

Penicillium was immobilized on chitosan by glutaraldehyde. The results indicated that the immobilized-hemicellulase prepared by 0.5 g chitosan crosslinking with 4% glutaraldehyde and then combining with 2.5 mg protein showed higher enzyme activity and better activity recoveries (45.6%). The optimum pH of soluble enzyme and immobilized enzyme were pH 4.6 and pH 3.6 respectively. The optimum temperature of soluble

enzyme was 55 °C, whereas immobilized showed high activity in 60 ~ 75 °C. Thermal stability of immobilized enzyme was better than soluble enzyme at 65 °C. The apparent K_m of the immobilized enzyme was 3.58×10^{-2} g/L and the K_m of soluble enzyme was 5.0×10^{-2} g/L with hemicellulose as the substrate.

Key words chitosan, hemicellulase, immobilized enzyme

分子信标探针用于 PCR 检测对虾白斑杆状病毒*

章晓波 徐 洵^{1,2)} 李庆阁³⁾ 徐丽美²⁾

(中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230026)

摘要 将对虾白斑杆状病毒的一段特异性 DNA 设计成分子信标探针, 用于该病毒的 PCR 检测. 温度与荧光强度之间的关系表明, 所设计探针的发夹既可以形成也可以打开, 符合 PCR 对分子信标探针的要求. 结果表明, 在 PCR 同时加入分子信标探针不影响 PCR 扩增, 分子信标探针只能与目的 DNA 杂交, 具有较高的特异性. 随着 PCR 循环数的增加以及含目的 DNA 的质粒拷贝数的增加, 荧光强度都随之增强.

关键词 对虾白斑杆状病毒, PCR, 分子信标探针

学科分类号 Q78

对虾白斑杆状病毒 (prawn white spot bacilliform virus, WSBV) 是引起对虾病害的一种主要病原, 在我国和亚洲养殖对虾中高度感染, 引起很大的经济损失, 但是至今为止对于这种没有包涵体的新型杆状病毒不能进行有效治疗. 通过早期诊断、及早预防, 有利于防止此病毒的发生. 对虾白斑杆状病毒的检测方法中, 多聚酶链反应 (PCR) 是一种较为简便快速且有效的方法^[1~3], PCR 扩增产物的检测通常采用琼脂糖凝胶电泳. 依据荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 原理^[4~6], Tyagi 和 Kramer^[7]首次建立一种新的荧光探针即分子信标 (molecular beacon) 探针, 用荧光素和淬灭剂分别在两端同时标记发夹式探针, 这种探针尤其适合于 PCR. 在 PCR 同时加入分子信标探针, 根据扩增产物是否产生荧光, 以确定目的 DNA 的有无, 使得 PCR 扩增和扩增产物的检测在同一封闭的试管中进行, 这样不仅可以避免 PCR 后扩增产物琼脂糖电泳过程中可能造成的污染, 简化检测手段, 更重要的是同时进行引物特异性扩增和探针的特异性

杂交检测而极大地提高了方法的特异性. 分子信标探针在 PCR 检测中的应用研究不多, 国内则未见这方面的报道. 为此, 本研究试图将分子信标探针技术应用于对虾白斑杆状病毒的 PCR 检测, 以提高检测的特异性, 简化检测手段.

1 材料与方法

1.1 PCR 扩增的模板制备

将对虾白斑杆状病毒的一段 DNA 克隆在 pBluescript 中, 通过 Sanger 双脱氧法测序后^[8], 设计特异性较高的 PCR 扩增引物 (已申请专利), 按文献 [8] 介绍的方法少量制备重组质粒, 此重组质粒用作 PCR 扩增的模板. 收集发病的对虾, 按文献上的方法制备含对虾白斑杆状病毒的对虾样

*国家“863”计划 (819-02-04) 和国家海洋局海洋生物工程重点实验室开放基金资助项目 (Hy9801).

¹⁾通讯联系人.

²⁾国家海洋局第三海洋研究所海洋生物工程重点实验室, 厦门 361005.

