

白斑综合征病毒 PCR 检测中使用 dUTP 扩增的 PCR 产物极限长度

于洪涛^{1,2} 张秀丽¹ 黄 健^{1*} 张士璀²

(¹中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²中国海洋大学, 青岛 266003)

摘 要 依据白斑综合征病毒的序列设计了 7 对 PCR 引物, 扩增长度从 600bp 到 1 800bp。结果显示, 使用 dUTP 代替 dTTP, 用普通 *Taq* 酶所能扩增的最大长度约为 1 400bp。Mg²⁺ 梯度研究发现, 扩增片段长度越长, 最适 Mg²⁺ 浓度越低。使用具有 3'-5' 外切酶活性的 *Taq* 酶无法扩增出任何长度的片段。

关键词 dUTP WSSV PCR 极限长度

中图分类号 S945 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2011)06-0063-06

The utmost length of PCR product in detection of white spot syndrome virus (WSSV) using dUTP

YU Hong-tao^{1,2} ZHANG Xiu-li¹ HUANG Jie^{1*} ZHANG Shi-cui²

(¹Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²Ocean University of China, Qingdao 266003)

ABSTRACT To prevent carry-over contamination, dTTP was replaced by dUTP in PCR detection for white spot syndrome virus (WSSV). Seven pairs of primers were designed according to the genome sequence of WSSV. The 600~1 800bp DNA fragments were amplified separately. It was found that the utmost length of PCR product is about 1 400bp, when dUTP is used to take place of dTTP.

KEY WORDS dUTP WSSV PCR Utmost length

白斑综合征病毒是危害对虾养殖业可持续发展最为严重的一种对虾病原, 该病毒宿主广泛, 对虾、螯虾、蟹类、淡水甲壳类及轮虫都可以被其感染(Lo *et al.* 1996; Maeda *et al.* 2000; Hameed *et al.* 2003; Yan *et al.* 2004), 且致死能力极强, 已严重威胁整个海洋生态系统的平衡(Jory *et al.* 1999)。

聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)灵敏度高, 可从微量样品中大量扩增目的产物。目前 PCR 及其衍生出的巢式 PCR、竞争性 PCR、多重复合 PCR、二温式多重 PCR 等方法已成为检测和定量 WSSV 的主要分子生物学方法(Sritunyalucksana *et al.* 2006; Peinado-Guevara *et al.* 2006; Tang *et al.* 2000; Galavíz-Silva *et al.* 2004; 吴文林等 2005; 谢芝勋等 2005)。PCR 的灵敏高度使 PCR 的扩增易造成假阳性, 扩增产物的遗留被认为是污染的主要来源之一。在白斑综合征病毒的 PCR 检测中使用 dUTP 加尿嘧啶-DNA 糖基酶(UNG)的组合可防止 PCR 产物造成的遗留污染; 将 dTTP 置换为 dUTP, 在每次扩增前用 UNG 处理 PCR 混

和物可将之前残留的 PCR 产物消化(Longo *et al.* 1990),以此来达到防止遗留污染的目的。

闫冬春等(2003)通过实验确定了在使用 UNG 的情况下最适宜的 dUTP 和 Mg^{2+} 浓度分别为 0.4 和 2.0 mmol/L,但在实验中作者发现,使用此浓度即使优化条件也无法扩增出长度较长的 PCR 产物。本研究通过扩增一系列不同长度的片段,确认了此条件下所能扩增的最大长度以及最适 Mg^{2+} 浓度的变化趋势。

1 材料和方法

1.1 材料

感染 WSSV 的病虾由中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与病原分子生物学实验室于 2003 年采自青岛胶南, $-80^{\circ}C$ 保存。dATP、dCTP、dTTP、dGTP 购自 Promega, dUTP 购自 MBI, UNG 购自 Fermentas, 两种 Taq 酶分别使用 TaKaRa *rTaq* 和 TianGen Platinum Taq, PCR 引物合成于上海生工生物工程有限公司。

