

光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

吴时友 杨承谕

(农业部动物检疫所, 青岛)

陈书琨 沈正达 王锡祯

(甘肃农业大学兽医系, 兰州)

摘 要

本文首次报道了利用pF1034质粒制备FMDV O型特异性探针, 并通过PCR反应扩增FMDV O₁K株病毒基因组的第2962位与3071位之间共110bp序列, 制备了能检测O型、A型和亚洲 I 型FMDV RNA的群(组)特异性探针。用硝酸纤维素膜斑点杂交试验表明, 二者均能检测出10pg水平的O₁K毒株的纯RNA, 但前者只与O型FMDV RNA杂交, 与A型及亚洲 I 型FMDV RNA无交叉杂交现象; 而后者则能与O型、A型和亚洲 I 型的FMDV RNA发生杂交反应。对照试验显示: 此两种探针与SVDV ssRNA、BTV dsRNA、EHDV dsRNA、DHV ssRNA、PRV DNA、乳腺组织细胞RNA、BHK₂₁克隆13细胞 RNA及DNA等均不出现交叉杂交现象, 但与IBR DNA有假阳性杂交反应。

关键词 FMDV, PCR反应, 探针, 斑点杂交

口蹄疫(Foot and Mouth Disease, FMD)是一种世界范围的偶蹄动物烈性传染病, 不仅给畜牧业造成巨大的经济损失, 而且严重地威胁着人类健康。由于传统的各种血清学诊断方法费时费力、灵敏度不够高, 而且无法检测出污染过口蹄疫病毒(Foot and Mouth Disease Virus, FMDV)的畜产品及其加工、制成品等原因, 已远远不能满足我国目前口岸检疫工作的需要。最近国外有人报道利用含FMDV复制酶基因cDNA片段制成了能检测A型、O型和C型FMDV RNA的³²P标记核酸探针^[1]。但由于这种放射性标记探针存在半衰期短、所需设备复杂等问题, 因而未能广泛地应用于临床。我们从FMDV基因组入手, 应用pF1034质粒首次成功地研制出了生物素标记的, 能检测FMDV型特异性的O型探针, 以及通过PCR(polymerase chain reaction)反应扩增FMDV O₁K株基因组的第2962位与3071位之间共110bp序列, 制备了能检测O型、A型和亚洲 I 型FMDV RNA的群(组)特异性探针。此两种探针均能检测出低至10pg水平的O₁K毒株之RNA。从样品处理到最后观察结果只需35~40小时, 同时在普通实验室内就能进行检测试验, 从而使此法应用于各边境口岸对FMDV的检测成为可能。

*本研究曾先后得到农业部动物检疫所中心实验室孙书华同志、蒋正军同志, 病毒室封启民副研究员、李昌琳副研究员和张瑞珍副研究员的帮助, 在此一并致谢。

**本文于1990年1月10日收稿。

材料与方 法

一、材料 pF1034质粒,由西德的Hofschneider, P.H.教授惠赠。O型、A型及亚洲 I 型FMDV和猪水泡病病毒,由陈家庆研究员惠赠。BHK₂₁克隆 13 细胞,由农业部动检所病毒室提供。Pst I、Bio-11-dUTP、dATP、dGTP、dCTP、dTTP和 RNase 均购自华美生物工程公司。光敏生物素试剂盒为澳大利亚 Bresatec 公司产品。Taq polymerase为英国Biorec公司产品。“上、下游”各19聚寡核苷酸引物(“上游”引物GACGCCCGTGC GGAAACCA “下游”引物ACGTCCGTGTGTTGGCGCC),由宫云浩同志协助合成。硝酸纤维素(NC)膜为浙江黄岩人民化工厂产品。3日龄乳鼠购自青岛市药品检验所。

二、常规方法扩增pF1034质粒DNA及FMDV O型特异性探针的制备

(一)pF1034质粒转化*E. coli* C600菌株:按文献〔2〕介绍的方法进行。

(二)pF1034质粒的扩增与回收:扩增按以前报道的方法进行〔3〕;根据文献介绍的方法进行pF1034质粒DNA的分离和纯化〔4,5〕。

(三)FMDV-cDNA 1034片段的回收:把回收的pF1034质粒进行Pst I限制性酶切〔6〕,然后按文献介绍的方法从琼脂糖凝胶上回收FMDV-cDNA片断〔7〕。

