

# 鸡传染性支气管炎病毒 N 基因片段的 RT-PCR 扩增及限制性内切酶分析\*

孙 涛, 王 欣, 陆 萃

(上海交通大学 农学院, 上海 201101)

**[摘 要]** 根据鸡传染性支气管炎病毒(BV)的已报道基因序列设计了 1 对可扩增 N 基因片段的引物, 并得到了预期的 438 bp 扩增产物; 将目的条带纯化并回收后, 克隆到 PMD18-T 质粒载体中, 对插入片段进行序列测定, 并与已发表的 BV N 基因序列进行了比较, 证实扩增和克隆的产物是正确的; 根据扩增的 N 基因的序列, 选择了 *Bst*X I 酶对 BV 进行分析, 发现 M 41 和澳大利亚 T 株 *Bst*X I 酶切图谱存在明显的差异, 从而建立了一种新的鉴定 BV 病毒的方法。

**[关键词]** 鸡传染性支气管炎病毒(BV); N 基因; RT-PCR

**[中图分类号]** S858.310.65; S813.3

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1000-2782(2001)04-013-04

鸡传染性支气管炎是严重危害养禽业的一种急性、高度接触性传染病, 由鸡传染性支气管炎病毒(BV)引起。BV 属冠状病毒科, 是一种 RNA 病毒<sup>[1]</sup>。由于其复制酶为 RNA 聚合酶, 缺乏自我修复能力, 导致该病毒基因组具有较大的变异性。过去该病的爆发多以呼吸道病变型为主; 近年来出现了一些新的病变型, 如肾病变型和腺胃病变型等, 新出现的 BV 变异毒株给检测和鉴定带来了较多困难。检测 BV 的方法较多, 如可用鸡胚和气管环培养物来对 BV 进行分离和鉴定, 但该方法费时、费力; 血清学分析方法通常只能对已知毒株进行检测和分析, 而对一些新出现的变异株则可能漏检。近年来, 分子生物学技术在病毒学研究中得到了广泛的应用, 由于其具有敏感、快速和简便的特点, 因此应用分子生物学技术检测和鉴定 BV 具有独特的优势。目前, 国内外已有许多这方面的报道, Kwon 等<sup>[2]</sup>利用 RT-PCR 扩增 S1 基因, 结合酶切分析来检测和鉴定 BV, 王林川等<sup>[3]</sup>、江国托等<sup>[4]</sup>也利用类似方法对 BV 中国地方流行株进行了分析。由于 S1 基因具有较大的变异性且片段较长(分子含约 1.7 kb), 所以常给扩增带来困难, 影响检测的敏感性。N 基因则相对保守, 对该基因或其基因片段进行 RT-PCR 扩增应该更加可行。本研究利用 RT-PCR 方法扩增 BV N 基因的片段, 同时结合限制性内切酶酶切结

果来对扩增产物进行分析, 从而建立起一种准确、实用的检测和鉴定 BV 的新方法。现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 BV 病毒株、转化质粒受体菌株

鸡传染性支气管炎病毒(BV) M 41、澳大利亚 T 株(以下简称 T 株)均为上海交通大学农学院生物技术所保存。E. coli TG1 宿主菌为上海交通大学农学院生物技术所保存。

### 1.2 试剂及仪器

RNA 抽提试剂为美国 GBCO 公司的试剂盒。M-MLV 逆转录酶、dNTP 购自 Promega 公司, PCR 反应试剂盒、pMD18-T 载体及限制性内切酶由大连 Takara 公司提供。PCR 产物小量回收试剂盒、胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司。PCR DNA marker 购自华美生物工程公司。其余常用化学试剂均为国产分析纯。

### 1.3 BV 病毒增殖和浓缩

BV 病毒增殖采用尿囊腔接种。每枚鸡胚接种 0.1~0.2 mL, 38℃下孵育。试验期间, 24 h 内死胚弃去, 每天翻蛋 2 次以上。孵育 36~40 h 以后, 将鸡胚置于 4℃下冷藏 12 h 左右, 收获尿囊液。将收获的鸡胚尿囊液于 10 000 r/min 离心 30 min。收获上

\* [收稿日期] 2001-03-08

[基金项目] 上海市教委基金资助项目(97E04)

[作者简介] 孙 涛(1968-), 男, 浙江嘉兴人, 讲师, 在读博士, 主要从事病毒学研究。

清液, 弃去沉淀。上清液再于 35 000 r/min 离心 2~2.5 h 后, 弃上清液, 将沉淀用 0.02 mol/L, pH 7.4 PBS 悬浮。电镜下观察病毒粒子。将形态数量良好者于 -30 °C 冻存。

