

Zeitschrift: Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 138 (1996)

Heft: 2

Artikel: Der Einsatz der PCR zum Studium muriner Coronaviren

Autor: Homberger, F.R. / Zhang, L. / Thomann, P.E.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-589338>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 30.01.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Der Einsatz der PCR zum Studium muriner Coronaviren

F. R. Homberger, L. Zhang, P. E. Thomann

Zusammenfassung

Es werden verschiedene Anwendungen der Polymerase Chain Reaction (PCR) in Rahmen des Forschungsprojekts über enterotrope murine Coronaviren [Mäusehepatitisvirus (MHV)] beschrieben. Eine diagnostische PCR zum Nachweis von MHV in Gewebeproben war in der Lage, schnell, sicher und sensitiv alle 11 getesteten MHV-Stämme zu erkennen und von nicht murinen Coronaviren zu differenzieren. Aus dieser Grundreaktion wurde eine quantitativ-kompetitive PCR entwickelt. Dabei wurde der Probe ein mit einer Punktmutation versehenes Alternativ-Template zugegeben, welches um die Primer konkurrenzierte. Die Amplifizierung und anschliessende Klonierung der Strukturprotein-Gene von enterotropen MHV-Stämmen wird beschrieben. Zum Schluss wird eine RT-PCR vorgestellt, welche in der Lage war, künstlich hergestellte Rekombinanten zwischen unterschiedlichen MHV-Biotypen einwandfrei zu erkennen.

Schlüsselwörter: PCR – Mäusehepatitis-Virus – Maus – Coronavirus

PCR as a tool in studying murine coronaviruses

This paper describes a number of applications of the Polymerase Chain Reaction (PCR) in the study of enterotropic murine coronaviruses [mouse hepatitis virus (MHV)]. A diagnostic PCR was developed which detected all of 11 different MHV strains. This fast and reliable method was also able to differentiate MHV from other non-murine coronaviruses. On the basis of this assay a quantitative PCR was designed using a mutant template containing a point mutation which competed for the PCR primers. The amplification and cloning of the structural protein genes of enterotropic MHV strains in plasmid vectors for subsequent sequencing is described. In addition an RT PCR was developed which was able to selectively detect artificially generated recombinant coronavirus.

Key words: PCR – mouse hepatitis virus – mouse – coronavirus

Einleitung

Coronaviren sind eine wichtige Virusgruppe, welche bei vielen Tierarten und auch beim Menschen vorkommen. In der Veterinärmedizin kommt ihnen eine grosse Bedeutung zu, da enterale Coronavirusinfektionen bei Nutztieren, insbesondere bei Kälbern und Schweinen, grosse wirtschaftliche Schäden verursachen (Siddell et al., 1983). Beim Menschen ist bekannt, dass bis zu 20% der Erkältungen durch Coronaviren verursacht werden (Holmes, 1986).

Das bei der Maus vorkommende Coronavirus wird aus historischen Gründen Mäusehepatitis-Virus genannt (Homberger, im Druck). Es ist für die wissenschaftliche Forschung aus zwei Gründen wichtig. Es dient als Prototyp-Coronavirus und ist heute das bestuntersuchte Virus dieses Genus. Viele grundlegende Prinzipien von Pathogenese, molekularem Aufbau und Replikation von Coronaviren wurden anhand von MHV erforscht (Lai, 1990). Ausserdem ist MHV das am häufigsten in Versuchstierpo-

pulationen vorkommende Mäusevirus (Homberger und Thomann, 1994). Es kann Probleme in der Zucht verursachen (analog derer bei den Nutztieren) und darüber hinaus Versuchsergebnisse in vielfältiger Weise negativ beeinflussen (Barthold, 1986).

Diese beiden Gründe haben uns dazu bewogen, die Pathogenese von MHV im Rahmen eines grösseren Forschungsprojekts zu studieren. Dabei haben wir uns speziell auf das Phänomen des Gewebstropismus konzentriert. Wie bei den meisten Coronaviren anderer Tierarten finden wir bei der Maus zwei unterschiedliche Biotypen (Barthold, 1986). Der Unterschied liegt in der Pathogenese. Der polytrope oder respiratorische Biotyp befällt nach einer Primärvermehrung im oberen Respirationstrakt je nach Virusstamm unterschiedliche Organe des Körpers. Im Vordergrund stehen Leber und Gehirn, nie aber der Darm. Der enterotrope Biotyp andererseits befällt fast ausschliesslich Enterozyten. In seltenen Fällen disseminiert enterotropes MHV von dieser Primärlokalisierung und befällt andere Organe, wobei das Gehirn im

Vordergrund steht (Compton et al., 1993). Obwohl die Pathologie der beiden Biotypen schon lange bekannt und deskriptiv im Detail studiert worden ist, weiss man noch nichts über die ursächlichen Faktoren dieses Unterschiedes. Kein Bestandteil des Virions oder des Genoms konnte bis heute in direkten Zusammenhang mit dem Gewebstropismus gebracht werden. Erschwerend kommt hinzu, dass antigenisch sehr ähnliche Virusstämme durchaus unterschiedliche Gewebstropismen haben können (Kunita et al., 1995).

Diese Arbeit beschreibt den Einsatz der Polymerase Chain Reaction (PCR) im Rahmen unserer Forschungstätigkeit.

