

应用生物素标记 DNA 探针检测伪狂犬病病毒的研究

王琴* 郭万柱 阴文奇

(四川农业大学动物科技学院, 四川雅安, 625014)

5852.655

关键词 伪狂犬病毒, 核酸, 杂交, 检测

生物标记; DNA 探针; 家畜病毒

核酸杂交技术已广泛用于检测畜禽疱疹病毒和其它动物病毒, 已报道 PRV-DNA 的探针方法有 RNA-DNA 杂交法^[1]、标记 PRV-DNA 探针^[2]和³²P 标记 PRV-DNA 探针^[3]。郭万柱等应用了³²P 标记 DNA 探针检测伪狂犬病病毒 (PRV), 由于同位素标记探针的放射性污染及危害使之应用范围受限。本文报道了非放射性标记 PRV Fa (闽 A) 株全基因组 DNA 和重组质粒 pPB11-DNA 探针的制备, 以及用斑点杂交法检测 7 株 PRV 不同毒株 DNA 的研究结果。

材料与方 法

1 细胞和病毒 BHK 21 细胞由卫生部成都生物制品研究所惠赠; MDBK 细胞和 PRV Mink III 由美国华盛顿州立大学 D. Burger 博士实验室惠赠; PRV Fa 和猪瘟病毒石门系由中国兽药监察所提供; PRV BUK, Noden 和 Shope 株由本室提供; PRV 双城株由哈尔滨兽医研究所供给; PRV SR 株由四川畜牧兽医学院余永健教授惠赠。

2 PRV-DNA 的抽提 参照本室建立的方法^[3]。

3 重组质粒 pPB11 的分子克隆与鉴定 参照文献^[4,5]。

4 探针制备 应用 Biotin-11-dUTP 分别标记 PRV Fa-DNA、pPB11-DNA (该重组质粒载体为 pBR322, 插入片段为 PRV Fa BamHI-11) 和 pBR322 DNA, 按 BRL 公司的 Nick translation reagent kit 使用说明书进行。

5 斑点杂交 参照文献^[5]。

结果与讨论

1 以 PRV Fa 全基因组 DNA 探针, 对 PRV BUK (1 号), PRV SR (2 号), PRV Mink III (3 号), PRV Noden (4 号), PRV Shope (5 号), PRV 双城 (6 号), PRV Fa (7 号) 的 DNA 进行斑点杂交, 结果均为阳性 (图 1), 其检测灵敏度可达 10 pg。对正常 BHK 21 细胞提取物 (8 号) 和猪瘟病毒 (9 号) 杂交, 结果为阴性。这一结果与郭万柱等 (1991) 采用³²P 标记的 PRV Mink III DNA 探针的检测结果一致。试验表明, 待测的 7 株 PRV 基因组具有高度同源性。

2 以 pPB11-DNA 探针, 对上述 7 株 PRV-DNA 杂交均出现阳性结果 (图 2), 对正常 BHK 21 细胞抽提物和猪瘟病毒杂交结果为阴性。pPB11 质粒中插入子为 PRV Fa 基因组的 BamHI-

本文于 1995 年 9 月 4 日收到, 1996 年 1 月 18 日修回

* 本文为国家自然科学基金资助项目

** 现在四川畜牧兽医学院动医系, 四川荣昌, 邮编 632460

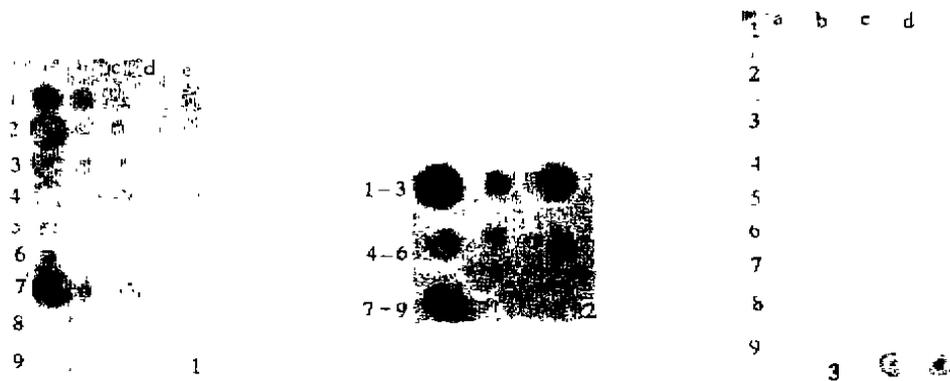


图1 以生物素标记 PRV Fa DNA 探针与 PRV BUK(1)、PRV SR(2)、PRV Mink III(3)、PRV Noden(4)、PRV Shope(5)、PRV 双城(6)、PRV Fa(7)、BHK21 抽提物(8)和猪瘟病毒(9)杂交。

