

禽白血病病毒 p19 基因末端片段在大肠杆菌中的表达*

刘公平¹, 赵振芬², 刘福安^{1**}(1. 华南农业大学动物医学系, 广东广州 510640;
2. 郑州牧业工程高等专科学校, 河南郑州 450008)Expression of p19 Gene of Avian Leukosis Virus in *Escherichia coli*LIU Gong-ping¹, ZHAO Zhen-fen², LIU Fu-an^{1**}(1. Department of Veterinary Medicine, South China Agr. Univ. Guangzhou 510640, China;
2. Zhengzhou Animal Husbandry College, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: Based on avian leukosis virus (ALV) p19 gene terminal nucleotide sequence, a 82 bp double-stranded DNA fragment was chemically synthesized and cloned into the expression vector pGEMEX-1. The sequencing result indicated that the cloned fragment was a correct version of the one designed both in nucleotide sequence and in its open reading frame. The recombinant was used to transform *E. coli* BL21 (DE3). The cloned fragment was expressed as a fused protein with T7 gene 10 leader peptide and was shown to be 34 kD in size on SDS-PAGE gel when induced with 1 mmol/L IPTG. The expression product was able to bind immunologically to rabbit anti-ALV serum in Western-blot assay and is being tested to differentiate exogenous from endogenous ALV.

Key words: Avian leukosis virus; p19 gene; Cloning; Prokaryotic expression

摘要: 根据禽白血病病毒(ALV) p19 基因末端序列合成一条 82 bp 的双链 DNA 片段, 将其克隆到表达质粒 pGEMEX-1 中, 序列分析结果与设计的相符。重组表达质粒转化的大肠杆菌 BL21(DE3)经 IPTG 诱导后产生 34kD 融合表达产物, 与理论值相符; Western-blot 分析表明该表达产物能与兔抗 ALV 血清发生反应。

关键词: 禽白血病病毒; p19 基因; 克隆; 原核表达

中图分类号: S852.6 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2001)01-0078-03

禽白血病是由 ALV 引起的以造血细胞增生为主的一类传染病, 对养禽业危害最大的是禽淋巴细胞性白血病。ALV 属反转录病毒科 C 型肿瘤病毒属, 其亚群特异性由病毒囊膜基因决定, ALV 可分为外源性病毒(A, B, C, D 和 J 亚群)和内源性病毒(E, F, G, H 和 I 亚群)^[1-3]。Lee 等制备的一株针对 ALV 基膜蛋白 p19 的单克隆抗体(6AL20)能与 A, B 和 D 亚群病毒发生反应, 而不能与 E 亚群反应, 该单抗可区分内、外源性 ALV^[4]。比较 ALV 各

亚群病毒 p19 基因的核苷酸序列发现, A, B, D 亚群病毒 p19 基因末端比 E 亚群长 80 bp^[3,5-7], 因此 Lee 制备的单抗很可能是针对该基因所编码的多肽。本研究拟化学合成该末端片段并用大肠杆菌表达, 期望其表达产物能用于区分内外源性 ALV。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

表达质粒 pGEM-EX-1, 宿主菌 BL21(DE3), 工具酶, IPTG 和 酶标羊抗兔 IgG 均购自华美生物工

收稿日期: 2000-01-24, 修回日期: 2000-04-10

* 基金项目: 高等学校博士学科点专项基金资助项目(980501)

作者简介: 刘公平(1964-), 男, 湖南祁阳籍, 博士, 研究方向为动物病毒分子生物学, 现在美国明尼苏达大学做博士后工作。

** 通讯作者: 刘福安(1930-), 男, 广东东莞籍, 教授, 博士生导师, 研究方向为动物病毒分子生物学。For correspondence.

程公司,兔抗 ALV 抗体购自哈尔滨兽医研究所。

1.2 基因片段的化学合成

以 D 亚群的 p19 基因末端序列为模板设计合成四条寡核苷酸片段(由上海生工生物工程公司合成),按 Sambrook 等法^[8]对各片段进行 5' 端磷酸化后分别将 F₁(32 bp)与 F₂(40 bp),F₃(46 bp)与 F₄(38 bp)混合 94℃ 5 min 后,60℃ 水浴 5 min 得到两条互补片段 F₁/F₂ 和 F₃/F₄,二者可结合形成一条长 82 bp 的两端带有 *Eco*R I 和 *Hind* III 粘端的双链 DNA 片段(图 1)。

