

鸡新城疫病毒 F 基因高效真核表达质粒的构建*

邓明俊¹, 张彦明¹, 梁 荣², 段明星²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨陵 712100; 2 清华大学 生物科学与技术系, 北京 100084)

[摘 要] 为进一步研究基因疫苗的免疫机制和基因疫苗的免疫效果, 应用 DNA 重组技术, 根据载体 pCDNA 4.0/HisMax 的多克隆位点设计引物, 对含有 NDV 保护性抗原基因 F 的质粒 PCR 扩增, 将得到的目的片段插入到载体的启动子下游, 成功得到含有 NDV F 基因的真核表达质粒载体 PC4F 的基因疫苗。

[关键词] 鸡新城疫病毒; F 基因; 基因疫苗

[中图分类号] Q 784

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)02-0009-04

新城疫病毒属于副粘病毒科, 副粘病毒亚科, 腮腺炎病毒属, 是一种含有囊膜的负链 RNA 病毒^[1,2]。新城疫是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的一种急性败血性传染病, 对养禽业危害严重。NDV 共有 HN、F、M、NP、P、L 6 种结构蛋白。其中 HN 蛋白和 F 蛋白构成 NDV 囊膜表面的大纤突和小纤突, 在免疫应答和致病过程中起着极其重要的作用。HN 蛋白在病毒侵染过程中起识别受体的作用, 而 F 蛋白则介导病毒与宿主细胞及宿主细胞间的融合。许多试验证明, F 和 HN 基因均是新城疫病毒的保护性抗原基因, 用真核细胞表达系统表达的 F 蛋白免疫动物对强毒的攻击有较好的保护作用。单克隆抗体研究结果表明, F 蛋白有多个中和位点, 是 NDV 重要的保护性抗原之一。用 NDV 的 F 基因与真核表达载体重组构建的基因疫

苗直接免疫鸡后, 通过抗体监测和攻毒试验证明, 可诱导机体的免疫应答和耐受强毒攻击^[3]。为此, 本实验室从国外引进一个高效的真核细胞表达载体 pCDNA 4.0/HisMax, 并将 NDV 的 F 基因与其重组构建了新城疫病毒的 F 基因的基因疫苗, 为探讨基因疫苗的免疫机理和提高基因疫苗的免疫效果奠定了一定基础。现将构建过程和结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 质粒和载体

含 NDV F 基因(F 基因来自 NDV D26 株)的真核表达质粒 PCF 由哈尔滨兽医研究所陈洪岩博士惠赠; 真核表达载体 pCDNA 4.0/HisMax 购自 Invitrogen 公司。pCDNA 4.0/HisMax 质粒载体的物理图谱见图 1。

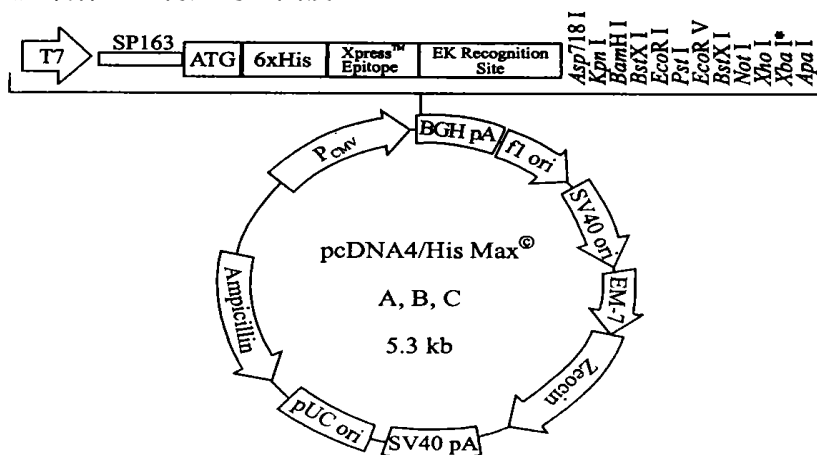


图 1 pCDNA 4.0/HisMax 载体的物理图谱

A 型质粒紧接 Xba I 后有一个终止密码子

Fig 1 Picture of pCDNA 4.0/HisMax

There is a stop codon following the Xba I site in version A

[收稿日期] 2002-10-09

[基金项目] 国家“九五”科技攻关项目(96-C01-04-01)