a、b、c、d、e DNA 含量分别是 100 ng、10 ng、1 ng、100 pg、10 pg。

Fig 1 Dot blot with biotinylated PRV Fa-DNA probe and PRV BUK(1), PRV SR(2), PRV Mink III(3), PRV Noden(4), PRV Shope(5), PRV Shuang Cheng(6), PRV Fa(7), BHK 21-DNA(8) and HCV(9).

a, b, c, d and e DNA concentrations are 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg and 10 pg, respectively.

图2 以生物素标记 pPB11-DNA 探针与 PRV BUK(1)、PRV SR(2)、PRV Mink III(3)、PRV Noden(4)、PRV Shope(5)、PRV 双城(6)、PRV Fa(7)、BHK(21) 抽提物(8)和猪瘟病毒(9)杂交。

Fig 2 Dot blot with biotinylated pPB11-DNA probe and PRV BUK(1), PRV SR(2), PRV Mink III(3), PRV Noden(4), PRV Shope(5), PRV Shuang Cheng(6), PRV Fa(7), BHK21-DNA(8) and HCV(9).

图3 以生物素标记 pBR322 探针与 PRV BUK(1)、PRV SR(2)、PRV Mink III(3)、PRV Noden(4)、PRV Shope(5)、PRV 双城(6)、PRV Fa(7)、BHK21 抽提物(8)、猪瘟病毒(9a-c)和 pBR322-DNA(9d-e)杂交。

a、b、c、d、e DNA 含量分别是 100 ng、10 ng、1 ng、100 pg、10 pg。

Fig 3 Dot blot with biotinylated pBR 322-DNA probe and PRV BUK(1), PRV SR(2), PRV mink III(3), PRV Noden(4), PRV Shope(5), PRV Shuang Cheng(6), PRV Fa(7), BHK 21(8), HCV(9a-c) and pBR 322-DNA(9d-e)

a, b, c, d and e DNA concentrations are 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg and 10 pg, respectively.

11 片段,位于其长链区,各个毒株均存在这一片段,因此选择该片段作为探针具有通用性。为排除假阳性反应,特制备 pBR322-DNA 探针,结果 pBR322-DNA 探针不与 7 株 PRV 及 BHK21 细胞 DNA 发生杂交反应,这与郭万柱报道的结果相一致。

3 1.5% 脱脂乳和 2% 牛血清白蛋白封闭效果无显著差异,因此选用 1.5% 脱脂乳可节约成本。加入 SP-APC 后置 37℃ 20~30 min 反应较室温 10 min 处理效果好,因为 SP-APC 更易与探针结合。加底物后的显色温度也由室温改为 37℃,在 30 min 内可出现明显斑点色彩,且重复性好。

致谢 本研究得到黄伟副教授帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Gntekunst D E. Latent pseudorabies virus infection in swine detected by RNA-DNA hybridization, *Am J Vet Res*, 1979, 40: 1568-1572
- 2 McFarlane R G, Thawley D G. DNA hybridization procedure to detect pseudorabies virus DNA in swine tissue, *Am J Vet Res*, 1985, 46: 1133-1136
- 3 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): 52-56
- 4 汪铭书, 郭万柱, 娄高明等. 伪狂犬病毒 A 株基因文库的构建及物理图谱分析. *中国病毒学*, 1994, 9(4): 347-350
- 5 王琴. 伪狂犬病病毒 Fa 株胸苷激酶基因缺失株的构建. [学位论文], 四川: 四川农业大学, 1994

Detection of Pseudorabies Virus by Biotinylated DNA Probe

Wang Qin Guo Wanzhu Yin Wenqi

(*Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan Province 625014*)

A dot blot hybridization method was developed to detect pseudorabies virus DNA in infected cultured cells. Seven strains of pseudorabies virus were detected by biotinylated pseudorabies virus Fa DNA probe, and recombinant plasmid pPB11 DNA(BamHI-11 fragment of PRV Fa was cloned between the BamHI sites of plasmid pBR322) probe. PRV Fa DNA probe could detect 10 pg nucleic acid in the samples. The nucleic acid hybridization method is sensitive and specific for diagnosing pseudorabies virus.

Key words Pseudorabies virus, Nucleic acids, Hybridization, Detection