

伪狂犬病毒粤 A 株 gE 基因真核表达质粒的构建

吴德铭, 黄毓茂, 罗满林, 刘镇明, 鄢苏晓

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 根据伪狂犬病毒(PRV)NIA-3 和 Rice 株的 gE 基因序列, 设计了 1 对含有起始密码子和 *Hind* III、*Bam* HI 酶切位点的引物, 以 PRV 粤 A 毒株(PRV-YA)基因组为模板, 利用聚合酶链反应(PCR)扩增获得 gE 基因片段, 将这一片段克隆至 PMD18-T 载体中, 获得重组质粒 PMD18-gE; 用 *Hind* III和 *Bam* HI 酶切该重组质粒, 回收得到含有以上 2 个酶切位点粘端的 gE 基因, 将此基因片段克隆至相同酶切、回收后的 pcDNA3.1(+)真核表达载体中, 获得真核表达重组质粒 pcDNA3.1-gE, 经 PCR 鉴定、限制性内切酶分析和克隆片段的序列测定、比较, 证实了克隆片段的可靠性。

关键词: 伪狂犬病毒; 聚合酶链反应; gE 基因; PMD18-T 载体; pcDNA3.1(+)真核表达载体

中图分类号: S852.659.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2003)03-0069-04

伪狂犬病(pseudorabies, PR)是猪的一种重要传染性疾病, 其病原伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)属于疱疹病毒科 α -病毒亚科, 由一封闭的核衣壳以及环于其中的约 145 kb 的线性 DNA 组成; gE、gI、TK 等基因是 PRV 的毒力基因, 由它们编码的糖蛋白是病毒的非必需糖蛋白, 因此缺失这些基因并不影响病毒的自身复制, 相反可以降低 PRV 的毒力^[1-3]; 在此研究的基础上, 国外学者已经研制、开发出多种伪狂犬病基因缺失疫苗, 及其相关的血清学鉴别诊断技术^[4,5], 为伪狂犬病的防治提供了新的手段和策略。我国作为一个养猪大国, 随着养猪业的迅速发展, 伪狂犬病的危害日趋突出, 因此有必要对伪狂犬病进行净化。生产中一般采用伪狂犬病 gE 基因缺失疫苗免疫猪群, 结合 gE 鉴别诊断试剂盒检测猪血清抗体, 淘汰 gE 抗体阳性猪的方法净化猪群。PRV gE 鉴别诊断试剂盒目前主要依靠从国外进口, 但是进口试剂盒价格昂贵, 且我国养猪数量多, 完全依靠花费巨额外汇进口试剂盒显然不现实, 因此有必要研制、开发国产伪狂犬病 gE 鉴别诊断试剂盒。本研究旨在利用载体 pcDNA3.1(+)可以在哺乳动物细胞中表达的特性, 依据课题组先前的研究结论, 选用 PRV 粤 A 毒株(PRV-YA)基因组作为模板^[6], 构建 PRV gE 基因真核表达质粒, 为进一步研制抗 PRV gE 糖蛋白单克隆抗体、建立特异性 ELISA 诊断试剂盒奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒、质粒和工程菌

HS-2H 细胞由广州市检验检疫局惠赠; 伪狂犬

病毒粤 A 株(PRV-YA)由华南农业大学兽医学院传染病教研室由野外爆发病例中分离、鉴定并保存; 真核表达载体质粒 pcDNA3.1(+)购自 Invitrogen 公司; PMD18-T 载体质粒购自宝生物工程(大连)有限公司; 基因工程菌 DH₅ 由华南农业大学兽医学院传染病教研室保存。

1.2 试剂与工具酶

细胞基础培养基 DMEM 为 Gibco BRL 公司产品; 新生小牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所; 核酸内切酶 *Hind* III、*Bam* HI、*Eco* RI 和 dNTPs 购自宝生物工程(大连)有限公司; 1 000 bp Ladder 分子量标记购自北京鼎国生物科技发展有限公司; L-Glutamine、RNA 酶、T4DNA Ligase、200 bp Ladder 分子量标记、 λ DNA/*Eco* RI + *Hind* II 分子量标记购自华美生物工程公司; *Taq* DNA 聚合酶为加拿大真达公司产品; UNIQ-5 柱离心式 DNA 胶回收试剂盒购自上海生物工程技术服务有限公司。

1.3 引物的设计与合成

参照伪狂犬病毒 NIA-3 和 Rice 株的 gE 基因序列, 设计了 1 对引物, 在上游引物中加入了 *Hind* III 酶切位点以及 ATG 起始密码子; 下游引物引入 *Bam* HI 酶切位点以及 2 个终止密码子。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

上游引物: 5' AAG CTT ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC GGC GAC GAT GAC 3';

下游引物: 5' GGA TCC TCA TCA GGG CGA GAA GAG CTG 3'.

