

犬I型腺病毒DNA的酶切分析及分子克隆

白丽萍¹ 童光志¹ 赵永军² 吴保成¹
岳军明¹ 王玫¹ 殷震²

S852.65

(1. 中国农科院哈尔滨兽医研究所国家兽医生物技术实验室, 哈尔滨 150001)

(2. 解放军兽医大学军事兽医研究所, 长春 130012)

提 要

犬I型腺病毒(CAV-1)弱毒用限制性内切酶EcoR I, BamH I, Pst I, Sph I和Hind III消化分析后其图谱与强毒株相比没有差异。将弱毒DNA用Pst I完全消化后以鸟枪法克隆到载体质粒pBluescrip' SK中, 经用光生物素标记的CAV-1 DNA杂交筛选以及Pst I分析重组质粒证明已将分子量为5.5, 3.5, 2.85, 1.2, 0.32和0.28Kb的CAV-1 DNA片段克隆到质粒中。克隆到的这些片段将可考虑进一步研究作为探针检测犬及狐狸等野生动物的腺病毒感染。

关键词: 犬I型腺病毒 DNA酶切分析 分子克隆 克隆

犬I型腺病毒(CAV-1)可引起犬传染性肝炎(ICH)及狐狸脑炎(FE)等疾病。此病在世界各地均有流行, 发病率和死亡率均高, 对养犬业及养狐业危害很大^[1,2]。近年来, 疑似ICH和FE的疫病在我国的犬、狐群中屡有发生^[3], 因此, 为尽快查清病原, 以便采取有效的防治措施, 本实验克隆了CAV-1 DNA的6个Pst I片段, 以此作为探针可进一步研究建立一种有效、特异而且灵敏的诊断方法。

材 料 与 方 法

病毒及细胞 本实验所用的CAV-1弱毒是从美国引进的三联苗(犬瘟热, 犬副流感和犬腺病毒)中分离的, 命名为ML-CAV 1; CAV-1强毒系从患传染性肝炎的病犬体内分离的A-8301株^[2]。以上强弱毒及犬肾传代细胞(MDCV₁)均由长春兽医大学军事兽医研究所提供。

酶及其它试剂 限制性内切酶EcoR I, BamH I和Hind III购于美国的Bio-Lab公司; Pst I, Nsi I, Sph I, T-4 DNA连接酶和碱性磷酸酶系华美生物工程公司的产品; 光生物素(photobiotin)购自Research Organic Inc.; X-gal及BluGENE非放射性检测试剂盒是BRL公司生产的; 载体质粒pBluescrip' SK是由英国豪顿家禽研究所Cavanagh博士惠赠。

病毒的培养及病毒DNA的抽提^[4] 将CAV-1接种到长成单层的犬肾细胞上, 当大部分细胞出现病变时, 倒掉上清, 将细胞刮下, 反复冻融两次后用等体积TE饱和的酚抽提, 离心取出中间的

本文于1991年8月13日收到, 1992年3月2日修回。

蛋白质用 TNE (0.1mol/L Tris-HCl, pH8.0, 0.15mol/L NaCl, 0.001mol/L EDTA) 溶解后加 SDS 至终浓度为 0.4%, 加蛋白酶 K 到 0.15mg/ml, 在 37℃ 消化 2 小时后再用等体积酚抽一次, 取上层用等体积酚/氯仿 (1:1) 抽一次, 最后用氯仿抽一次, 然后加 3 倍体积乙醇在 -20℃ 放置 30 分钟, 离心 (12000×g) 20 分钟, 沉淀用 TE 悬浮备用。

DNA 的非放射性标记 约 25μl (25μg) 的 CAV-1 DNA 经 20 个单位的 Pst I 消化 2 小时后加 25μl (25μg) 光生物素进行光合成标记, 详细方法见文献^[5]。

