维普资讯 http://www.cqvip.com

176—182

15975(14)

第11卷第2期 中国病毒学 Vol.11 No.2
1996年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 1996

用PCR扩增和克隆马立克氏病病毒糖蛋白D基因*

段玉友 崔治中
(扬州大学农学院动物医学系,扬州 225009)
殷 震
(中国人民解放军农牧大学,长春 130062)

S852.65

提要 用PCR技术,从GA株马立克氏病病毒(MDV)感染的成纤维细胞(GEF)基因组DNA中扩增出MDV糖蛋白D(gD)抗原基因片段的约1300 bp编码序列,将该PCR扩增的产物于EcoRI和KpnI位点克隆到pUC18质粒载体中,在以digoxigenin(dig)标记的gD PCR产物作为探针,进行原位杂交初步筛选到阳性重组质粒克隆,再根据酶切分析筛选到含MDV gD基因的重组质粒p18MgD。将p18MgD质粒DNA用dig标记后,在Southern blot中,该探针能识别MDV基因组DNA的BamHI-A克隆中的A片段DNA。酶切位点分析表明,该gD克隆也和已发表的MDV的RB1B株gD一样,不含有EcoRⅠ、HindⅢ、PstⅠ、SmaⅠ、PvuⅡ等酶切位点。证明该重组质粒是MDV gD克隆。

关键词 马立克氏病病毒,糖蛋白D,聚合酶链式反应

位于病毒颗粒表面的囊膜糖蛋白在病毒感染过程中起着重要的作用,它与病毒识别和吸附易感细胞、与细胞的融膜作用及病毒核酸进入细胞等感染的各种过程密切相关。疱疹病毒是有囊膜糖蛋白的大型病毒[1],在该科中,如人的单纯疱疹病毒(HSV)、水痘病毒(VZV)、巨细胞病病毒(CMV)、淋巴滤泡病毒(ERV)、牛疱疹病毒(BHV)、伪狂犬病病毒(PRV)等的病毒粒子糖蛋白结构已研究得相当深入。如HSV感染细胞中有6种糖蛋白,分别是gB、gC、gD、gE、gH、gI,它们分别在病毒进入细胞中发挥不同的作用[2]。对马立克氏病病毒(MDV)gB和gC在感染及抗感染免疫反应中的作用已有不少研究,例如gB在感染和抗感染中和反应中起着重要作用[3],而gC似乎与感染及抗感染免疫关系不密切[4,5]。虽然已知在疱疹病毒中,如HSV的gD糖蛋白在病毒感染过程中起最重要的作用,而且引起的中和抗体能力最强。重组的HSV gD表达产物可引起高水平的补体依赖和补体不依赖的中和抗体,经该产物免疫的小鼠可被保护不受HSV的攻毒[6],但是MDV的gD的作用还不清楚。特别令人感兴趣的是,在MDV感染的CEF中,不能表达gD基因[7],这是否与MDV在细胞培养上特有的严格细胞结合性有关?在对MDV基因组结构深入研究发现,MDV在基因组结构与囊膜糖蛋白组成上更类似α疱疹病毒[8],它与HSV糖蛋白gB、gC、gD、gE、gI和gH的同源蛋白基因均已在MDV基因组DNA酶切图上准确定位[7,9-12]。MDV gD基因则位于BamHI-A片段上的US(短独特区)序列中。为了进一步阐明gD的生物学特性,根据最近发表的MDV gD基因完整序列[10],

本文于1995年6月29日收到,10月19日修回
* 本研究为国家自然科学基金重点项目一部分

维普资讯 http://www.cqvip.com

本研究试图利用 PCR 技术,从 GA 株 MDV 感染的 CEF 基因组 DNA 中分离和克隆 MDV gD 基因。

材料与方法

1 材　料

1.1 引物　引物 1:5′CATGATGAATTCGGTATGAATAGATACA 3′

引物 2:5′CATGATGGTACCAAACACGTGTTATAGG 3′

分别相应于 Ross 等[10]发表的含 RB1B gD 的 DNA 序列的 3169～3187 和 4400～4381 的序列。在该序列中,gD 的编码序列起始于 3191,终止于 4384。