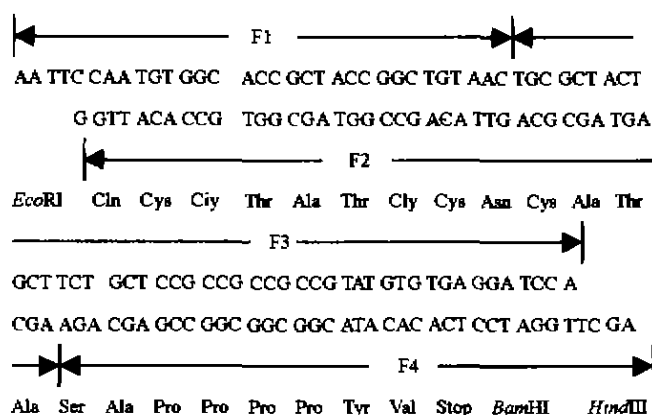


图 1 四条寡核苷酸片段及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 Sequence of four oligonucleotides and their deduced amino acids

1.3 基因片段的克隆

按卢圣栋法^[9]质粒 pGEMEX-1 经 *Eco*R I/*Hind* III 双酶切后与合成基因片段进行连接,10× 反应缓冲液 1.0 μL, T4DNA 连接酶(4 U/μL) 1.0 μL, F₁/F₂(10 pmol/μL) 1.0 μL, F₃/F₄(10 pmol/μL) 1.0 μL, 质粒(2 pmol/μL) 5.0 μL, ddH₂O 1.0 μL, 共 10 μL, 置 12℃ 过夜后转化 BL21(DE3)。

1.4 重组质粒的鉴定

按卢圣栋法^[9]抽提质粒,用 *Bam*HI 酶切后在 2.5% 琼脂糖凝胶上电泳初筛,再用 *Eco*R I/*Hind* III 双酶切鉴定,对得到的重组质粒 pGEMEX-1-P19 中外源性片段进行序列分析。

1.5 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达

按卢圣栋法^[9]挑取 Amp 抗性转化菌落纯化后用 IPTG 诱导表达,SDS-PAGE 分析表达产物。

1.6 表达产物的免疫原性鉴定

按卢圣栋法^[9]用 Western-blot 鉴定表达产物的免疫原性。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的鉴定

重组质粒 pGEMEX-1-19 经 *Eco*R I/*Hind* III 酶切得到一条约 80 bp 的片段,与预期插入的外源性片段(82 bp)相符;空质粒 pGEMEX-1 经 *Eco*R I/*Hind* III 酶切得到一条约 40 bp 的片段,与载体质粒中多克隆位点 *Eco*R I 和 *Hind* III 之间的长度(45 bp)相符(图 2)。用全自动荧光标记双脱氧法从正反两方向测出的重组质粒 pGEMEX-1-19 外源性片段序列与设计的完全相同。

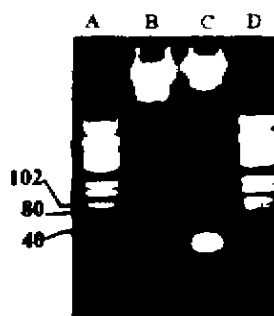


图 2 重组质粒 pGEMEX-1-19 酶切鉴定

Fig. 2 Restriction analysis of recombinant plasmid pGEMEX-1-19 A&D, pGEM7zf/*Hae* III marker (657, 458, 434, 328, 289, 267, 174, 142, 104, 102, 80, 40, 18, 11 bp); B, pGEMEX-1-19 digested with *Eco*R I and *Hind* III; C, pGEMEX-1 vector digested with *Eco*R I and *Hind* III

