

# PCR 法检测对虾皮下和造血器官坏死杆状病毒\*

夏 春

黄 捷

(中国农业大学动物医学院 北京 100094)

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

**关键词** PCR 法, 皮下和造血器官坏死杆状病毒, 对虾, 暴发性流行病

**分类号** S854.43 **文献标识码** B **文章编号** 0001-6209(1999)02-0171-73

皮下和造血器官坏死杆状病毒(HHNBV)<sup>[1]</sup>、对虾杆状 DNA 病毒(PRDV)<sup>[2]</sup>和白斑杆状病毒(WSBV)<sup>[3]</sup>是近年来引起全球对虾暴发性死亡的病原。这三种病毒同属杆状病毒属 C 杆状病毒亚群中的新病毒,在流行病学和病理学特征上十分类似,因此,我们统称为对虾暴发性流行病。该病自 1988 年首次在台湾省暴发以来,随后从福建沿海蔓延到黄海和日本海对虾养殖水域,并逐年都导致养殖对虾暴发性、毁灭性死亡,其疫情至今尚未得到有效控制。

灵敏、特异性的检测方法是遏制暴发性流行病的重要一步。目前, Kimura 等采用限制性内切酶切割 PRDV 的基因组 DNA,根据其特异序列建立了聚合酶链反应(PCR)检测法<sup>[4]</sup>。为了加强对我国发生的 HHNBV 的早期诊断和流行病学普查,我们根据对虾杆状 DNA 病毒的特有基因序列设计了引物,对皮下和造血器官坏死杆状病毒的该基因进行了 PCR 扩增和 RFLP 分析,建立了 PCR 法检测 HHNBV 的方法。现将结果报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 HHNBV 基因的扩增和 RFLP 分析

参照 Kimura 等<sup>[4]</sup>方法从 HHNBV 感染中国对虾中提取 HHNBV 基因组 DNA。根据 PRDV 病毒的基因组序列设计两引物,正引物序列为 5'-CATGGCTGCTTCACAGAC-3'(DP1);反引物序列为 5'-GGCTGGAGAGACAAGAC-3'(DP2)。按 Sangon 公司 Taq DNA 酶说明书进行 PCR 扩增 HHNBV 基因。其中正、反引物各添加 100pmol,模板 DNA 添加量为 1 $\mu$ g,PCR 反应总体积为 50 $\mu$ L。PCR 程序是首先 94 $^{\circ}$ C 热变性 1min,然后 55 $^{\circ}$ C 退火 1min、72 $^{\circ}$ C 延伸 1min。所有 PCR 反应均在美国 ERICOMP 公司 SingleBolck system PCR 仪上循环 32 个周期。PCR 产物以 Taq II 和 Bst XI 酶切,再以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,进行 RFLP 分析。

### 1.2 PCR 反应

设计两引物,引物序列为 5'-TTCATCAGATGCTACTGC-3'(DP3);反引物序列为 5'-ACGC-TATCCAGTATCACG-3'(DP4)。如上述 PCR 扩增条件分别进行 DP1/DP2 和 DP3/DP4 引物对 PCR 反应。

### 1.3 PCR 法的检出界限

取 6 尾 HHNBV 阳性对虾内脏共 0.2g,分别加 5 mL TE 缓冲液匀浆,如上述方法提取 HHNBV 基因组 DNA 后,进行  $10^{-3}$  至  $10^{-8}$  倍稀释,再如上述 PCR 扩增条件采用 DP1/DP2 进行 PCR 反应,然后再以 1 $\mu$ L 各稀释度的 PCR 产物为模板以 DP3/DP4 引物进行 Nested-PCR,循环 25 个周期。PCR 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳、照相。

\* 国家教委回国人员启动资金资助

收稿日期:1997-09-10,修回日期:1998-03-20

## 2 结果

### 2.1 HHNBV 基因扩增和 RFLP 分析

HHNBV 基因扩增和 RFLP 分析结果如图 1 所示, 引物 DP1 和 DP2 扩增的 DNA 片段为 978bp, 经 Taq I B 酶切后, 分别成两小片段: 359bp 和 619bp; 经 Bst XI 酶切后, 也成两小片段, 为 330bp 和 648bp。

