

中国禽肾病变 IBV 分离株 S1 基因的 RT-PCR/RFLP 特性^{*}

王林川 张桂云 黄勇 李华 廖明

(华南农业大学动物医学系, 广州 510642)

摘要 对中国 13 个省市分离到的 29 个肾病变 IBV 毒株作了 S1 基因的 RT-PCR/RFLP 特性鉴定. 用相同的一对引物, 8 个毒株——广东/01/83, 河南/04/94, 河南/05/94, 内蒙/01/93, 江苏/01/93, 河南/01/93, 天津/02/93, 内蒙/02/93, 经 RT-PCR 扩增获得了包含有 S1 基因 cDNA 的 1 734 bp 的片段; 河南/06/95 的为 1 000 bp 左右的片段; 其它 20 个毒株没有结果. 经 RFLP 分析, 广东/01/83, 河南/04/94, 河南/05/94, 内蒙/01/93 归类于 Massachusetts 血清型, 江苏/01/93 归于 Gray 血清型, 河南/01/93, 天津/02/93, 内蒙/02/93 是新的变异株. 研究表明, 国内禽肾病变 IB 的致病毒株, 在不同的地区有其特异的变异株, 也有一个共同的血清型——Massachusetts 型的毒株.

关键词 IBV; S1 基因; RT-PCR/RFLP; 肾病变

中图分类号 S 855.3

禽传染性支气管炎病毒 (IBV) 感染能引起鸡的一种经济损失重大的疫病. 禽传染性支气管炎 (IB) 1931 年最先报道为仔鸡的呼吸道疾病 (Schalk et al, 1931). 目前, 其临床病型可分为呼吸道疾病、畸形蛋和产蛋下降、肾病变、腺胃病变等 (Calnek et al, 1993; 王永坤等, 1996). Witherfield 等 (1962) 首先报道了在美国发生的与一些 IB 爆发有关联的肾病变疫情, Cummings (1962) 也报道了在澳大利亚发生的导致鸡严重肾病变的 IB 疫情. 在中国, 邝荣禄 (1982) 首先在广东省发现有肾病变 IB 病例, 近年则在中国大部分省市报道有肾病变 IB 的发生, 导致死亡率近 30%. 本文采用 Kwon 等 (1993) 建立的方法, 用 IBV S1 基因 RT-PCR/RFLP 分析, 对中国 IBV 肾病变分离株作了鉴定.

1 材料与方法

1.1 病毒

IBV 标准毒株: M41, H52, A5968, Gray; 在中国 13 个省市, 经鸡胚接种试验和电镜鉴定的 29 个肾病变毒株 (王林川等, 1997). 这些毒株接种于 10 日龄的 SPF 鸡胚 (中国山东 SPF 鸡场) 或商品鸡胚 (中国广东墟岗种鸡场, 种鸡开产之前经 Massachusetts 型 2 次弱毒疫苗、1 次灭活疫苗免疫); 弃去 24 h 内死亡胚蛋, 收集孵化了 48 h 的鸡胚尿囊液, -20 °C 保存待用.

1.2 RNA 抽提

病毒尿囊液先 6 000 r/min 低速离心 10 min, 取上清液再 35 000 r/min 离心 1.5 h. 沉淀病毒用 DEPC 处理水悬浮, 之后加入 SDS ($\rho_{\text{终}} = 20 \text{ g/L}$) 和蛋白酶 K ($\rho_{\text{终}} = 250 \text{ mg/L}$), 55 °C 作用 30 min 后, 用苯酚/氯仿/异戊醇抽提病毒 RNA, 取水相加 1/10 体积的 3 mmol/L NaAc 和 2 倍体积的无水乙醇 -20 °C 过夜以沉淀出 RNA. 最后, RNA 用 DEPA 处理水悬浮, 以待反转录 (RT) 反应.

