

栉孔扇贝急性病毒性坏死症病毒 cDNA 文库的构建及部分序列分析

王崇明¹, 艾海新^{1,2}, 刘英杰³, 王秀华¹, 李 赞²

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003; 3. 中国水产科学研究院, 北京 100039)

摘要:急性病毒性坏死症病毒(Acute Virus Necrobiotic Virus, AVNV)已被证实是一种对养殖栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)危害极大的致病病原。本研究应用基因克隆技术对 AVNV 基因组进行 cDNA 合成、克隆, 并对部分克隆进行序列分析。采用差速和蔗糖密度梯度离心法, 分离纯化 AVNV。用 TRIzol 试剂抽提病毒 RNA, 采用随机引物和 Oligo(dT)双引物法, SuperScript II 反转录酶合成 cDNA, 并克隆于 pUC118 质粒上, 利用蓝白斑筛选阳性克隆子, PCR 法快速鉴定重组质粒。经筛选得到 2 个阳性克隆 23[#]、52[#], 插入片段大小约为 1 200 bp 和 800 bp。测序结果与 GenBank 的比对分析显示, 尚未有类似的序列报道, 提示该病毒可能为一种新发现的病毒。[中国水产科学, 2006, 13(3): 421-425]

关键词:栉孔扇贝; 急性病毒性坏死症病毒; cDNA 文库; 克隆; 序列分析

中图分类号: S944.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)03-0421-05

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)是中国最重要的养殖经济贝类之一, 养殖区域分布在濒临黄海的山东半岛和辽东半岛, 栉孔扇贝养殖为沿海地区主要的支柱性产业。

自 1997 年起, 连续几年暴发的“大规模死亡症”导致了该产业的巨大损失^[1-2]。本课题组自 2000 年起在山东半岛栉孔扇贝主要养殖海区对导致“大规模死亡症”的各种可能诱因, 分别从流行病学、病理学、病原学以及环境理化、生物因子等方面开展了深入、全面的研究与调查。结果证实, 一种 RNA 球形病毒是导致“大规模死亡症”的直接病原^[3-7]。宋微波等将该病症定名为“急性病毒性坏死症”(Acute Viral Necrobiotic Disease, AVND^[8])。

国内针对一些水产动物病毒, 已成功构建了部分病毒基因组的 cDNA 文库。如田静等^[9-10]构建了草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)出血病病毒基因组和部分基因片段的 cDNA 文库; 张叔勇等^[11]构建了中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)呼肠孤病毒 RNA1 的 cDNA 文库; 宋晓玲等^[12]构建了 1 000 余株凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)感染 WSSV 后期鳃细胞的重组 cDNA 克隆。但贝类病毒类似的研究尚未见相关的报道。本研究对 AVNV 基因组进行了 cDNA 合成、克隆以及部分克隆的序列分析, 以期为

进一步探索该病毒的分子生物学性质, 建立该病毒核酸诊断技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

具典型发病症状的栉孔扇贝(壳高 4.5~6.5 cm), 于 2003 年 7 月采自山东省青岛市中国海洋大学太平角实验基地。

1.2 试剂与仪器

限制性内切酶、RNase、DNase、pUC118 质粒、感受态细胞 JM109、DNA Marker: DL2000 (分子量梯度为: 100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1 000 bp、2 000 bp)、λDNA/*Hind* III digest (分子量梯度为: 125 bp、564 bp、2 027 bp、2 322 bp、4 361 bp、6 557 bp、9 416 bp、23 130 bp)购自宝生物工程(大连)有限公司。TRIzol 试剂、SuperScriptTM Choice System for cDNA Synthesis 购自 Invitrogen 公司。pUC/M13 Primer R Primer (RV-M) (GAGCG GATAA CAATT TCACA CAGG) 和 L Primer (M13-47) (CGCCA GGGTT TTCCG AGTCA CGAC), 由上海博亚生物技术有限公司合成。其他化学试剂为国产 AR 级。RNA 浓度检测仪: Gene Quant Pro RNA/DNA Calculation。PCR 仪: PCR Express HBP×02

