

用光敏生物素标记鸡传染性支气管炎病毒 cDNA 探针及其应用的研究

贺东生 S.N.H.Jafary 刘福安 徐立群

(华南农业大学动物医学系, 广州, 510642)

摘要 应用光敏生物素标记鸡传染性支气管炎病毒 cDNA, 制备核酸探针。经斑点杂交法和碱性磷酸酶显色后, 探针同以 cDNA 为模板合成的 PCR 产物及其重组子 pSXIBVS₁ 均呈现强阳性的蓝色斑点, 而与正常尿囊液、新城疫病毒和鸡败血霉形体无杂交。一个初诊为 IB 感染的田间病料与探针杂交阳性结果相符合。试验表明该 cDNA 探针是敏感和特异的检测方法。

关键词 鸡传染性支气管炎病毒; cDNA 探针; 光敏生物素; 核酸杂交

中图分类号 S 855.3

鸡传染性支气管炎病毒 (Infectious Bronchitis Virus, IBV) 是一种冠状病毒, 引起鸡急性高度传染性上呼吸道和支气管感染, 使鸡群增重减少, 产蛋下降、饲料报酬降低, 甚至引起死亡 (Calnek, 1991)。

用鸡胚做病毒血清中和试验是 IBV 的常规鉴定方法, 但它费时长而且繁琐。其它方法如电泳、HI 试验、免疫荧光、琼脂沉淀、气管培养和 ELISA 等均不够理想。此外, 在 IBV 的基因工程疫苗研究中, 也需要一种方法来鉴定和显示 IBV 免疫源基因是否已合成或插入到适宜的载体上。核酸探针是一种快速敏感的鉴定方法。Hyuk 等 (1993) 和 Jackwood 等 (1992) 研制的探针系采用 PCR 和生物素标记法, 费用昂贵且标记步骤复杂。

我们提取克隆的 IBVcDNA, 经光敏生物素光照标记后制备探针, 杂交检测免疫原基因获得成功, 试验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 E.Coli/p IBVS₁D₄₁。含有 IBV 免疫源基因的大肠杆菌株, 本室保存。

1.1.2 长臂光敏生物素及碱性磷酸酶 (AV-AP) 显色系统, 由军事医科院二所提供。十二烷基磺酸钠 (SDS)、聚蔗糖 (ficoll-400)、聚乙稀吡咯烷酮 (PVP)、鲑精 DNA 等分子杂交试剂为进口分装, 购自广州三元科技公司。杂交尼龙膜为西德 BM 产品。

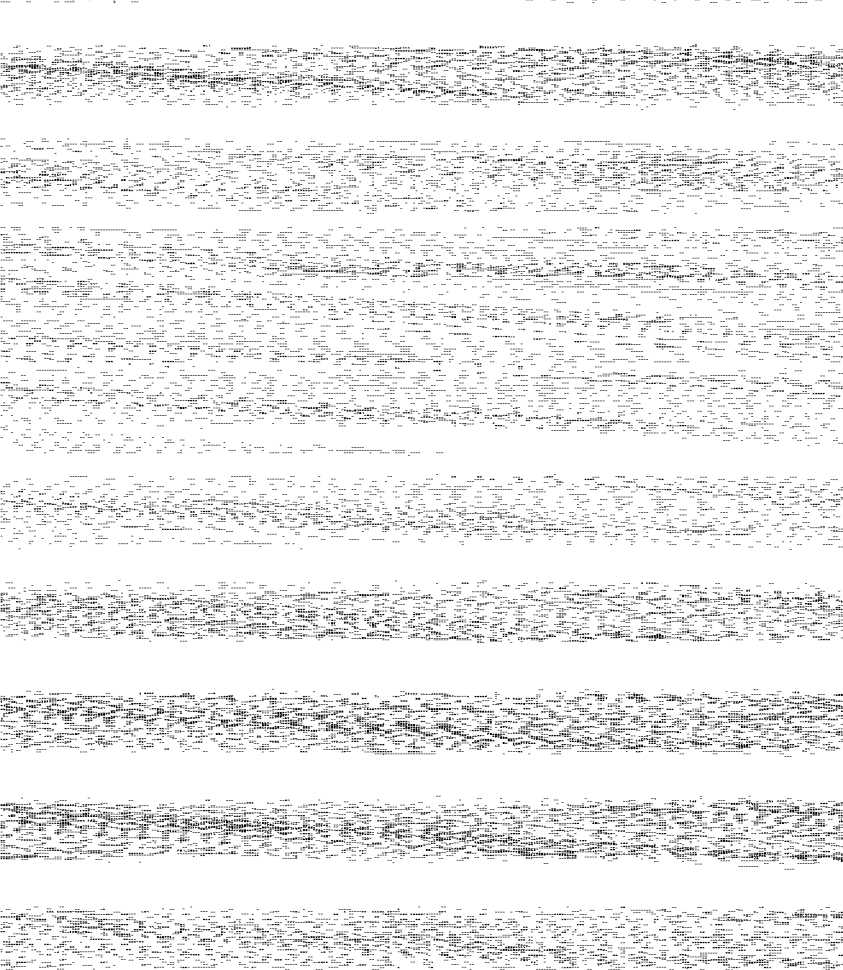
1.1.3 PCR 产物及重组载体 pSXIV VI⁺X₃。变更二端酶切位点, 以质粒 pIBVS₁D₄₁ 为模板合成, 疑含有同源 IBVcDNA。