(四)pF1034质粒DNA探针及FMDV-cDNA 1034片段探针的标记,按文献〔8〕推荐的方法进行光敏生物素标记。

三、应用PCR反应体外酶促扩增FMDV-cDNA寡核苷酸片段及FMDV群(组)特异性探针的制备

(一)编码FMDV O₁K株V_{p3}蛋白C-末端与V_{p1}蛋白N-末端的110bp寡核苷酸片段的酶促扩增:按文献推荐的方法进行〔9〕。

(二)110bp寡核苷酸探针的标记:分别进行光敏生物素标记〔8〕和在末端脱氧核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotide transferase, TdT)催化下的Bio-11-dUTP之3'末端标记〔10〕。

四、FMDV的繁殖与分离纯化及其RNA的提取

(一)从感染致死的乳鼠之胴体中提取FMDV RNA:无菌操作取发病死亡(约在接毒后25小时左右死亡)的4日龄乳鼠之胴体,经研磨后按文献介绍的方法提取含FMDV RNA的粗制品,作杂交样品用〔11〕。

(二)从接毒的BHK₂₁克隆13细胞培养物中分离纯化O₉K毒株的RNA:1.按常规方法培养BHK₂₁克隆13细胞,待其长成单层后,弃去营养液,并用Hanks液洗涤细胞一遍;然后按1%的比例接种10倍稀释的乳鼠组织毒(4,000rpm离心10分钟后所得的上清液),并让其在37℃吸附1小时,再加入维持液,随后置37℃培养至CPE达90%以上时,收集培养物于离心管中。2.FMDV及其RNA的分离与纯化,按以前报道的方法〔1,12〕以蔗糖线性梯度离心法分离、纯化FMDV及其RNA。

五、细胞感染与毒价的测定

(一)FMDV O₉K毒株接种BHK₂₁克隆13细胞:其方法见前述。

(二)毒价的测定:按文献〔13〕介绍的方法用微量塑料细胞培养板测定收毒时的

BHK₂₁克隆13细胞悬液之TCID₅₀。

六、样品的处理与杂交

(一)样品的处理:组织病料经研磨或细胞样品经冻融3~4次后,按文献^[1]介绍的方法进行处理。不过,在用1%的Sarkosyl溶解FMDV RNA等核酸沉淀后,再分别用苯酚-氯仿(1:1)和氯仿-异戊醇(24:1)抽提一次。所得的RNA样品经乙二醛变性^[14]后,即可用于点样。

(二)预杂交与杂交:把变性后的FMDV RNA用点样器每点1 μ l点到事先用10 \times SSC液浸泡过夜,然后又晾干了的NC膜上,待NC膜上的样品干燥后,置80 $^{\circ}$ C的真空干燥箱中烤干2小时。经去除乙二醛^[14]后,按文献介绍的方法在42 $^{\circ}$ C下预杂交2小时^[1],随后在杂交液(3 \times SSC、50% HCONH₂、5 \times Denhardt、4% dextran sulphate、0.1% SDS、100 μ g/ml酵母RNA和约40ng新煮沸变性的探针DNA)中于44~45 $^{\circ}$ C下杂交15小时。

(三)洗膜、封闭与显色:按文献推荐的方法进行^[8]。

结 果

由pF1034质粒及其Pst I酶切下来并回收的FMDV-cDNA1034片段经光敏生物素标记制成的探针,通过斑点杂交试验(表1,图1a)表明,它们只能与O型FMDV RNA进行杂交,而不能与A型和亚洲I型FMDV RNA进行杂交。在上述实验条件下它能检测出10pg水平的O₉K毒株之RNA(图2)。

表1 三种光生物素标记的探针对O型、A型和亚洲I型FMDV RNA的定性检测

RNA来源	O ₉ K	A ₂₂ Iraq	Asia I
探 针			
pF1034	+	-	-
cDNA1034片段	+	-	-
110bp	+	+	+

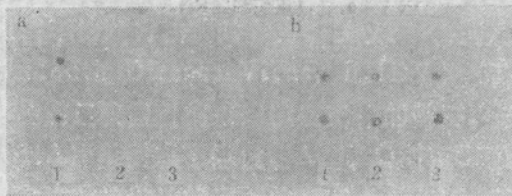


图1 用pF1034质粒探针(a)和110bp寡核苷酸探针(b)对O型、A型和亚洲I型FMDV RNA检测的斑点杂交图
图中1列为O₉K RNA样品,2列为A₂₂Iraq RNA样品,3列为亚洲I型FMDV RNA样品。



图2 用pF1034质粒探针与纯化的O₉K毒株之RNA的斑点杂交图。
图中自左至右每斑点的上样量分别为100ng、1ng、100pg、10pg、1pg和0.1pg。