1.4 病毒基因组的提取

取适量 PRV-YA 种毒接种生长良好的 HS-2H 细

胞,待细胞出现 90% CPE 时,收获病毒,参照文献[7] 的方法抽提病毒基因组。

1.5 PRV gE 基因的扩增

以所抽提的 PRV-YA 基因组为模板,进行 PCR 扩增,反应体系如下:10×PCR 缓冲液 5 μL, dNTPs(2 mmol/L) 5 μL, 二甲基亚砜(DMSO)5 μL, 上、下游引物各 2.5 μL, 模板 0.5 μL, Taq 酶(2.5 U)0.5 μL, 灭菌双蒸水补至 50 μL。反应条件:94℃预变性 4 min;再以 94℃30 s, 56℃30 s, 72℃30 s, 进行 25 个循环;最后 72℃延伸 7 min。PCR 产物在 0.01 g/mL 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL EB)中电泳检测。

1.6 gE 基因的克隆

(1) PMD18-gE 的构建:用 UNIQ-5 柱离心式 DNA 胶回收试剂盒回收 PCR 扩增获得的 DNA 片段,将回收的目的片段与 PMD18-T 载体连接、转化,挑取白色菌落培养,作菌落 PCR 鉴定;碱裂解法^[8]少量提取 PCR 阳性菌落质粒 DNA,用 EcoRI 和 Hind III 双酶切以及 EcoRI 单酶切鉴定重组质粒。最后,命名酶切鉴定正确的质粒为 PMD18-gE。

(2) 真核表达质粒 pcDNA3.1-gE 的构建:用 BamHI 和 Hind III 分别双酶切真核表达载体质粒 pcDNA3.1(+)和重组质粒 PMD18-gE,按照 UNIQ-5 柱离心式 DNA 胶回收试剂盒说明书分别回收 pcDNA3.1(+)和 gE 片段,同样方法进行连接、转化,挑取白色菌落培养物进行重组质粒鉴定,命名初步鉴定阳性的重组质粒为 pcDNA3.1-gE。

1.7 目的基因的序列测定与鉴定

将经过初步鉴定的重组质粒 pcDNA3.1-gE 送上海博亚生物技术有限公司进行序列测定。获得目的基因序列后,借助分析软件,将目的基因序列与 PRV Rice 株 gE 基因进行核苷酸和氨基酸同源性比较。

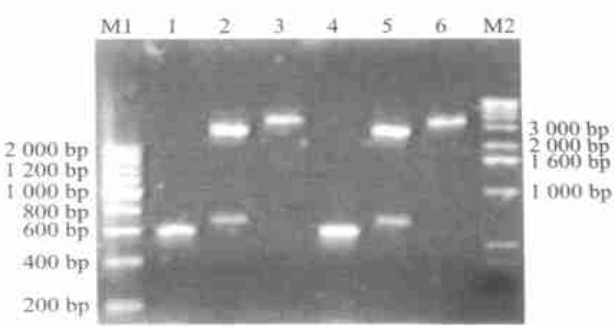
2 结果

2.1 gE 基因片段的扩增

以 PRV-YA 基因组为模板,用所设计的引物进行 PCR 扩增,一次性地扩增出所需要的 gE 基因片段。在 0.01 g/mL 的琼脂糖凝胶中电泳,可见到 1 条大小约 600 bp 的特异条带,与预计产物的长度相符合,证明反应体系及反应条件合适。

2.2 重组质粒 PMD18-gE 的鉴定

以重组质粒 PMD18-gE 为模板,进行 PCR 扩增,可以得到 1 条约 600 bp 的特异条带;用 EcoRI 和 Hind III 双酶切该重组质粒,可获得 1 条约 680 bp 的小片段和 1 条约 2.62 kb 的大片段;用 EcoRI 单酶切后,可获得 1 条 3.29 kb 的电泳条带(图 1)。



