维普资讯 http://www.cqvip.com

第15卷4期 中国病毒学 Vol.15 No.4
2000年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 2000

388-394 (14) S852.659.1

鹅源腺病毒基因组DNA物理图谱的构建*

徐福洲，崔治中**，刘岳龙，段玉友，孙怀昌

（扬州大学畜牧兽医学院，扬州 225009）

摘要：将鹅源腺病毒 $Y_{81}G_4$ 株全基因组DNA的 *Hin*dⅢ酶切片段分别插入质粒pUC18，成功构建了全基因组DNA文库。在此基础上，将重组质粒携带的插入片段切出、回收并分别用地高辛标记后作为探针，与经限制酶 *Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、*Pst* Ⅰ、*Eco*R Ⅴ 消化的病毒基因组DNA进行Southern Blotting，杂交结果经比较综合后获得了该病毒基因组DNA的 *Hin*dⅢ、*Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、*Pst*Ⅰ、*Eco*R Ⅴ 限制性内切酶的物理图谱。利用已发表的含有鸡 EDS_{76} 病毒AA-2株基因组DNA右末端的重组质粒pBE42作为探针，与本病毒两末端重组质粒进行Southern Blotting，根据同源性杂交结果确定了本病毒基因组DNA物理图谱与EDSVAA-2株相应的方向。本病毒基础因组DNA物理图谱的精确构建，为进行基因组结构分析，筛选复制非必需区，构建禽腺病毒载体打下了基础。

关键词：鹅源腺病毒；基因组DNA；物理图谱；Southern Blotting

中图分类号：S852.65 **文献标识码**：A **文章编码**：1003－5125(2000)04－0388－07

禽腺病毒根据抗原性不同可分为三个群：Ⅰ群包括传统禽腺病毒及分离自鸡、火鸡、鹅和其它禽类的腺病毒；Ⅱ群包括火鸡出血性肠炎病毒、大理石脾病病毒及鸡大脾病病毒；Ⅲ群为减蛋综合征病毒及来自鸭的相似病毒[1]。近年来禽腺病毒分子生物学研究取得很大进展，目前已完成Ⅰ群CELO病毒[2]，Ⅱ群火鸡出血性肠炎病毒[3]，Ⅲ群 EDS_{76} 病毒AV-127株[4]的全基因组序列测定和基因结构分析。国内李茂祥完成了 EDS_{76} 病毒AA-2株的全基因组文库构建和基因组右侧DNA序列分析[5]，曾力宇、李茂祥等对该病毒部分基因进行了结构分析[6,7]。所有这些研究皆有助于阐明禽腺病毒基因组结构与功能的关系，使分类更趋合理，同时对构建禽腺病毒载体具有重要意义。

本研究所用病毒为一株自健康鹅体分离的腺病毒（$Y_{81}G_4$ 株）[8]，它可感染鸡并在鸡体内诱发很高的中和抗体。我们早期的研究发现，即使在血液中循环抗体水平很高时，该病毒仍能存在于感染鸡的粘膜系统。病毒基因组RFLP分析表明，该病毒与鸡的 EDS_{76} 病毒有明显差异[13]。因此，如能以该病毒为载体表达外源基因，有可能在鸡体内诱导对靶病原体较长期的免疫反应，而且其对鸡的自然致病性也明显小于 EDS_{76} 病毒。我们在构建该病毒全基因组DNA文库的基础上[9]，利用Southern Blotting技术建立病毒基因组不同限制酶的物理图谱，为筛选复制非必需区，构建禽腺病毒载体奠定了基础。

