

斑节对虾白斑综合症病毒部分基因组文库及核酸探针检测法

邓敏 何建国 吕玲 左涛
(中山大学生命科学学院寄生虫室, 广州 510275)

龙肇新
(中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

陈兆明
(香港大学动物学系)

摘要 通过分离纯化白斑综合症病毒(WSSV)粒子, 抽提病毒 DNA, 用限制性内切酶 EcoRI 或 Sal I 酶切后, 克隆入质粒 pBluescript II KS 中, 从而建立了 WSSV 部分基因组文库。估计 WSSV 基因组 DNA 在 165kb 以上。将 WSSV EcoRI 克隆片段标记制备为探针, 进行 Southern 杂交、打点杂交和原位杂交, 其结果证明了克隆片段对 WSSV 特异, 并为检测 WSSV 提供了方法。通过对部分基因组文库序列分析发现, WSSV 核酸序列与已知杆状病毒核酸序列的同源性低, 与 GenBank 中已有病毒核酸序列比较都无较大同源性, 说明 WSSV 不属于杆状病毒科, 目前只能列为未分类的无脊椎动物病毒, 其分类地位尚需更多证据方能确定。

关键词 斑节对虾, 白斑综合症病毒, 核酸探针, 检测方法

Partial cloning of the genome library of white spot syndrome virus from *Penaeus monodon* and DNA probe detection methods

Deng Min, He Jianguo, Lv Ling, Zuo Tao
(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Long Qinxin
(State Key Laboratory of Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Chan S M
(Department of Zoology, Hongkong University)

ABSTRACT White spot syndrome virus(WSSV), a non-enveloped virus which is the causative agent of a disease caused high shrimp mortalities and severe damage to shrimp cultures, was isolated and purified. Virions are rod-shaped, enveloped, 430nm × 120nm in size, with a tail-like appendage at one extremity. Nucleocapsids are 300nm × 85nm in size, and are composed of rings of subunits in a stacked series. The genome of the virus is a double-stranded DNA molecule. The full length of the DNA is estimated to be longer than 165kb. EcoRI or Sal I restriction fragments obtained after agarose gel electrophoreses were cloned in the system pBluescript II KS-XL1-blue. Southern hybridization, dot blot hybridization and in situ hybridization were performed using the WSSV EcoRI clone fragments as probe, and those proved that these clone fragments are specific to WSSV. According to the results of nucleotide sequence analysis, none of the WSSV clones showed considerable se-

国家自然科学基金资助项目(斑节对虾杆状病毒传染途径和媒介及其传播机理研究), 39670577号。

第一作者简介: 邓敏, 女, 1972年9月生, 讲师。Tel: 020-84113739-19, E-mail: mdeng@21cn.com

收稿日期: 1999-06-22

quence homology with those of other known viruses or organisms, indicating that WSSV may only be distantly related to baculoviruses.

KEYWORDS *Penaeus monodon*, white spot syndrome virus(WSSV), DNA probe, detection method

白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是全球养殖对虾危害性最大的病毒,各地学者对之有不同的命名,如有:白斑杆状病毒(white spot baculovirus, WSBV)^[1]、皮下及造血组织坏死杆状病毒(hepodermal and hematopoietic necrosis baculovirus, HHNBV)^[2]、日本对虾杆状核病毒(rod-shaped nuclear virus of *Penaeus japonicus*, RV-PJ)^[3]和系统性外胚层和中胚层杆状病毒(systemic ectodermal and mesodermal baculovirus, SEMBV)^[4]等。白斑综合症(WSS)以对虾甲壳上出现白斑为其明显的外观症状,1990年于我国大陆发现,当时尚未引起暴发流行。自1992年始于广东、福建,1993年蔓延至全国各地的WSSV暴发流行^[5],使我国对虾养殖业损失惨重,目前,部分省区对虾产量略有回升,但WSS仍大量发生,制约着我国对虾养殖业的持续发展。因此对WSSV的诊断、预防和控制的研究直接关系到我国对虾养殖业的恢复与发展。本文通过分离纯化WSSV病毒粒子,抽提病毒DNA进行酶切克隆,从而建立了WSSV部分基因组文库,为从基因水平上研究WSSV开了个好头。

1 材料与方法

1.1 试验虾

甲壳上带明显白斑的濒死斑节对虾(*Penaeus monodon*)于1998年6月取自广东省廉江市龙营围养虾场,置于液N₂中带回实验室,-80℃保存。健康的野生斑节对虾和健康的野生刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)购自广州市市场。样品经PCR检测、常规组织学(H.E染色)和电镜观察确证为感染WSSV的虾或健康虾。