重组质粒的构建及筛选 将 5μg 的 CAV-1 弱毒 DNA 用 10 个单位 Pst I 消化 1 小时后, 再加 10 单位 Pst I 继续消化 2 小时, 加等体积酚/氯仿 (1:1) 抽提一次, 然后加 1/10 体积的 3mol/L 醋酸钠 (pH4.8) 及 2 倍体积乙醇, 在 -20℃ 放置 30 分钟后离心沉淀 (12000×g, 10 分钟), 吹干乙醇后加适量 TE 悬浮沉淀。将此病毒 DNA 片段与 Pst I 酶切后脱磷的 pBluescrip⁺ SK (2:1) 混合后在 55℃ 加热 10 分钟, 然后在室温冷却退火, 加连接缓冲液 (含 ATP) 及 2—3 个单位的 T-4 DNA 连接酶于 15℃ 过夜连接, 将连接后的质粒转化到大肠杆菌 DH52 中, 然后涂在含 X-gal 及 Amp 的 LB 平板上, 含重组质粒的细菌将形成白色菌落, 含非重组质粒的菌形成蓝色菌落。选白色菌落扩增并抽提质粒, 经沸水加热变性后点在硝酸纤维素膜上, 用光生物素标记的 CAV-1 DNA 探针与之杂交, 杂交及显色方法见文献^[5]。

结果与讨论

一、CAV-1 强毒株及弱毒株 DNA 的酶切分析

提纯的 CAV-1 强毒和弱毒 DNA 分别用限制性内切酶 EcoRI, BamHI, Pst I, Nsi I, Sph I 和 Hind III 完全消化后在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳分离, 结果证明 CAV-1 强、弱毒株的以上 6 种酶切图谱完全相同。本实验未做进一步分析, 可能其它种酶切能发现其差异存在, 图 1 所示的是 CAV-1 弱毒 DNA 的酶切图, 参照标准分子量样品测出了图中

表 1. CAV-1 弱毒 DNA 酶切片段的分子量

Table 1. Mol. Wet. of Modified CAV-1 DNA Fragments

片段 Fragments	酶切片段分子量 (Kb) Sizes of restriction enzyme fragment (kb)					
	EcoR I	BamH I	Pst I	Nsi I	Sph I	HindIII
A	17.0	13.0	5.5*	12.0	8.5*	6.6
B	3.6	11.8	3.5	8.1	5.4	8.0
C	2.8	5.7	2.85	4.2	3.1	6.0
D	2.4		1.2	3.6	2.0	4.1
E	1.8		0.32	2.5	1.5	2.2
F	1.7		0.28	1.05	1.0	2.0
G	0.9			0.8	0.75	1.9
H				0.7		1.2
I						0.7
J						0.5
共计 Total	30.2	30.5	13.6	30.95	22.25	30.2

