

伪狂犬病毒蛋白激酶基因的 PCR 扩增 及其克隆鉴定

罗满林 丁建华 王家富 张楚瑜

(武汉大学病毒系, 武汉 430072)

A

摘要 以 BHK-21 细胞单层上增殖的伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV), 经离心浓缩后, 用 SDS-蛋白酶 K 消化法分离纯化 PRV 基因组 DNA。参照 PRV Ka 株和 NIA-3 株蛋白激酶(PK)基因的 DNA 序列, 设计并合成了一对长度为 26 bp 和 32 bp 的引物, 以纯化的 PRV 基因组 DNA 为模板, 用 PCR 技术成功地扩增出我国伪狂犬病毒地方株的 PK 基因, 并将它克隆于 pUC19 载体。酶切分析结果表明, 所获 PK 基因克隆在 Pst I、Sma I、Xho I 和 Sal I 上的切点与 PRV NIA-3 株相同。为下一步进行 PK 基因的体外缺失和重组, 以构建减毒的 PK 缺失疫苗株奠定了基础。

关键词 伪狂犬病毒, 蛋白激酶基因, PCR 扩增, 基因克隆

聚合酶链反应

伪狂犬病是由伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)引起的多种家畜和野生动物均可感染的传染病。本病对猪的危害最为严重, 两周龄内仔猪致死率可高达 100%, 成年猪可发生呼吸系统感染症, 康复猪可潜伏感染, 终生带毒, 母猪繁殖障碍等, 给我国及世界养猪业造成巨大经济损失^[1]。

PRV 属于疱疹病毒科 α -疱疹病毒亚科的成员, 为双股 DNA 病毒。病毒基因组长约 150 kb, 其 G+C 含量约为 72%。目前, 国外已对 PRV 的多个基因进行了定位和测序^[2]。与单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1)US3 同源的 PRV 蛋白激酶(PK)基因是病毒增殖的非必需基因, 同时又是 PRV 重要的毒力基因^[3]。本研究根据国外已确定的 PK 基因序列^[4,5], 设计并合成了一对引物, 成功地从我国 PRV 地方株中扩增了 PK 基因, 并将其克隆于质粒载体, 从而为我国研制 PK 基因缺失疫苗奠定基础。

材料和方法

1 PRV 增殖与 DNA 提取

PRV 由湖北省农科院畜牧兽医研究所提供。将 PRV 种毒接种于长好单层的 BHK-21 细胞上, 培养 1~2 d, 当 80% 细胞出现 CPE 时, 3000 r/min 除去细胞, 将上清铺于 30% 蔗糖垫上, 14000 r/min 离心 1 h, 收获病毒沉淀物。用 TNE(0.1 mol/L Tris·Cl, pH 8.0; 0.1 mol/L NaCl, 0.025 mol/L EDTA)悬浮后, 用蛋白酶 K(终浓度 100 μ g/mL)和 0.5% SDS 裂解病毒粒子, 使释放出 DNA 后, 再苯酚、氯仿抽提, 乙醇沉淀。

2 PCR 扩增 PK 基因

模板: 以纯化的 PRV 基因组 DNA 或经线性化处理的重组质粒 DNA。

本文于 1996 年 2 月 5 日收到, 5 月 14 日修回

• 中国博士后科学基金资助课题

•• 联系作者

引物设计:根据引物设计基本原则,参照国外已发表的 PRV PK 基因序列,选择比较保守的区域。设计并合成了长度分别为 26 bp 和 32 bp 的一对引物(由中科院上海细胞所合成),引物间包括具有两个转录起始区的完整 PK 基因。引物间跨距约 1.3 kb。

反应液成分:模板量 50~100 ng,引物各 50 pmol/L,4 种 dNTP 250 μmol/L,DMSO 5 μL,Taq 酶 1.5 单位,反应体积 50 μL,所用 PCR 试剂盒为华美生物工程公司产品。

扩增条件:模板与引物先在沸水中预变性 5 min,加入 Taq 酶和石蜡油后在水浴式 DNA 扩增仪上进行如下 2 轮循环:94℃,50 s;58℃,90 s;72℃,180 s;以后 35 轮循环时退火时间改为 60 s,延伸时间改为 150 s,末次循环的延伸时间为 10 min。反应完毕后,取 5~8 μL 样品电泳分析。

3 PRV PK 基因的分子克隆

将 PCR 扩增产物和 pUC19 质粒 DNA 用 EcoR I / BamH I 消化,按硝酸纤维素膜离心法回收^[6],取含插入物的液体 80 μL 和含载体的液体 20 μL 混合,加乙醇沉淀后,溶于 7.5 μL 双蒸水中,补加 10 mmol/L ATP 1 μL,T₄ DNA 连接酶 2 单位,反应体积 10 μL,于 16℃ 过夜。转化 *E. coli* DH5a 后,涂于含 Amp 的 LB 平板上。从 LB 平板上挑取单个菌落,小量法抽提质粒,初步检测阳性重组子,进一步用酶切分析鉴定。

