

应用生物素标记的 NDV-cDNA 探针检测 感染尿囊液中 NDV-RNA 的初步研究

陈书琨 何云生 李观娣 钟安清

(中华人民共和国深圳动植物检疫局, 深圳 518010)

摘要 本文应用聚合酶链反应 (PCR) 技术从构建的新城疫病毒(NDV)cDNA 文库中扩增含编码 F 糖蛋白前体——F₀酶切位点序列的 359 bp 的 F 蛋白基因 cDNA 片段。将此 359bp cDNA 片段经光敏生物素标记后, 即成 NDV-cDNA 探针。该探针能特异性地从感染的尿囊液中检测出 NDV 强毒株和疫苗毒株的基因组 RNA, 而不与 IBDV-dsRNA、AIBV-ssRNA、EDS76-dsDNA、MDV-dsDNA、FPV-dsRNA 及 AILV-dsDNA 发生交叉杂交反应。试验结果表明: 尽管该探针含有编码 F₀ 蛋白酶切位点序列的碱基顺序, 但它还是不能把 NDV 的强、弱毒株区分开。这说明 NDV 强、弱毒株比区域内的碱基存在着相当大的同源性。不过, 此探针对于 NDV 来说具有特异性, 这就为 NDV 的诊断技术开创了基因水平检测的新途径。

关键词 新城疫病毒, 聚合酶链反应 (PCR), cDNA 探针, 斑点杂交

新城疫 (Newcastle disease) 是鸡的一种既古老又危害十分严重的烈性传染病。世界各地的科学工作者对该病进行了大量而深入的研究, 发表的研究论文不计其数, 就其诊断方法而言, 已经先后建立了鸡胚中和试验^[1]、蚀斑中和试验^[2]、单向辐射免疫扩散^[3]、单向辐射溶血^[4]、琼脂扩散^[5]、酶联免疫吸附试验^[6]及气管切片免疫过氧化物酶试验^[7]等。由于目前多数国家禽类中存在着缓发型 NDV 毒株, 以及世界范围内使用活疫苗, 而以上诊断方法的阳性结果仅仅只能证明 NDV 感染。现在诊断 ND 的唯一确切明了的方法是病毒分离试验, 并且可为感染的病毒株初步定性。但这一方法明显不足之处是非常费时、费力。随着对 NDV 分子水平研究的不断深入, 人们已经发现: NDV 强毒株与弱毒疫苗株和无毒力株系对易感禽的致病性的差异主要在于其 F 糖蛋白的翻译后加工, 即 F 糖蛋白的前体分子——F₀ 被宿主细胞具胰蛋白酶样活性的蛋白酶裂解为 F1 和 F2, 产生由两个二硫键连结而成的多肽链^[8]。F1 的新氨基末端具极度疏水性而起“插入”肽的功能, 促进病毒颗粒与宿主细胞膜之间的融合^[9]。强毒株的 F₀ 分子能被多种蛋白酶裂解, 但弱毒株的 F₀ 分子的敏感性则很有限, 只能被特定的宿主细胞蛋白酶所裂解, 因而只对特定的宿主表现出毒力。R. L. Glickman 等^[10]测定并比较了 NDV 毒力株与无毒力株 F₀ 蛋白酶切位点的氨基酸残基顺序 (毒力株: —RRQK/RR↓F—, 无毒力株: —GRGGR↓L—) 和其相应的核苷酸顺序 (毒力株为—AGGAGACAGAA/GACGC↓TTT—, 无毒力株则为—GGGAGACAGGGGCCG↓CTT—)。我们应用聚合酶链反应 (PCR) 技术从 NDV-cDNA 文库^[11]中扩增 NDV F 基因

*本课题系深圳市科委科技三项经费资助项目。

**收稿日期 1994-01-18。

的第200位与558位之间共 359 bp 序列, 经光敏生物素标记后制成 NDV-cDNA 探针。通过检测试验发现, 此探针能从感染的鸡胚尿囊液中检测出 NDV 强毒株和疫苗毒株的基因组 RNA, 但不能把它们区分开来。不过, 它与禽类其他种类的病毒基因组 RNA 或 DNA 均不出现交叉杂交现象。这一结果与 V. Jestin 等^[13]应用 PCR 方法检测感染的尿囊液中 NDV-RNA 所得的结果相似。

