

禽网状内皮组织增殖病病毒LTR序列的启动子功能*

赵文明^{1**}, 丁家波², 姜世金², 崔治中²

(1. 扬州大学畜牧兽医学院, 江苏扬州 225009; 2. 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018)

The Promoting Function of Long Terminal Repeat from
Reticuendotheliosis VirusZHAO Wen-ming^{1**}, DING Jia-bo², JIANG Shi-jin², CUI Zhi-Zhong²

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 22500, China; 2. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: The long terminal repeat (LTR) of *Reticuendotheliosis virus* (REV) was amplified by PCR technique and cloned into pUC18 vector at the sites of EcoRI and SacI, and the BGH polyadenylation signal sequence was cloned at the sites of *Sph* I and *Hind* III as a terminator. The positive clone was named pUC-LTR, which was used as a basic expressing vector to validate the activity of LTR. Green fluorescent protein (GFP) and REV envelope glycoprotein 90 (gp90) gene was cloned at the downstream of LTR in the pUC-LTR vector respectively as a reporter. These two recombinants pUC-LTR-GFP and pUC-LTR-gp90 were then transfected into Chicken Embryo Fibroblast (CEF) cells. 48h after the transfection, we could detect the expression of GFP and gp90. This study shows the LTR sequence could be used as a promoter to construct expressing vectors.

Key Words: *Reticuendotheliosis virus* (REV); Long terminal repeats (LTR); Promoter; Expressing vector

摘要: 通过PCR方法, 将禽网状内皮组织增殖病病毒 (REV) 的长末端重复序列 (LTR) 扩增并克隆进pUC-18质粒多克隆位点 (MCS) 的EcoR I和Sac I之间, 并以BGH基因的多聚腺苷酸序列作为终止子克隆到Sph I和Hind III之间, 构建成重组质粒pUC-LTR。将GFP基因和REV囊膜糖蛋白gp90基因分别克隆到pUC-LTR载体中, 获得质粒pUC-LTR-GFP和质粒pUC-LTR-gp90。重组质粒经转染48h, 能够检测到外源基因的表达。本研究提示, REV LTR能够作为启动子构建表达质粒。

关键词: 禽网状内皮组织增殖病病毒 (REV); 长末端重复序列 (LTR); 启动子; 表达质粒

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号 1003-5152(2004)03-0255-04

禽网状内皮组织增殖病病毒 (*Reticuendotheliosis virus*, REV) 是禽网状内皮组织增殖病的病原, 属反转录病毒科中C型致肿瘤病毒类的一种。该病毒主要侵害火鸡, 但也能引起鸡、鸭等禽类以淋巴-网状组织增生为特征的肿瘤性的病理综合征^[1,2]。REV基因组两端的长末端重复序列 (LTR) 非常保守, 同源性在94%以上^[3]。通过PCR方法, 特异性地扩增REV LTR序列常被用作检测REV存在的方法

^[4-6]。牛泡沫病毒 (*Bovine foamy virus*, BFV)、劳斯肉瘤病毒 (*Rous sarcoma virus*, RSV) 和人免疫缺陷病毒 (*Human immunodeficiency virus*, HIV) 的LTR已被证实具有体外真核启动子活性, 并且能够在*E.coli*中起始基因表达^[7-9], 但未见关于禽网状内皮组织增殖病病毒 (*Reticuendotheliosis virus*, REV) LTR作为启动子方面的研究报道。由于REV在感染宿主后, 能够以cDNA的形式整合进宿主细胞的基

收稿日期: 2003-11-21, 修回日期: 2004-01-05

* 基金项目: 江苏省教育厅高校自然科学研究计划项目(01KJB230001)

