

文章编号: 1001-411X(2000)02-0079-03

# 伪狂犬病毒基因转移载体的快速构建及其瞬时表达

罗满林<sup>1</sup>, 建华<sup>2</sup>, 刘镇明<sup>1</sup>, 袁少华<sup>1</sup>, 张楚瑜<sup>2</sup>, 王家富<sup>2</sup>

(1 华南农业大学动物医学系, 广东 广州 510642; 2 武汉大学病毒研究所, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 以含有伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)蛋白激酶(protein kinase, PK)基因的重组质粒为基础, 利用非互补粘性末端经过部分补平后成为粘性末端, 再进行连接的方法克隆了与载体分子大小相当的报告基因表达盒。用限制性内切酶分析确证了伪狂犬病毒表达载体中报告基因表达盒的插入方向, 并通过导入细胞后检测外源基因在体外的瞬时表达, 直接鉴定了表达载体的生物学活性。

**关键词:** 伪狂犬病毒; 基因表达盒; 部分补平; 分子克隆; 瞬时表达

**中图分类号:** Q 784 Q 786

**文献标识码:** A

伪狂犬病(pseudorabies, PR)是严重危害我国养猪生产的重要疾病<sup>1,2</sup>, 研制伪狂犬病的基因工程疫苗已成为目前的热点之一。引起 PR 的病原——伪狂犬病病毒(PRV)属于  $\alpha$ -疱疹病毒, 其基因组为线性双股 DNA 分子, 分子组成  $87 \times 10^6$ , 约 150 kb<sup>3</sup>。迄今为止, 已有 60%左右的基因被定位和测序, 其中包括许多非必需的基因。有些非必需基因同时也是病毒的毒力基因。它们的缺失或灭活可使病毒致弱或毒力降低。此外, 这些非必需基因也适宜作为外源基因插入的部位。

在构建表达载体中经常采用报道基因作为标记, 以便于重组病毒的筛选; 但报道基因的片段较大, 克隆时有困难。本文报道了一种用部分补平、创造粘端的方式在 PRV 蛋白激酶(PK)基因中有效地插入  $\beta$ -半乳糖苷酶(LacZ)基因表达盒, 构建 PRV 转移载体的方法, 并通过瞬时表达检测确定了所构建的表达载体的可行性。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒和菌株

含 PRV-HB 株 PK 基因的重组质粒 pPK 由作者构建<sup>4</sup>,  $\beta$ -半乳糖苷酶基因表达盒的重组质粒由荷兰 Sondermeijer Paul 博士提供; 转化受体菌为大肠杆菌 TG1, dNTP 来自 Hongene 公司, Klenow 酶来自 Biolabs 公司, 限制性内切酶 *EcoR* V 来自 Takara 生物工程公司, 其他限制性内切酶及其工具酶均来自华美生物工程公司。

### 1.2 重组转移载体的构建与鉴定方法

如图 1 所示, 以 *Pst*I 和 *Bam*HI 酶切重组质粒 pCH

110 *Bam*, 用 *Xho*I 酶切重组质粒 pPK, 经低熔点琼脂糖胶挖槽法<sup>5</sup>, 回收 pCH 110 *Bam* 质粒中 4.1 kb 片段和线性化的 pPK 质粒载体, 从 pCH 110 *Bam* 回收的 4.1 kb 片段用 1 mmol/L dATP 和 dGTP 5  $\mu$ L, 回收的 pPK 用 1 mmol/L dCTP 和 dTTP 5  $\mu$ L, 再各加入 Klenow 酶 0.5  $\mu$ L(5 u/ $\mu$ L), 30  $^{\circ}$ C 30 min 作补平反应, 然后经苯酚氯仿抽提后, 乙醇沉淀部分补平的 DNA, 再将其溶于 10  $\mu$ L H<sub>2</sub>O 中, 载体与插入子按 1:5 比例(DNA 浓度比)加入, 连接反应在 10  $\mu$ L 体积中进行, 混合各成分, 45  $^{\circ}$ C 5 min 退火, 再补加 1  $\mu$ L T<sub>4</sub> DNA 连接酶。将部分补平的插入子与部分补平的质粒载体予以连接, 经转化大肠杆菌 TG1, 并在含有氨苄青霉素的 LB 平板上挑取单个菌落, 用碱裂解小量法提取质粒。