Nachweis von MHV in Gewebeproben mittels PCR

Insbesondere die enterotropen MHV-Stämme wachsen, wenn überhaupt, nur sehr schlecht in Zellkulturen. Erst vor kurzem ist eine Zelllinie beschrieben worden, welche das Wachstum aller bekannten MHV-Isolate unterstützt (Compton, 1994). Zum Nachweis von MHV in biologischem Material (Gewebeproben, Zellkulturen etc.) ist aber auch diese Zelllinie zu wenig empfindlich. Historisch wurden zu diesem Zweck Bioassays in neugeborenen Mäusen oder der Mouse Antibody Production (MAP) Test eingesetzt (deSouza und Smith, 1989; Homberger und Barthold, 1992). Da beide Tests sehr aufwendig sind und das Inokulieren von lebenden Tieren mit dem Probenmaterial bedingen, haben wir eine In-vitro-Alternative entwickelt. Beim Vergleich verschiedener Techniken (PCR, RNA Dot-Blot und Protein Dot-Blot) hat sich die PCR als schnellste, billigste und sensitivste Methode erwiesen (Homberger et al., 1991; unpublizierte Resultate).

Nachweis von MHV

Damit der Test zum Nachweis der unterschiedlichsten MHV-Stämme sowie noch unbekannter Wildtypisolate eingesetzt werden kann, benötigt er eine breite Spezifität. Wir haben die Primers deshalb in einer hoch konservierten Region gewählt. Von den vier bis fünf Strukturproteinen von MHV zeigt das Membranprotein am wenigsten virusstammspezifische Variationen. Es lagen uns Sequenzinformationen von zwei Serotypen (MHV-A59 und MHV-JHM) vor. Diese beiden M-Protein-Gen-Sequenzen wurden verglichen und zwei Primer ausgewählt. MHV1 und MHV2 (Tab. 1) umschlossen ein Fragment von 375 Nukleotiden Länge. Im Vergleich zwischen den beiden bekannten Sequenzen wies dieser Bereich des Genoms nur 8 Nukleotid-Unterschiede auf, wobei keine dieser Differenzen in den Primersequenzen lag.

Das Probegewebe wurde in der zehnfachen Menge Zellkulturmedium (EMEM) homogenisiert. Vor der RNA-Extraktion wurde es mit einem RNase-Inhibitor [40 Ein-

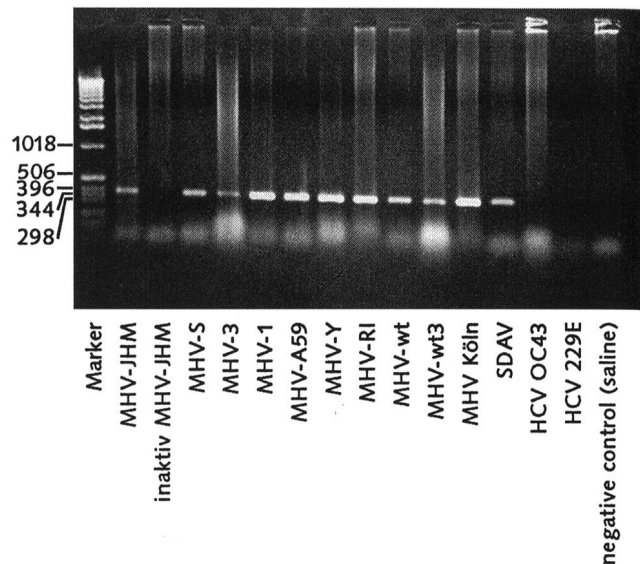


Abbildung 1: Ethidiumbromid gefärbtes 0,8% Agarosegel mit PCR-Amplifikationsprodukten von verschiedenen Coronavirusstämmen.

heiten RNasin (Promega) pro 100 µl] behandelt. Das Gewebshomogenat (100 µl) wurde dann mit 2.5 µl Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) (20%) versetzt, gemischt und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert. Nach dem Zentrifugieren (10 Minuten, 12000×g, 4 °C) wurde die wässrige Phase entfernt und aufbewahrt. Dem Phenol/Chloroform wurde 100 µl Extraktionspuffer [10 mM Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% SDS] zugegeben, gemischt und abermals zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde entnommen und mit derjenigen vom ersten Durchgang vereinigt. Diesen 200 µl Reaktionsgemisch wurden 100 µl 6 M Ammoniumacetat und 750 µl 100% Äthanol (-20 °C) (2.5faches Volumen) zugegeben und während mindestens 2 Stunden bei -20 °C inkubiert. Nach der darauffolgenden Zentrifugation (30 Minuten, 12000×g, 4 °C) wurde der Überstand abgegossen, das Nukleinsäurepellet luftgetrocknet und in 10 µl mit DEPC (Diäthylpyrocarbonat) behandeltem H₂O resuspendiert.

Von der extrahierten RNA wurde mit Hilfe der reversen Transkriptase des Avianen Myeloma Virus (AMV) (Promega) einsträngige cDNA synthetisiert. Als Primer wurde oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Pharmacia) verwendet. Die Reaktion erfolgte bei pH 8.3 und 42 °C und dauerte 2 Stunden (Tab. 2: RT1). Wird diese cDNA als Ausgangsmaterial für die PCR verwendet, ist der zweite Strang nicht nötig. Die eigentliche PCR wurde mit Taq-Polymerase (Boehringer Mannheim) während 30 Zyklen in einem Thermocycler TCX15 (Ericomp Inc.) durchgeführt (Tab. 2: PCR1). Jeder Zyklus umfasste 30 Sekunden Denaturierung bei 95 °C, 30 Sekunden Bindungsphase bei 55 °C und 1 Minute Verlängerungsphase bei 72 °C. Nach den 30 Zyklen folgten 5 Minuten bei 72 °C mit anschließender Kühlung bei 6 °C. Als Template diente einsträngige cDNA aus der reversen Transkription (RT) ohne Vorbehandlung. Die PCR-Produkte wurden auf einem 0.8% Agarosegel

elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht ausgewertet.

