

文章编号: 1000- 0615(2002)02- 0185- 04

• 研究简报 •

用逆转录多聚酶链式反应从凡纳对虾中 检出传染性皮下组织和造血器官坏死病毒

刘 荭, 高隆英, 史秀杰, 江育林

(深圳出入境检验检疫局, 广东 深圳 518010)

关键词: 传染性皮下组织和造血器官坏死病毒; 凡纳对虾; 逆转录多聚酶链式反应

中图分类号: S945.4 文献标识码: A

Detection of RNA of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Penaeus vannamei* using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

LIU Hong, GAO Long-ying, SHI Xi-jie, JIANG Yu-lin

(Shenzhen Exit-entry Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518010, China)

Abstract: A reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used for detection of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) from the gills and subcutaneous tissue of *Penaeus vannamei* (10– 15cm in body size) without clinical signs. With primers 77012R and 77353F, a fragment of 356bp of IHHNV was amplified in RT-PCR. The amplified product was sequenced and showed more than 98% homologue with the sequences of other IHHNV strains in Gene Bank.

Key words: infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV); *Penaeus vannamei*; reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

传染性皮下组织和造血器官坏死病毒(IHHNV), 是一种细小病毒, 它能感染所有起源于中胚层和外胚层的对虾组织细胞^[1]。在许多养殖对虾的国家都有 IHHNV, 特别是中美洲国家和地区^[2]的对虾养殖业深受其害。随着各国间对虾贸易的急剧增长, IHHNV 地理分布范围日益广泛, 迄今为止, 已扩散到中国台湾、新加坡、马来西亚、泰国、印度尼西亚、澳大利亚、菲律宾、厄瓜多尔、秘鲁等国家和地区^[2- 4]。红额角对虾(*Penaeus stylirostris*)、斑节对虾(*P. monodon*)、短沟对虾(*P. semisulcatus*)、凡纳对虾(*P. vannamei*)、日本对虾(*P. japonicus*)、褐对虾(*P. aztecus*)和桃红对虾(*P. duorarum*)都会感染 IHHNV^[4], 其中红额角对虾、斑节对虾和凡纳对虾感染 IHHNV 后会引急性流行, 造成大面积虾群死亡^[5]。

凡纳对虾肉质鲜美、盐度适应范围广、抗病力强, 非常适合人工高密度养殖, 为世界三大高产虾之一。我国自 1998 年开始养殖凡纳对虾, 主要分布在广东、福建和海南等地。目前仅在广东省, 养殖面积就已经达到 7.5 公顷以上。随着对虾苗种的大量引进, 疾病传入我国的机会增加。我们在对虾疾病监测过程中, 使用文献[6]中介绍的 IHHNV 特异性引物, 用 RT-PCR 检测技术从无症状的凡纳对虾中扩增出 IHHNV 特异性的核酸片段, 并用 DNAsis 软件和 BLAST 软件对该

收稿日期: 2001-09-10

作者简介: 刘 荭(1971-), 女, 安徽阜阳人, 兽医师, 在职博士研究生, 主要从事鱼病学研究和出入境水生动物检疫工作。E-mail:

核酸片段的测序结果及同源性进行了分析。

1 材料和方法

1.1 试验材料

凡纳对虾由北京某水产养殖公司提供, 体长 10~15 cm, 外表健康, 无临床症状。

引物 77012R (5'-ATCGGTGCACTACTCGGA-3') 和 77353F (TCGTACTGGCTGTTTCATG-3') 由上海生工生物工程有限公司(以下简称上海生工) 制备, 可扩增 IHNV 基因中长度为 356 bp 的核酸片段; 逆转录酶 (AMV)、RNA 酶抑制剂 (RNasin)、Taq 酶、脱氧核苷三磷酸混合物 (dNTPs)、氯化镁 (MgCl₂) 及 PCR 缓冲液均购自上海生工; RT-PCR 扩增产物由上海生工进行测序。

1.2 核酸抽提

取无临床症状的凡纳对虾的上皮、鳃、肝胰腺和肌肉(约 0.2 g), 剪碎、研磨匀浆, 放在 1.5 mL 的 Eppendorf 离心管中。先加入 150 μL 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 溶液 (2% CTAB, 1.4 mol·L⁻¹ NaCl, 20 mmol·L⁻¹ 乙二胺四乙酸 [EDTA], 100 mmol·L⁻¹ 三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液 [Tris-HCl], pH=7.5, 用前加 0.25% 的 α-巯基乙醇), 用小剪刀剪碎, 后用搅拌器将样品匀浆成糊状。加 CTAB 到 800 μL。混匀后, 25℃ 作用 2 h, 加入 600 μL 酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 用力混合 30 s 以上, 12,000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上层水相; 加入 650 μL 氯仿/异戊醇 (24:1) 混合 30 s 以上, 12,000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上层水相, 加 1.5 倍体积的冷无水乙醇混匀后 -20℃ 过夜以沉淀 RNA。次日经 15,000 r·min⁻¹ 离心 30 min 后, 小心弃去上清液, 37℃ 干燥, 加 10 μL 水溶解, -80℃ 冻融一次, 吹打溶解后做 PCR 模板。