收稿日期：1999－06－28，修回日期：1999－12－6

* 基金项目：国家"863"高科技攻关项目资助（19601002）

作者简介：徐福洲（1973年－），男，山东单县人，硕士。现工作单位：北京市农林科学院畜牧兽医研究所，100089

** 通讯作者简介：崔治中（1944年－），男，江苏江阴人，教授，博士，研究方向为分子病毒学

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料和方法

1.1 材料的准备

鹅源腺病毒 $Y_{81}G_4$ 株[8]由本教研室分离鉴定，经鹅胚增殖后收获的尿囊液用差速离心法纯化病毒粒子，并用蛋白酶K消化、酚：氯仿抽提纯化病毒DNA；宿主菌为大肠杆菌 TG_1；鹅源腺病毒全基因组DNA的10个 *Hin*d Ⅲ片段克隆由本室自行构建[9]；含有 EDS_{76} 病毒AA-2株基因组DNA右末端片段重组质粒pBE42由李茂祥博士惠赠[5]。

限制性内切酶购自华美生物工程公司；High Pure Plasmid Isolation Kit, DIG DNA Labelling and Detection Kit 购自 Boehringer Mannheim 公司，QIAquick Gel Extraction Kit 购自 QIAGEN 公司，NC膜购自 Amersham Life Science 公司。

1.2 DNA片段的酶切回收及探针标记

病毒基因组DNA-*Hin*dⅢ片段构建的10个重组质粒分别经大肠杆菌 TG_1 增殖后用 High Pure Plasmid Isolation Kit 提取纯化，用相应限制酶切出插入片段，然后用 QIAquick Gel Extraction Kit 分别回收插入片段，按照 DIG DNA Labelling and Detection Kit 标记程序将各插入片段分别用地高辛标记后作为探针。

1.3 病毒基因组DNA酶切分析

病毒基因组DNA经 *Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、*Pst* Ⅰ、*Eco*R Ⅴ、*Hin*d Ⅲ等不同限制酶分别酶切并电泳，分析不同限制片段的数目和大小。

1.4 Southern Blotting与病毒DNA物理图谱的构建

病毒基因组DNA经 *Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、*Pst* Ⅰ、*Eco*R Ⅴ酶切后分10个泳道同时电泳，电泳结束后凝胶经变性、中和后转印至NC膜上。自然干燥30 min，80 ℃干烤2 h后备用。所有转印后的NC膜置预杂交液（5×SSC，1% Blocking Reagent，0.02% SDS）中于68 ℃预杂交2 h，将每张NC膜上的10个泳道剪开分成10份，分别与病毒 $Y_{81}G_4$ 株全基因组DNA的10个 *Hin*d Ⅲ片段标记的地高辛探针杂交，杂交结束后按试剂盒程序洗膜和免疫显色。杂交结果按齐义鹏介绍的方法[10]经比较综合后用于确定病毒基因组DNA不同限制酶的物理图谱。

1.5 病毒基因组DNA物理图谱方向的比较

将含EDSVAA-2株基因组DNA右末端片段的重组质粒pBE42用地高辛标记作为探针，与经限制酶 *Hin*d Ⅲ消化的病毒 $Y_{81}G_4$ 株基因组DNA及双酶切的重组质粒（pGAHC/*Sac* Ⅰ + *Hin*d Ⅲ，pGAHI/*Eco*R Ⅰ + *Hin*d Ⅲ）进行Southern Blotting，杂交和洗膜温度选用68 ℃，根据同源性杂交结果确定病毒 $Y_{81}G_4$ 株基因组DNA与EDSVAA-2株基因组DNA相应的方向。

2 结果

2.1 病毒 $Y_{81}G_4$ 株基因组DNA限制性酶切分析

病毒基因组DNA经不同限制酶酶切后电泳结果见图1，酶切片段大小及数目见表1，表1显示病毒基因组DNA总长度为32～33 kb。

2.2 重组质粒插入片段酶切显示

所有重组质粒经相应限制酶切出的插入片段与病毒基因组DNA的 *Hin*d Ⅲ酶切片段大小比较见图2。由图2可见，克隆的各插入片段与病毒基因组DNA *Hin*d Ⅲ酶切产生的相应片段完全一致。

2.3 病毒基因组DNA酶切片段的杂交

限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、*Pst* Ⅰ、*Eco*R Ⅴ消化的病毒DNA经琼脂糖凝胶电泳后