1.2 PCR 引物及程序

根据 GenBank 上公布的 WSSV 中国株的全序列 AF332093(Yang *et al.* 2001),选择基因组中的保守区 DNA 聚合酶基因的序列(开放阅读框 wsv514),用 Primer Premier 5.0 软件设计 7 对引物,扩增长度 600~1 800 bp 成等差数列,引物序列及退火温度见表 1, 600~1 000 bp 长度每个循环延伸 1 min, 1 200~1 800 bp 长度每个循环延伸 2 min。

表 1 扩增长度引物
Table 1 Primer pairs for different size of product

引物对名称 Primer pair	扩增长度 Length of amplified fragment (bp)	退火温度 Annealing temperature ($^{\circ}C$)	引物序列(5'-3') Sequence of primers	引物对名称 Primer pair	扩增长度 Length of amplified fragment (bp)	退火温度 Annealing temperature ($^{\circ}C$)	引物序列(5'-3') Sequence of primers
600bp-screen	608	50.9	S:GCCAAAGTGAGTAGTGTCG A:GCAATATCAATGGGTCTGT	1 400bp-screen	1 411	50.3	S:AATTATTCCCATCCTAGTCA A:TCTTCTCCCTCCGTTTT
800bp-screen	804	50.3	S:ATTACGGTGAAGACGACG A:CAGCCATCAAATCTACAGAG	1 600bp-screen	1 619	50.1	S:TCCAATACCATCCCCTT A:TCGCCGACACTACTACT
1 000bp-screen	1 005	50.6	S:CAGATGGGTATGTTGTTC A:CGTCTCACCGTAATCCT	1 800bp-screen	1 795	50.0	S:GAACGCAACAAGTTATCC A:TTCTCCATCACCTACAAT
1 200bp-screen	1 197	52.6	S:GCTCGCCAAAGTGAGTAGTGT A:GAATCAAATGCGCCAACG				

1.3 使用 dUTP 扩增极限长度的确定

采用 50 μ l PCR 体系,使用 3 种 dNTP 混合物:体系 1 为 dATP、dCTP、dTTP、dGTP 各 0.2 mmol/L, Mg^{2+} 浓度 1.5 mmol/L;体系 2 为 dATP、dCTP、dGTP、dUTP 各 0.2 mmol/L, Mg^{2+} 浓度 1.5 mmol/L;体系 3 使用闫冬春等(2003)的方法, dATP、dCTP、dGTP 各 0.2 mmol/L, dUTP 0.4 mmol/L, Mg^{2+} 浓度 2.0 mmol/L;各对引物的终浓度 1 μ mol/L,分别使用普通无 3'-5'外切酶活性的 *taq* 酶和具有 3'-5'外切酶活性的 Platinum Taq 进行平行实验,实验重复 3 次。扩增结束后,取 2 μ l 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检查结果。

确定能够扩增的最大长度后,使用体系 4: dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP 各 0.2 mmol/L, Mg^{2+} 浓度 2.0 mmol/L,用普通 Taq 酶扩增长于极限长度的片段,产物经紫外分光光度计定量后,按 10ng 加入 0.5U UNG 的比例, $37^{\circ}C$ 消化 10 min, 1%琼脂糖凝胶电泳检查结果。

同时使用普通 Taq 和 Platinum Taq,采用体系 4 扩增 600 bp 长度的片段。

1.4 随扩增长度变化最适 Mg^{2+} 浓度变化趋势的确定

设 4 个 Mg^{2+} 浓度梯度,终浓度分别为 1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L。使用体系 3 分别扩增 1 000、1 200、

1 400、1 600 bp 长度的片段。灵敏度高、特异性强的 Mg^{2+} 浓度为各个长度扩增的最适浓度。

1.5 部分样品的 PCR 检测

实验中所检测的 WSSV 样品来自 10 个地区(表 2),获得途径有实验室保存、现场采集、空运等。利用优化的系统检测样品的发病率,选择 13 个地区比较典型的一份样品检测。