Unsere PCR war in der Lage, alle untersuchten 11 MHV-Stämme zu erkennen (Abb. 1). Ebenfalls erfasst wurde das Sialodacryoadenitisvirus der Ratte (SDAV), nicht aber die etwas entfernter verwandten Coronaviren des Rindes (BCV) und des Menschen (HCV-OC43, HVC-229E). Die PCR erwies sich als gleich sensitiv wie der Bioassay und empfindlicher als der RNA Dot Blot (Homberger et al., 1991).

Quantitative PCR

Beim Bioassay wurde jeweils durch Titration der Probe die Virusmenge im Gewebe bestimmt. Aus diesem Grund wollten wir eine quantitative PCR entwickeln. Das Prinzip dieses Assays ist relativ einfach (Gilliland et al., 1989). Der Probe wird eine genau bekannte Menge eines Alternativtemplates zugegeben. Dieses wird durch die gleichen Primer amplifiziert wie das Probenmaterial. Dadurch entsteht eine Konkurrenzsituation zwischen der Proben-cDNA und dem Alternativtemplate. Während der PCR wird das häufiger vorkommende Template stärker amplifiziert. Sind nach der PCR das Proben- sowie das Alternativprodukt in gleichen Mengen vorhanden, bedeutet das, dass im Ausgangsmaterial gleich viel Proben-cDNA wie Alternativtemplate vorhanden war. Entschei-

dend bei dieser Methode ist, dass die beiden entstehenden PCR-Produkte klar unterschieden werden können. Um diese Unterscheidung zu ermöglichen, wurde das Alternativtemplate mit einer Punktmutation versehen. Durch diese Mutation wurde die *HaeIII*-Restriktionsenzym-Schnittstelle des PCR-Produktes zerstört. Nach der PCR wird das entstandene Produktgemisch mit *HaeIII* verdaut. Dabei wird das Proben-Produkt geschnitten, das Alternativprodukt jedoch bleibt intakt. Mittels Gelelektrophorese können diese beiden Produkte nun direkt quantitativ verglichen werden (Abb. 2).

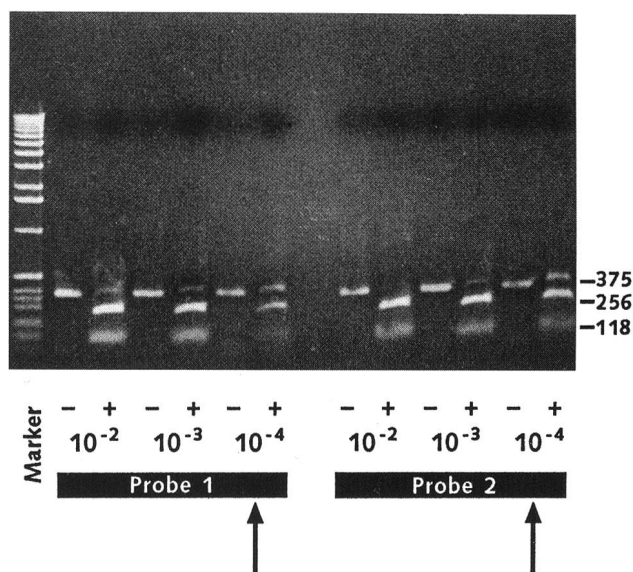


Tabelle 1: Liste der verwendeten Primer

Primer	Sequenz (5' - 3')	Sense	Lokalisation ^a
MHV1	AATGGAACCTCTCGTTGGG	+	5271 - 5289
MHV2	TAGTGGCTGTTAGTGTATGG	-	5636 - 5655
MHV3	GTTAATGTGGACACTGAC ^b	+	5380 - 5397
MHV4	GTCAGTGTCCACATTAAC ^b	-	5380 - 5397
LTK1	TACGTACCCCTCTCAACTC	+	Leader ^c
LTK2	ATGACAGCAAGACATCC	-	7339 - 7355
LTK3	GATCGATCGAGGATCCAATACTTGGTGCTGCC ^d	+	5077 - 5094
LTK4	GGAAATCCGGGATCCAAGTGGTGTCTTGAGG ^d	-	5970 - 5986
LTK5	CACCAGGACAGTATTGTG	+	4084 - 4101
LTK8	CAATGTAGCCTTAGGACC	-	4244 - 4251
LTK9	AAAAGGTCAATGAGTGCG	+	3386 - 3403
LTK10	AGGCGCATTCTGGACAAG	-	3460 - 3477
LTK11	GGCGTTCTGCTATAGAGG	+	2759 - 2776
LTK12	CCAGTAATACCGTAGAGG	-	1938 - 1955
LTK14	CCTCTATGGTATTACTGG	+	1938 - 1955
LTK15	CTTCTTGACCACCAAGTGC	-	2837 - 2854
LTK17	GAGTTGTATACCGCGGTG	+	950 - 967
LTK23	TACGCTCCCAATTGAGAG	-	1038 - 1055
LTK51	TACTGGCTATCGATTAAC	+	2316 - 2333
LTK52	AATTAGCTATCGATCATC	-	2315 - 2332
LTK53	CTAAACATGCTGTTCCGTG	+	-6 - 12
C30	TTGCGCATACTGGTAGTC	+	~ -10'000 ^e
C84	AAGGCAGGTATCATGTGA	-	1765 - 1782
C142	AATGCCTAGCATACATGC	-	4282 - 4299
C143	ACGGATAGCGGTGTTAGA	+	-40 - -23
C147	ACAGCGGAGATCATAGGT	-	1631 - 1648

