

347-350

4033(11)

伪狂犬病毒闽A株基因文库的构建及物理图谱分析

汪铭书 郭万柱

(四川农业大学, 四川雅安 625014)

娄高明 ✓ 费恩阁 宣华

(中国人民解放军农牧大学, 长春 130062)

S852.65

A 提要 本文报道以质粒 pBR322 作载体, 用鸟枪法克隆出了 PRV 闽 A 株除 BamHI-1, 2 外的所有酶切片段, 构建了 PRV 闽 A 株基因文库, 并以克隆出的 BamHI 片段用光生物素标记作探针, 应用分子杂交法确定了 PRV 闽 A 株绝大部分限制性内切酶位点的位置。

关键词 伪狂犬病毒, 基因文库, 物理图谱 *家畜病毒学*

伪狂犬病毒 (PRV) 是多种家畜和野生动物均可感染的一种传染病的病原, 它属于 α 疱疹病毒^[1,2], 基因组为一线性双链 DNA, 分子量 90×10^6 道尔顿, 核酸长度约 150kb^[3,4]。

分子病毒学在阐明基因和产物结构与功能的基础上有可能提示病毒感染病的本质, 从而为诊断控制病毒病提供有效的方法和手段。因此国外对 PRV 分子生物学方面的研究已越来越深入, 不仅确定了许多毒株的物理图谱和基因组中各段基因的功能^[2,4], 且在此基础上对一些毒株的基因组进行改造, 获得了各种有用的基因缺失苗^[5]。但国内毒株分子生物学方面的研究未见报道, 我们认为这一部分工作是对 PRV 深入研究并有效地控制、最终消灭伪狂犬病不可缺少的部分。为此本研究克隆和构建出了 PRV 闽 A 株的基因文库并对其物理图谱进行了定位。

材料和方法

1 材料

1.1 细胞及毒株 PK₁₅ 细胞及 PRV 闽 A 株均由中国兽药监察所提供。

1.2 菌株及质粒宿主菌 *E. coli* DH5 α (F⁻, *crdA*⁻, λ ⁻, *argF*⁻ Lac Zya) 及质粒 pBR322 购自 BRL 公司, 质粒 PN₃HB (含 PRV Hind III B 片段) 由荷兰 Lelystad 中央兽医研究所病毒系 Gielkens A. L. J. 博士惠赠。

1.3 硝基纤维素膜购自 BRL 公司, 各种工具酶及主要试剂购自华美生物工程公司, 光生物素购自 Research Organics Inc. USA。

1.4 主要仪器 Beckman (TJ-6 型) 冷冻离心机, TGU-18A 高速冷冻离心机, SHZ-8Z 型水浴恒温振荡器, DF-C 型恒压恒流电泳仪, TR-312A/A 短波紫外透射仪。

2 方法

2.1 病毒 DNA 的提取 将病毒接种到长成单层的 PK₁₅ 细胞上, 当细胞出现 75—100% 的细胞病变 (24—72 小

本文于 1993 年 9 月 28 日收到, 10 月 23 日修回

时)时,按文献^[4]介绍的方法提取病毒 NDA。

2.2 重组质粒的构建及酶切鉴定^[7,8] 经 BamHI 酶解并用碱性磷酸酶除去 5' 末端磷酸的 pBR322 和经 BamHI 酶解的 PRV 闽 A DNA 于 12—16℃ 下加入 T4 DNA 连接酶作用 12—24 小时后,转化经 CaCl₂ 致敏的 *E. coli* DH5a,并以 Amp 和 Tet 琼脂平板筛选出 Amp^r 和 Tet^r 的阳性菌落。

阳性菌落用 Triton-lyzome 法提取重组质粒,酶切后与经 BamHI 酶切的 PRV 闽 A DNA 一同电泳,重组片段与 PRV 闽 A DNA 的带谱进行比较,初步鉴定出重组质粒及所属的片段。

2.3 探针的光生物素标记及 Southern 转印杂交 经酶切初步鉴定的 BamHI 片段及 PN₃HB 片段,用光生物素标记^[9]作探针,与经 Southern 转移^[7,8]至硝基纤维素膜上的 PRV 闽 A/BamHI 及 PRV 闽 A/Kpn I 片段,采用甲酰胺杂交系统进行杂交^[4],具体方法按文献进行。据杂交结果鉴定出重组质粒并确定出酶切位点的位置。

