

马立克氏病病毒 pp38 基因上游的一个双向启动子研究

丁家波 崔治中* 孙淑红 姜世金

(山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

摘 要: 马立克氏病病毒(MDV) pp38 基因上游是病毒基因组 DNA 复制原点。在其两侧均含有启动子 TATA-box、CAAT-box 等特征性的保守基元, 推测是一个天然的双向启动子。为了在体外验证其双向启动活性, 本研究以 MD-Vpp38 为报告基因, 并将其 ORF 插入到 pUC18 中, 构建了 pUC-pp38 质粒。将包含该启动子完整区域的 789bp 序列分别以正反两个方向克隆进 pUC-pp38 质粒中, pp38 报告基因的上游, 获得的重组质粒 pPro^fpp38 和 pPro^rpp38。将所获得的重组质粒分别转染鸡胚成纤维细胞(CEF), 通过间接免疫荧光试验检测 pp38 基因的表达以验证该启动子的双向启动活性。结果表明, 马立克氏病病毒复制原点区的启动子无论以何种方向插入 pUC-pp38 质粒中, 在转染细胞 24h 内能检测到 pp38 基因的表达, 48h 后能获得高效和持续的表达。逐渐缩小该启动子的范围, 最终在 320bp 时, 仍能检测到两个方向较强的启动活性。

关键词: 马立克氏病病毒, pp38 基因, 双向启动子

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209(2004)02-0162-05

马立克氏病病毒(*Marek's disease virus*, MDV) 是一种细胞结合型疱疹病毒, 对养禽业造成了巨大的损失^[1~3]。随着对 MDV 基因组结构的深入研究, 与 MDV 致肿瘤相关的基因相继被发现^[4~9]。在以 MDV 基因组 DNA 复制原点的两侧约 350bp 的区域内, 均含有 TATA-box、CAAT-box、Sp1 和 TA-rich 反向重复序列等启动子和增强子特有的保守序列。其上游和下游分别是与 MDV 致肿瘤相关的 1.8kb 转录子和 pp38 基因^[7,9,10]。因而, 这段序列同时调控着 1.8kb 的转录子和 pp38 基因的转录^[9]。

研究蛋白质功能的时候, 需要考虑蛋白质之间的相互作用。特别是对二聚体的研究, 往往需要在同一载体中表达两种蛋白质。现有的商品化载体(如 pBud4.1 等)是将两个不同的启动子插入同一个载体构建而成。在植物上已经有双向启动子的报道^[11], 但对动物病毒中双向启动子的报道很少, 更未见利用天然的双向启动子构建的商品化载体。

为了进一步证实该 MDV 启动子的双向启动活性, 探索以它来构建真核双向表达质粒的可能, 本研究将启动子以两种不同的方向克隆进一种质粒中, 并转染 CEF 细胞, 通过检测报告基因 pp38 的表达, 来证实该启动子的双向启动能力。同时构建了一系列长短和方向不同的质粒转染 CEF, 通过 IFA 的荧

光强度, 确定了与该启动子活性相关的碱基范围。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

pUC18、PCR Kit、T4 DNA 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 Mini Kit 购于 Qiagen 公司。pGEX-6p-1-pp38 原核表达质粒由崔晓萍博士提供。9~11 日龄 SPF 鸡胚购于斯帕法斯公司(济南)。

1.2 病毒的扩增和病毒基因组 DNA 的提取

按照常规方法制备鸡胚成纤维细胞(CEF), 待细胞近 70% 铺满培养瓶底时, 接种液氮中冻存的 RB1B 株 MDV^[12], 并维持 4d 以上, 到出现大量细胞空斑时收获。将收集的细胞消化、抽提, 最后用乙醇沉淀 DNA。

1.3 重组质粒的构建

参照 Cui 等^[9]发表的 pp38 基因序列, 自行合成 3 对引物, 用于构建包括整个启动子序列在内的不同方向的表达质粒。不同引物的上下游分别引入了各自的酶切位点, 各引物序列及其相对于 pp38 的位置见表 1。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