^a Nukleotide des MHV-RI Genoms nummeriert beginnend mit dem 5' Ende des S-Protein Gens

^b Das unterstrichene Nukleotid entspricht der Mutation in der *HaeIII* Schnittstelle

^c Dieser Primer liegt in der allen MHV mRNAs gemeinsamen Leader Sequenz. In der genomischen RNA liegt sie am 5' Ende.

^d kursiv: Nonsensesequenz; unterstrichen: *BamHI* Schnittstelle; neutral: MHV spezifische Sequenz

^e Dieser Primer liegt im RNA Polymerase Gen (Bestandteil des DI Partikels pDPRIS)

Abbildung 2: Ethidiumbromid gefärbtes 0,8% Agarosegel zur Auswertung einer quantitativen PCR von zwei mit MHVY infizierten Gewebeproben. Unverdautes (—) und *HaeIII* verdautes (+) PCR-Produkt von drei cDNA-Verdünnungen (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) nebeneinander aufgetragen. Der Pfeil bezeichnet die Gleichgewichtsreaktion. Unverdauliches Alternativ-Produkt: 375 bp; verdautes Proben-Produkt: 256 und 118 bp. Das unverdaute PCR-Produkt (375 bp) läuft wegen der unterschiedlichen Salzkonzentration vergleichsweise etwas schneller auf dem Gel.

In einem ersten Schritt wurde das Alternativtemplate mit der Punktmutation durch PCR hergestellt. Es wurden zwei neue Primer (MHV3 und MHV4) (Tab. 1) synthetisiert. Diese sind zueinander komplementär und entsprechen der Sequenz von MHV-A59 im Bereich der *HaeIII*-Schnittstelle (GGCC) mit der Ausnahme, dass das erste C der Schnittstelle durch ein A ersetzt wurde. Das Alternativtemplate wurde nun in zwei Teilen amplifiziert (Tab. 2: PCR1), wobei für die erste Hälfte (118 bp) MHV1 und MHV4 und für die zweite Hälfte (256 bp) MHV2 und MHV3 als Primer eingesetzt wurden. Die beiden PCR-Produkte wurden zusammengegeben und $1:10^7$ verdünnt, um die Konzentration der internen Primer (MHV3 und MHV4) zu reduzieren.

In einer zweiten PCR (Tab. 2: PCR1) mit MHV1 und MHV2 als Primern wurden diese beiden Hälften wieder zusammengefügt. Während der Bindungsphase des ersten PCR-Zyklus verbanden sich die beiden Fragmente an ihrer überlappenden Sequenz (MHV3 bzw. MHV4). In der darauffolgenden Verlängerungsphase wurde nun das jeweilige Fragment entlang dem anderen bis zur vollen Länge aufsynthetisiert. Während der restlichen Zyklen wurde das entstandene «full-length»-PCR-Produkt weiter amplifiziert. Das so hergestellte Alternativtemplate konnte nun in der quantitativen PCR eingesetzt werden. Es zeigte sich aber, dass wenn das Alternativtemplate in hoher Konzentration (>2 pg/100 µl Reaktionsgemisch) zugegeben wurde, es nicht amplifiziert werden konnte. Es ist uns nicht gelungen, eine Erklärung oder eine Gegenmassnahme für dieses Phänomen zu finden. Allerdings trat dieses Problem nie bei einer Probe auf, vermutlich wegen der geringeren Menge an Template. Um eine quantitative Beeinflussung des Assays zu verhindern, haben wir uns deshalb entschlossen, mit einer konstanten Alternativtemplate-Konzentration zu arbeiten und die Proben-cDNA zu titrieren.

Somit sah unsere quantitative PCR wie folgt aus: Aus einer Gewebeprobe wurde wie oben beschrieben RNA isoliert und cDNA synthetisiert (Tab. 2: RT1). Zum PCR-Mastermix wurde 0.1 fg/µl Alternativtemplate zugegeben. Von der cDNA wurde eine Verdünnungsreihe (10^{-2} bis 10^{-6}) hergestellt, die PCR wurde wie oben beschrieben durchgeführt (Tab. 2: PCR1). Danach wurden je vier µl PCR Produkt, 0.2 µl $10\times$ Verdauungspuffer, 1.7 µl H_2O und 0.1 µl *HaeIII* gemischt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das verdaute PCR-Produkt wurde anschliessend mit 2 µl des unverdauten mittels Gelelektrophorese verglichen (Abb. 2). Bewusst wurde die doppelte Menge von verdaulichem PCR-Produkt eingesetzt, da bei Gleichgewicht nach dem Verdau nur noch 50%, das Alternativprodukt, übrigbleibt. Auf dem Gel wird von Auge die Reaktion ausgewählt, bei der gleich viel unverdautes wie verdautes PCR-Produkt vorhanden ist und welche demzufolge ursprünglich 0.1 fg/µl MHV cDNA enthalten hat (Abb. 2: Pfeil).

