

对虾白斑病毒 PCR反应体系的改进*

Improvement of Reaction System of PCR Applied in the Detection of White Spot Virus of Penaeid Shrimp

廖思明¹ 阎冰^{1,2} 陈剑锋¹ 兰国宝¹ 文雪²
Liao Siming¹ Yan Bing^{1,2} Chen Jianfeng¹ Lan Guobao¹ Wen Xue²

(1. 广西红树林研究中心 北海市长青东路 92号 536000;
2. 广西海洋研究所 北海市长青东路 92号 536000)

(1. Guangxi Mangrove Research Center, 92 East Changqinlu, Beihai, Guangxi, 536000, China;
2. Guangxi Institute of Oceanography, 92 East Changqinlu, Beihai, Guangxi, 536000, China)

摘要 采用 TN匀浆, 蛋白酶 K 消化、裂解, 煮沸的方法, 从感染白斑病毒的养殖对虾中提取 DNA作模板, 在模板和扩增缓冲液用量恒定下, 改变 PCR反应体系的 dNTP 引物和 Taq酶用量, 进行 PCR扩增, 使用琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测。结果表明, dNTP用量在 $125\sim 187\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$, 引物用量在 $0.6\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$, Taq酶用量达到 0.5u及以上时, 扩增条带荧光很强, 而使用产品提供商建议用量, PCR可现特异性扩增, 但不是最佳的扩增。

关键词 对虾 白斑病毒 PCR 反应体系 改进

中图分类号 S945.46

Abstract Genome DNA was extracted from the tissue of the white spot virus infected cultured shrimp *Penaeus monodon* by TN homogenizing, DS digesting, proteinase K decomposing and boiling. Under the condition of the same amount in DNA template and the same volume in amplifying buffer, modifications were made in the reaction with the use of quantity of dNTP, primer and Taq polymerase. After PCR amplification, the products were detected by agarose electrophoresis. It shows that the fluorescent intensities of the amplified bands were much high when the quantity of dNTP was between $125\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ and $187\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$, correspondingly the quantity of primer being $0.6\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$, and the quantity of Taq polymerase reaching 0.5 u and above. Results also showed that using the producer's recommended quantity of dNTP, primer and Taq polymerase, PCR could take the specific amplification, but not the best.

Key words shrimp, white spot virus, PCR, reaction system, improvement

对虾白斑综合症病毒 (WSSV) 是一种对养殖对虾有很强致病性的病原体, 能感染斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、日本对虾 (*P. japonicus*)、中国对虾 (*P. chinensis*)、南美白对虾 (*P. vannamei*)、墨吉对虾 (*P. merguensis*)、长毛对虾 (*P. penicillatus*) 等多种对虾。自 1993 年以来在我国广泛流行, 导致养殖对虾死亡 80%~90%, 目前仍是严重危害我国对虾养殖最主要的病原之一^[1]。

建立在分子生物学基础上的 PCR 技术, 以其特异、快速、灵敏的特点, 在亲虾检疫、虾苗检测、对

虾养殖过程中广泛应用。PCR 技术的灵敏性, 与其反应体系的组成、反应程序密切相关。结合我们实验室的条件, 我们在对 WSSV 的检测中, 对 PCR 反应的体系组成进行了一系列的改进试验, 力求寻找最佳的量比关系。

1 材料和方法

1.1 实验材料

斑节对虾取自广西北海市营盘镇的 1 个养殖发病虾池。

PCR 反应体系中的扩增缓冲液 (成份: 100mM Tris-Cl, 500mM KCl, 15mM MgCl₂)、dNTP TaKaRa Taq 购自大连宝生物工程公司, 引物

2003-09-24收稿, 2004-02-11 修回。

* 广西科技攻关项目 (桂科攻 0235018-1) 资助。

(146F1, 146R1)^[2]由上海博亚生物技术有限公司合成,电泳 DNA Marker购自华美生物工程公司。PCR仪为 Hema4800基因扩增仪。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取

