

132-135

第20卷 第3期
1998年5月中国畜禽传染病
Chinese Journal of Animal and Poultry Infectious DiseasesVol. 20, No. 3
May 1998

H14 亚型禽流感病毒核蛋白基因的扩增与克隆

邓国华 于康震*

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001)

S852.65

摘要 本研究直接从浓缩的鸡胚尿囊液中提取 H14 禽流感病毒的 RNA, 并根据已发表的 A 型流感病毒株的核苷酸序列, 设计一对引物, 采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术成功地扩增了 AIV 的核蛋白(NP)基因, 以 pUC119 为载体, 以大肠杆菌 JM83 为受体菌, 并通过限制性分析证实, 成功地克隆了该 NP 基因。

关键词 RT-PCR 核蛋白基因 禽流感病毒 克隆

Amplification and Cloning of NP gene of H14 Subtype Avian Influenza Virus

DENG Guohua, YU Kangzhen*

(State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001)

Abstract The present paper describes the nucleoprotein(NP)-encoding cDNA of H14 subtype avian influenza virus(AIV) was amplified and cloned. The virus RNA was directly extracted and purified from concentrated chicken embryo allantoic fluid. According to published gene sequence, a pair of specific primers to the NP gene was designed and synthesized. After that, the NP cDNA was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) and subsequently cloned in pUC119. The presentation of the NP cDNA in transformed E. coli JM83 cells was confirmed by PCR and restriction analysis.

Key words RT-PCR Nucleoprotein gene Avian influenza virus Cloning

禽流感(AI)是由正粘病毒科中 A 型流感病毒引起的禽类的病毒性传染病。本病 1878 年首次在意大利发现, 至今已遍布全世界。1993 年以来在我国部分地区先后分离到不同亚型的流感病毒^[1,2,3]。1996 年我们从鸡群中分离到 H14N5 亚型禽流感病毒^[3], 这是世界上首次从鸡体分离到的 H14 亚型, 已引起了国内外流感研究者的兴趣。

尽管禽流感病毒血清学亚型众多, 病毒变异极为频繁, 但主要集中在病毒的血凝素(HA)和神经胺酶(NA)两种表面结构蛋白上, 而核蛋白(NP)则具有种群和型的特异性^[4,5], 是禽流感病毒型的分类和诊断基础。一般认为, 核心抗原不能诱导保护性体液免疫, 但近来有研究表明 NP 蛋白能诱导机体的细胞免疫^[6], 能产生一定免疫保护性, 同时具有良好的种间交叉反应性, 不受禽流感病毒亚型的影响, 这给新型、广谱禽流感疫苗

的研制带来一线光明。

作为流感病毒的整体而言, 可分为 A、B、C 三群(型), 在 A 型群体内, 核蛋白基因的遗传变异又可作为流感病毒分子进化和分类的基础^[4]。根据核蛋白基因序列差异可将流感病毒分为明显的两大类, 一为人枝, 另一为禽枝, 而猪枝与人和禽枝均有较大的重叠和交叉, 说明猪在流感病毒增殖和传播过程中有较低的种间障碍, 使人、禽流感得以相互作用。NP 基因的氨基酸序列在禽枝中无明显的集中性, 呈发散状态, 但在人枝中却表现出明显的递进性^[7], 这表明核蛋白基因在流感病毒中具有种属特异性。综上所述, 禽流感病毒核蛋白基因的克隆对于禽流感诊断抗原制备工艺的改进、新型、广谱禽流感疫苗的研制以及鸡 H14 亚型起源的探讨具有重要意义。有鉴于此, 我们开展了该 H14 禽流感病毒核蛋白基因的扩增和克隆的研究, 现将主要结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 病毒制备 H14 亚型禽流感病毒为我国地

* 通讯作者

1997-10-29 收稿

方分离株^[3],由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所禽流感研究中心保存。病毒接种9~11日龄SPF鸡胚尿囊腔,24~96小时后收集尿囊液,4000r/min(BECKMAN JA18转头)离心30分钟后收集上清,再经27000r/min(BECKMAN SW28转头)超速离心,将沉淀溶于无RNA酶的蛋白酶缓冲液中,冻存备用。

1.2 RNA提取 取病毒悬液500 μ l,加SDS至终浓度为0.5%,蛋白酶K至终浓度为50 μ l/ml,于37 $^{\circ}$ C作用后再用无RNA酶水饱和的酸性酚(pH4.0)、酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、氯仿各抽提一次,上清分装为100 μ l/管,每管加入1/10体积的3M的NaAc(pH5.2)和2.5倍的无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C沉淀过夜,12000g 4 $^{\circ}$ C离心10至20分钟,沉淀干燥后溶于无RNA酶水中-20 $^{\circ}$ C冻存备用。