1998-02-27 收稿 王林川, 男, 33 岁, 副教授, 博士

^{*} 国家自然科学基金 (39470538) 和广东省青年基金 (950416) 资助项目

1.3 RT-PCR 引物

由中国上海生工生物技术工程公司合成.2 条引物, Pw 1 和 Pw 2, 各有 21 个核苷酸对应着 IBV Beaudette 株 S1 基因两侧的序列(Binns et al, 1985), 且在 Pw 1(1 697 ~1 717 位)的 5' 端加有 *Bam*HI 酶切位点, Pw 2(—5 ~16 位)的 5' 端加有 *Hind*III 酶切位点(见图 1).

1.4 RT

RT 反应体系中有 5× 缓冲液 4 μL, 2.5 mmol/L 每个 dNTP 6 μL, 15 pmol/L Pw1 2 μL, 20 u μL RNasin (Promega) 1 μL, RNA 溶液 6 μL; 离心 5 s, 95 °C 作用 1 min 后立即放入 0 °C 冰浴, 之后加 1×10⁴ u μL AMV-RNase (Promega) 1 μL, 混匀后 42 °C 作用 2 h.

1.5 PCR

PCR 反应体系中有 10× 缓冲液 4 μL, 15 pmol/L Pw2 1 μL, RT 反应产物 10 μL, 2 mmol/L dNTP 4 μL, 2×10³ u μL Taq DNA 聚合酶(Promega) 1.2 μL, 三蒸水 29.8 μL; 总反应体积 50 μL. 再在上层加 30 μL 石蜡油覆盖. PCR 反应在水浴锅式 PCR 仪(北京新技术研究所制)上进行. 93 °C 变性 2 min, 48 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 经 35 个循环; 最后在 72 °C 延伸 10 min. PCR 产物在含溴化乙锭的 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外检测仪上检测.

1.6 RE 分析

含 S1 基因的 1 734 bp PCR 产物条带经低熔点琼脂糖凝胶纯化回收. 纯化后的 DNA 用 New England Biolabs 公司的 *Hae* III、*Xba* I、*Bst* Y I、*Bam* H I、*Bgl* II、*Hind* III 按产品说明书进行酶切. 酶切产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶上电泳检测.

2 结果

2.1 肾病变 IBV 毒株 S1 基因的 RT-PCR

4 个标准株及 8 个国内分离株扩增出含 S1 基因的 1 734 bp 产物(图 2), 一个分离株仅扩增出一大约 1 000 bp 的 DNA 片段(图中未标出), 其余 20 个分离株无扩增产物, 详见表 1.

2.2 RE 分析

S1 基因的 RT-PCR 产物分别用 *Hae* III、*Xba* I 和 *Bst* YI 酶切的 RFLP 图谱见图 3~5. 从图中可知, 4 个标准株与 Kwon 等(1993)报道的 RFLP 图谱相同; 8 个扩增出含 S1 基因的 1 734 bp 产物的分离株用 *Hae* II 酶切后呈 5 组 RFLP 图谱: 广东 01/83、内蒙 01/93、河南 04/94、河南 05/94 同 M 41 和 A 5968 的一样; 江苏 01/93 与 Gray 的一样; 河南 01/93、内蒙 02/93 及天津 02/93 分别为新的 RFLP 图谱. 用 *Xba* I 酶切广东 01/83、内蒙 01/93、河南 04/94、河南 05/94 所得 RFLP 图谱与 M41 的一样, 并与 Connecticut 型的 A5968 株区分开. 广东 01/83、内蒙 01/93、河南 04/94、河南 05/94、M41、A5968 有相同的 *Bst* YI 酶切图谱, 并都没有 *Hind* III、*Bgl* II 及 *Bam* H I 的酶切位点.