模板 DNA提取参照吕玲等^[3]的改进方法。取病虾鳃、胃、附肢、肌肉等约 0.5 g,加 10倍 TN冰浴匀浆,8000 r·min⁻¹,离心 5 min,取上清,加入蛋白酶 K (50 mM·L⁻¹ KCl; 10 mM·L⁻¹ Tris-Cl, pH 值为 8.3; 明胶 0.1 mg·mL⁻¹; NP-40, 0.4%; Tween 20, 0.4%) 于 45℃温浴 30 min,再于沸水中煮 10~15 min,冰浴 5 min,高速离心,取上清。通过紫外分光光度计 260 nm 处的读数,计算出上清 DNA 的浓度,用 ddH₂O 水稀释,使其浓度为 10⁸ g·mL⁻¹,此即模板 DNA。

1.2.2 PCR反应体系

PCR反应总体积为 20 μL,其中 DNA 模板 2.0 μL (10⁸ g·mL⁻¹), 10× PCR Buffer 2.0 μL, DNA 模板和缓冲液体积不变,而 dNTP (各 2.5 mM·L⁻¹), 引物 (25 μM·L⁻¹)、Taq 酶 (0.5 U·μL⁻¹) 中的 2 种成分在采用产品提供商推荐用量下,另一种成分用量进行系列改变,然后用 ddH₂O 补充体积至 20 μL。

1.2.3 PCR扩增程序

样品在 Hema4800 基因扩增仪上进行扩增,扩增程序为 Lo 等^[2]采用程序的改进,即 94℃ 变性 5 min; 94℃ 45s, 55℃ 45s, 72℃ 90s, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存。

1.2.4 电泳检测

取扩增产物 5.0 μL 在 0.7% 琼脂糖凝胶上进行电泳,紫外分析仪下观察并拍照。

2 结果

2.1 dNTP 用量改变对 PCR 扩增的影响

DNA 模板 2.0 μL, 扩增缓冲液 (10×) 2.0 μL, 引物和 Taq 酶在推荐用量下,即引物 1.0 μL, Taq 酶 2.0 μL, dNTP 分别为 0.5 μL, 1.0 μL, 1.5 μL, 2.0 μL, 2.5 μL, ddH₂O 补充体积至 20 μL, PCR 扩增情况见图 1。从图 1 可见, dNTP 用量为 1.0 μL, 1.5 μL 时,扩增条带荧光很强, 2.0 μL 时荧光稍强,其次为 0.5 μL, 2.5 μL 时荧光最弱。

2.2 引物用量改变对 PCR 扩增的影响

DNA 模板 2.0 μL, 扩增缓冲液 (10×) 2.0 μL, dNTP 和 Taq 酶在推荐用量下,即 dNTP 2.0 μL, Taq 酶 2.0 μL, 引物分别为 0.5 μL, 1.0 μL, 1.5 μL, 2.0 μL, 2.5 μL, ddH₂O 补充体积至 20 μL, PCR 扩增情况见图