1.3 引物设计与合成 参照禽流感A/Mallard/New York/6750/78株^[6]及人流感A/Udorn/307/72株^[7]和A/NT60/68株^[8]等的核蛋白基因序列,应用OLIGO引物设计软件,在NP基因的高度保守区设计并合成了1对引物:

P1:5'-AGGGTACCTAATCACTCACACTGA-3'

P2:5'-TGGAATTCTTTAATTGTCGTACTCCTC-3'

上游引物(P1)在启动子之外另加入Kpn I酶切位点;下游引物(P2)包含有终止密码子,并加入了EcoRI位点。P1,P2的限制性部分包含有完整的NP基因,所扩增的片段为1541bp,与NP基因阅读框架相一致。

1.4 RT-PCR扩增 取6 μ l RNA悬液加入20pmol上游引物,70 $^{\circ}$ C 10分钟预变性,迅速置于冰浴中5分钟,依次加入10U Rnasin,5 \times 反转录缓冲液4 μ l,0.1M DTT2 μ l,2.5mmol DNTP 4 μ l,10U M-MLV反转录酶,37 $^{\circ}$ C温浴1~2小时,在95 $^{\circ}$ C灭活反转录酶,置-20 $^{\circ}$ C备用。取反转录产物5 μ l,10 \times Taq酶缓冲液10 μ l,20mmol DNTP4 μ l,上下游引物各20pmol,用灭菌无离子水补至100 μ l,混匀,95 $^{\circ}$ C预变性5分钟,然后加入1~2U Taq DNA聚合酶,于PTC-100基因扩增仪内扩增,循环参数为:94 $^{\circ}$ C 30秒 \rightarrow 48~49 $^{\circ}$ C 1分钟 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1分30秒,共进行35个循环。最后72 $^{\circ}$ C延伸反应10分钟,取PCR产物10 μ l进行1%琼脂糖凝胶电泳,检查扩增结果。

1.5 PCR产物的限制性分析 取5 μ l PCR产物

分别进行EcoRI、BamHI、HindIII、HincII、PstI、Sall、KpnI酶的限制性分析。

1.6 PCR产物的克隆 取pUC119载体DNA 2 μ l经SmaI彻底消化,备用;PCR产物用T4DNA聚合酶和T4核苷酸激酶补平,加磷酸,再用透析袋回收纯化,用于连接反应。将PCR产物与载体按适当比例混合,在20 μ l体系中加入连接酶反应缓冲液和T4连接酶(GIBCO公司)进行连接反应。取5 μ l连接产物转化感受态JM83菌,涂布于含Amp、X-gal、IPTG的LB培养基上,挑白色菌落进行快速鉴定,再将初步克隆的细菌克隆小量培养,提取质粒进一步酶切鉴定。

1.7 重组质粒的PCR鉴定 取小量法提取的重组质粒DNA进行NP基因PCR扩增,以进一步鉴定重组质粒中的NP基因的存在。

2 结果和讨论

2.1 RT-PCR 取PCR产物5 μ l于1%琼脂糖上电泳,结果表明扩增产物为1.5Kb左右的DNA片段,与预计的NP cDNA大小相符。

2.2 PCR产物的限制性分析 PCR产物经HincII酶切,切出1.1Kb和0.4Kb左右的2条带;PstI酶切,切出1.0kb、300bp和200bp左右大小的3条带;EcoRI、BamHI、Sall、Sall和HindIII均不能剪切。结果表明该毒株的NP基因与已发表的几个参考序列有较大差异(图1)。

2.3 PCR产物的克隆与鉴定 重组质粒DNA用EcoRI和BamHI双酶切,切出1.5Kb和3.2Kb左右的2条带,用EcoRI切出3.2Kb和1.5Kb左右的2条带(图3),用PstI切出4.2Kb,0.3Kb和0.2Kb左右的3条带(图4),同时以重组质粒为模板,PCR扩增出1.5Kb的带(图2)。这些结果均表明已克隆到了核蛋白基因。

2.4 由于流感病毒基因的分段性,每个基因组外部非编码区序列非常有限,加上整个基因组(特别是非编码区)的GC含量较低,给引物设计带来较大困难。国外大多采用建cDNA文库的方法进行克隆^[9,10],工作量和难度较大。我们在NP基因的5'端和3'端的保守区设计了一对相对理想的引物来进行扩增,这给以后的实验带来一定困难,如退火温度低,PCR产量低,非特异性大等,但比起建cDNA文库仍具有一定的优越性。