### 1.3 重组质粒的鉴定

先比较质粒的大小, 初步筛选那些明显大于克隆载体的 DNA 重组质粒, 进一步用 *EcoR* I、*Hind* III 和 *EcoR* V 分别单酶切, 观察酶切片段数目及其大小与预期是否相符, 继而判定克隆片段的插入方向。

### 1.4 PRV 增殖与病毒 DNA 提取

PRV 地方株(HS9304)由湖北省农科院畜牧兽医研究所提供, PRV HS 9304 在 BHK 21 单层细胞上增殖, 待 80%细胞单层出现 CPE 后, 收毒冻融 3 次, 再 1 000 r/min 离心, 沉淀用 TE 重悬再次离心, 沉淀物加入现配细胞裂解液(在 TNE 中加入  $\varphi=10\%$  的 Triton X-100 和  $\rho=10$  g/mL Sarcosyl) 600  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 作用 30 min, 再 1 000 r/min 离心后, 将上清转至另一 Eppendorf 管, 先用等量苯酚, 再用等量氯仿:异戊醇(24:1)各抽提 1 次后, 乙醇沉淀备用。临用前用自制带钩玻棒钩起絮状物, 溶于适量灭菌双蒸水中, 再次用乙醇沉淀,  $\varphi=70\%$  乙醇洗 2 次后风干即用。

收稿日期: 1999-09-29

作者简介: 罗满林(1957 年~), 男, 副教授, 博士后。

基金项目: 中国博士后基金资助项目(中博基[1996]2 号)

1.5 重组转移载体在转染细胞中  $\beta$ -gal 酶活性检测按 Mettenleiter 等<sup>[9]</sup> 的方法进行.

2 结果

2.1 重组质粒的构建和酶切鉴定

根据设计的方案,按图 1 所示的技术路线构建了插入有  $\beta$ -半乳糖苷酶基因表达盒的重组质粒. 克隆载体 pPK 经 *Xho* I 酶切后,露出两末端——AGCT, CH 110 *Bam* 经 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切后,回收 4.1 kb 的插入片段,其两末端均为——CTAG. 经过部分补平,克隆载体末端成为——CT,插入子成为——AG,两者互为粘端,十分易于连接. 对重组质粒作大小比较,发现绝大多数均大于克隆载体,进一步用酶切鉴定,得到两种不同酶切图谱的重组质粒,如图 2 所示. 其中用 *Hind* III 或 *Eco*R I 酶切,分别可切下一个大小为 0.85 kb 和 1.33 kb 的小片段,为反向克隆,而用 *Eco*R I 能切出大小稍不同的两条带(3.92 kb/4.35 kb)为正向克隆. *Eco*R V 是新增的一个酶切位点,它的存在是目的片段插入后的直接证据.