1.3 逆转录多聚酶链式反应 (RT-PCR)

1.3.1 解二级结构

在 PCR 管中加入模板 10 μL, 引物 77012R 和 77353F 各 1.5 μL, 水 2 μL, 总体积 15 μL。70℃ 加热 5 min 后立即冰浴, 稍离心使反应物集于管底。

1.3.2 合成 cDNA

在上述 PCR 管中继续加入 AMV 5Xbuffer 5 μL, dNTPs (各 10 mmol·L⁻¹) 2 μL, RNasin 1 μL (20 U), 水 1 μL, AMV 酶 1 μL, 共 25 μL。40℃ 60 min 反应后稍离心。

1.3.3 PCR

继续在 PCR 管中加入 10× PCR buffer 8 μL, 0.2 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 8 μL, 引物 (77012R 和 77353F, 分别为 0.8 mmol·L⁻¹) 各 2 μL, dNTPs 2 μL (各 10 mmol·L⁻¹), Taq 酶 1 μL, 水 52 μL, 总体积 100 μL。加 50 μL 矿物油覆盖, 稍离心。先 93℃, 4 min, 再按 93℃ 1 min、55℃ 1 min、71℃ 1 min 作 30 个循环; 最后 72℃ 10 min 延伸, 4℃ 保温。

1.4 PCR 产物的检测

用含 0.5 μg·mL⁻¹ 溴化乙锭 (EB) 的 1X TBE 做电泳缓冲液及配制 1.5% 的琼脂糖凝胶。将凝胶板放入水平电泳槽, 使电泳缓冲液刚好淹及胶面, 将 6 μL 样品和 2 μL 4× 电泳样品缓冲液 (每 100 mL 溶液中含溴酚兰 0.25 g, 蔗糖 40 g) 混匀后加入样品孔, 5V·cm⁻¹ 电泳约 0.5 h, 在紫外灯下观察核酸带。

1.5 核酸序列同源性的比较

由上海生工对 RT-PCR 产物进行测序。将测序结果输入计算机, 用 DNA sis 软件和 NCBF Nucleotide-BLAST 软件对序列进行分析。

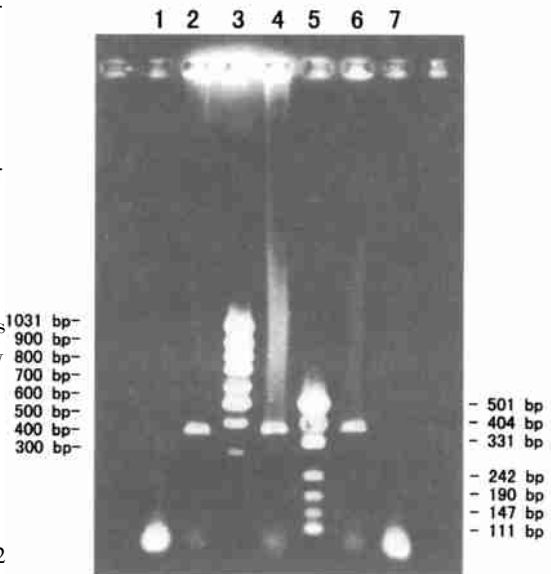


图 1 RT-PCR 扩增后, 从皮下组织和鳃中均扩增出长度为 356 bp 的 DNA 片段的琼脂糖电泳染色照片。

Fig. 1 RT-PCR amplification products were analyzed on agarose gel and the DNA fragments of 356 bp were amplified from subcutaneous tissue and gill of shrimp.

注: 孔 1 为肝胰腺; 孔 2 和 4 为皮下组织; 孔 3 为 DNA 分子量标准 (MassRuler™ DNA Ladder, Low Range); 孔 5 为 DNA 分子量标准 (pUC19 DNA/MspI [HpaII] Marker, 23); 孔 6 为对虾鳃组织; 孔 7 为肌肉。

Notes Lane 1: Hepatopancreas of shrimp; Lane 2 and 4: Subcutaneous tissue of shrimp; Lane 3: DNA Marker (MassRuler™ DNA Ladder, Low Range); Lane 5: DNA Marker (pUC19 DNA/MspI [HpaII] Marker, 23); Lane 6: Gills of shrimp; Lane 7: Muscle of shrimp.