#### 1.4 病毒基因的 RT-PCR

1.4.1 PCR 引物设计 针对 BV N 基因 5' 末端的一段保守序列设计了 1 对引物。跨度为 438 bp。上游引物序列: 5'-GTCTTCTCCCGCGTGTA-3'; 下游引物序列: 5'-ACCTTACCA GCAACCC-3'。

1.4.2 RNA 抽提 将电镜下观察良好的 BV 病毒浓缩液用异硫氰胍一步法进行病毒 RNA 提纯。以未接种病毒的鸡胚尿囊液为阴性对照。具体操作均按 GBCO 公司说明书进行。大致步骤如下: 取病毒浓缩液 0.25 mL 并加入 0.75 mL TRIzol 裂解液, 于室温下作用 10~15 min。加入氯仿 200  $\mu$ L, 剧烈振荡, 室温下放置 10~15 min。再于 12 000 r/min 离心 15 min。待分层以后, 吸出上层水相约 500  $\mu$ L, 再加入等体积的异丙醇, 混合后置室温下沉淀 RNA 5~10 min。12 000 r/min 离心 15 min。弃上清液, 加入体积分数 75% 乙醇 1 mL 洗涤沉淀, 9 000 r/min 离心 5 min。弃上清液, 将 RNA 沉淀于室温下干燥 10 min 左右, 用适当体积的 DEPC 水溶解。

1.4.3 cDNA 合成反应 按 Promega 公司操作说明书进行, 大致如下: 吸取 10  $\mu$ L RNA 加入 2  $\mu$ L 下游引物。70 °C 10 min, 立即插在冰上。调制 RT 反应液。用 5 $\times$ RT buffer 5  $\mu$ L; dNTP 2.5  $\mu$ L; M-MLV 逆转录酶 (200  $\mu$ mol/(\( $\mu$ L $\cdot$ min)) 1  $\mu$ L; Rnasin 0.5  $\mu$ L; RNA 及下游引物混合物 12  $\mu$ L, 补水至总体积 25  $\mu$ L。将调制好的 RT 反应液 42 °C 水浴孵育 1 h。结束后, 将反应液于 95 °C 作用 10 min 灭活反转录酶。于 -20 °C 冻存。

1.4.4 PCR 扩增反应 PCR 反应液按 100  $\mu$ L 反应体积调制: 10 $\times$ PCR buffer 10  $\mu$ L; dNTP 8  $\mu$ L; 上游引物 1  $\mu$ L; 下游引物 1  $\mu$ L; Taq 酶 (5  $\mu$ mol/(\( $\mu$ L $\cdot$ min)) 0.5  $\mu$ L; RT 反应产物 2  $\mu$ L; 补水至总体积 100  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 2 min, 以下按 94 °C 1 min, 50 °C 40 s, 72 °C 1 min 共进行 30 个循环, 最后在 72 °C 延伸 10 min。反应产物在质量分数 10% 的 Agarose 胶上电泳检测并拍照。剩下的冻存于 -20 °C 冰箱。

#### 1.5 PCR 产物的回收及克隆

1.5.1 PCR 扩增产物纯化和回收 按上海华舜公司“小量 PCR 产物胶回收试剂盒”的说明书进行。

1.5.2 PMD 18-T Vector 连接 将纯化片段与

PMD 18-T 载体连接, 步骤参见 Takara 公司试剂盒说明书。同时设阳性和阴性对照。

1.5.3 连接产物的转化及蓝白斑筛选 按文献[5]的方法制备感受态细胞。取 20  $\mu$ L 的 TG1 感受态细胞悬液, 加入连接溶液 1  $\mu$ L, 轻轻混匀, 冰上放置 30 min。37 °C 水浴 5 min, 冰上放置 2 min, 然后向离心管中加入 100  $\mu$ L 37 °C 预热的 LB 液体培养基, 37 °C 轻摇培养 1 h, 使细胞恢复正常生长状态。将细菌及 10  $\mu$ L (100 mg/mL) IPTG; 20  $\mu$ L X-gal (50 mg/mL) 均匀涂布于 Amp + LB 平板, 放置 15~30 min, 待菌液完全被培养基吸收后, 倒置 LB 平板, 37 °C 培养过夜。挑取白色菌落接种于 5 mL Amp + LB 培养基, 37 °C 振荡培养过夜。

1.5.4 重组质粒的鉴定 质粒抽提按常规碱法<sup>[5]</sup>进行, 并用 PCR 方法进行鉴定。

#### 1.6 重组质粒的序列测定

由大连 Takara 公司进行。测序仪为 ABI PRISM<sup>TM</sup> 377 XL DNA Sequencer。

#### 1.7 扩增产物的限制性内切酶分析

通过对扩增产物的序列分析, 选择 BstX I 内切酶对 BV 毒株进行酶切分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 RT-PCR 扩增 BV 病毒 N 基因片段