1.2 病毒粒子的分离纯化

取病虾的鳃、胃、附肢、表皮于液N₂中研磨成粉,随后加入10倍体积TES(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5, 10 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl)冰浴匀浆后,4℃,5 000 r/min离心10 min,上清铺于20%蔗糖垫上,4℃,45 000 r/min离心30 min。沉淀用含1% (v/v) Triton X-100的TES重悬后,铺于20%~40% (w/w) CsCl梯度上用Beckman SW40 Ti转子23 000 r/min离心24h以上。收集病毒带于4℃用透析缓冲液(15 mmol/L NaCl, 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)透析过夜。

纯化的病毒粒子滴加于铜网上,用2%磷钨酸(pH 7.0)负染2min后,滴加蒸馏水洗,干后用日立JEM-100CX II透射电镜观察。

1.3 病毒核酸的提取

纯化的病毒粒子悬液加入SDS和蛋白酶K至终浓度分别为0.5%和0.5 mg/mL于55℃消化3h,随后用酚法抽提、乙醇沉淀病毒DNA。

1.4 病毒核酸的酶切克隆

WSSV DNA用限制性内切酶EcoRI或SalI(Gibco/BRL)于37℃酶切过夜,然后用T4 DNA连接酶(Gibco/BRL)于16℃连接过夜,插入质粒pBluescript IIKS(用限制性内切酶EcoRI或SalI于37℃酶切3h,电泳后从琼脂糖凝胶中切下条带,用透析带回收纯化后,用牛胰碱性磷酸酶CIP脱磷)中,转化入大肠杆菌(*Escherichia coli*) XL1-blue中,挑选白色菌落,碱法提质粒,用EcoRI或SalI酶切以鉴定重组子。

1.5 Southern 杂交

按 Sambrook 等^[6]所述方法提取健康的野生斑节对虾和健康的野生刀额新对虾的基因组 DNA。用限制性内切酶 EcoR I 或 Sal I 于 37℃ 酶切 WSSV DNA、健康的野生斑节对虾和健康的野生刀额新对虾的基因组 DNA 过夜, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 按 Sambrook 等^[6]所述方法毛细管转印到尼龙膜 (Hybond) 上, 80℃ 烘 2h 固定。将 2.2 kb WSSV EcoR I 克隆片段按 High Prime DNA labeling Kit (Boehringer Mannheim) 说明书用 ³²P 标记制备为探针。杂交、漂洗、显色按 Sambrook 等^[6]所述方法进行。

1.6 组织切片 (H. E 染色)

现场取濒死斑节对虾, 于第 2 和第 3 腹节间和头胸部注射 Davidson's AFA 固定液全身固定, 切取头胸部, 从额剑将头胸部分成 2 部分, 再置 Davidson's AFA 固定液中固定 24h, 于 70% 乙醇中保存。固定好的样品用于组织切片 (常规技术, HE 染色) 或原位杂交。

1.7 原位杂交

核酸探针的制备: 将 413bp WSSV EcoR I 克隆片段按 DIG DNA 标记和检测试剂盒 (Boehringer Mannheim) 说明书用 DIG 标记制备为核酸探针。

用于原位杂交的载玻片, 必须先用 2% APES (Sigma) 的丙酮液硅化, 或直接用 Fisher Scientific 公司的正电荷显微镜载玻片。

固定好的样品按组织切片常规技术制成 4μm 厚的组织切片, 60℃ 烘 45min, 然后经二甲苯脱蜡, 乙醇水化, 蛋白酶 K (10μg/mL) 37℃ 消化 10min, 0.4% 甲醛固定 5min 后, 加预杂交液 37℃ 预杂交 30min。

预杂交结束后, 载玻片上加入含 10~25 ng/mL 探针 (预先于 100℃ 变性 10min) 的杂交液, 于 95℃ 变性 6min, 置冰上 5min, 42℃ 杂交过夜。

杂交后用 2×SSC、0.5×SSC 于 37℃ 洗片, 显色反应按 DIG DNA 标记和检测试剂盒说明书操作。显色完后用 TE (pH 8.0) 停止显色, 光镜观察。同时以健康虾、无探针杂交和无 AP 显色反应作为阴性对照。

1.8 打点杂交

分别取病虾和健康虾的鳃于 TN 缓冲液 (0.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4) 中冰浴匀浆, 4℃, 10 000 r/min 离心 10min, 上清煮沸 10min 变性后, 打点于尼龙膜 (Hybond) 上, 120℃ 烘 30min 固定。

