

含四个串联核酶和 GFP 基因的转基因质粒的构建*

邹键, 沈学仁, 吴建华, 周国瑛, 龚祖坝**

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

Construction of the Transgenic Plasmid Containing GFP Gene and Four Ribozyme Genes Targeting the Prawn Baculovirus Gene

ZOU Jian, SHEN Xue-ren, WU Jian-hua, ZHOU Guo-ying, GONG Zu-xum**

(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: The transgenic plasmid of hammerhead ribozymes Rz1 and Rz2 targeting one of the Prawn baculovirus genes has been constructed. The transgenic plasmid contains double series copies of Rz1 and Rz2 as Rz1-Rz2-Rz1-Rz2. The Green Fluorescent Protein(GFP) gene was selected as the report gene of the transgenic plasmid. The GFP gene was cloned into plasmid pcDNA3 at site 2093bp with Sma I, controlled by SV40 promoter. Ribozyme gene Series was cloned into the MCS of plasmid pcDNA3 with proper restriction endonuclease, controlled by T7 and CMV promoter. The constructed transgenic plasmid was named pGTR and will be used for obtaining transgenic Prawn.

Key words: Baculovirus; Ribozyme; Transgenic plasmid

摘要: 以含绿色荧光蛋白(GFP)基因的质粒 pSK100-DS、含切割对虾杆状病毒基因的核酶 Rz1 的质粒 pRG Rz1、含核酶 Rz2 的质粒 pRG Rz2 和转基因空质粒 pcDNA3 为基础, 把绿色荧光蛋白 GFP 基因克隆于 pcDNA3 的 SV40 启动了下面, 由 SV40 启动子控制; 含四个两种核酸基因的四联体克隆于 pcDNA3 的多克隆位点区, 由 T7 启动子控制, 构建成含两个 Rz1、两个 Rz2 和 GFP 基因的转基因质粒 pGTR, 以用于转基因抗病毒对虾的研究。

关键词: 对虾杆状病毒; 核酶; 对虾转基因质粒

中图分类号: S945.4 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2001)03-0275-05

1993 年以来, 我国沿海省份相继发生养殖对虾大批死亡现象, 损失严重, 引起国内外研究者的重视。经过较短时间的努力研究后, 我们报导和证实了引起该病的病原是一种无包含体的杆状病毒^[1], 并发展了一种快速鉴定该病毒的 PCR 方法(专利申请号 9811072615), 已在全国 9 个省份推广应用。这

对虾病的检测和可能传播途径的阐明起了一定作用。但到目前为止, 如何防治此种对虾病毒病尚缺少有效办法。我们以前曾报导过该杆状病毒的一个可能的早晚期基因的克隆和序列分析, 并针对此基因设计了两个核酶, 在体外成功地对此基因进行了切割^[2]。此后我们又构建了含有绿色荧光蛋白

收稿日期: 2000-09-18, 修回日期: 2001-01-15

* 基金项目: 国家海洋 863 计划经费资助项目(819-04-08)

作者简介: 邹键(1975-), 男, 湖南省籍, 博士生, 从事分子病毒学研究。

** 通讯作者: 龚祖坝(1937-), 男, 上海籍, 研究员, 从事分子生物学和分子病毒学研究。Correspondence author.

(GFP)基因和上述核酶基因的转基因质粒,并在和中国科学院青岛海洋所通力合作下,用基因枪成功地将外源 DNA 导入至对虾受精卵^[3],为今后利用核酶技术来抑制病毒的增殖和控制对虾病毒病的危害打下了基础。为了进一步提高核酶的切割功能和效率,本文报导我们将两种核酶基因作为一个四联体并以 GFP 基因作为报导基因,构建一个新的对虾转基因质粒,以用于转基因抗病毒对虾的研究

1 材料与方 法

1.1 质粒

质粒 pSK100-DS,带有 GFP 基因,由澳大利亚 CSIRO 的 H. Narayana 博士惠赠;质粒 pRG Rz1 和质粒 pRG Rz2 分别为核酶 Rz1 和核酶 Rz2 的转录质粒,由本组构建并保存;质粒 pcDNA3 为空的转基因质粒,质粒 pBluescript SK+,均由本组保存、用于构建中间载体。

