

禽传染性支气管炎病毒免疫 原基因的 PCR获取及其酶切鉴定*

王林川 辛朝安

(华南农业大学动物医学系,广州,510642)

摘要 介绍用 RT-PCR(反转录-聚合酶链反应)获取禽传染性支气管炎病毒(IBV) M41株和广东地方致弱株 D41免疫原(S1)基因的详细方法,所用引物为 IBV Beaudette株 S基因两侧的对应序列,跨幅为 1.7 kb。结果表明,两株病毒所获的 PCR产物与预期的一致;用此对引物,以 IBV D41株 S基因 PCR产物为模板,扩增出同样的 DNA片段。试验还显示,国内外几家公司有关 RT和 PCR的分子生物学试剂可以兼用,适用于国内的有关研究;PCR仪则以进口的或水浴锅式的为佳。对 IBV M41株 S基因的 RT-PCR产物进行 Hae III酶切图谱分析,结果与国外文献的一致。

关键词 禽传染性支气管炎病毒;S糖蛋白;PCR;酶切分析

中图分类号 S 855.3

禽传染性支气管炎 (IB)为呼吸道型、肾病变型或肠病变型急性传染病,对养鸡业危害巨大。近年国内纷纷报道致死率高的肾病变型 IB的发生,分离出许多地方株,并从分子生物学方面对其进行深入的研究,以求探讨新的诊断防治途径。国外资料表明,禽传染性支气管炎病毒 (IBV)有 3种主要结构蛋白:纤突 (S)蛋白、膜 (M)蛋白、核衣壳 (N)蛋白,其中 S蛋白成熟裂解为 S1、S2两蛋白亚基。作者在国内首次报道了 IBV S1基因的 RT-PCR研究结果 (王林川等,1994),现有几家单位来信或来人探讨他们实验结果不理想的结症,作者认为有针对 IBV 单股 RNA基因组的 RNase活性处理及 RT-PCR生化试剂适用性两个主要问题,现详细报道其方法及研究情况,并对部分毒株 PCR产物进行了限制性内切酶的酶切分析,以供同行们参考。

1 材料与方法

1.1 病毒

IBV 呼吸道型强毒株 M41(源自中国兽药监察所)和广东地方致弱疫苗株 D41(陈天杰等,1987)。

1.2 用具的处理

所用玻璃器具如试剂瓶、装 Eppendorf管的烧杯等,均经三蒸水清洗后 180℃处理 4 h;所用的 Eppendorf管及吸头为进口产品,戴手套取出,高压消毒,一次性使用。

1996-06-28收稿 王林川,男,32岁,副教授,博士

* 国家自然科学基金项目

1.3 常规试剂

2 mol/L pH4.0 NaAc, 水饱和酚, 氯仿, 异戊醇 (24:1), 无水乙醇, 均为新购买及新配制后置于上述处理好的用具中保存。

DEPC处理三蒸水: DEPC终浓度为0.2%, 作用过夜, 再敞开盛水瓶盖高压消毒, 保存待用。

1.4 方法

1.4.1 病毒 RNA 提取 病毒接种于10~11 d鸡胚, 37℃培养30 h后收集尿囊液, 8 000 r/min 离心10 min去杂质, 40 000 r/min 2 h去上清, 收集病毒。加 SDS(终浓度为2%) 和蛋白酶 K(终浓度为250 mg/L), 55~60℃ 5 min, 室温1 h, 加0.1倍体积的2 mol/L pH4.0 NaAc, 再加等体积的水饱和酚, 抽提上清; 酚再处理1次, 氯仿-异戊醇处理2次, 无水乙醇-20℃沉淀过夜, 再用 DEPC处理蒸馏水悬浮 RNA, 90℃作用5 min, 进入反转录体系。