1 材料与方 法

1.1 鸡胚与病毒 9 d 龄鸡胚购自正大康地(深圳)有限公司孵化场。NDV 强毒株来源于华南农大兽医系, NDV I 系与 La Sota 毒株以及鸡传染性法氏囊病病毒(IBDV)、鸡痘病毒(FPV)、鸡传染性支气管炎病毒(AIBV)、鸡传染性喉气管炎病毒(AILV)、鸡产蛋下降综合症病毒(EDS76)和 马立克氏病毒(MDV)均为本局中心检验室保存的疫苗毒株。除了 NDV 各株系和 AIBV 接种鸡胚外, 上述其他病毒均为细胞疫苗毒。

1.2 酶类、引物与试剂 *Taq* DNA 聚合酶为美国 Pharmacia Biotech 公司产品, 蛋白酶 K 为德国 Merck 公司产品。扩增用的两个 PCR 引物(引物 1:5'ATATCACCTCATCCCA3', 引物 2:5'CCGTCAGTGACCTCATG 3')在军事医学科学院二所马立人教授实验室合成。光敏生物素标记及检测试剂盒、四种 dNTPs、琼脂糖和硝酸纤维素膜均购自华美生物工程公司。

1.3 F 蛋白基因 359 bp cDNA 片段的体外扩增 基本上按照 J. Sambrook 等介绍的方法进行^[13]。即在一灭菌的 0.5-ml 微量离心管中加入 53 μ l 灭菌的 ddH₂O、10 μ l 10X PCR 缓冲液、16 μ l 1.25mmol/L dNTPs、10 μ l μ mol/L 引物 1、10 μ l 1 μ mol/L 引物 2 和 1 μ l 未克隆化的 NDV-cDNA (模板 DNA, 约 40ng), 盖紧管盖, 置 94 $^{\circ}$ C 水浴中加热 5 min, 加入 0.5 μ l *Taq* DNA 聚合酶 (5U/ μ L), 并在其上覆盖一层液体石蜡。然后进行扩增循环 (55 $^{\circ}$ C 退火 2 min、74 $^{\circ}$ C 延伸 3 min、94 $^{\circ}$ C 变性 1 min), 共循环 30 次, 最后一次循环的延伸时间为 8 min。扩增产物置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测 按常规的微量法进行。琼脂糖浓度为 2%, 溴化乙锭染色, 电泳图谱拍照。

1.5 扩增产物的纯化与标记 扩增产物的纯化按常规的苯酚/氯仿抽提法除去其中的酶蛋白, 然后用 2.5X 体积的预冷 EtOH 沉淀 359 bp cDNA 片段 (-20 $^{\circ}$ C 过夜)。按文献介绍的方法对其进行光敏生物素标记^[14]。

1.6 样品的处理与杂交

1.6.1 样品的处理: 分别吸取 870 μ l NDV 各毒株感染的尿囊液和 IBDV 细胞苗与 AIBV 尿囊液苗于相应的 1.5-ml 微量离心管中, 然后依次向各管中加入 100 μ l 10% 的 SDS、20 μ l 蛋白酶 K (10mg/ml) 和 10 μ l DEPC (Diethylpyrocarbonate), 于 50 $^{\circ}$ C 水浴中保温 15min, 其中向 IBDV 管加入 5 μ l 无 RNase 的 DNase (2U/ μ l), 继续置室温 (~20 $^{\circ}$ C) 下保温 30min。然后用 TE (pH 7.6) 平衡过的苯酚抽提 3 次, 再用氯仿/异戊醇 (24:1) 抽提 2~3 次; 向水相中加入 0.1X 体积的 3 mol/L NaAc (pH 5.2) 和 3X 体积的预冷 EtOH, 置 -70 $^{\circ}$ C 30min。随后将以上各管置微量离心机中全速离心 10min, 将 RNAs 沉淀物真空干燥后分别溶于 5 μ l 经 DEPC 处理过的 ddH₂O 中。所得的 RNA 样品经乙二醛变性^[15]后, 即可用于点样。FPV、MDV、EDS76 和 AILV 细胞苗分别冻融 4~5 次后, 离心

(5000r/min) 除去细胞碎片，所得上清液按上述蛋白酶K法提取其病毒基因组 DNA。不过，在其抽提过程中不加 DEPC，也不加无 RNase 的 DNase，将得到的病毒 DNA 沉淀直接溶于 10μl ddH₂O 中。