[作者简介] 邓明俊(1974-), 男, 新疆奇台人, 硕士, 主要从事基因疫苗方面的研究。E-mail: dengmij@133165.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 菌株及细胞系

E. coli DH5 α 由清华大学生物系结构生物学实验室庞海副教授惠赠, 感受态细胞自制。

1.3 工具酶及主要试剂

各种限制性内切酶、T4DNA 连接酶购自 Promega 公司; Taq plus DNA 聚合酶、dNTP、 λ DNA/HindIII+*EcoR*I 双酶切 Marker 购自上海生物工程公司; DNA 快速纯化回收试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自博大公司; 其余试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.4 含有表达融合蛋白 F 基因真核质粒的构建

1.4.1 NDV F 基因的 PCR 扩增 根据 PCF 质粒 F 基因的序列和 pDNA 4.0/HisMax(+)(A) 载体多克隆酶切位点的序列, 分别设计了一对引物 F1、R1。利用这 2 对引物, 可以扩增 F 基因从 ATG 到终止子 TAG, 全长 1 662 bp 的片段, 引物的序列及引入的酶切位点如下:

F1: 5' TCGGATATCTGGCCCCAAA TCTTCTACCA G3'

EcoR V

R1: 5' A TATCTCGA GA GTTCTTGTAGTGGCCCTCA 3'

Xho I

引物的合成在 TAKARA 公司(大连分公司)进行, 合成的引物以灭菌 ddH₂O 稀释至使用浓度 25 μ mol/L, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

取 PCF 质粒适量, 加入 10 $\times$ Taq Plus buffer 5 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, 上下游引物各 1 μ L (25 μ mol/L)、Taq Plus DNA 聚合酶 1 μ L (5 Mu/L), 最后以 ddH₂O 将终体积调至 50 μ L, 混匀, 于 PCR 仪上进行扩增, 同时设置不加 PCF 的阴性对照。循环参数为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增完毕后, 取 5 μ L 用 0.9% 琼脂糖凝胶电泳 40 min, 观察结果, 并按博大公司 PCR 产物回收试剂盒说明书进行回收, 回收后取 1 μ L 电泳并观察。

1.4.2 PCR 回收产物及载体酶切 回收的 PCR 产物经 *EcoR* V + *Xho* I 双酶切, 同时载体 pDNA 4.0/HisMax 也分别进行双酶切, 酶切后的产物均需用博大公司 DNA 回收试剂盒进行回收, 回收后各取 1 μ L 电泳, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4.3 目的基因与载体的连接、转化 参照分子克隆实验指南^[4], 分别将酶切的目的基因与载体按 4:1 的体积比混合, 在 T4 DNA 连接酶的作用下 15 $^{\circ}$ C 过夜, 将连接产物转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞并涂布平板, 挑选单个菌落提取质粒进行酶切

和 PCR 鉴定。

2 结果与讨论

2.1 NDV F 基因真核表达质粒的构建

采用设计的引物, 对含 NDV F 基因的 PCF 质粒进行 PCR 扩增、酶切, 连接到 pDNA 4.0/HisMax, 并转化至 DH5 α 感受态细胞, 挑取疑为阳性的菌落提取质粒, 经酶切和 PCR 鉴定得到 1 个阳性重组子, 命名为 PC4F, 结果见图 2。