结 果

1 PRV 闽 A 基因文库的构建 PRV 闽 A 经 BamH I 酶解后,以质粒 pBR322 为载体,经鸟枪法以 T4 DNA 连接酶连接后,转化 *E. coli* DH5a,以 Amp 和 Tet 琼脂平板筛选出 Amp^r 和 Tet^r 的阳性重组体,重组质粒酶切电泳初步筛选,然后用光生物素标记后与经 Southern 转移至硝基纤维素膜上的 PRV 闽 A/BamH I 片段进行杂交鉴定(杂交结果见表 1),克隆出了 PRV 闽 A 基因组除 BamH I—1,2 片段外的所有 12 个酶切片段的重组质粒,从而构建了 PRV 闽 A 的基因文库(见图 1)。

2 PRV 闽 A 株物理图谱的确定 以克隆出的 BamH I 片段和 PN₃HB 片段用光生物素标记作探针,以 Kpn I 消化的 PRV 闽 A 片段作为杂交的受体,以 Southern blot 法进行转膜杂交(杂交结果见图 2 和表 1)。据各杂交片段之间的邻近关系和交替重叠现象,排列出了 PRV 闽 A 的 BamH I 和 KpnI 的大部分限制性内切酶的位点图,即物理图谱(见图 3)。

讨 论

本研究不但较完整地克隆出了 PRV 闽 A 基因组的 BamH I 酶切的 14 个片段中的 12 个基因片段,构建了其基因文库,且确定出了 PRV 闽 A BamH I 和 KpnI 的大部分限制性酶切位点的位置,据已构建的其它 PRV 毒

株的物理图谱看出^[2,10],各 PRV 基因组的长链区(U_L)变化不大,差异主要是在重复区(TR 和 IR)和短链区(U_S)以及它们的连接区,且大部分对 PRV 生物学特性较重要的基因(如主要的糖蛋白基因 gp50)位于这些区域内。Berns A 等通过实验证实毒力的标记也主要位于这些区域内^[2],因未克隆到两个大片段,在确定 PRV 的限制性内切酶位点时我们主要确定了 U_S 和重复

表 1 以标记 BamH I 片段和 PN₃HB 片段作为探针的杂交结果

Tab. 1 Hybridization with labeled BamH I fragments and PN₃HB fragment

生物素标记探针 Biotin-labeled probes	闽 A 株 DNA 酶切片段 Restriction fragments of Min-A DNA	
	BamH I	Kpn I
PN ₃ HB	5,7,10,12	H, I, J/K, M, N
PPB51	4	B
PPB92	5	E/F, J/K, M
PPB108	6	F, L
PPB140	7	I, J/K, N
PPB15	8	E/F, H
PPB151	9	J/K
PPB75	10	J/K
PPB103	11	B, J/K
PPB81	12	I, J/K
PPB96	13	H
PPB116 大	14	F
PPB116 小	15	B

区的位点位置。从现已构建的 N1A-3、Ka、MK-25 等毒株的物理图谱来看^[2,10],各毒株的酶切位点的差异又主要是 5、6、14 和 15 这 4 个片段的位置变化,在确定闽 A 株的限制性酶切位点中,因片段 5 和 6 的迁移率相同,而大部分毒株的 5 片段位于重复区内,因而我们主张把闽 A 株重复区内的片段编为 5,而片段 6 编在长链区内。片段 14 在片段 6 和 8 之间;片段 15 的位置是在 9 与 11 间还是在 3 与 4 间,尚待进一步确定。

PRV 闽 A 株基因文库的构建及限制性内切酶位点的确定对于深入研究 PRV 的分子生物学特性和伪狂犬病的诊断、预防有其实际意义和价值。如现用核酸探针杂交技术诊断伪狂犬病,但用整个基因组作探针,不但灵敏度和特异性可能降低,且提取病毒 DNA 也较麻烦,若用基因文库中的某个特异性的短片段则可克服上述问题^[6]。又如,用国内 PRV 毒株构建基因缺失苗,要切除编码毒力的某个基因或加上某些基因片段,也须在克隆出酶切片段并确定其酶切位点的基础上进行。再如,有的学者试图利用 PRV 构建通用载体,这也须在克隆出酶切片段、了解限制性内切酶位点的基础上进行。此外,我们要对 PRV 作进一步深入的研究,确定某个基因编码区与 PRV 所表现出的生物学特性之间的关系等也须在克隆出基因片段,清楚其酶切位点的基础上进行。当然,这些工作还有待于去研究,但对我国 PRV 闽 A 株基因文库的构建及主要限制性内切酶位点的确定,将有助于推动我国基因工程技术在伪狂犬病诊断、预防等方面的实际应用和发展。

