

鸡传染性支气管炎病毒 H 株纤突蛋白基因的
RT-PCR/RFLP 分型赵振芬¹, 黄亚东², 王林川³, 刘公平³, 辛朝安³

S852.65

Q78

¹(郑州牧业工程高等专科学校, 郑州 450008)²(华南农业大学蚕桑系, 广州 510642)³(华南农业大学动医系, 广州 510642)

ZBV

关键词: 鸡传染性支气管炎病毒; 纤突蛋白 S₁ 基因; 反转录和聚合酶链式反应

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2000)02-0197-03

RT-PCR.

RFLP. 分型

鸡传染性支气管炎病毒(IVB)属于冠状病毒科冠状病毒属,可引起鸡呼吸道、输卵管、肾脏、肠道及腺胃等多部位病变。近年来,由于新的 IVB 变异毒株不断出现,从而导致鸡传染性支气管炎病的不断爆发,造成严重的经济损失^[1]。IVB 的基因组为单股 RNA,约 27.6 kb,该基因主要编码 3 种主要结构蛋白:纤突蛋白(S)、膜蛋白(M)和核衣壳蛋白(N),其中 S 蛋白成熟裂解为 S₁ 和 S₂ 两个蛋白亚基。S₁ 蛋白是 IVB 的主要免疫原基因,可刺激机体产生中和抗体,决定病毒的组织嗜嗜性,在病毒血清学分类中起主要作用^[1,2]。H 株是 1993 年在河南省分离的典型肾病变 IVB 毒株,我们对 IVB 的 H 株 S₁ 基因进行了 RT-PCR 及酶切分析,并将其 PCR 产物克隆入质粒载体,为进一步研究 IVB 的 H 株分子生物学特性和研制 IVB 基因工程疫苗打下基础。

1 材料和方法

1.1 病毒 H 株,广东肾病变 IVB 致病株 D₄₁和 IVB 呼吸道型强毒株 M₄₁,均为鸡胚适应毒,由华南农业大学禽病室提供。

1.2 寡核苷酸引物 根据已发表的 IVB Beaudette 株 S₁ 基因序列(Binns *et al.*, 1986)设计 PCR 引物,两引物间为包含有整个 S₁ 基因的 1.66 kb 片段^[2],由上海生物工程公司合成。引物 P₁ 含有 S₁ 基因 5' 端自第 53 位碱基的序列,其 5' 端有 EcoRI 酶切位点, P₁: 5' TCGAATTCTGGTAAGAGATGTTGGTAA(27 bp); 引物 P₂ 为与 S₁ 基因 3' 端至第 1 717 位碱基互补的序列,且其 5' 端有 BamH I 酶切点, P₂: 5' TTGGATCCATAAC-TAACATAAGGGCAA(27 bp)。

1.3 病毒增殖及 RNA 提取 将各病毒经尿囊腔途径分别接种 9 日龄 SPF 鸡胚(由广东生物药厂提供),37℃ 培养 30 h 收取尿囊液,差速离心后用经 DEPC 处理过的水悬浮病毒。抽提 RNA 所有用水及水溶液均经 DEPC 做去 RNase 处理。加 SDS(终浓度 2%)和蛋白酶 K(终浓度 250 μg/mL),55℃ 作用 45 min,等量水饱和

收稿日期:1998-12-08,修回日期:1999-04-20

作者简介:赵振芬(1965年-),女,河南省新郑市人,硕士,副教授。研究方向为动物病毒学。

酚、氯仿/异戊醇(24:1)各抽提一次,加入2倍体积无水乙醇和1/10体积2 mol/L 醋酸钠(pH4.0),-20℃过夜。12 000 r/min 10 min后70%冷乙醇洗涤两次,真空抽干后用水悬浮RNA,95℃变性5 min后进入反转录体系。

1.4 RT-PCR 5×缓冲液4 μL, RNA样品10 μL, 10 mmol/L dNTP 2 μL, RNasin 1 μL, 引物P₂(20 mmol/L) 2 μL, AMV RNase (1 u/μL Promega) 1 μL, 共20 μL, 42℃温育1 h后进行PCR。10×缓冲液5 μL, RT产物10 μL, 引物P₁(20 pmol/L) 1 μL, 水33 μL, 95℃变性10 min后加1 μL Taq酶(1 u/μL, BM公司), 石蜡油50 μL, 混匀后置水浴式PCR自动扩增仪(北京新技术应用研究所)上进行扩增。预先72℃ 2 min后再进行93℃ 60 s, 50℃ 60 s, 72℃ 180 s, 共30个循环, 72℃后延伸5 min, 产物于含溴化乙锭(EB)的1.2%琼脂糖凝胶上电泳后紫外检测。

1.5 酶切分析 将H、D₄₁及M₄₁毒株的PCR产物分别用BstYI, HaeⅢ和EcoRI(均为Promega产品), 按说明书进行酶切后, 在2%琼脂糖凝胶(含EB)上电泳紫外检测。

2 结果与讨论

2.1 PCR产物 IBV的H株、D₄₁株和M₄₁株经RT-PCR扩增后电泳分析表明三者均得到了1.66 kb的片段, 与预期结果一致(图1)。

2.2 酶切分析 IBV的H株S₁基因PCR产物经BstYI酶切得到1.0 kb和0.66 kb两个片段, 经HaeⅢ酶切得到0.9 kb、0.4 kb和0.36 kb三个片段, 经EcoR I酶切后仅一条1.66 kb片段, 证明该PCR产物中无EcoR I酶切位点。IBV的H株与D₄₁株和M₄₁株S₁基因PCR产物酶切结果完全一致, 按Kwon等的PCR/RFLP分型方法^[3], 可判定IBV的H株属于Mass血清型(图1)。