** 通讯作者: 赵文明(1969-), 男, 硕士。江苏泰州人, 主要从事动物分子生物学研究。Corresponding author. Tel: 0514-7971839; E-mail: wzmzhao@yzu.edu.cn

基因组, 并且REV和马立克氏病病毒(MDV)共感染或共培养时, LTR基因可整合进MDV基因组中^[10], 并且随着培养代次的增多, 含LTR的MDV所占的比重会增加^[11], 提示LTR可能会作为启动子, 加强某些与病毒MDV复制有关基因的表达。为了验证REV LTR在体外的启动活性, 本研究构建了以 REV LTR作为启动子的表达质粒, 通过检测GFP基因和REV gp90基因的表达, 验证了REV LTR 基因的体外启动活性。

1 材料与方 法

1.1 鸡胚和毒株

9-11 日龄 SPF 鸡胚购自南京药械厂; REV HA 毒株, TG1 宿主菌由本实验室保存。

1.2 分子生物学试剂

pUC18, PCR Kit, T₄DNA 连接酶, X-gal, IPTG 等均购于大连宝生物工程有限公司; FITC 购于 Sigma 公司; 脂质体(lipfectamine)购于 GiBco BRL 公司; 质粒纯化试剂盒购于 Qiagen 公司; 鼠抗重组 pGEX-env-gp90 血清由吉荣制备, 本实验室保存。

1.3 病毒的扩增

按照常规方法制备鸡胚成纤维细胞(CEF), 待细胞近 80%铺满培养瓶底时, 接种液氮中冻存的 HA 株 REV, 并维持 7d 后收获。

1.4 病毒基因组 DNA 的提取

参照“分子克隆”中介绍的方法进行^[12], 简略步骤如下: 加适量消化缓冲液(含蛋白酶 K)于收获的细胞液中, 50℃消化过夜; 苯酚氯仿抽提后, 用乙醇沉淀 DNA, 最后将沉淀溶解在 50μL TE 中备用。

1.5 PCR 循环

试验共设计了 4 对引物, 分别用于扩增 REV LTR 基因, BGH polyA 终止序列, GFP 基因以及 REV gp85 基因, 引物中含有用于克隆的酶切位点。(引物由上海生工生物工程有限公司合成)。各片段的引物序列如下:

F_{LTR}: 5' - AAAGGAATTC AATGTGGGAGGGAGCTC -3'

R_{LTR}: 5' - GTTGGAGCTC CAAATGTTGTATCGAAGTA -3'

F_{BGH}: 5'-ATTTCATG CCGCTCGACTGTGC-3'

R_{BGH}: 5' -CCTAAGCTT CCGCCTCAGAA-3'

F_{GFP}: 5' -ACGGGTACCAAGAATGGACTGTCTCACC-3'

R_{GFP}: 5' -AAAAGTCTGACTGGTGGAGGACATAGC-3'

F_{gp90}: 5-ATAGTCGACAGTGAACCGTCAGATCC-3'

R_{gp90}: 5' -TTACTGCAGACTTGTACAGCTCGTCC-3'

PCR 按常规方法进行, 反应体系为 50μL, 其

中 10×PCR Buffer 5 μL, dNTP (2.5 mmol/L each) 4 μL, 引物(25 μmol/L)各 2μL, 模板 DNA 约 20μg, rTaq 2U。

PCR 反应程序如下: 95℃ 5min 后, 按 95℃ 45s, 50℃ 45s, 72℃ 2min 进行 28 个循环; 最后 72℃延伸 10min。扩增产物用 0.8%琼脂糖凝胶进行电泳鉴定, 对于不同大小的片段程序作了适当的调整。

1.6 重组质粒的构建

1.6.1 pUC-LTR 质粒的构建: 将 LTR PCR 产物与 pUC18 载体分别用 *EcoR* I 和 *Sac* I 酶消化, 经连接和转化后, 筛选阳性克隆。获得的阳性质粒与 BGH 终止序列的 PCR 产物同时用 *Sph* I 和 *Sal* I 双酶切, 然后按一般方法筛选和鉴定阳性克隆。

