

鳊鱼病毒核酸随机引物扩增与克隆*

李新辉 吴淑勤 李凯彬 白俊杰 潘厚军 罗建仁 简清

(农业部热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

摘要 从感染鳊鱼病毒(*Siniperca chuatsi* Virus, 简称 SCV)的鳊鱼体中分离病毒, 提纯核酸作模板。通过 RAPD 法, 用带酶切位点的引物进行病毒核酸随机引物扩增, 获得扩增带谱。从带 EcoR I 酶切位点的引物扩增产物中, 用琼脂糖凝胶电泳回收大小约为 0.4 和 0.5 Kbp 的片段, 经 EcoR I 酶切处理制备成带粘性末端的片段, 分别插入质粒 pUC19 的 EcoR I 位点。EcoR I 酶对重组子进行了酶切鉴定, 获得 2 种带插入 SCV 核酸 PCR 扩增产物的重组子。

关键词 鳊鱼, 病毒, 核酸, 随机引物扩增, 克隆

自 1994 年以来, 广东养殖鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)每年暴发大规模的流行病, 造成严重的经济损失。吴淑勤等^[1]首次对病原作了研究, 确定暴发病的主要病原为病毒, 并将该病毒定名为鳊鱼病毒(*Siniperca chuatsi* Virus, 简称 SCV)。由于尚未对 SCV 建立病毒敏感性的培养细胞株, 大量获取病毒仍有赖于发病季节, 并且从目前现有的研究结果发现, 病毒的长期保存尚有一定难度, 给研究带来极大不便。为此, 李新辉等^[2]建立了 SCV 核酸的简易提取方法。在此基础上, 从核酸水平研究 SCV 病毒。本研究应用 RAPD 法, 对鳊鱼病毒核酸进行了部分克隆, 为进一步研究病原核酸打下了基础。

1 材料与方法

1.1 病鱼样品

发病季节从珠江三角洲养殖鳊鱼塘取典型暴发症状的病鱼。

1.2 试剂与酶类

限制性内切酶 EcoR I, T₄-DNA 连接酶, X-gal, IPTG 购自华美生物工程公司; 蛋白酶 K, 低熔点琼脂糖购自 Sigma 公司; Taq DNA 聚合酶, 引物

E₁(GGAATTCC), E₂(CGGAATTCCG), E₃(CCGGAATTCCGG), 购自上海生物工程公司; 其它化学试剂为国家 AR 级。

1.3 方法

1.3.1 病毒核酸提取 病原核酸分离参照文献[2], 取病鱼脾脏匀浆, 10 000 g 离心去除细胞核、线粒体等可能含核酸的细胞器。上清液用 RNase 和 DNase 处理, 以去除溶液中裸露的核酸, 然后用 100 000 g 离心获得带病毒颗粒的沉淀。

1.3.2 病毒核酸提取 将 100 000 g 离心获得带病毒颗粒的沉淀物, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液悬浮, 加上终浓度为 1% 的 SDS, 蛋白酶 K 1 μg/ml 于 60℃ 温育 30 min, 用酚、1/2 酚和 1/2 氯仿、氯仿各抽提 1 次, 上清液用 2 倍体积的乙醇沉淀核酸。离心, 取沉淀核酸干燥后用 TE 缓冲液(pH 7.5)溶解。

1.3.3 核酸纯化 提取的病毒核酸经低熔点琼脂糖电泳, 去除杂质, 经溴乙锭染色, 在紫外灯下回收 SCV 核酸, 于 65℃ 温育 30 min, 用酚、1/2 酚和 1/2 氯仿、氯仿各抽提 1 次, 上清液用 2 倍体积的乙醇沉淀核酸。离心, 取沉淀核酸, 参照文献[3]用蒸馏水按 10 μg/ml 溶解备用。

1.3.4 引物制备 将引物用灭菌双蒸水按 60 μmol/L 浓度溶解备用。

1.3.5 病毒核酸扩增 PCR 参照林万明^[4]方法稍

收稿日期: 1999-01-18

* 本研究由农业部、广东省自然科学基金(编号: 980907)以及广东省科委资助

作修改,模板 10 ng,引物 60 nmol/L, Taq DNA 聚合酶 2.5 u, 4 × dNTP 各 20 mmol/L, Mg^{2+} 750 μ mol/L, 反应体积为 50 μ l。反应条件为 94℃ 预处理 5 min, 后按 94℃ 40 s, 48℃ 40 s, 72℃ 1 min 循环 40 次。最后于 72℃ 延伸 7 min。

1.3.6 扩增产物克隆

(1)载体质粒制备 质粒 pUC19 用 EcoR I 酶切备用。

(2)PCR 产物 在 1% 的低熔点琼脂糖凝胶中电泳,溴乙锭染色,然后用解剖刀切下 0.4~0.5 Kb 的电泳带,分别置于 65℃ 熔化,用 TE 补充体积至 500 μ l,按 1.3.3 所列的方法纯化核酸,回收核酸用灭菌双蒸水溶解备用。

