

猪瘟病毒 E₂ 基因乳腺特异表达载体的构建^{*}

顾 玲, 王 强, 郑月茂, 安志兴, 马利兵, 张 涌

(西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为进一步研究基因疫苗的免疫机制与免疫效果, 探讨外源基因在乳腺中的定位表达, 应用重组 PCR 方法, 将猪瘟病毒(CSFV) E₂ 基因与牛 β 乳球蛋白(BLG) 5 部分调控序列连接起来, 并插入到真核表达载体 pEGFP-C1 上, 构建了含有 CSFV E₂ 基因的乳腺特异表达载体。

[关键词] 猪瘟病毒; E₂ 基因; 牛 β 乳球蛋白; 表达载体

[中图分类号] Q 784

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004) 11-0011-04

猪瘟是由猪瘟病毒引起的一种 A 类传染病, 对养猪业危害严重。猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV) 属于黄病毒科瘟病毒属, 是一种含有囊膜的正链 RNA 病毒^[1]。E₂ 囊膜蛋白是 CSFV 的主要保护性抗原蛋白, 含有高度保守的抗原决定簇, 为 CSFV 吸附和进入敏感细胞所必需, 在整个免疫应答和致病过程中起着极其重要的作用^[2]。许多研究表明^[3, 4], 应用真核细胞表达系统表达的 E₂ 蛋白免疫动物, 对强毒攻击有较好的保护作用。

乳腺生物反应器以其成本低、表达量高、表达产物生物活性好而备受人们关注。高效乳腺定位表达载体的构建是制备转基因动物乳腺生物反应器的基础和关键。 β 乳球蛋白(β -lactoglobulin, BLG) 是反刍动物乳汁中的主要乳清蛋白。Whitelaw 等^[5]指出, 羊 BLG 基因 5 侧翼序列长为 406 bp 时, 即可启动 BLG 基因的特异表达, 而牛 BLG 基因与羊 BLG 基因有 89% 的同源性, 其基因组织方式和剪切位点与绵羊 BLG 基因完全相同^[6]。因此, 一定长度的牛 BLG 基因 5 调控序列应该也可启动外源基因的特异表达。

为了生产乳腺特异性表达的 E₂ 蛋白, 本试验在已有研究的基础上, 应用重组 PCR 技术将牛 BLG 5 部分调控序列与 CSFV E₂ 基因相连, 再与真核表达载体 pEGFP-C1 (增强型绿色荧光蛋白质粒) 重组, 构建了含有 CSFV E₂ 基因的乳腺特异表达载体 (图 1), 为进一步探讨利用乳腺生物反应器生产基因疫苗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 基因和载体 CSFV E₂ 基因 (E₂ 基因来自中国猪瘟兔化弱毒 C 株兔脾组织毒, 编号为 E₂-1) 由本室保存; 1 449 bp 的牛 BLG 5 调控序列 (含有 645 bp 的 5 侧翼序列及 804 bp 的第一外显子、第一内含子, 编号为 BLG-1) 由本室硕士生石玉强提供; 克隆载体 pMD18-T 购自大连宝生物公司; 真核表达载体 pEGFP-C1 购自 Clontech 公司。

1.1.2 菌株及细胞系 *E. coli* DH5 α 由本室保存, 感受态细胞自制。

1.1.3 工具酶及主要试剂 各种限制性内切酶、*p*fu Taq 酶、M marker 购自 MBI 公司; T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; Ex Taq 酶、小牛肠碱性磷酸酶 (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIP) 购自大连 Takara 公司; DNA Gel Extraction Kit, Plasmid Miniprep Kit 购自上海生物工程公司; 其余试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 方 法

1.2.1 CSFV E₂ 基因和 BLG 5 部分调控序列的扩增 根据 CSFV E₂-1 基因序列、牛 BLG-1 序列和载体 pEGFP-C1 的物理图谱, 分别设计 2 对引物 EF1, ER1 和 BF1, BR1。利用引物 EF1 和 ER1, 可扩增出 E₂ 基因不含信号肽和跨膜区序列约 1 017 bp 的片段。利用引物 BF1 和 BR1, 可扩增出 BLG-1 从 5 端到信号肽约 737 bp 的片段。引物的序列及酶切