维普资讯 http://www.cqvip.com

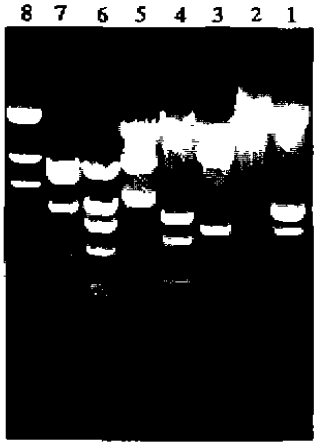

图1 病毒 $Y_{81}G_4$ 株基因组 DNA 限制性片段的电泳图谱

Fig.1 Ristriction map of virus $Y_{81}G_4$ DNAs

1, λDNA/*Eco*R Ⅰ + *Hin*d Ⅲ; 2, adenovirus $Y_{81}G_4$ genomic DNA; 3～7, adenovirus $Y_{81}G_4$ genomic DNA digested by *Bam*HI, *Eco*R I, *Eco*R V, *Hin*dⅢ, *Pst* I; 8, λDNA/*Hin*dⅢ

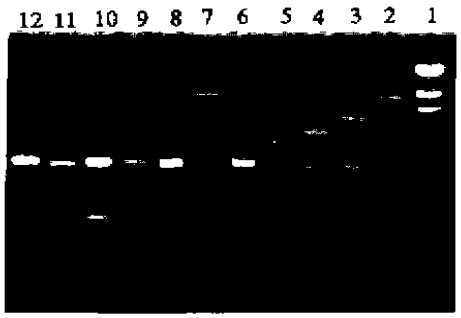

图2 重组质粒插入片段酶切鉴定

Fig.2 Identification of the inserts in recombinant plasmids

1, λDNA/*Hin*d Ⅲ; 2, pGAHA/*Hin*d Ⅲ; 3, pGAHB/*Hin*d Ⅲ; 4, pGAHC/*Sac* Ⅰ + *Hin*d Ⅲ; 5, pGAHD/*Hin*d Ⅲ; 6, pGAHE/*Hin*d Ⅲ; 7, Adenovirus $Y_{81}G_4$ genomic DNA/*Hin*d Ⅲ; 8, pGAHF/*Hin*d Ⅲ; 9, pGAHG/*Hin*d Ⅲ; 10, pGAHH/*Hin*d Ⅲ; 11, pGAHI/*Eco*R Ⅰ + *Hin*d Ⅲ; 12, pGAHJ/*Hin*d Ⅲ

表1 病毒基因组 DNA 限制性片段的大小和数目

Table 1 Calculated sizes (kb) of restriction fragments of $Y_{81}G_4$ DNA

限制酶 Retriction enzymes	病毒基因组 DNA 限制性酶切片段的大小 Fragments with differen sizes (kb)										Sum
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
*Hin*dⅢ	8.5	5.8	4.5	3.8	2.8	2.6	1.4	1.4	1.4	0.7	32.9
*Bam*H I	16	10	4.3	1.7							32.0
*Eco*R I	18	4.7	4.0	2.8	2.5						32.0
Pst I	8.8	7.2	5.4	3.5	3.0	2.5	2.2				32.6
*Eco*R V	17	9.5	6.0								32.5

转印至 NC 膜上与 10 个病毒基因组 DNA-*Hin*d Ⅲ 片段探针的杂交结果见图 3，与相应探针杂交显示阳性的酶切片段列于表 2。

2.4 病毒基因组 DNA 物理图谱方向的比较

以含鸡 EDS_{76}病毒 AA-2 株基因组 DNA 右侧末端片段的重组质粒 pBE42 为探针，对 $Y_{81}G_4$ 株基因组 DNA 的 *Hin*d Ⅲ 消化产物及 $Y_{81}G_4$ 株基因组 DNA 的二个末端片段作 Southern blotting，杂交结果显示重组质粒 pGAHC 和病毒 DNA-*Hin*d Ⅲ 酶切的 C 片段有阳性信号，说明 C 片段为 $Y_{81}G_4$ 株病毒基因组 DNA 的右末端片段。电泳及杂交结果见图 4。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2　病毒基因组 DNA 酶切片段的杂交结果