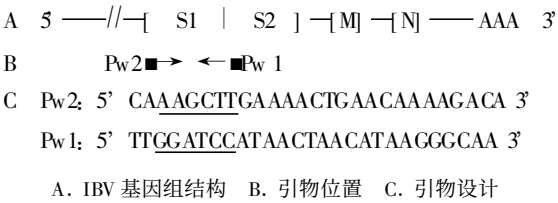
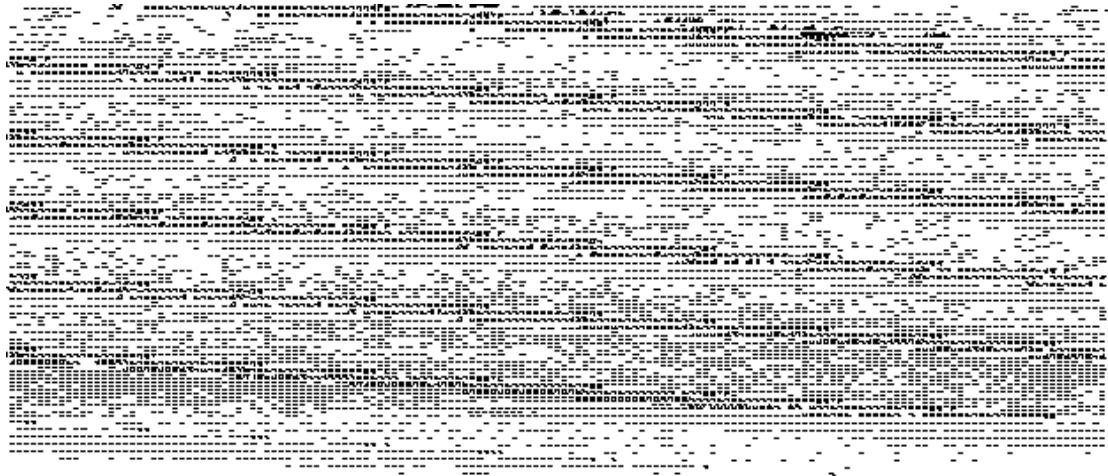


图 1 2 条引物结构示意图

表 1 IBV S1 基因 RT-PCR 的结果

编号	病毒株	RT-PCR 产物 /kb	编号	病毒株	RT-PCR 产物 /kb
1	M41(Massachusetts)	1.73	18	河南/b3/b3	—
2	H52(Massachusetts)	1.73	19	黑龙江/01/93	—
3	A5968(Connecticut)	1.73	20	辽宁/b1/b3	—
4	Gray	1.73	21	山西/b1/b3	—
5	广东/01/83	1.73 0.3	22	山东/b1/b3	—
6	江苏/01/93	1.73	23	吉林/b1/b4	—
7	河南/01/93	1.73	24	天津/b1/b3	—
8	河南/04/94	1.73	25	河北/b1/b3	—
9	河南/05/94	1.73	26	四川/b1/b3	—
10	河南/06/95	1.0	27	四川/b2/b3	—
11	天津/02/93	1.73	28	四川/b3/b3	—
12	内蒙/01/93	1.73 0.3	29	江苏/b2/b3	—
13	内蒙/02/93	1.73	30	江苏/b3/b3	—
14	北京/01/93	—	31	江苏/b4/b3	—
15	北京/02/93	—	32	广东/b2/b5	—
16	北京/03/93	—	33	广东/b3/b7	—
17	河南/02/93	—			