在两引物的 5′端分别加有 EcoRI、KpnI 酶切位点序列,引物由中国科学院上海细胞生物学研究所合成。

1.2 CEF 基因组 DNA 的制备　用 9 日龄的 SPF 鸡胚进行成纤维细胞培养,并按常规[13]提取其基因组 DNA。

1.3 MDV 感染的 CEF 基因组 DNA 的制备　用 MDV GA 株病毒感染 CEF,并按常规[13]提取其细胞基因组 DNA。

2 方　法

2.1 用 PCR 扩增 MDV gD 基因片段

2.1.1 PCR 体系组成　MDV CEF 基因组 DNA(模板 DNA):含量为 1～10 pg/反应,引物浓度为 50 pmol/L,4 × dNTPs 浓度为 2.5 mmol/L,10 × buffer 组成为 100 mmol/L Tris(pH 8.3),500 mmol/L KCl,15 mmol/L $MgCl_2$。同时用 CEF 基因组 DNA 作为正常对照进行同步试验。

2.1.2 PCR 循环参数　模板 DNA 98 ℃变性 10 min,92.5 ℃-60 sec→56 ℃-45 sec→72 ℃-180 sec,30 个循环,之后 72 ℃再延伸 10 min。

2.2 PCR 产物凝胶电泳　取 10 μl PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,以 λDNA-HindⅢ消化物为分子量、观察扩增片段的长度。

2.3 PCR 产物的特异性鉴定　PCR 产物纯化后,用 dig 标记作为探针,在 dot blot 中,分别与已知含有 gD 全基因 MDV 基因组 DNA BamHI-A 片段 DNA(18 kb)[8]、MDV-CEF 基因组 DNA、CEF 基因组 DNA 进行分子杂交反应,鉴定探针的特异性。

2.4 PCR 产物的克隆及重组质粒的特异性鉴定　将已纯化的 PCR 产物与载体 pUC18 分别用 EcoRI、KpnI 酶消化,按常规[13]连接、转化,用 dig 标记的 PCR 产物探针进行原位杂交筛选出重组质粒克隆。将 PCR 扩增的 MDV gD 产物、MDV 基因组 DNA 的 BamHI-A 的 BamHI 消化产物、重组质粒的 EcoRI 和 KpnI 消化产物进行凝胶电泳,按常规作 Southern blot,分别用 dig 标记 gD PCR 产物和重组质粒作探针进行交叉分子杂交,进一步验证重组质粒插入片段的特异性。

2.5 重组质粒的酶切分析　将重组质粒分别用 EcoRI、KpnI、EcoRI-KpnI、EcoRI-BamHI、HindⅢ、PstⅠ、SmaⅠ和 PvuⅡ等内切酶进行酶切,验证 gD 基因内部和重组后载体 polylinker 的酶切位点是否符合预期的结果。

结　果

1 PCR 产物大小及特异性的鉴定

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳显示,扩增的片段长度为 1.3 kb(图 1A),与预期长度 1259 pb 一致;而以 CEF DNA 为模板未扩增出任何片段。用 dig 标记 gD 的 PCR 产物作为探针,在 dot blot 中,该探针只与 PCR 产物本身、MDV 基因组 DNA 的 BamHI-A 克隆质粒 DNA、MDV-CEF 基因组 DNA 发生反应,而不与正常 CEF 基因组 DNA 发生反应(图 1B)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

