

应用 DIG 标记探针杂交检测 IBDV

陈士友* 陈溥言 蔡宝祥

(南京农业大学动物医学系, 南京 210095)

金由辛 王德宝

(中国科学院上海生化所分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

S852.65

张兹钧

(拱北动植物检疫局, 珠海 519020)

A

提要 本试验用地高辛(Digoxigenin, DIG)标记的探针建立了核酸杂交检测传染性法氏囊病病毒(IBDV)的方法,并在敏感性方面同琼脂扩散试验进行了比较。探针来源于IBDV STC-119和STC-243 cDNA。杂交方法的敏感性试验表明,核酸杂交可以检测到0.1pg的IBDV RNA;与多个毒株核酸的杂交则显示出标记的探针可以作为通用试剂用于IBDV早期感染的诊断;而同琼脂扩散试验的比较则说明,杂交方法比常规的免疫沉淀反应敏感10⁴倍以上。除此之外,由于杂交方法特异以及非放射性探针操作方便,因而具有很大的应用前景。

关键词 传染性法氏囊病病毒, DIG 标记核酸探针, 核酸分子杂交, 琼脂扩散试验

(针) 地高辛, 标记, 探

传染性法氏囊病病毒(IBDV)是鸡的传染性法氏囊病(IBD)的病原。IBDV感染鸡后,引起法氏囊组织的坏死,破坏机体免疫系统,使鸡对其他病原入侵的抵抗力减低或丧失,并导致疫苗的免疫力降低和混合感染,多方面的原因常引起感染鸡群的大批死亡。由IBDV引起的疾病自1975年在美国特玛瓦州(Delmarva)发现以来,已在世界范围内给养鸡业造成了严重的经济损失^[1]。目前,IBDV仍是危害国内养鸡业最严重的病原之一。

近几年,IBDV经常发生变异。变异株的出现使IBD的发生出现了许多新特点,包括发病率、死亡率升高、发病日龄区间扩大、亚临床感染和病变趋于不明显化等。这些变化给IBD的诊断与防治造成了许多困难。

诊断IBD的方法很多,如琼脂扩散试验、ELISA、反向间接血凝、间接荧光抗体、APAAP桥联酶标技术,生物素SPA-亲和素酶联免疫吸附试验、电泳技术等^[2-8]。其中,琼脂扩散试验最简单,在实践中也是最常用的方法,但琼脂扩散试验的敏感性低,而且主要用于检测血清中的抗体,因此不能在感染的早期诊断出IBD。免疫酶系列方法虽然敏感,但由于其涉及的因素太多,结果不稳定,有时与琼脂扩散试验诊断的结果不吻合,因此也不是理想的方法。

本文于1993年10月21日收到,1994年4月22日修回

本课题获高校博士学位点专项及上海分子生物学国家重点实验室科研基金资助

* 现在中国科学院上海细胞生物学研究所,上海 200031

随着分子生物学的发展,核酸探针技术越来越多地被用于诊断病毒性疾病。IBDV 的探针杂交试验国外已有应用^[9-11],但用 Digoxigenin (DIG) 标记的探针检测 IBDV 的方法尚未见报道,而且也很少有人将杂交方法与血清学方法进行比较。本试验用 DIG 标记的 IBDV STC-119 和 STC-243 cDNA 片段作探针建立了检测 IBDV 核酸的方法并同琼脂扩散试验进行了比较。