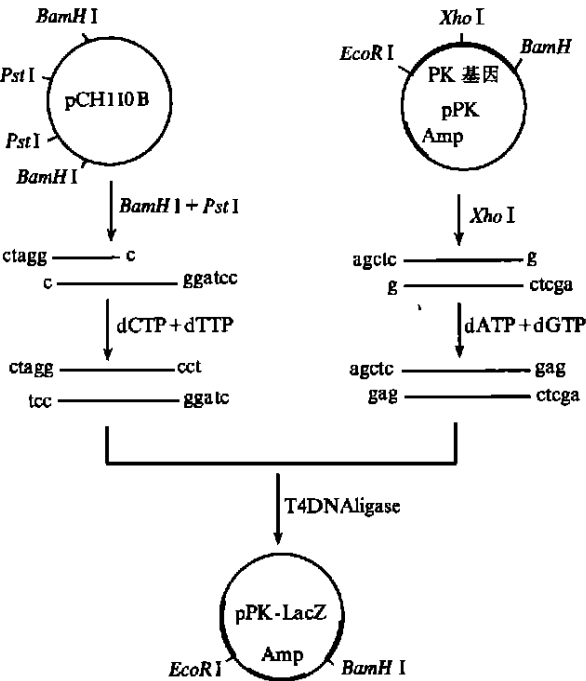
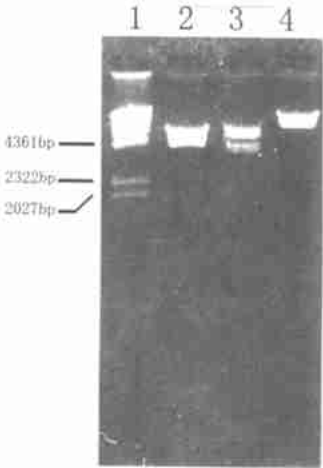


图 1 选择性 dNTP 补平法和重组质粒 pPK-LacZ 的构建  
Fig. 1 Selective dNTP repair method and construction of the recombinant plasmid pPK-LacZ

2.2 在转染细胞内  $\beta$ -LacZ 基因的瞬时表达

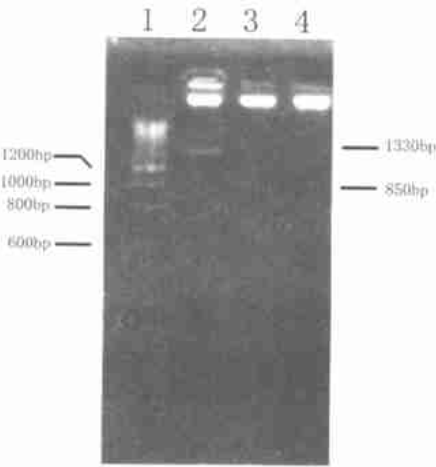
在  $\beta$ -半乳糖苷酶的作用下,底物 *X*-gal 降解为不溶于水的蓝色沉淀物. 通过 *X*-gal 对转染细胞染色后可以确定插入 PRV HS 9304 株 PK 基因内的外源基因  $\beta$ -LacZ 的表达. 用正向重组质粒、反向重组质粒和 CH 110 *Bam* 阳性质粒对照均可见有部分细胞

着染成蓝绿色(即  $\beta$ -gal 有表达),其中用反向重组质粒转染细胞瓶出现特多细胞被着染,而细胞空白对照无着染,从而证明所插入的  $\beta$ -gal 基因表达盒的正确性及潜在的生物学活性.



1.  $\lambda$  DNA *Hind* III     $\lambda$  DNA *Hind* III Marker  
2. *Hind* III 酶切重组质粒    *Hind* III digestion of plasmid  
3. *Eco*R I 酶切重组质粒    *Eco*R I digestion of plasmid  
4. *Eco*R V 重组质粒的酶切鉴定    *Eco*R V digestion of plasmid  
图 2 pPK-LacZ(正向克隆)重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction pattern of pPK-LacZ, a direct clone



1.  $\lambda$  DNA *Hind* III     $\lambda$  DNA *Hind* III Marker  
2. *Hind* III 酶切重组质粒    *Hind* III digestion of plasmid  
3. *Eco*R I 酶切重组质粒    *Eco*R I digestion of plasmid  
4. *Eco*R V 重组质粒的酶切鉴定    *Eco*R V digestion of plasmid  
图 3 pPK-LacZ(反向克隆)重组质粒的酶切鉴定