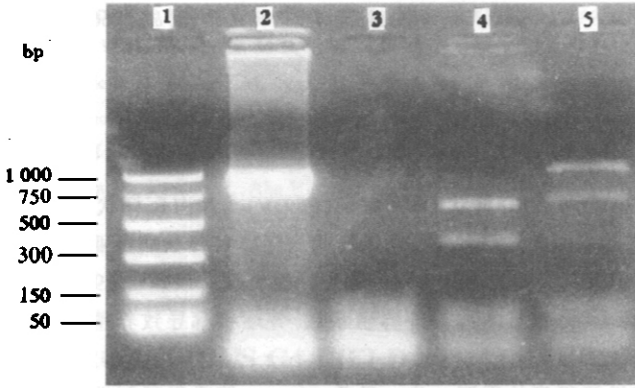


图 1 HHNBV 基因扩增和 RFLP 分析结果

1. PCR Markers (Promega); 2. 以 DP1/DP2 引物对扩增的 DNA 片段; 3. 阴性对照; 4. Taq I B 酶切 PCR 产物; 5. Bst XI 酶切 PCR 产物。

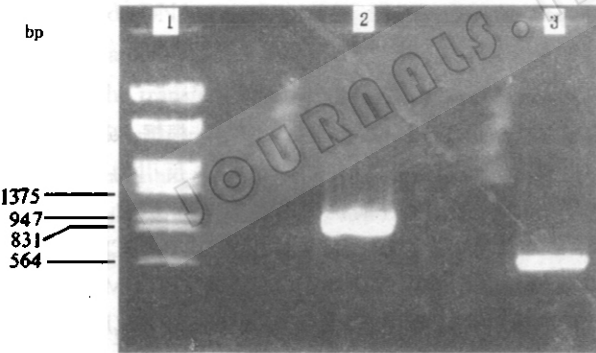


图 2 PCR 反应结果

1. DNA Markers ( $\lambda$ DNA/EcoR I + Hind III); 2. 以 DP1/DP2 引物对扩增的 HHNBV 片段; 3. 以 DP3/DP4 引物对扩增的 HHNBV 片段。体表形成白斑等, 且这三种病毒均不形成一般杆状病毒感染所产生的包含体。因此, 认为发生在我国、日本、泰国等地的对虾暴发性流行病的病原可能是同类病毒或者属同种病种。我们选取了 Kimura 等报道的一段 1.4kb 的 PRDV 序列<sup>[2]</sup>, 设计了 PCR 法扩增 HHNBV 的引物的 Taq I B 和 Bst XI 酶切位点。结果也证实了 HHNBV 与 PRDV 在 RFLP 水平上是一致的, 因此我们推测 HHNBV 与 PRDV 确属同类病毒或同种病毒。

以 DP1/DP2 和 DP3/DP4 引物进行 PCR 反应, 均可见特异性片段。先以 DP1/DP2 引物进行 PCR 反应, 可见 978bp 片段, 再取各稀释度的 PCR 产物为模板, 以 DP3 和 DP4 引物进行 Nested-PCR 的结果,  $10^{-3}$  ~  $10^{-7}$  稀释度均可见 567bp 大小的特异性片段。即大约从 0.04pg 阳性对虾组织中检出 HHNBV, 其灵敏度非常高。另外, 用于检测 PRDV 的 PCR 系统不能扩增中肠腺坏死杆状病毒 (BMNV)、对虾弧

### 2.2 PCR 反应

PCR 反应结果如图 2 所示, 以引物 DP1/DP2 和 DP3/DP4 从 HHNBV 基因组中分别扩增出 978bp 和 562bp 片段。这与预测相同。

### 2.3 PCR 法的检出灵敏度

PCR 法的检出界限如图 3 所示, 将 HHNBV 阳性匀浆液进行  $10^{-3}$  至  $10^{-8}$  倍稀释后, 如上述 PCR 扩增条件先进行 DP1/DP2 的 PCR 反应, 结果在  $10^{-3}$  稀释度可见 978bp 片段,  $10^{-4}$  ~  $10^{-8}$  稀释度无扩增片段。再取各稀释度的 PCR 产物 1  $\mu$ L 为模板, 以 DP3/DP4 引物进行 Nested-PCR 的结果, 在  $10^{-3}$  ~  $10^{-7}$  稀释度均可见 567bp 的特异性片段; 同时,  $10^{-3}$  ~  $10^{-4}$  稀释度可见两条非特异性片段。