*: 高摩尔浓度片段
which are hypermolar fragments

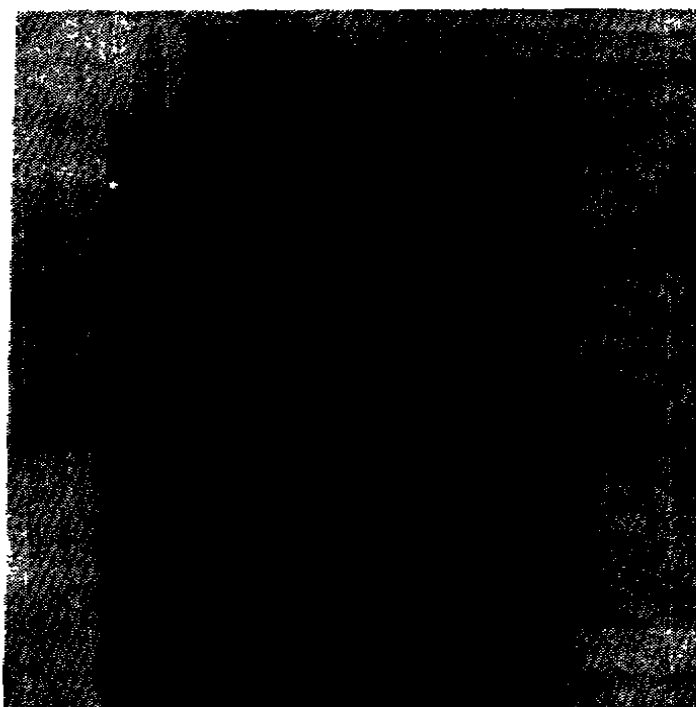


图1 CAV-1弱毒DNA的限制性酶切分析, CAV-1 DNA经限制性内切酶EcoRI, BamHI, Pst I, Nsi I, Sph I和HindⅢ完全消化后在0.8%的琼脂糖凝胶上电泳分离, 左侧是标准分子量样品(1kb ladder, BRL), 右侧是λ DNA的HindⅢ片段。

Fig. 1. Restriction Enzyme Analysis of Modified CAV-1 DNA. CAV-1 DNA was digested completely with restriction enzymes as indicated, and electrophoresed on a 0.8% agarose gel. Mol. Wgt. standards were placed at left (1kb ladder, BRL) and right (lambda DNA HindIII fragments) sides.

所见的各酶切片段的分子量(表1)。有些区带的密度明显高于邻近的区带, 这提示此处可能有两种或两种以上的片段。

二、CAV-1弱毒DNA Pst I片段的克隆及鉴定

CAV-1 DNA用Pst I完全消化后与载体质粒 pBluescript⁺SK连接, 获得大量的重组子, 挑选其中60个菌落进行扩增培养, 快速抽提质粒用光生物素标记的全病毒DNA与之杂交进行初步筛选, 呈阳性反应的质粒用Pst I消化后与Pst I消化的CAV-1 DNA共同电泳, 结果显示重组质粒中的外源片段与病毒DNA的不同片段迁移率一致。经双重鉴定证明分子量分别为5.5(A), 3.5(B), 2.85(C), 1.2(D), 0.32(E)和0.28(F)kb的CAV-1 Pst I片段都被克隆到质粒中(图2a), 图2b所示的是部分杂交筛选结果。

核酸探针是一种比较新的诊断技术, 用光生物素标记的探针具有更快速、安全和操作方便等优点。利用生物素标记整个重组质粒作为探针将比单纯用病毒DNA片段更为敏感, 因为质粒本身被标的生物素在最后加亲和素、碱性磷酸酶连接物及底物显色时有额外的放大作用⁽⁶⁾, 但是, 如果被检样品中含有与质粒DNA同源的系列时, 则不能用整个重组质粒作为探针。