4 重组质粒的酶切分析与 PCR 扩增鉴定

分别用 EcoR I / BamH I、EcoR I / Sal I、Pst I、Sma I、Xho I 和 Sal I 酶切重组质粒,根据酶切结果,确定重组质粒中外源基因插入与否及分析酶切位点的分布情况。重组质粒作线性化处理为模板,按上述 PRV 基因组 DNA 作模板扩增 PK 基因相同条件和方法,进行 PCR,然后取扩增物作电泳分析。

结 果

1 PCR 扩增产物的分析

PRV 基因组 G+C 含量特别高,这给 PCR 扩增带来很大困难。在常规条件下扩增,未能从 PRV 基因组模板中获得任何相应产物。作者在扩增反应液中加入甲酰胺、甘油或 DMSO,结果在补加 10% DMSO 时扩增,可得到预定大小的产物(见图 1a);将第一次扩增产物中预定大小条带回收后作模板进行再次扩增,也能从扩增物中得到预定大小的条带(见图 1c)。

2 PCR 扩增产物的克隆和重组质粒的鉴定

按图 2 所示 PK 基因克隆的策略,PCR 扩增产物以 EcoR I / BamH I 消化后,与相同双酶切的 pUC19 载体连接,转化 *E. coli* DH5a,在 Amp 的 LB 平板上获得多个菌落,挑取了 10 余个菌落扩增,抽提质粒,经分子大小比较,其中 3 个明显大于载体,初步确定为阳性重组子,当用 EcoR I / BamH I 双酶切后,可见从中切出大小为 1.3 kb 的一个片段,这即为所克隆的外源基因(见图 1b),此重组质粒命名为 pPK;为了进一步验证这个基因克隆的可靠性,以此 pPK 为模板进行 PCR 扩增,仍能从扩增样品中得到预定大小的产物(见图 1c),用限制性内切酶消化 pPK,,证实在所克隆的 PK 基因中 Pst I、Sma I、Xho I 和 Sal I 各 1 个切点(见图 3)。酶切位点分布与已发表的 PRV NIA-3 株 PK 基因酶谱图相符(见图 4),由此证明我国 PRV 地方株 PK 基因与 NIA-3 株 PK 基因具有很高同源性。

讨 论

在 PCR 扩增产物的分析中,作者发现扩增产物中除了预定大小的条带外还发现另一小分子量的条带,可能为引物二聚体,当它较多时则严重干扰 PCR 扩增效果。由于我们只是应用



图 1 PRV PK 基因的 PCR 扩增和基因回切

a. 病毒基因组 DNA 为模板, PCR 扩增产物, 其中 1 为标准分子量参照物, 片段大小为: 1543 bp, 994 bp, 695 bp, 515 bp, 377 bp, 237 bp; 2-3 为 PCR 扩增产物; b. 重组质粒 pPK 基因回切: 1. λ /Hind III, 2. pPK/EcoR I - BamH I, 3. pPK/EcoR I, 4. puc19/EcoR I; c. 不同模板的 PCR 扩增产物, 1. 标准 DNA 分子量参照物 (片段大小同图 a) 2. PRV DNA 为模板 3. 回收的扩增产物为模板 4. pPK 为模板。

Fig1 The amplification of PRV protein kinase gene by PCR and its reexcision

a. PCR products with viral genome DNA as template. 1: Marker of standard DNA molecular weight, the fragments are 1543 bp, 994 bp, 695 bp, 515 bp, 377 bp, 237 bp. 2-3: PCR products with PRV genome as template. b. excision of pk gene from recombinant plasmid pPK, 1. λ /Hind III, 2. pPK/EcoR I - BamH I, 3. pPK/EcoR I, 4. puc19/EcoR I; c. PCR products with different templates, 1. DNA marker with the same size as figure 1a, 2. Viral genome DNA as template, 3. Recovering of amplified products as template, 4. Recombinant plasmid pPK as template.

