

牛病毒性腹泻病毒基因组 cDNA 文库的构建

糜克永¹ 玉 蕾¹ 朱 勇¹ 任向远² 杨玉莹²¹(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)²(内蒙古畜牧科学院, 呼和浩特 010030)

S852.653

A **摘要** 以牛病毒性腹泻病毒(BVDV)InL株的基因组RNA为模板,经逆转录酶作用,合成第一链cDNA,再以RNase/H与DNA聚合酶I联合作用合成ds cDNA,并以dC同聚物尾化。pUC8 DNA在Pst I酶解后,以dG同聚物尾化,两者退火构成重组质粒,转化到*E. coli* JM101受体菌中。另以 γ -³²P-ATP标记BVDV RNA制备探针,通过菌落原位杂交筛选重组子。酶切分析表明重组质粒插入片段最长接近12kb,该片段含有EcoR I, Hind III, BamH I的酶切位点,此cDNA文库基本上包括了BVDV基因组。

关键词 牛病毒性腹泻病毒, 逆转录, 基因克隆, cDNA 文库

基因组;

牛病毒性腹泻病毒(BVDV)是引起牛羊病毒性腹泻的重要病原,研制该病毒基因工程疫苗有重要经济价值。BVDV cDNA文库的构建将为此提供所需要的免疫原性蛋白基因。

美国分子遗传公司M. Collett^[3,4]对BVDV NADL分离株的核苷酸序列,分子克隆及编码各类蛋白的基因作了研究,说明BVDV基因组含有编码449kDa的阅读框,其中一些短片段在大肠杆菌中表达的融合蛋白,其免疫血清能与病毒产生免疫沉淀反应。

我们从分离的BVDV InL株^[5]中,制备BVDV基因组,作了类似的研究,获得了BVDV基因组的cDNA文库,本文将叙述这一研究结果。

材料与amp;方法

- 1 *E. coli* pUC8 质粒菌及受体菌 JM101 由本实验室提供。
- 2 BVDV InL 株 本实验室保存。
- 3 酶制剂, λ DNA, 缺口翻译药合, Xgal, IPTG 均为华美公司产品。
- 4 电泳缓冲液 为1 \times TBE, 0.089mol/L Tris-硼酸, 0.001mol/L EDTA 钠盐, pH8.3。
- 5 BVDV RNA 的提取与纯化 取BVDV InL株感染的病牛犊肝, 肾病料, 加入TNE缓冲液(0.01mol/L Tris-HCl, 0.1mol/L NaCl, 0.001mol/L EDTA 钠盐, pH7.4)高速匀浆, 反复冻融, 使细胞破碎, 病毒粒子释放, 悬浮液以离心机(GL20型, NO3转子)于10000转/分离心30分钟, 取上清液用10000Da截流分子量的中空纤维滤膜超滤, 除去10000Da分子量以下蛋白质及核酸分子。获得的病毒浓缩液按Brock^[6]方法进行密度梯度离心, 获得纯化的病毒。在冰浴条件下, 用STE缓冲液饱和的苯酚抽提BVDV RNA, 再用2mol/L LiCl除去小分子核酸, 经此法处理的BVDV RNA中含有少量逆转录需要的引物RNA。
- 6 pUC8 质粒的提取与纯化 按常规方法^[3]扩增, 并用碱法提取, 电泳纯化制取pUC8的CCC DNA和OC DNA

本文于1993年10月22日收到, 1994年10月31日修回

质粒。

7 **pUC8 质粒的 PstI 酶消化及 dG 尾化** 将上述提纯的 pUC8 ccDNA 及 CCC DNA 约 100 μ g, 加入 25 μ l 酶解缓冲液, Pst I 酶 2 μ l, 于 37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时, 以 STE 饱和的苯酚抽提 DNA, 获线性 DNA 沉淀。然后按 Guber^[8]方法加入接尾缓冲液及 20 单位末端脱氧核糖核苷酰转移酶, 于 37 $^{\circ}$ C 反应 15 分钟后产生 dG 聚合片段接尾的 pUC8 质粒, 该质粒经乙醇漂洗沉淀以后, 真空干燥备用。

8 **BVDV 双链 cDNA dC 尾化** 按 Collett^[3]方法合成第一条 cDNA 链。第二条 cDNA 链合成按 Guber^[8]方法进行, 并取 2—3 μ g 双链 cDNA, 加入接尾缓冲液, dC 及 2 μ l 末端脱氧核糖核苷酰转移酶, 在 22 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟, 65 $^{\circ}$ C 反应 10 分钟, 反应以乙醇沉淀, 漂洗, 真空干燥备用。