M1 200 bp Ladder 分子量标记; 1, 4. PMD18-gE 重组质粒①、②PCR 产物; 2, 5. EcoRI + Hind III 双酶切 PMD18-gE 重组质粒①、②; 3, 6. EcoRI 单酶切 PMD18-gE 重组质粒①、②; M2 1 000 bp Ladder 分子量标记

M1 200 bp Ladder Marker; 1, 4. PCR products of PMD18-gE①、②; 2, 5. PMD18-gE①、②/ EcoRI + Hind III; 3, 6. PMD18-gE①、②/ EcoRI; M2 1 000 bp Ladder Marker

图 1 PMD18-gE 重组质粒酶切鉴定

Fig. 1 Results of PCR and digestion of recombinant PMD18-gE

2.3 重组质粒 pcDNA3.1-gE 的鉴定

以重组质粒 pcDNA3.1-gE 为模板,进行 PCR 扩增,可以得到 1 条约 600 bp 的特异条带;用 EcoRI 与 Hind III 双酶切及用 EcoRI 单酶切鉴定;质粒双酶切后可获得 1 条约 610 bp 的小片段和 1 条约 5.4 kb 的大片段,单酶切后可获得 1 条约 6.0 kb 的电泳条带(图 2)。



M1 200 bp Ladder 分子量标记; 1. pcDNA3.1-gE 质粒 PCR 产物; 2. EcoRI + Hind III 双酶切 pcDNA3.1-gE 重组质粒; 3. EcoRI 单酶切 pcDNA3.1(+)载体质粒; 4. EcoRI 单酶切 pcDNA3.1-gE 重组质粒; M2 λDNA/ EcoRI + Hind III 分子量标记

M1 200 bp Ladder Marker; 1. PCR product of pcDNA3.1-gE; 2. pcDNA3.1-gE/ EcoRI + Hind III; 3. pcDNA3.1(+) / EcoRI; 4. pcDNA3.1-gE/ EcoRI; M2 λDNA/ EcoRI + Hind III Marker

图 2 pcDNA3.1-gE 重组质粒酶切鉴定

Fig. 2 Results of PCR and digestion of recombinant pcDNA3.1-gE

2.4 目的基因的测序鉴定

借助分析软件,将重组质粒(Yue-A)插入片段的测序结果与 PRV-Rice 株 gE 基因序列进行比较(图 3),二者核酸同源性达到 97.5%,推导氨基酸同源性为 95.3%,证实重组质粒中的插入片段为 PRV gE 基因;

阅读框架正确, 表明该重组真核表达质粒 pcDNA3. 1- gE 可以在哺乳动物细胞进行正确的翻译表达.

Yue-A	GGCGACGATGACCTCGACGGCGACCTCAACGGCGACCTCGACG T CGACGA	50
Rice	----- G -----	
Yue-A	CCGCCGCGCGGGCTTCGGCTCGGCCCTCGCCTCCCTGAGGGAGGC G CCCC	100
Rice	----- A -----	
Yue-A	CGGCCCATCTGGTGAACGTGTCCGAGGGCGCCAACCTTCACCCTCGACGCG	150
Rice	-----	
Yue-A	CGCGGCGACGGCGCCGT G CTGGCCGGGATCTGGACGTTCTGCCCCGTCCG	200
Rice	----- G -----	
Yue-A	CGGCTGCGACGCCGT T CGGTGACCAC G GTGTGCTTCGAGACCGC G TGCC	250
Rice	----- G ----- T ----- C -----	
Yue-A	ACCCGGACCTGGTGCTGGGCCGCGCCTGCGTCCCCGAGGCCCGGAG ATG	300
Rice	----- CG -----	
Yue-A	GGCATCGGCGACTACCTGCCGCCCGAGGTGCCGCGGCTCC G GCGCGAGCC	350
Rice	----- A -----	
Yue-A	GCCCATCGTCACCCCGGAGCGGTGGTCGCCGCACCTGAG G CGTCC T GCGGG	400
Rice	----- C ----- G -----	
Yue-A	CCACGCCCAACGACACGGGCCTCTACACGCTGCACGACGCCTCGGGGCCG	450
Rice	-----	
Yue-A	CGGGCCGTGTTCTTTGTGGCGGTGGGCGACCGGCCGCCCGCGCC G CGGA	500
Rice	----- CT ----- C	
Yue-A	CCCGGTGGGCCCCGCGGCCACGAGCCCCGCTTCCACGCGCTCGGCTTCC	550
Rice	-----	
Yue-A	ACTCGCAGCTCTTCTCGCCC	570
Rice	-----	