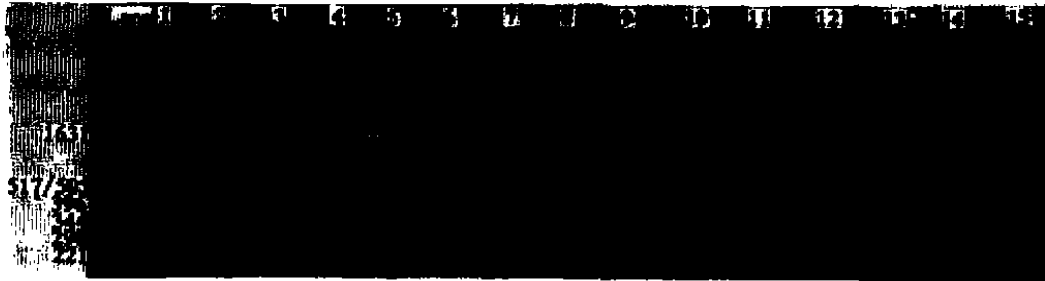


图1 IBV的H株S₁与其它两株IBV的PCR/RFLP分型的比较

Fig.1 Comparison of pattern of IBV H strain S₁ with the other two IBV strains by PCR/RFLP

lane1, 6, 11: pBR322/HinfI; lane 2, 7, 12: H, D₄₁ and M₄₁ PCR products respectively; lane 3, 8, 13: H, D₄₁ and M₄₁ PCR products were digested by BstYI respectively; lane 4, 9, 14: H, D₄₁ and M₄₁ PCR products were digested by HaeⅢ respectively; Lane 5, 10, 15: H, D₄₁ and M₄₁ PCR products were digested by EcoR I respectively.

2.3 由于国内IBV各血清型标准毒株不全, 因此, 很难用中和试验确定地方分离株的血清型。Kwon等^[3]证明IBV S₁基因PCR/RFLP分型结果与中和试验测定的血清型一致, PCR/RFLP分型与中和试验相比具有简便、快速的优点。本实验中将IBV的H株S₁基因的PCR产物分别用BstYI、HaeⅢ和EcoRI酶切, 其结果与D₄₁株和M₄₁株的PCR/RFLP带型完全一致。按Kwon等的判定方法, IBV的H株属于Mass血清型。IBV的H株是从典型肾病变鸡

分离得来, D₄₁ 株为肾变 IBV 致弱株, 它有效防制了许多鸡场肾型 IB 的发生^[2], 然而它们的 PCR/RFLP 分型却与呼吸道型毒株 M₄₁ 相同。这与 Kwon 等^[3]报道的不同, Kwon 证明美国 IBV 肾变株 Gray、Holte 与 M₄₁ 的 S₁ 基因 PCR/RFLP 不同, 用 Hae III 酶切可将它们区分开来。廖明等^[4]对 IBV 的 D₄₁ 株 S₁ 基因序列分析认为 S₁ 基因变异程度与 IBV 的临床表现和血清学反应不呈强相关关系, 而江国托等^[5]研究不同 IBV 毒株对不同靶器官的组织嗜性, 组织培养中和试验和 S₁ 基因的 PCR/RFLP 的结果表明 IBV 组织嗜性与其血清型和 S₁ 基因变异紧密相关。三者确切的相关性还需进一步的试验证明。

参 考 文 献

- [1] 卡尔尼克 B W 主编, 高福, 刘文军主译. 禽病学[M]. 第 9 版. 北京: 北京农业大学出版社, 1991. 407~418
- [2] 王林川. 禽传染性支气管炎病毒免疫原基因 cDNA 的构建与鉴定[D]. [博士学位论文], 广州, 华南农业大学, 1994.
- [3] Kwon H M, Jackwood M W, Gelb J. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis [J]. Avian Disease, 1993, 37: 194~202
- [4] 廖明. 鸡传染性支气管炎病毒 D41 株 S1 基因序列测定及同源性分析[D]. [博士学位论文]. 广州: 华南农业大学, 1997.
- [5] 江国托, 刘思国, 步志高, 等. 鸡传染性支气管炎病毒的组织嗜性与其血清型和 S1 基因变异的关系[C]. 中国畜牧兽医学会禽病学分会第九次学术研讨会论文集. 广西, 南宁, 1998.

Study on RT-PCR/RFLP of Spike Protein S₁ Gene of Avian Infectious Brochitis Virus H Strain

ZHAO Zhen-fen*, HUANG Ya-dong, WANG Lin-chuan
LIU Gong-ping, XI Chao-an

* (College of Zhengzhou Animal Husbandry, Zhengzhou 450008, China)

(Department of Animal Medicine, South-China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A 1.66 kb expected S₁ gene fragment of avian infectious brochitis virus (IBV) H strain was amplified by RT-PCR. Its PCR/RFLP pattern was similar to IBV D₄₁ strain and M₄₁ strain when digested using Bst YI, Hae III and EcoRI respectively. IBV H strain was thought as Massachusetts serotype.

Key words: Avian infectious bronchitis virus; S₁ gene; RT-PCR/RFLP