Fig. 3 Restriction pattern of pPK-LacZ, a reversed clone

3 讨论

基因 DNA 片段的酶切、连接、重组是进行分子克隆的基本步骤,而关键之处在于连接及其效率. 例如为了提高连接效率,当前正流行一种所谓“T”载体<sup>[7]</sup>,即是利用 PCR 产物末端经常有个额外的 A 碱基,那么利用末端转移酶在平端载体末端加上一个 T 碱基,使 A-T 互补配对,这样既可减少引物设计时添

加限制性酶切位点和保护碱基的费用, 又可简化克隆步骤。根据这一思路, 作者利用选择性部分补平法, 使载体和插入子末端各补上两个碱基后, 剩余两个碱基能相互配对, 成为粘端, 大大提高了克隆效率。与载体单一酶切口相比, 既不需要用碱性磷酸酶作去磷酸化处理, 载体本身也不会环化; 同时插入子经部分补平后, 又不会形成寡聚串联体, 只有插入子与载体之间才形成碱基互配。

伪狂犬病毒基因组庞大, 含有多个非必需基因或片段, 可供外源基因插入, 适于构建活载体疫苗<sup>[8]</sup>。本文以 PRV PK 基因作为重组双臂, 以  $\beta$ -LacZ 为报告基因, 成功构建了重组转移载体, 通过 X-gal 的显色反应, 确定了  $\beta$ -LacZ 基因的瞬时表达。在瞬时表达试验中, 反向克隆的重组质粒转染细胞, 显示有较高活性, 其原因有待进一步研究。本研究为重组转移载体的构建建立了一种简便的有效方法。

参考文献:

[1] 许伟琦, 朱璇, 孙泉云, 等. 猪伪狂犬病病毒的分离鉴定[J]. 中国兽医科技, 1998, 28(3): 23~24.

[2] 陈焕春, 方六荣, 何启盖, 等. 猪伪狂犬病病毒鄂 A 株的分离鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 1998, 29(2): 156~161.

[3] CARD J P, ENQUIST L W. Neurovirulence of pseudorabies virus[J]. Critical Reviews in Neurobiology, 1995, 9(2&3): 137~162.

[4] 罗满林, 丁建华, 王家富, 等. 伪狂犬病毒蛋白激酶基因的 PCR 扩增及其克隆鉴定[J]. 中国病毒学, 1996, 11(4): 360~364.

[5] SAMBROOK J, FRITSCH F, MANIATIS T. 分子克隆: 实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1992. 47~322.

[6] METTENLEITER T C, RAUH I A. Glycoprotein gX- $\beta$ -galactosidase fusion gene as insertional marker for rapid identification of pseudorabies virus mutants[J]. J Virological Methods, 1990, 30: 55~66.

[7] DIEFFENBACH C W, DVEKSLER G S. PCR 技术实验指南[M]. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 1998. 338.

[8] METTENLEITER T C. Genetically engineered pseudorabies virus live vaccines: novel concepts of vaccination and eradication[A]. MONETTI P G, VIGNOLA G. Proceedings of the 14<sup>th</sup> IPVS Congress [C]. Bologna: Press Point-Abbiategrosso(MI), 1996. 30~31.

Rapid Construction of the Gene Transfer Vector of Pseudorabies Virus and Its Transient Expression *in vitro*

LUO Man-lin<sup>1</sup>, DING Jian-hua<sup>2</sup>, LIU Zhen-ming<sup>1</sup>, YUAN Shao-hua<sup>1</sup>, ZHANG Chu-yu<sup>2</sup>, WANG Jia-fu<sup>2</sup>  
(1 Dept. of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;  
2 Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** A gene expression cassette with molecular size of the insert, a recombinant plasmid containing the PK gene of PRV, equal to vector was cloned through partial repair of the terminal ends of insert and vector, thus transforming them from nonadherent to adherent ones. The constructed gene expression vector of PRV with the report gene was further identified by endonuclear enzyme analysis and the biological activity of expression vector was recognized directly through transfecting cells to detect its transient expression *in vitro*.

**Key words:** pseudorabies virus; gene expression cassette; partial repair; molecular cloning; transient expression

【责任编辑 柴 焰】