图 2 PC4F 重组子电泳结果

1. Marker; 2. pDNA 4.0/HisMax *EcoR* I 酶切;
3. PC4F *EcoR* V + *Xho* I 双酶切; 4. PC4F *EcoR* V 单酶切
Fig. 2 The electrophoresis result of recombinant PC4F
1. Marker; 2. pDNA 4.0/HisMax *EcoR* I restriction enzyme digest;
3. PC4F *EcoR* V + *Xho* I restriction enzyme digest;
4. PC4F *EcoR* V restriction enzyme digest

由电泳结果可看出, 对重组子进行 PCR 扩增得出了所要求的大小为 1 662 bp 的目的基因, 用 *EcoR* V 和 *Xho* I 对重组子 PC4F 进行酶切也得到了相同大小的线形 DNA 条带和一条大小约为 5.3 kb 的载体带。说明 PC4F 重组质粒含有按设计所要求的 F 基因。

2.2 PC4F 测序结果

对测序结果的分析表明, 构建的重组质粒 PC4F 序列与设计结果完全相符。PC4F 核苷酸和推导的氨基酸序列见图 3。测序工作由 TAKARA 公司大连分公司进行, 测序结果以 Bionet 软件进行分析。图中分别标出了载体上的 T7 启动子、QBI SP163 t 翻译增强子、6 $\times$ His 和 Xpress 位点以及 NDV F 基因信号肽(F 基因 1~32 氨基酸)、F₁ 和 F₂ 片段、裂解位点(116 位氨基酸), 该处只有 1 对碱性氨基酸为弱毒株的典型特征。* 是 NDV D26 毒株的 5 个潜在的糖基化位点, 该位点在 NDV 非常保守。初步鉴定的阳性克隆测序结果显示, F 基因被正确地插入到表达载体启动子的下游, 说明本研究成功构建了含有新城疫病毒 F 基因的载体质粒, 即基因疫苗。

ATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTAGCGCAGAGGCTTGGTGACGCCG
 T7 promoter/priming site(启动子位点)
 AGCGGCAGCC AGGCCCCGGCCCGGGCTCGGTTCCAGAAGGGAGAGGAGCCCGCCAAGGCGCGCAAGAGAGCGGGC
 TGCTCGCAGTCCGAGCCGGA GAGGGAGCGCGAGCCGCGCCGCGCCCGCGCCGCTCCGAAAC
 QBI SP163 translational enhancer (翻译增强子)
 1 ATGGGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCTGTACGA 80
 M G G S [H H H H H H] G M A S M T G G Q Q M G R [D L Y D]
 6×His(组氨酸) Xpress™ Epitope (抗原决定)
 81 CGATGACGATAAGGTACCTAGGATCCAGTGTGGTGAATTCTGCAGATATCTGGCCCCAAATCTTACCAGGATCCCAG 160
 [D D D K] V P R I Q C G G I L Q I S G P K S S T R I P
 161 TACCTCTGATGCTGACCGTCCGAATCATGTTGGCACTGAGTTGCGTCTGTCCGACCAGCTCCCTTGATGGCAGGCCTCTT 240
 V P L M L T V R I M L A L S C V C P T S S L D G R P L
 signal I peptide(信号肽)
 241 GCAGCTGCAGGGATTGTGGTAACAGGAGACAAAGCAGTCAACATATACACCTCATCTCAGACAGGGTCAATCATAATCAA 320
 A A A G I V V T G D K A V N I Y T S S Q T G S I I I K
 F2
 321 GTTACTCCCAAATATGCCAAAGGATAAAGAGGCGTGTGCAAAAGCCCCATTGGAAGCATACAACAGGACATTGACTACTT 400
 L L P N M P K D K E A C A K A P L E A Y N R T L T T
 401 TGCTACCCCCCTTGGTGATTCTATCCGTAGGATACAAGAGTCTGTGACCACATCCGGAGGAGGGAACAGGGACGTCTT 480
 L L T P L G D S I R R I Q E S V T T S G G G K Q G R L
 split site(裂解位点)
 481 ATAGGCGCCATTATCGGTGGTGTAGCTCTCGGGTTGCAACCGCTGCACAGATAACAGCAGCCTCGGCTCTGATACAAGC 560
 I G A I I G G V A L G V A T A A Q I T A A S A L I Q A
 F1
 641 GATTATCACAACCTAGCAGTGGCAGTTGGGAAGATGCAGCAATTTGTTAATGACCAGTTTAATAAAACAGCTCAGGAATTG 720
 G L S O L A V A V G K M O O F V N D O F N K T A O E L
 721 GACTGTATAAAATACACAGCAGGTTGGTGTAGAACTCAACCTGTACCTAACTGAATTGACTACAGTATTGGGGCCACA 800
 D C I K I T O O V G V E L N L Y L T E L T T V F G P O
 801 AATCACTTCCCTGCCTTAACCTAGCTGACTATCCAGGCGCTTACAATCTAGCTGGTGGGAATATGGATTACTTGTGTA 880
 I T S P A L T O L T I O A L Y N L A G G N M D Y L L
 881 CTAAGTTAGGTGTAGGAAACAACCAACTCAGCTCATTAATTGGTAGTGGCTGATTACCGGCAACCTATCCTGTACGAC 960
 T K I G V G N N O I S S I I G S G L I T G N P I L Y D
 961 TCACAGACTCAACTCTGGGTATACAGGTACCTACCCTCAGTCGGGAATCTAAATAATATGCGTGCCACCTACCTGGA 1040
 S O T Q L L G I Q V T L P S V G N L N N M R A T Y L E
 1041 AACCTTGTCTGTAAAGTACAACCAAGGATTTGCCTCAGCACTTGTCCCAAAAGTAGTGACACAGGTTGGTTCGGTGATAG 1120
 T L S V S T T K G F A S A L V P K V V T O V G S V I
 1121 AAGAGCTTGACACCTCGTACTGTATCGAGACCGATTGGACCTATATTGTACAAGAATAGTGACATTCCTATGTCTCCT 1200
 E E L D T S Y C I E T D L D L Y C T R I V T F P M S P
 1201 GGTATTATTCCTGTTTGTAGTGGCAATACATCTGCTTGATGTATTCAAAGACTGAAGGCGCACTCACTACGCCGTATAT 1280
 G I Y S C L S G N T S A C M Y S K T E G A L T T P Y M
 1281 GACCTCAAAGGCTCAGTTATTGCCAACTGTAAGATGACAACATGTAGATGTGCAGACCCCCCGGGTATCATATCGCAGA 1360
 T L K G S V I A N C K M T T C R C A D P P G I I S O
 1361 ATTATGGAGAAGCTGTGTCTCTAATAGATAGGCAATCATGCAATATCTTATCCTTAGACGGGATAACTTTGAGGCTCAGT 1440
 N Y G E A V S L I D R O S C N I L S L D G I T L R L S
 1441 GGGGAATTTGATGCAACTTATCAAAAGAATATCTCAATAAAGATTCTCAAGTAATAGTTACAGGCAATCTTGACATCTC 1520
 G E F D A T Y Q K N I S I Q D S Q V I V T G N L D I S
 1521 GACTGAGCTTGGGAATGTCAACAACTCGATAAGTAATGCTTTGGATAAGTTAGAGGAAAACAGCAAACTAGACAAGG 1600
 T E L G N V N N S I S N A L D K L E E S N S K L D K
 1601 TCAATGTTAACTGACCAGCACATCCGCTCTTATTACCTATATCGTTTTAACTGTCATATCTCTTGATGTGGTATACTT 1680
 V N V K L T S T S A L I T Y I V L T V I S L V C G I L
 1681 AGCCTGGTCTAGCATGTACCTGATGTACAAGCAAAAGGCGCAACAGAAGACCTTGTGTGGCTTGGGAATAATACCCT 1760
 S L V L A C Y L M Y K Q K A Q Q K T L L W L G N N T L
 1761 AGACCAGATGAGGGCCACTACAAGAATCTCTCGAGTCTAG 1800
 D O M R A T T R I S R V #