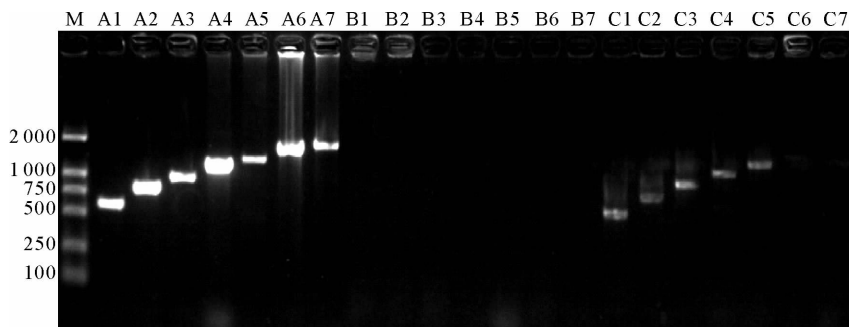
表 2 实验中各分离株来源情况
Table 2 Origin of the Chinese WSSV isolates used in this study

来源地 Origin	采集时间 Sampling date	简称 Name	宿主 Host	状态 Status	保存或运输方式 Store/ transportation	来源地 Origin	采集时间 Sampling date	简称 Name	宿主 Host	状态 Status	保存或运输方式 Store/ transportation
山东胶南	2003-05-30	03	凡纳滨对虾	已发病	实验室-80℃冻存*	天津汉沽	2007-07-10	HG	斑节对虾	尚未发病	空运
山东胶南	2004-08-31	04	凡纳滨对虾	已发病	实验室-80℃冻存*	河北丰南	2007-07-10	FN	凡纳滨对虾	尚未发病	空运
山东胶南	2006-07-18	06	凡纳滨对虾	已发病	实验室-80℃冻存*	辽宁锦州	2007-08-5	JZ	凡纳滨对虾	尚未发病	空运
广东中山	2004	ZS	斑节对虾	已发病	实验室-80℃冻存#	辽宁庄河	2007-07-25	ZH	日本对虾	尚未发病	空运
广东江门	2007-04-4	JM	凡纳滨对虾	已发病	现场采集	山东昌邑	2007-08-31	CY1	中国对虾	已发病	现场采集
山东东营	2007-08-25	DY	凡纳滨对虾	已发病	现场采集	山东昌邑	2007-08-31	CY2	三疣梭子蟹	已发病	现场采集
河北黄骅	2007-08-8	HH	凡纳滨对虾	尚未发病	空运						

2 结果

2.1 使用 dUTP 扩增极限长度

作为参照的体系 1 所有 7 个长度的片段都可扩增出,体系 2 所有长度的片段都不能扩增出,体系 3 扩增出了 600、800、1 000、1 200、1 400 bp 长度的片段,1 600、1 800 bp 长度没有扩增出(图 1)。由此得出结论,1 400 bp 左右是使用 dUTP 扩增的极限长度。



A. 体系 1, B. 体系 2, C. 体系 3
M. Marker, 1~7. 600~1 800 bp 扩增长度为 200 bp 等差序列
A. System I B. System II C. System III
M. Marker 1~7. 600~1 800bp amplification length as a 200bp arithmetic progression

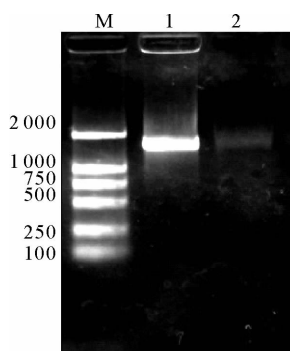
图 1 使用 3 种 dNTP 混合物体系 PCR 扩增长度梯度效果对比

Fig. 1 PCR on ever size of product by 3 systems of dNTP mixture

1 600 bp 长度的片段使用体系 4 扩增,如图 2 所示。在相应长度位置有一条明亮条带,此产物经 UNG 消化后亮度明显变暗,证明在 PCR 反应体系中等量加入 dUTP 和 dTTP 时,会有部分 dUTP 掺入 1 600 bp 长度的 PCR 产物中。