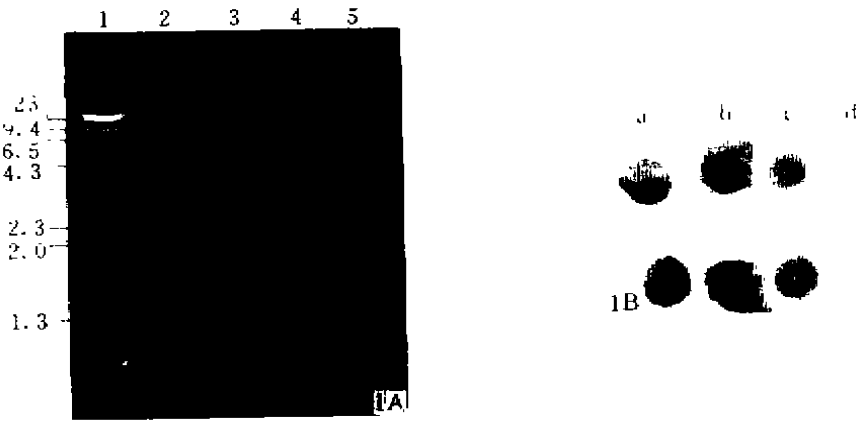

图 1 PCR 产物大小及特异性的鉴定

Fig. 1 Identification of PCR products by agarose gel electrophrosis(A)and dot blot with the probe of gD PCR product labeled with digoxigenin(B)

A 1:λDNA-HindⅢ消化物;2、3:gD PCR 产物; 4、5:CEF DNA 的 PCR 产物

Lane 1:λDNA-HindⅢ digests; Lane 2 and 3:gD PCR products; Lane 4 and 5: PCR products of CEF DNA

B a. gD PCR 产物; b:MDV 基因组 DNA 的 BamHI-A 克隆质粒 DNA; c: MDV-CEF 基因组 DNA; d: CEF 基因组 DNA

a: gD PCR product; b: MDV genomic DNA BamHI-A clone plasmid; c: MDV-CEF genomic DNA; d: CEF genomic DNA

2 重组质粒的筛选和鉴定

利用经 dig 标记 gD 的 PCR 产物作为探针，通过原位杂交，筛选出含有 gD 基因的重组质粒克隆 p18 MgD，其插入位点如图 2。

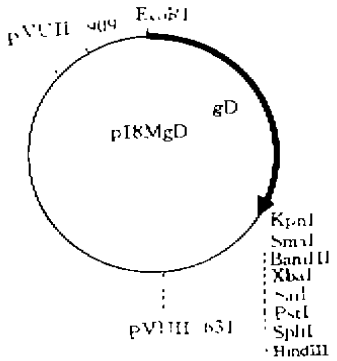

图 2 重组质粒 p18MgD 的酶切位点

Fig. 2 Structure of the recombinant plasmid p18MgD

将重组质粒 p18 MgD、MDV 基因组 DNA 的 BamHI-A 克隆质粒的酶切产物及 gD 的 PCR 产物进行凝胶电泳(图 3A)，用经标记的 PCR 产物和重组质粒 p18 MgD 作为探针在 Southern blot 中进行交叉分子杂交，两探针皆能同时识别 PCR 产物中的 1.3 kb、经 EcoRI-KpnI 双酶消化的重组质粒中的 1.3 kb 插入片段及 MDV 基因组 DNA 的 BamHI-A 克隆质粒 DNA 经 BamHI 消化后的 A 片段 DNA(约 18 kb)(图 3B1、3B2)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

