,这除与试验尚未对 PCR 条件进行优化外,与引物设计时两端添加了额外的核苷酸有关,相关试验有待进一步实行。

珠江水产研究所育种中心谢骏先生为本工作提供部分实验鱼,在此表示感谢!

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[J]. 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[J]. 中国水产科学, 1997, 4(5): 112- 114.
- [3] 李新辉, 吴淑勤, 李凯彬, 等. 鳊鱼病毒核酸初步分析[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 165- 169.
- [4] 谢天恩. 病毒的分类与命名进展概况[J]. 中国病毒学, 1992, 7(4): 375- 382.
- [5] 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1993. 456- 468.
- [6] 林万明, 杨瑞馥, 黄尚志, 等. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 1995. 8- 147.
- [7] 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[J]. 华中农业大学学报, 1996, 15(4): 370- 373.
- [8] 赖子尼, 吴淑勤, 石存斌, 等. 气候突变影响藻相水色及其与鳊鱼疾发生的关系研究[J]. 华南师范大学学报(增刊), 1998, 64- 69.
- [9] 张奇亚, 李正秋. 在患病鳊鱼组织中观察到 3 种病毒[J]. 科学通报, 1999, 44(2): 192- 195.
- [10] Minoru M, Toshiaki I, Atsushi F, et al. Detection of Penaeid Rod shaped DNA Virus (PRDV) in Wild-caught Shrimp and Other Crustaceans [J]. Fish Pathology, 1998, 33(4): 373- 380.
- [11] Gray W L, Williams R J, Griffin B R. Detection of channel catfish virus DNA in acutely infected channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), using the polymerase chain reaction[J]. J Fish Diseases, 1999, 22: 111- 116.
- [12] Jun K, Kazuhiro N, Ikuo H, et al. Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification of DNA of Red Sea Bream Iridovirus (RSIV) [J]. Fish Pathology, 1998, 33(1), 17- 23.
- [13] Zhang J H, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSF BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 3389- 3402.