Table 2　Southern blot hybridization of restriction fragments from $Y_{81}G_4$ genomic DNA with DIG-labelled *Hin*d Ⅲ fragments

选用的限制酶 DNA digested with	病毒基因组 DNA-*Hin*d Ⅲ 片段探针 Probes of viral *Hin*d Ⅲ fragments									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
*Bam*H Ⅰ	B, C, D*	A, C	B	A	A	A	A	A	A	A
*Eco*R Ⅰ	A, D	A	C, D	A	B	A	B	B, E	E	A, B
Pst Ⅰ	A, D, F	C, D	A	C, E	B	B, E	B	B, G	G	B
*Eco*R Ⅴ	A, B	A	B	A	A, C	A	C	C	C	A

* 表示与病毒 DNA-*Hin*d Ⅲ 片段探针杂交出现阳性信号的相应限制性片段

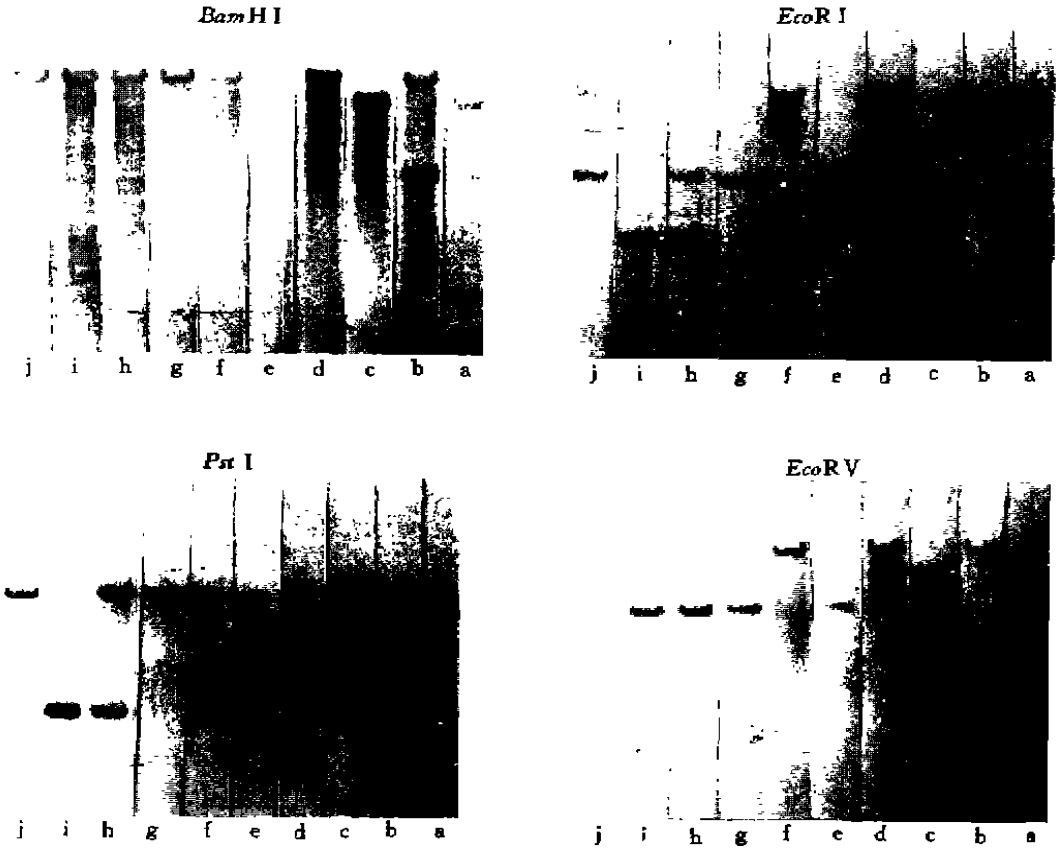

图 3　病毒基因组 DNA 酶切片段的杂交结果

a、b、c、d、e、f、g、h、i、j 分别示 10 个病毒 DNA-*Hin*d Ⅲ 片段探针

Fig. 3　Southern blot hybridization of restriction fragments from $Y_{81}G_4$ genomic DNA with DIG-labelled *Hin*d Ⅲ fragments.

a、b、c、d、e、f、g、h、i、j show 10 DIG-labelled fragments respectively.