2.2 随扩增长度变化最适宜 Mg^{2+} 浓度变化趋势

由图 3 可以看出,1 000 bp 长度 Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L 时的扩增效果最佳,1 200 和 1 400 bp Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L 时扩增效果最佳,而 1 600 bp 长度即使调整 Mg^{2+} 浓度也无法扩增出。由此可见,在能够扩增的范围内,随扩增长度延长最适宜 Mg^{2+} 浓度逐渐变低。

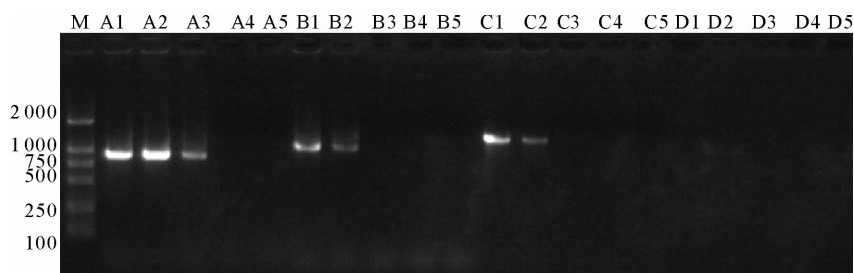


M. Marker, 1. 消化前, 2. 消化后

M. Marker, 1. Before digestion, 2. After digestion

图 2 1 600bp 产物 UNG 消化前后

Fig. 2 Product with size of 1 600bp before and after digestion



A. 1 000 bp, B. 1 200 bp, C. 1 400 bp, D. 1 600 bp

1. 1.5 mmol/L, 2. 2.0 mmol/L, 3. 2.5 mmol/L,

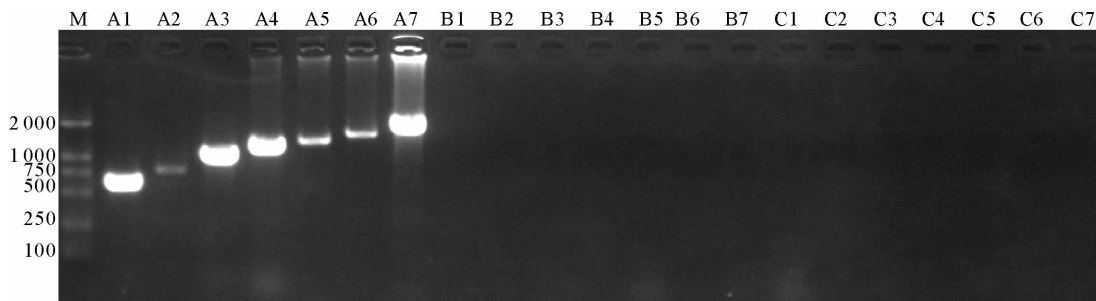
4. 3.0 mmol/L, 5. 阴性对照 Negative control

图 3 不同长度 Mg^{2+} 浓度梯度扩增效果

Fig. 3 PCR result comparison with different Mg^{2+} concentration

2.3 Platinum *taq* 扩增结果

具有 3'-5'外切酶校正功能的 *Taq* 酶会将掺入到 PCR 产物中的 dUTP 视为错配碱基而将其切除。如图 4 所示,使用 Platinum *Taq* 时,体系 2 和体系 3 都没有相应的条带扩增出,而用体系 4 扩增 600 bp 长度片段时也未能扩增出(图 5),证明有 dUTP 存在时会干扰 Platinum *Taq* 识别 dTTP,从而不能将其掺入到合成的产物中。