Amplifizieren und Klonieren der Strukturprotein-Gene von MHV als Grundlage für die Sequenzierung

Um mehr über die Ursachen des unterschiedlichen Gewebstropismus von Coronaviren zu erfahren, haben wir die Strukturproteingene von verschiedenen enterotropen MHV-Stämmen (MHV-Y, MHV-RI, DVIM) sequenziert. Mehr Informationen über das Genom der Coronaviren finden sich im Beitrag von Tobler und Mitarbeiter an anderer Stelle in dieser Ausgabe. Zuerst mussten die Gene in einen Vektor kloniert werden. Der traditionelle Weg über eine cDNA-Library ist sehr aufwendig, und da bereits Sequenzinformationen der polytropen Stämme vorlagen, entschlossen wir uns, die einzelnen Struktur-

proteingene direkt mittels PCR zu amplifizieren und zu klonieren. Um das Klonieren zu erleichtern, verwendeten wir spezielle Primer von 34 Nukleotiden Länge (Tab. 1: LTK3 / LTK4). Die 18 Nukleotide des 3' Endes entsprachen der Zielsequenz im Genom von MHV-A59, die nächsten 6 Nukleotide bildeten eine *BamHI*-Schnittstelle, während es sich bei den 10 Nukleotiden am 5' Ende um eine willkürlich gewählte Nonsensesequenz handelte. Die Nonsensesequenzen an beiden Enden des PCR-Produkts, sind nötig, da eine Schnittstelle unmittelbar am Ende eines DNA-Fragments von einem Restriktionsenzym nicht erkannt wird. Nach der Amplifikation wurde das PCR-Produkt mit *BamHI* geschnitten und anschliessend in einen ebenfalls mit *BamHI* geschnittenen Plasmidvektor (pUC 18) kloniert.

Wir haben nur das erste, das M-Protein-Gen, auf diese Weise kloniert. Als später ein käuflicher Klonierungskit (SureClone, Pharmacia) zur Verfügung stand, haben wir diesen verwendet, da er einfacher und billiger war. Der Kit funktioniert wie folgt: Der 3' A Überhang, der beim Amplifizieren durch die *Taq*-Polymerase immer an beiden Enden des PCR-Produkts entsteht, wird durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I entfernt. Die dadurch entstanden geraden Enden (blunt ends) des PCR-Produkts werden mittels T₄Polynukleotidkinase phosphoryliert, damit das DNA-Fragment anschliessend in den mit *SmaI* geschnittenen pUC 18 ligiert werden kann. Auf diese Weise wurden das N-Protein-Gen (Primer: LTK1 / LTK2), der Bereich des orf 4/5 (Primer: LTK5/MHV2) und das S-Protein-Gen (in fünf Teilen: Primer: LTK1/LTK23; LTK17/LTK12; LTK14/LTK15; LTK11/LTK10; LTK9/LTK8) kloniert (Tab. 1). Da die in der RT synthetisierte cDNA nur ca. 4 kb lang ist, wurde das am weitesten vom poly-A-Schwanz des Virusgenoms entfernte S-Protein-Gen in der durch oligo (dT) gestarteten Reaktion (Tab. 1: RT1) nicht transkribiert. Zur Herstellung von cDNA des S-Protein-Gens wurde deshalb ein Primer (in der Regel der antisense Primer der PCR) unmittelbar 3'-seitig der Zielsequenz verwendet. Die Länge der amplifizierten und klonierten DNA-Fragmente lag zwischen 0.7 und 1.5 kb. Die PCR wurde in einem DNA-Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer) unter Verwendung des oben beschriebenen Protokolls (Tab. 1: PCR1) durchgeführt. Bei den grösseren Fragmenten (ab 1.4 kb) nahm die Amplifikationseffizienz jedoch deutlich ab. Eine Ausdehnung der Verlängerungsphase auf 1.5 Minuten konnte diese Reduktion teilweise wieder ausgleichen.

Herstellung und Nachweis von rekombinanten Virusstämmen

In der nächsten Phase des Projekts versuchten wir, den Tropismus eines polytropen Stammes dadurch zu verändern, dass wir Teile des Genoms durch entsprechende Bereiche eines enterotropen Virusstammes ersetzten. Das S-Protein-Gen, der wahrscheinlichste Kandidat für die Lokalisation des Gewebstropismus, wurde als erstes ausgetauscht. Für die Herstellung von rekombinanten

Viren wurde von zwei Besonderheiten der Coronaviren Gebrauch gemacht, der häufig vorkommenden natürlichen Rekombinationen zwischen homologen, aber auch heterologen Stämmen (Lai, 1992) und der Existenz von «defective interfering» (DI) Partikeln (Van der Most et al., 1992). Rekombination tritt auf durch die sogenannte «copy choice» der RNA-Polymerase. Bei der Replikation des Genoms löst sich die Polymerase häufig von ihrer Vorlage ab und haftet sich an homologe Stellen anderer RNA an, um dort die RNA-Synthese wieder aufzunehmen. Handelt es sich bei den Vorlagen um RNA unterschiedlicher Herkunft, können dabei Chimär-Genome entstehen (Rekombination). DI-Partikel sind defekte Viren, welche eine intakte Hülle, aber nur ein unvollständiges Genom besitzen. DI-Partikel können nur in Anwesenheit eines intakten Helfervirus repliziert werden. Natürlicherweise kommt es zwischen DI-Partikeln und Helfervirus häufig zu Rekombinationen. Diese sind normalerweise ohne Bedeutung, da das DI-Partikel in der Regel ein Derivat des Helfervirus ist. Im Gegensatz zum Coronavirus-Genom (31 kb) lässt sich das Genomrudiment eines DI-Partikels (oft nur wenige kb) relativ einfach klonieren und danach in vitro verändern.