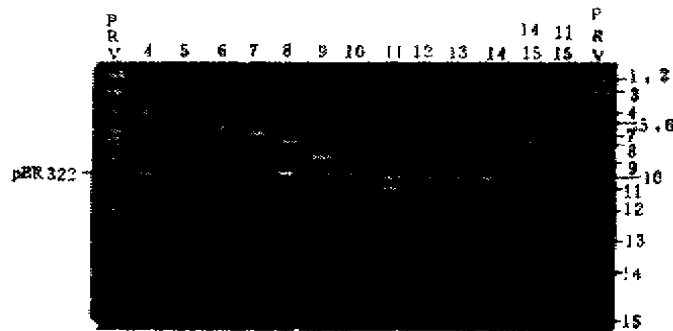


图 1 克隆的 PRV 闽 A DNA/BamH I 片段和病毒 DNA 经 BamH I 消化后在 0.7% 琼脂糖凝胶电泳 18 小时(50V)

Fig. 1 Cloned BamH I fragments of PRV Min-A and PRV min-A DNA were digested with BamH I, and electrophoresis on a 0.7% agarose gel for 18 hours(50V)



图 2 用光生物素标记 BamH I 片段作探针与 PRV 闽 A/Kpn I 作 Southern 杂交的部分结果

Fig. 2 Section Southern Hybridization of the biotin-labeled BamH I fragments with PRV Min-A/Kpn I

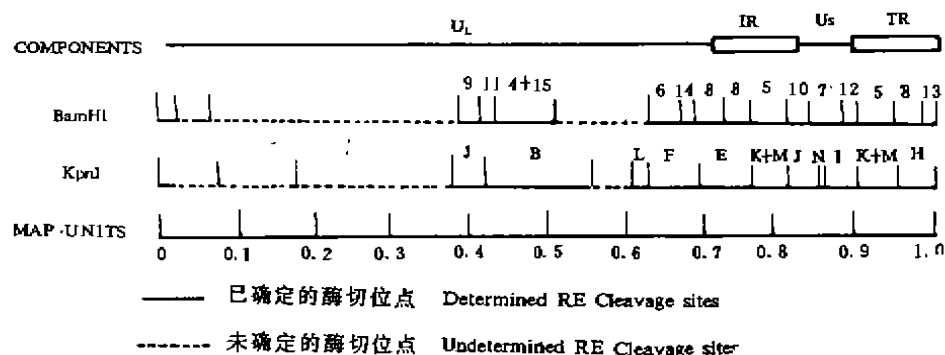


图3 PRV 闽A的 BamH I 和 Kpn I 的物理图谱

Fig. 3 Physical mapping of the BamH I and Kpn I cleavage site for PRV Min-A

参 考 文 献

- 1 殷震,刘景华主编. 动物病毒学. 第1版. 北京:科学出版社,1985;705~713
- 2 Berns A, Ouweland A, Quint W, et al. Presence of markers for virulence in the unique short region of repeat region or both of pseudorabies hybrid virus. J virol. 1985; 53(1): 89~93
- 3 Rixon F J, Ben P T. Structure evolution of the DNA of Pseudorabies defective viral particles. Virology, 1979; 57:151~163
- 4 Wathen M W, Wathen L M K. Isolation, characterization, and physical mapping of a pseudorabies virus mutant containing antigenically altered gp50. J Virol, 1984; 51(1):57~62
- 5 Saul K, Michael S, Tchinura H, et al. Second-generation pseudorabies virus vaccine with deletions in thymidine kinase glycoprotein genes. AM J Vet Res. 1987; 45(5): 780~793
- 6 郭万柱,冯炳芳,曹军,等. 应用³²P 标记 DNA 探针检测伪狂犬病病毒的研究. 四川农业大学学报,1991; 9(1):52
- 7 侯云德主编. 病毒基因工程原理与方法. 第1版. 北京:人民卫生出版社,1985; 183~206
- 8 Maniatis T, Fritsh E F, Sambrook J. Molecular Cloning A Laboratory Manual. New York, USA; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982
- 9 Froster A C, McLines J L, Derek C S, et al. Non-radiative hybridization probes prepared by the chemical labeling of DNA with a novel reagent photobiotin. Nucleic Acids Res, 1985; 3:745
- 10 Gielkens A, Lomniczi B, Csobai L, et al. Evolution of pseudorabies virions containing genomes with an invertible long component after repeat passage in chicken embryo fibroblasts. J Virol, 1987; 61(6): 1772~1780

Construction of Pseudorabies Virus Genomic Library and Analysis of Physical Mapping

Wang Mingshu Guo Wanzhu

(Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625014)

Lou Gaoming Fei Enge Xuan hua

(The Chinese People's Liberation Army University of Agriculture and Animal Husbandry, Changchun 130062)

The Restriction endonuclease fragments except the ones from BamH I -1,2 were inserted into plasmid pBR322. The genomic library of Pseudorabies virus Min-A was also constructed. The Cloned fragment digested by BamH I were labeled with photobiotin. With molecular hybridization, the main cleavage site of Pseudorabies virus Min-A strain were determined.

Key words Pseudorabies virus, Genomic library, Physical mapping