收稿日期: 2005-01-13; 修订日期: 2005-11-14。

基金项目: 国家重点基础研究规划项目资助(G1999012001); 山东省科技攻关项目资助(2004CG2205115)。

作者简介: 王崇明(1962-), 男, 副研究员, 主要从事海水养殖动物病害研究。Tel: 0532-85823062。E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

220/HYBAID。测序仪用 ABIPRISM™ 377DNA Sequencer。本实验测序工作由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.3 AVNV RNA 的提取

采用差速离心和蔗糖密度梯度离心相结合的方法^[3]分离纯化 AVNV。纯化的病毒粒子,经适量 RNase、DNase 37℃下消化 30 min(排除宿主基因组的干扰),再经 TRIzol 试剂(Invitrogen)抽提,溶于 DE-PC 水中, -70℃保存备用。具体实验步骤参见 TRIzol® LS Reagent(Invitrogen)说明书。取一份 RNA 样品经 3% 琼脂糖 TAE 电泳检验 RNA 的完整性和质量。另一份样品,用 Gene Quant Pro 测 RNA 浓度。

1.4 AVNV 基因组 cDNA 的合成

以总 RNA 为模板,采用随机六聚体引物和 Oligo(dT) 双引物法,经 SuperScript II 反转录酶合成 cDNA 第一链;将 cDNA 第一链与 mRNA 的杂合体变性分开,以第 1 条 cDNA 链引导 RNA 酶 H 和大肠杆菌 DNA 聚合酶 I klenow 片段置换合成 cDNA 第 2 条链,取 1 份 cDNA 第二链样品经 1% TAE 琼脂糖电泳检验 cDNA 第二链的质量;在 cDNA 第二链两端连接 EcoR I Adaptor,并磷酸化;经 cDNA Size Fractionation 柱选择 cDNA 片段大小。具体实验步骤参见 SuperScript™ Choice System for cDNA Synthesis(Invitrogen)说明书。取 1 份样品,用 Gene Quant Pro 测 cDNA 浓度。

1.5 cDNA 的克隆

将 cDNA 连接于经 EcoR I 酶切并去磷酸化的

pUC118 质粒 DNA 上, CaCl₂ 法导入感受态细胞 *E. coli* JM109(TaKaRa),在含氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG 的 LB 培养基上筛选白色菌落^[13-14]。

1.6 重组质粒的筛选与鉴定

以 pUC/M13 Primer 为引物,用无菌牙签轻轻挑取少量白色菌落为模板,按以下反应条件:94℃、5 min 预变性;94℃、0.5 min,55℃、0.5 min,72℃ 1.5 min,扩增 30 个循环;72℃ 延伸 10 min 进行 PCR 扩增快速筛选重组子。在 1% 琼脂糖凝胶电泳条件下,对 PCR 产物进行鉴定及分析。

1.7 重组质粒测序分析

选择合适的阳性重组质粒交上海博亚生物技术有限公司测序,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

2.1 AVNV RNA

利用 TRIzol 试剂提取的 RNA,条带清晰,质量较好,产量高(图 1)。经 Gene Quant Pro 对 RNA 进行定量,OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.622,质量浓度为 610 ng/μL。

2.2 AVNV 基因组 cDNA 的合成

合成的双链 cDNA 条带主要在 500 bp 以下,500 bp 以上片段较少(图 2)。经 cDNA Size Fractionation 柱选择后,9 号管的 cDNA 片段主要在 750 bp 以上(图 3)。取 9 号管 cDNA 片段进行精制作为待克隆的 cDNA,经 Gene Quant Pro 测得质量浓度为 6 ng/μL。