³⁾厦门大学生物系, 厦门 361005.

Tel: (0592) 2085376, E-mail: xxu@public.xm.fj.cn

收稿日期: 1999-03-10, 修回日期: 1999-08-02

品^[9], 用于 PCR 扩增.

1.2 分子信标探针的设计及合成

按照一般杂交探针设计的要求, 从用作 PCR 扩增模板的重组质粒插入片段中选取长 24 bp 的 DNA 片段, 通过分析软件 DNASIS (Hitachi Software Engineering Co. Ltd, 4th version), 将 24 bp 的 DNA 片段与对虾白斑杆状病毒基因组 DNA 序列进行同源比较, 确定一段无同源片段的特异性 DNA. 再按照分子信标探针设计的要求, 在 24 bp 特异性 DNA 片段的 5 和 3 端分别添加互补的且与目的 DNA 无关的 6 个碱基臂, 5 端为 CCTAGA, 3 端为 TCTAGG, 形成一发夹结构 (图 1), 24 bp 特异性 DNA 构成发夹的嘧啶环, 6 个互补碱基配对形成发夹的茎. 在发夹结构的 5 端标记荧光素 FAM, 3 端标记淬灭剂 DABCYL.

分子信标探针由上海生工生物工程有限公司合成, 将合成的探针用 HPLC 纯化: A 液 (0.1 mol/L 醋酸三乙胺) 80% ~ 30%, B 液 (75% 乙腈 + A 液) 20% ~ 70%, 梯度洗脱 25 min, 再用 B 液 (100%) 洗 5 min, 流速 1 ml/min, 收集相应的峰, 得到纯度较高的分子信标探针.

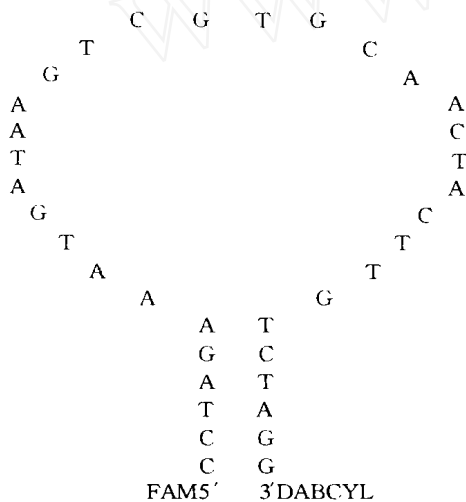


图 1 分子信标探针示意图

1.3 PCR 条件

采用 25 μl 体系: 10mmol/L Tris · HCl (pH 8.9), 50 mmol/L KCl, 2mmol/L MgCl₂, 1mmol/L dNTP, 两端引物均为 10 pmol/L, Taq 酶 1 ~ 2 U, 分子信标探针 596 nmol/L. 按常规 PCR 条件进行扩增: 95 5 min 后, 94 30 s, 58 30 s, 72 45 s, 40 个循环, 95 5 min, 60 45 min.

1.4 荧光检测

PCR 扩增产物用 F4010 (Hitachi) 荧光分光光度计测定荧光, 激发光波长为 491 nm, 散射光波长为 512 nm.

2 结 果

2.1 分子信标探针的可用性

取适量的分子信标探针, 通过改变温度观察其荧光强度的变化. 结果表明 (图 2), 在温度较低的情况下, 荧光强度维持在较低水平, 40 ~ 50 以前随着温度的变化荧光强度变化很小, 表明分子信标探针主要以较为稳定的发夹结构存在. 但是当温度超过 50 后, 随着温度的逐渐升高, 荧光强度急剧增加, 这表明探针的发夹结构迅速打开. 当温度增高到 75 以后, 随着温度的增加, 荧光强度变化不大, 一直维持在较高水平, 表明所有分子信标探针的发夹已全部打开. 随着温度逐渐降低, 观察到的荧光逐渐减弱, 发夹又重新形成. 因此, 我们所设计的分子信标探针的发夹既可形成也可打开, 符合 PCR 过程对分子信标探针的要求.