Unser Ziel war es nun, das gesamte S-Protein-Gen des enterotropen MHV-RI in ein bereits kloniertes DI-Partikel von MHV-A59 (pMIDI) einzufügen. Das 4 kb lange S-Protein-Gen wurde in zwei überlappenden Fragmenten mittels PCR amplifiziert und kloniert. Dabei wurden Primer LTK53 / LTK52 und LTK51 / LTK8 eingesetzt. Die PCR war leicht modifiziert (Abb. 2: PCR2). Die beiden PCR-Produkte hatten eine Länge von 2.3 respektive 1.9 kb. Die zwei Fragmente wurden mit Hilfe einer im überlappenden Bereich gelegenen Restriktionsenzym-schnittstelle zusammengesetzt und anschliessend in

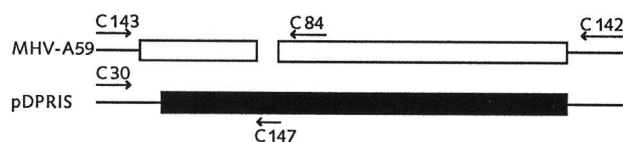


Abbildung 3: RT- und PCR-Primer zum Nachweis von Rekombinanten Coronaviren. Relative Lage im Vergleich zum S-Protein-Gen von MHV-A59 und dem DI-Partikel (pDPRIS). Nachweis von A59: C142 (RT); C143/C84 (PCR). Nachweis pDPRIS: C147 (RT); C30/C147 (PCR). Nachweis von Rekombinanten: C142 (RT); C143/C147 (PCR).

pMIDI subkloniert. Das rekombinierte DI-Partikel (pDPRIS) wurde zusammen mit dem Helfervirus MHV-A59 in Zellkultur vermehrt.

Die Wahrscheinlichkeit eines «crossing overs» zwischen den beiden RNA-Strängen liegt laut Literaturangaben bei ungefähr 1:100. In unserem Fall sind für die Rekombination zwei «crossing overs» nötig. Der erwartete Anteil von Rekombinanten an der gesamten Virusernte liegt somit bei höchstens 1:10⁴. Wir benötigten eine sehr sensitive und Rekombinanten-spezifische Methode zum Nachweis der Rekombinanten. Mit Hilfe einer Serie von geschickt gewählten Primern und hochempfindlicher RT und PCR ist es uns gelungen, zweifelsfrei zwischen entstandenen Rekombinanten, dem Helfervirus und dem DI-Partikel zu unterscheiden (Abb. 3). Die RT (Tab. 2: RT2) wurde durchgeführt mit einem Primer (C142) der 3'-seitig des S-Protein-Gens liegt, in einem Bereich, der im Vollvirus (MHV-A59, Rekombinante) vorhanden ist, nicht aber im DI-Partikel. Auf diese Weise wurde von der DI-RNA keine cDNA hergestellt. Die Vollvirus-cDNA wurde anschliessend mit den Primern C147 und C143 in einem

Tabelle 2: Zusammenfassung der im Text beschriebenen «Reverse Transcription» (RT) und «Polymerase Chain Reaction» (PCR) Protokolle.

	RT1	RT2	PCR1	PCR2
Reaktions-gemisch	4 µl RNA 4 µl oligo (dT)* (1mg/ml) 1 µl 1 M Tris (pH 8.3) 3 µl 1 M KCl 0.8 µl 250 mM MgCl ₂ 0.8 µl dNTP's (25 mM) 0.8 µl 0.1 M DTT 0.2 µl RNasin (10 Einheiten) 3.4 µl H ₂ O (DEPC) 2 µl RT (16 Einheiten) 20 µl Total	3 µl RNA 2.5 µl Primer (0.1mg/ml) 3 µl H ₂ O (DEPC) 4 µl 5x RT Puffer (250 mM Tris, 250 mM KCl, 50 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT, 2.5 mM Spermidin, pH 8.3) 2 µl dNTP's (10 mM) 0.6 µl RNasin (30 Einheiten) 4.4 µl H ₂ O (DEPC) 0.5 µl RT (10 Einheiten) 20 µl Total	2 µl cDNA* 2 µl 10x PCR Puffer (0.5 M KCl, 40 mM MgCl ₂ , 100 mM Tris, pH 8.3) 0.1 µl Primer 1 (0.1 mM) 0.1 µl Primer 2 (0.1 mM) 0.2 µl dNTP's (25 mM) 0.1 µl Taq (0.5 Einheiten) 15.5 µl H ₂ O 20 µl Total	2 µl cDNA 2 µl 10x PCR Puffer (0.5 M KCl, 15 mM MgCl ₂ , 100 mM Tris, pH 8.3) 0.2 µl Primer 1 (0.1 mM) 0.2 µl Primer 2 (0.1 mM) 0.2 µl dNTP's (25 mM) 0.2 µl Taq (1 Einheit) 15.2 µl H ₂ O 20 µl Total
Inkubation	2 Stunden bei 42 °C	RNA und Primer: 3 Minuten bei 60 °C anschl. auf Eis Nach Zugabe des RT-Mix: 1 Stunde bei 37 °C	30 Zyklen: 30 sec, 95 °C 30 sec, 55 °C 60 sec, 72 °C** 5 Minuten bei 72 °C ∞ bei 6 °C (oder 4 °C)	35 Zyklen: 60 sec, 94 °C 60 sec, 49 °C 120 sec, 72 °C 5 Minuten bei 72 °C ∞ bei 4 °C
Bemerkungen	* oder spezifischer interner Primer (1 mM) wenn mehr als 4 kb vom 3' Ende des Genoms		* Zugabe von 2 fg Alternativtemplate bei quantitativer PCR ** 90 sec, 72 °C bei Produkten mit mehr als 1.4 kb Länge	

GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer) amplifiziert (Tab. 2: PCR2). C147 liegt in einer Region, die nur im RI-Genom vorhanden ist (Deletion in MHV-A59) (Abb. 3). Dadurch wurde selektiv nur das Rekombinanten-Genom amplifiziert. Diese Vorgehensweise birgt die zumindest theoretische Möglichkeit von falsch positiven Resultaten, wenn es zu Rekombination zwischen DI-Partikel und Helfervirus während der RT oder der PCR kommt. Um dies zu verunmöglichen, haben wir zusätzlich vor der RT das Virusgemisch verdünnt und in Zellkultur passagiert, bis das DI-Partikel nicht mehr nachweisbar war (Zhang et al., im Druck).

Schlussfolgerung

Die beschriebene PCR zum Nachweis von murinen Coronaviren hat sich als schnelle, genaue und sensitive Alternative zum traditionellen Bioassay erwiesen. Wir haben diese PCR während Jahren mit grossem Erfolg in unserer Forschungsarbeit eingesetzt (Homberger et al., 1992; Homberger, 1994; Homberger, 1995). Auf diese Weise konnten nicht nur Hunderte von Mäusen eingespart werden, die Methode diente uns auch als Basis für die weiteren beschriebenen Anwendungen.

Die quantitative PCR hat gut funktioniert, war aber in Relation zu den zusätzlich gelieferten Resultaten eher aufwendig. Wir haben deshalb die Methode nie im grösseren Stil angewendet. Wenn wir eine quantitative Aussage benötigten, haben wir das Ausgangsmaterial (Gewebshomogenat) titriert und in den Verdünnungsstufen MHV mittels PCR nachgewiesen. Für unsere Zwecke genügte es festzustellen, bis zu welcher Verdünnung im Ausgangsmaterial MHV nachweisbar war (Homberger et al., 1991).

Die PCR hat die Sequenzierung der Strukturproteingene der enterotropen MHV-Stämme stark vereinfacht. Einzelne Bereiche des Genoms konnten gezielt amplifiziert und kloniert werden. Die Resultate wurden mit den Daten der polytropen Stämme aus der Literatur verglichen, um Anhaltspunkte bezüglich des Gewebstropismus zu erhalten (Homberger, 1994; Homberger, 1995; Kunita et al., 1995). Natürlich können Sequenzinformationen keinen abschliessenden Beweis über die Funktion eines Gens liefern, aber diese Informationen dienten als Ausgangslage für die nachfolgenden Rekombinationsversuche.

Es ist uns gelungen, rekombinante murine Coronaviren mit chimärem S-Protein-Gen herzustellen. Dank PCR konnte dies bewiesen werden, ausserdem konnte das veränderte Gen amplifiziert, kloniert und sequenziert werden. Dabei hat es sich gezeigt, dass eine Serie von Chimären mit unterschiedlichem Muster entstanden ist (Zhang et al., im Druck). Zur Zeit sind wir daran, ein rekombinantes MHV zu isolieren, um es anschliessend zu charakterisieren und anhand der Pathologie festzustellen, ob es zu einem Biotypenwechsel gekommen ist.

Alle unsere PCR-Primer wurden nach drei einfachen Kriterien ausgewählt: Aus Kostengründen sollten Primer

so kurz wie möglich sein, aber nicht unter 18 Nukleotiden aufweisen. Nach Möglichkeit sollten Primer am 3' Ende ein G oder C aufweisen, da diese Nukleotide eine stärkere Bindung mit dem Template eingehen (3 statt 2 Wasserstoffbrücken). Wir haben ausserdem darauf geachtet, dass die Primer ungefähr gleichviel A/T wie G/C enthalten. Alle von uns ausgewählten PCR-Primer haben auf Anhieb funktioniert, und wir konnten keine Unterschiede in der Effizienz feststellen.

Ein grosses Problem im Zusammenhang mit der PCR sind Kontaminationen, vor allem durch genomische Nucleinsäuren. Bis heute sind wir glücklicherweise davon verschont geblieben. Das Arbeiten mit einem empfindlichen RNA-Virus hat den Vorteil, dass man sich darum keine Sorgen machen muss. RNA wird sehr rasch abgebaut und steht der PCR ausserdem nicht als Template zur Verfügung. Schwierig wird es erst beim Arbeiten mit cDNA. Hier ist eine klare Trennung zwischen Probenvorbereitung und der Analyse der PCR-Produkte wichtig. Der Thermocycler kann räumlich davon getrennt sein oder einer dieser beiden Stationen angegliedert werden. Aus eigener Erfahrung können wir sagen, dass eine räumliche Trennung der beiden Bereiche nicht zwingend notwendig sein muss. Bei knappen Platzverhältnissen genügt eine diszipliniert eingehaltene, zeitlich-organisatorische Trennung. Dies bedingt eine gründliche Reinigung (Wechseln der Unterlagen) zwischen den Arbeitsschritten und das Verwenden von den jeweiligen Arbeitsschritten fest zugeteilten Pipetierhilfen und anderen Gerätschaften.

