

IBV S1 基因不对称 PCR 的研究*

王林川 刘福安

(华南农业大学动物医学系, 广州, 510642)

摘要 DNA模板为 IBV 广东地方株 D41 经病毒 RNA 提取后反转录而获得; 两引物为 IBV Beaudette 株 S1 基因两侧的对应该序列; 跨幅为 1.7kb。当限制性引物 (Oligo 3') 终浓度为 0.8 mg/L、两引物比例为 1:10 时, 即得到不对称 PCR 的预计单链和双链 DNA 产物。此研究结果及不对称 PCR 反应条件为国内首次报道。

关键词 IBV; S1 糖蛋白; 不对称 PCR

中图分类号 S855.3

不对称 PCR 的目的在于生产特定基因片段的单链 DNA, 途径有两条: 一是通过限制性引物的浓度。在 PCR 的反应过程中, 当限制性引物因量少而消耗完后, 非限制性引物继续扩增而产生大量的单链 DNA。二是通过限制性引物的碱基数目与组成, 限制性引物的退火温度 ($T_m = 4[G + C] + 2[A + T] - 5^\circ\text{C}$) 低于非限制性引物的 T_m ; 当经常规 PCR 的几个循环后, 将 PCR 的退火温度提高至非限制性引物的 T_m , 此时限制性引物不能结合到模板上, 只有非限制性引物继续扩增产生大量单链 DNA (Sambrook, 1989)。产生的单链 DNA 可用于制备特定基因的核酸探针及直接进行该基因片段的核苷酸序列分析。本文报道的是用控制限制性引物浓度的方法来制备 IBV (禽传染性支气管炎病毒) S1 基因单链 DNA 的不对称 PCR 研究工作情况。

1 材料与方法

1.1 病毒

IBV 广东地方株 D41 (陈天杰, 1987)。

1.2 IBV RNA 的提取

病毒接种于 10~11 d 龄鸡胚, 经 30 h 后收集尿囊液, 超速离心纯化病毒; 加 SDS (终浓度 2%) 和蛋白酶 K (终浓度 250 mg/L), 55~60 °C 10 min, 再室温 1h, 而后经苯酚、氯仿抽提, 乙醇沉淀, 用 DEPC 处理的蒸馏水悬浮 RNA; 92 °C 作用 5 min 后, 冰浴 5 min, 立即进行反转录。

1.3 PCR 引物

用 MODEL391 · PCR-MATE^(TM) DNA 合成仪自动合成。两条引物各为 27 个碱基; 两引物 3' 端的 21 个碱基, 在 OLIGO5' 为 IBV Beaudette 株 S1 基因 5' 端两侧序列, 在 OLIGO3' 则为与 S2 基因 5' 端两侧互补的序列 (Binns, 1985); 两段引物间为包含有整个 S1 基因的 1700 bp 片段。

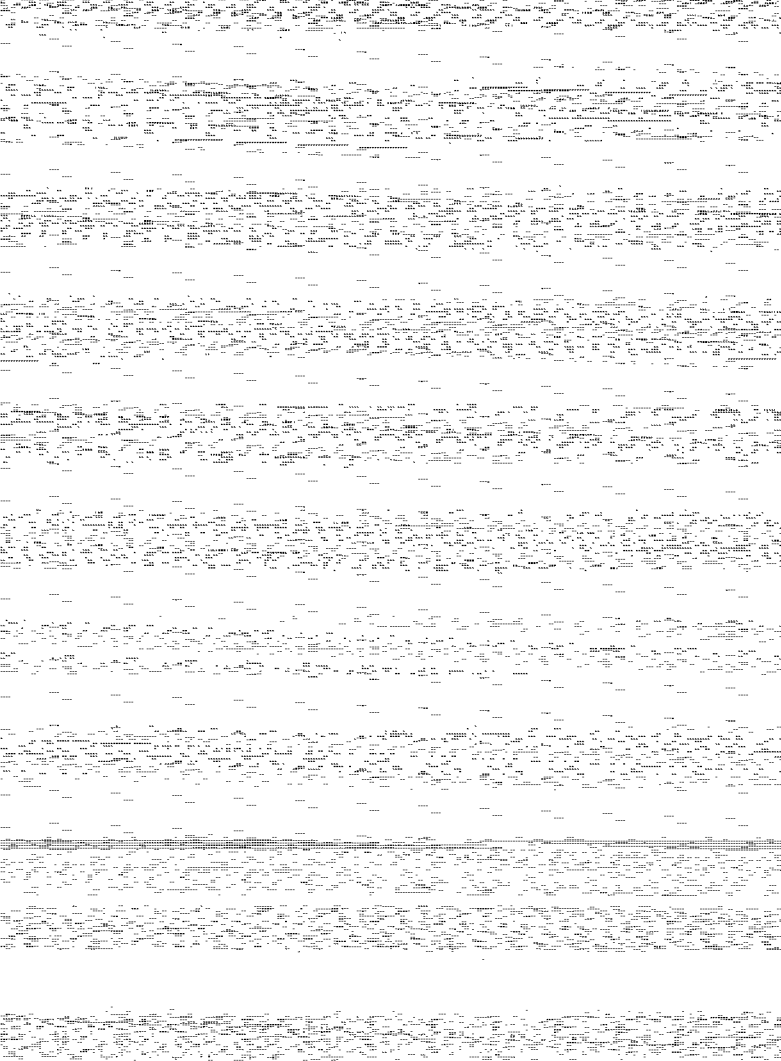
A. 5' —//— [S1 | S2] — [M] — [N] — AAA 3'

B. S1 OLIGO5' ■ → ← ■ S1 OLIGO3'

C. 引物 S1 OLIGO3': 5'TTGGATCCATAACTAACATAAGGGCAA3'

1994-05-26 收稿

* 本文为高等学校博士学科点科研基金资助项目内容



参 考 文 献

- 王林川,刘福安.1994. 禽传染性支气管炎病毒免疫原基因的 RT-PCR 研究. 中国兽医杂志, 20(8): 3~4
- 陈天杰,梁眷衡,廖丽春,等.1987. 鸡传染性支气管炎D41株弱毒疫苗的研究. 广东农业科学, 79(5):46~48
- Binns M M, Boursnell M E G, Cavanagh D, et al. 1985. Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the coronavirus IBV. J gen Virol, 66: 719~726
- Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. 1990. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. California: Academic Press, Inc, 76~83
- Kwon H M, Jackwood M W, Jelb J. 1993. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Avian Dis, 37:194~202
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 14

STUDY ON ASYMMETRIC POLYMERASE CHAIN
REACTION OF THE INFECTIOUS BRONCHITIS S1 GENE

Wang Linchuan Liu Fu'an

(Dept. Vet. Med., South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

A DNA template was got by reverse transcription of the IBV Guangdong local strain D41 genome RNA. Two synthetic primers corresponding to sequences on both flanks of the IBV Beaudette strain spike I (S1) gene, facilitated PCR amplification of 1700-base sequence. When the final concentration of the limiting primer (OLIGO 3') was 0.8 mg/L and the ratio of two primers 1:10, we got expected single- and double-stranded DNA products of asymmetric PCR. This is the first report on asymmetric PCR of IBV S1 gene in China.

Key words IBV; S1 glycoprotein; Asymmetric PCR