

IBV 广东地方株 D41 S1 基因 PCR 产物的 酶切分析及其意义^{*}

王林川¹ 刘福安¹ 廖丽春²

(1 华南农业大学动物医学系 广州 510642 2 广东省农科院兽医所)

摘要 对广东肾变病型鸡中分离致弱的 IBV D41 株 S1 基因 PCR 产物作了 HaeII 酶切分析, 发现其酶切产物与 IBV M41 的一样, 而与美国肾变型标准株 Gray、Holte 不同。根据国外用 RFLP 区分 IBV 血清型的判定标准, D41 株应归属于马萨诸塞血清型; 综合此分离株的其它特性, 说明华南地区存在有 IBV 变异株的流行。

关键词 IBV; PCR; 酶切分析

中图分类号 S 855.3

IBV(禽传染性支气管炎病毒)是冠状病毒科的代表种, 现已证明有 20 余个血清型。IBV D 株是陈天杰等(1987a)从广东省佛山市东方鸡场肾变病型禽传染性支气管炎病死鸡中获得的分离毒株, 其经鸡胚传代的致弱毒株 D41(陈天杰, 1987a)是对雏鸡安全性好、连传 5 代不返强、平均保护率达 88.7% 的弱毒疫苗株。D 株的人工发病鸡呈不典型的肾病变, 但使用 D41 又控制了多家鸡场的肾变病型 IB; 因国内 IBV 各血清型标准毒株不全, 故未能作中和试验确定 D41 株的血清型归类。Kwon 等(1993)采用对 IBV S1 基因 PCR 产物作限制性内切酶酶切片段多形性分析(RFLP)确定的毒株分型谱系与病毒中和试验的结果一致。本试验对 IBV D41 株 S1 基因 RT-PCR 产物进行酶切分析, 以求加深对 D41 株的本质了解。

1 材料与方 法

1.1 IBV 广东地方弱毒株 D41、标准强毒株 M41 S1 基因的 PCR 产物

其长度 1.73 kb, 为经两条 27 bp 的引物以 D41、M41 鸡胚尿囊液毒超速离心后提取的 RNA 作模板来进行 RT-PCR 获得(王林川, 1994)。

1.2 限制性核酸内切酶

HindIII、BamHI 为 Boehringer Mannheim 公司产品; Hae II 为北京协和友谊科技开发公司产品。

1.3 IBV D41 株、M41 株 S1 基因 PCR 产物的酶切

1.3.1 HindIII 酶切 取 PCR 产物 15 μ L, 加 10 $\times$ 缓冲液 2 μ L, H₂O 2 μ L, HindIII 10 单位/ μ L)1 μ L, 37 $^{\circ}$ C 作用 3 h。

1.3.2 BamHI 酶切 取 PCR 产物 15 μ L, 加 10 $\times$ 缓冲液 2 μ L, H₂O 2 μ L, BamHI

1996-01-08 收稿 王林川 男, 31 岁, 讲师, 博士

^{*} 高校博士点科研基金和自然科学基金资助课题

(10 单位/ μL)1 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 3 h。

1.3.3 Hae II酶切 取 PCR 产物 15 μL , 加 10 $\times$ 缓冲液 2 μL , H_2O 2 μL , Hae III(20 单位/ μL)0.5 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h。

1.3.4 PCR 产物酶切结果检查 取酶切产物10 μL , 于2%琼脂糖凝胶(含EB)中电泳检查。

2 结果

IBV D41 株 S1 基因 PCR 产物的酶切结果与 IBV M41 株的一样(见图 1): 用 BamH I 和 Hind II酶切的产物没有出现新的条带, 与原 PCR 产物电泳位置无差异, 说明扩增片段无 BamH I 和 Hind II酶切位点;用 Hae II酶切的产物出现有 3 条带, 其大小大致为 900 bp、500 bp 和 300 bp 左右。这些结果与 已发表的 IBV Beaudette 株、M41 株(马萨诸塞血清型)的 S1 基因核苷酸序列(Binns, 1985; 1986)的电脑检索结果一致: 无 BamH I、Hind II酶切位点; 有两个 Hae II位点, 分成 906 bp、489 bp、333 bp 3 个片段; 而与美国 IBV 肾变型标准株 Gray、Holte 的不同(Kwon, 1993)。根据 Kwon(1993)建立的判定标准—Hae III酶切与 M41 株的一致, D41 株归属于马萨诸塞血清型。



图 1 IBV D41 株 S1 基因 RT-PCR 酶切图谱

1 DNA 分子量标记物 885 bp
2 DNA 分子量标记物 485 bp
3 DNA 分子量标记物 285 bp
4 IBV M41 株 S1 基因 PCR 产物 Hae II酶切
5 IBV D41 株 S1 基因 PCR 产物 Hae II酶切

IBV D 株来源于肾变病型病鸡, D41 株用作疫苗使用了 1 400 万头份, 控制了广东 4 个大、中、小型鸡场肾变病型 IB(陈天杰, 1987b), 据了解, 目前已在华南地区应用了上亿头份, 对十多个发生肾变病型 IB 的鸡场效果也很好; 而酶切鉴定的结果却归属于马萨诸塞型, 与美国标准肾变病株不一致; 中和试验结果, IBV D 强毒株及 M41 株相互之间中和指数为 85%; 由上说明, 华南地区流行的 IBV 毒株已有变异, 其对组织器官的亲嗜性也有变化; 很有必要对 IBV 变异的发生发展规律进行深入的研究。

参 考 文 献

王林川, 刘福安, 林维庆, 等. 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, 梁誉衡, 辛朝安, 等. 1987a. 鸡传染性支气管炎 D41 等弱毒株的培育与抗原性筛选试验. 广东农业科学, 79(4): 41~43

陈天杰, 梁誉衡, 廖丽春, 等. 1987b. 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, Bournsnel 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

- Binns M M, Boursnell M E G, Tomley F M, et al. 1986. Comparison of the spike precursor sequences of coronavirus IBV strains M41 and 6/82 with that of IBV Beaudette. *J Gen Virol* 67: 2825~2831
- 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

RESTRICTION ENZYMES ANALYSIS OF IBV GUANGDONG LOGICAL STRAIN D41 S1 GENE PCR PRODUCT AND ITS SIGNIFICANCE

Wang Linchuan¹ Liu Fu'an¹ Liao Lichun²

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

2 Veterinary Medicine Research Institute, Guangdong Academy of Agr. Sci.)

Abstract

Using Hae III to digest the S1 gene PCR product of IBV D41 strain isolated from a chicken nephrosis case in Guangdong province, it was found that the digested products were the same as that of IBV M41 strain, and different from that of the American standard nephritic strains Gray and Holte. So the IBV D41 belongs to the Massachusetts serotype, and the IBV strains in South China seem to have undergone mutation.

Key words IBV; PCR; restriction enzyme analysis