

生物素标记寡核苷酸探针检测 B 群轮状病毒

刘明军

(新疆畜牧科学院动物生物技术室, 乌鲁木齐 830000)

王正党

(新疆农业大学畜牧兽医学院, 乌鲁木齐 830052)

王升启

(北京军事医学科学院二所, 北京 100086)

5852.65

摘要 用 5'端接氨基标记法, 用生物素对 B 群轮状病毒(GBRV)IDIR 株具有群特异性的 3 片段基因上 23 bp 寡核苷酸序列进行标记, 经高效薄层层析板(HPTLC)纯化, 制备了 B 群轮状病毒生物素寡核苷酸探针, 探针显色灵敏度达 10 pg, 与 GBRV、KB-63 株基因杂交可检测到 100 pg 靶序列, 而与 A 群和 C 群轮状病毒及无关基因均不产生杂交信号, 该探针可用于 B 群轮状病毒的检测、鉴定, 以及同群不同毒株间基因相关性研究。

关键词 生物素, 寡核苷酸探针, B 群轮状病毒

轮状病毒属是呼肠孤病毒科中基因型呈多样性变化的一种, 目前根据核酸电泳带型分为 A、B、C、D、E 五个群, 能够进行分型鉴定的有 A、B、C 三个群。这三个群在血清学和核酸电泳带型上差异较大, 但同群之间有共同的群特异性抗原, 核酸电泳带型的排列也较相似。近几年的研究还发现各群轮状病毒均存在基因重组和基因重排现象^[1,2], 这给轮状病毒的分类鉴定带来了一定的困难。仅仅根据核酸带型的排列很难对发生基因重排或重组的病毒株进行分群, 因此, 用不同片段的基因探针进行分子杂交, 是对轮状病毒进行分类鉴定和基因变异分析的一种有效手段。我们根据文献报道, 选择 GBRV IDIR 株三片段基因上 23 bp 序列(5'AT-CATGGAGCCCGCCACAGAACT 3')^[3]进行生物素标记, 用该探针对我们分离的轮状病毒进行检测, 结果该探针只与 B 群轮状病毒发生杂交, 而与 A 群、C 群轮状病毒不发生杂交。该探针可用于 B 群轮状病毒的检测, 并可对我们近几年发现的 B 群轮状病毒的基因重排现象进行深入研究。

材料与方 法

1 试剂与材料

B 群轮状病毒 KB-63 株, C 群轮状病毒 Pc-86 株, A 群轮状病毒 P2 株由我室从羔羊和仔猪腹泻粪便中分离鉴定。5'-NH₂ 寡核苷酸由军事医学科学院二所 ABI 391A DNA 合成仪合成; N-羟基丁二酰胺-长链生物素(NHS-LC-biotin)、生物素检测系统均为 BRL 公司产品; HPTLC 板为 Merck 公司产品; DMSO 为 Baker 公司产品; 其余试剂均为国产。文中图片经 Pharmacia 公司凝胶成像仪成像。

2 方法与步骤

2.1 5'-氨基寡核苷酸的合成 将接氨基试剂 Aminolink II 置 DNA 合成仪 X 碱基瓶位置, 在 DNA 合成仪上

用 β -氰乙基亚磷酸脂法,合成5'-氨基寡核苷酸。

2.2 5'-生物素寡核苷酸探针标记 参考文献[4]进行,5'-氨基寡核苷酸100 μ g溶于200 μ L灭菌双蒸水中,加入0.1 mol/L pH 9.6 Na_2CO_3 20 μ L,混匀后加入50 μ L NHS-LC-biotin(1 μ g/ μ L溶于DMSO中),总体积270 μ L。室温暗处反应6 h,进行紫外扫描检测。

2.3 5'-生物素寡核苷酸探针纯化 取一10 \times 20 cm HPTLC 纯化板,在距下端1.5 cm处用铅笔轻打一细线,用毛细管将反应液均匀点在线上。点完后冷风吹干,置展开剂中展开。展开剂为55%异丙醇,10%浓氨水,35%双蒸水,展开6 h后,放紫外灯下观察,用刀刮取主带,放入1.5 mL小指管中,加入300 μ L灭菌双蒸水,室温放置15-20 min,不时摇动,12 000 g离心3 min,取上清,沉淀重复上述过程两次,最后合并上清,测上清中生物素寡核苷酸含量,分装小管,冷冻抽干。

2.4 5'-生物素寡核苷酸鉴定 将生物素寡核苷酸点于硝基纤维膜上,80 $^{\circ}\text{C}$ 烤2 h,封闭洗膜后,加亲和素-碱性磷酸酶(AV-AP)和底物进行显色。