材料与方法

1 材料

- 1.1 STC-119、STC-243 cDNA 克隆 由美国俄亥俄州立大学的 Daral J. Jackwood 博士惠赠。
- 1.2 IBDV 病毒株 青岛株由拱北动植物检疫局的张兹钧老师提供,荷兰株(B87)由南京药械厂提供,上海株由上海农学院谈建明老师提供,其他株均由南京农业大学提供。
- 1.3 IBDV 抗原、阳性血清(IBDS)和阴性血清均由南京农业大学传染病组提供。
- 1.4 限制性内切酶 Hind III 和 EcoRI 为 BRL 产品。
- 1.5 DIG DNA 标记和检测试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司产品。
- 2 IBDV RNA 的制备 发病鸡和健康鸡的法氏囊各 10 个匀浆,氯仿抽提 3 次,用 IBDS 沉淀病毒,然后按常规方法抽提病毒核酸。
- 3 IBDV cDNA 探针的制备 将 STC-119 和 STC-243 分别用 Hind III 和 EcoRI 消化,用低熔点琼脂糖凝胶电泳法回收两个 cDNA 片段,然后将两者混合起来作探针和阳性对照。
- 4 用 DIG 标记 IBDV cDNA 片段 按试剂盒说明书介绍的方法进行。
- 5 Dot blot 及固定 将 IBDV 核酸样品、正常法氏囊抽提物(阴性对照)和探针混合物(阳性对照)分别放入 Eppendorf 管中,100℃5 分钟后,立即转入冰浴 5 分钟。按一定顺序每样品点 1 μ l 于尼龙膜上,并在长波紫外灯下照射 8 分钟,80℃真空烤膜 2 小时。
- 6 杂交、洗膜及检测 均按试剂盒中介绍的方法进行。
- 7 微量琼脂双扩散试验及凝胶染色 参照殷震介绍的方法进行^[12]。

结 果

1 杂交方法的敏感性 将浓度为 13ng/ μ l 的纯 IBDV RNA 用 pH8.0 的 TE 缓冲液稀释至每微升含 IBDV RNA 13ng、1ng、100pg、10pg、1pg、0.1pg,分别点 1 μ l 于尼龙膜上,固定和杂交后发现,该方法可检出 0.1pg 的 IBDV RNA (图 1)。

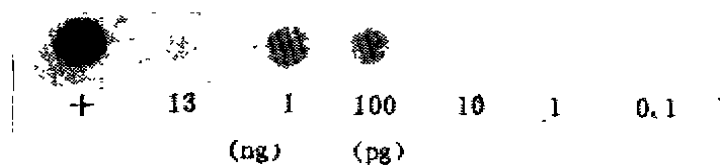


图 1 DIG 标记的 cDNA 探针杂交检测 IBDV RNA 的敏感性

Fig. 1 Sensitivity of hybridization assay with DIG-labeled cDNA probe in detecting IBDV RNA

2 核酸探针与多个毒株 RNA 的杂交 提取 IBDV 青岛株、上海株、荷兰株和 SW 株、马群株、SHT 株的 RNA。10 个法氏囊中提取的核酸最后溶于 50 μ l TE 中,经变性后各点 1 μ l 于尼龙膜,以正常鸡法氏囊提取物作阴性对照,未标记的 STC-119/243 片段作阳性对照。用 DIG 标记的

cDNA 与上样品多次杂交后发现,探针能与试验所用的 IBDV 的所有毒株杂交,并呈现很深的杂交斑点(图 2)。

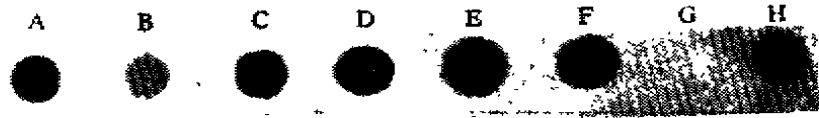


图 2 DIG 标记的 cDNA 探针同多个 IBDV 毒株 RNA 的杂交

A, 青岛株, B, 上海株, C, B87 株, D, SW 株, E, 马群株, F, SHT 株, G, 正常法氏囊抽提物, H, 探针混合物

Fig. 2 Hybridization of DIG-labeled cDNA probe with extracted RNA from several IBDV isolates.