用 1.7 中制备的探针 (413bp WSSV EcoR I 克隆片段) 按 DIG DNA 标记和检测试剂盒说明书与膜进行杂交、漂洗和显色。同时以含 413bp WSSV EcoR I 克隆片段的重组质粒为正对照, 以无菌双蒸水为负对照。

1.9 DNA 序列分析

用 SequiTherm EXCEL™ II DNA 测序试剂盒 (Epicentre Technologies) 对所建立的 WSSV 部分基因组文库进行测序, 所得序列通过 Internet 进入 GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) 进行同源性比较。

2 结果

2.1 病毒纯化及其形态特征

蔗糖垫离心粗提纯后,电镜下可见完整的病毒粒子呈椭圆形,具囊膜,大小平均为430nm×120nm,一端较平,另一端略细,其顶端延伸出一条很长的尾,尾部有一膨大部分。病毒核衣壳为杆状,大小平均为300nm×85nm,核衣壳的两端各有一帽状结构,一端为较扁的梯形,另一端为三角锥形,此端延伸出一条长尾。帽状结构之间有14圈螺旋,螺旋与核衣壳的长轴垂直(图版-1)。

超速离心后,CsCl梯度中有一明显的乳白色折光带,收集此乳白色带经负染后于电镜下观察,可见大量高纯度的WSSV病毒粒子(图版-2),因此这一乳白色折光带即为病毒区带。经超速离心后,病毒粒子已失去尾与囊膜。

2.2 WSSV 部分基因组文库

WSSV基因组DNA用限制性内切酶EcoR I或Sal I酶切过夜,用0.8%琼脂糖凝胶电泳分离后,得到的片段见表1,其中小于2kb的片段已跑出凝胶,因此我们推测WSSV基因组DNA可能在165kb以上。

将WSSV基因组DNA EcoR I或Sal I酶切产物与质粒pBluescript II KS连接,转化入*E. coli* XL1-blue中,挑选白色菌落,碱法提质粒,用EcoR I或Sal I酶切以鉴定重组子,得到的重组子其插入片段从10kb到低于500bp,共计40kb,从而建立了WSSV部分基因组文库。

表1 WSSV基因组DNA EcoR I或Sal I酶切片段大小

Tab.1 The sizes of the fragments of the genomic DNA of WSSV digested with EcoRI or SalI

		片段大小(kb)						共计(kb)	
WSSV/EcoRI		22	21	11.2	10	9.4	8.5	7.3	164.9
		6.9	6.1	6.0	5.6	5.3	4.8	4.7	
		4.15	4.05	3.8	3.6	3.4	3.3	3.2	
		3.0	2.8	2.6	2.2				
WSSV/SalI		22	20.5	18	13	9.3	8.9	8.5	154.6
		8.1	7.7	7.3	6.3	5.9	4.9	4.4	
		3.85	3.2	2.75					

2.3 Southern 杂交

从所建立的WSSV部分基因组文库中选择2.2kb WSSV EcoRI克隆片段抽提纯化后用³²P标记制备为探针,将探针与WSSV DNA、健康的野生斑节对虾和健康的野生刀额新对虾的基因组DNA EcoRI和Sal I酶切片段杂交,其结果发现探针特异地与WSSV DNA EcoRI和Sal I酶切片段杂交,其中与2.2kb、5.6kb WSSV EcoRI片段和6.3kb WSSV Sal I片段强杂交,与8.5kb、9.4kb WSSV EcoRI片段及13kb WSSV Sal I片段弱杂交;探针不与健康的野生斑节对虾和健康的野生刀额新对虾的基因组DNA EcoRI和Sal I酶切片段杂交(图版-3)。

2.4 组织切片与原位杂交

样品经组织切片后,细胞核为蓝色,细胞质为红色,感染WSSV的阳性细胞靠鉴定其细胞核肿大作为主要诊断依据,但在光镜下有时难以分辨HE染色后的病变细胞和正常细胞(图版-4,5)。而用DIG标记413bp WSSV EcoRI克隆片段制备为探针进行原位杂交,光镜下观察,可见被WSSV感染的阳性细胞与未被感染的正常细胞较组织切片更易区分,经原位杂交后,被WSSV感染的阳性细胞出现明显的蓝紫色颗粒沉积。探针特异地与感染WSSV的患病虾组织细胞杂交,而不与健康虾的组织细胞杂交(图版-6,7)。

2.5 打点杂交

用 DIG 标记 413bp WSSV EcoR I 克隆片段制备为探针进行打点杂交的结果发现, 探针特异地与病虾 DNA 杂交, 而不与健康虾 DNA 杂交。

2.6 DNA 序列分析

所建立的 WSSV 部分基因组文库中小于 600bp 的插入片段已全部测序, 计有 8.6 kb。将所得序列通过 Internet 输入 GenBank 进行同源性比较, 结果发现所得序列与已知杆状病毒核酸序列的同源性低, 与 GenBank 中已有病毒和生物核酸序列比较都无较大同源性。