用PCR反应扩增的110bp寡核苷酸片段,经3%的琼脂糖凝胶电泳和20%的PAGE检测,凝胶图谱上均只出现单一的、且比较规整的一条带(详情另文发表),说明此PCR反应产物为高度纯净的110bp片段。由它经光敏生物素标记和TdT催化进行的3'末端标记而成的寡核苷酸探针,经在NC膜上进行的斑点杂交试验,结果显示它们均能

与O型、A型和亚洲I型FMDV RNA进行杂交(图1b,表1),并且都能检测出10pg水平的O₉K毒株之RNA(参见图2)。

经测定,接种O₉K毒株的BHK₂₁克隆13细胞培养至CPE达90%以上时,此时的细胞悬液之TCID₅₀/0.05ml = 4。我们比较了用BHK₂₁克隆13细胞接种与斑点杂交两种方法检测FMDV的灵敏度,其结果如表2所示。

对照试验(表3)表明:光敏生物素标记的pF1034质粒探针、cDNA1034片段探针和110bp寡核苷酸探针,它们都不能与SVDV ssRNA、BTV dsRNA、EHDV dsRNA、PRV DNA、DHV ssRNA、乳鼠组织细胞RNA、BHK₂₁克隆13细胞RNA和DNA出现交叉杂交现象,但与IBR DNA有假阳性杂交反应。

表2 细胞感染与斑点杂交两种方法
检测FMDV灵敏度的比较

方法 细胞悬液。	细胞感染**	斑点杂交
10 ⁻¹	+	+
10 ⁻²	+	+
10 ⁻³	+	+
10 ⁻⁴	+	+
10 ⁻⁵	+	+
10 ⁻⁶	-	+
10 ⁻⁷	-	+
10 ⁻⁸	-	-
10 ⁻⁹	-	-

*: 为收毒时(达90%以上CPE)的细胞悬液,进行10倍递增稀释。每一稀释度样品取50μl分别接种BHK₂₁克隆13细胞(微量细胞培养板)或取100μl分别进行样品处理。然后再吸取1/2量点膜进行杂交试验。

** : 接种的4孔,有一孔出现病变的,均判定为阳性。

表3 三种光敏生物素标记探针的特异性
检测试验

RNA或 DNA 探针	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pF1034	-	-	-	-	-	+	-	-	-
cDNA 1034片段	-	-	-	-	-	+	-	-	-
110bp	-	-	-	-	-	+	-	-	-

注: 1.SVDV(猪水泡病毒)ssRNA 2.BTV₃(蓝舌病毒Ⅲ型)dsRNA 3.EHDV(鹿流行性出血热病毒)dsRNA 4.PRV(伪狂犬病病毒)DNA 5.DHV(鸭肝炎病毒)ssRNA 6.IBR(牛传染性鼻气管炎病毒)DNA 7.BHK₂₁克隆13细胞RNA 8.BHK₂₁克隆13细胞DNA 9.乳鼠组织细胞RNA

讨 论

在我们的实验条件下,应用光敏生物素标记的pF1034质粒探针和经PCR反应扩增的110bp寡核苷酸探针均能检测出不能使乳鼠发病致死或在接种后2小时内使其中毒死亡的陈腐材料(1981、1982年分别保存下来的A型和亚洲I型FMDV乳鼠组织毒)中存在的FMDV RNA,而目前沿用的所有查毒方法都无法做到这一点。

我们的实验结果与Rossi, M.S.等人所报道的结果基本相符^[1]。但由于我们改进了RNA的变性方法和杂交液的成分,使pF1034质粒探针和110bp寡核苷酸探针的最低检出量比他们的约高10倍(达10pg水平)。从表2还可看出,斑点杂交试验的灵敏度约比细胞感染法高出100倍,而他们的乳鼠接种试验的敏感性还略高于斑点杂交试验,这可能与FMDV RNA的变性方法和杂交条件密切相关。此两种探针与IBR DNA之间的假阳性杂交现象,很可能是由于杂交温度(44~45℃)偏低造成的非同源性杂交。因为

在通常的杂交温度(42℃)下,它们与BTV₃ dsRNA、PRV DNA和乳鼠组织细胞RNA也显示出假阳性杂交现象,但把杂交温度提高到44~45℃时便可消除。最近Salimans, M.M.M等人报道的斑点杂交温度为55℃,而他们所使用的杂交液的成分^[15]与我们的几乎相似。若把杂交温度也提高到55℃,能否消除IBR DNA的假阳性杂交现象,有待实验证实。