1.6.2 pUC-LTR-GFP 和 pUC-LTR-gp90 质粒的构建: 将 GFP 基因的 PCR 产物和 pUC-LTR 质粒用 *Kpn* I 和 *Sal* I 双酶消化后, 连接和转化。同法, 将 gp90 PCR 产物和 pUC-LTR 质粒用 *Sal* I 和 *Pst* I 消化, 经连接和转化后, 常规方法筛选阳性克隆。所有重组质粒均经序列测定验证。

1.7 重组质粒的转染

用 Qiagen 公司的质粒制备试剂盒制备 pUC-LTR, pUC-LTR-GFP 和 pUC-LTR-gp90 质粒, 经定量后保存备用。按照 Lipfectamine 说明书进行转染, 取 1, 2, 3, 4, 5, 6μg 质粒分别与 8μL 的脂质体共转染长满 70%~80%的 CEF 瓶皿中(35mm), 6h 后, 加入等体积的含 10%犊牛血清的 DMEM 培养基继续生长。

1.8 表达产物的检测

对 pUC-LTR-GFP 质粒, 转染 24h 后, 将细胞瓶直接置于荧光显微镜下观察; 对 pUC-LTR-gp90 质粒, 转染 24h, 48h 和 72h 后, 分别从瓶皿中取出一预先放置的盖玻片。用 -20℃预冷的丙酮固定 5min。吸取 1:100 稀释的鼠抗 gp90 (大肠杆菌表达)血清, 小心加到固定好的盖玻片上, 37℃作用 40min, 1xPBS 洗涤三遍; 加上 FITC 标记的抗鼠 IgG 荧光抗体 (1:256), 37℃作用 40min, 1X PBS 洗涤三遍。加一滴 50%甘油于盖玻片上, 在荧光显微镜下观察并拍摄实验结果。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

PCR 程序经适当调整后, 获得了所有预期大小的 PCR 产物。图 1 显示了不同长度 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果。

2.2 重组质粒的鉴定

重组质粒通过不同的限制性内切酶初步鉴定后, 经序列测定, 与发表的序列完全一致^[3]。图 2 显示了 pUC-LTR 质粒的不同酶切图谱。

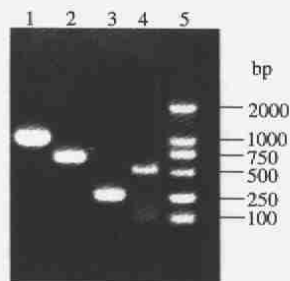


图 1 PCR 产物电泳图

Fig.1 The electrophoresis for the product of PCR

1, PCR products of gp90; 2, PCR products of GFP; 3, PCR products of BGH terminator; 4, PCR products of LTR; 5, Marker 2000.

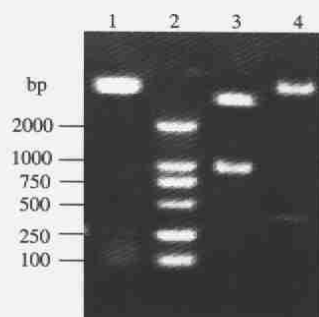


图 2 pUC18-LTR 克隆酶切鉴定图

Fig.2 The electrophoresis for the identification of pUC18-LTR plasmid digested by restri-enzyme.

1, pUC18-LTR digested by *EcoR* I; 2, Marker 2000; 3, pUC18-LTR digested by *EcoR* I and *Hind* III.