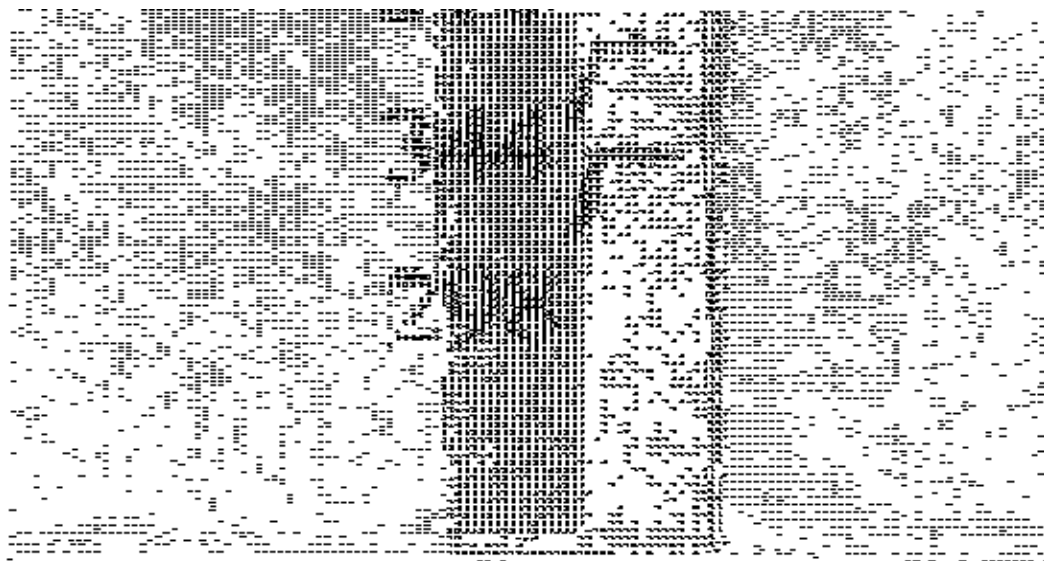


A: pBR 322/Hinf I; G: pBR 322/BstN I;
B 上: M 41; B 下: A 5968;
C 上: 江苏/b1/93; C 下: 河南/05/b4;
D 上: 河南/b1/b3; D 下: 天津/b2/b3;
E 上: 广东/01/b3; E 下: 内蒙/01/b3;
F 上: H52; F 下: Gray

图 2 IBV S1 基因 RT-PCR 产物电泳图

A: pBR 322/BstN I; B: Gray;
C: 广东/01/b3; D: 天津/02/b3;
E: 河南/01/b3; F: 江苏/b1/93;
G: pBR 322/Hinf I

图 3 IBV S1 基因 PCR 产物 Hae III酶切图谱



A: pBR 322/*Hinf* I; B: M41; C: 内蒙/01 b3; D: 广东/01 b3;
E: 河南/04 b4; F: 河南/05 b4; G: pBR 322/*Bst*NI

A: pBR 322/*Hinf* I; B: *Hae* III酶切;
C: *Xba* I 酶切; D: *Bst*Y I 酶切;
E: pBR 322/*Bst*N I

图4 IBV S1 基因 PCR 产物 *Xcm*I 酶切图谱

图 5 Massachusetts 型毒株 RFLP 图谱

3 讨论

确定某一地区有 IBV 新的血清型或变异株,便可修定免疫程序以求对新的当地毒株提供更大的保护力. Kwon 等(1993)建立这种新的 IBV 血清型鉴定方法时,用了 3 种不同的内切酶(*Hae* III, *Xcm* I, *Bst* Y I)对 S1 基因作 RT-PCR/RFLP 分析,对已知的 11 个 IBV 标准毒株(8 个血清型)和 26 个已知血清型的野毒株和参考毒株进行鉴定,其结果与各个毒株的中和试验确定的血清型一致. 已经知道, IBV 的中和及血清型的决定位点是在 S1 糖蛋白上(Cavanagh et al, 1986),但作者还不能确定这 3 个酶切位点是否就代表着 S1 基因中决定血清型的区域. 从上述结果中可看出的是,这种新的分型方法有它的统计学基础.

作者用这种新的 IBV 分型方法对中国的肾病变毒株进行了检测和确定. 29 个毒株中, 20 个没有出现 PCR 产物, 可能存在变异株; 有 1 株的 PCR 产物为 1 000 bp 左右; 8 个毒株有 1 734 bp 的 PCR 产物, 其中 4 株(分离自南方的广东、中部的河南、北方的内蒙古)归类于 Massachusetts 血清型, 1 株为 Gray 型, 3 株为新的变异株(图 6). 结果表明, 中国的肾病变 IB 的致病