1.2 酶类

所有限制性内切酶购自 Promega 公司或 TAKARA 公司。连接酶购自 TAKARA 公司。Taq DNA 聚合酶购自华美生物工程公司。

1.3 PCR 反应

A, B 两对 PCR 引物均由中科院上海植物生理研究所合成。引物对 A 用于扩增或检测 GFP 基因,根据 GFP 全长基因序列的 5'-和 3'-两末端而设计,两个引物的序列分别为:

Primer 1: 5' ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG 3'

Primer 2: 5' TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT G3'

引物对 B 用于检测或扩增核酶基因,根据 pcDNA3 多克隆位点两端的序列设计,并在 5'-引物引入一个 *Apa* I 酶切位点,两个引物的序列分别为:

Primer 3: 5' GCA TGG GCC CAT ACG ACT CAC TAT
AGG GAG A 3'

Primer 4: 5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT A 3'

用引物对 A 扩增或检测 GFP 基因的反应条件为:以 2 μ L100 倍稀释的质粒 DNA 或 2 μ L 试管培养 12~14h 的菌液为模板,引物各 2 μ L, 2.5mmol/L 的 dNTP 4 μ L, 10 \times Taq 酶缓冲液 5 μ L, Taq 酶 1 μ L, 加 ddH₂O 至体积 50 μ L。程序为 94 $^{\circ}$ C 5min, 1 cycle; 94 $^{\circ}$ C, 30s, 50 $^{\circ}$ C, 45s, 72 $^{\circ}$ C, 45s, 30cycles; 94 $^{\circ}$ C, 30s, 50 $^{\circ}$ C, 45s, 72 $^{\circ}$ C, 10min, 1 cycle。引物对 B 扩增或检测核酶基因的反应条件与之相比,只是 DNA 链延伸条件改为 72 $^{\circ}$ C, 30s, 其余均相同。

1.4 质粒鉴定

用各种相应的限制性内切酶和上述 PCR 方法筛选和鉴定所获得的各个克隆。最终获得 pGTR 质粒,在此基础上进行 DNA 测序分析。测序由上海博亚生物技术有限公司完成。

2 结果

2.1 含 GFP 基因的中间质粒的构建

整个质粒的构建见图 1, 第一步先构建含 GFP 基因的中间质粒。PCR 扩增获得的 GFP 基因,经酚:氯仿抽提纯化后,与 *Sma* I 线性化的 pcDNA3 质粒相连接。经转化、挑菌扩增后用 PCR 和 *Pst* I 酶切初步筛选阳性克隆,用 *Ava* II 酶切鉴定所选阳性克隆中基因克隆的方向。阳性克隆经 PCR 获得一条大小约为 700bp 的片段,即 GFP 基因。*Pst* I 在 pcDNA3 上有两个酶切位点,分别位于 948bp 和 2 333bp 处,GFP 克隆位点在这两位点之间的 2 093 处。故阳性克隆经 *Pst* I 酶切后产生 2.1kb 和 4kb 两条带,而阴性克隆的带为 1.4kb 和 4kb。*Ava* II 在 pcDNA3 上的酶切位点在 2 796、4 664、8 484bp 处,在 GFP 基因上的位点在 656bp 处。因此,阳性克隆中,正向克隆经 *Ava* II 酶切后,产生 222bp、766bp、1 866bp、3 265bp 四个片段(图 2),而反向克隆将是 222bp、1 385bp、1 866bp、2 626bp 四个片段。获得的正向克隆命名为 pGDNA3。