2.5　病毒基因组 DNA 不同限制酶的物理图谱

根据 2.1, 2.3 和 2.4 的结果经综合分析后建立病毒基因组 DNA 不同限制酶的物理图谱(图 5)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

图4 病毒基因组DNA物理图谱方向的比较结果

Fig. 4 Comparison of genomic DNA mapping orientation of strain $Y_{81}G_4$ with EDSV strain AA-2

Ⅰ:电泳结果 Ⅱ:杂交结果

Ⅰ: Result of electrophoresis Ⅱ: Result of Southern blot hybridization a、a': λDNA/*Hin*d Ⅲ b、b': pGAHC/*Sac* Ⅰ + *Hin*d Ⅲ c、c': $Y_{81}G_4$ adenovirus genomic DNA/*Hin*d Ⅲ d、d': pGAHI/*Eco*R Ⅰ + *Hin*d Ⅲ

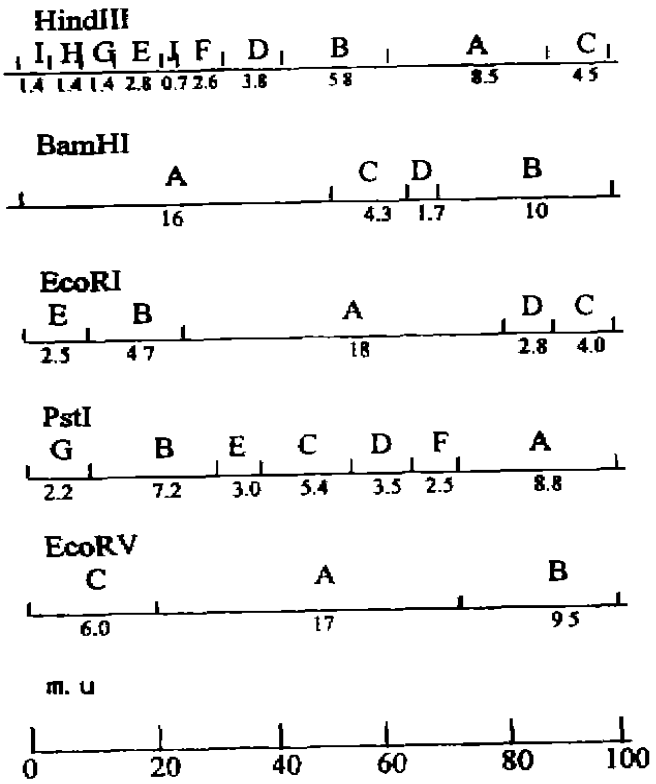

图5 鹅源腺病毒 $Y_{81}G_4$ 株基因组DNA的物理图谱

Fig. 5 Physical map of goose adenovirus $Y_{81}G_4$ genomic DNA

3 讨论

腺病毒表达载体系统是一种发展较快的载体系统，在重组疫苗和基因治疗方面应用比较

维普资讯 http://www.cqvip.com

广泛。随着人和多种哺乳动物腺病毒表达载体的构建与应用,禽腺病毒作为表达载体的研究愈来愈受到重视,特别是Ⅲ群减蛋白综合征病毒(EDSV),其宿主范围广泛,在自然界中存在许多无毒或弱毒毒株,利用其表达外源基因,有可能构建比较理想的禽腺病毒表达载体。