(3)PCR 产物粘性末端的制备 经低熔点琼脂糖回收扩增的产物用 EcoR I 酶切,分别用等体积的饱和酚、1/2 酚和 1/2 氯仿、氯仿抽提纯化,乙醇沉淀核酸,灭菌双蒸水溶解备用。

(4)纯化 PCR 产物与载体 pUC19/EcoR I 按 1:1 混合,在 10 μ l 体积中加入 5 u T₄-DNA 连接酶,12℃ 连接过夜。

(5)受体菌感受态制备 过夜培养的大肠杆菌 DH5 α ,按 1:100 比例接种于新鲜 LB 培养液,37℃ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5,离心收集菌体,加入预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 悬浮,离心收集菌体,每 100 ml 培养液培养的菌体用 10 ml 0.1 mol/L CaCl₂ 悬浮,冰浴 2 h 以上备用。

(6)重组质粒转化大肠杆菌 取连接反应液 5 μ l,加入 200 μ l 感受态菌,冰浴 30 min,42℃ 水浴 90 s,加入 0.8 ml LB 培养液于 37℃ 缓摇 1 h 复苏,取 200 μ l 涂平板并于 37℃ 培养至菌落出现。

1.3.7 重组子鉴定

(1)重组子平板筛选 转化质粒菌经 Amp 抗性和 x-gal/IPTG 培养基平板筛选,长出白色菌落为重组转化子。

(2)插入片段酶切鉴定 取白色菌落,接种于含 Amp 药物的 LB 培养液中,37℃ 振荡过夜培养,翌日收集菌体用碱变性方法^[5]提取质粒,用 EcoR I 酶切,电泳筛出带不同插入片段的重组质粒。

3 结果

3.1 病毒粒子

病原分离参照李新辉等^[2]方法,经分级离心后获得带病毒颗粒的沉淀。图 1 示电镜下的病毒粒

子。

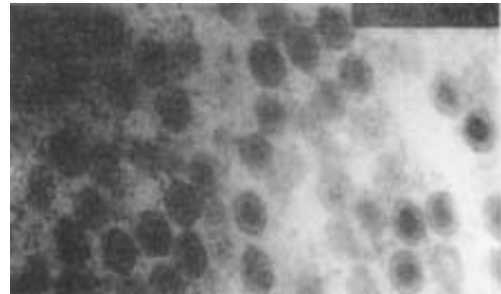


图 1 鳃鱼病毒粒子(SCV)电镜图(×48 000)

Fig.1 Electron micrograph of SCV

3.2 扩增片段

本研究用带 EcoR I 酶切位点的引物

E₁(GGAATTCC); E₂(CGGAATTCCG)和 E₃(CCGGAATTCCGG)对病毒核酸进行扩增,获得扩增片段(图 2)。



a E₃ 扩增产物 E₃ primer; b E₂ 扩增产物 E₂ primer; c DNA 分子量标准 DNA marker; d E₁ 扩增产物 E₁ primer.

图 2 3 种引物扩增鳃鱼病毒核酸结果

Fig.2 The RAPD results of 3 primers on SCV

3.3 PCR 产物

PCR 产物从琼脂糖凝胶电泳中回收,回收片段经 EcoR I 酶切后与质粒 pUC19 连接,重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α ,经 Amp 和 x-gal/IPTG 筛选,获得带重组子的白色菌落。从白色菌落中提取质粒 DNA,经限制性内切酶 EcoR I 酶切,初步筛选出 2 种插入不同大小的带病毒核酸片段的重组子(如图 3)。



a: pUC19/EcoRI; b: DNA 分子量标准 DNA marker; c: 插入片段分子长度约为 0.5 Kb. 0.5 Kb fragments of SCV; d: 0.4 Kb 插入片段 0.4 Kb fragments.

图 3 克隆的 2 个 PCR 片段

Fig.3 Cloned fragments of SCV

4 讨论

鳊鱼是新兴养殖的名贵鱼,但近年珠江三角洲高产养殖区出现了毁灭性的暴发性传染病。本实验根据外源性核酸分子量大小,以及在不同组织中出现的判别基础上,通过电镜在病鱼脾脏中观察到鳊鱼病毒。

鳊鱼病毒是尚未进行系统分类的病毒,对其基因组缺乏了解,无法按病毒的基因结构设计特定引物。通常的 RAPD 所用的引物扩增的核酸片段不容易获得可与载体质粒匹配的粘性末端,不利于对扩增片段的克隆。本研究选用带酶切位点的随机引物,在鳊鱼病毒核酸方面扩增出病毒核酸片段,借助引物提供的酶切位点,方便了对扩增产物的克隆。同时在 PCR 扩增过程中,使用了多种引物,从酶切位点上区别,可分成 3 种类型,即 EcoRI; HindIII; PstI。用于 SCV 核酸扩增中,引物与模板的错配率与 Mg^{2+} 浓度相关。EcoRI 引物要求的 Mg^{2+} 浓度相对较低; HindIII 引物要求的 Mg^{2+} 浓度相对要高。从引物长度分类,亦可分成 3 种类型,即 8 碱