图3 重组子 PC4F 核苷酸和氨基酸序列

Fig 3 The nucleotide acid and amino acid sequence of recombinant PC4F

3 讨 论

自从 1992 年 Tang^[5]将含人生长激素基因的质粒 DNA 导入小鼠表皮细胞产生抗人生长激素抗体,并首次提出 DNA 免疫的概念以来,在短短 10 年的时间里,DNA 疫苗的研究有了迅速的发展。已知 A IV、HBV、T 细胞淋巴瘤和结核等疾病的 DNA 疫苗已进入临床试验。在畜禽传染病方面,新城疫(ND)、禽流感(AI)、猪瘟(HCV)、狂犬病等传染病的 DNA 疫苗也正在研究开发中。研究者们正在尝试提高 DNA 疫苗表达效率的方法,如选择特异性高和抗原性好的保护性抗原基因、选择具有强启动子和增强子的载体,以及尝试各种 DNA 免疫的途径,如基因枪^[6]、肌肉注射、腹腔注射、口服免疫、粘膜免疫^[7,8]等,以增强机体的免疫效果,达到预防和治疗疫病的目的。

鸡新城疫是鸡的烈性传染病,是目前危害我国养鸡业的最重要的传染病之一。许多试验证明 F 和

HN 基因是新城疫病毒的保护性抗原基因,国内外许多专业人士针对该基因进行了基因疫苗及其诱导的细胞免疫和体液免疫方面的研究。但是,以往关于鸡新城疫病毒基因疫苗的研究主要采用的是一些普通质粒载体,如 pUC19、pBR322、pDNA 3.0 等。用这些载体构建的真核表达质粒虽然能达到一定免疫效果,但这些基因疫苗在动物机体内表达效率不高,免疫用量较大,成本费用相对偏高。针对基因疫苗进入真核细胞效率不高的弱点,本研究在国内首次引进了真核表达载体 pDNA 4.0/HisMax,与其他表达质粒载体相比,除具有可在哺乳动物细胞中高效表达的 CMV 强启动子、便于检测的 Myc 位点和便于分离的 6×His 外,还具有 QBISP163 翻译增强子,可使表达效率提高 10~20 倍。应用 DNA 重组技术成功地将 NDV F 基因克隆到高效真核表达质粒载体中,这为下一步进行 NDV F 基因的体外细胞表达和基因疫苗的免疫研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 殷震. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 736.
- [2] 卡尔尼克 B W. 禽病学[M]. 高福和, 刘文军, 译. 北京: 北京农业大学出版社, 1991: 427.
- [3] 白新盛, 卢景良. 禽病重大疫病生物技术防制研究[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1998: 29-33.
- [4] 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, 译. 北京: 科学出版社, 1995.
- [5] Tang D. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response[J]. Nature, 1992, 356: 152-154.
- [6] Tanelian D L. Controlled gene gun delivery and expression of DNA within the cornea[J]. Biotechniques, 1997, 23: 484-488.
- [7] Izumi Y, Yokoi S. Enhancement of mucosal immune response against HIV-1 by DNA immunization[J]. Vaccine, 2001, 19: 2995-3003.
- [8] Elizabeth J, Kingston H G. Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes[J]. Trends in Biotechnology, 2001, 19: 293-304.

Construction of highly expressed eukaryotic plasmid containing NDV F gene

DENG Ming-jun¹, ZHANG Yan-ming¹, LIANG Rong², DUAN Ming-xing²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The recombinant plasmid PC4F that contains the gene of protective antigen F of NDV was constructed by method of the PCR and restricted enzyme. The F gene was inserted into the downstream promoter of pDNA 4.0/HisMax vector. The result shows that we successfully get a DNA vaccine of NDV F gene that can be highly expressed in the eukaryotic cell in order to study the mechanism and effect of the DNA vaccine.

Key words: chicken new castle disease virus; F gene; DNA vaccine