

文章编号: 1001-411X(2001)01-0078-03

我国鸡传染性支气管炎病毒地方分离株 S1 基因的分离及初步鉴定

游 洪, 王林川

(华南农业大学动物医学系, 广东 广州 510642)

摘要: 根据 IBV Beaudette 株全基因组序列, 借助基因分析软件自行设计合成了 3 条引物(you1+、you2-、youM+), 引物 you1+ 和 you2- 在 S1 基因两侧, 跨幅为 1 611 bp, 引物 you2- 和 youM+ 在 S1 基因的 3' 端, 跨幅为 535 bp. 用引物 you1+ 和 you2- 对 5 个 IBV 地方分离株(HN2、HN4、JX1、SC2 和 SC4)进行 RT-PCR, 均成功地扩增出预期大小的目的片段. 用另 1 对引物(you2- 和 youM+)对各毒株的 RT-PCR 产物再进行 PCR 扩增, 均得到一条约 530 bp 的目的片段; 对 RT-PCR 产物用限制性内切酶 *Pst* I 进行酶切分析, 结果酶切产物中得到 2 条条带, 大小分别为 560 和 1 050 bp, 与 GeneBank 中 11 株已发表的 S1 基因分析结果一致. 初步鉴定结果显示, 已经成功分离得到了 IBV-S1 基因.

关键词: 鸡传染性支气管炎病毒; RT-PCR; S1 基因; 鉴定
中图分类号: S855.3 **文献标识码:** A

传染性支气管炎(IB)是鸡的一种急性、高度接触性呼吸道传染病, 其病原是传染性支气管炎病毒(IBV). 该病是 1930 年春 Schalk 等在美国北达科他州首次发现, 于 1931 年正式报道; 70 年代我国在广东省首次发现该病^[1]. 该病毒在复制过程中极易发生变异, 从而导致 IBV 血清型众多、新的变异株不断出现^[2]; 病毒对组织器官的亲嗜性也在发生变化, 导致不同病变型的出现(如呼吸型、肾型、肠型、腺胃型等)^[3]. IBV 是一种正链单股 RNA 病毒, 基因组大小约 27~30 kb, 是目前所知 RNA 病毒中最大的^[4]. IBV 有 3 种主要结构蛋白: 表面纤突蛋白(S 蛋白)、膜蛋白(M 蛋白)和核衣壳蛋白(N 蛋白). S 蛋白可被宿主细胞的蛋白酶降解为 S1 和 S2 两条糖多肽, S2 与病毒和细胞的吸附有关^[2,3], 而 S1 蛋白是重要的免疫原, 能够诱发产生血凝抑制抗体和病毒中和抗体^[6,7], 并且 IBV 血清特异性抗原决定簇主要位于 S1 蛋白上^[8]. 本试验通过 RT-PCR 方法扩增出 IBV-S1 基因, 并对扩增产物进行初步鉴定, 为探讨我国不同地区 IBV 地方分离株的致病性和免疫原性差异的分子基础, 及为 IBV 的分子流行病学调查奠定基础.

1 材料与方法

1.1 病毒

IBV 四川地方分离株 SC4 和 SC2 系四川农业大学动物科技学院黄勇赠; IBV 河南地方分离株 HN2 系中国农业大学动物医学院张桂云赠; IBV 河南地方分离株 HN4 系河南农业大学牧医工程学院王泽霖赠; IBV 江西地方 JX1 分离株系江西省农科院张渊魁赠.

1.2 试剂与酶

Taq DNA 聚合酶为加拿大真达公司产品; RNasin、AMV-RTase、dNTPs 及 SDS 为 Promega 公司产品; 蛋白酶 K 为 Merk 公司产品; DEPC 为 Sigma 公司产品; *Pst* I 为华美公司产品; 其他试剂均为国产分析纯级产品.

1.3 引物的设计与合成

参照已发表的 IBV Beaudette 株全基因组序列^[9], 设计引物 you1+、you2- 和 youM+, 位置见图 1. 运用 DNAsis (2.0 版本, 下同)软件辅助设计, 并将初步设计结果提交给 primer (4.1 版)程序作评价分析, 在此基础上, 为了避免引物二聚体和发夹结构的产生, 在 5' 端对个别碱基作了更改; 另外, 为了下游工作的方便, 在引物的 5' 端加入了酶切位点. 引物由上海生工公司合成.