2.2 重组质粒 pGEMEX-1-19 在大肠杆菌中的诱导表达

重组质粒 pGEMEX-1-19 转化的大肠杆菌 BL21(DE3)经 IPTG 诱导后,SDS-PAGE 分析表明其表达产物的分子量约 34 kD,与理论值相符(外源性片段插入多克隆位点 *Eco*R I 和 *Hind* III 之间后,其终止密码子 TGA 与融合伴侣蛋白 T7 基因 10 起始密码子间相距 927 bp,表达产物应含 309 个氨基酸残基,每个氨基酸的平均分子量为 110 D,则融和蛋白的分子量应为 34 kD);空质粒 pGEMEX-1 转化的大肠杆菌 BL21(DE3)经 IPTG 诱导后,SDS-PAGE 分析表明表达产物约 31 kD,与理论值(28 kD,质粒 pGEMEX-1 中 T7 基因 10 引导序列的表达产物为 260 个氨基酸残基)相近。因此,上述 34 kD 条带中可能含有外源性片段融合表达产物(图 3)。

2.3 表达产物的 Western-blot 分析

融合表达产物在近 34 kD 处有一条明显的棕色



图3 重组质粒表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE of expressed product of recombinant plasmid pGEMEX-1-19 in *E. coli*

A, Protein markers(kD); B, BL21(DE3) transformed with pGEMEX-1 (control); C&D, BL21(DE3) transformed with recombinant plasmid pGEMEX-1-19.

带,而空载体质粒对照在相应位置无此条带。说明融合表达产物具有免疫原性(图4)。



图4 表达产物的 Western-blot 分析

Fig. 4 Western-blot of expressed products

A, Protein markers(kD); B, BL21(DE3) transformed with pGEMEX-1-19; C BL21(DE3) transformed with pGEMEX-1 (control).

3 讨论

本研究将人工合成的 82 bp 禽白血病病毒 p19 基因末端进行克隆、表达,得到 34 kD 有免疫原性的

融合表达产物。由于小片段基因重组质粒与空质粒的分子量相近,不能用分子量大小比较来筛选重组质粒,因此我们在寡核苷酸片段终止子 TGA 和 *Hind* III 间加入供筛选用的内切酶 *Bam* H I,经 *Eco* R I/*Hind* III 酶切后重组质粒仍有 *Bam* H I 位点而空质粒则无;目的片段与质粒连接物转化宿主菌时设置空质粒双酶切自我连接物转化对照,当前者转化率明显高于后者时再进行筛选。由于影响外源基因在大肠杆菌中表达的因素很多^[10,11],因此我们尽量使用原代宿主菌并利用原核生物中出现频率较高的简并密码子及高效表达的载体。本试验得到的表达产物有望用于鉴别内外源 ALV,有关的研究正在进行中。

参考文献

- [1] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].第2版.北京:科学出版社,1997.870-885.
- [2] B W 卡尔尼克.禽病学[M].第9版.高福,刘文军主译.北京:北京农业大学出版社,1991.334-381.
- [3] Bai J, Payne L N, Skinner M A. HPRS-103 has an env gene related to those of endogenous elements EAV-0 and E51 and an E element found previously only in sarcoma viruses [J]. J Virol, 1995, 69:779-784.
- [4] Lee L F, Silva R F, Cheng Y Q, et al. Characterization of monoclonal antibodies to avian leukosis virus [J]. Avian Disease, 1986, 30:132-138.
- [5] Bieth E, Darlix J L. Complete nucleotide sequence of a highly infectious avian leukosis virus [J]. Nucleic Acids Research, 1996, 20-367.
- [6] Kihira Y. Genebank, Accession, 1992, No. D10652.
- [7] Vogt V M, Pepinsky R B, Southard L E et al. Primary structures of p19 species of avian sarcoma and leukemia viruses [J]. J Virol, 1985, 53: 31-39.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning [M] 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] 卢圣栋.现代分子生物学实验技术[M].北京:高等教育出版社,1993.
- [10] 孙乃恩,孙东旭,朱德熙.分子遗传学[M].南京:南京大学出版社,1995.
- [11] 隋广超,胡美浩.影响大肠杆菌中外源基因表达的因素[J].生物化学与生物物理进展,1994,21(2):128-132.