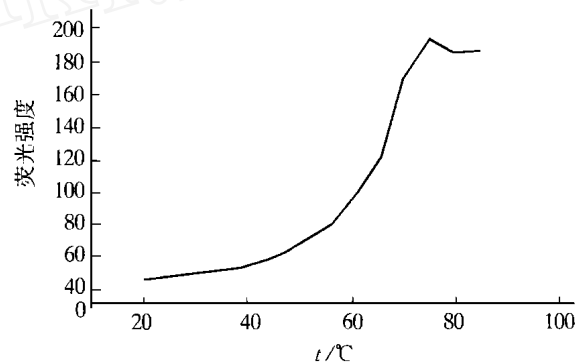


图 2 荧光强度与温度的关系

2.2 分子信标探针对 PCR 扩增的影响

分别以含有对虾白斑杆状病毒特异性 DNA 的阳性质粒和对虾病毒作为 PCR 扩增的模板, 设计两个试验, 其一在 PCR 反应液中加入分子信标探针, 另一试验在 PCR 反应液中不含探针, 同时进行 PCR 扩增. 琼脂糖凝胶电泳结果表明 (图 3), 无论是阳性质粒还是病毒, PCR 反应液中加入探针及不含探针的扩增带基本位于同一位置, 扩增产物的量也基本一致, 这表明在 PCR 同时加入分子信标探针不会影响 PCR 的扩增反应. 任意选取的含对虾白斑杆状病毒 DNA 插入片段的其他质粒和不含 DNA 的阴性对照均没有扩增带.

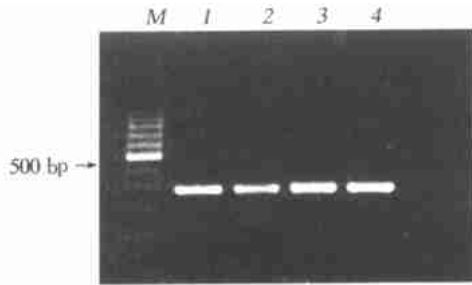


图3 分子信标探针对 PCR 扩增的影响

M: 分子质量标准 (100 bp ladder); 1: 阳性质粒; 2: 阳性质粒 + 分子信标探针; 3: 病毒; 4: 病毒 + 分子信标探针.

2.3 分子信标探针的特异性

分别以含有模板的阳性质粒、对虾白斑杆状病毒、不含模板的对虾白斑杆状病毒 DNA 片段作为模板, 不含 DNA 的样品作为阴性对照, 加入 PCR 反应液和分子信标探针, 在同一条件下进行 PCR 扩增. 扩增产物用紫外激发, 结果阳性质粒及病毒都产生肉眼可见的绿色荧光, 而不含模板的 DNA 片段和阴性对照都只有很弱的荧光, 它们的荧光测定值均低于前者 (图 4). 上述结果说明, 所设计的分子信标探针只能与目的 DNA 杂交, 具有较高的特异性.

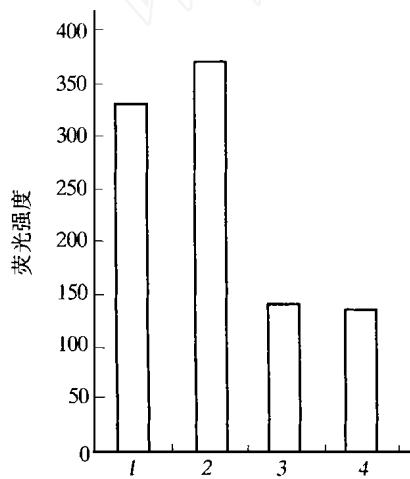


图4 分子信标探针的特异性

1: 阳性质粒; 2: 病毒; 3: 不含模板的对虾白斑杆状病毒 DNA 片段; 4: 阴性对照.

2.4 PCR 循环数对荧光强度的影响

从图 5 可以看到, 随着 PCR 循环数的逐渐增加, 扩增产物的荧光强度也逐渐增大, 其中以 40 个循环的荧光强度最高.