构建腺病毒载体的关键是筛选复制非必需区,人和哺乳动物腺病毒的E_3区为复制非必需区,位于病毒基因组pVⅢ基因与纤维蛋白基因之间,在此区域插入外源基因不影响病毒的复制又能使外源基因良好表达。而禽腺病毒CELO[2]、HEV[3]、EDSV[4]全基因组序列分析的结果表明,pVⅢ基因与纤维蛋白基因之间无明显的E_3区样结构;李茂祥[5]对EDSV基因组右侧序列分析结果也证实E_3区仅长245 nt,而在E_4区上游和ITR之间为病毒转录沉默区,此区可插入外源基因不影响病毒复制且能使外源基因良好表达。因此,在鹅源腺病毒$Y_{81}G_4$株进行全基因组DNA文库的构建和物理图谱分析的基础上,参照这些研究结果,将有利于筛选本病毒复制非必需区,为利用$Y_{81}G_4$株构建禽腺病毒载体奠定了坚实的基础。

本实验所用鹅源腺病毒$Y_{81}G_4$株自健康成年鹅体分离获得[8],本教研室曾对其病原学、血清学等方面作过比较详尽的研究[14],虽然该病毒在人工感染时对雏鸡有一定的致病性,但相对于天然致病性病毒来说,该毒株易于致弱,为构建禽腺病毒载体提供了方便。本病毒基因组DNA经不同限制酶分析显示其长度约为32~33 kb,与EDS_{76}病毒AV-127株基因组DNA全长33.2 kb[4],EDSVAA-2株全长32.9 kb[5]基本相符。该长度明显小于禽腺病毒Ⅰ群CELO病毒(43.8 kb)[2]而明显大于Ⅱ群火鸡出血性肠炎病毒(26.3 kb)[3],而且$Y_{81}G_4$株基因组DNA左末端序列分析结果显示ITR的长度和碱基序列与EDS_{76}病毒基本一致(内部资料,待发表),表明该鹅源腺病毒$Y_{81}G_4$株更类似于Ⅲ群禽腺病毒。但它与鸡EDS_{76}病毒仍有明显差异,如$Y_{81}G_4$株与AV-127株*Hin*dⅢ酶切后产生的片段数相同但片段大小具有明显差异;$Y_{81}G_4$株与AA-2株*Hin*dⅢ物理图谱两末端具有相似性但其它位点明显不同。$Y_{81}G_4$株与AV-127株*Eco*RI物理图谱比较在7.8 m.u处增加一个位点,其它位点相同;而两者的*Bam*HI物理图谱没有差异。证明不同时间、不同地点、不同宿主分离的Ⅲ群禽腺病毒酶切图谱存在明显差异[12]。

利用Southern Blotting技术构建病毒DNA物理图谱具有明显的优势[10]。该法具有特异性强、灵敏度和精确度高的优点,而且可同时构建多种限制酶物理图谱。如本实验在鹅源腺病毒全基因组DNA文库构建成功的基础上,首先分析各酶切片段克隆内的酶切位点,以便于选用消化病毒DNA的其它限制酶,这些限制酶应满足在病毒基因组中位点相对较少,且各酶切位点均匀分布在各酶切片段克隆内的条件,通过对各酶切片段克隆的酶切分析和病毒DNA的酶切分析,可确定选用的其它限制酶。然后将克隆的各个酶切片段分别标记探针,与其它限制酶消化的病毒DNA进行杂交,对杂交结果进行比较、分析、综合,这样利用多次转印、一次杂交即可获得病毒基因组DNA多种限制酶的物理图谱。

参 考 文 献

[1] Calnek B W, Barnes H J, Beard C W, *et al*. Diseases of Poultry [M]. Tenth Edition, 1997. 607-642

[2] Chiocca S, Kurzbauer R, Schaffner G, *et al*. The Complete DNA Sequence and Genomic Organization of the Avian Adenovirus CELO [J]. J Virol, 1996, 70: 2939-2949