1.1.4 田间病料 1 例。经鸡胚接种和血清学试验诊断为 IB 感染。

1.2 探针制备

按照 Sambrook 等 (1989) 的方法, 繁殖 E.coli/pIBVS₁D₄₁ 菌株, 提取质粒, 电泳检查其

1995-03-09 收稿



光敏生物素标记法不仅制作简便、费用低廉,还有保存期长,可一次性大量(达毫克级)标记等优点。本试验甚至用存放了 10 个月的光敏生物素来标记也可获得满意结果。该探针的保存期有待进一步验证,已报道的同类标记探针保存期均在 4 至 6 个月以上(贺东生, 1993; 钱建飞, 1992)。探针与田间病料也呈阳性反应,与其它病毒如 NDV、MG 均为阴性反应,显示了它在临床诊断和进出口检疫等方面的潜在用途。

影响杂交试验成败的因素非常多,包括有无甲酰胺体系的选择、样品和试剂处理甚至洗涤方法异同等。我们的经验是:选用甲酰胺体系,42℃ 杂交,严格按照改进的洗涤程序。我们改洗液中的 Tris 为 PBS,也节省了费用。

本试验的结果仅是一个初步尝试,对该探针的最低检出量及检测各种病原体的特异性方面,还在继续探索,但是可以相信,这种具有多项优点的光敏生物素标记 IBVcDNA 探针在实验诊断,进出口检疫和病毒分子生物学研究中具有非常广泛的用途。

参 考 文 献

- 贺东生,赵善昌. 1993. 光敏生物素标记鸭瘟病毒核酸探针的制备和应用的研究. 广西农业大学学报, 12 (3):69~74
- 钱建飞. 1992. MDV 光敏生物素探针的制备及应用. 中国畜禽传染病, 64(3):50~52
- Calnek B W. 1991. 禽病学. 第九版. 高福等译. 北京:北京农业大学出版社, 407~418
- Hyuk M K, Mark W J, Thomas P B, et al. 1993. Polymerase Chain Reaction and a Biotin-Labelled DNA Probe for Detection of IBV in Chicken. Avian Dis, 37:149~156
- Jackwood M W, Kwon H M, Hilt D A. 1992. IBV Detection in allantoic fluid Using the PCR and a DNA Probe. Avian Dis, 36: 403~409
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, (1): 131~152

STUDIES ON THE PREPARATION AND APPLICATION OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS cDNA PROBE

He Dongsheng S.N.H.Jafary Liu Fu'an Xu Liqun

(Dept. of Veterinary Medicine, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

In this study, an Avian Infectious Bronchitis Virus (IBV) cDNA probe labelled with photobiotin was prepared. Using blot hybridization and the AV-AP staining system, the probe showed strongly positive results when hybridized with a PCR product and its recombinant pSXIBVS₁, but no hybridization signal was exhibited in other specimens such as NDV, MG and normal allantoic fluid. A field sample suspected to be from an IB infected birds gave result which corresponded to the positive hybridization reactions. The study showed that the photobiotin-labelled IBV cDNA probe was a highly sensitive and specific method of detection.

Key words Avian Infectious Bronchitis Virus; cDNA probe; photobiotin; nucleic acid hybridization