9 **BVDV cDNA 的克隆** 按齐义鹏^[9]所述方法将上述尾化的 pUC8 质粒与 BVDV ds cDNA 沉淀混合, 加入退火缓冲液, 构建重组 DNA, 并转化到 JM101 受体菌中。转化后, 在含有 2% 琼脂的 AmP LB 平板及含有 AmP、2% Xgal 和 0.1mol/L IPTG 的 0.6% 琼脂平板上, 筛选阳性克隆菌株。对于已筛选出的几十个阳性克隆菌株, 按 Grunstein^[10]方法, 筛选出含 BVDV cDNA 的克隆菌株。方法是取 20 μ g BVDV RNA 在 T4 多核苷酸激酶作用下, 标记 γ -³²P-ATP。克隆菌株的菌落转移到硝酸纤维素膜, 经过蛋白酶 K 消化蛋白的处理, 使其 DNA 固定在膜上。上述的 BVDV RNA 探针对后者进行 Dot blot 杂交于 -20 $^{\circ}$ C, 放射自显影 7 天, 取出显影, 黑点相应的菌落为含 BVDV cDNA 插入片段的克隆菌株。

10 **重组质粒的核酸分子杂交鉴定** 由含有 BVDV cDNA 插入片段的菌体中提取质粒, 应用缺口翻译药盒标记 α -³²P-dC TP 后, 分别与 BVDV 感染的牛核脾肝提取的核酸, 在硝酸纤维素膜上进行 Dot blot 杂交, 以此进一步判定重组质粒 DNA 中是否含有 BVDV cDNA。

11 **重组质粒 DNA 限制性内切酶位点的测定** 取其量 100 μ g 以无水乙醇充分混悬后, 迅速分装到 4 支 Eppendorf 管中, 离心, 弃去乙醇, 真空干燥。然后按华美公司产品介绍的方法分别加入 EcoR I, Hind III, BamH I, Pst I 及 20 μ l 相应缓冲液, 于 37 $^{\circ}$ C 反应 4 小时, 加入苯酚-氯仿(1:1)抽提 DNA。DNA 酶解片段以 0.8% 琼脂糖电泳, 溴化乙锭染色, 观察电泳结果。

结果与讨论

1 **BVDV RNA 纯化** 纯化后 BVDV RNA 电泳后呈现一条核酸带, 如图 1 所示。1975 年 Pritchett^[11]从 BVDV 提出 38S, 31S 和 24S 三个 RNA 组分, 他认为 31S 和 24S 可能由 38S RNA 降解而来。采取其方法, 也可分离出三个 RNA 组分。但是采用 Brock^[6]方法提取 RNA, 仅有一种 RNA 组分, 与 Brock 的结果相同。Purchio^[12]解释这一现象时, 认为 BVDV 为一条核苷酸链, 但存在薄弱环节, 由于提取条件剧烈, 易被降解产生另两组分。Collett^[3]测算 BVDV RNA 全长为 12—13kb。图 1 中 BVDV RNA 电泳位置比含其 cDNA 线性重组质粒 DNA 片段偏高, 是因为同样长度的核苷酸片段, 单链比双链的电泳速度偏低, 此结果与 Gary^[13]描述 SV40 核酸电泳行为一致。

2 **BVDV RNA 的 cDNA 克隆与鉴定** 我们用 RNA 病毒基因组, 可以利用细胞小分子 RNA 引导逆转录的原理合成了 cDNA。尾化 pUC8DNA 与尾化的 BVDV ds cDNA 混合退火, 并经 T4 DNA 连接酶作用构建重组 DNA, 转化到 JM101 受体菌以后, 由于插入外源 DNA 而致 pUC8 中半乳糖苷酶基因破坏。不能作用于 Xgal 产生蓝色反应, 从而筛选出白色阳性克隆菌落。

标记 γ -³²P-ATP 的 BVDV RNA 探针与重组质粒菌落核酸分子原位杂交结果如图 2 所示。显影后出现黑色小点, 表明含有 BVDV cDNA 的克隆株菌落。这些菌株的 DNA 与标记的 γ -³²P-ATP 的 BVDV RNA 进行 Dot blot 杂交结果如图 3 所示, 黑色斑点为阳性, 说明这些菌株含有 BVDV cDNA 插入片段, 反之为不含有其插入片段的菌株。以阳性反应的 A₃ 菌株扩大培养, 提