## 3 讨论

对虾暴发性流行病是死亡率极高的传染病。为了有效地控制该病, 1997 年初召开了国际学术讨论会。其中, 广泛的交流了用分子生物学方法监测海水养殖对虾引起对虾暴死的杆状 DNA 病毒、白斑杆状病毒的研究现状<sup>[5]</sup>。综合各国学者的研究, 我们发现我国报道 HHNBV<sup>[1]</sup> 与 PRDV<sup>[2]</sup> 和 WSBV<sup>[3]</sup> 十分相似, 诸如感染

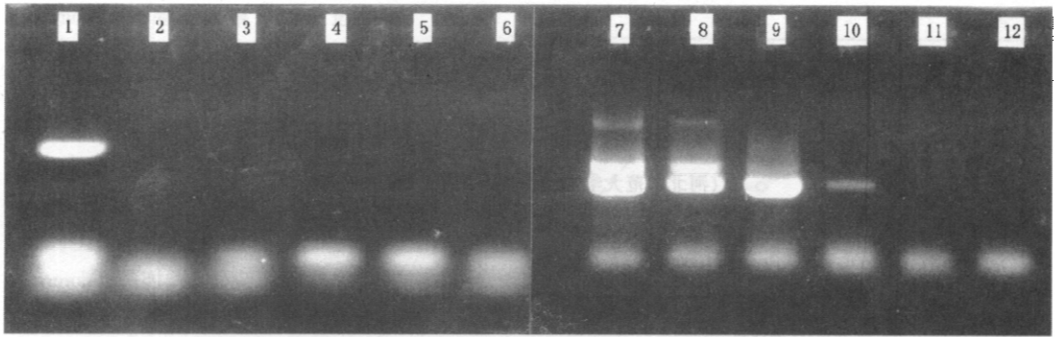


图3 PCR 法的检出界限

1~6.  $10^{-3}$ ~ $10^{-8}$  稀释 HHNBV 后,以 DP1/DP2 引物对进行 PCR 反应;7~12.  $10^{-3}$ ~ $10^{-8}$  稀释 HHNBV 后,先以 DP1/DP2 引物对进行 PCR 反应,然后,取各种稀释度的产物  $1 \mu\text{L}$  为模板,再以 DP3/DP4 引物对进行 PCR 反应的结果。

菌以及一些海水菌种的基因组 DNA<sup>[4]</sup>,这也间接显示出了本 PCR 法检测 HHNBV 所具有的良好特异性和准确性。

本文进行了 PCR 检测我国对虾 HHNBV 即暴发性流行病的研究,本方法既可用于 HHNBV 的早期诊断和流行病学调查,亦可在净化亲虾、防治对虾病毒病上起到重大作用。

### 参 考 文 献

- [1] 黄捷,宋晓铃,于佳等.海洋水产研究,1995,16(1):1~7.
- [2] Inouye K, Miwa S, Oseko N *et al.* *Fish Patholog*,1994,29(2):149~158.
- [3] Lo C-F, Leu J-H, Ho C-H *et al.* *Dis Aquat Org*1996,25:133~141.
- [4] Kimura T, Yamano K, Nakano H *et al.* *Fish Pathology*,1996,31(2):93~98.
- [5] National Resarch Institute of Aquaculture, New Approaches to Viral Diseases of Aquatic Animals, *NRIA International Workshop*, Kyoto, Japan, 1997, January 21~24.

## DETECTION OF HYPODERMAL AND HEMATOPOIETIC NECROSIS BACULOVIRUS BY PCR METHOD

Xia Chun

(Department to Microbiology an Infection, College of Velerinary Medicine,  
China Agricultural University Beijing 100094)

Huang Jie

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071)

**Abstract** For control of the explosive epidemic disease of Penaeid shrimp in China. We have developed a method for detection of Hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus (HHNBV) by polymerase chain reaction (PCR). Two pairs of PCR primers (DP1/DP2 and DP3/DP4) were prepared, based on the RFLP analysis between HHNBV and penaeid rod-shaped DNA virus. PCR using either DP1/DP2 or DP3/DP4 specified HHNBV genome. When PCR products amplified with DP1/DP2 were subjected to nested PCR with DP3/DP4, a high sensitivity about 0.04pg was seen with the nested PCR.

**Key words** PCR, Hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus, Penaeid shrimp, Explosive epidemic disease