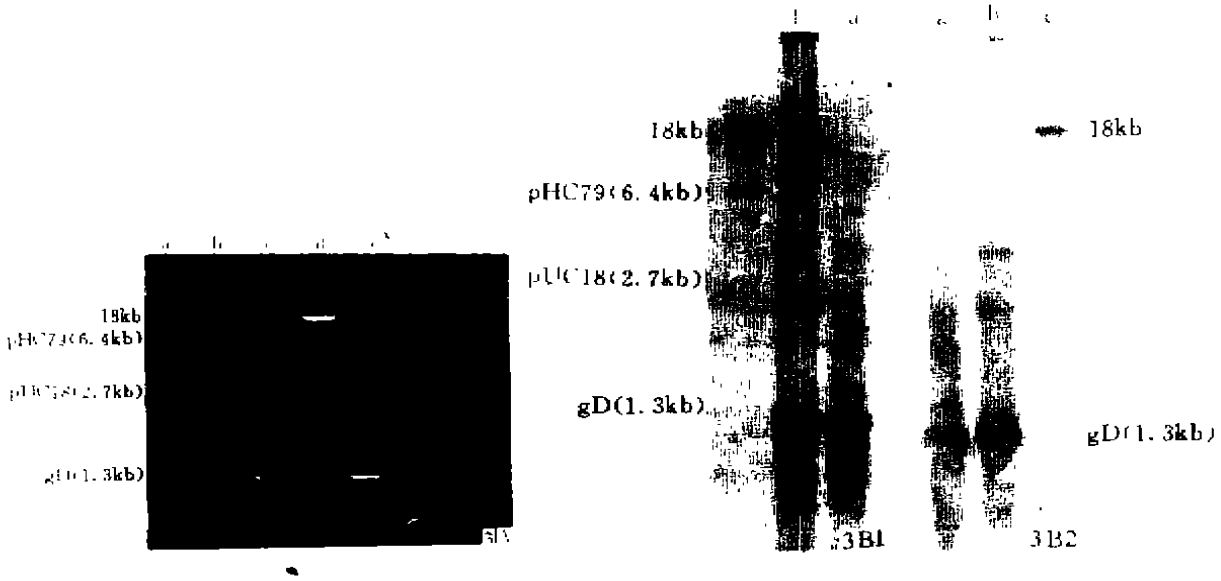

图 3　用 Southern blot 鉴定重组质粒

Fig. 3　Identification of recombinant plasmid DNA with cross-hybridization by Southern blot with the probes of gD PCR products(B2) and recombinant plasmid DNA(B1) labeled with digoxigenin

A:凝胶电泳图谱;B:Southern blot 结果;a:gD PCR 产物;b:重组质粒 EcoRI-KpnI 双酶消化物;c:MDV 基因组 DNA 的 BamHI-A 克隆质粒 DNA 的 BamHI 消化物;d:λDNA-HindⅢ消化物;

A: The map of gel electrophoresis; B: The result of Southern blot; a: gD PCR products; b: Digestion of recombinant plasmid p18MgD DNA with EcoRI and KpnI; c: Digestion of MDV genomic DNA BamHI-A clone plasmid DNA with KpnI; d: λDNA-HindⅢ digests

3　MDV gD 克隆重组质粒的酶切分析

重组质粒经 EcoRI、KpnI、BamHI、HindⅢ、PstⅠ、SmaⅠ酶切后皆产生一条约 4.0 kb 的条带(图 4e-j);EcoRI-BamHI 和 EcoRI-KpnI 双酶切后产生的片段均为 2.7 kb 和 1.3 kb(图 4c 和 d);PvuⅡ酶切后产生的片段为 1.7 kb 和 2.3 kb 二条带(图 4k)。

酶切分析表明,p18 MgD 重组质粒中的插入片段无 EcoRI、KpnI、HindⅢ、PstI、SmaⅠ、PvuⅡ酶切位点,这与已发表的 RB1B 株 gD 序列结果一致。其中 PvuⅡ产生的两个片段是由于 pUC18 载体中含有两个 PvuⅡ的位点(分别位于载体的 309 bp 和 631 bp),gD 基因插在其两个位点之间(见图 2)。所以 PvuII 产生的两个分别是 2.3 kb(部分载体)和 1.7 kb(gD 全基因加载体部分)。稍有不同的是,已发表的 RB1B 的 gD 序列中含有一个 BamHI 位点,而从 GA 株得到的该 gD 克隆无此位点。

讨　论

虽然已知在疱疹病毒中,如 HSV 的 gD 糖蛋白在病毒感染过程中起最重要的作用,且引起的中和抗体能力最强,但在 MDV 中,gD 糖蛋白在感染和抗感染免疫中的作用目前还很不清楚。现有研究结果表现,虽然 MDV 的 gD 基因与其它疱疹病毒的 gD 基因有高度同源性,但是在 MDV 感染的 CEF 上却完全不表达 gD[7],这与 HSV 的 gD 在 HSV 识别和感染易感细

维普资讯 http://www.cqvip.com

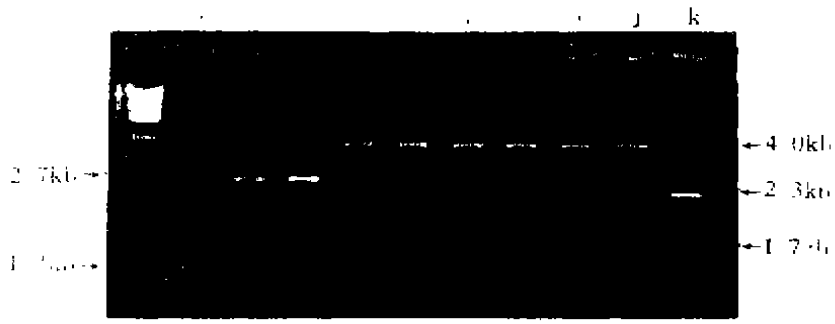

图 4 重组质粒 p18MgD 内切酶分析

Fig.4 Digestion of recombinant plasmid p18MgD DNA with restriction enzymes

a:λDLA-HindⅢ消化物; b:gD PCR 产物;