基金项目: 国家自然科学基金(30070544)

* 通讯作者。Tel 86-538-8241560; Fax 86-538-8241419; E-mail: zzcui@sdaa.edu.cn

作者简介: 丁家波(1975-)男, 江苏泰州人, 博士研究生, 主要从事动物分子病毒学研究。E-mail: dingjiabo@sohu.com

收稿日期: 2003-07-04, 修回日期: 2003-10-08

表 1 用于构建不同重组质粒的 PCR 引物序列

Table 1 Primers used to generate a serial of plasmids to validate the activity of the promoter

Primer	Sequence	The sites opposite to the ORF of pp38 ^[9]	Fragment generated/bp	Restri-enzyme sites
F _{pp38}	5'-TAAAgtcgacGTGCAAGATCGGCAGGG-3'	- 22 ~ - 4	1428	Sal I
R _{pp38}	5'-GAGatgcGAGAAAGGAGCAAATGAC-3'	1391 ~ 1371		Sph I
F _{pro^f}	5'-CCA gagctc CATCATCAAATATCGCCG-3'	- 879 ~ - 853	789	Sac I
R _{pro^f}	5'-TAA gtcgac ATGAGTGGAGGGAGGGTG-3'	- 108 ~ - 126		Sal I
F _{pro^r}	5'-AGG gtcgac ATCATCAAATATCGCCG-3'	- 879 ~ - 853	789	Sal I
R _{pro^r}	5'-ATA gagctc ATGAGTGGAGGGAGGGTG-3'	- 108 ~ - 126		Sac I
F _{pPro^fpp38-1}	5'-CCA gagctc CATCATCAAATATCGCCG-3'	- 879 ~ - 853	521	Sac I
R _{pPro^fpp38-1}	5'-GT gtcgac TCGAGGCCACAAGAAATT-3'	- 393 ~ - 374		Sal I
F _{pPro^rpp38-1}	5'-AA gtcgac GAGCATCGCGAAAGAGAGA-3'	- 690 ~ - 671	599	Sal I
R _{pPro^rpp38-1}	5'-TAA gagctc ATGAGTGGAGGGAGGGTG-3'	- 108 ~ - 126		Sac I
F _{pPro^fpp38-2}	5'-CCA gagctc CATCATCAAATATCGCCG-3'	- 879 ~ - 853	475	Sac I
R _{pPro^fpp38-2}	5'-GT gtcgac CTACTCGAACTATCAC-3'	- 420 ~ - 437		Sal I
F _{pPro^rpp38-2}	5'-AAA gtcgac CGAGCCGCCCCACATGTA-3'	- 635 ~ - 616	544	Sal I
R _{pPro^rpp38-2}	5'-TAA gagctc ATGAGTGGAGGGAGGGTG-3'	- 108 ~ - 126		Sac I
F _{pPro^fpp38-3}	5'-CCA gagctc CATCATCAAATATCGCCG-3'	- 879 ~ - 853	436	Sac I
R _{pPro^fpp38-3}	5'-AAA gtcgac TGCCAACGCGTCAGCGT-3'	- 460 ~ - 477		Sal I
F _{pPro^rpp38-3}	5'-AAT gtcgac CCCCAACACTCAAGTG-3'	- 614 ~ - 598	523	Sal I
R _{pPro^rpp38-3}	5'-TAA gagctc ATGAGTGGAGGGAGGGTG-3'	- 108 ~ - 126		Sac I

1.3.1 pUC-pp38 质粒的构建 :以 RB1B 株 MDV 基因组 DNA 为模板 ,以 F_{pp38} 和 R_{pp38} 为引物(表 1)获得的 PCR 产物 ,包含了 MDV pp38 基因的完整阅读框和其终止序列^[9] ,总长度为 1428bp。将 PCR 产物与 pUC18 载体分别用 Sac I 和 Sph I 酶消化后 ,回收酶切产物。按常规方法连接 ,转化宿主菌 TG1。挑取白色菌落培养后 ,碱裂解法小量制备质粒 ,酶切筛选、鉴定阳性克隆 ,并对阳性克隆测序。