1.6.2 预杂交与杂交：将经乙二醛变性的病毒 RNA 样品和经煮沸变性的病毒 DNA 样品用点样器每点 1 μl 分别点到一张事先处理好的硝酸纤维素膜^[14]上，待硝酸纤维素膜上的样品干燥后，置 80℃ 真空干燥箱烤干 2 h。经去除乙二醛^[14]后，将该膜置预杂交液（50% 去离子甲酰胺、5X SSC、5X Denhardt's solution、50mmol/L SPB (pH 6.5)、5mmol/L EDTA 及 4 μg/ml 变性的鲑精 DNA）中于 42℃ 下预杂交 2 h。随后在杂交液（50% 去离子甲酰胺、3X SSC、1X Denhardt's solution、20mmol/L SPB (pH 6.5)、6% dextran sulphate、250ng/ml 变性的鲑精 DNA、0.1% SDS 和约 50ng/ml 新变性的 359 bp NDV-cDNA 片段探针）中于 50℃ 下杂交 12~18 h。

1.6.3 洗膜、封闭与显色：按文献^[14]介绍的方法进行。将显色后的硝酸纤维素膜在湿润状态下拍照。

2 结果与讨论

应用 PCR 技术从 NDV-cDNA 文库中扩增的蛋白基因 359 bp cDNA 片段如图 1 和图

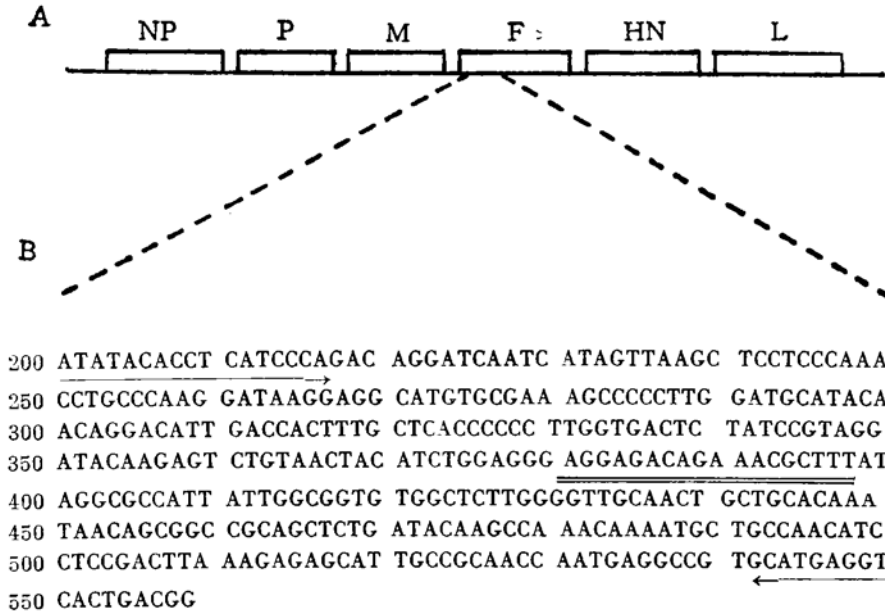


图 1 NDV 基因组 (cDNA) 的组织 (A) 与 PCR 引物的定位 (B)。图中虚线表示 359 bp cDNA 片段在 F 蛋白基因上的定位，带箭头的实线表示 PCR 引物的定位和扩增方向，其下标有双实线的序列表示 F₀ 酶切位点的编码序列。

Fig.1 Schematic diagram of organization (A) of the genome cDNA of NDV and localization (B) of PCR primers. The dotted lines show the localization of 359 bp cDNA fragment on the gene encoding fusion glycoprotein F. The primer localizations and amplification directions are shown by arrows. The sequence encoding the cleavage-activation site of F₀ is doubly underlined.

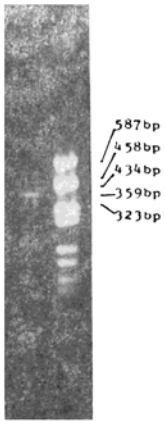


图2 PCR扩增产物(359 bp)的2%琼脂糖凝胶电泳图谱。图中箭头所示为359 bp所处的电泳带,分子量参照物为pGEM-3Zf (+) DNA-Hae III。

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified product of NDV-cDNA. The arrow points to 359 bp band. Molecular-weight marker made from pGEM-3Zf (+) DNA digested with Hae III.