2。从图 2 可见,引物为 0.5 μL 时,扩增条带荧光最强,其余依次为 1.0 μL, 1.5 μL, 2.0 μL, 2.5 μL。

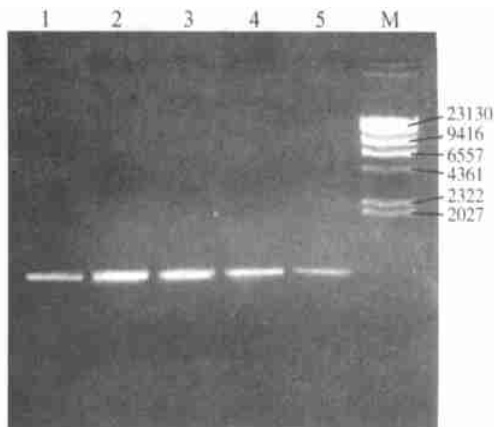


图 1 不同 dNTP 用量对 PCR 扩增的影响

Fig. 1 PCR amplified products affected by different quantity of dNTP

M: DNA marker; 1: 0.5 μL; 2: 1.0 μL; 3: 1.5 μL; 4: 2.0 μL; 5: 2.5 μL

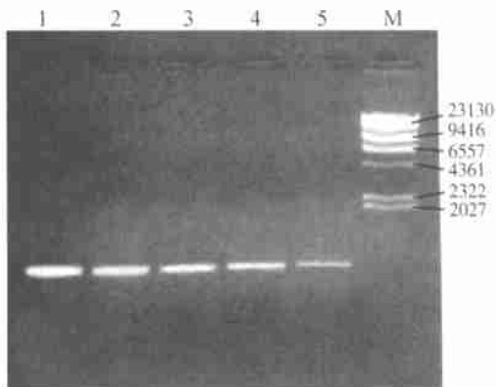


图 2 不同引物用量对 PCR 扩增的影响

Fig. 2 PCR amplified products affected by different quantity of primer

M: DNA marker; 1: 0.5 μL; 2: 1.0 μL; 3: 1.5 μL; 4: 2.0 μL; 5: 2.5 μL

2.3 Taq 酶用量改变对 PCR 扩增的影响

DNA 模板 2.0 μL, 扩增缓冲液 (10×) 2.0 μL, dNTP 和引物在推荐用量下,即 dNTP 2.0 μL, 引物 1.0 μL, Taq 酶分别为 0.5 μL, 1.0 μL, 1.5 μL, 2.0 μL, 2.5 μL, ddH₂O 补充体积至 20 μL, PCR 扩增情况见图 3。从图 3 可见, Taq 酶为 1.0 μL, 1.5 μL, 2.0 μL, 2.5 μL 时,荧光强度相似,为 0.5 μL 时,荧光强度稍弱。

3 讨论

PCR 的反应体系,主要包含 DNA 模板、热稳定的 DNA 聚合酶、引导 DNA 合成的一对寡核苷酸引物、脱氧核苷三磷酸 (dNTP)、二价阳离子、一价阳离子、维持 pH 值的缓冲液。扩增缓冲液中的 Mg²⁺ 用

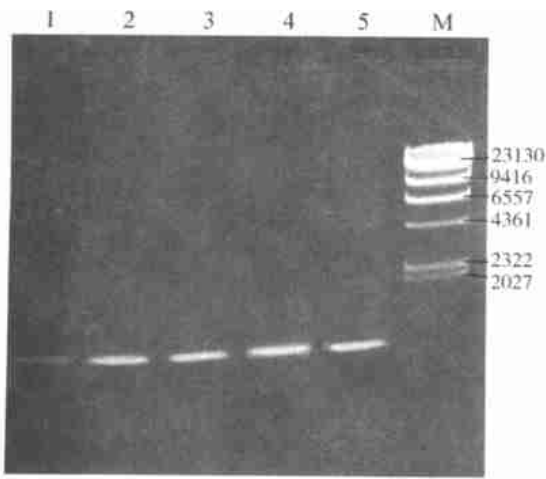


图 3 不同 Taq 酶用量对 PCR 扩增的影响

Fig. 3 PCR amplified products affected by different quantity of Taq polymerase

M: DNA marker; 1: 0.5 μ l; 2: 1.0 μ l; 3: 1.5 μ l; 4: 2.0 μ l; 5: 2.5 μ l.

于激活 Taq 酶; K^+ 有利于扩增大于 500bp 长度的 DNA 片段; Tris-Cl 用于维持体系的 pH 值^[4]。在本实验中,加入的模板约为 20ng DNA,相当于几千个拷贝数的模板量加入到反应体系中。我们对模板和扩增缓冲液的用量不改变,只是对 dNTP 引物、Taq 酶的用量进行系列对比,以确定适合我们实验用的各反应成分的量比关系。

dNTP 中包含 4 种等摩尔浓度的脱氧核苷三磷酸,各为 $2.5 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1}$,其建议用量为每种 dNTP 浓度为 $200 \sim 250 \mu \text{ M} \cdot \text{L}^{-1}$,而本实验中,每种 dNTP 用量在 $125 \sim 187 \mu \text{ M} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,扩增效果最好,其次为 $250 \mu \text{ M} \cdot \text{L}^{-1}$,再其次的为 $62.5 \mu \text{ M} \cdot \text{L}^{-1}$,而在 $312.5 \mu \text{ M} \cdot \text{L}^{-1}$ 时扩增作用已明显减弱,推断为 dNTP 浓度过高时,对扩增反应起抑制作用,这可能是 dNTP 与 Mg^{2+} 螯合而引起的。