通过反应条件的优化, M41 和 T 株均扩增出了目的大小条带 (438 bp), 如图 1 所示。同时, 阴性对照未出现扩增结果。

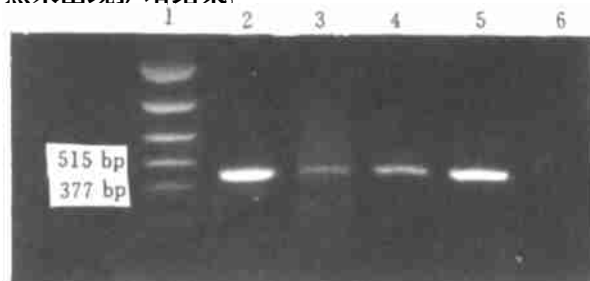


图 1 BV N 基因片段扩增产物及重组质粒 PCR 鉴定产物的琼脂糖凝胶电泳

1 PCR DNA marker; 2 M41; 3 T 株; 4 M41 重组质粒的 PCR 鉴定产物; 5 T 株重组质粒的 PCR 鉴定产物; 6 阴性对照

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of amplification products and PCR analysis of recombinant plasmid  
1 PCR DNA marker; 2 M41; 3 T strain; 4 PCR analysis of M41 recombinant plasmid; 5 PCR analysis of T strain recombinant plasmid; 6 Negative control

## 2.2 重组质粒的筛选和鉴定

将挑出的白色菌落接种于Amp+LB液体培养基,并于37℃下培养过夜。按常规方法抽提重组质粒,进行PCR扩增鉴定,得到了相同的片段,见图1。

## 2.3 序列测定结果及分析

对插入重组质粒的N基因片段进行序列测定,

```
GTCTTCTCCCGCGTGTACCTCTCTAGTATTCAGGGGAAAACCTTGTGAGGAACACAAATATAATAATAATCTTTTGTCT
ATGGCAAGCGGTAAGGCAACTGGAAAGACAGATGCCCCAGCTCCAGTCATCAAACCTAGGACCACCAAAGCCACCTA
AAGTTGGTCTCTCTGGAAATGTATCTTGGTTTCAAGCAATAAAAGCCAAGAAGTTAAATTCACCTCCGCCTAAGTTTG
AAGGTAGCGGTGTTCTTGATAATGAAAATCTAAAACCAAGTCAGGAGCATGGATATTGGAGACGCCAAGCTAGGTTT
AAGCCAGGTAAAGGTGGAAGAAAACCAAGTCCAGATCCTTGGTATTTTACTATACTGGAACAGGACCAGCCGCTAA
CCTGAATTGGGGTGATAGCCAAGATGGTATAGTGTGGGTTGCTGGTAAGGGT
```

图2 BV M41的测序结果

Fig. 2 Sequence of BV M41 N gene fragment

```
GTCTTCTCCCGCGTGTACATCACTAGYATTCGAGGGGAAAACCTTGTGACGAGCACTTATATAATAATAATCTTTTATCA
TGGCAAGCAGTAAGGCAGCTGGAAAAACAGACGCCCCGACGCCGATCATCAAACCTAGGAGGACCAAAACCACCAA
AGTTGGGTCTCTCTGGAAATGCACTTGGTTTTCAGCCAATAAAAGCCAAGAACTCAATTCACCTCAACCAAATTTTG
AAGGTAGTGGTGGTCTTGATAATGAAAATATTAACCAAGCCAGCAGCATGGATATTGGAGACGCCAAGCCAGGTAT
AAGCCAGGTAAAGGCCGAAGAAAACCAAGTCCCTGATGCGTGGTATTTTACTATACTGGAACAGGACCAGCCGCTAA
CCTGAATTGGGGTGATAGCCAAGATGGTATAGTGTGGGTTGCTGGTAAGGGT
```

图3 BV T株的测序结果

Fig. 3 Sequence of BV T strain N gene fragment



图4 BV N基因扩增片段BstX I酶切图谱

1, 6 M41扩增产物; 2, 5 M41酶切产物; 3 T株扩增产物;  
4 T株酶切产物; 7 ①X174-HaeIII digest DNA marker

Fig. 4 BstX I digest analysis of amplification product of BV N gene fragment

1, 6 PCR product of M41; 2, 5 Digest product of M41;  
3 PCR product of T strain; 4 Digest product of T strain; 7 ①X174-HaeIII digest DNA Marker