2.3 重组质粒的定量和转染

重组质粒经试剂盒纯化后, 按 1:5; 1:25; 1:100 稀释, 各取 2 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳, 结果发现, 所提质粒 DNA 条带均匀一致, 没有 RNA 的残余。参照 Marker 的用量, 确定保存的质粒 DNA 约为 0.5 μ g/ μ L。质粒在转染 72h 内, 转染细胞和未转染的细胞在形态和生长状况上不见明显差异。

2.4 间接免疫荧光试验结果

转染 24h 后, pUC-LTR-GFP 质粒样品在荧光显微镜下可观察到少数细胞的胞浆内存在微弱的荧光 (见图 3), 并且该荧光能维持到转染 48h 和 72h; 对 pUC-LTR-gp90 质粒样品, 不同用量和不同时期取出的盖玻片固定后, 进行 IFA, 试验结果发现, 用量为 2-4 μ g 之间的重组质粒, 转染 72h 的样品出

现了较高的转染率, 其余的样品都出现了不同程度的阳性结果其荧光强度远远高于 pUC-LTR-GFP 样品 (见图 4A); 重组质粒 pUC-LTR (阴性对照) 和没有转染质粒的 CEF (空白对照) 在任何时候都不见荧光, 全为阴性结果 (见图 4B)。



图 3 pUC-LTR-GFP 质粒转染 CEF48 h 后的荧光照片

Fig.3 The fluorescence on the cytoplasm of CEF cells transfected by plasmid pUC-LTR-GFP

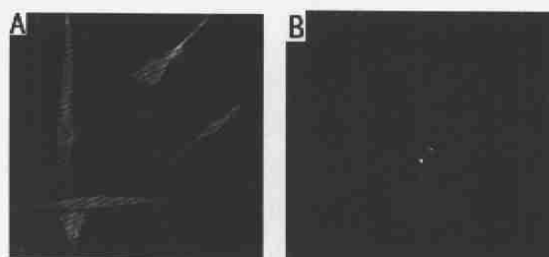


图 4 pUC-LTR-gp90 质粒转染 CEF 在间接免疫荧光试验

Fig.4 A. The fluorescence from cytoplasm of CEF cells when the plasmid pUC-LTR-gp90 was transfected for 48 hours in IFA; B. Control test (negative)

3 讨论

为探讨禽网状内皮增殖病病毒 LTR 启动子在真核细胞中的功能, 我们成功构建了 pUC18-LTR 质粒, 该质粒以 REV LTR 作为启动子; 同时我们又将 BGH 基因的 Poly (A) 序列引入其中, 避免了非目的基因的无效转译。

实验选择了 GFP 和 REV 囊膜糖蛋白 gp90 作为报告基因。由于 GFP 不需作任何标记, 就可直接观察结果, 灵敏方便, 该基因常被用作研究启动子活性和转染效率^[13-15]; 选用 gp90 为报告基因, 不仅由于我们已经具有 gp90 的抗血清, 也为了使 gp90 基因置于其天然的启动子之下, 可能达到理想的表达水平。而实验结果发现, 转染 pUC-LTR-gp90 质粒在 IFA 中的荧光强度远远高于 pUC-LTR-GFP 质粒转染后在荧光显微镜下的观察效果。作者认为, 这除了与实验操作可能带来的误差有关, 但更多是启动子对不同基因的启动效果可能存在差异有关。

一般反转录病毒 LTR 序列均具有启动子功能,有些反转录病毒如 HIV、RSV、MMTV、HTLV - II、BIV 不仅可以在真核生物中具有启动活性,而且还能在原核细胞内行使转录功能^[16,17],但对 REV LTR 体外启动活性的研究却未见报道。本研究首次证明了 REV LTR 在体外的真核启动活性,并且根据 IFA 试验中的荧光强度,我们可以初步判断出其良好的启动能力,这预示这 REV LTR 可以考虑用作构建真核表达载体。由于 IFA 不能定量地确定启动子的活性,我们拟用 CAT 为报告基因,将该启动子和其它的启动子如 SV40 等启动子的活性作定量的比较,从而确定其构建实用真核表达载体的意义。

由于 LTR 序列中常存在真核启动子与原核启动子镶嵌的现象^[18],REV LTR 是否具有原核启动子活性,这一点我们也正在研究之中,很可能这一现象是反转录病毒 LTR 启动子的一种共性。进一步研究将为探寻反转录病毒的起源与进化提供重要线索。