对虾白斑病毒的特征引物及其合成产物见诸报道的有几种^[5-7],我们采用的是合成目标产物为 1447 bp 的一对外引物。在我们的实验中,引物浓度为 $0.6 \mu \text{ M} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,扩增作用最好,引物浓度依次增大时,扩增作用则相应减弱。这可能与高浓度的引物易引发错配,导致非特异性扩增有关。

当体系中 Taq 酶用量达到 0.5 u 及以上,扩增已很明显,而低于这一用量,则因用量不足而限制扩增。Taq 酶用量,与模板 DNA 量及提取方法有关,模板 DNA 量增大或模板中含有机质或内源性物质增多时,Taq 酶用量则需相应增大,但亦应在一定范围内。因 Taq 酶进行引物延伸的效率一般约 0.7,当扩增产物已积累在反应体系中达到 $1.4 \times 10^{12} \sim 7 \times 10^{12}$ 分子数时,Taq 酶就会成为反应进一步进行的限制性因

素^[8]。

反应体系中, Mg^{2+} 的浓度为 $1.5 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1}$,因 dNTP 与寡核苷酸引物皆能结合 Mg^{2+} ,有报道认为,适当增加 Mg^{2+} 的浓度至 $4.5 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $6 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1}$ 可减少非特异性引导^[9],但亦有相反的报道^[10]。我们的扩增缓冲液是含有 3 种成分的混合液,因而采用产品提供商的建议用量,而没有进行预实验。

PCR 反应体系中的各组分总是处于相互动态制约中,只有当各组分朝着我们设计的目标并协同作用时,PCR 才能达到预期的扩增。当反应进行中,随着各组分参与反应的量的变化,体系的平衡状态则随之调整,而此时,往往因其中某些成分的变化,限制了反应的进一步扩增。因此,PCR 体系的改进也是相对的,也应是动态变化的,同时,PCR 方法本身也是在不断发展中。

参考文献

- 1 谢数涛,仁涛,辛朝安.对虾白斑综合症病毒的传播途径.见:张本,周永灿,黄勃.虾类养殖研究.北京:海洋出版社,2002.143~146.
- 2 Lo C F, Ho C H, Peng S E, et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. Diseases of Aquatic Organism, 1996, 27: 215~225.
- 3 吕玲,何建国,谢数涛,等.白斑综合症杆状病毒 PCR 检测方法的改进及应用.热带海洋,2000,19(2): 90~95.
- 4 Riedel K H, Wingfield B D, Britz T J. Combined influence of magnesium concentration and polymerase chain reaction specificity enhancers. FEMS Microbiol Lett, 1992, 92: 69~72.
- 5 王旭,史成银,黄.用于 PCR 检测对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒 (HHNBV) 的一种快速提取 DNA 的方法.海洋水产研究,2000,21(1): 8~12.
- 6 徐丽美,杨丰.利用定量 PCR 方法研究对虾白斑杆状病毒感染与发病的关系.高技术通讯,2001,12: 9~11.
- 7 史成银,黄,杨冰,等.应用 PCR 和 RT-PCR 技术对 4 种对虾病毒的检测.海洋水产研究,2003,24(1): 1~5.
- 8 Lubin M B, Elashoff J D, Wang S J, et al. Precise gene dosage determination by polymerase chain reaction. Theory, methodology, and statistical approach. Mol Cell Probes, 1991, 5: 307~317.
- 9 Krawetz S A, Pon R T, Dixon G H. Increased efficiency of the Taq polymerase catalyzed polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res, 1989, 17: 819.
- 10 Harris S, Jones D B. Optimisation of the polymerase chain reaction. Br J Biomed Sci, 1997, 54: 166~173.

(责任编辑:邓大玉)