1.3.2 验证启动子正反向活性克隆质粒的构建 :将以 F_{pro^f} 和 R_{pro^f} 为引物 ,RB1B 株 MDV 基因组 DNA 为模板的 PCR 产物分别用 Sac I 和 Sal I 双酶消化 ,与双酶切的质粒 pUC-pp38 连接转化后 ,挑取白色菌落鉴定克隆。获得启动子正向克隆子 pPro^fpp38 和反向克隆子 pPro^rpp38 ,获得的重组克隆再进一步测序验证。

1.3.3 用于确定启动子核心区域的一系列克隆的构建 :为了确定该双向调控序列与启动子活性的关系 ,对 1.3.1 中 789bp 的 PCR 产物序列测定和分析后 ,参照各调控元件的位置^[9] ,合成 6 对不同引物(表 1) ,将该启动子的范围不断缩小。其中正向分别切去 pp38 转录子的前导序列 ,TATA 框和 Oct 位

点 ,反向分别切去了 1.8kb 转录子前导序列 ,TATA 框和一个 SP1 位点。获得的 PCR 产物分别克隆进 pUC-pp38 质粒中 ,所有克隆均测序验证。将一系列含长短和方向不同的调控序列的质粒转染 CEF 细胞 ,用 IFA 试验检测 pp38 基因的表达。根据 IFA 试验中的荧光强度确定调控序列中与活性相关的有效范围。

1.4 pp38 抗血清的制备

将 pp38 基因克隆进原核表达载体 pGEX-6P-1 中 GST 基因下游 ,用 IPTG 诱导表达后进行 SDS-PAGE 分析 ,将表达条带从胶中回收并碾碎 ,分 4 次免疫小白鼠 ,每次免疫约 100ng ,每两次免疫之间间隔 15d ,最后一次免疫 7d 后采血分离血清。

1.5 重组质粒的转染

将重组菌 pUC-pp38、pPro^fpp38 和 pPro^rpp38 大量培养后 ,用 Mini Kit 试剂盒纯化质粒 ,经定量后保存备用。转染方法参照 GiBco BRL 公司 Lipfectamine 说明书进行。转染后 24h、48h、72h、96h 和 120h 分别取样品固定、待检。

1.6 间接免疫荧光试验 (IFA)

吸取 1:100 稀释的鼠抗 pp38 血清 ,小心加到固

定好的盖玻片上,37℃作用 40min,1 × PBS 洗涤 3 遍,加上 FITC 标记的抗鼠 IgG 荧光抗体,37℃作用 40min,1 × PBS 洗涤 3 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 验证启动子正反向活性的重组克隆的鉴定

用表 1 中的前 3 对不同引物,以 RB1B 株 MDV

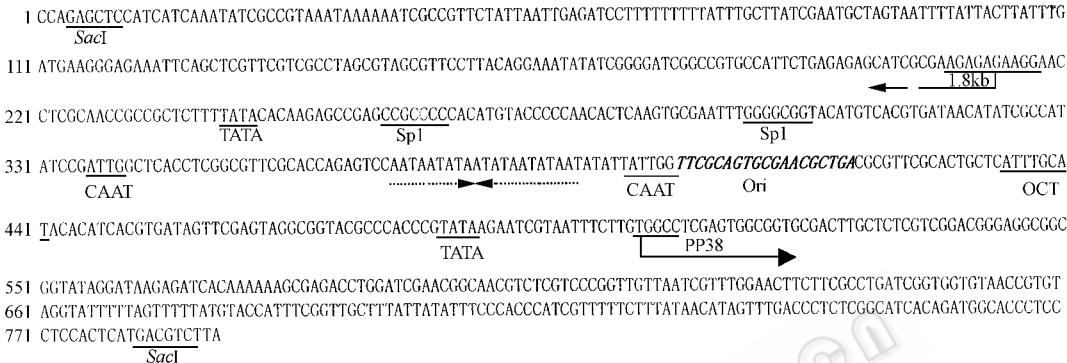


图 1 以 RB1B 株 MDV 基因组 DNA 为模板的 789bp PCR 测序结果及其功能元件的分析

Fig.1 Nucleotide sequence analysis of 789bp PCR product from MDV RB1B strain

Arrows underlining the sequence represent perfect inverted repeats described by Cui *et al* ;

The blacked italic sequence shows putative origin of replication , based on homology with HSV *ori*^[6].