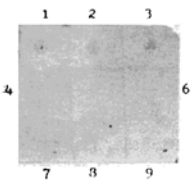


图3 NDV F蛋白基因359 bp cDNA片段探针的检测结果。图中1~9分别为NDV强毒株基因组RNA、I系疫苗基因组RNA、La Sota疫苗基因组RNA、IBDV-RNA、AIBV-RNA、EDS76-DNA、MDV-DNA、FPV-DNA和AILV-DNA的样品。

Fig. 3 Detection of 359 bp cDNA fragment probe on some viral genomes RNA or DNA. Samples: 1, RNA from a virulent strain of NDV; 2, RNA from Mukteswar strain of NDV; 3, RNA from La Sota strain of NDV; 4, IBDV-RNA; 5, AIBV-RNA; 6, EDS76-DNA; 7, MDV-DNA; 8, FPV-DNA; and 9, AILV-DNA.

2所示。由图2可见,只出现一条扩增带,说明该扩增反应是很特异的,并且其大小介于分子量参照物434bp与323bp之间。由于没有得到大小与其相当的分子量参照物,故其确切的大小还不能肯定,尚有待对其进行序列分析后才能最后确定。不过,据V. Jestin等^[12]对NDV 30株不同毒株F蛋白基因的315位与589位之间共275 bp的体外扩增实验发现:其

中间的27株均扩增出了 275 bp 的阳性 cDNA 片段 (90%); 只有 3 株发生了缺失突变, 其扩增产物小于 275 bp (230~250 bp)。因此, 从图 2 扩增产物所处的位置来看, 我们在实验中使用的国内强毒株的 F 蛋白基因该片段很可能没有发生缺失突变, 其核苷酸序列也很可能与已公布的国外强毒株的相似。因为我们所用的 PCR 引物是根据 NDV Texas G. B. 株 (一种速发型毒株) 的 F 蛋白基因核苷酸顺序^[15]设计的。

用光敏生物素标记的 NDV F 蛋白基因的 359 bp cDNA 片段探针, 能从感染的尿囊液中特异性检测出 NDV 强毒株和疫苗毒株 (I 系、La Sota) 基因组 RNA, 而不与禽类 FPV-DNA、IBDV-RNA、AIBV-RNA、EDS76-DNA、MDV-DNA、和 AILV-DNA 等发生交叉杂交反应, 检测结果如图 3 所示。由该结果可知, 我们使用的国内强毒株 F 蛋白基因该片段的核苷酸顺序与疫苗毒株——I 系和 La Sota 的基本相似, 因为此 cDNA 片段探针均可与它们发生同源性阳性杂交反应, 尽管提高杂交反应的温度 (55℃), 还是不能把强、弱毒株区分开来。另外, 我们还曾试验过扩增整个 F 蛋白基因 cDNA, 经光敏生物素标记后制成探针, 应用 F 基因 cDNA 探针的检测方法与上述的 359 bp 探针一致 (结果没有显示出来)。我们所得到的试验结果与已发表的 NDV F 蛋白基因的核苷酸顺序资料^[15~17]相符合。因为 NDV Texas G. B. 株与 Texas 株 F 蛋白基因的核苷酸差异率仅为 10.65%; 就其 F 基因的第 200 位与 558 位共 359 个碱基而言, 它们的差异率也只有 11.69%, 而且发生变化的核苷酸主要为碱基转换突变 (78.57%), 碱基颠换突变的仅占 21.43%。NDV Texas G. B. 株与 Beaudette C 株 F 基因的碱基同源性则更高, 达 99.47%, 仅仅只有 0.53% 的碱基差异率。这说明 NDV Texas G. B. 株与 Beaudette C 株的亲源性比 Texas 株的还要高。由此看来, NDV 各毒株之间的碱基同源性比较大, 这为制备 NDV-cDNA 探针提供了理论依据。但是, 由于同样的原因, 要制备能区分强、弱毒株的 NDV-cDNA 探针就显得比较困难。