2.2 含一个 Rz1,一个 Rz2 和 GFP 基因的质粒的构建

在构建好的 pGDNA3 的基础上,分别把一个 Rz1,一个 Rz2 克隆入此质粒的多克隆位点区。

质粒 pRG Rz1 用 *Eco* R I 和 *Hind* III 双酶切切出(173bp), 2% 的 Agarose 分离,低熔点胶回收后克隆到 pGDNA3 质粒多克隆位点区相应的酶切位点。经转化、挑菌扩增后用 PCR 和 *Sal* I 酶切筛选目的克隆。

PCR 产物经 2% 的 Agarose 检定,可看到 270bp 的小片段(含 Rz1, 其有 52bp 的两引物序列和 pGDNA3 的部分多克隆位点区)(图 3)。*Sal* I 在 pGDNA3 上有 3 个酶切位点,在 Rz1 的 1 63bp 处有一个位点。故阳性克隆质粒经 *Sal* I 酶切后出现三个可见片段(还有一个 33bp 的小片段,但在 Agarose 胶上不可能观察到),大小分别约为 1kb、2.2kb、3kb,而阴性克隆只有 2.2kb、3.9kb 两个可见片段。为进一步确证克隆,用 *Hind* III-*Eco* R I 双酶切, *Xho* I、

*Apa*I、*Bam*H I 分别单酶切阳性克隆。*Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切产生 170bp 小片段,为 R_z1 基因。*Xho*I 与 *Apa* I 单切使质粒线性化,*Bam*H I 由于位

