

减蛋综合征病毒基因文库的构建

孔德迎 黄庚明 辛朝安

(华南农业大学动物医学系, 广州, 510642)

摘要 采用差速离心法纯化了鸭胚尿囊液中的减蛋综合征(EDS—76) WPDV 205 病毒并提取了病毒基因组核酸。选用 EcoRI 和 BamHI 两种限制性内切酶对病毒基因组 DNA 进行双酶切处理, 结果产生 7 个片段, 在这 7 个片段中, 只具有 BamHI 酶切位点的片段有 2 个, 只具有 EcoRI 酶切位点的片段有 3 个, 具有双酶切位点的片段有 2 个。将其中的 5 个片段分别插入到 pUC18 相应多克隆位点中, 建立了 pEDSVBE1、pEDSVBE2、pEDSVB1、pEDSVB2、pEDSVE 5 个重组子, 并对这 5 个重组子进行了酶切鉴定。

关键词 减蛋综合征(EDS—76)病毒; 基因克隆; 基因文库
中图分类号 S 855.3

van Eck 等(1976)首次于荷兰报道了减蛋综合征, 减蛋综合征(Egg Drop Syndrome 1976, EDS—76)是一种以鸡的产蛋下降和出现薄壳蛋、软壳蛋、无壳蛋为特征的传染性疾病, 对肉用种鸡和蛋鸡的影响尤为严重, 已成为世界养禽业中引起产蛋损失的一个重要原因。

鉴于本病毒的致病作用和引起生产上的经济损失, 有必要对该病原作一个全面认识。孔德迎等(1991)研究了减蛋综合征—76 病毒在鸡体内的动态分布及其与蛋传递的关系, 但目前人们在分子水平上对 EDS—76 病毒的发生发展规律的认识尚处于初步阶段。在国外, 人们仅停留于病毒基因组 DNA 的酶切分析、酶切图谱的建立、倒置末端重复序列的研究(Shinagawa 等, 1987)以及同源性的分析。国内除了建立病毒酶切图谱(王泽霖等, 1994)外, 还作了探针(非保护性抗原的基因片段的探针)来检测病毒(张兹钧等, 1993), 但未有构建病毒基因文库的报道。为了更清楚的认识此病毒, 对构建 EDS—76 病毒基因组文库进行了探索。

1 材料和方法

1.1 病毒

试验用病毒(EDS—76 病毒 WPDV 205 株)由美国加州大学戴维斯分校的 R. A. Bankowski 博士提供, 将病毒接种于 9~11 日龄鸭胚, 37℃ 孵育 72h, 收获尿囊液, 用于提取病毒。

1.2 主要试剂

SDS(MERK 原装), RNA 酶, 蛋白酶 K, BamHI、EcoRI、T₄DNA 连接酶、碱性磷酸酶 CIP(SERVA 分装)、X-gal 和 IPTG 均为 Promega 公司产品, pUC18 为北京协和科技开发公司产品, E. coli DH5 α 为王林川博士提供。

1996—04—29 收稿 孔德迎, 男, 31 岁, 讲师, 硕士

1.3 病毒的纯化及病毒核酸的提取

参照章光志等(1992)的方法进行。收集9~11日龄的鸭胚尿囊液(HA检测血凝效价达216),用差速离心法纯化病毒,纯化的病毒悬液加SDS(终浓度为0.4%),然后加RNaseA酶(终浓度为0.16 mg/mL),37℃30 min后加蛋白酶K(终浓度为0.15 mg/mL),在37℃下继续消化4 h,依次用等体积饱和酚,酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提去蛋白,然后加盐和无水乙醇沉淀病毒基因组核酸,经离心、洗盐后用适量pH7.6的TE溶液充分溶解。然后取少量直接进行凝胶电泳,以DNA-Hind III消化物作为标准分子量,观察提取的病毒基因组DNA的纯度和分子量大小。本实验中同时设立正常鸭胚尿囊液对照。

1.4 EDSV基因组DNA酶切片段的克隆

采用卢圣栋(1993)主编的《现代分子生物学实验技术》介绍的方法,对EcoRI和BamHI两种限制性内切酶双酶切处理病毒基因组DNA后产生的7个片段分别进行回收,然后与BamHI、EcoRI分别单酶切和双酶切后的pUC18质粒DNA进行连接(单酶切后的pUC18质粒DNA均用碱性磷酸酶CIP处理,双酶切后的pUC18质粒DNA则回收大片段),再转化到大肠杆菌DH5 α 中,转化后的细菌涂布到含Amp及X-gal和IPTG的LB培养基上,挑选白色的菌落进行扩增分析。参照萨姆布鲁克等(1993)的《分子克隆实验指南(第2版)》介绍的方法进行。