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增结果

用 77012R 和 77353F 为引物, 扩增结果如图 1 所示。经 RT-PCR 扩增后, 在肝胰腺和肌肉中未能扩增出特异性的核酸带。以水为模板的空白对照没有出现任何核酸带。在鳃和皮下组织中均扩增出长度为 356 bp 的核酸片段。

2.2 核酸序列测定

本实验中 RT-PCR 得到的扩增产物由上海生工对 RT-PCR 产物进行测序。测序结果见图 2(编号: 44C040)。

2.3 扩增产物序列比较

用 DNAsis 软件将本实验扩增到的序列 44C040 与 Gene Bank 中, 编号为 NC 002190、寄主为对虾的 IHNV cDNA 序列(图 2 中 IHNV-1), 以及和编号为 AF 273215、寄主为红额角对虾的 IHNV 的 cDNA 序列(图 2 中的 IHNV-2) 进行多重比较, 结果见图 2。44C040 与 IHNV-1 中编码非结构蛋白的 cDNA 序列有 98.1% 的同源性^[7], 与 IHNV-2 中编码非结构蛋白和编码部分核衣壳蛋白的 cDNA 序列有 98.4% 的同源性^[8]。用 NCBI-BLAST Program 程序作序列相似性寻找和同源性比较, 结果本实验扩增序列与其它病毒的序列同源性均低于 7.6%, 表明本实验中 RT-PCR 得到的扩增产物是 IHNV 的一段保守序列。

```

44C040      -----A TCGGTGCACT ACTCGGAAAA TGAACACTG GCCTAGTAAC
IHNV-1 2301 TCTCTTACCA TCGGTGCACT ACTCGGAAAA CTGAACACTG GCCTAGTAAC
IHNV-1 2301 TCTCTTACCA TCGGTGCACT ACTCGGAAAA CTGAACACTG GCCTAGTAAC

44C040 2351 AAGAAAGGA GACTCAAACA CCTTCCATCT ACAAAACCTC ATCGGAAAGT
IHNV-1 2351 AAGAACAGGA GACTCAAACA CCTTCCATCT ACAAAACCTC ATCGGAAAGT
IHNV-2 2351 AAGAACAGGA GACTCAAACA CCTTCCATCT ACAAAACCTC ATCGGAAAGT

44C040 2401 CCTACGCTCT CTTCGAAGAA CCCAGAATCA GTCAAATAAC AGTGGACGAC
IHNV-1 2401 CCTACGCTCT CTTCGAAGAA CCCAGAATCA GTCAAATAAC AGTGGACGAC
IHNV-2 2401 CCTACGCTCT CTTCGAAGAA CCCAGAATCA GTCAAATAAC AGTGGACGAC

44C040 2451 TTCAAACCTC TTTTCGAAGG ATCAGACTTA GAAGTAAACA TAAAACACCA
IHNV-1 2451 TTCAAACCTC TTTTCGAAGG ATCAGACTTA GAAGTAAACA TAAAACACCA
IHNV-2 2451 TTCAAACCTC TTTTCGAAGG ATCAGACTTA GAAGTAAACA TAAAACACCA

44C040 2501 AGAGTCAGAA ATTATGGGAC GAATACCAAT CTTTATATCA ACAAAACAAG
IHNV-1 2501 AGAGTCAGAA ATTATGGGAC GAATACCAAT CTTTATATCA ACAAAACAAG
IHNV-2 2501 AGAGTCAGAA ATTATGGGAC GAATACCAAT CTTTATATCA ACAAAACAAG

44C040 2551 ATATAGACTA CTGGGTACCT CCAGCTGATG GTAAAGCTCT ACAAAACAAG
IHNV-1 2551 ATATAGACTA CTGGGTACCT CCAGCTGATG GTAAAGCTCT ACAAAACAAG
IHNV-2 2551 ATATAGACTA CTGGGTACCT CCAGCTGATG GTAAAGCTCT ACAAAACAAG

44C040 2601 ACAAAAACCT TCCACCTGAC AAGACAAATA AAAGGCCTCT CAGACAGGAT
IHNV-1 2601 ACAAAAACCT TCCACCTGAC AAGACAAATA AAAGGCCTCT CAGACAGGAT
IHNV-2 2601 ACAAAAACCT TCCACCTGAC AAGACAAATA AAAGGCCTCT CAGACAGGAT

44C040 2651 GAACAGCCAG TCGA----- -----
IHNV-1 2651 GAACAGCCAG TACGACATCA ACCCTCCACC AGACAAGATC ACCAGCGGAC
IHNV-2 2651 GAACAGCCAG TACGACATCA ACCCTCCACC AGACAAGATC ACCAGCGGAC

```

图 2 用 DNAsis 对三个序列进行分析。

Fig. 2 Analyse on sequences with the soft package of DNAsis.