点被剔除(原位于 pGDNA3 的 *Hind* III 与 *Eco*R I 之间),故切不动(图 4)。所得的阳性克隆命名为 pGR_z1。

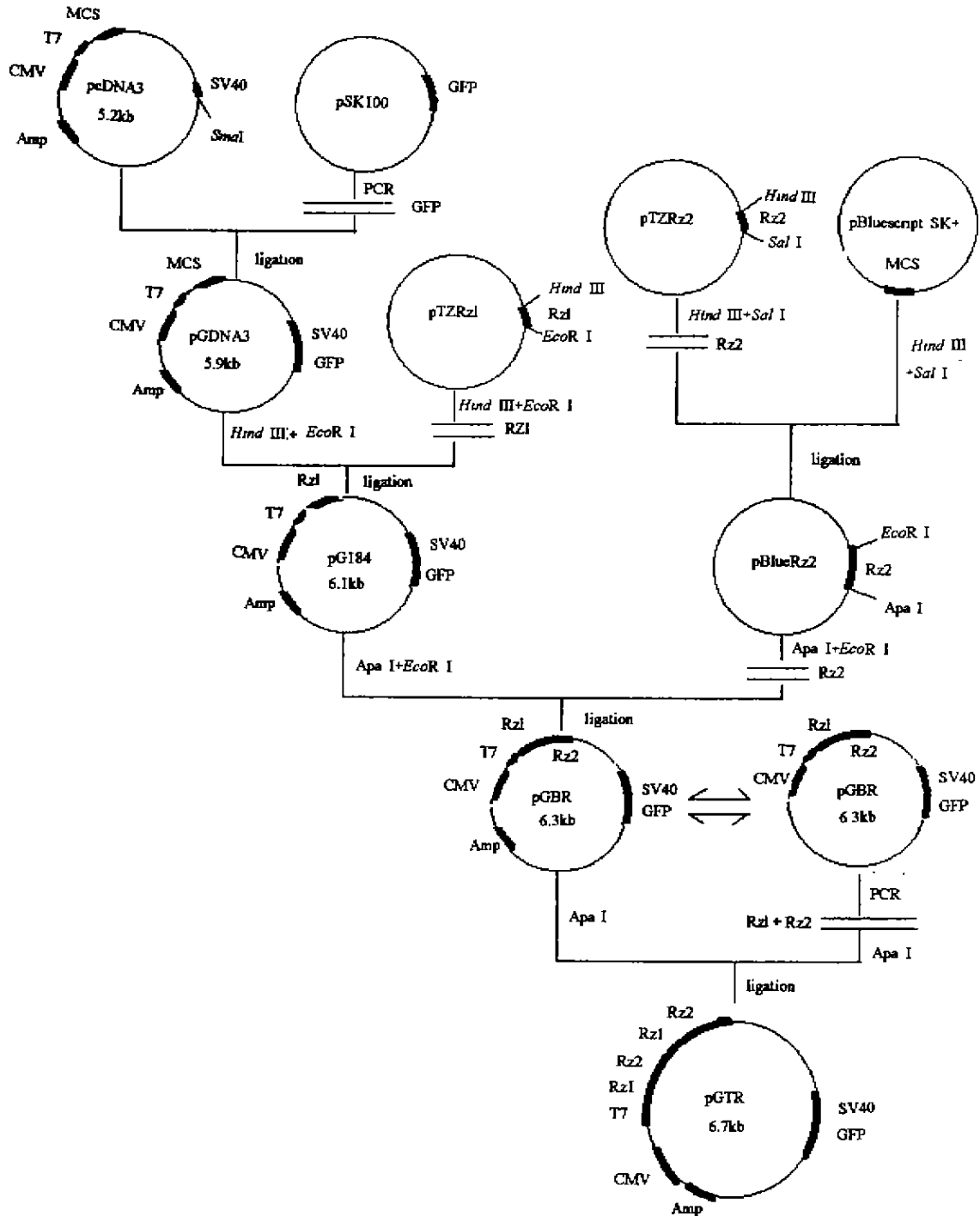


图 1 转基因质粒 pGTR 的构建

Fig.1 Construction of transgenic plasmid pGTR

由于 pRG R_z1 与 pRG R_z2 的酶切位点情况完全相同,不易直接把 R_z2 克隆入 pG_z1 质粒,故利用 pBluescript SK+ 构建一中间质粒,然后再将 R_z2 克

隆于 pGR_z1。用 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切含 R_z2 的质粒 pRG R_z2,切出 170bp 的核酶 R_z2,2% 的 Agarose 分离,低熔点胶回收 R_z2 后,克隆入 pBluescript SK+

质粒相应的酶切位点。用 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切筛选,切出 2.96kb 大片段和 170bp 小片段的即为阳性克隆,命名为 pBlue443。用 *Xho* I 和 *Bam*HI 双酶切, *Eco*R I 和 *Apa* I 双酶切进一步鉴定,均切出约 200bp 的小片段(图 5)。pBlue443 用 *Eco*R I 和 *Apa* I 双酶切,切出含 Rz2 的 190bp 小片段,2% 的 Agarose 分离,低熔点胶回收后克隆入 pGRz1 质粒多克隆位点区相应酶切位点。PCR 和 *Hind* III 筛选。PCR 引物为 primer 3 和 4,得到的片段大小为 410bp(图 3)。 *Hind* III 酶切则出现一条 180bp 的小片段。获得的阳性克隆命名为 pGBR。用 *Kpn* I, *Eco*R I, *Xho* I 分别单独酶切进一步鉴定, *Kpn* I 单酶切产生大小约 200bp 的片段, *Eco*R I 和 *Xho* I 均在 pGBR 上产生单切口(图 6)。

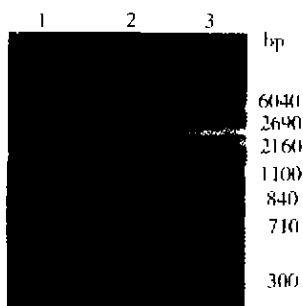


图 2 pC3 的限制性内切酶鉴定

Fig.2 Restriction endonuclease analysis of pC3
Lane 1, pC3/*Pst* I; 2, pC3/*Ava* II; 3, Marker.

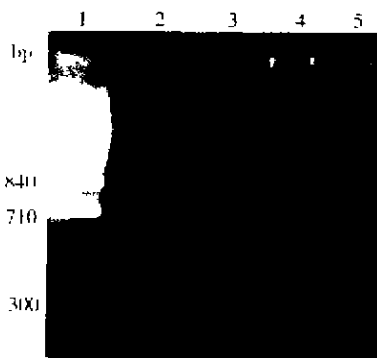


图 3 各质粒的 PCR 鉴定

Fig.3 PCR analysis of plasmids
Lane 1, Marker; 2, pC3; 3, pGRz1; 4, pGBR; 5, pGTR.

