

PCR 法制备地高辛标记 DNA 探针斑点杂交检测对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)

杨冰, 黄捷, 宋晓玲, 史成银, 刘莉, 刘庆慧

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:利用非放射性标记物地高辛(DIG),通过PCR方法制备了对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)DNA探针,探针长度705 bp,标记产量为20 ng/ μ L。通过核酸探针斑点杂交检测方法对此探针特异性及灵敏度进行验证,结果表明,该探针具有较高的灵敏度和较强的特异性,检测IHHNV DNA的检出灵敏度为24.8 pg,可检出26.6 ng患病对虾组织DNA中的IHHNV,与250.4 ng健康虾组织DNA、202.5 ng健康虾匀浆液、白斑综合症病毒(WSSV)DNA和肝胰腺细小病毒(HPV)DNA均不发生交叉反应。本方法可应用于健康亲虾、苗种的培育和无特定病原(SPF)对虾种群的选育及IHHNV流行病学调查,并具有较高的应用价值。

关键词:传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV);PCR;探针;斑点杂交

中图分类号:S941.41 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)02-0095-04

传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)自20世纪80年代初在美国夏威夷地区养殖对虾中被发现以来^[1],其分布的地理范围迅速扩大,可感染世界各地养殖对虾,尤其对对虾幼虾的危害最大,严重影响养殖业的发展^[2]。世界动物卫生组织(OIE),水生动物健康法典(第三版)^[3]将它列为“需向OIE申报的甲壳动物重大疾病”之一。随着世界贸易及地区间流动的不断扩展,迫切需要建立一种快速、灵敏的病毒检测方法。

原位杂交和PCR检测IHHNV具有较高的灵敏度^[4-5],但其所需仪器设备昂贵,操作复杂繁琐。核酸探针斑点杂交检测方法具有既快速又灵敏的特点,在疾病诊断中得到广泛应用^[6]。Carr等^[7]利用商品化的IHHNV核酸探针斑点杂交检测试剂盒(ShrimProbe[®]-IHHNV, Diagnotics, Wilton, CT, USA)对南美白对虾进行SPF筛选,同时设立原位杂交作对比试验,结果证明该方法是一种快速、灵敏、可靠的诊断方法。利用非放射性标记物地高辛(DIG)通过PCR方法制备DNA探针对对虾白斑综合症病毒的检测已有相关报道^[8-10]。但用该方法对对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)检测的应用在国内尚属首次。

本研究在已建立的PCR检测方法的基础上,利用非放射性标记物-地高辛(DIG)通过PCR方法制备DNA探针,应用斑点杂交检测法检测传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)。该方法的建立将对对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒病的诊断及无特定病原(SPF)对虾选育提供可靠的技术手段。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 对虾样品 健康南美白对虾(*Penaeus vannamei*)为本实验室提供;病虾为引进南美白对虾仔虾活体,体长0.7 cm,共约300尾。

1.1.2 试剂和材料 10×地高辛(DIG)标记混合物、DNA提取试剂盒、碱性磷酸酶标记的抗地高辛(DIG)抗体、地高辛(DIG)标记检测试剂盒、硝酸纤维素膜、糖原(glycogen)、地高辛(DIG)标记DNA产量测定标准均购自Roche公司,25 mmol/L MgCl₂、10×PCR缓冲液、5 U/ μ L Taq DNA聚合酶购自Promega公司,其他试剂为国产分析纯。引物由本实验室设计,上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 DNA的提取 分别取健康和患病南美白对

收稿日期:2003-09-03; 修订日期:2003-11-20.

基金项目:国家“973”重点基础研究项目(G1999012002)资助;青岛市科技发展计划项目(02-2-kj-hh-74)资助.

作者简介:杨冰(1975-),女,硕士研究生,主要从事水产养殖动物疾病学研究. E-mail: aqadis@public.qd.sd.cn

通讯作者:黄捷. E-mail: aqadis@public.qd.sd.cn

虾鳃丝 25 ~ 50 mg 按 DNA 提取试剂盒说明提取对虾组织 DNA。

1.2.2 PCR 法检测 IHNV 感染样品 按史成银等^[11] PCR 技术检测 IHNV 方法进行,同时设立健康虾组织 DNA 及阴性对照。

1.2.3 PCR 法制备地高辛 (DIG) 标记 DNA 探针 100 μL 反应体系中: $10 \times \text{PCR}$ 缓冲液 10 μL , 25 mmol/L MgCl_2 8 μL , $10 \times$ 地高辛 (DIG) 标记混合物 10 μL , 正向引物 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 0.3 μL , 反向引物 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 0.3 μL , 模板 (198.5 $\text{pg}/\mu\text{L}$) 2 μL , 去离子水 68.9 μL 。混匀后进行一个热启动 94 $^\circ\text{C}$ 10 min, 55 $^\circ\text{C}$ 5 min。加入 5 U/ μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL , 按以下循环参数进行 PCR 扩增: 94 $^\circ\text{C}$ 1 min, 57 $^\circ\text{C}$ 1 min, 72 $^\circ\text{C}$ 1 min, 40 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min; 4 $^\circ\text{C}$ 保温。