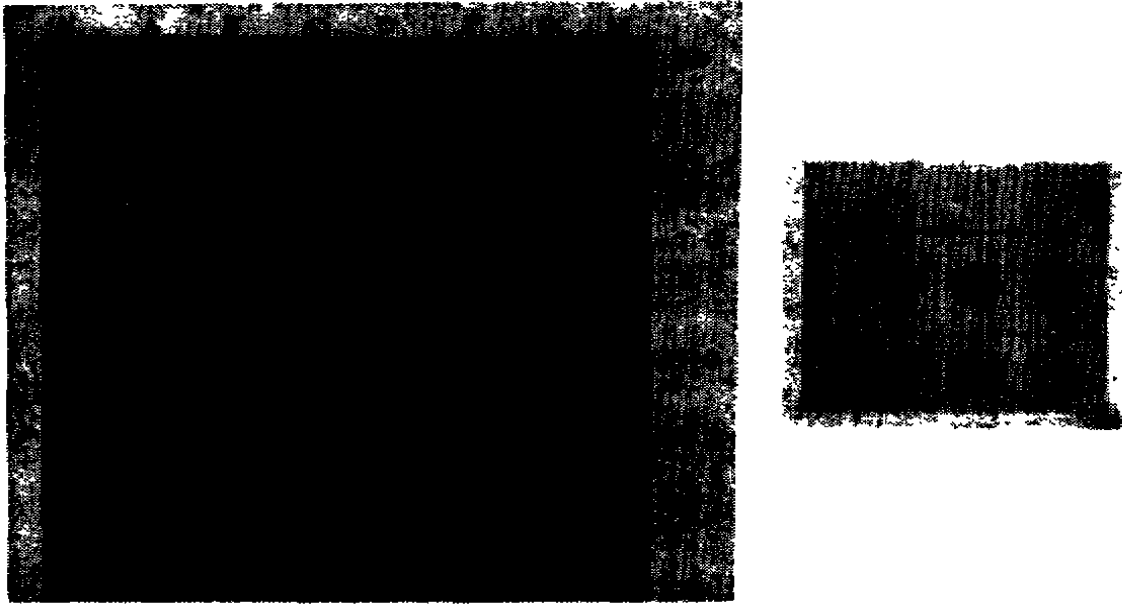


图 2. 克隆的 CAV-1 弱毒株 DNA Pst I 片段及杂交筛选

- a. 各重组质粒及 CAV-1 DNA 用 Pst I 完全消化后在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳分离, 箭头所指为较小的 F 和 G 片段, 右侧 (M) 是标准分子量样品 (1kb ladder, BRL)。
- b. 将快速法抽提的重组质粒点在 NC 膜上, 然后用光生物素标记的 CAV-1 DNA 与之杂交, 显色所用的底物是 NBT 和 BCIP。

Fig. 2. Cloned Modified CAV-1 DNA Pst I Fragments and Hybrid-selection

- a. Recombinant plasmids and CAV-1 DNA were digested with Pst I, and separated on 0.8% agarose gel. White arrows indicate small fragments, F and G, 1kb ladder (BRL) as mol. wt. standard was placed at right side (M), all sizes are given in kb.
- b. Recombinants extracted by mini-procedure were dotted on NC membrane and hybridized with photobiotin labeled CAV-1 DNA. Substrates for color development were NBT and BCIP.

考 参 文 献

- [1] Koptopoulos, G. et al., 1981, *Vet. Bull.*, 51:135-140.
- [2] 夏成柱等, 1990, *中国畜禽传染病*, (6): 38-40.
- [3] 徐汉坤等, 1990, *中国畜禽传染病*, (6): 1-3.
- [4] Garusi, E.A., 1977, *Virology*, 76: 380-394.
- [5] 童光志等, 1990, *病毒学杂志*, (4): 423-429.
- [6] 童光志等, 1990, *中国畜禽传染病*, (4): 49-51.

Restriction Enzyme Analysis and Molecular Cloning of CAV-1 DNA

Bai Li-ping* Tong Guang-zhi* Zhao Yong-jun** Wu Bao-chen*
Yue Jun-ming** Wang Mei* Yin Zhen**

(*: The National Veterinary biotechnological Laboratory,
Harbin Vet. Res. Inst. Harbin 150001)

(**: The Military Veterinary Research Institute, Vet. College
of PLA, Changchun 130012)

The virulent and modified canine adenovirus type 1 (CAV-1) DNAs extracted from canine kidney cells (MDCK) 36 hrs postinfection were both analysed with restriction enzymes EcoR I, BamH I, Pst I, Nsi I, Sph I and HindIII, and no difference was found from the electrophoresis pattern between the two viruses. The modified CAV-1 DNA was digested completely with Pst I and cloned into plasmid pBluescript SK taking shotgun procedure. Through hybridization selection of photobiotin labeled CAV-1 DNA and Pst I digestion of recombinant plasmids, 6 CAV-1 DNA Pst I fragments with mol. wts. of 5.5, 3.5, 2.85, 1.2, 0.32 and 0.28kb, were indicated being cloned in the plasmid. These clones will be used as probes to diagnose CAV-1 infections for dogs and foxes.

Key words: CAV-1 DNA fingerprinting Molecular cloning