2.3 含四个核酶基因和 GFP 基因的质粒的构建

在 pGBR 质粒的基础上,使 Rz1 和 Rz2 都扩增一次,即可获得含四个核酶基因的质粒。

以 pGBR 为模板,用引物 3 和 4 进行 PCR 扩增,所获得的 410bp 片段(含一个 Rz1 和一个 Rz2)经低

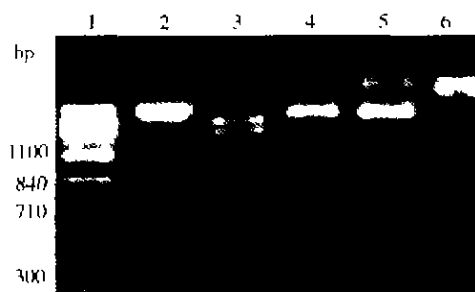


图 4 pGRz1 的限制性内切酶鉴定

Fig.4 Restriction endonuclease analysis of pG3
Lane 1, Marker; 2, pGRz1/*Hind* III + *Eco*R I; 3, pGRz1/*Sal* I; 4, pGRz1/*Xho* I; 5, pGRz1/*Apa* I; 6, pGRz1/*Bam*HI.

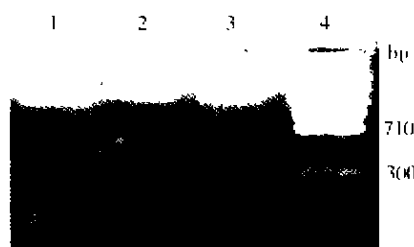


图 5 Blue443 的限制性内切酶鉴定

Fig.5 Restriction endonuclease analysis of pC3

Lane 1, pBlue443/*Eco*R I + *Apa* I; 2, pBlue443/*Xho* I + *Bam*HI; 3, pBlue443/*Hind* III + *Sal* I; 4, Marker.

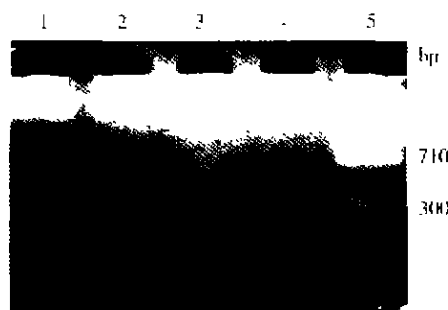


图 6 pGBR 的限制性内切酶鉴定

Fig.6 Restriction endonuclease analysis of pGBR

Lane 1, pGBR/*Kpn* I; 2, pGBR/*Hind* III; 3, pGBR/*Xho* I; 4, pGBR/*Eco*R I; 5, Marker

熔点胶回收后 *Apa* I 酶切。酚:氯仿处理后克隆于 pGBR 质粒的相应酶切位点。以 primer 3 和 4 为引物,用 PCR 初步筛选阳性克隆。阳性克隆 PCR 产物有 790bp 和 410bp 两条片段,而阴性克隆只有 410bp 片段(图 3)。 *Xho* I 酶切 PCR 筛出的阳性克隆以鉴定基因克隆的方向。产生 6.5kb 和 370bp 两条片段的即为所要的正向克隆,命名为 pGTR。用 *Apa* I, *Eco*R I, *Eco*R V 和 *Hind* III 分别单独酶切 pGTR 质粒

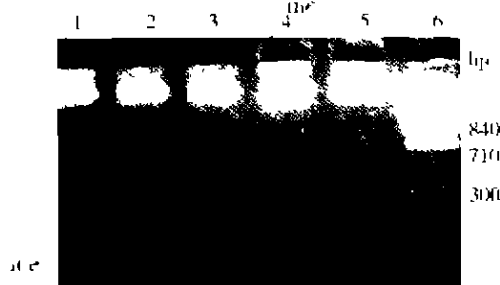


图7 pGBR的限制性内切酶鉴定

Fig.7 Restriction endonuclease analysis of pGBR

Lane 1, pGBR/*Hind* III; 2, pGBR/*Xho*; 3, pGBR/*Apa* I; 4, pGTR/*EcoRV*; 5, pGTR/*EcoR* I; 6, Marker.