1.5 重组质粒的鉴定(彭秀玲等,1987)

采用碱裂解法抽提出可疑重组子的质粒DNA,再用相应的酶进行酶切,然后以EDS-76病毒核酸和pUC18质粒DNA的相应酶的酶切产物为对照,若在0.8%的琼脂糖凝胶中只出现两条带,并且其中一条带的迁移率与酶切的pUC18质粒DNA带相同,另一条则与EDS-76病毒核酸酶切片段带相同,则该重组子为含有目的片段的重组质粒。

2 结果

2.1 病毒的纯化及病毒核酸的提取

纯化的EDS-76 WPDV205株病毒有很高的血凝价(大于 2^{20})。提取的病毒核酸经0.6%琼脂糖凝胶电泳,以 λ DNA-Hind II酶切片段为标准分子量标记物,以经同样抽提处理的正常尿囊液作对照,病毒DNA只出现一条清晰的核酸带(位于分子量标记物23.1 kb带的后面),而对照的尿囊液没有核酸带(见图1)。

2.2 病毒核酸酶切片段的克隆及鉴定

本实验获得的5个重组子pEDSVB1、pEDSVB2、pEDSVE、pEDSVBE1、pEDSVBE2,经酶切分析表明,pEDSVB1质粒中含有只具有BamHI酶切位点的较大片段(其分子量为3.6kb)(见图2),pEDSVB2质粒中含有只具有BamHI酶切位点的较小片段(其分子量为1.4kb)(见图2),pEDSVE质粒中含有只具有EcoRI酶切位点的最小片段(其分子量为1.1kb)(见图4),pEDSVBE1质粒中含有具有双酶切位点的较大片段(其分子量为9.4kb)(见图4),pEDSVBE2质粒中含有具有双酶切位点的较小片段(其分子量为4.4kb)(见图4)。(病毒基因组DNA和7个酶切片段的较小片段(其分子量为4.4kb)(见图4)。(病毒基因组DNA和7个酶切片段的分子量是用琼脂糖凝胶电泳方法测定的)。