注: 44C040 为本实验中 RT-PCR 扩增序列; IHNV-1 为寄主为对虾的 IHNV 的 cDNA 序列(Gene Bank 编号: NC 002190); IHNV-2 为寄主为红额角对虾的 IHNV 的 cDNA 序列(Gene Bank 编号: AF 273215)。

Notes: 44C040 is the sequence of RT-PCR amplification product in this study; IHNV-1 is the cDNA sequence of IHNV from *Penaeus shrimp* (Accession No.: NC 002190 in Gene Bank); IHNV-2 is the cDNA sequence of IHNV from *Penaeus stylirostris* (Accession No.: AF 273215 in Gene Bank).

3 讨论

作印片和组织切片等病理学检查是诊断对虾是否感染 IHNV 的主要手段,但只有在对虾感染病毒、细胞和组织出现明显的病理变化后,才能准确地进行判断。此外,也有关于用 ELISA、免疫斑点实验和 Western blot 试验中使用单克隆抗体特异性地检测 IHNV^[6]的报道。我们使用 RT-PCR 这种分子生物学检测技术,在 48 小时内迅速、准确地从无症状的凡纳对虾中检出 IHNV,这在国内尚属首次报道。

IHNV 是一种 RNA 病毒,容易降解,而且在处理过程中容易受到 RNA 酶的污染,所以在保存和处理时要特别小心。将对虾组织放在 95% 酒精中,可以在不能立即进行检测的情况下保存样品,防止对虾死后,各种酶释放降解核酸而导致检出率下降。同时注意在取样时,要注意不要取到虾眼,因为虾眼中的某些成分会抑制 RT-PCR 反应。

IHNV 是对虾养殖业中主要疾病之一。它可通过水平传播、垂直传播两种方式扩散开来。过去认为, IHNV 不会显著影响对虾的生长,但最新研究情况表明, IHNV 会严重影响对虾亲虾的成活率,所以长时间来,一直低估了 IHNV 所造成的经济损失^[8]。我们建议应在沿海对虾主要养殖地区,开展 IHNV 的监测,预测 IHNV 的流行情况,以便及时开展控制措施。尤其是要检出带毒亲虾,以切断 IHNV 垂直传播的途径。

参考文献:

- [1] Lu Y, Loh P C, Brock J A. Isolation, purification and characterization of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) from penaeid shrimp[J]. Journal of Virological Methods, 1989, 26: 339- 344.
- [2] Lightner D V, Redman R M, Poubs B T, et al. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp[J]. Rev Sci Tech, 1997, 16(1):146- 60.
- [3] Lightner D V, Redman R M, Bell T A, et al. Detection of IHNV virus in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei* imported into Hawaii[J]. Journal of the World Mariculture Society, 1983, 14: 212- 225.
- [4] Lightner D V. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas[J]. Rev Sci Tech, 1996, 15(2): 579- 601.
- [5] Bell T A, Lightner D V. IHNV virus: Infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*[J]. Aquac, 1984, 38: 185- 194.
- [6] OIE diagnostic manual for aquatic animal diseases(3rd edition)[M]. Office International des Epizooties Paris France, 2000. 214- 226.
- [7] Bonami J R, Trumper B, Mari J, et al. Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps[J]. J Gen Virol, 1990, 71(11): 2657- 2664.
- [8] Dhar A K, Burns J C, Shimizu C, et al. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito brevidensoviruses[J]. Virology, 2000, 277(1): 167- 177.

下期论文摘要

耐盐红螺菌科细菌对淡水鱼池水质及细菌类群的影响

邱宏端, 徐姗楠, 朱航, 王沁亦

(福州大学生物与食品科学工程系, 福建 福州 350002)

摘要: 对耐盐红螺菌科光合细菌应用于淡水斑点叉尾、彭泽鲫养殖后, 水化学环境因子、细菌类群及养殖生物的变化进行了研究。结果表明, 鱼池泼施光合细菌后, 水体 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 COD 下降, 溶氧和 pH 上升; 细菌类群及数量变化大致是: 光合细菌提高 3~ 50 倍(多数在 15~ 20 倍), 亚硝酸细菌提高 3 倍, 硝酸细菌提高 4~ 5 倍; 斑点叉尾 养殖池的主要异养细菌肠杆菌科细菌提高 9.4%, 气单胞菌属降低 7.5%, 彭泽鲫养殖池的主要异养细菌假单胞菌属降低 16%, 肠杆菌科提高 21%; 养殖生物的养殖效果是: 斑点叉尾 鱼苗个体增重提高 15.7%, 彭泽鲫鱼苗个体增重提高 12.8%。

关键词: 耐盐红螺菌; 淡水养殖; 水质; 影响