取出 1 μL PCR 产物作电泳分析, 在 99 μL 已标记的 PCR 产物中加入 20 mg/mL 糖原 (glycogen) 1 μL , 200 mmol/L EDTA (pH 8.0) 10 μL , 4.0 mol/L LiCl 11.0 μL 终止反应, 加入无水乙醇 (−20 $^\circ\text{C}$) 360 μL , 充分混匀后于 −70 $^\circ\text{C}$ 静置 1 h, 4 $^\circ\text{C}$ 条件下 13 000 g 离心 30 min, 倾去上清液, 用 70% 乙醇 (−20 $^\circ\text{C}$) 500 μL 洗涤沉淀物, 4 $^\circ\text{C}$ 条件下 13 000 g 离心 10 min, 倾去上清液, 沉淀于室温晾干后加入 40 μL TE 溶解。

1.2.4 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析 取 1.2.2 及 1.2.3 中 PCR 产物, 在 100 V 电压下于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 45 min, 紫外灯观察并拍照。

1.2.5 地高辛 (DIG) 标记 DNA 探针产量的测定 地高辛 (DIG) 标记标准 DNA 进行 100 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 10 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 1 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 0.1 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 0.01 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 梯度稀释; 地高辛 (DIG) 标记 DNA 探针进行 10^{-2} , $1/3 \times 10^{-2}$, $1/9 \times 10^{-2}$, $1/27 \times 10^{-2}$, $1/81 \times 10^{-2}$ 梯度稀释, 各取 1 μL 点于尼龙膜上, 按地高辛 (DIG) 标记检测试剂盒说明操作。

1.2.6 地高辛 (DIG) 标记 DNA 探针检测传染性皮下及造血组织坏死病毒 (IHNV) 特异性 用 PCR 方法制备的地高辛 (DIG) 标记 DNA 探针检测 IHNV DNA, 病虾组织 DNA, 健康虾组织 DNA, 健康虾组织匀浆液, WSSV DNA 和 HPV DNA。将 IHNV DNA (198.5 $\text{pg}/\mu\text{L}$), 病虾组织 DNA (212.7 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 健康虾组织 DNA (250.4 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 健康虾组织匀浆液 (202.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 按 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 梯度稀释, WSSV DNA (375 $\text{ng}/$

μL) 和 HPV DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 各样品煮沸变性, 冰浴 2 min, 每样取 1 μL 点于硝酸纤维素膜上, 80 $^\circ\text{C}$ 烤膜 2 h, 65 $^\circ\text{C}$ 预杂交 2 h, 加入地高辛 (DIG) 标记的 IHNV 探针 (20 ng/mL), 杂交过夜, 洗涤, 加入抗体, 显色^[12]。

2 结果

2.1 PCR 反应产物琼脂糖凝胶电泳分析

PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 1, 由图中结果可见, PCR 制备地高辛 (DIG) 标记 DNA 探针和感染 IHNV 南美白对虾 PCR 产物为 705 bp, 与预设产物片段大小一致。

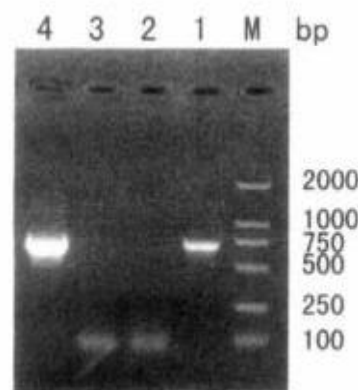


图 1 PCR 反应产物琼脂糖凝胶电泳分析图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of the PCR product

M: DL2,000 DNA 分子量标准; 1: 感染 IHNV 南美白对虾 PCR 结果; 2: 健康南美白对虾 PCR 结果; 3: 阴性对照 (去离子水); 4: 地高辛 (DIG) 标记 IHNV DNA PCR 结果

M: DL2,000 DNA Ladder; Lane1: DNA template extracted from IHNV-infected *Penaeus vannamei*; Lane2: DNA template extracted from IHNV-free *Penaeus vannamei*; Lane3: Negative control; Lane4: IHNV DNA from *Penaeus vannamei* labeled by digoxigenin

2.1 PCR 制备地高辛 (DIG) 标记 DNA 探针产量测定结果

DNA 探针测定结果见图 2, 通过对杂交斑点显色深浅和显色面积大小, 计算得 IHNV DNA 探针的质量浓度约为 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