引物序列如下:

you1+ 5' cggaattcCTGGTAAGAGATGTTGGTAA 3'
(位于 S1 起始密码 ATG 处)
you2- 5' cacaagctTCACGAGTTCATTAGTGA 3'
(位于 S 蛋白裂解位点处)
youM+ 5' catgtcgacGTGGTGAAGCAATCTGT 3'
(位于 S1 区域内)

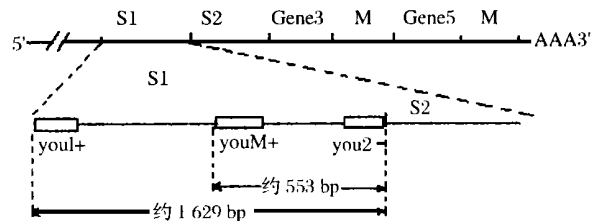


图 1 引物的位置

Fig. 1 Location of the primers used in this study

收稿日期: 2000-06-28

作者简介: 游 洪 (1974-), 男, 硕士.

基金项目: 国家自然科学基金重大项目 (39893290-2B)

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.4 病毒的繁殖与浓缩

用 10 龄非免疫鸡胚(购自广东省佛山市墟岗蛋鸡场)复壮各 IBV 地方分离株, 37℃温箱培养 36 h 后收获尿囊液;取清亮的尿囊液超速离心,用适量 DE-PC 处理水重悬病毒,置于-20℃冰箱备用.

1.5 病毒 RNA 的提取

参照王林川的方法进行^[10]. 取适量病毒悬液,经 SDS-蛋白酶 K 裂解,酚、氯仿/异戊醇(24:1)反复抽提 2~3 次,再于-20℃下经无水乙醇沉淀 3 h,离心后用 DEPC 水溶解病毒 RNA,置于-20℃下备用或直接进行反转录.

1.6 S1 基因 cDNA 第一链的合成与 PCR 扩增

S1 基因 cDNA 第一链的合成(反转录):取 12 μL 病毒 RNA 溶液与 1 μL 引物 you2- (20 μmol/L)混匀后,70℃水浴 5 min,立即冰浴 5 min,再依次加入以下各组分:40 U/μL 的 RNasin 1 μL,5× RT buffer 5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 4 μL,10 U/μL AMV-RTase 2 μL,混匀于 42℃1.5 h;最后置于 95℃水浴 5 min 以灭活 AMV-RTase. RT 产物置于-20℃冰箱待 PCR 扩增.

S1 基因的 PCR 扩增:将 10× PCR buffer 5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 4 μL,引物 you2- (20 μmol/L)和 you1+ (20 μmol/L)各 1 μL,RT 产物 5 μL 以及 33 μL 三蒸水混匀,于 97℃水浴中预变性 10 min,迅速冰浴 5 min 后,加入 5 U/μL Taq DNA 聚合酶 1 μL,置 PCR 扩增仪上执行以下程序:94℃1 min,51℃1 min,72℃2 min,共 30 个循环,最后 72℃后延伸 10 min.

1.7 S1 基因的 PCR 初步鉴定

取 S1 基因的 RT-PCR 产物 0.5 μL,将 10× PCR buffer 5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 4 μL,引物 you2- (20 μmol/L)和 youM+ (20 μmol/L)各 1 μL,37.5 μL 三蒸水混匀,于 97℃水浴中预变性 10 min,迅速冰浴 5 min 后,加入 5 U/μL Taq DNA 聚合酶 1 μL,置 PCR 扩增仪(Biometra, UNOII)上执行以下程序:94℃1 min,51℃1 min,72℃2 min,共 30 个循环,最后 72℃后延伸 10 min.

1.8 S1 基因的初步酶切鉴定

从 GeneBank 中调出 11 个 IBV-S1 基因序列用 DNAsis 软件进行比较分析发现,11 个 IBV 毒株的 S1 基因内距 5' 端约 560 bp 处均存在 Pst I 酶切位点,且在 S1 基因内该酶酶切位点较保守且唯一,因此本试验选取该酶对 S1 基因进行初步的酶切鉴定.

取 S1 基因 RT-PCR 产物 7.2 μL,10× Buffer(H) 1 μL,乙酰化 BSA 1 μL,限制性内切酶 Pst I (18 U/μL) 0.8 μL,加到 0.5 mL 的离心管中,瞬时离心混匀后置 37℃水浴中 3 h. 酶切产物在 10 g/L 的琼脂糖凝胶中进行电泳分析.