2.5 不同质粒拷贝数与荧光强度的关系

含对虾白斑杆状病毒特异性 DNA 的重组质

粒, 其拷贝数从 10^1 开始以指数增加直至 10^8 , 多次测定结果均表明, 随着重组质粒拷贝数的逐渐增加 (图 6), 荧光强度表现出随之增大的趋势, 拷贝数为 10^1 时荧光强度最小, 10^8 时荧光强度最高.

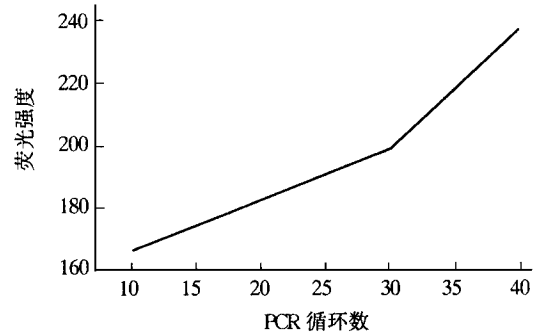


图5 荧光强度与 PCR 循环数的关系

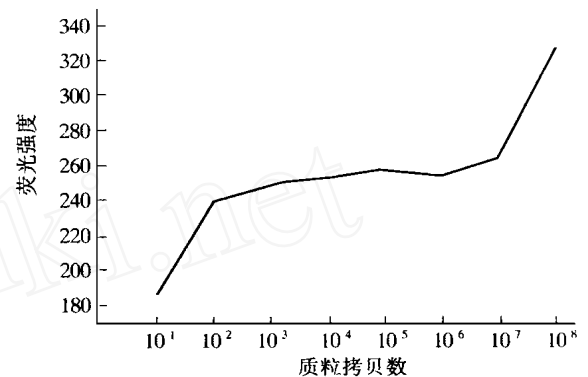


图6 不同质粒拷贝数的荧光强度变化

3 讨 论

分子信标探针依据的原理是荧光共振能量转移 (FRET), 在不存在目的 DNA 的情况下, 分子信标探针两端的 6 bp 碱基臂互补配对, 从而形成发夹结构, FAM 和 DABCYL 相距较近, 此时在紫外激发下, FAM 吸收的能量通过荧光共振能量转移 (FRET) 传递给与之靠近的 DABCYL, DABCYL 再将能量以热量的形式散失, 因此不产生荧光. 当存在对虾白斑杆状病毒目的 DNA 时, 分子信标探针的嘧啶环与目的 DNA 互补结合, 形成比两臂杂交更长也更稳定的杂交, 使发夹打开, FAM 和 DABCYL 随之分开, 在紫外激发下, FAM 吸收能量, 由于 FAM 与 DABCYL 相距较远, FAM 吸收的能量不能转移给 DABCYL, 因此产生荧光.

影响分子信标探针构型变化的参数主要有臂长、臂序列 GC 含量、嘧啶环长度和溶液盐浓度, 尤其是二价阳离子如 Mg^{2+} 对两臂形成的杂交茎有较强的稳定作用^[7]. 嘧啶环长度至少应是臂长的两倍, 才能保证探针与目的 DNA 杂交后荧光素与

淬灭剂分开。臂序列 GC 含量一般在 50 % 以上, 利于形成较稳定的发夹结构。

分子信标探针提出后, Nazarenko^[10]对分子信标探针进行了改进, 他将引物设计成发夹结构, 5 端标记荧光素, 发夹茎上与标记荧光素的碱基互补的碱基标记淬灭剂, 3 端用于 PCR 延伸, 5 端数个碱基与目的 DNA 无关, 其余则均可与目的 DNA 杂交。这种改进提高了探针的有效性, 但是这种方法需要中间碱基标记, 其成本高出末端标记近一倍, 而且按现有技术这种标记的碱基只能是 T, 从而对探针序列多了一种限制, 会影响到其特异性。在 PCR 过程中同时采用特异性引物扩增及探针特异性杂交, 可提高 PCR 的特异性, 而改进的方法没有这种优点。因此, 我们采用 Tyagi^[7]的方法设计检测对虾白斑杆状病毒的分子信标探针。