A, Qindao strain; B, Shanghai strain; C, B87 strain; D, SW strain; E, Maqun strain; F, SHT strain; G, extracts from normal bursa; H, mixture of the probe cDNA

3 核酸探针杂交与琼扩试验比较 用于琼脂扩散的法氏囊匀浆 12ml,按前述方法抽提核酸后,溶于 30 μ l TE(pH8.0)中。核酸对原液作 400 倍浓缩。将其按 8×10^0 、 8×10^{-1} 、 8×10^{-2} ... 8×10^{-5} 稀释。100 $^{\circ}$ C 5 分钟变性并按相同方法杂交,结果在 8×10^{-5} 时,仍能出现杂交斑点。琼扩试验的结果是:法氏囊匀浆(20 μ l)在 1:1—1:4 时有沉淀线出现(图 3)。

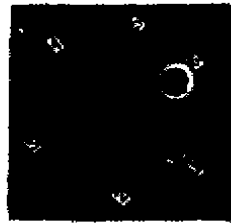


图 3 琼脂扩散试验检测 IBDV 的敏感性;中央孔:IBDV 抗原;周边孔:血清 1,1:1; 2,1:2; 3,1:4; 4,1:8; 5, 阴性对照; 6, 阳性对照

Fig. 3 Sensitivity of immunodiffusion test in detecting IBDV. Central well: IBDV antigen; Peripheral well: IBDV serum; 1, 1:1; 2, 1:2; 3, 1:4; 4, 1:8; 5, negative control; 6, positive control

琼脂扩散试验在用 20 μ l 法氏囊匀浆时,出现沉淀线的最大稀释倍数为 1:4,说明检测 IBDV 所需的匀浆原液最低不能少于 5 μ l。杂交方法是在浓缩 400 倍后开始检测的,因此杂交方法起点所用核酸相对应的匀浆量比琼扩试验沉淀线出现的最低匀浆量高 80 倍。杂交的结果则是核酸在 8×10^{-5} 时,仍有较清晰的斑点出现,说明杂交方法比琼扩试验的敏感性至少高出 10^4 倍。

讨 论

核酸探针杂交技术由于具有很高的特异性和灵敏度而被广泛用于鉴定特定的核酸。本文建立的杂交方法可以检测到 0.1pg 的核酸,显示出 DIG 系统的高度灵敏性,加上其避免了同位素的放射性,因此不会对人体产生危害和给环境造成污染,在实际应用中容易推广。整个杂交过程只需 24 小时,因此可以在感染早期,快速对法氏囊病作出诊断。

在实验中发现,有两个因素对杂交结果影响较大。一是标记反应所用探针的量,作者曾对 1—3 μ g 和小于 1 μ g 的探针作过标记,结果发现,用后者作杂交反应,其信号和灵敏度均较低。而 1—3 μ g 的探针标记后,杂交效果特别好,可以检测到 0.1pg 的核酸。低浓度探针杂交效果差

的原因可能是由于标记时模板少,引物相对较多,其结果是除所得标记探针本身的浓度低外,探针的长度也较短,自然不能获得理想的结果。二是所用杂交膜的性质,试验发现,尼龙膜比硝酸纤维素膜的敏感性高许多。尼龙膜若用紫外线固定效果最好,但由于我们没有特制的紫外辐射箱,因此只能在长波紫外灯下试照,结果发现在长波紫外灯下10cm处照射8分钟,然后在80℃下烤2小时可以获得理想的结果。硝酸纤维素膜灵敏性差的原因是大部分的核酸没有被固定上,在预杂交和杂交时被洗了下来。

STC-243和STC-119分别是IBDV基因组A片段和B片段的一段序列,将它们混在一起制备的探针能与国内的青岛株,上海株,SW株、马群株、SHT株及荷兰的B87株杂交,说明该探针的序列在IBDV基因组中的保守性较高,很有希望成为诊断IBD的通用试剂。由于标记的探针可以在-20℃保存一年,而且一次标记的探针可以检测1000个样品,从整体计算,用杂交方法还是比较廉价的。