3 讨论

WSSV 的核酸类型为双链 DNA, 其基因组 DNA 大小目前尚无统一的结论。我国台湾地区 Wang 等根据病毒 DNA Hind III 22 个酶切片段的电泳位置, 推算 WSSV 基因组 DNA 大小在 150kb 以上^[1]; 泰国 Wongteerasupaya 等用 EcoR I 和 BamH I 分别酶切电泳, 计算其基因组 DNA 大小约为 168kb^[4]; 而厦门 Yang 等则报道用多种限制性内切酶酶切后推测病毒 DNA 大小约为 290kb^[7]。我们根据 WSSV EcoR I 与 Sal I 的酶切片段大小推算 WSSV DNA 大小在 165kb 以上, 与 Wang 等^[1]和 Wongteerasupaya 等^[4]的结论相近, 而与 Yang 等^[7]的结论出入较大。我们通过分离纯化 WSSV 病毒粒子, 抽提病毒 DNA, 对之进行酶切克隆, 建立了 WSSV 部分基因组文库。从中选取 2.2kb WSSV EcoR I 克隆片段用³²P 标记制备为探针进行 Southern 杂交, 结果发现探针可与 WSSV 基因组酶切片段杂交, 其中与 2.2kb WSSV EcoR I 片段有强杂交, 与预期结果相符。另外探针还与 5.6kb WSSV EcoR I 片段和 6.3kb WSSV Sal I 片段有强杂交, 与 8.5kb 和 9.4kb WSSV EcoR I 片段及 13kb WSSV Sal I 片段弱杂交, 其原因可能是由于 WSSV 基因组上存在同源性很高的不同区域。探针不与健康虾基因组酶切片段杂交, 说明此探针(2.2kb WSSV EcoR I 克隆片段)对 WSSV 特异, 不是来源于其宿主虾基因组。

对于 WSSV 的检测, 除常规组织切片和电镜观察外, 还发展了快速野外观察、基因探针和 PCR 扩增等方法^[8,9]。我们从 WSSV 部分基因组文库中选取 413bp WSSV EcoR I 克隆片段用 DIG 标记制备成探针, 将之用于 WSSV 的打点杂交和原位杂交检测, 其结果首先证明了探针(413bp WSSV EcoR I 克隆片段)对 WSSV 特异性高; 其次, 运用打点杂交可发展 WSSV 特异的检测试剂盒; 最后, 由于原位杂交可在受染细胞内显示特定病毒的核酸序列, 因此为 WSSV 的组织细胞定位提供了一个更有效的方法, 运用原位杂交不仅能确定受染细胞的类型, 还能同时观察组织病理变化, 有助于研究 WSSV 的发病机理和流行病学, 进而达到预防 WSS 的目的。同在光镜下观察, 原位杂交相对于 HE 染色更具优越性, 因为: ①原位杂交是对 WSSV 特异的, 而 H. E 染色以受染细胞核肿大为依据, 但细胞核肿大也可由别的原因引起; ②原位杂交可检测病毒早期及潜伏感染, 而 HE 染色在细胞核肿大之前则难以鉴定; ③由于原位杂交以在受染细胞中出现蓝紫色颗粒沉积为诊断标准, 颜色对比大, 比 H. E 染色更直观、更清楚。如在肝胰腺和中肠中, 经原位杂交可清楚地看到其上皮细胞不感染 WSSV, 结缔组织感染 WSSV, 从而证明了 WSSV 感染外胚层和中胚层来源的组织 and 细胞, 而不感染内胚层来源的组织 and 细胞。

Wang 等^[1]根据国际病毒分类委员会(ICTV)第 5 次报告^[10]将 WSSV 定为杆状病毒科裸杆状病毒亚科无包涵体病毒属。但是 ICTV 第 6 次报告^[11]只列出核型多角体病毒属(*Nudepolyhedrovirus*)和颗粒体病毒属(*Granulovirus*), 而没有列出裸杆状病毒亚科无包涵体病毒属, 原列为无包涵体病毒属的昆虫病毒 OrV 和 Hz-1 现列为未分类的无脊椎动物病毒。由于感染 WSSV 的组织细胞内未发现包涵体(occlusion body, OB)的形成, 因此 WSSV 既不属核型多角体病毒属, 也不属颗粒体病毒属。从本文结果及相关文献[12, 13]来看, WSSV 与已知杆状病毒在大小、形态结构、理化特性、组织病理、感染方式(经口感染)、宿主范围(均感染节肢动物)、核酸类型(双链 DNA)等方面相近。但也有不同之处: WSSV