c～k:重组质粒 p18MgD 经 EcoRI-BamHI、EcoRI-KpnI、EcoRI、KpnI、BamHI、HindⅢ、PstI、SmaⅠ、PvuⅡ消化产物

a:λDLA-HindⅢ digests; b:gD PCR products;

c～k: Digestions of recombinant plasmid p18MgD DNA with EcoRI-BamHI、EcoRI-KpnI、EcoRI、KpnI、BamHI、HindⅢ、PstI、SmaⅠ、PvuⅡ

胞过程中起最重要的作用有着明显的区别。MDV 与其它疱疹病毒的另一个显著差别是，MDV 在 CEF 中表现严格的细胞结合性，为此人们推测 MDV 在 CEF 上的这一严格细胞结合性很可能与其 gD 基因在 CEF 中不表达有关。但另一方面，感染了 MDV 并耐过的鸡却能产生与在大肠杆菌中表达的 MDV gD 抗原发生反应的抗体[14]，结果表明，MDVgD 糖蛋白在感染鸡的体内某些组织中是能表达的。鉴于感染鸡的羽囊能产生有感染性的 MDV 颗粒，因此至少羽囊上皮细胞可能是表达 gD 的组织之一。为了深入阐明 gD 在 MDV 感染和抗感染免疫中的作用，为了阐明 MDV 在 CEF 上的严格细胞结合性与 MDV 在感染的 CEF 中不表达 gD 间的关系，根据 RB1B 株的 gD 基因已知序列，本研究用 PCR 从 GA 株 MDV 扩增并克隆了该 gD 基因，用于在适当表达系统中表达该基因，并制备出抗 gD 抗体用作进一步研究。

将 RB1B 株 MDV 基因组片段的 DNA 随机定序结果与疱疹病毒 gD 基因进行比较，Ross 等(1991)[10]确定了 MDV gD 基因位于基因组 DNA 酶切图的 BamHI-A 片段 (18 kb)上，同时还报道了该基因的 DNA 序列。根据这一序列，我们合成了一对引物，用 PCR 从 GA 株 MDV 扩增及克隆了 gD 基因。在点杂交中，标记的 gD PCR 产物探针只与 MDV-CEF 基因组 DNA 反应，而不与未感染的 CEF 基因组反应；在 Southern blot 中，p18 MgD 重组质粒探针能与含有 gD 基因的 MDV 基因组 DNA 的 18 kb 大小的 BamHI-A 片段反应。这表明重组质粒 p18 MgD 确是 MDV gD 的基因克隆。对重组质粒 p18MgD 的 DNA 作酶切分析表明，同已发表的 RB1B 株 gD 序列一样，从 GA 株扩增和克隆到的 gD 片段中也没有 EcoRI、KpnI、HindⅢ、PstI、PvuⅡ和 SmaⅠ位点。但是在 RB1B 株 gD 编码序列终止编码子上游约 80bp 处，有一个 BamHI 切点[10]，而用 BamHI 单酶和 EcoRI-BamHI 双酶分析结果显示，从 GA 株 MDV 扩增出的 gD 基因中无 BamHI 位点，这种情况究竟是由于毒株间固有的差异，还是由 PCR 过程中的突变造成的，尚不清楚。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

1 殷震，刘景华主编．动物病毒学．第一版，北京：科学出版社，1985；700～705

2 侯云德编．分子病毒学．第一版，北京：学苑出版社，1990；150～180

3 Yanagida N, Nazaerian K, Lee L F, *et al*. Recombinant fowlpox viruses expressing the glycoprotein B homolog and the pp38 gene of Marek's disease virus. J Virol, 1992;66(3):1402～1408