取质粒 DNA,经缺口翻译标记 α - 32 P-dCTP 后与感染 BVDV 的牛犊肝脾及未感染的健牛犊肝脾提纯的核酸进行 Dot blot 杂交,前者为阳性,后者为阴性,如图 4 所示,结果进一步确定该株重组质粒中含有 BVDV cDNA。

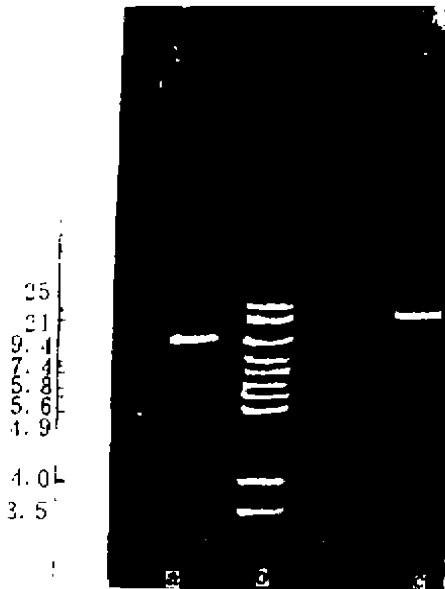


图 1 BVDV RNA,电泳纯化后的线性重组质粒 DNA,

λ DNA 酶解片段电泳结果,1%琼脂糖

- a. A₃ 克隆株线性重组质粒 DNA.
- b. λ DNA Hind III 与 EcoR I 酶解片段
- c. BVDV RNA

Fig 1 Electrophoretic analysis results of 1% agarose

- a. Linear recombinant plasmid DNA of colony A₃
- b. λ DNA-Hind III and EcoR I fragments
- c. BVDV RNA

图 2 γ - 32 P-ATP 标志的 BVDV RNA 与阳性克隆菌落重组质粒 DNA 的原位分子杂交

黑点,示含有 BVDV cDNA 插入片段的克隆菌落

Fig 2 *In situ* hybridization of the recombinant colonies with γ - 32 P-ATP labeled BVDV RNA Dark dots showing the positive colonies which contain BVDV cDNA inserts.

表 1 A₃ 克隆菌重组质粒 DNA 酶解片段长度

Table 1 Lengths of digested fragments of the A₃ recombinant plasmid DNA

限制性内切酶 Restriction enzymes	酶解片段长度(kb) Length of digestive fragments (kb)		
	EcoR I	5.2	3.8
Hind III		11.6	2.0
BamH I	5.8	5.2	2.8
Pst I	8.4	3.0	2.0

3 重组质粒 DNA 酶切分析 以 Pst I 酶解不同克隆株中重组 DNA,其插入片段的 cDNA 从 3kb 到 12kb 长度不等。含最大 cDNA 片段菌株 A₃,其电泳如图 5 所示,参照标志的 λ DNA 酶切

片段碱基对长度,计算各种酶切片大小如表1所示,其各个酶切片总和在12kb到13kb,接近资料报道的BVDV cDNA插入片段的总长度^[3]。

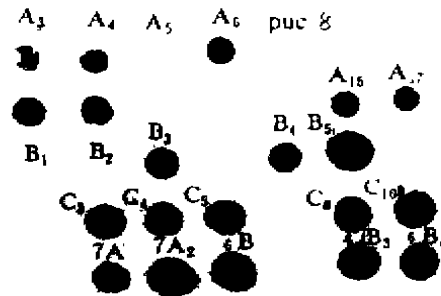


图3 α -³²P-ATP 标志的 BVDV RNA 与克隆菌中提取的质粒 DNA 分子杂交的结果。

黑色,示阳性结果

Fig 3 Hybridization analysis of the recombinant plasmid DNA with α -³²P-ATP labeled BVDV RNA. Dark dots, showing positive results.



图4 α -³²P-dCTP 标志的 A₃ 克隆菌重组 DNA 与健康 and 感染 BVDV 的牛脾脏中提取的 RNA Dot blot 杂交结果

a. 健康牛脾样品; b, c, d 病牛脾样品

Fig 4 Dot blot hybridization analysis of the RNA extracted from the spleens of BVDV-infected and healthy calves, with the α -³²P-dCTP labeled plasmid DNA extracted from recombinant A₃.

a. sample of the healthy calf; b, c, d. samples of the calves infected with BVDV.