* [收稿日期] 2003-09-15

[基金项目] 科技部 863 高技术研究发展计划项目 (2001AA 213081)

[作者简介] 顾 玲 (1979-), 女, 江苏南通人, 硕士, 主要从事胚胎工程及基因工程研究。

[通讯作者] 张 涌 (1956-), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程和发育生物学研究。

位点如下, 有下划线者为基因组中的序列

BF1: 5' ATTAATCCCA CGTGCCTGCACGG3'!

Ase I

BR1: 5' TGTAATCTTCCTTGCA GGCTA GCCGGGCTGGGCGCCACAA GT3'!

EF1: 5' ACTTGTGGCGCCCA GGCCCGGCTA GCCTGCAAGGAA GATTACA 3'!

ER1: 5' ATTAATTTA GAA GTAA TCCGA GTGGCGGTCA GTC3'!

Ase I

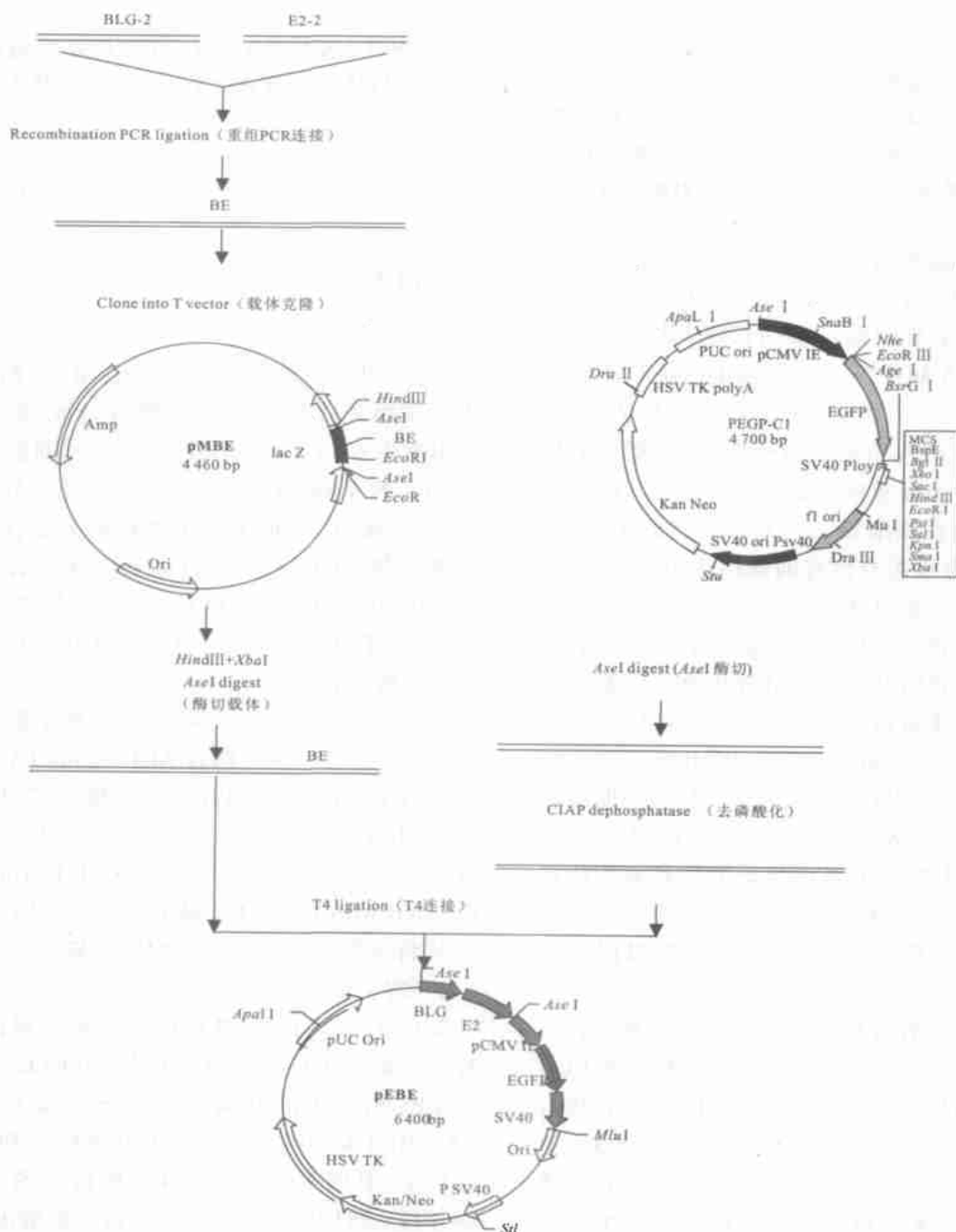


图 1 猪瘟病毒 E_2 基因乳腺特异表达载体构建示意图

Fig 1 Construction of mammary-specific expressed vector containing CSFV E_2 gene

引物合成由上海生物工程公司完成, 合成的引物以灭菌的 ddH₂O 稀释至使用浓度 10 μ mol/L, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

分别以 E_2 -1 和 BLG-1 为模板, 以 EF1, ER1 和 BF1, BR1 为引物, 用 pfu Taq 酶进行 PCR, 循环参数均为 94 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循

环后, 72 °C 延伸 10 min, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 并按 PCR 产物回收试剂盒说明进行回收纯化。所得产物分别编号为 E_2 -2, BLG-2。