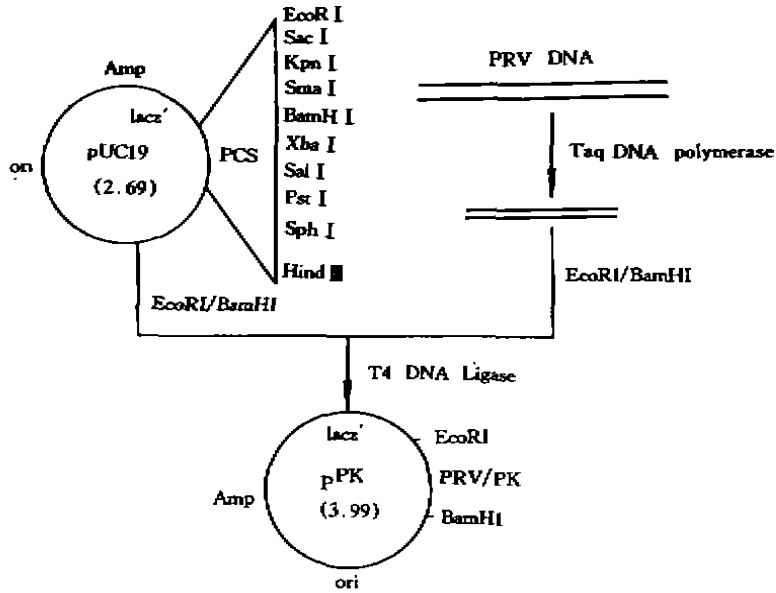


图 2 伪狂犬病毒 PK 基因的克隆

Fig.2 Cloning of pseudorabies virus PK gene



图 3 重组质粒 pPK 的酶切分析

Fig. 3 Restriction analysis of recombinant plasmid pPK
 1, 8. λ DNA/Hind III, 2. BamHI/EcoRI (2.69, 1.33 kb), 3. Pst I (3.12, 0.9 kb) 4. Sal I (3.58, 0.42 kb), 5. Sal I/EcoRI (2.68, 0.9, 0.42 kb), 6. XhoI (4.02 kb), 7. Sma I (4.02kb)

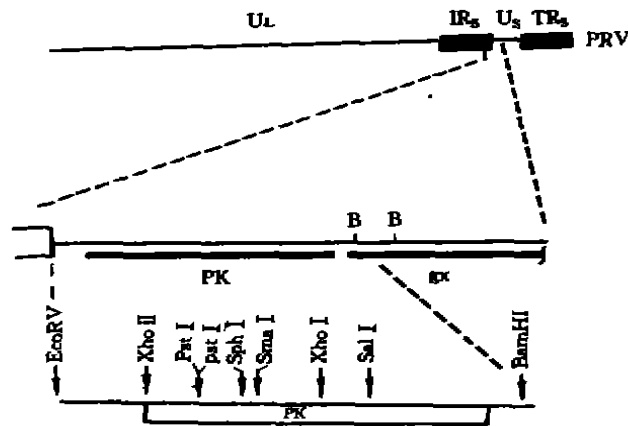


图 4 PRV PK 基因的限制性内切酶图谱(根据 Zhang & Van Zijl 等资料)

Fig. 4 Restriction map of PRV PK gene (the date derived from Zhang and Van Zijl *et al*)

PCR 这一手段欲从 PRV 基因组中调出 PK 基因, 当达到这一目标后, 就对其它干扰因素未加以详尽研究。

通过上述工作, 首次克隆了我国 PRV 地方株的 PK 基因。克隆 PK 基因的旨意在于构建减毒但仍保持免疫原性的 PRV PK 基因缺失疫苗株。另一方面, 在缺失区设计一个引物, 可用本研究建立的 PCR 方法鉴别 PK 缺失株与其它强毒株, 便能从诊断和免疫预防两个环节解决目前伪狂犬病防治中存在的问题。目前有关构建 PRV PK 基因缺失的转移载体工作正在进之中。

参 考 文 献

- 1 蔡宝祥主编. 家畜传染病学. 第 2 版, 北京: 农业出版社, 1986, 第 2 版, 163~166
- 2 刘尚高、张立昌、罗长保. 伪狂犬病毒分子生物学及基因工程疫苗研究进展. 全国家畜传染病第 6 次学术研讨会论文集. 杭州, 中国畜牧兽医学学会家畜传染病分会, 1995, 81~84
- 3 Kimman T G, Wind N, de Oeille N. Contribution of single genes within unique short region of Aujeszky's disease virus (suid herpesvirus type 1) to virulence, Pathogenesis and Immunogenicity. *J Gen Virol*. 1992, 73: 243~251
- 4 Zhang G, Stevens R, Leader D P. The protein kinase encoded in the short unique region of pseudorabies virus: description of the gene and identification of its product in virions and infected cells. *J Gen Virol*, 1990, 71: 1757~1765
- 5 Van Zijl M, Gulden H V D, Wind N D *et al*. Identification of two genes in the unique short region of pseudorabies virus; compari-

son with herpes simplex virus and varicella-zoster virus. *J Gen Virol*, 1990, 71:1747-1755

- 6 蒋盘宏, 吴秋茜. 简便快速从凝胶中分离 DNA 的方法. *中华微生物学和免疫学杂志*. 1992, 12(2): 132

Amplification and Cloning of Protein Kinase Gene of Pseudorabies Virus by PCR

Luo Manlin Ding Jianhua Wang Jiafu Zhang Chuyu

(*Department of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072*)

Pseudorabies virus (PRV) was multiplied on BHK-21 monolayer cells. After concentration with centrifuge, viral DNA was isolated by SDS-proteinase K digestion method. According to the sequences of protein kinase genes of PRV Ka and NIA-3 strains, the primers with 26 bp and 32 bp were designed. With pure PRV genome DNA as template, the PK gene of PRV was amplified successfully by PCR, and cloned into pUC19 vector. Restriction enzyme analysis showed that the cloned PK gene at *Sma*I, *Xho*I and *Sal*I site was the same as that of PRV NIA-3 strain. This work laid foundation for constructing the PRV vaccine with deletion of PK gene.

Key words Pseudorabies virus, Protein kinase gene, PCR amplification, Gene clone