4 Ikuta K, Shigeharu U, Shiro K, *et al*. Most virus-specific Polypeptides in Cells Productively Infected with Marek's Disease Virus or Herpesvirus of Turkeys Possess Cross-reactive Determinants. J Gen Virol, 1983;64:961～965

5 Isorft R J, Hsing-Jien K, Velicer L F. Identification of the gene encoding Marek's disease herpesvirus A antigen. J Virol, 1987; 61:2614～2620

6 Krishna S, Barbara A B, Hilarya O, *et al*. Expression of Glycoprotein D of Herpes Simplex Virus Type 1 in a Recombinant Baculovirus: Protective Responses and T Cell Recognition of the Recombinant-infected Cell Extracts. J Gen Virol, 1989;70:1805～1814

7 Brunovskis B P, Chen X, Velicer L F. Analysis of Marek's Disease Virus Glycoprotein D, I and E. Proceedings, 19th World Poultry Cogress. Amsterdam, Netherlands, 1992

8 Fukuchi K, Miyuki S, Yin-Shong L *et al*. Structure of Marek's Disease Virus DNA: Detailed Restriction Enzyme Map. J Virol, 1985;51(1):102～109

9 Ross L J N, Sanderson M, Scott S D, *et al*. Nucleotide Sequence and Characterization of the Marek's Disease Virus Homologue of Glycoprotein B of Herpes Virus. J Gen Virol, 1989;70:1789～1804

10 Ross L J N, Binns M M, Pastorek J. DNA sequence and organization of genes in a 5.5kbp EcoRI fragment mapping in the short unique segment of Marek's disease virus(strain RB1B). J Gne Virol, 1991;72:949～954

11 Coussens P M, Velicer L F. Characterization of the gene encoding herpesvirus of Turkeys gp57-65 comparision to Mark's disease virus gp57－65 and herpes simplex virus glycoprotein C. Virus Genes, 1990;(4):291～307

12 Scott S D, Graham D S, Ross L J N *et al*. Identification and sequence analysis of the homologues of the herpes simplex virus type 1 glycoprotein H in Marek's disease virus and the herpesvirus of turkeys. J Gen Virol, 1993; 74:1185～1190

13 Maniatis T, Fritsh E F, Sambrook J. Molecular cloning. A Laboratory Manual. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982

14 Zelnick V, Ross L J N, Smith G D *et al*. Comparsion of Glycoprotein D(gD) Genes of Msrek's Disease Virus and Herpesvirus of Turkeys. Proceedings, 19th World Poultry Cogress, Amsterdam, Netherlands, 1992

维普资讯 http://www.cqvip.com

Amplification and Cloning of Marek's Disease Virus Glycoprotein D gene by Polymerase Chain Reaction

Duan Yuyou Cui Zhizhoug

(*Agricultrual College, Yangzhou University, Yang Zhou* 225009)

Yin Zhen

(*The Chinese People's Liberation Army University of Agriculture and Animal Husbandry, Changchun* 130062)

Marek's Disease Virus (MDV) glycoprotein D (gD) gene was amplificated from CEF genomic DNA infected with MDV GA strain by polymerase chain reaction(PCR). PCR products of the gD gene were labeled with digoxigenin as porbes and they could only detect MDV-CEF genomic DNA, MDV genomic DNA BamHI-A fragment DNA by dot blot, but not uninfected CEF DNA. PCR products of the gD gene were cloned into pUC 18 plasmid, and recombinant plasmids were screened by *in situ* hybridization with the probes of gD PCR products. The recombinant plasmids were also labeled with digoxigenin as probes. Two probes could detect gD PCR products, insert of recombinant plasmids, MDV genomic DNA BamHI-A fragment DNA by cross-hybridization in Southern blot. Restriction endonucleases analysis was used to identify the restriction sites of the gD gene and polylinker of recombinant plasmid, and it showed that there were no sites of EcoRI、KpnI、Hind Ⅲ、Pst Ⅰ、Sma Ⅰ and Pvu Ⅱ. It demonstrated that the recombinant plasmid cloned from MDV GA strain was gD clone.

Key words Marek's Disease Virus, Glycoprotein D, Polymerase chain reaction