1.2.2 BLG 5 部分调控序列与 CSFV E_2 基因的重组 PCR 连接 以 E_2 -2, BLG-2 为模板, 以 BF1, BR1 为引物, 用 Ex Taq 酶进行重组 PCR, 循环参数为 94 °C 30 s, 59 °C 50 s, 72 °C 1 min, 30 个循环后, 72 °C 延伸 10 min, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 并回收纯化。所得片段命名为 BE。

1.2.3 BE 片段的克隆及序列测定 参照文献[7], 将 BE 片段克隆到 pMD18-T 载体 T 位点, 连接产物全量转化至感受态 *E. coli* DH5 α , 蓝白斑筛选疑似菌落提取质粒酶切鉴定。阳性菌落穿刺培养, 交由上海华大生物公司测序, 并命名为 pMBE。

1.2.4 BE 片段与 pEGFP-C1 载体的连接 由于 pMD18-T 载体上有 3 个 *Ase* I 酶切位点, 因此 pMBE 质粒经 *Hind* III, *Xba* I 双酶切和 *Ase* I 单酶切后, 才能将 BE 片段从 pMBE 质粒上卸下, 编号为

ABE。pEGFP-C1 质粒上有 *Ase* I 单酶切位点, 经 *Ase* I 单酶切 5' 端去磷酸化处理后, 用 T4 DNA 连接酶, 按 1:4 体积比与 ABE 片段混合, 室温 (22 °C) 连接 3 h, 转化至感受态 *E. coli* DH5 α , 提取质粒并酶切鉴定。阳性质粒命名为 pEBE。

2 结果与分析

2.1 BLG 5 部分调控序列与 CSFV E_2 基因的扩增、连接及序列测定

利用设计的引物和已有的片段, 分别扩增 BLG 5 部分调控序列和 CSFV E_2 基因, 再经重组 PCR 方法将二者连接为 BE 片段, 取 5 μ L PCR 产物电泳, 发现与预期的产物大小一致, 结果见图 2。BE 片段测序后, 用 BLAST 软件进行同源性分析, 结果表明, 所扩增出的 BLG-2 和 E_2 -2 与 Genbank 中已有序列同源性均大于 98%, 推测这可能是由于 Taq 聚合酶缺乏校正功能所致。这说明 CSFV E_2 基因被正确连接到 BLG 5 调控序列下游。