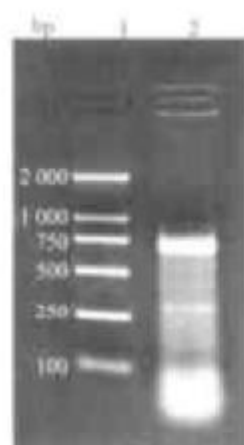


图 1 AVNV RNA 电泳图

Fig.1 Agarose electrophoresis of AVNV RNA
1:DNA Marker DL2000; 2:AVNV RNA

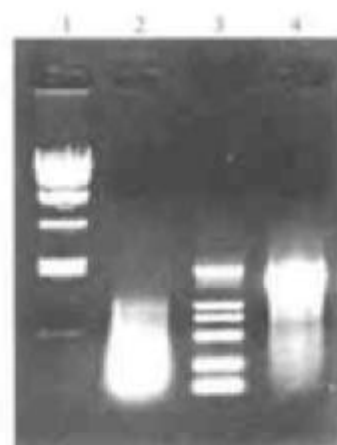


图 2 AVNV 基因组 cDNA 电泳图

Fig.2 Agarose electrophoresis of cDNA of AVNV gene
1:DNA/Hind III Marker; 2:AVNV cDNA; 3:DNA Marker DL2000; 4:Control cDNA

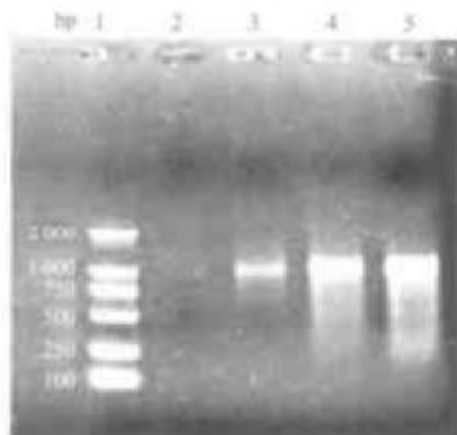


图3 AVNV 基因组 cDNA 片段筛选电泳图

Fig.3 Electrophoresis of size fraction of AVNV cDNA
1: DNA Marker DL2000; 2: 7[#] tubes; 3: 9[#] tubes; 4: 12[#] tubes; 5: 13[#] tube

2.3 重组质粒的筛选、鉴定及序列分析

应用 PCR 法筛选了 218 个 X-gal/IPTG 阳性克隆, 部分克隆 PCR 结果见图 4。其中有 36 个克隆扩增到相应片段, 产物大小在 0.2~1.2 kb, 有 13 个克隆的插入片段大小在 0.5~1.2 kb, 其中 23[#] 质粒插入片段大小约为 1.2 kb, 52[#] 质粒插入片段大小约为 800 bp。

选取插入片段大小在 500 bp 以上的 13 个克隆进行序列测定, 测定的序列通过 Internet 在 GenBank 数据库进行同源序列分析, 尚未发现与 23[#]、52[#] 阳性克隆序列 (图 5、图 6) 接近的同源序列, 23[#]、52[#] 重组质粒的无源性提示 AVNV 可能是一种新发现的病毒。



图4 重组质粒 PCR 鉴定插入片段大小电泳图

Fig.4 Electrophoresis of PCR screening to detect the length of cDNA insert
M: DNA Marker (DL2000)