图 3 PRV gE 基因核酸序列比较
Fig. 3 Comparison of nucleotide sequence of PRV gE genes

3 讨论

考虑到重组质粒最终要在哺乳动物细胞中进行表达, 在引物设计时, 加入了起始密码子 ATG 以及终止密码子 ACT; 为便于克隆的需要, 在上游引物中引入了 *Hind* II 酶切位点, 在下游引物中引入 *Bam*H I 酶切位点; 为了解决体外表达时的纯化问题, 在引物中加入了 6 个组氨酸密码子. 由于考虑到引物的长度以及可能形成二聚体和发夹结构, 在引物的设计中未在酶切位点前添加保护性碱基, 因此将 PCR 扩增获得的目的基因先克隆至 PMD18-T 载体中, 构建获得重组质粒 PMD18-gE, 然后用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切 PMD18-gE 质粒, 回收获得含有以上 2 个酶切位点粘端的 gE 基因, 再与同上方法酶切、回收的 pcDNA3. 1 (+) 真核表达载体相连接, 通过转化最终获得真核表达质粒 pcDNA3. 1-gE.

gE 基因是伪狂犬病毒的主要毒力基因之一, 它可以影响病毒在细胞间的扩散, 促进病毒从视网膜、

嗅觉上皮细胞、三叉神经节转移到中枢神经^[9]; 由它编码的 gE 糖蛋白是伪狂犬病毒的非结构蛋白, 许多实验表明, 缺失 gE 基因的伪狂犬病毒可以在宿主鼻粘膜上皮细胞内复制^[10, 11], 因此, 缺失 gE 基因并不影响伪狂犬病毒在宿主体内的繁殖, 相反可以抑制病毒对宿主中枢神经的侵害, 降低病毒的毒力. PRV gE 蛋白的主要抗原表位存在于第 52 ~ 238 位氨基酸之间, 因此本实验扩增了 PRV-YA 株 gE 的主要抗原表位基因, 将其与 PRV Rice 株进行核苷酸和氨基酸同源性比较, 发现二者核苷酸同源性为 97 %, 氨基酸同源性 95. 3 %; 另外与 PRV-SH (中国上海分离株)、PRV-Ea (中国湖北分离株) 毒株比较, 核酸同源性均大于 99 %, 氨基酸同源性均大于 98. 4 %, 由此说明伪狂犬病毒 gE 基因的保守性很高, 不同毒株之间的变异很小, 因此, 选用一种毒株制备的抗 gE 单克隆抗体将可以与其他 PRV 毒株发生特异性的结合, 选用一种毒株作为抗原亦可以与其他毒株诱导产生的抗体发生特异性的免疫学反应.

在成功构建真核表达质粒 pcDNA3.1-gE 的基础上,广东省科技计划项目(2KM03507N)课题组将以此表达质粒作为免疫原,制备相应的单克隆抗体.利用真核表达质粒免疫动物制备单克隆抗体为这一领域的发展提供了一种新的方法,具有广阔的应用前景,有着常规方法无法比拟的优势:常规的单抗制备方法需要获得大量纯化的抗原,而基因免疫的抗原用量却很少,抗原也容易纯化;应用基因工程的方法,人为的设计抗原,可以获得所要的外源基因片段,甚至单一抗原决定簇;DNA 质粒容易通过体外培养、提纯的方法大量获得,保存与运输也非常稳定可靠;质粒 DNA 免疫原性良好,可以诱导机体产生体液和细胞免疫;基因免疫效果持久,外源基因可以长期在体内进行表达,刺激机体免疫系统,省却了加强免疫的步骤^[12,13];对于一些烈性传染病,使用基因免疫制备单抗,显然可以很好的解决这类生物安全性问题.

