

文章编号: 1001-411X(2000)04-0071-03

传染性喉气管炎病毒北京 E2 株 gC 基因的克隆及其部分序列测定

吴红专¹, 刘福安¹, 朱道中¹, 陈义为², 梁志清²

(1 华南农业大学动物医学系, 广东 广州 510642; 2 香港大学动物学系, 香港)

摘要: 根据传染性喉气管炎病毒美国 632 株和英国 Thome 株 gC 基因的序列设计 1 对引物, 以北京 E2 株为模板, 用 PCR 方法扩增得到长度为 1.9 kb 的片段, 并将其克隆至质粒 pA-T 中, 用碱小量法制备质粒 DNA, 以酶切和质粒 PCR 的方法对其进行鉴定, 并以正向和反向引物测定其两翼序列, 结果正向引物测出 498 个碱基, 反向引物测出 499 个碱基, 将所得序列输入 GenBank 与其他毒株进行比较, 结果发现其与美国 632 株的同源性为 94.6%~98.9%, 与英国 Thome 株 UL44 的同源性为 55.1%。目前该基因序列已在 GenBank 中注册, 代码分别为 AF161065 和 AF161066。

关键词: 传染性喉气管炎病毒; 北京 E2 株; gC 基因; 序列测定

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

鸡传染性喉气管炎病毒属于 α 疱疹病毒亚科的一员, 它能使鸡发生一种死亡率增加、产蛋减少的呼吸道疾病^[1], 基因组为双股线状 DNA, 长度约为 155 kb。gC 基因是其非必需基因, 因而可作为外源性基因插入的位点。国外已相继报道了各自地方株的 gC 基因序列^[2,3], 我国台湾学者张伯俊^[4] 认为, 可以用 gC 基因对喉气管炎病毒不同毒株进行初步分型, 但要进行分型研究, 有赖于全世界范围内不同地方株 gC 基因的比较研究。传染性喉气管炎病毒北京 E2 株是我国地方强毒株, 研究其 gC 基因序列并与其他毒株进行比较, 有助于从分子水平揭示喉气管炎病毒在抗原型上是否存在差异, 为传染性喉气管炎病毒的分型奠定基础。

1 材料和方法

1.1 病毒和 SPF 鸡胚

鸡传染性喉气管炎病毒北京 E2 株购自中国兽药监察所, SPF 鸡胚购自山东营口 SPF 鸡场。

1.2 引物的设计及合成

参照美国 632 株及英国 Thome 株的序列设计 1 对引物, 并由 GibcoBRL 公司合成, 其序列如下:

正向: 5' - GCTAACATGGCTTGCTTTAA - 3',

反向: 5' - ATCATTGGGAATATCGGAC - 3'.

1.3 病毒核酸的抽提及 PCR 扩增条件的设置

病毒核酸的抽提按常规的蛋白酶 K + SDS 及酚: 氯仿法进行, PCR 反应体系设置 50 μ L, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min, 然后经 94 $^{\circ}$ C 1 min、52 $^{\circ}$ C 2 min、72 $^{\circ}$ C 2 min 35 个循环, 最后以 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.4 克隆质粒和转化菌

用于克隆的质粒 pA-T (3.9 kb) 和转化菌 Top10 为 CloneTech 公司产品。

1.5 PCR 产物的克隆

取 5 μ L 经 GeneClean II 试剂盒 (GibcoBRL 公司) 纯化的 PCR 产物与 1 μ L pA-T 质粒经 16 $^{\circ}$ C 连接过夜后, 用电转化法 1.8 kV 转化感受态细菌 Top10, 并用氨苄青抗性和蓝白斑筛选阳性克隆。

1.6 质粒的抽提和纯化

质粒的抽提按碱小量法制备, 并用 GeneClean II 试剂盒对其进行纯化。

1.7 质粒的鉴定

用双酶切和质粒 PCR 的方法对重组质粒 pgC 进行初步鉴定。

收稿日期: 2000-03-01

作者简介: 吴红专 (1968-), 男, 副教授, 博士。

基金项目: 华南农业大学校长博士启动基金项目 (4380)