基, 10 碱基和 12 碱基。相同条件试验中反映出,引物碱基长度与扩增片段的大小跨度之间存在明显的正比关系。如图 1-a, 在含 8 碱基的引物中, 扩增出的带谱片段范围在 0.2~0.7 Kb 之间, 10 碱基的引物扩增范围在 0.7~1.0 Kb (图 1-b) 之间, 12 碱基的引物扩增片段范围在 0.7~1.4 Kb 之间 (图 1-d)。从图 1 中可见, 引物的长度与扩增出的最大片段间亦有一定正比关系。

选用引物的长度、复性温度的高低直接影响 PCR 结果。复性温度与扩增带谱关系密切, 在使用带 HindIII 位点的引物试验中, 复性温度为 40℃ 时, 引物与模板未能发生错配, 得不到扩增带谱, 而在 46℃ 复性时, 获得扩增带谱在 0.4~1.2 Kb 之间。有关不同条件影响 SCV 核酸 RAPD 的分析将另文讨论。

本实验用 Mg^{2+} 浓度为 750 $\mu\text{mol/L}$, 复性温度 48℃ 获得结果。在琼脂糖凝胶电泳回收核酸中, 由于样品很小, 酚抽提之前应注意将体积扩大 10 倍以上, 否则抽提中样品损失较大, 影响试验结果。连接过程中, 亦应尽量在小的体积内实现, 并尽量将连接反应液全部用于转化实验, 最后力求把经转化操作的菌液全部用于平板筛选, 这样可确保转化的重组子均能筛选到。

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. 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. 中国水产科学, 1997, 4(5): 112~114
- 3 Wienand V, Schwarz Z, Felix G. Electrophoretic elution of nucleic acids from gels adapted for subsequent biological tests: application for analysis of mRNAs from maize endosperm. Febs Lett. 1978, 98: 319~323
- 4 林万明, 杨瑞霞, 黄尚志, 等. PCR 技术操作和应用指南. 1995, 8~147
- 5 Birnboim H C. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Methods Enzymol. 1983, 100: 243~255

RAPD analysis and primitive clone on the nucleic acid of *Siniperca chuatsi* virus

Li Xinhui Wu Shuqin Li Kaibin Bai Junjie Pan Houjun Luo Jianren Jian Qing

(Key Lab of Tropical & Subtropical Fish Breeding and Cultivation, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380)

Abstract The epidemic disease has been broken out in cultured *Siniperca chuatsi* in south of China since 1994. The symptoms of the diseased fish are tumescence on livers and spleens, pale on livers and muscles. The mean pathogen is a kind of unknown virus about 150 nm in diameter and six-sided structure. In this experiment, the nucleic acid was isolated from *S. chuatsi* infected with this *S. chuatsi* virus (SCV) and purified with low melt agarose, then was made into template. Three random primers, E₁(GGAATTCC), E₂(CGGAATTCCG), E₃(CCGGAATTCCGG), containing the enzyme position of EcoR I, were used to amplify the SCV genome. Two fragments of PCR production (0.4 and 0.5 Kb) were isolated from electrophoresis gel of low melt agarose. After extracted with EcoR I the purified DNA fragments were inserted in pUC19 plasmids. The recombinant plasmids were screened by x-gal/IPTG and identified by EcoR I.

Key words *Siniperca chuatsi*, virus, nucleic acid, RAPD, clone

2000 年《中国水产科学》征订启事

《中国水产科学》是中国水产科学研究院主办的国家级学术期刊,已经被联合国《水科学与渔业文摘》(ASFA)、《中国学术期刊(光盘版)》、CinaInfo(中国信息)网络资源系统《电子期刊》及“中国期刊网”收录并上网。本刊主要刊载水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖、水产品保鲜与加工综合利用、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器及渔业基础科学和应用基础研究及开发应用研究的学术论文、研究简报、综述和学术动态等文稿。它的主要服务对象是水产科学研究、教学、科技管理人员以及大专院校师生。是反映水产科研成果的窗口和培养人才的园地。它面向水产业,为水产业的持续发展和水产经济建设服务。

《中国水产科学》是季刊,大 16 开,每期 128 页,季末出版,国内外公开发行。国内定价 14 元/期,全年 56 元/期(含邮费)。本刊邮发代号:18-250,国内统一刊号:CN11-3021/S,国际标准刊号:ISSN1005-8737,国外代号 4639Q。全国各地邮局办理订阅手续(可被季订阅)。漏订或补订当年和过期期刊,请直接向编辑部订阅,地址:北京市永定路青塔村 150 号,邮政编码:100039,联系电话:(010)68673921。