参 考 文 献

- [1] Beard C W. Serologic procedures. In S. B. Hitchner et al. (eds). Isolation and identification of avian pathogens. Am. Assoc. Avian Pathol., Kennett Sqar, PA. 1980, 129~135.
- [2] Beard C W et al. Newcastle disease. In M. S. Hofstad et al. (eds). Diseases of poultry. 8th ed. Iowa State Univ Press, Ames. 1984, 452~470.
- [3] Chu H P et al. A single radial immunodiffusion test for antibodies to Newcastle disease virus. Avian Pathol, 1982, 11:227~234.
- [4] Hari Babu Y. The use of a single radial haem Olysis technique for measurement of antibodies to Newcastle disease virus. Indian Vet. J, 1986, 63:982~984.
- [5] Gelb J et al. Detergent-treated Newcastle disease virus as an agar gel precipitin test antigen. Poul. Sci, 1987, 66:845~853.
- [6] Rivetz B et al. Evaluation of a novel rapid kit for the visual detection of Newcastle disease virus antibodies. Avian Dis., 1985, 29:929~242.
- [7] Hamid H et al. Indirect immunoperoxidase staining for the Newcastle disease virus (NDV). Proc.

- 2nd Asian/Pacific Poultry Health Conf, Aust. Vet. Poultry Assoc, Sydney. 1988, 425~427.
- [8] Nagai Y et al. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology*, 1976, 72:494~508.
- [9] Richardson C D et al. Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of F1 or HA2 viral polypeptides. *Virology*, 1980, 105:205~222.
- [10] Glichman R L et al. Quantitative basic residue requirements in the cleavage activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. *J. Virol.*, 1988, 62:354~356.
- [11] 陈书琨等. 新城疫病毒 cDNA 文库的构建. *中国兽医科技*, 1992, 23(2):3~5.
- [12] Jestin V et al. Detection of Newcastle disease virus RNA in infected allantoic fluids by *in vitro* enzymatic amplification (PCR). *Arch. Virol.*, 1991, 118:151~161.
- [13] Sambrook J et al. *Molecular Cloning*. 2nd ed. CSH, USA 1989, 14.18~14.19.
- [14] 吴时友等. 光敏生物素标记的口蹄疫病毒 cDNA 探针的制备及其对口蹄疫病毒 RNA 检测的试验研究. *畜牧兽医学报*, 1991, 22(4):365~370.
- [15] Schaper U M et al. Nucleotide sequence of the envelope protein genes of a highly virulent, neurotropic strain of Newcastle disease virus. *Virology*, 1988, 165:291~295.
- [16] Taylor J et al. Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox recombinant confers protection in chickens. *J. Virol.*, 1990, 64(4):1441~1450.
- [17] Chambers P et al. Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus. *J. gen. Virol.*, 1986, 67:2685~2694.

DETECTION OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS RNA IN INFECTED ALLANTOIC FLUID WITH PHOTOBIO TIN LABELED cDNA PROBE

Chen Shukun, He Yunsheng, Li Guandi, Zhong Anqing
(Shenzhen animal and plant quarantine service of P. R. China)

Abstract

The photobiotin labeled cDNA probe, which was made up with 359 bp sequence, lying in the gene encoding the fusion glycoprotein F for a virulent strain, amplified by polymerase chain reaction (PCR) from NDV-cDNA gene library, was studied for detecting NDV-RNA in infected allantoic fluids. Preliminary results show that the probe could specially detect the RNA from a virulent strain and two vaccine strains of NDV using dot-blot hybridization on nitrocellulose membrane. Control experiments revealed that it could not hybridize with dsRNA from infectious bursal disease virus (IBDV) of poultry, ssRNA from avian infectious bronchitis virus (AIBV), dsDNA from egg drop

syndrome 1976 (EDS-76), dsDNA from Marek's disease virus (MDV), dsDNA from fowl pox virus (FPV), and dsDNA from avian infectious laryngotracheitis virus (AILV). Although the 359 bp fragment probe spans the sequence encoding the proteolytic cleavage site of the F₀ protein, it could not differentiate the genome RNA of virulent strain from the one of avirulent strain. It is probable that there is base-homology at least in the region between virulent and avirulent strains. As the same reason, the probe is very specific for NDV-RNA.

Key words Newcastle disease virus (NDV), Polymerase chain reaction (PCR), cDNA probe, Dot-blot hybridization