1.8 传染性喉气管炎病毒北京 E2 株 gC 基因的部分序列测定及与其他毒株 gC 基因的比较

取 1 μ L 纯化的质粒 DNA, 按 PE 公司测序试剂盒说明, 分别用正向和反向引物, 经 96 $^{\circ}$ C 10 s, 50 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s 25 个循环后, 用异丙醇沉淀, 并用 φ = 75% 的乙醇洗涤后, 加入 TSR (终止缓冲液) 96 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 置于 ABI 310 自动测序仪上测序, 将所得序列输入 GenBank 进行查寻, 并与其他毒株的序列进行比较。

2 结果

2.1 传染性喉气管炎病毒北京 E2 株 gC 基因克隆

经 PCR 后得到了 1 条 1.9 kb 的 DNA 条带, 将其克隆至 pA-T 载体后, 双酶切和质粒 PCR 均得到了 1.9 kb 的 DNA 条带, 证明了克隆的正确性(图 1)。

2.2 传染性喉气管炎病毒北京 E2 株 gC 基因序列

5' 端序列 (GenBank ID No. AF161065)(1~498bp)

```

1 ttaggttact ttagtcganc ctgctctgaa tgttttcctc caaacctaag atgttcttag
61 ttgtacgatt ttgtattgc gaataccaca tcatccagta ccaagtaact aatggctggc
121 aatcgaatag aaatcaaaca tggcaccgag gagactgtcg cctcgaaact gccttcgccc
181 agctgcagaa attcggaaag aggacattag aaacagatct acattccacc gagcaaccgt
241 ttaactggaga aaatgctaga gaataaccta acaggcggcc tccaacttct actacttaac
301 aactggaact atattgtoga ggattgtcat agtcaogaac atgatgcagt attgcttcgg
361 atgcaatcta tattttgaca ttgtaataa agcacatgta ctatgcaag tttgcatcgg
421 tgaattcgt cgagagagaa agttacaagt tcgattctct cgcgctagga gtgtttccac
481 gtgcgaaaac gcaaaatt

```

3' 端序列 (GenBank ID No. AF161066)(1~499bp)

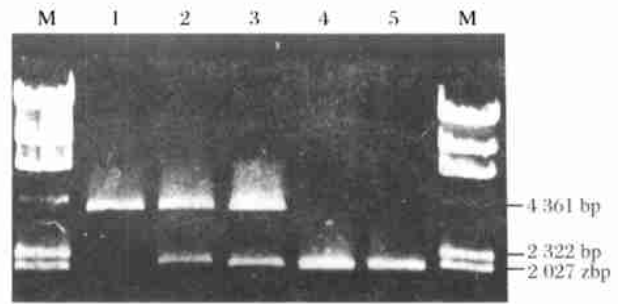
```

1 tgcctgtgt agagcagcta atattataga cggccgagga tttattgaat ggatcgtaga
61 taatagaatt tcgacgagcc cacaccagac ctttgttttg gatgagccc aggggaaaaa
121 tatcgttaca ctaatggacg tcataaaact accaccggag gatacatttc aatctgcctc
181 taattacgtg tgcgtcataa gaggctatga acatgcatac agatatctca acgcctcctt
241 aatgatagat aatctgcca tgcggcaagg attccccgca gtcgctgcga tttttattat
301 aattagtate gcttttgtgg gtgggttaact agttgcttgc ttgggcgcat ggtgctggaa
361 gacaacataa acgctcattt aataaatgac attacaaacg tgcactactg tctgtccaat
421 ttatttcate gaaaccttg cactggcagg tagtctcaag caagcctaaa cgatattata
481 gatttcaata tttetacca

```

2.3 传染性喉气管炎病毒北京 E2 株 gC 基因序列与其他毒株基因序列的比较

将传染性喉气管炎病毒北京 E2 株 gC 基因的序列输入 GenBank 与其他毒株的基因序列进行比较, 结果发现它与美国 632 株的同源性为 94.6%~98.9%, 而与英国 Thome 株 UL44 基因的同源性为 55.1%。



M. λ DNA/*Hind* III;

1. 空载体 pA-T *EcoR* I 的单酶切, 1. pA-T digested by *EcoR* I; 2. 重组质粒 pgC 的双酶切鉴定 (*EcoR* I + *Hind* III); 2. Characterization of gC gene recombinant pgC by double restriction enzyme digestion (*EcoR* I + *Hind* III); 3. 重组质粒 pgC 的双酶切鉴定 (*EcoR* I + *Hind* III); 3. Characterization of gC gene recombinant pgC by double restriction enzyme digestion (*EcoR* I + *Hind* III); 4. ILTV 北京 E2 株 gC 基因的 PCR 扩增; 4. Amplification of gC gene of ILTV Beijing E2 strain with PCR; 5. 重组质粒 pgC 的 PCR 鉴定; 5. Identification of recombinant pgC with PCR