1	CAAGCTTGCA	TGCTGCAGG	TCAATAGAAC	GTAAGACAGA	TCCCAACACA	50
51	TTAGATATTT	TTTUCAGCAT	AACAGATGCT	CAACGCTACC	TATTTGCTAA	100
101	CAAGCTTTCA	GAATTACCTG	AAATGGGGAA	ATACTCTCAG	GGCACTGAAA	150
151	GCTATCAACA	GTTTGCAATA	AGAATTGCTG	AAATGCTTCA	AGATCCTGCT	200
201	AAATTTCAAG	AATTACATCC	TTATCTTGAA	AAAGTTGGCT	ATCGTTAAAT	250
251	GACTGATGTA	ACGTTACATG	ATTAATTATT	GTCTACAAGC	ATACAGATTT	300
301	TTACTTGGGT	TACATGATGA	AAGCACTATC	TGTTATTGAG	TTATCACAAC	350
351	TTTACGGGAT	GAATCGACAA	AGTATTTATA	AGCGTATAAA	TAAAGGAGAT	400
401	TTATCAAAAA	ATAGTGATGG	GAAAATAGAT	TTATCTGAAG	CCATACGAGT	450
451	ATTTGGCGAA	CCATCGAATA	AAAATAATAA	TGTAACCAAG	TTACAGTCTA	500
501	CTGCGGTACA	AAAAGAGACA	GAAGTAGACA	TGCTAAAACA	ACAGGTAGAC	550
551	ATACTGAAAA	AACAGCTAGA	ACTTGACAT	GAGCGAGAAG	TTTTCCAACG	600
601	AGAACAGCTA	GCAGCAAAAG	ACAATCAAAT	AGAAGCAATA	CAACGACTGC	650
651	TAGAAGCTCC	AAAAACCAAT	ATGACTACGT	TTACCGATCA	GAAACCTGGT	700
701	CAGGATATAG	CAACAGATCC	TGGTCAGAA	OCTGCGCTAA	AAGATGACGG	750
751	AGTGACTACT	CCGGAACAAA	CAGAAAATAA	GCGTATTCT	ATTCCAGAAC	800
801	ATATCGAAGA	AGAACCAGAG	AAAAGGGGCT	TTCTGAGCG	TTTTTTTCTG	850
851	CCAAATGGGT	GAAGGTACTA	TAACTATGC	CTAATCAAAA	CCGTGGAACA	900
901	ATGGTTAAGG	AATGAGCGTG	AAACGACTCT	AGAGGATCC	CCGGTACCGA	950
951	GCTCGAATTC	GTAATCATGG	TCATAGCTGT	TTCCTGTGTG	AAATTGTTAT	1 000
1 001	CCGCTCACAA	TTCACACAA	CATACGAGCC	GGAAGCATAA	AGTGTAAAGC	1 050
1 501	CTGGGGGTGC	CTAATGAGTG	AGCTAACTCA	CATTAATTGC	GTTGCGCTCA	1 100
1 101	CTGG					1 200

图5 AVNV 23[#] 克隆测序结果

Fig.5 AVNV 23[#] clone sequence result

1	ACCCAGGCT	TTACACTTTA	TGCTTCGGC	TGATATGTTG	TGTGGAATTG	50
51	TGAGCGGATA	ACAATTTAC	ACAGGAAACA	GCTATGACCA	TGATTACGAA	100
101	TTGAGCTCG	GTACCGGGG	ATCTCTAGA	GTCATTCAGT	TTGCTCTCTG	150
151	GGGAGACGAA	TGTCITTTGTC	ACCCACTATT	CCCCATCATT	GATGACGGCT	200
201	TGGCTCAAGA	CCGAGCTGAC	CGTGACGAGC	CGGCGCTTC	TGGCGCGAAA	250
251	GTOCAATACG	CTCTGGGTG	TGATTCGCT	GGGCGATGAC	GATGCGGCA	300
301	TGCGCTCGG	CTCCATCAGC	GAGGTTGGCG	TGAACAGCAA	GTTCCACCCA	350
351	GGTGGCGCAA	TCATGGCAAT	AGTCTGGCTC	GTOCTCATGA	TTTCCATGTT	400
401	CAATGGCGAT	CAACCGGTGC	TGGGCGTCT	CGCTTGCTC	CTGTTAATCG	450
451	TGCGGTTCT	TACGACGATG	GACGCGGAGC	TGAGGGTCTG	TAACAATGCT	500
501	GGTTCTGTCA	CGAGCGTGAC	CGTTTCTGCT	CTGAGAAGG	CCAAGCTGCA	550
551	GAGCTTCAAG	CAGGAGGTG	AACAGCGTCT	GTACGCGGAT	CAGGCGCTTC	600
601	TCATGCAACG	TGAGTCGATG	AACCAGGCC	GACCTGCAGG	CATGCAAGCT	650
651	TGGCACTGGC	CGTCGTTTFA	CAACGTCGTG	ACTGGGAAAA	CCCTGGCGTT	700
701	ACCCAACCTTA	ATCGCTTGC	AGCACATCC	CCTTTGCGCA	GCTGGCGTAA	750
751	TAGCGAAGAG	GCGCGACCG	ATCGGCTTC	CCAACAGTTG	CGCA	800