## 2.4 限制性内切酶酶切结果

M41和T株N基因片段均存在BstX I内切酶

结果见图2、图3,图中框内阴影所标为BstX I内切酶位点。将其与文献[6]报道的BV Beaudette标准株同源序列进行比较,M41和Beaudette株的同源性为91.7%;T株与Beaudette株的同源性为89%;M41和T株核酸序列的同源性为88.6%。证明了这3株病毒有极高的亲缘关系,为同一种病毒。

的酶切位点,如图2、3阴影所示,但位置不一样。用BstX I酶对二者N基因片段扩增产物进行酶切,得到了以下结果:M41为347和91 bp两个片段,而T株为280和158 bp两个片段,结果如图4所示。与序列分析结果一致。

## 3 讨论

BV病毒的变异性较强,对其检测,尤其是对新出现的变异毒株的检测一直是困扰养禽业的一大难题。用PCR、核酸探针检测技术及基因序列测定等方法可直接以病毒基因为研究目标,因此,在病毒检测和鉴定及流行病学研究方面显得更为准确、可靠。本研究针对BV病毒N蛋白基因的保守区段设计了1对引物,建立了扩增这段序列的RT-PCR方法。由于RT-PCR是一种极为敏感的方法,常会带来一些不确定性,如产生非特异性扩增条带。因此,单纯依靠RT-PCR方法检测、鉴定BV病毒并不可靠,必须做进一步验证。通常用的方法有限制性内切

酶分析、核酸探针杂交及基因序列测定等。本研究为了验证扩增结果的正确性,对其进行了克隆和测序。经与已报道的 BV Beaudette 标准株相应区段进行比较,M 41 和 T 株与标准株的同源性分别为 91.7% 和 89%,证明用建立的 RT-PCR 方法扩增出的是目的产物。

病毒基因序列测定结果可靠,但费时、费力,一般实验室无法完成。而对产物进行限制性内切酶酶切鉴定则比较实用和可靠。所以,根据序列分析结果,本研究选择了 *BstX I* 这种较为廉价和易得的酶来对 BV M 41 和 T 株扩增产物进行酶切分析,得到了二者的 *BstX I* 酶切图谱。这样,可以利用 RT-

PCR 结合限制性内切酶图谱分析来准确地检测和鉴定这两株 BV 病毒。同时,根据二者在酶切图谱上存在的明显差异,仅用一种内切酶就可以将 BV 中主要的 2 个代表株(M 41 和 T 株)区分开来,该方法快速、实用、经济。由于 M 41 和 T 株均是 BV 病毒的标准株,其中 M 41 在生产中还被用来作为疫苗株,因此,疫苗生产单位、科研单位经常需要对保存种毒进行鉴定。本研究建立的这种方法用于种毒的区分、鉴定是有意义的。此外,将这种方法应用于更多的 BV 毒株,及准确建立血清型(sero type)与基因型(geno type)之间的相关性将是进一步研究的目标。

### [参考文献]

- [1] 殷震,刘景华 动物病毒学[M]. 北京:科学出版社,1997.
- [2] Kwon H M, Jackwood M W, Gelb J. D differentiation of infectious brochitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis[J]. Avian Dis, 1993, 37: 194- 202.
- [3] 王林川,廖明,王红宁,等 用 RT-PCR 和 RFLP 对禽传染性支气管炎病毒中国分离株的分型[J]. 病毒学报, 1997, 13(4): 365- 367.
- [4] 江国托,刘思国,康丽娟,等 中国鸡传染性支气管炎病毒的变异[J]. 中国畜禽传染病, 1999, 20(6): 321- 323.
- [5] 金冬雁,黎孟枫译 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版 北京:科学出版社,1992.
- [6] Boursnell M E G, Brown T D K, Foulds P F, et al Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus[J]. Journal of General Virology, 1987, 68: 57- 77.

## The RT-PCR amplification and restriction endonuclease analysis of BV N gene fragment

SUN Tao, WANG Xin, LU Ping

(College of Agriculture, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China)

**Abstract** We designed a pair of primers to amplify the N gene fragment of BV M 41 and T strain based on the reported gene sequences. The anticipated 438 bp products were acquired. After purification and recovery, the products were recombined into PMD18-T vector and sequenced. The sequence were compared with the reported N gene sequences and testified that the RT-PCR products were correct. According to the sequences, we found some restriction endonuclease sites. At last, we selected *BstX I* enzyme to analyze the two BV strains and found the maps of the two strains were significant different. So we can use this method (RFLP) to identify and distinguish BV M 41 and T strain.

**Key words:** BV; N gene; RT-PCR