1.4.2 PCR引物 由广州金华生物技术公司合成, 使用仪器为 MODEL 391, PCR-MATE^(TM) DNA自动合成仪。

S1 OLIGO 5'引物含有 S1基因5'端两侧的序列, 且其5'端有 Hind III酶切位点; S1 OLIGO 3'引物则为与 S2基因5'端两侧互补的序列, 且其5'端有 Bam HI酶切位点; 两条引物各为27个碱基, 且是根据已发表的 IBV Beaudette株序列 (Binns et al, 1985)来设计的, 两条引物间为包含有整个 S1基因的1.7 kb片段。

A 5'—//—[S1 I S2]—[M]—[N]— AAA 3'

B 引物 5'■→ ←■引物 3'

C 引物 5': 5' CAAAGCTTGAAA ACTGAACA AAAGACA 3'

引物 3': 5' TTGGATCCATAACTAACATAAGGGCAA 3'

A. IBV 基因组结构 B. 引物位置 C. 引物设计

1.4.3 反转录 (RT) RNA样品 10 μL, 5× 缓冲液 4 μL, 2.5× 10⁷ U/L RNasin 1 μL, 10 mmol/L each dNTP 2 μL, S1引物 3' (429 mg/L) 1 μL; 2.0× 10⁷ U/L AMV-RTase (BM公司) 2 μL或改用 Promega公司的 Mu- RTase (2.0× 10⁸ U/L)及其缓冲液; 共20 μL, 混匀后, 置42℃ 2 h, 再经95℃ 5 min终止反应, 0℃颤振3 min, 即进行 PCR

1.4.4 cDNA单链的 PCR RT产物 10 μL, 10× 缓冲液 4 μL, S1引物 5' (393 mg/L) 1 μL, 蒸馏水 35 μL, 94℃ 5 min, 离心数秒, 再加 BM公司或华美生物工程公司的 Taq DNA聚合酶 3 U (0.7 μL), 混匀; 上加50 μL石蜡油, 置于 Perkin-Elmer公司 PCR仪或上海复生生物工程研究所的 FS-318型 DNA扩增仪上进行扩增。经94℃ 1 min, 45℃ 2 min, 73℃ 6 min一个循环, 93℃ 1 min, 45℃ 2 min, 73℃ 5 min 30个循环, 最后再于73℃ 保持10 min; 产物于1.5%琼脂糖凝胶中电泳检测。

1.4.5 IBV D4株 S1基因 PCR产物的 PCR IBV D4株 S1基因 PCR产物作1:50稀释后取5 μL, dNTP 2 μL, 10× 缓冲液 5 μL, 80 mmol/L MgCl₂ 2 μL, 引物 3', 5'各1 μL, H₂O 26 μL, Taq DNA聚合酶 (PE公司, 5.0× 10⁶ U/L) 0.6 μL, 上加50 μL石蜡油, 置于北京新技术应用研究所的1109型电脑自动扩增仪 (水浴锅式) 进行扩增, 其扩增后循环条件及其检测同1.4.4所述。

1.5 IBV M4株 S1基因 RT-PCR产物的 Hae III酶切鉴定

PCR产物 15 μL, 10× 缓冲液 2 μL, H₂O 2 μL, Hae III (2.0× 10⁷ U/L) 0.5 μL, 37℃ 1 h

后置于 2% 琼脂糖凝胶中电泳检查

2 结果

两株病毒 PCR 产物电泳结果均为一条带,且电泳速率一样,经分子量标记测定为 1.73 kb 左右(图 1),与理论预计值相符合;对 IBV D4 株 S 基因 PCR 产物进行 PCR,获得了一样的结果;M4 株 S 基因 PCR 产物用 Hae III 酶切得到 906 bp 485 bp 333 bp 的 3 条带(图 2),这些与该片段基因 Hae III 酶切位点(Binns et al, 1985; 1986)相符合;对照 Kwon (1993)的结果,可以判定所获 PCR 产物为 S 基因片段。