2.3 地高辛 (DIG) 标记 IHNV DNA 探针斑点杂交检测各样品

检测结果见图 3, 其中 A1 ~ A9 为 IHNV DNA; B1 ~ B9 为病虾组织 DNA; C1 ~ C9 为健康虾组织 DNA; D1 ~ D9 为健康虾匀浆液; E1 为 WSSV DNA; E2 为 HPV DNA; E3 为 TE 缓冲液; E4 为采样液

(SEMP-SSC)^[12];E5~E9为空白对照。



图2 PCR制备地高辛(DIG)标记DNA探针产量测定结果
Fig. 2 Production of IHHNV DNA probe labeled by digoxigenin

A1~A5:地高辛(DIG)标记IHHNV DNA探针 10^{-2} , $1/3 \times 10^{-2}$, $1/9 \times 10^{-2}$, $1/27 \times 10^{-2}$, $1/81 \times 10^{-2}$; B1~B5:地高辛(DIG)标记DNA产量测定标准梯度100 pg/ μ L, 10 pg/ μ L, 1 pg/ μ L, 0.1 pg/ μ L, 0.01 pg/ μ L

A1~A5: 3-fold serially diluted digoxigenin-labeled IHHNV probe;
B1~B5: 10-fold serially diluted digoxigenin-labeled control DNA

用PCR制备地高辛(DIG)标记IHHNV探针斑点杂交检测IHHNV DNA的检出灵敏度为24.8 pg,可检出26.6 ng病虾组织DNA中IHHNV,与250.4 ng健康虾组织DNA、202.5 ng健康虾匀浆液、375 ng WSSV DNA和1 μ g HPV DNA均不发生交叉反应。



图3 IHHNV DNA探针斑点杂交检测各样品结果
Fig. 3 Dot-blot hybridization to detect IHHNV DNA of samples using digoxigenin-labeled probe

A1~A9:IHHNV DNA 2倍梯度稀释;B1~B9:病虾组织DNA 2倍梯度稀释;C1~C9:健康虾组织DNA 2倍梯度稀释;D1~D9:健康虾匀浆液2倍梯度稀释;E1:WSSV DNA;E2:HPV DNA;E3:TE缓冲液;E4:采样液(SEMP-SSC);E5~E9:空白对照

A1~A9: 2-fold serially diluted IHHNV DNA; B1~B9: 2-fold serially diluted DNA extracted from IHHNV-infected shrimp; C1~C9: 2-fold serially diluted DNA extracted from IHHNV-free shrimp; D1~D9: supernatant of IHHNV-free shrimp in SEMP-SSC; E1: WSSV DNA; E2: HPV DNA; E3: TE buffer; E4: SEMP-SSC; E5~E9: Blank of control

3 讨论

传染性皮下及造血组织坏死病毒最初在美国夏威夷地区养殖红额角对虾(*Penaeus stylirostris*)中发

现^[1]。西半球大多数养殖南美白对虾和红额角对虾中都有感染,受感染的对虾没有明显的外观症状^[13],但可引起南美白对虾幼虾慢性疾病“矮小残缺综合症”(即RDS)^[2]。Lightner等^[14]研究发现感染传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)或患病后存活下来的红额角对虾和南美白对虾会终生带毒,并可通过垂直传播和水平传播把病毒传给下一代和其他种群。也有报道,养殖的中国对虾(*Penaeus chinensis*)携带病毒^[15],且通过电子显微镜超微结构观察发现受精卵细胞内有传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)感染^[16]。由于该病毒病不同于对虾白斑综合症具有明显的外观症状,因此对疾病的诊断带来一定困难。本实验中的患病南美白对虾外观健康,无临床症状,研究结果表明其携带传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)。在养殖或区域间流动过程中极有可能将病毒传播开,产生潜在的威胁。

分子生物学诊断技术在水产养殖疾病中的应用正迅速地发展^[4],传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)是无囊膜的二十面体,粒子大小为22 nm,线性单链DNA,长度为4.1 kb^[17]。本研究对IHHNV DNA探针特异性检测结果表明,该探针对于IHHNV DNA的检出灵敏度为24.8 pg,且与健康虾组织DNA、健康虾匀浆液及对虾白斑综合症病毒(WSSV) DNA和对虾肝胰腺细小病毒(HPV) DNA均不发生交叉反应,说明其具有较高的灵敏度和特异性。应用PCR方法可快速、大量地合成特异性探针,通过斑点杂交进行大批量样品检测,操作简便、安全,易于推广。本方法的建立可有效指导健康亲虾、虾苗和SPF种群的选育及IHHNV流行病学调查,有利于我国对虾养殖的健康管理。

该方法可通过斑点显色的强度初步判定样品感染IHHNV程度的强弱及携带病毒的情况,不适于对病毒感染活性的估测,有关组织细胞的感染程度及其病毒扩增状况可应用原位杂交做进一步分析研究。

参考文献:

- [1] Lightner D V, Redman R M, Bell T A. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp[J]. Invertebrate Pathology, 1983, 42:62-70.
- [2] Kalagayan H, Godin D, Kanna R, et al. IHHNV as an etiological factor in runt-deformity syndrome(RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii[J]. World Aquaculture Society,

- 1991, 22(4):235-243.
- [3] Office International des Epizooties. Diagnostic manual for aquatic animal diseases[M]. 3rd ed. 2000. 253-266.
- [4] Lightner D V, Poulos B T, Bruce L, et al. Development and application of genomic probes for use as diagnostic and research reagents for the Penaeid shrimp parvoviruses IHNV and HPV and BPV[A]. USMSFP 10th Anniversary Review[C]. GCRL: Special Publication, 1994. 1:59-85.
- [5] Lightner D V, Poulos B T, Bruce L, et al. New developments in Penaeid virology: Application of biotechnology in research and disease diagnosis for shrimp viruses of concern in the Americas[A]. Diseases of cultured Penaeid shrimp in Asia and the United States[C]. The Oceanic Institute, 1992. 233-253.
- [6] Vivares C P, Guesdon J. Nucleic acid probes in aquatic bacteriology[J]. Aquaculture, 1992, 107:147-154.
- [7] Carr W H, Sweeney J N, Nunan L, et al. The use of an infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus gene probe serodiagnostic field kit for the screening of candidate specific pathogen-free *Penaeus vannamei* broodstock[J]. Aquaculture, 1996, 147:1-8.
- [8] 徐洪涛, 朴春爱, 杨 朵, 等. PCR 方法制备地高辛标记 DNA 探针检测中国对虾非包涵体型杆状病毒[J]. 病毒学报, 2000, 16(1):73-75.
- [9] 雷质文, 史成银, 黄 健, 等. PCR 法制备地高辛标记探针斑点杂交检测白斑综合症病毒(WSSV)[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(2):201-204.
- [10] Nunan L M. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV)[J]. Virological Methods, 1997, 63:193-201.
- [11] 史成银, 黄 健, 杨 冰, 等. 应用 PCR 和 RT-PCR 技术对 4 种对虾病毒的检测[J]. 海洋水产研究, 2003, 24(1):1-5.
- [12] 史成银, 宋晓玲, 黄 健, 等. 核酸斑点杂交分析法检测对虾皮下及造血组织坏死病毒(IHNV)[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(5):486-490.
- [13] Lightner D V, Redman R M, Bell T A. Detection of IHNV virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii[J]. World Mariculture Society, 1983, 14:212-225.
- [14] Lightner D V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures of diseases of cultured penaeid shrimp[M]. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1996.
- [15] Sun Xiuqin, Zhang Jinxing. A study on pathogens of Chinese prawn virus disease[J]. Chin Oceanol Limnol, 1995, 13(3):284-288.
- [16] 张进兴, 孙修勤. 中国对虾细胞中病毒的初步研究[J]. 黄渤海海洋, 1997, 15(1):48-50.
- [17] Bonami J R, Trumper B, Mari J, et al. Purification and characterization of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps[J]. General Virology, 1990, 71:2 657-2 664.

Detection of IHNV in shrimp by dot blot hybridization with digoxigenin labeled DNA probe by PCR

YANG Bing, HUANG Jie, SONG Xiao-ling, SHI Cheng-yin, LIU Li, LIU Qing-hui

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: IHNV (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus) DNA labeled by non-radioactive label digoxigenin using PCR was used as probe for detecting IHNV of shrimp. The size of the DIG-labeled fragment was 705 bp and the labeled production was 20 ng/ μ L. Using dot blot hybridization the sensitivity and specificity were tested with IHNV DNA, DNA extracted from IHNV-infected shrimp, DNA extracted from IHNV-free shrimp, healthy shrimp tissues, White Spot Syndrome Virus (WSSV) DNA and Hepatopancreatic Parvo-like Virus (HPV) DNA. The results showed the DNA probe has high sensitivity and strong specificity that the sensitivity was 24.8 pg to IHNV DNA and was able to hybridize with IHNV DNA from 26.6 ng tissues DNA of IHNV-infected *Penaeus vannamei*. No hybridization signals were observed using 250.4 ng healthy tissue DNA, 202.5 ng supernatant of IHNV-free shrimp, WSSV DNA and HPV DNA, which demonstrated it had a highlg-applied value in detecting IHNV, diagnosing epidemic disease and specific pathogen free (SPF) shrimp breeding.

Key words: IHNV; PCR; probe; dot blot hybridization

Corresponding author: HUANG Jie. E-mail: aquadis@public.gd.sd.cn

* This study is funded by the National Basic Research 973 Project (No. 19901200) and Science and Technology Development Programme of Qingdao (02-2-kj-hh-74).