A. 体系 1, B. 体系 2, C. 体系 3

M. Marker, 1~7. 600~1 800 bp 扩增长度为 200 bp 等差序列

A. System I B. System II C. System III

M. Marker, 1~7. 600~1 800 bp amplification length as a 200bp arithmetic progression

图 4 使用 Platinum *Taq* 扩增各长度效果

Fig. 4 PCR result by platinum *Taq*

2.4 各分离株 WSSV 检测结果

分离株 03、04、06 和 ZS 分别为中国水产科学研究院黄海水产研究所病研室与中国水产科学研究院南海水产研究所病研室保存的感染白斑综合征病毒的病虾样品,之前已确认为阳性,在此以 03 株作为阳性对照,对比其他分离株。结果显示,所有待测分离株均为 WSSV 阳性(图 6),因此,确定此 13 个分离株都可以作为以后实验的分析材料。

3 讨论

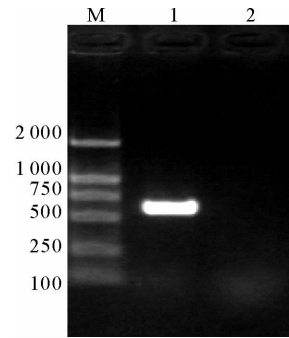
虽然有报道说 dUTP 与 dTTP 之间的直接置换 (0.2 mmol/L) 一般不会影响扩增能力(Rys *et al.* 1993;Kox *et al.*

1994),本实验的结果却证明,当 dUTP 的浓度与其他 3 种 dNTP 浓度相同时无法扩增出相应长度的 PCR 产物(图 1),这显然说明二者之间的直接置换会导致扩增结果的巨大差异。

在实验过程中我们发现,闫冬春等(2003)确定的 dUTP 浓度和 Mg^{2+} 浓度即使在不使用 UNG 防遗留污染的条件下也是最优浓度(过程在此未列出)。但依此条件进行实验时却发现,较长的 PCR 产物难以扩增,而短片段却可以扩增出,依此推断使用此条件可能有极限扩增长度的限制,本实验确认这个极限扩增长度为 1 400 bp 左右。在进行的 3 次重复实验中,600~1 200 bp 的片段每次都能扩增出,而 1 400 bp 只有一次扩增出,说明在可以扩增的极限长度以内,产物越长越不稳定。虽然 dUTP 与 dTTP 等浓度混合可以很好地扩增出长于极限长度的产物(图 2),但这样做失去了 UNG 防止遗留污染的基础。

当使用具有 3'-5' 外切酶校正功能的 *Taq* 酶时不能使用 dUTP。此外,从本实验中的凝胶电泳结果看出,使用 dUTP 扩增的产物长度与 Marker 对比的结果从表观上看比实际的产物长度短,这也给凝胶电泳结果的软件分析,如 Gel Pro 分析等带来一定的麻烦。

不同的靶序列/引物组合对 dUTP 浓度的敏感度不同(Hohlfeld *et al.* 1994),使用 dUTP 加 UNG 的组合虽然可以有效地防止遗留污染,但需要视具体的实验情况而定。我们建议在以下几种情况下应慎用或不用 dUTP 加 UNG 的组合:(1)需要扩增的产物长度超过 1 400 bp(尽量不超过 1 200 bp)时;(2)目的产物长度未知时,如扩增基因组可变区;(3)产物需测序,对产物序列的保真度要求较高,需用高保真聚合酶时。



M. Marker, 1. 普通 *Taq*, 2. Platinum *Taq*
M. Marker, 1. Regular *Taq*, 2. Platinum *Taq*
图 5 普通 *Taq* 与 Platinum *Taq* 采用
体系 4 扩增 600 bp 长度比较

Fig. 5 PCR result comprison for 600bp
product with regular *Taq* and platinum *Taq*