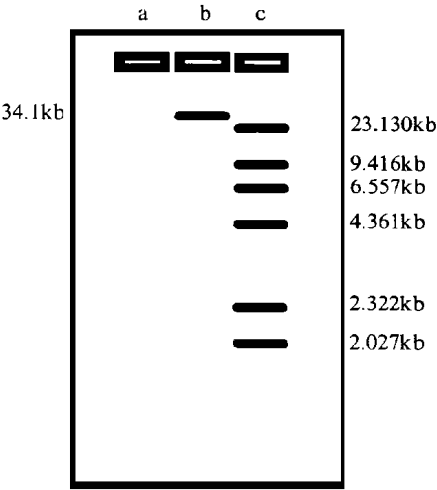


图 1 EDS - 76WPDV205 病毒基因组 DNA 凝胶电泳

a: 对照的尿囊液

b: EDS - 76WPDV205 病毒基因组 DNA

c: λDNA - HindIII 消化物

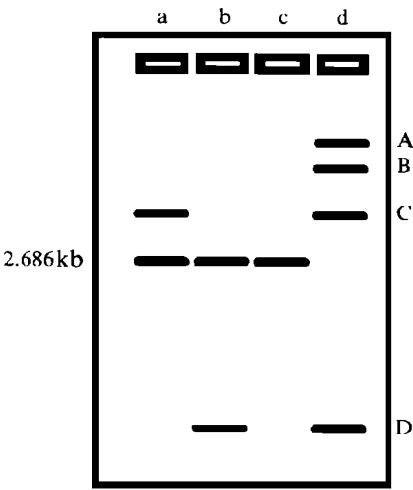


图 2 pEDSVB1、pEDSCB2 两个重组质粒的酶切结果

a: pEDSVB1 重组质粒的 BamHI 酶切结果

b: pEDSVB2 重组质粒的 BamHI 酶切结果

c: pUC₁₈ DNA BamHI 单酶切产物

d: EDS - 76 WPDV205 病毒基因组 DNA 的 BamHI 酶切消化物

A、B、C 和 D 代表消化产生的各片段

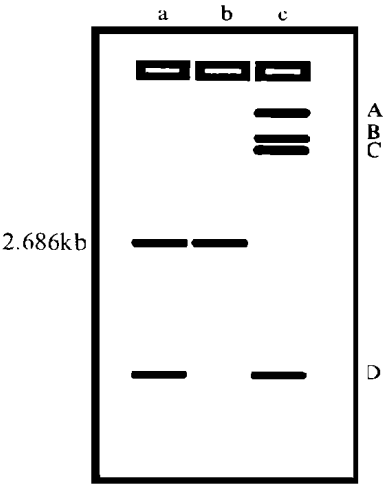


图 3 pEDSVE 重组质粒的酶切结果

a: pEDSVE 重组质粒的 EcoRI 酶切结果

b: pUC₁₈ DNA EcoRI 单酶切产物

c: EDS - 76 WPDV 205 病毒基因组 DNA 的 EcoRI 酶切消化物

A、B、C 和 D 代表消化产生的各片段

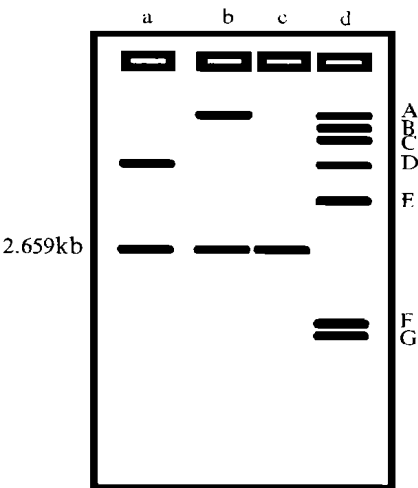


图 4 pEDSVBE2、pEDSVBE1 两个重组质粒的双酶切结果

a: pEDSVBE2 重组质粒的双酶切结果

b: pEDSVBE1 重组质粒的双酶切结果

c: pUC₁₈ DNA 双单酶切产物

d: EDS - 76 WPDV205 病毒基因组 DNA 的双酶切消化物

A、B、C、D、E、F 和 G 代表消化产生的各片段

3 讨论

实验表明,采用差速离心法纯化的病毒用于提取病毒 DNA 效果很好。用正常尿囊液对照电泳说明本实验提取的核酸是来自所接种的 EDS-76 WPDV205 株,通过琼脂糖凝胶电泳法测得该核酸分子量约为 34.1 kb,与 Zakharchuk 等(1993)报道的 EDS-76 127 株基因组 DNA 分子量为 34 kb、Zsak 等(1981)报道的 EDS-76 B8/78 株基因组 DNA 的分子量为 34.2 kb(22.6×10^6 Da)、王泽霖等(1994)报道的国内其它 4 株 EDS 分离株平均分子量为 22.7×10^6 Da,在分子量上基本一致,故本次实验所用的核酸为 EDS-76 WPDV205 病毒的基因组 DNA。

EDS-76 WPDV205 病毒基因组 DNA 非末端片段克隆分为:只具有单酶切位点的片段克隆和具有双酶切位点片段的克隆两种。只具有 BamHI 酶切位点的片段有两个,其大小分别为 3.6 和 1.4 kb,也即是 pEDSVB1、pEDSVB2 两个重组子中克隆到的片段,它们的分子量较小,所以采用加大片段的回收量进行目的片段克隆,结果都出现了重组子,但重组子数目不多,这些重组子没有一个是甲基化的(即,都可以用相应的酶切开)。只具有 EcoRI 酶切位点的片段有 3 个(大小分别为 7.8、6.4 和 1.1 kb),其中 7.8、6.4 kb 两个片段为基因组 DNA 末端片段。对 G 片段的克隆,所采用的方法与只具有 BamHI 酶切位点的片段克隆一样,而所得到的重组子数目较少,但都是没有甲基化的,该片段所对应的重组子为 pEDSVE。具有双酶切位点片段的克隆,获得了 5 个重组质粒,其中有 1 个在进行酶切鉴定时,发现不能切开,其余 4 个均能切开,在这 4 个重组子中有 1 个克隆到 A 片段,该片段所对应的重组子是 pEDSVBE1,其余 3 个克隆到的都是同一个片段,即 D 片段,该片段对应于 pEDSVBE2 重组子。