参考文献:

- [1] 斯特劳 B E, 阿莱尔 S D, 蒙加林 W L 等. 猪病学[M]. 第8版. 赵德明, 张中秋, 沈建忠, 等译. 北京: 中国农业大学出版社, 2000. 239—253.
- [2] KIMMAN T G, de WIND N, de BRUIN T, et al. Inactivation of glycoprotein gE and thymidine kinase or the US3-encoded protein kinase synergistically decreases *in vivo* replication of pseudorabies virus and the induction of protection immunity [J]. *Virology*, 1994, 205: 511—518.
- [3] MCGREGOR S, EASTERDAY B C, KAPLAN A S, et al. Vaccination of swine with thymidine kinase-deficient mutants of pseudorabies virus [J]. *Am J Vet Res*, 1985, 46(7): 1494—1497.
- [4] KINKER D R, SWENSON S L, WU L L, et al. Evaluation of serological tests for the detection of pseudorabies gE antibodies during early infection [J]. *Vet Microbiol*, 1997, 55(1—4): 99—106.
- [5] MORENKOV O S, FODOR N, FODOR I. Indirect ELISAs based on recombinant and affinity-purified glycoprotein E of Aujeszky's disease virus to differentiate between vaccinated and infected animals [J]. *Acta Vet Hung*, 1999, 47(1): 137—150.
- [6] 石迎新, 罗满林, 黄毓茂, 等. PRV gE 抗原表位基因的序列分析. 华南农业大学学报, 2002, 23(4): 71—74.
- [7] 罗满林, 丁建华, 刘镇明, 等. 伪狂犬病毒基因转移载体的快速构建及瞬时表达 [J]. 华南农业大学学报, 2000, 21(2): 79—81.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1992. 19—22.
- [9] 姜 焱, 汪海健, 祁 贤, 等. 伪狂犬病毒上海株 gE 基因克隆及其含 GFP 基因质粒载体的构建 [J]. 中国兽医科技, 2001, 31(10): 5—7.
- [10] BABIC N, KLIPP B G, BRACK A, et al. Deletions of glycoprotein gE reduces the propagation of pseudorabies virus in the nervous system of the mouse after intranasal inoculation [J]. *J Virology*, 1996, 219: 279—284.
- [11] KRITAS S K, PENSART M, METTENLEITER T C, et al. Invasion and spread of single glycoprotein deleted mutants of Aujeszky's disease virus (ADV) in the trigeminal nervous pathway of pigs after intranasal inoculation [J]. *J Vet Microbiol*, 1994, 40: 323—334.
- [12] CASELLI E, BETTI M, GROSSI M P, et al. DNA immunization with HIV-1 tat mutated in the trans activation domain induces humoral and cellular immune responses against wild-type tat [J]. *Immunol*, 1999, 162(9): 5631—5638.
- [13] TURNES C G, ALEXO J A, MONTEIRO A V, et al. DNA inoculation with a plasmid vector carrying the *faeG* adhesin gene of *Escherichia coli* K88ab induced immune responses in mice and pigs [J]. *Vaccine*, 1999, 17(15—16): 2089—2095.

Construction of an Eukaryotic Expression Plasmid for gE Gene of Pseudorabies Virus Strain Yue-A

WU De-ming, HUANG Yu-mao, LUO Man-lin, LIU Zhen-ming, WU Su-xiao

(College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Based on the gE nucleotide sequence of PRV strains NIA-3 and Rice, a pair of primers were designed. Using the genome DNA of the strain Yue-A of PRV, which was isolated from an outbreak in Guangdong Province, as template, a segment of gE was amplified by polymerase chain reaction (PCR), and a fragment with the expected size was obtained. The gE gene fragment was cloned into PMD18-T vector, and the recombinant plasmid named PMD18-gE obtained. The gE fragment was recovered after the plasmid PMD18-gE was digested with *Hind* III and *Bam* H I, then was cloned into the mammalian expression vector pcDNA3.1(+). Finally, a recombinant plasmid named pcDNA3.1-gE, which was identified by PCR, restriction enzyme analysis and sequencing, was obtained.

Key words: pseudorabies virus; PCR; gE gene; PMD18-T vector; mammalian expression vector pcDNA3.1(+)

【责任编辑 柴 焰】