维普资讯 http://www.cqvip.com

[3] Pitcovski J, Mualem M, Rei-Koren Z, *et al*. The Complete DNA Sequence and Genomic Organization of the Avian Adenovirus, Hemorrhagic Enteritis Virus [J]. Virology, 1998, 249:307 - 315

[4] Hess M, Blocker H, Brandt P, *et al*. The Complete Nucleotide Sequence of the Egg Drop Syndrome Virus: An Intermediate *between Mastadenoviruses and Aviandenoviruses* [J]. Virology, 1997, 238:145 - 156

[5] 李茂祥. 减蛋综合征病毒基因文库构建及基因组右侧 DNA 序列分析[D]. [学位论文], 长春: 解放军农牧大学军事兽医研究所, 1998

[6] 曾力宇, 金奇, 章金钢, 等. 鸡减蛋综合征病毒(EDSV-76)末端前体蛋白的基因结构分析[J]. 病毒学报, 1997, 4:351 - 356

[7] 李茂祥, 金奇, 章金钢, 等. 减蛋综合征病毒 pVⅢ基因和 E_3 区序列测定及结构分析[J]. 中国兽医学报, 1998, 1:27 - 31

[8] 郑玉美, 王永坤, 徐瑗, 等. 鹅腺病毒的初步研究[J]. 中国家禽, 1992, 6:23 - 24

[9] 徐福洲, 崔治中, 段玉友, 等. 鹅源腺病毒全基因组 DNA *Hin*dⅢ酶切片段的分子克隆[J]. 扬州大学学报, 1999, 待发表

[10] 齐义鹏, 黄永秀, 梁明山. 基因工程原理和方法[M]. 成都: 四川大学出版社. 1988

[11] Zakharchuk A N, Kruglyak V A, Akopian T A, *et al*. Physical mapping and homology studies of egg drop syndrome (EDS-76) adenovirus DNA [J]. Arch Virol, 1993, 128:171 - 176

[12] Todd D, Menulty M S, Smyth J A. Differentiation of Egg Drop Syndrome Virus Isolates by Restriction Endonuclease Analysis of Virus DNA [J]. Avian Pathology, 1988, 17:909 - 919

[13] 王泽霖. 产蛋下降综合征(EDS-76)病毒 DNA 酶切图谱分析[J]. 中国兽医学报, 1994, 14(4):360 - 364

[14] 朱国强, 王永坤, 周继宏, 等. 鸡产蛋下降综合征的研究及防治[A]. 见: 中国畜牧兽医学会禽病学分会第四次代表大会暨第七次学术讨论会论文集. 中国郑州, 1994

Construction of Physical Mapping of Goose-derived Adenovirus Genomic DNA

XU Fu-zhou, CUI Zhi-zhong, LIU Yue-long, DUAN Yu-you, SUN Huai-chang

(Col of Ani Sci and Vet Med, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: The genomic DNA library of goose-derived adenovirus (strain $Y_{81}G_4$) was constructed after ten fragments of viral genomic DNA digested with *Hin*dⅢ were cloned into plasmid pUC18 respectively. The inserted fragments of the ten recombinant plasmids were labelled with digoxigenin. Viral genomic DNA digested with *Bam*HI、*Eco*RI、*Pst*I or *Eco*RV were transferred to NC membranes after electropheresis and probed with DIG-labelled cloned *Hin*dⅢ fragments respectively. The physical mapping of adenovirus $Y_{81}G_4$ genomic DNA was constructed successfully by Southern blot. To compare strain $Y_{81}G_4$ genomic DNA mapping orientation with EDSV strain AA-2, the cloned right terminal fragment of EDSV strain AA-2 was labelled with digoxigenin and probed with the two cloned terminal fragments of $Y_{81}G_4$ genomic DNA by Southern blot. By comparison of homology the orientation of $Y_{81}G_4$ genomic DNA were determined. These results will be helpful for construction of avian adenovirus vector.

Key words: Goose-derived adenovirus; Genomic DNA; Physical mapping; Southern blotting