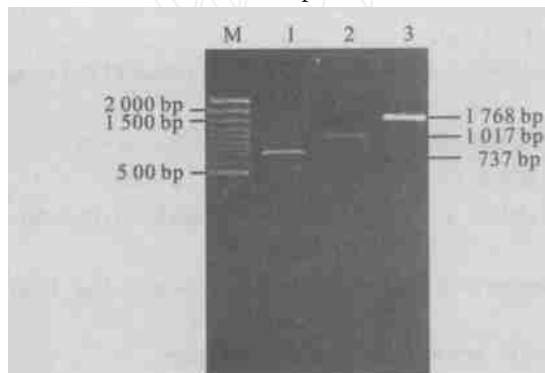


图 2 BLG-2, E_2 -2, BE 电泳结果

M: Marker; 1: BLG-2; 2: E_2 -2; 3: BE

Fig. 2 The electrophoresis results of BLG-2, E_2 -2, BE

M: Marker; 1: BLG-2; 2: E_2 -2; 3: BE

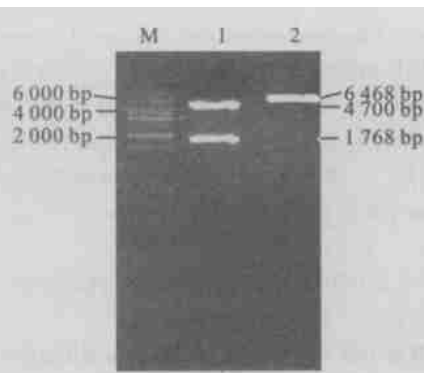


图 3 重组质粒酶切结果

M: Marker; 1: *Ase* I 酶; 2: *Mlu* I 酶切

Fig. 3 Endonuclease digestion of reconstructed plasmid

M: Marker; 1: *Ase* I digest; 2: *Mlu* I digest

2.2 CSFV E_2 基因真核表达质粒的构建

质粒 pMBE, pEGFP-C1 经酶切修饰后, 用 T4 DNA 连接酶连接, 并转化感受态 *E. coli* DH5 α , 提取质粒酶切鉴定, 结果见图 3。由图 3 可以看出, 用 *Ase* I 酶切重组质粒, 得到了要求的约 1800 bp 的条带和 1 条约 4.7 kb 的载体条带。用 *Mlu* I 单酶切后得到了 1 条约 6.4 kb 的条带。说明 pEBE 重组质粒含有设计要求的 E_2 基因, 即成功构建了含有猪瘟疫病毒 E_2 基因的载体质粒。

3 讨论

本研究通过 PCR 技术扩增出了牛 BLG 5 部分

调控序列与 CSFV E_2 基因, 并将其进行酶切、连接等修饰, 成功构建了含 CSFV E_2 基因的真核表达质粒 pEBE, 为验证表达载体构建的合理性和外源基因的表达效率奠定了基础。

本研究扩增的 E_2 基因 5' 端接有 BLG 调控成分的信号肽序列, 3' 端没有编码跨膜区的序列。有研究表明^[3], 无信号肽的质粒不能诱导 CSFV 特异性的免疫应答, 同时缺乏信号肽的 E_2 糖蛋白不能成熟, 进而影响其抗原性; 无跨膜区序列 E_2 基因的质粒与有跨膜区序列的相比, 能够诱导小鼠产生更高水平的 CSFV 特异性抗体。另外, 由于 E_2 基因没有终止密码子, 须在设计引物时加入, 因此利用该载体应该