2.5 GBRV KB-63 株核酸提取及3片段基因分离 核酸提取参考文献[5]方法进行,纯化核酸经7.5%聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和EB染色后,切下含3片段基因凝胶,置透析袋进行电洗脱。待凝胶中核酸全部进入洗脱液后,反向电泳1 min,收集洗脱液,加入等体积仲丁醇进行浓缩,再加入两倍体积乙醇沉淀,沉淀经真空干燥后,用TE(10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA)溶解,测定含量。

2.6 5'-生物素寡核苷酸探针对B群轮状病毒的杂交检测 将GBRV KB-63株、A群轮状病毒(GARV)P2株、C群轮状病毒Pc-86株基因组RNA和酵母RNA煮沸变性后点于NC膜上,80 $^{\circ}\text{C}$ 烤2 h,预杂交、杂交按文献[6]进行,用BRL AV-AP显色系统进行显色。

结 果

1 5'-生物素寡核苷酸探针标记

5'-氨基寡核苷酸与NHS-LC-Biotin在pH9.6,0.1 mol/L NaHCO_3 缓冲液中室温反应4-6 h即得5'-生物素化寡核苷酸探针。将4 h与6 h反应液点于HPTLC检测板,展开剂展开,紫外扫描可观察到,展开6 h几乎100%氨基寡核苷酸生物素化(图1)。HPTLC上生物素化寡核苷酸的Rf值较5'-氨基寡核苷酸增加,通过HPTLC可将生物素化的寡核苷酸分离。生物素化核苷酸斑点显色,证明了生物素标记可靠。

2 探针敏感性试验

将分离的GBRV KB-63株3片段基因定量稀释点于NC膜上,与探针杂交,结果该探针能检测到100 pg KB-63基因靶序列(图2)。

3 5'-生物素寡核苷酸探针杂交检测GBRV基因组RNA

将1 μ g GBRV KB-63、GARV P2、C群轮状病毒(Pc-86)基因组RNA,及酵母RNA煮沸变性后点于NC膜上,与IDIR(NMP)₂₃生物素探针杂交。结果探针只能与KB-63基因杂交,而与GARV P2、Pc-86和酵母RNA均不产生杂交信号(图3)。

讨 论

目前,生物素寡核苷酸末端标记方法研究进展很快,每种方法各有其特点。3'末端转移酶标记生物素,标记效率高,但不适于大量制备。Kempe(1985)^[7]报道用化学方法将生物素通过氨基乙醇连在寡核苷酸的5'-端氨基磷酸胺上,侧链不需保护,但反应物需进行多步纯化,且