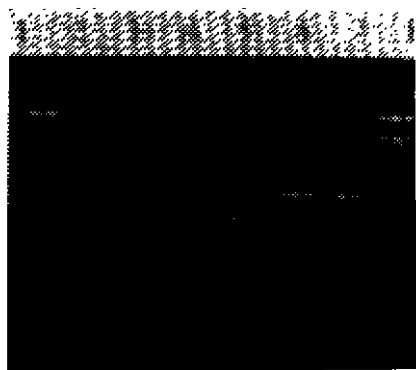


图1 PCR产物酶谱分析

1、8; DNA分子量标准 2; EcoRI 酶切
3; PstI 酶切 4; Hind III 酶切
5; Hind II 酶切 6; Sal I 酶切

Fig. 1. Restriction analysis of PCR products.

Lane 1, 8; λ DNA/Hind III + EcoRI Marker

Lane 2; EcoRI digestion

Lane 3; Pst I digestion

Lane 4; Hind III digestion

Lane 5; Hinc II digestion

Lane 6; Sal I digestion

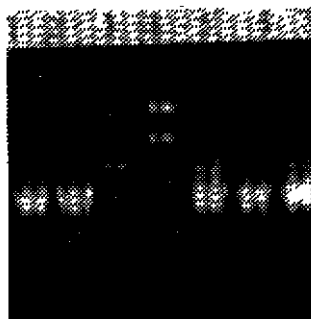


图2 重组质粒的PCR鉴定

4; DNA分子量标准

1、2、3、5、6、7; 重组质粒

Fig. 2; Identification of recombinant plasmids by PCR

Lane 4; λ DNA/Hind III + EcoRI Marker

Lane 1, 2, 3, 5, 6, 7; recombinant plasmids

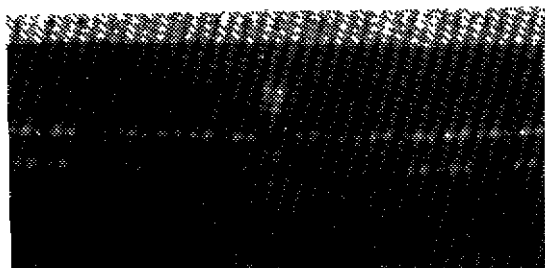


图3 重组质粒 EcoRI 酶切鉴定

8; DNA分子量标准

1、2、4、12、13、15; EcoRI 酶切(示阳性克隆)

Fig. 3; Identification of recombinant plasmids by EcoRI digestion.

Lane 8; λ DNA/Hind III Marker

Lane 1, 2, 4, 12, 13, 15; EcoRI digestion (shows positive clones)

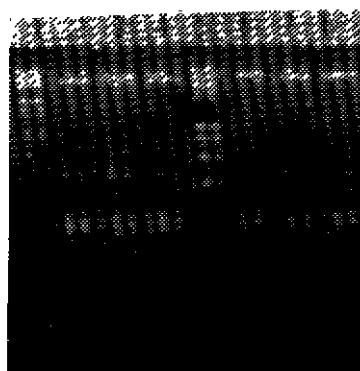


图4 重组质粒 Pst I 酶切鉴定

1; DNA分子量标准

5; 1Kb DNA分子量标准梯度

2、3、4、6、7、8; PstI 酶切(示阳性克隆)

Fig. 4; Identification of recombinant plasmids by Pst I digestion.

Lane 1; λ DNA/Hind III + EcoRI Marker

Lane 5; 1Kb ladder

Lane 2, 3, 4, 6, 7, 8; Pst I digestion (shows positive clones)

2.5 近20年来,人们主要集中研究流感病毒的两种囊膜蛋白 HA 和 NA,以期能找到预防流感病毒的新途径。但由于 HA 亚型众多,亚型之间的交叉保护性低,用它来作为流感亚单位疫苗难以大面积应用。近几年来,又有人尝试用禽流感病毒的核蛋白(NP)来作为亚单位疫苗,并证明它能诱发机体的细胞免疫,产生广谱的免疫保护力^[5],这说明核蛋白的研究对于新型、广谱禽流感疫苗的