可以产生分泌型的 E_2 蛋白。

本研究所选用的启动子是牛 β 乳球蛋白基因 5' 部分调控序列, 该序列除含有完整的 645 bp 5' 侧翼序列外, 还含有包含信号肽编码区在内的 92 bp 的第一外显子序列。该启动子含有 TATA 盒、GC 盒、NF1 结合位点等多个特异结合位点, 是指导外源基因在乳腺细胞中表达的较为理想的调控元件^[8]。本研究用 β 乳球蛋白启动子含有第一外显子部分序列, 但其起始密码子 ATG 事先已经突变修饰为 AAG, 因此不会出现融合蛋白。目前, 应用绵羊或山羊 BLG 基因 5' 调控序列作为表达载体的启动子获得转基因动物的报道较多, 选用牛 BLG 基因 5' 调控序列构建表达载体的相对较少, 而获得转基因牛比转基因羊具有更大的经济价值。

猪瘟病毒是猪的自然性传染病, 严重危害着我国的养猪业。许多研究证明, E_2 基因是猪瘟病毒的

主要保护性抗原基因。国内外许多研究人员针对该基因进行了基因疫苗及其诱导细胞免疫和体液免疫方面的研究。但主要采用的是些普通质粒载体, 这类质粒表达效率低、免疫用量大、成本相对较高。本研究针对基因疫苗导入真核细胞效率不高的缺点, 首次将猪瘟病毒 E_2 基因与牛 β 乳球蛋白 5' 调控序列进行重组连接, 并插入到 pEGFP-C1 载体上。由于该载体除具有可在哺乳动物细胞中高效表达的 CMV 强启动子、便于筛选的 Kan/neo 基因外, 还含有经过改造的荧光强度提高了 35 倍的 EGFP^[9], 因此更适合在哺乳动物细胞中表达和检测。

应用重组 DNA 技术成功地将 CSFV E_2 基因克隆到乳腺特异表达载体中, 为下一步进行 CSFV E_2 基因的体外表达和基因疫苗的免疫研究, 以及乳腺生物反应器的研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Wengler G. Classification and nomenclature of viruses[J]. Arch Virol, 1991, (2): 228- 229.
- [2] Moser C, Ruggli N, Tratschin J D, et al. Detection of antibodies against classical swine fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glycoprotein E_2 [J]. Vet Microbiol, 1996, 51: 41- 53.
- [3] 余兴发, 涂长春, 李红卫, 等. 猪瘟病毒 E_2 基因真核表达质粒载体的构建及基因疫苗的研究[J]. 中国病毒学, 2000, 15(3): 264- 271.
- [4] 周鹏程, 陆宇, 陈建国, 等. 猪瘟病毒 E_2 基因的克隆表达及其 DNA 疫苗的初步研究[J]. 微生物学报, 2000, 40(3): 243- 251.
- [5] Whitelaw C B A, Harris S. Position independent expression of the ovine β -lactoglobulin gene in transgenic mice[J]. Biochem J, 1992, 386: 31- 39.
- [6] Alexander L J, Hayes G, Bawden W, et al. Complete nucleotide sequence of the bovine β -lactoglobulin gene[J]. Anim Biotechnol, 1993, 4(1): 1- 10.
- [7] 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, 2002.
- [8] Simons J P, McClenaghan M, Clark A J. Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta-lactoglobulin in transgenic mouse[J]. Nature, 1987, 328: 530- 532.
- [9] Zolothukin S, Potter M. A humanized green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells[J]. J Virol, 1996, 70: 4646- 4654.

Construction of mammary-specific expression plasmid containing CSFV E_2 gene

GU Ling, WANG Qiang, ZHENG Yue-mao, AN Zhi-xing, MA Li-bing, ZHANG Yong

(Institute of Bio-Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The mammary-specific expression vector of pEBE was constructed with pEGFP-C1 and BE fragment. The BE fragment was gained with bovine beta-lactoglobulin (BLG) 5' regulation region and the E_2 gene of classical swine fever virus (CSFV) by the method of recombinant PCR. The results show that we could successfully get a DNA vaccine of CSFV E_2 gene that can be expressed in mammary gland cell in order to study the effect of DNA vaccine and mammary bioreactor.

Key words: classical swine fever virus; E_2 gene; bovine β -lactoglobulin (BLG); expression vector