在进行重组质粒转染时,研究发现转染质粒量在 2-4ug 之间较合适。质粒的转染量低于 1ug 时,转染效率会明显降低;4ug 以上的质粒对转染效率的提高不见明显的提高。用脂质体 lipofectamine 转染细胞后 24h, 48h 和 72h 后,分别取样检测,结果我们发现 48h 转染的阳性细胞最多,且荧光强度也最高。

参考文献

- [1] Witter R L. Reticuloendotheliasis. In: B W Calnek. Diseases of Poultry (10th ed.) [M]. USA, Iowa State University Press, 1997, 467~484.
- [2] 崔治中, 孙怀昌, 朱承如. 禽白血病及禽网状内皮增生病毒感染情况的调查[J]. 中国畜禽传染病, 1987, (1):37-38.
- [3] 赵文明, 丁家波, 崔治中. 禽网状内皮增生病毒不同毒株 LTR 基因的分析[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2001; 19(1): 13-15.
- [4] 赵文明, 丁家波, 崔治中. 不同方法对网状内皮组织增殖病毒病的检测[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(2): 133-135.
- [5] 张志, 崔治中, 姜世金, 等. 鸡肿瘤病料中马立克氏病病毒和禽网状内皮增生病毒共感染的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(4): 274-278.
- [6] 吉荣, 刘岳龙, 秦爱建, 等. 免疫抑制鸡群传染性贫血病病毒和网状内皮增生病毒共感染的检测[J]. 中国兽药杂志, 2001, 35(4): 1-3.
- [7] 郭春光, 乔文涛, 胡文治, 等. 牛泡沫病毒长末端重复序列在大肠杆菌中的启动子功能[J]. 病毒学报, 2002, 18(2): 181-184.
- [8] Kashanchi F, Wood C. Human immunodeficiency viral long terminal repeat is functional and can be transactivated in *Escherichia E.coli* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 2157-21611.
- [9] Mitsialis S A, Young J F, Palese P, et al. An avian tumor virus promoter directs expression of plasmid gene in *Escherichia coli* [J]. Gene, 1981, 16: 217-2251.
- [10] Isfort R, Jones D, Kost R, et al. Retrovirus insertion into herpesvirus in vitro and in vivo [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89:991-995.
- [11] Jones D, Isfort R, Witter R L, et al. Retrovirus insertion into a herpesvirus are clustered at the junctions of the short repeat and short unique sequences [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 3855-3859.
- [12] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T (金冬雁, 黎孟枫等译): 分子克隆实验指南(第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [13] 陈扬超, 张月飞, 周克元, 等. 以 GFP 为报告基因优化 CNE-2Z 细胞脂质体转染条件的实验研究[J]. 广东医学院学报, 2001, 19(3): 161-163.
- [14] 潘兹兹, 张楚瑜, 陈玉栋, 等. 表达猪瘟病毒 E2 基因和 gfp 报道基因的伪狂犬病病毒双基因转移载体的构建[J]. 武汉大学学报(理学版), 2002, 48(4): 466-470.
- [15] 王业富, 齐义鹏, 岳莉莉, 等. 用细菌 δ 杆状病毒系统在昆虫细胞中表达 GFP 与 HCV 抗原融合蛋白[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1998, 14(2): 134-139.
- [16] 陈宙涛, 良臣, 刘淑红, 等. 牛免疫缺陷病毒长末端重复序列 (BIV-LTR) 在大肠杆菌中的启动子功能[J]. 病毒学报, 1996, 12(2): 148-155.
- [17] Hawley D K, McClure W R. Compilation and analysis of *E.coli* promoter DNA sequences [J]. Nucleic acids reserch, 1983, 11: 2237-2249.
- [18] Corpenner S, et al. Identification of transactivator response sequences in the long terminal repeat of bovine immunodeficiencylike virus [J]. J Virol. 1993, 67: 4399-4403.