不形成包涵体;外型上 WSSV 核衣壳较粗短,其长宽比约为 5: 1,而杆状病毒一般为 10: 1; WSSV 囊膜一端有一“尾”结构; WSSV 可在细胞核与细胞质中复制、装配和成熟,而杆状病毒只在细胞核中复制、装配和成熟;我们对所建立的部分基因组文库序列分析发现, WSSV 核酸序列与已知杆状病毒核酸序列的同源性低,与 GenBank 中已有病毒和生物核酸序列比较都无较大同源性。由以上分析可见,根据 ICTV 第 6 次报告, WSSV 应不属于杆状病毒科,目前只能列为未分类的无脊椎动物病毒,其分类地位尚需更多证据方能确定。

参 考 文 献

- 1 Wang C H, Lo C F, Leu J H, et al. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. Dis Aquat Org, 1995, 23(3): 239~ 242
- 2 黄捷,宋晓玲,于佳等. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死——对虾暴发性流行病的病原和病理学. 海洋水产研究(对虾病害研究专集), 1995, 16(1): 1~ 10
- 3 Inouye K, Miv a S, Oseko N, et al. Mass mortality of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. Fish Pathol, 1994, 29(4): 149~ 158
- 4 Wongteerasupaya C J E, Vickers S, Sriumairatana G L, et al. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. Dis Aquat Org, 1995, 21(1): 69~ 77
- 5 苏永全,蔡心一,王军. 1992~ 1993 年福建南部地区虾病的调研. 海洋科学, 1995, (1): 1~ 4
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning—a laboratory manual (2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 456~ 490
- 7 Yang F, Wang W, Chen R Z, et al. A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus DNA. J Virol Methods, 1997, 67: 1~ 4
- 8 Lightner D V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society. 1996, 1(section): 1~ 11
- 9 Lo C F, Ho C H, Chen C H, et al. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. Dis Aquat Org, 1997, 30(1): 53~ 72
- 10 Francki R I B, Fauquet D M, Knudson D J, et al. Classification and nomenclature of viruses. Arch Virol, 1991, 2(Supplement): 1~ 145
- 11 Murphy F A, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. Virus taxonomy—sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. Springer-Verlag Wien New York. Arch Virol, 1995, 10(Supplement): 104~ 113
- 12 何建国,翁少萍,邓敏等. 斑节对虾白斑病原与病理. 中山大学学报论丛, 1996, 增刊: 12~ 15
- 13 翁少萍,何建国,钟慰等. 斑节对虾白斑综合症杆状病毒致病性及组织细胞特异性研究. 中山大学学报论丛, 1996, 增刊: 16~ 22

图 版 说 明

Explanation of Plate

1. 负染的粗提纯 WSSV 粒子电镜照片; $\times 100\ 000$ 。2. 负染的 CsCl 梯度离心纯化的 WSSV 粒子的电镜照片; $\times 36\ 000$ 。3. 用³²P 标记 2.2kb WSSV EcoRI 克隆片段制备为探针进行 Southern 杂交结果。A: 电泳结果, B: 杂交结果, 1: DNA 分子量标准(ADNA/Hind III), 2: WSSV/ EcoRI, 3: WSSV/ Sal I, 4: DNA 分子量标准(1kb), 5: 斑节对虾基因组 DNA/ EcoRI, 6: 斑节对虾基因组 DNA/ Sal I, 7: 刀额新对虾基因组 DNA/ EcoRI, 8: 刀额新对虾基因组 DNA/ Sal I。4, 5. 被 WSSV 感染的斑节对虾鳃($\times 300$)、中肠($\times 600$)组织切片(H. E 染色)。6, 7. 用 DIG 标记 413bp WSSV EcoRI 克隆片段制备为探针与被 WSSV 感染的斑节对虾鳃($\times 600$)、中肠($\times 600$)组织的原位杂交结果, 受染细胞核肿大, 有蓝紫色颗粒沉积

1. Negative stain of WSSV virion, $\times 100\ 000$; 2. Negative stain of WSSV purified by CsCl density gradient centrifugation, $\times 36\ 000$; 3. Characterization of Southern hybridization with 2.2kb WSSV EcoRI clone fragment as probe; 4, 5. WSSV-infected gill ($\times 300$), midgut ($\times 600$) of *P. monodon* (HE stain); 6, 7. Characterization of in situ hybridization with 413bp WSSV EcoRI clone fragment as probe.