研究具有现实意义。同时禽流感病毒的核心抗原 NP 由于其型(而非亚型)特异性而被用来代替全病毒作为诊断抗原,在禽流感琼脂免疫扩散试验(AGP)和酶联免疫吸附试验(ELISA)中可检测出各种亚型的禽流感病毒感染。因此, NP 的分子克隆为下一步的重组表达继而开发为禽流感诊断抗原奠定了分子生物学基础,这对于禽流感诊断抗原生产工艺的简化和生产成本的降低具有重要

135-136

第20卷 第3期
1998年5月中国畜禽传染病
Chinese Journal of Animal and Poultry Infectious DiseasesVol. 20, No. 2
May 19984
犬疱疹病毒的分离鉴定范泉水 齐桂凤[✓] 王度林 李国荣 唐安建 陆明昌 兰建强 路年生 夏成柱*
(成都军区后勤部军事医学研究所,昆明 650224)

S852.655

摘要 犬疱疹病毒引起1周龄以下仔犬严重和高死亡的疾病,用犬肾传代细胞 MDCK,从濒死发病犬的肾脏器官分离获得一株疱疹病毒,经鉴定为犬疱疹病毒。培养液观察病毒大小为140nm有囊膜病毒,核酸型为DNA,对乙醚敏感,对热抵抗力弱,56℃经4分钟灭活,pH4.5时30分钟失去感染力,用分离毒接种7日龄的幼犬引起典型的疱疹病毒感染症状,并从人工感染试验的幼犬回收病毒。

关键词 犬疱疹病毒 肾传代细胞系 分离鉴定

Isolation and Identification of Canine Herpesvirus

FAN Quanshui, QI Guifeng, WANG Dulin, LI Guorong, TENG Anjian
LU Minchang, LAN Jianqin, LU Niansheng, XIA Xianzhu*

(Institute of military medical, Changdu military area, Kunming 650224)

Abstract One local strain of Canine Herpesvirus causing several diseases and high mortality in one-week-old puppies was isolated and identified to be canine Herpesvirus by the culture on MDCK cells from kidneys of a dying puppies. Results showed that the size of the viral particle was about 140 nm with envelope and the nucleic acid of the isolate was DNA. Virus could be inactivated by lipid solvents such as ether, 56°C for 4 minutes and pH4.5, respectively, and obtained again from the isolate challenged puppies with typical canine herpesvirus symptom.

Key words Canine Herpesvirus MDCK cells Isolation and Identification

* Direct

犬疱疹病毒是引起犬急性死亡的重要致病因子之一。对犬的繁殖造成严重的经济损失,1965

年 Carmichael 和 Stewart 氏分别在美国和英国首次分离到犬疱疹病毒以后,才引起人们的注意,并相继在世界不同地区分离出病毒。我国到目前为止尚未见有报道。1995年初,云南省畜产公司玩赏犬养殖场幼犬先后发生犬疱疹病毒感染,临床表现呼吸困难、腹疼、嚎叫、死亡率100%,经病理

* 中国人民解放军农牧大学军事兽医研究所病毒室教授,为本文指导

1997-03-14 收稿

实用价值。

2.6 本研究所用毒株是目前国际上唯一的鸡源 H14 亚型禽流感分离株,其 NP cDNA 的限制性研究表明,该分离株与其它的禽源分离株有较大差异。该 NP cDNA 的序列分析几近完成(将另文报道),这无疑有助于对鸡源 H14 亚型分离株的起源及其与其它禽源分离株差异的比较性研究。

致谢:在本研究中,哈尔滨兽医研究所禽流感研究中心和兽医生物技术国家重点实验室的唐秀英研究员、金红博士、陈化兰博士、李媛和田国斌研究员等在种毒提供、技术支持等方面做出了贡献,在此深表谢意。

参考文献

1. 陈伯伦等:中国兽医杂志,1994,20(10):3~5.
2. 张泽伦等:中国兽医杂志,1994,20(10):6~7.
3. 唐秀英等:中国畜禽传染病,1998,20(1):1~5.
4. William J. Bean et al, Virology, 1984, 133: 438~442.
5. S. Kodihalli et al, Vaccine, 1994, 12(15): 1467~1472.
6. Robert G. Webster et al, Vaccine, 1991, 9(5): 303~309.
7. Christoph Scholtissek et al, Virus Genes, 1996, 11(2/3): 209~215.
8. Alicia J. Buckler-White et al, Virology, 1986, 155, 345~355.
9. J. A. Huddlast et al, Nucleic Acids Research, 1982, 10(3): 1029~1038.
10. Gereg Winter et al, Virology, 1981, 114, 423~428.