以进一步鉴定,前三种酶切均产生 6.5kb 和 370bp 两条片段,*Hind* III 切出 6.3kb 和 200bp 两条片段(图 7)。

2.4 DNA 测序分析。

经测序分析证明,采用本路线成功的构建了我们所需的介导核酶基因转入中国对虾基因组中的转基因质粒 pGTR。

3 讨论

自从 RNA 的酶切割功能发现以来^[4],用核酶来切割病毒基因组,从而治疗相关病毒病一直是各实验室的研究热点^[5,6]。尽管经过多年的努力,在此研究方向上已取得一些进展^[7],但仍然存在一些难题。特别在 *in vivo*,核酶基因表达的时间和空间对这一技术路线的成功有重要意义,即核酶必须在适当的时间表达,并必需和被切割的底物在特定的细胞某一空间相遇,才能发挥其切割作用。控制核酶基因表达的空间和时间性,目前尚存在一定的难度,但如果能提高核酶基因表达的强度,使核酶在数量上获得高效表达,则可在一定程度上弥补核酶基因表达的调控在其它方面的不足。本工作主要设想和实现了将两种切割对虾杆状病毒同一基因不同位点的核酶基因串联成两组,以达到既增加同一基因的

酶切位点数,又增加核酶表达量的目的。从而能使核酶抑制病毒基因组复制的效率大大增加。这是本工作的创新之处。由于两组串联的核酶基因具有同样的酶切位点,因此在构建这一质粒时必须避免使用重复的酶切位点,这也是构建这一质粒的难度所在。我们使用 pBluescript SK+ 作为构建这一质粒的中间载体,从而克服了这一难点。

中国对虾是我国水产养殖业的主要品种。近年来,由于养殖对虾病害严重,种植资源衰退,严重阻碍了水产养殖业的发展。培养抗病抗逆的对虾新品种,是生物工程技术在水产养殖事业应用的一个新的热点和难点,并具有重要的理论和经济意义。我们以前的工作,已经初步把含有一个核酶基因和作为报告基因的绿色荧光蛋白基因构建的转基因质粒成功地导入中国对虾的受精卵^[3],因此在论文所报导的转基因质粒的构建成果,相信能使核酶基因的切割效能大大提高。

参考文献

- [1] 彭宝珍,任家鸣,龚祖坝,等.急性致死对虾病的杆状病毒原研究[J].病毒学报,1995,11(2):151-157.
- [2] 周国瑛,吴建华,沈学仁,等.核酶对对虾白斑病毒的一个可能的早晚期基因的体外切割[J].生物化学与生物物理学报,2000,32(3):253-257.
- [3] 刘志毅,相建海,周国瑛,等.用基因枪将外源 DNA 成功导入中国对虾受精卵[J].科学通报,2000,45:2539-2544.
- [4] Thomas R C. RNA as an enzyme[J]. Scientific American, 1986, 255 (5):64-75.
- [5] Gohla R, Banerjee A C. Sequence specific cleavage of the HIV-1 coreceptor CCR5 gene by a hammer-head ribozyme and a DNA-enzyme: inhibition of the coreceptor function by DNA-enzyme [J]. FEBS-Lett, 1998, 436(2):233-238.
- [6] Zhang X, Iwatani Y, Shinayama T, et al. Phosphorothioate hammerhead ribozymes targeting a conserved sequence in the V3 loop region inhibit [J]. Antisense-Nucleic-Acid-Drug-Dev. 1998, 8(6):441-450.
- [7] Narendra KV, Anilkumar RK, Fritz E. Recent developments in the hammerhead ribozyme field [J]. Nucleic Acid Res. 1998, 26(23):5237-5242.