Literatur

- Barthold S.W.* (1986): Mouse hepatitis virus: Biology and epidemiology. In: *Viral and mycoplasmal infections of laboratory rodents. Effect on biomedical research.* (eds. Bhatt P.N., Jacoby R.O., Morse III H.C., New A.E.), pp. 571-601, Academic Press.
- Compton S.R.* (1994): Enterotropic strains of mouse coronavirus differ in their use of murine carcinoembryonic antigen-related glycoprotein receptors. *Virology* 203, 197-201.
- Compton S.R., Barthold S.W., Smith A.L.* (1993): The cellular and molecular pathogenesis of coronaviruses. *Lab. Anim. Sci.* 43, 15-28.
- de Souza M., Smith A.L.* (1989): Comparison of isolation in cell cultures with conventional and modified mouse antibody production tests for detection of murine viruses. *J. Clin. Microbiol.* 27, 185-187.
- Gilliland G., Perrin S., Brunn H.F.* (1989): Competitive PCR for quantitation of mRNA. In: *PCR protocols: a guide to methods and amplifications.* (eds. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J.), pp. 60-69, Academic Press.
- Holmes K.V.* (1986): Replication of coronaviruses. In: *Fundamental virology.* (eds. Field B.N., Knipe D.M., Chanock R.M., Melnick J.L., Roizman B., Shope R.E.), pp. 513-525, Raven Press.
- Homberger F.R.* (1994): Nucleotide sequence comparison of the membrane protein genes of three enterotropic strains of mouse hepatitis virus. *Virus Res.* 31, 49-56.
- Homberger F.R.* (1995): Sequence analysis of the nucleoprotein genes of three enterotropic strains of murine coronavirus. *Arch. Virol.* 140, 571-579.
- Homberger F.R.* Mäusehepatitis-Virus. Schweiz. Arch. Tierheilk. im Druck.

Homberger F.R., Barthold S.W. (1992): Passively acquired challenge immunity to enterotropic coronavirus in mice. *Arch. Virol.* 126, 35-43.

Homberger F.R., Thomann P.E. (1994): Prevalence and transmission of murine viruses and *Mycoplasma* in laboratory mouse colonies with respect to housing conditions. *Lab. Anim.* 28, 113-120.

Homberger F.R., Smith A.L., Barthold S.W. (1991): Detection of rodent coronaviruses in tissues and cell cultures by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2789-2793.

Homberger F.R., Barthold S.W., Smith A.L. (1992): Duration and strain specificity of immunity to enterotropic mouse hepatitis virus. *Lab. Anim. Sci.* 42, 347-351.

Kunita S., Zhang L., Homberger F.R., Compton S.R. (1995): Molecular characterization of the S proteins of two enterotropic murine coronavirus strains. *Virus Res.* 35, 277-289.

Lai M.M.C. (1990): Coronavirus: Organization, replication and expression of genome. *Annu. Rev. Microbiol.* 44, 303-333.

Lai M.M.C. (1992): RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol. Rev.* 56, 61-79.

Siddell S.G., Anderson R., Cavanagh D., Fujitwara K., Klenk H.D., MacNaughton M.R., Pensaert M., Stobelman S.A., Sturman L., van der Zeijst B.A.M. (1983): Coronaviridae. *Intervirology* 20, 181-189.

Van der Most R.G., Heijnen L., Spaan W.J.M., de Groot R.J. (1992): Homologous RNA recombination allows efficient introduction of site-specific mutations into the genome of coronavirus MHV-A59 via synthetic co-replicating RNAs. *Nucleic Acids Res.* 20, 3375-3381.

Zhang L., Luytjes W., Homberger F.R., Spaan W.J.M. A study of the site specific mutagenesis of MHV spike gene by using homologous RNA recombination between MHV genome and synthetic DI RNAs. In preparation.

Dank

Ein Teil dieses Projektes wurde durch den Schweizerischen Nationalfond (Nr.31-39'728.93) unterstützt. Weitere Zuwendungen erfolgten von der Stiftung für Wissenschaftliche Forschung und der Jubiläumsspende der Universität Zürich sowie der Schweizerischen Akademie für Medizinische Wissenschaften in Basel.

Wir möchten uns bei Proff. Stephen W. Barthold, Abigail L. Smith und Willy J. M. Spaan und Dr. Willem Luytjes für ihre Mitarbeit bei den einzelnen Projekten bedanken. Ebenso bei Elizabeth Johnson und Kirsten Rappold für die technische Unterstützung und bei Prof. Mathias Akkermann und Kurt Tobler für ihre Kommentare zum Manuskript.

Korrespondenzadresse: Felix R. Homberger, Institut für Labortierkunde, Universität Zürich-Irchel, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zürich

DIANA.

Computersoftware für Gross- und Kleintierpraxen

brunner & hess software ag
 PC-Lösungen aus Entwicklerhand
 Schulhausstrasse 73 Tel. 01/286 20 30
 CH-8002 Zürich Fax 01/286 20 31
 DIANA-Direktnummer Tel. 01/286 20 40