2 结果

2.1 IBV-S1 基因的 RT-PCR

用自行设计的 1 对引物 you1+ 和 you2- 采用

RT-PCR 方法顺利地 5 个 IBV 地方分离株(JX1、HN2、HN4、SC4、SC2)扩增出 1 条约 1.6 kb 的目的片段,与试验预期结果一致,同时,用另一对引物 youM+ 和 you2- 以 RT-PCR 产物作为模板进行 PCR 扩增也成功地扩增出 1 条约 530 bp 的目的片段,与预期结果吻合(图 2、图 3).

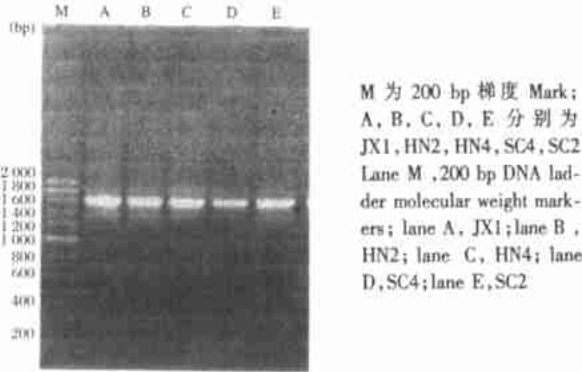


图 2 IBV-S1 基因的 RT-PCR(用引物 you1+ 和 you2-, 跨幅约 1 610 bp)

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of S1 genes from 5 IBV isolates

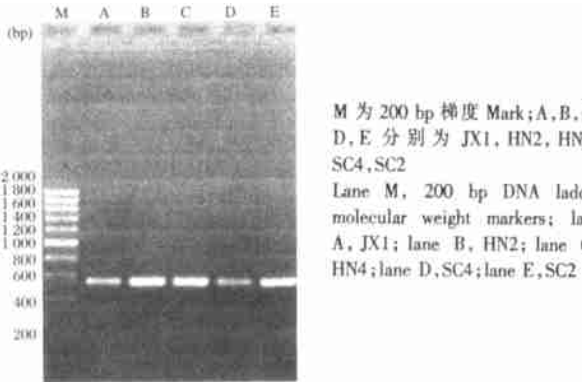


图 3 RT-PCR 产物的 PCR 初步鉴定(用引物 youM+ 和 you2-, 跨幅约 530 bp)

Fig. 3 Nested-PCR identification of RT-PCR products of S1 genes from 5 IBV isolates

2.2 S1 基因的初步酶切鉴定

经 Pst I 酶切鉴定, S1 基因 Pst I 酶切产物出现 2 条条带, 大小分别为 560 bp 和 1 050 bp, 与 GeneBank 中 11 株已发表的 S1 基因分析结果一致(图 4).

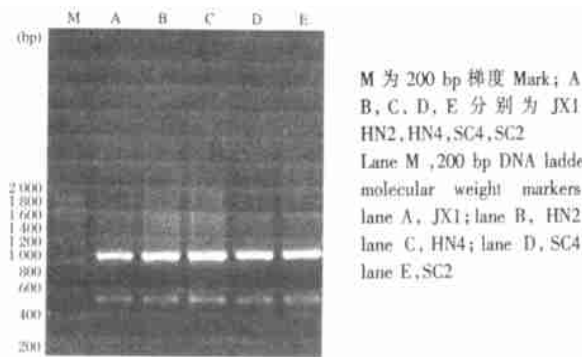


图 4 IBV 分离株 S1 基因 Pst I 酶切鉴定

Fig. 4 RFLP patterns of the PCR-amplified S1 genes from 5 IBV isolates digested with Pst I

3 讨论

在用 RT-PCR 方法分离 IBV S1 基因的试验中, 保证基因组 RNA 的完整性是实验成功的关键因素之一, 但是由于 RNA 酶无所不在, 且对外界环境的抵抗力强, 这就给病毒 RNA 的提取带来了很大的不便; 同时由于病毒基因组 RNA 极易发生点突变、缺失、插入和不同毒株间的高频率同源重组, 而且突变主要发生在 S1 基因上^[8], 加之 IBV-S1 基因长度大 (约 1.6 kb), 均此种种原因, 给 IBV S1 基因的 RT-PCR 扩增带来了极大的障碍。为了顺利地进行 IBV S1 基因的 RT-PCR 扩增, 创造一个无 RNA 酶的环境, 避免和抑制 RNA 酶对基因组 ssRNA 的降解, 以及设计多对引物, 从中遴选出 1 对扩增效率高且较为通用的引物是有必要的。