图 6 AVNV 52[#] 克隆测序结果Fig. 6 AVNV 52[#] clone sequence result

3 讨论

在构建 cDNA 文库过程中,核酸污染是最常见的导致错误结果的原因,而且必须消除来自宿主的 RNA、DNA 的干扰。因此本研究采用 Trizol 试剂抽提 AVNV RNA 样品前,用 RNase、DNase 消化 AVNV 以彻底去除宿主 RNA、DNA。另外在抽提过程中小心取出上层水相,防止下层有机相引起的 DNA 污染,经过电泳分析确认无 DNA 污染后再进行下一步的操作。

传统的 cDNA 合成方法,其主要技术基本路线为:无 Poly(A) 尾的 RNA 通过 Poly(A) 加尾反应获得带 Poly(A) 尾的双链 RNA,然后采用 Oligo (dT) 为引物引导 cDNA 的合成;有 Poly(A) 尾的 RNA 直接通过 Oligo (dT) 为引物引导 cDNA 的合成。根据 Cashdollar 等^[15] 的报道,在进行呼肠孤病毒 III 型 cDNA 克隆时,曾用 150 μg 经同位素标记的全基因组 RNA 进行 poly(A) 加尾反应,然后用 ³²P-dATP 再次标记合成 cDNA 第一链,如此大的模板用量及长时间的同位素操作,在一般实验室条件下是难以进行和控制的,而且 Poly(A) 加尾反应效率低,加尾数难以控制,经常造成实验失败^[16]。目前最为普遍的 cDNA 文库构建多采用 RT-PCR 技术合成 cDNA,但该方法需借助计算机数据库进行相关种属序列的同源性分析及保守区域的分析,以获得 RT-PCR 的引物序列,从而构建同类病毒新毒株的 cDNA 文库。本研究中的 AVNV 可能为一种新发现的病毒,尚未确认其分类地位。因此本实验中采用随机六聚体引物和 Oligo (dT) 双引物法引导 cDNA 合成不失为一

种简单、可行的策略,cDNA 第二链合成后经过 cDNA Size Fractionation 柱筛选大小后,可以增加获得较大插入片段的几率。

根据 GenBank 数据库查询结果,目前尚未发现与本研究克隆的 23[#]、52[#] 重组质粒序列接近的同源序列,综合电镜切片显示病毒粒子的形状、大小等因素分析,AVNV 可能是一种在栉孔扇贝中新发现的病毒。构建其 cDNA 文库,为进行深入的分子生物学研究和建立用于早期检测该病毒的核酸诊断技术,具有重要的理论价值和现实意义。

参考文献:

- [1] 于瑞海,王加才,田传远,等. 栉孔扇贝大面积死亡的原因分析及预防探讨[J]. 海洋通报,1998, (3): 69-72.
- [2] 张福维,杨红生. 栉孔扇贝大规模死亡问题的对策与应急措施[J]. 海洋科学,1999, (2): 38-42.
- [3] 王崇明,王秀华,宋晓玲,等. 栉孔扇贝一种球形病毒的分离纯化及其超微结构观察[J]. 水产学报,2002,26(2): 180-184.
- [4] 王秀华,王崇明,李 菁,等. 胶州湾栉孔扇贝大规模死亡的流行病学调查[J]. 水产学报,2002,26(2): 149-155.
- [5] 贺桂珍,李 菁,宋晓玲,等. 栉孔扇贝病原体感染与疾病发生关系探讨[J]. 水产学报,2003, 27(3): 271-277.
- [6] 文海新,王崇明,王秀华,等. 栉孔扇贝急性病毒性坏死症病原人工感染试验[J]. 中国水产科学,2003, 10(5): 386-391.
- [7] 黄剑宇,王崇明,李 菁,等. 栉孔扇贝病毒核酸及其提取方法的研究[J]. 青岛海洋大学学报,2002,32(Sup.): 262-266.
- [8] 宋晓玲,王崇明,王秀华,等. 栉孔扇贝大规模死亡的病原研究新进展[J]. 海洋科学,2001,25(2): 23-26.
- [9] 田 静,邹桂平,方 勤. 草鱼出血病病毒基因组的 cDNA 合成、克隆及部分序列分析[J]. 中国病毒学,1999,14(1): 87-