IBD的诊断虽然有许多方法,但目前主要还是依赖琼脂扩散试验,它的简单和方便是其它任何方法不能比拟的。但由于它的灵敏度比较低,因此在实践中对组织中低浓度的IBDV不能检测出,尤其是在感染早期,病毒量不太多而鸡体内又没有产生抗体的时候就显出其不足。杂交方法的高灵敏度正好弥补这一缺陷。试验发现,用DIG标记的探针所建立的杂交方法比琼脂扩散试验敏感 10^4 倍以上,不能不说是一个振奋人心的结果。很显然,将杂交方法用于IBDV感染的早期诊断比常规方法准确得多,因而对于及早控制疾病,减少经济损失具有十分重要的意义。

参 考 文 献

- 1 Okoye J O A, Dip, DVM. *et al.* Infectious bursal diseases of chicken Veterinary Bulletin, 1984, 54(6):425-436
- 2 Kreider D L. Variability in a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay system. Avian Diseases, 1991, 35:276-287
- 3 Ismail N M. Differentiation between antibodies to serotypes 1 and 2 infectious bursal disease virus in chick sera. Avian Disease, 1990, 34:1002-1004
- 4 Bayyari G R. Determination of infectious bursal disease virus titration and neutralization endpoints using fluorogenic staining. Avian Diseases, 1991, 35:476-480
- 5 Cho B R. An immunoperoxidase monoclonal antibody stain for rapid diagnosis of infectious bursal disease. Avian Diseases, 1987, 31:538-545
- 6 Aniya M, Rao A T. An indirect immunoperoxidase method for diagnosis of infectious bursal disease. Indian Vet J, 1992, 69:176-177
- 7 陈明勇. 应用PPA-ELISA检测鸡传染性法氏囊卵黄抗体. 中国兽医杂志, 1993, 19(1):8-9
- 8 谷守林. 应用电子显微镜技术对IBDV和CAA混合感染的研究. 中国兽医杂志, 1993, 19(2):6-7
- 9 Davis V S, Boyle J A. Random cDNA probes to infectious bursal disease virus. Avian Disease, 1990, 34:329-335
- 10 Jackwood, D J, Kubenge F S B, Mercado C C. The use of biotin-labeled cDNA probes for the detection of infectious bursal disease viruses. Avian Diseases, 1990, 34:129-136
- 11 Hathcock T L, Giambrone J J. Tissue-print hybridization using a nonradioactive probe for the detection of infectious bursal disease virus. Avian Diseases, 1992, 36:202-205
- 12 殷震, 刘景华主编. 动物病毒学, 第1版, 上海: 科学出版社, 1985: 329

Establishment of Hybridization Assay with Nucleic Acid Probe to Detect IBDV and Comparison with Immunodiffusion Test

Chen Shiyou Chen Puyan Cai Baoxiang

(*Department of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014*)

Jin Youxin Wang Debao

(*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*)

Zhang Zijun

(*Gongbei Animal & Plant Quarantine Bureau, Zhuhai 519020*)

The hybridization assay with digoxigenin (DIG)-labeled probe was developed for detection of infectious bursal disease virus (IBDV) and its sensitivity was compared with that of immunodiffusion test in this experiment. IBDV STC-119 and STC-243 cDNA fragments used as probe were prepared from recombinant pUC plasmid with Hind III and EcoRI and labeled with DIG. IBDV RNA was extracted from IBDV purified from chicken bursa which were homogenized followed by extraction with chloroform, precipitation of virus with immune serum, digestion with proteinase K and recovery of IBDV RNA with ethanol precipitation. The results show that 0.1pg of IBDV RNA can be positively detected by this method and the mixed probe were able to hybridize with RNA from several IBDV isolates and can be used for diagnosis of infectious bursal disease in the early stage of infection. The comparison with immunodiffusion test revealed that the former is 10^4 times more sensitive than the later. Moreover, the specificity and the convenience of nonradioactive probe make the hybridization assay a very useful method in veterinary diagnostic laboratory.

Key words Infectious bursal disease virus, DIG-labeled nucleic acid probe, Hybridization, Immunodiffusion test