在本试验中, 用引物 (you1+ 和 you2-) 能够顺利地扩增出的 1 条约 1 610 bp 的目的片段, 与实验设计完全吻合; 同时用位于 S1 基因内 3' 端的 1 对引物 (youM+ 和 you2-) 以 RT-PCR 产物为模板进行 PCR 扩增, 5 个毒株均能准确扩增出 1 条约 530 bp 的目的片段; 用限制性内切酶 *Pst* I 对 RT-PCR 产物进行初步的酶切鉴定, 结果酶切产物中出现 2 条条带, 大小分别为 560 bp 和 1 050 bp, 这与 GeneBank 中调取的 11 个毒株的 S1 基因序列 *Pst* I 酶切位点分析结果也相符合。因此, 充分地说明作者已经得到了 5 个 IBV 地方分离毒株的 S1 基因。5 个毒株的 S1 基因 RT-PCR 产物的测序工作正在进行中。

本试验所用的 1 对引物 (you1+ 和 you2-) 对 5 个地方分离株 S1 基因进行 RT-PCR 扩增, 均能顺利地扩增出预期大小的目的片段, 而且重复性好, 说明

这对引物具有一定的通用性。当然其更广泛的通用性还需要收集更多的地方分离毒株来进行验证。

参考文献:

- [1] 邝荣禄. 禽病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997. 53—61.
- [2] CAVANAGH D, DAVIS P J. Sequence analysis of strains of avian infectious coronavirus isolated during the 1960s in the UK [J]. Arch Virol, 1992, (130): 471—476.
- [3] 王 斌, 刘彦威, 刘 娜, 等. 鸡传染性支气管炎病变型的研究进展[J]. 中国家禽, 1998 (20): 27—28.
- [4] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1997. 675—681.
- [5] CAVANAGH D, DAVIS P J, COOK J K A, et al. Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus [J]. Avian Pathol, 1992 (21): 33—43.
- [6] IGNJATOVIC J, GALLI L. The S1 glycoprotein but not the N or M protein of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens [J]. Arch Virol, 1994 (138): 117—134.
- [7] IGNJATOVIC J, GALLI L. Immune responses to structural proteins of avian infectious bronchitis virus [J]. Avian Pathol, 1995, (24): 313—332.
- [8] KUSTERS J G, NIESTERS H G M, BLEUMIN-PLUYM N M C, et al. Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus in the Netherlands [J]. J Gen Virol, 1987, (68): 343—352.
- [9] BOURSNEILL M E G, BROWN T D K, FOULDS U J, et al. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus [J]. J Gen Virol, 1987, (68): 57—77.
- [10] 王林川, 辛朝安. 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[J]. 华南农业大学学报, 1997, 18(2): 85—88.

The Amplification of the S1 Gene of Five Chinese Avian Infectious Bronchitis Virus Isolates and Identification

YOU Hong, WANG Lin-chuan

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

Abstract: According to the sequence of the genome of the Beaudette strain of IBV, and with a gene analysis program, three primers (you1+, you2- and youM+) were designed and synthesized. The primers you1+ and you2- were located respectively in the 5'-most and the 3'-most end of the S1 gene and approximately cover 1 611 bp and the primer youM+ lying in the middle of the S1 gene. RT-PCR was used to amplify the S1 gene fragment of the five Chinese IBV isolates (HN2, HN4, JX1, SC2 and SC4) using the primers you1+ and you2-. The result indicated that the length of the RT-PCR products was the same as expected. A sequence of 535 bp was amplified by PCR using the primers you2- and youM+ when every RT-PCR product of the five IBV isolates was used for template. The RT-PCR products were digested with the restriction enzyme *Pst* I and two fragments (560 bp and 1 050 bp) were seen, which were the same for the 11 published S1 sequences of IBV strains in Genbank. Therefore, all these results demonstrate that the S1 gene fragments of the five IBV isolates were isolated successfully.

Key words: avian infectious bronchitis virus; RT-PCR; S1 gene; identification