- 92.
- [10] 田 静,邹桂平,方 勤. 草鱼呼肠孤病毒(GCRV)部分基因片段 cDNA 文库的构建[J]. 中国病毒学,2000,15(1):78-82.
- [11] 张叔勇, Bonami J R, 石正丽. 一株中华绒螯蟹呼肠孤病毒 RNA1 cDNA 文库构建及其 RNA 聚合酶基因部分序列分析[J]. 中国病毒学,2003,18(1):72-75.
- [12] 宋晓玲, 黄 健, Kathy F L, 等. 对虾白斑综合症病毒重组 cDNA 克隆的构建与分析[J]. 水生生物学报, 2002, 2(5): 444-451.
- [13] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京:科学出版社,1995. 464-467.
- [14] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京:科学出版社,2002. 2-138.
- [15] Canbakkal I, W. Espurna, Hodson G R, et al. Cloning the double-strand RNA genes of reovirus: Sequence of the cloned S2 gene [J]. Biochemistry, 1982, 21:7 644-7 648.
- [16] Shatkin A J, Furuschi Y, Lafond A J, et al. Initiation of mRNA synthesis and 5'-terminal modification of reovirus transcripts [A]. Double-Stranded RNA Viruses[M]. Amsterdam: Elsevier Biomedical, 1983,15-26.

cDNA library construction and partial nucleotide sequence analysis of acute viral necrobiotic virus from *Chlamys farreri*

WANG Chong-ming¹, AI Hai-xin^{1,2}, LIU Ying-jie³, WANG Xiu-hua¹, LI Yun²

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. Chinese Academy of Fisheries Science, Beijing 100039, China)

Abstract: The scallop, *Chlamys farreri*, is one of the major species cultured in North China, and its culture in commercial scale has been performed more than 20 years. The highest production (about 10^6 t) has been achieved in 1997. However, the great expansion and intensification have induced the occurrence of disease since 1990's, especially the disease has been becoming epizootics since 1997 in Shandong and Liaoning provinces. It is believed that the disease so called Acute Viral Necrotic Disease^{*} (AVND) has been becoming the major limiting factor in the development of the scallop industry, and has stroke the economic process in the coastal region. In order to understand molecular biologic characteristics of Acute Viral Necrotic Virus (AVNV) and establish molecular diagnostic methods, cloning and sequence analysis had been undertaken. AVNV was isolated and purified from moribund scallop through differential centrifugation and discontinuous sucrose gradient centrifugation. The total RNA was extracted from AVNV with Trizol reagent. The cDNA was synthesized with random hexamers and Oligo(dT) method. After ligating of Size-Fractionated cDNA to the plasmid vector pUC118 and introducing into *E. coli* DH5 α , the recombinant plasmids were screened by blue and white colonies and checked by PCR amplification. Two positive clones, 23[#] and 52[#], were obtained, size of insert segment were about 1 200 bp and 800 bp respectively. The partial cDNA clones were sequenced and analyzed. According to the results of nucleotide sequence analysis, none of 23[#] or 52[#] clone shows significant homology with those of other known sequences in GenBank. The results indicate AVNV would be a new virus. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(3):421-425]

Key words: *Chlamys farreri*; Acute viral necrobiotic virus; cDNA library; cloning; sequence analysis