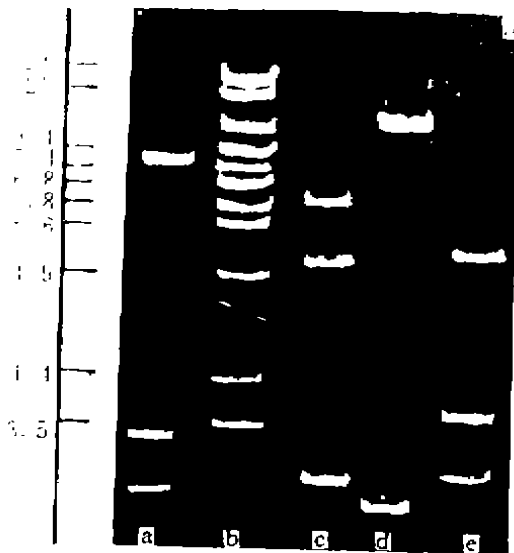


图5 A₃ 克隆菌重组 DNA 酶解片段的电泳结果,1%琼脂糖

a. Pst I 酶解片段; b. λ -DNA 的 Hind III 与 EcoR I 酶解片段; c. BamH I 酶解片段; d. Hind III 酶解片段; e. EcoR I 酶解片段

Fig 5 Restriction endonuclease analysis of A₃ recombinant plasmid DNA (1% agarose) a. Pst I; b. λ -DNA Hind III - EcoR I marker; c. BamH I; d. Hind III; e. EcoR I

综上所述,我们建立的克隆株含 BVDV cDNA 的插入片段几乎相当 BVDV RNA 的全长,因此该 cDNA 文库包括了 BVDV 大部分遗传信息。

参 考 文 献

- 1 王蕾,张国芳,张恒顺.内蒙地区羔羊下痢病毒病原调查. 内蒙古畜牧科学, 1989, 2: 31—38
- 2 向秀成,糜克永,王蕾,等. 湖南省牛病毒性腹泻/粘膜病的首次诊断及调查研究. 湖南畜牧兽医, 1988, 2: 15—16
- 3 Marcs Collett, Ruby Larsson. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus Bovine viral diarrhea virus. *Virology*, 1988, 165: 191—199
- 4 Marcs collett, Ruby larsson, B E susank, *et al.* Protein encoded by Bovine viral diarrhea virus; The genomic organization of a pestivirus. *Virology*, 1988, 165: 200—208
- 5 糜克永,丁清泉,王蕾,等. 牛病毒性腹泻病毒的初步鉴定. 病毒学杂志, 1987, 1: 66—75
- 6 Brock K V, D A Brian, B T Ronse, *et al.* Molecular cloning of complementary DNA from a pneumopathic strain of Bovine viral diarrhea virus and its diagnostic application. *J Vet Res*, 1988, 52: 451—457
- 7 齐义鹏,黄永秀,梁明山编著. 基因工程原理和方法. 重庆: 四川大学出版社, 1988: 180—183
- 8 Gubler V, Hoffman B J. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, 1983, 25: 263—269
- 9 齐义鹏,黄永秀,梁明山编著. 基因工程原理和方法. 重庆: 四川大学出版社, 1988: 180—192
- 10 Michael Grunstein, Davids Hogness. Colony hybridization; A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc Nat Acad Sci, USA*, 1975, 72(10): 3961—3965
- 11 Pritchett R F, Manning JS, Zee YC, *et al.* Characterization of Bovine viral diarrhea virus RNA. *J Virol*, 1975, 15: 1342—1347
- 12 Purchio AF, Lasso R, Collett MS. Characterization of virus specific RNA synthesised in bovine cells infected with bovine viral diarrhea virus. *J Virol*, 1983, 48: 320—324
- 13 Gary K Memaster, G Carmichael. Analysis of single and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gel by using glyoxal and acridine orange. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1977, 74(11): 4835—4838

Construction of a cDNA Library of the Bovine Viral Diarrhea Virus Genome

Me Keyong¹ Wan Qian¹ Zhu Yong¹ Ren Xianyuan² Yan Yuying²

¹(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

²(The Academy of Science of Animal Husbandry of Inner Mongol Autonomous Region, Huhhot 010030)

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) InL genomic RNA was used as a template to synthesize cDNA by reverse transcriptase. The ds cDNA was synthesized by RNase H-DNA polymerase, and was inserted into the Pst I site of the pUC8 vector by dC-dG homopolymeric tailing and ligation. After being transformed to *E. coli* JM101, the recombinants were screened by *in situ* hybridization with γ -³²P-ATP labeled purified BVDV RNA. Restriction enzyme analysis showed that the largest cDNA insert was 12kb—13kb, it almost covered the BVDV genome.

Key words BVDV, Reverse transcription, Gene cloning, cDNA library