目前荧光染料很多, 分子信标探针依赖的是供体与受体之间的共振能量转移, 为了荧光能被有效淬灭, 供体的发射光谱应完全覆盖受体的激发光谱^[11], FAM 与 DABCYL 符合这一要求。FAM 的荧光效率较高, DABCYL 吸收供体能量后以热量散失, 减少了干扰, FAM-DABCYL 是较好的供体-受体对。

文献报道及我们的试验结果都发现, 分子信标探针与目的 DNA 杂交后, 未杂交的探针有残余荧光, 这可能是由于荧光素和淬灭剂与探针碱基之间的接头过长或杂交茎末端瞬间解开造成的。荧光本底影响了分子信标探针检测的灵敏性, 因此降低荧光本底是需要进一步解决的问题。但在本试验中, 即使在目的 DNA 的拷贝数较低的情况下, 所测得的荧光强度仍然高于本底。

研究结果表明, 不同拷贝数质粒 PCR 扩增后, 荧光强度表现出随拷贝数增加的趋势, 因此有可能根据内标质粒进行 PCR 半定量或定量研究, 但准确定量尚待进一步研究。

参 考 文 献

- Lo C F, Leu J H, Ho C H, *et al.* Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis Aquat Org*, 1996, **25** (1): 133 ~ 141
- Chang P S, Lo C F, Wang Y C, *et al.* Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. *Dis Aquat Org*, 1996, **27** (1): 131 ~ 139
- Lo C F. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis Aquat Org*, 1996, **27** (1): 215 ~ 225
- Cardullo R A, Agrawal S, Flores C, *et al.* Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **85**: 8790 ~ 8794
- Cooper J P, Hagerman P J. Analysis of fluorescence energy transfer in duplex and branched DNA molecules. *Biochemistry*, 1990, **29**: 9261 ~ 9268
- Selvin P R, Hearst J E. Luminescence energy transfer using a terbium chelate: improvements on fluorescence energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 10024 ~ 10028
- Tyagi S, Kramer F R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*, 1996, **14**: 303 ~ 308
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1.25 ~ 1.28, 13.42 ~ 13.74
- Wang W, Yang F, Xu X, *et al.* Detection of prawn white spot baculovirus by polymerase chain reaction. *Acta Oceanologica Sinica*, 1999, **18** (4): 591 ~ 598
- Nazarenko I A, Bhatnagar S K, Hohman R J. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25** (12): 2515 ~ 2521
- Meldal M, Breddam K. Anthranilamide and nitrotyrosin as a donor-acceptor pair in internally quenched fluorescent substrates for endopeptidases: multicolumn peptide synthesis of enzyme substrates for subtilisin carlsberg and pepsin. *Anal Biochem*, 1991, **195**: 141 ~ 147

PCR Detection of Prawn White Spot Bacilliform virus (WSBV) Using Molecular Beacon Probe.

ZHANG Xiao-Bo, XU Xun¹⁾, LI Qing-Ge²⁾, XU Li-Mei¹⁾ (School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China; ¹⁾ Key Laboratory of Marine Biotechnology, The Third Institute of Oceanography, Xiamen 361005, China; ²⁾ Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005, China).

Abstract A molecular beacon probe was used in the detection of prawn white spot bacilliform virus (WSBV). The probe possesses a stem and loop structure. The sequence of loop is complementary to the WSBV DNA, and the stem is formed by two complementary arm sequences which are unrelated to the WSBV DNA. The probe underwent a fluorogenic conformational change as it hybridized to the WSBV DNA. The probe could not affect the amplification, and was specific and sensitive when used in PCR. It was showed that the fluorescent intensities increased as the cycles of PCR and the number of target DNA copy increased.

Key words prawn white spot bacilliform virus, polymerase chain reaction (PCR), molecular beacon probe