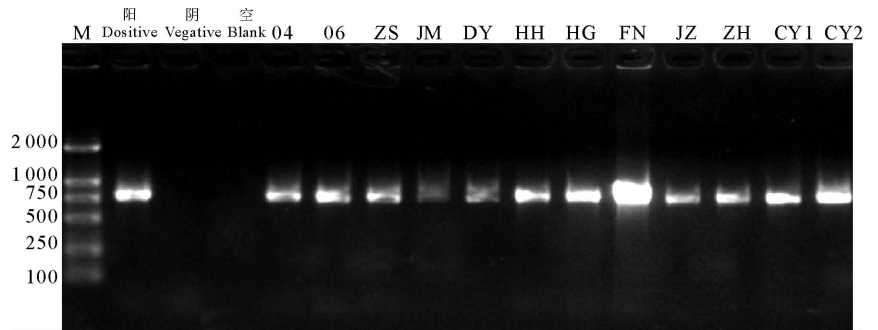


图 6 各分离株 WSSV 检测结果

Fig. 6 WSSV screen for all of the isolates

参 考 文 献

- 闫冬春,黄 捷,董双林,杨 冰. 2003. PCR 检测对虾白斑综合征病毒(WSSV)中使用 UNG 防遗留污染. 海洋水产研究, 24(3): 29~33
吴文林,戴聪杰,王 磊. 2005. PCR 法分析 WSSV 在日本对虾体内的感染增殖. 泉州师范学院学报(自然科学), 23(2): 77~80
谢芝勋,庞耀珊,刘加波,邓显文,唐小飞. 2005. 二温式多重 PCR 检测鉴别对虾白斑综合征病毒(WSSV)和传染性皮下及造血器官坏死病毒(IHNV)的研究与应用. 海洋科学, 29(12): 9~12
Galaviz-Silva, L., Molina-Garza, Z. J., Alcocer-González, J. M. *et al.* 2004. White spot syndrome virus genetic variants detected in Mexico by a

- new multiplex PCR method. *Aquaculture*, 242 (1-4): 53~68
- Hameed, A. S. S., Balasubramanian, G., Musthaq, S. S. *et al.* 2003. Experimental infection of twenty species of Indian marine crabs with white spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Organ.* 57(1-2): 157~161
- Hohlfeld, P., Daffos, F., Costa, J. M. *et al.* 1994. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *New. Engl. J. Med.* 331(11):695~699
- Jory, D. E., and Dixon, H. M. 1999. Shrimp white spot virus in the Western Hemisphere. *Aquac. Mag.* 25(3): 83~91
- Kox, L. F., Rhienthong, D., Miranda, A. M. *et al.* 1994. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 32(3):672~678
- Lo, C. F., Ho, C. H., Peng, S. E. *et al.* 1996. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis. Aquat. Organ.* 27(3): 215~225
- Longo, M. C., Berninger, M. S., and Hartley, J. L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, 93(1):125~128
- Maeda, M., Itami, T., Mizuki, E. *et al.* 2000. Red swamp crawfish (*Procambarus clarkii*): An alternative experimental host in the study of white spot syndrome virus. *Aqua Virol.* 44(6): 371~374
- Peinado-Guevara, L. I., and Lopez-Meyer, M. 2006. Detailed monitoring of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp commercial ponds in Sinaloa, Mexico by nested PCR. *Aquaculture*, 251 (1): 33~45
- Rys, R. N., and Persing, D. H. 1993. Preventing false positives: Quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. *J. Clin. Microbiol.* 31(9): 2 356~2 360
- Sritunyalucksana, K., Srisala, J., McColl, K. *et al.* 2006. Comparison of PCR testing methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp. *Aquaculture*, 255 (1-4): 95~104
- Tang, K. F. J., and Lightner, D. V. 2000. Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. *Aquaculture*, 189(1-2): 11~21
- Yan, D. C., Dong, S. L., and Huang, J. 2004. White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. *Dis. Aquat. Organ.* 59(1): 69~73
- Yang, F., He, J., Lin, X. H. *et al.* 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J. Virol.* 75(23): 11 811~11 820