两个末端片段(7.8、6.4 kb)均为 EcoRI 单酶切产物,由于这两个末端片段的 5' 端有末端蛋白(侯云德,1989),该末端蛋白在 SDS 及蛋白酶 K 的联合作用下都不能去除(Mark 等,1979;Edward,1977;Bruce,1981),只有在强碱的作用下才有部分 DNA 分子中的末端蛋白被完全除去,所以给克隆带来较大困难。在实验过程中,采用多种方法均无效。可能原因有:(1)在去 5' 末端蛋白过程中,两个末端片段的 DNA 分子量较大,在强碱的作用变性后复性不完全;(2)部分去肽加接头后纯化的过程中丢失了近 50% 的 DNA。由于这两个因素,使得最后用来克隆的有效片段较少。按常规操作,应将加接头后的片段混和物进行电泳,以回收目的片段,但这样一来丢失的 DNA 更多,在操作过程中到了这一步,往往在凝胶中看到的 DNA 带很淡,所以没有回收的价值。而目的 DNA 要有一定量,才有可能进行基因克隆。关于该病毒的末端片段的克隆,还有待进一步探索。

已克隆到的 5 个片段其分子量大小分别为 9.4、4.4、3.6、1.4、1.1 kb,这些片段的分子量之和占整个 EDS-76 WPDV205 病毒基因组 DNA 分子量(为 34.1kb)的 60%。

参 考 文 献

- 王泽霖. 1994. 产蛋下降综合征(EDS-76)病毒 DNA 酶切图谱分析. 中国兽医学报, 14(4): 360~365
孔德迎 刘福安. 1991. 减蛋综合征-76 病毒在鸡体内的动态分布及其与蛋传递的关系. 病毒学报, 7(2): 148~152
卢圣栋主编. 1993. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 124~134
张兹钧 胡木枝 刘金胜 等. 1993. 鸡减蛋综合征 DNA 片段的克隆及生物素化探针的制备. 中国畜禽传染病, 4: 46~48
侯云德著. 1989. 分子病毒学. 北京: 学苑出版社, 156
章光志 李峰. 1992. 鸡传染性喉气管炎病毒核酸探针的制备及特异性鉴定. 兽医大学学报, 12(3): 231~

234

- 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 1993. 分子克隆实验指南. 第2版. 金冬雁等译. 北京: 科学出版社, 34~40
- 彭秀玲, 袁汉英主编. 1987. 基因工程实验技术. 长沙: 湖南科技出版社, 30~90
- Bruce W. 1981. Adenovirus DNA replication in vitro: a protein linked to the 5' end of nascent DNA strands. *J Virol* 1: 139~147
- Edward A. 1977. Evidence for blocked 5' termini in human adenovirus DNA. *Virology*, 76: 380~394
- Mark D Thomas J. 1979. Adenovirus DNA replication in vitro: origin and direction of daughter strand synthesis. *J Mol Biol* 135: 999~1012
- Shinagawa M, Iida Y, Matsuda A, et al. 1987. Phylogenetic relationships between adenovirus as inferred from nucleotide sequences of inverted terminal repeats. *Gene* 55: 85~93
- Todd D, McNulty M S, Smith Joan A. 1988. Differentiation of egg drop syndrome virus isolates by restriction endonuclease analysis of virus DNA. *Avian Pathol* 17: 909~919
- van Eck J H H, Davelaar F G, van den Henuvel—plesman T A M, et al. 1976. Dropped egg production, soft shelled and shellless eggs associated with appearance of precipitins to adenovirus in flocks of laying fowl. *Avian Pathol* 5: 261~272
- Zakharchuk A N, Kunglyak V A, Akopian T A, et al. 1993. Physical mapping and homology studies of egg drop syndrome(EDS—76) adenovirus DNA. *Arch Virol* 128: 171~176
- Zsak L, Kisary J. 1981. Studies on egg drop syndrome(EDS) and chick embryo lethal orphan (CELO) avian adenovirus DNAs by restriction endonucleases. *J Gen Virol* 56: 87~95

CONSTRUCTION OF GENE LIBRARY OF EGG DROP SYNDROME 1976 VIRUS

Kong Deying Huang Gengming Xin Chao'an
(Dept. Vet. Med., South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

Egg drop syndrome 1976 virus(WPDV 205 Strain) from allantoic fluids of embryonated duck eggs was purified by differential centrifugation. Its genomic DNA was obtained by a conventional method of phenol—chloroform extraction and ethanol precipitation. The viral genomic DNA was cleaved into 7 fragments by digestion with BamHI + EcoRI. Among these fragments, 2 fragments have BamHI adhesive ends, 3 fragments have EcoRI adhesive ends and 2 fragments have both BamHI and EcoRI adhesive ends. Except for 2 terminal fragments, 5 fragments were cloned into plasmid pUC18. Five recombinant plasmids (pEDSVB1, pEDSVB2, pEDSVE, pEDSVBE1, pEDSVBE2), which were identified by restriction endonuclease analysis, were finally constructed.

Key words egg drop syndrome 1976 virus; gene cloning; gene library