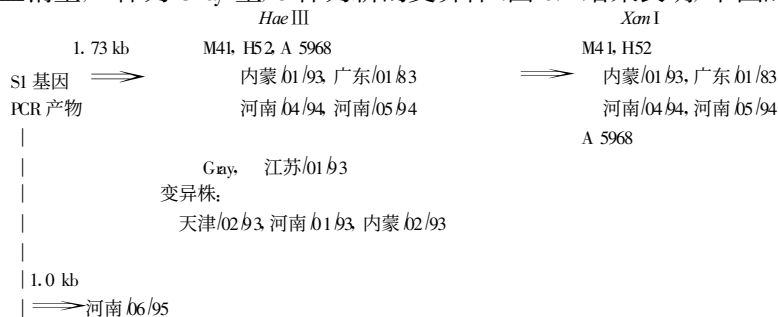


图 6 中国肾病变 IBV 毒株 S1 基因的 RT-PCR/RFLP 分析

因子在不同的地区有其特异的变异株,同时也存在有一个共同的血清型——Massachusetts 型毒株;这也解释了为什么一些象 Ma 5 等 Massachusetts 血清型疫苗株在防治中国肾病变 IB 时,有些地区效果好,有些地区没有效果。

致谢 感谢刘福安教授、辛朝安教授、甘孟侯教授、王红宁教授、杨汉春教授、李康然教授、王泽霖教授、张七斤副教授等惠赠毒株及工作支持。

参 考 文 献

- 王永坤,朱国强,田慧芳,等. 1996. 鸡传染性腺胃病的研究. 江苏农学院学报, 17(1): 52~53
- 王林川,陈水龙. 1997. IBV D 41 株的纯化与电镜观察. 广东农业科学, (1): 43
- 邱荣禄. 1982. 广东肾病变禽传染性支气管炎病例. 养禽与禽病防治杂志, 3: 41
- 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
- Calnek B W. 1993. Diseases of Poultry. 10th ed. Ames: American Association of Avian Pathologists 511~526
- Cavanagh D, Davis P J, Darbyshire D H, et al. 1986. Coronavirus IBV: virus retaining spike glycopolyptide S2 but S1 is unable to induce virus-neutralizing or haemagglutination-inhibiting antibody, or induce chicken tracheal protection. J Gen Virol, 67: 1435~1442
- Cummings R B. 1962. The etiology of uraemia of chickens. Aust Vet J, 38: 554
- Kwon H M, Jackwood M W, Gelb J. 1993. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Avian Dis 37: 194~202
- Schalk A F, Hawn M C. 1931. An apparently new respiratory diseases of baby chick. J Am Vet Med Assoc 78: 418~422
- Winterfield R W, Hitchner S B. 1962. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. Am J Vet Res, 23: 1273~1279

Characterization by S1 Gene RT-PCR/RFLP of Nephropathogenic IBV Strains Isolated in China

Wang Linchuan Zhang Guiyun Huang Yong Li Hua Liao Ming
(Dept. of Vet. Med., South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract 29 nephropathogenic IBV strains isolated from 13 provinces in China were characterized by S1 gene RT-PCR/RFLP. With the same pair of primers, eight IBV strains: Guangdong/01/83, Henan/04/94, Henan/05/94, Neimong/01/93, Jiangsu/01/93, Henan/01/93, Tianjing/02/93, Neimong/02/93, could amplify a sequence of 1734 bp that contains the S1 glycoprotein gene; the PCR product of strain Henan/06/95 was about 1 000 bp but the other 20 strains gave no result. By RFLP analysis, strains Guangdong/01/83, Henan/04/94, Henan/05/94, Neimong/01/93 were classified as Massachusetts serotype, strain Jiangsu/01/93 was the same as Gray; strains Henan/01/93, Tianjing/02/93, Neimong/02/93 were new variants. Based on these observations, it is suggested that the causative agents of nephropathogenic IB in China were specific variants in different enzootic areas, and which also had a common serotype——Massachusetts IBV.

Key words IBV; S1 gene; RT-PCR/RFLP; nephropathogenic

【责任编辑 柴 焰】