通过PCR反应扩增FMDV O₁K株基因组的第2962位与3071位之间共110bp的cDNA寡核苷酸序列,其中前15个碱基为与VP₃蛋白基因的3'末端互补的核苷酸,剩余的95个碱基为与VP₁蛋白基因的5'末端互补的核苷酸序列。它是编码主要抗原蛋白(VP₁蛋白)基因中比较恒定的碱基顺序。根据现有的资料统计,它与C₁ Santa Pau、C₃ Indial、A₁₂、和A₁₀61毒株的同源性分别为71.82%、74.55%、80.91%和80.00%。从我们所得出的结果来看,此110bp的核苷酸顺序与亚洲I型FMDV RNA的同源性至少也在80%以上。因从同样实验条件下的显色斑点上看,它的颜色似乎比A型的还要稍深一些。由于我们目前没有C型及南非I、II、III型FMDV毒种,尚未用此110bp寡核苷酸探针对其基因组RNA进行检测研究,此探针对它们是否有效,也有待进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Rossi, M.S.et al.,1988.Detection of Foot-and-Mouth disease virus with DNA probes in bovine esophageal-pharyngeal fluids.Arch.Virol., 99: 67~74.
- [2] Maniatis, T.et al.,1982.Molecular cloning.250~251.CSH, U.S.A.
- [3] Maniatis, T.et al.,1982.Molecular cloning.88.CSH, U.S.A.
- [4] Pritchard, R.H.et al.,1985.Basic cloning techniques.62.Blackwell Scientific Publications, U.S.A.
- [5] 蔡武城等,1983,生物化学实验技术教程,159~166.复旦大学出版社。
- [6] 蔡良瑛主编,1987,核酸研究技术(上册),90~91.科学出版社。
- [7] 王华岩、贾峰,1988,一种从琼脂糖凝胶上快速回收DNA片段的简易方法。生物化学与生物物理进展, 15(6): 467~468。
- [8] 澳大利亚Bresatec公司Photobiotin产品使用说明书,1988。
- [9] 英国Biores公司Taq polymerase产品使用说明书,1989。
- [10] Jo-Anne R. Dillon, et al.,1985. Recombinant DNA methodology.74~75.John Wiley&Sons.
- [11] 蔡良瑛主编,1987,核酸研究技术(上册),60.科学出版社。
- [12] Grubman, M.J.et al.,1979.Foot-and-Mouth disease virion RNA: Studies on the relation between the length of its 8'-poly(A)segment and Infectivity.Virology, 97: 22~31.
- [13] 殷震,刘景华主编,1985,动物病毒学,400~401.科学出版社。
- [14] 蔡良瑛主编,1987,核酸研究技术(上册),236~237.科学出版社。
- [15] Salimans,M.M.M.et al., 1989.Rapid detection of human parvovirus B19 DNA by dot-hybridization and the polymerase chain reaction.J.Virol.Meth., 23: 19~28.

DETECTION OF FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS
WITH PHOTOBIO TIN LABELED cDNA PROBES

Wu Shiyou, Yang Chengyu

(*National Animal Quarantine Institute of Agricultural
Ministry, Tsingdao*)

Chen Shukun, Shen Zhengda, Wang Xizhen
(*Department of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural
University, Lanzhou*)

Abstract

Two photobiotin labeled cDNA probes, one was prepared from pF1034, and the other was made up with 110 bp sequence between 2962 and 3071 base of O₁K strain genome amplified by polymerase chain reaction (PCR), were studied for detecting FMDV RNA. Preliminary results show that the two probes could detect as little as 10 pg of the pure RNA from O₉K strain of FMDV using dot-blot hybridization on nitrocellulose membrane, but the former could only hybridize with the RNA from O type of FMDV, and what is more, there were no across-hybridization reactions with the RNA from A and Asia I types of FMDV, the latter could hybridize with the RNA from O, A and Asia I types of FMDV. Control experiments revealed that the two probes could not hybridize with ssRNA from swine vesicular disease virus (SVDV), dsRNA from bluetongue virus (BTV), dsRNA from epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) of deer, dsRNA from duck hepatitis virus (DHV), DNA from pseudorabies virus (PRV), RNA from the cells of suckling mice, and the RNA and DNA from BHK₂₁ clone 13 cells. There was pseudopositive hybridization with DNA from infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV).

Key words Foot and mouth disease virus (FMDV), Polymerase chain reaction (PCR), Probe, Dot-blot hybridization