图 1 传染性喉气管炎病毒北京 E2 株 gC 基因的克隆鉴定

Fig. 1 Cloning and identification gC gene of ILTV Beijing E2 strain

3 讨论

传染性喉气管炎是危害养禽业的重要呼吸道传染病, 且较易与其他上呼吸道病误诊, 近年来在国内呈地方性流行。关于传染性喉气管炎病毒的血清型, 常规方法不能检出其差异, 但是在实际生产中发现,

ILTIV 不同毒株的毒力存在差异. 随着分子生物学技术的发展, 可以从基因型的角度对 ILTV 不同毒株进行分类研究.

gC 基因是 ILTV 的非必需基因, 它主要与 ILTV 在感染细胞时的吸附作用有关. 我国台湾学者张伯俊用 RFLP 的方法已经证实台湾地方株的 gC 基因存在差异^[4], 但由于他们研究的毒株太少, 尚不能对 ILTV 进行分类. 我国是养禽大国, ILTV 地方株较为丰富, 可以对不同地区的毒株 gC 基因进行克隆并进行序列测定而比较其差异. 在本研究中以我国地方强毒株北京 E2 株着手, 对其 gC 基因进行了序列测定, 结果发现, 北京 E2 株与美国 632 株的同源性较高, 而与英国 Thorne 株的差异较大, 这进一步证明了 ILTV 不同毒株在基因型之间存在差异, 可以用基因分型的方法对 ILTV 不同毒株进行分类研究. 目前, 对我国其他地方分离株 gC 基因的序列测定正在研究中.

参考文献:

- [1] HANSON L Y, BAGUST T J. Laryngotracheitis[A] . CALNEK B W, BARNES H J, BEARD C W, et al. Disease of poultry [C] . 9th ed. Iowa: Iowa State University Press 1991. 496—519.
- [2] KEELER C L, DAVID H K, ADAMS BURTON C R. Identification of the thymidine kinase gene of infectious laryngotracheitis virus [J] . Avian Disease, 1991, 35: 920—929.
- [3] GRIFFIN A M, BOURSNEILL M E. Analysis of the nucleotide sequence of DNA from the region of the thymidine kinase gene of infectious laryngotracheitis virus; potential evolutionary relationships between the herpesvirus subfamilies[J] . J Gen Virol, 1990, 71: 841—850.
- [4] CHANG P C, LEE Y L, SHIEN J H, et al. Rapid differentiation of vaccine strains and field isolates of infectious laryngotracheitis virus by restriction fragment length polymorphism of PCR products[J] . J Virol Methods, 1997, 66: 179—186.
- [5] HAUGHES C S, WILLIAMS R A, GASKELL R M, et al. Latency and reactivation of infectious laryngotracheitis vaccine virus[J] . Arch Virol 1991, 121: 213—218.

Cloning and Partial Sequencing gC Gene of Infectious Laryngotracheitis Virus Beijing E2 Strain

WU Hong-zhuan¹, LIU Fu-an¹, ZHU Dao-zhong¹, Yee-wai CHAN², Frederick C. LEUNG²

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

2. Dept. of Zoology, Hong Kong University, Hong Kong, China)

Abstract: A pair of primers flanking the gC gene was designed based on published nucleotide sequence of the American 632 strain and British Thorne strain. Expected PCR products of 1.9 kb were obtained after PCR and cloned into pA-T vector. The recombinant was designated as pgC and mini-preparation of pgC with alkaline protocol and identified with enzyme digestion and plasmid PCR. After sequencing both ends of the gC gene with forward and reverse primer, a 498 bp nucleotide sequence with the forward primer and a 499 bp one with the reverse primer were obtained in the end, their sequences submitted to GenBank and blast searched with other strains. It was found that homology with American 632 strain and British Thorne strain reached 94.6% ~ 98.9% and 55.1% respectively. At present, the gC gene of Beijing E2 strain has been registered with the GenBank, the accession number being AF161065 and AF161066 respectively.

Key words: infectious laryngotracheitis virus; Beijing E2 strain; gC gene; sequencing

【责任编辑 柴 焰】