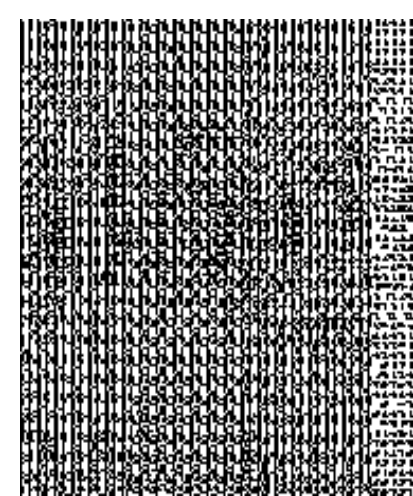


图 1 IBV S1 PCR 产物电泳图

- 1: pBR322/BstN I
- 2 pBR322/Hinf I
- 3 IBV M4株
- 4 IBV D4株

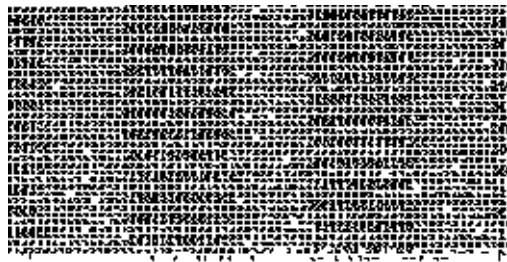


图 2 PCR 产物 Hae² III 酶切分析图谱

- 1 分子量标记物 1632 bp
- 2 分子量标记物 885 bp
- 3 分子量标记物 485 bp
- 4 分子量标记物 285 bp
- 6 IBV D4 株
- 7 IBV M4 株

3 讨论

(1) IBV RNA 的提取是本实验的关键 这里有两个注意点:一是要避免 RNase 对 IBV RNA 的破坏 由于 RNase 是无处不在且耐高温,如受 RNase 的污染则极易消化 IBV 的基因组 ssRNA,使实验常常得不到结果;因此,提取 IBV 的 RNA,须严格按照要求,如用 DE-PC 处理水,试剂如 NaAc 等以新开的为好,称量时不要与手接触,并在超净工作台上进行各项操作等。二是 RNA 在酸性酚中抽提获得率高,这是本试验中用水饱和酚并追加 2 mol pH4.0 NaAc 的原因

(2) 本实验结果表明,BM 公司的 AMV-RTase 体系与 BM 公司和华美生物工程公司的 Taq DNA 聚合酶体系可以配合进行 RT-PCR PE 公司的 Taq DN A 聚合酶在用于扩增 1.73 kb 的较长片段时提高些镁离子的浓度效果会更好。

(3) 就 PCR仪,以进口机及水浴锅式的扩增效果好,成功率高;而用光电管加热的 FS-318型,可能是降温速度太慢等原因,结果成功管数为20%~30%,因此,对长片段DNA的扩增,在使用仪器上应多加考虑

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,廖丽春,等. 1987. 鸡传染性支气管炎 D4 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, Bournsnel M E G, Timley 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

THE ATTAINMENT OF IBV IMMUNOGEN GENE (S1) BY PCR METHOD AND ITS CHARACTERIZATION BY RESTRICTION ENZYME DIGESTION ANALYSIS

Wang Linchuan Xin Chao'an

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

Abstract

Describes in detail the methods used to obtain the immunogen (S1) gene of IBV strain M41 and an attenuated local Guangdong isolate D41 by the PCR technique. Two synthetic primers were designed corresponding to segments on both flanks of the S1 gene of IBV strain Beaudette, a 1700- base sequence. The result demonstrates that the PCR products of the two IBV strains were the same as expected. Using this pair of primers, the S1 gene used the PCR product of IBV strain D41 as PCR template was recovered. It was also found that the chemicals used for RT and PCR of several companies matched well, and it was better to use the imported PCR machine (PE) and the mechanical arm PCR machine using water bath as heating system too. The *Hae*III restriction pattern of IBV M41 S1 gene was the same as reported in the literature.

Key words IBV; S1 protein; PCR; restriction enzyme digestion analysis