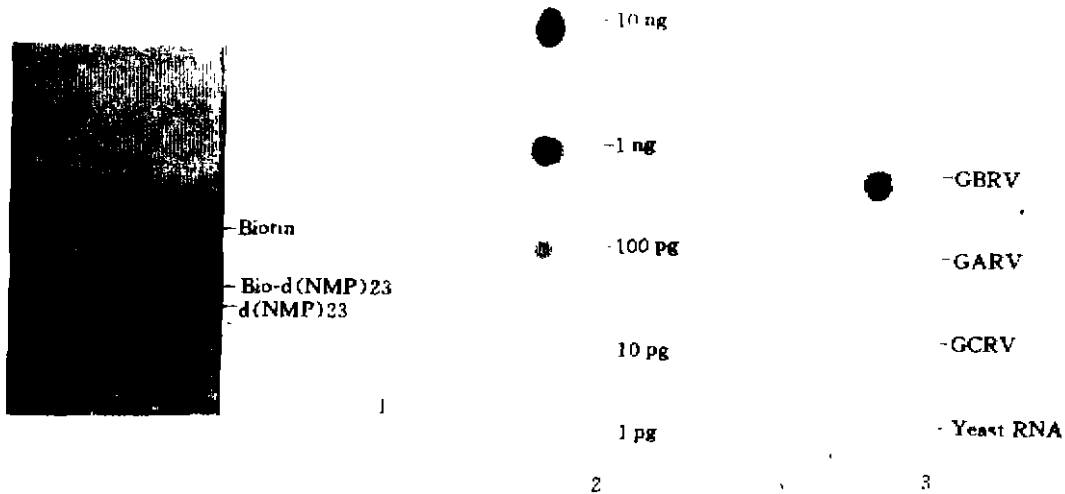


图1 HPTLC 纯化生物素寡核苷酸探针

1. 生物素化反应 6 h,
2. 物土素化反应 4 h

Fig 1 Purification of the biotinylated probe by HPTLC

1. biotinylation for 6 h
2. biotinylation for 4 h

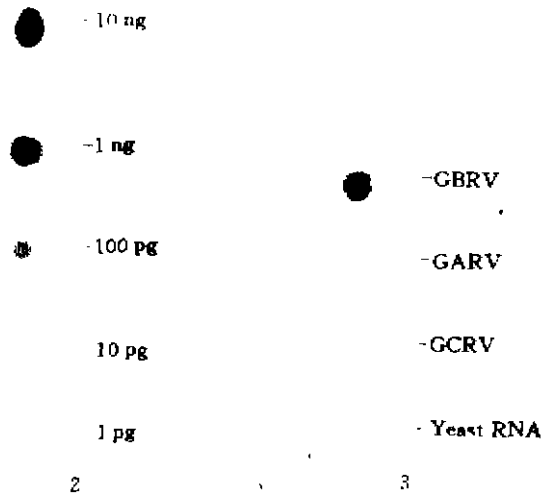


图2 探针敏感性试验

Fig 2 The sensitivity of the probe

图3 GBRV 的探针检测

Fig 3 Detection of the GBRV with the probe

反应进行得不完全。本研究采用合成 5' 氨基寡核苷酸标记生物素的方法, 简便、快速、反应效率高, 对寡核苷酸探针的应用及今后寡核苷酸探针基因诊断试剂盒的推广有重要的实际意义。

我们采用高效薄层层析板纯化寡核苷酸探针, 回收率可达 90% 以上, 比电泳及 HPLC 纯化回收率高, 且操作简便、快速。今后可用于各种寡核苷酸的纯化和检测。

轮状病毒是婴儿、幼畜病毒性腹泻的主要病源之一^[8]。目前已报道的有 5 个群, 其中 A 群研究得较清楚。分为 9 个血清型, 其余几群较为复杂。病毒基因组包括 11 个双链 RNA 片段, 核酸电泳带型呈多态性, 同群带型排列相似, 群与群之间带型排列差异较大。近年来对轮状病毒基因分子生物学研究发现, 各群轮状病毒均普遍存在基因重组和重排现象。本室在研究动物轮状病毒时也发现了这一现象。应用核酸探针分子杂交技术, 从分子水平对其基因组多态性以及基因重组、基因重排等变异现象进行研究, 不仅对研究病毒的遗传变异规律有着重要的理论意义, 而且对深入研究轮状病毒生物学特征和流行病学规律以及病原诊断和生物学防治, 包括基因工程疫苗的生产都有着十分重要的现实意义。作者利用寡核苷酸探针片段小、特异性强的特点, 建立生物素寡核苷酸探针分子杂交技术, 为轮状病毒分子生物学的研究提供了一个新的方法。

参 考 文 献

- 1 Gonzalez S A, Mattion N M, Bellinzoni R *et al*. Structure of rearranged genome segment 11 in two different rotavirus strains generated by a similar mechanism. *J Gen Virol*, 1989, 70(6): 1329 ~ 1336
- 2 Shen S, Burke B, Desselberger *et al*. Rearrangement of the VP6 gene of a group A rotavirus in combination with a point mutation affecting trimer stability. *J virol*, 1994, 68(3): 1682 ~ 1688
- 3 Sato S, Yolken R H, Eiden J J. The complete nucleic acid sequence of gene segment 3 of the IDIR strain of group B rotavirus. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17(23): 10113
- 4 林万明主编. 核酸探针杂交实验技术. 第一版. 北京: 中国科学技术出版社, 1989. 85
- 5 Eiden J J, S Vonderfecht, K Theil A *et al*. Antigenically distinct rotavirus: genetic and antigenic relatedness of human and animal strains. *J Infect Dis*, 1986, 154: 972 ~ 982
- 6 Chan V T W, Fleming K A, McGee J O D. Detection of subpicogram quantities of specific DNA sequences on blot hybridization with biotinylated probes. *Nucleic Acids Res*, 1985, 13: 8083 ~ 8091
- 7 Kempfe T, Eidenet J J, Hershon C. Studies towards the development of chemically synthesized non radioactive biotinylated nucleic acid hybridization probes. *Nucleic Acid Research*, 1985, 13: 45 ~ 57
- 8 Herring A J, N F Inglis, C K Ojeh D. Rapid diagnosis of rotaviral infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol*, 1982, 20: 441 ~ 447

Detection of the Group B Rotavirus with the Probe of Oligonucleotides Labelled with Biotin

Liu Mingjun Wang Zhengdang Wang Shengqi

(Animal Biotechnology Laboratory, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000)

Abstract According to segment 3 sequence of group B rotavirus (GBRV) IDIR strain the 23 bp oligonucleotide was synthesized and labelled with biotin. The probe was purified by HPTLC. Its sensitivity is up to 10 pg by a colorimetric reaction. The probe can detect at least 100 pg target sequence of GBRV and does not hybridize to Group A and Group C rotavirus. The results showed that the probe has high specificity and sensitivity. It can be used to detect and identify GBRV, and also to research the genetic relativity of GBRV gene mutation and rearrangement.

Key words Biotin, Probe of oligonucleotide, Group B Rotavirus