2.2 重组质粒在转染细胞中的表达

CEF 单层在分别经重组质粒 pPro^fpp38 和 pPro^rpp38 转染后 24h,用鼠抗 pp38 血清做 IFA,均能在 CEF 细胞上形成相似强度的绿色荧光(图 2-A);48h 后,CEF 的阳性细胞比例可达 50% 以上。没有插入启动子的 pUC-pp38 质粒转染的 CEF 在 IFA 试验中观察不到荧光(图 2-B)。

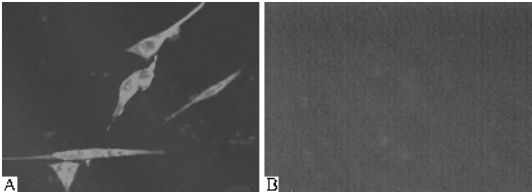


图 2 重组质粒转染 CEF 48h 的 IFA 结果

Fig.2 The fluorescence from cytoplasm of CEF cells when the recombinant plasmid was transfected for 48 hours in IFA.

A. The transfection of pPro^fpp38 and pPro^rpp38 plasmids ; B. The transfection of pUC-pp38 plasmid (control).

2.3 双向启动子中影响启动特性的序列成分确定

按照图 3 所示的策略,我们获得了一系列具有不同长度和方向调控序列的克隆质粒(表 2)。其中 pPro^fpp38-2 和 pPro^rpp38-2 质粒缺失了各自方向的 TATA 框,使表达强度明显下降;pPro^fpp38-3 缺失了

基因组 DNA 为模板,经 PCR 反应后,得到了预期大小的不同长度(1428bp、789bp)的 DNA 条带。获得的 pUC-pp38, pPro^fpp38 和 pPro^rpp38 质粒序列测定的结果与预期吻合,PCR 产物包含了相对于 pp38 基因 ORF - 879 ~ - 108 之间的部分,其中第 780 位碱基对应于 pp38 基因 ORF 的 ATG 上游 - 108 位碱基^[9],该序列分析结果见图 1。

TATA 框和 Oct 位点,结果在 IFA 中见不到荧光;pPro^rpp38-3 缺失 TATA 框和两个 SP1 位点中的一个,结果表达强度比 pPro^rpp38-2 质粒显著降低。各种质粒转染 CEF 后,在 IFA 试验中荧光强度见表 2。根据这一系列的克隆质粒转染的结果,本试验最终确定的核心区为处在两 TATA 框之间的约 320bp 之间的序列。

表 2 不同质粒转染 CEF 的 IFA 相对强度

Table 2 The fluorescence intensity in IFA with different plasmids			
Plasmid	Direction	The sites opposite to the ORF of pp38 ^[9]	The fluorescent intensity in IFA
pPro ^f pp38	pp38	- 879 ~ - 853	++ ++
pPro ^r pp38	1.8kb-mRNA transcript	- 879 ~ - 853	++ ++
pPro ^f pp38-1	pp38	- 879 ~ - 374	++ ++
pPro ^r pp38-1	1.8kb-mRNA transcript	- 690 ~ - 108	++ ++
pPro ^f pp38-2	pp38	- 879 ~ - 420	++
pPro ^r pp38-2	1.8kb-mRNA transcript	- 635 ~ - 108	++
pPro ^f pp38-3	pp38	- 879 ~ - 460	—
pPro ^r pp38-3	1.8kb-mRNA transcript	- 614 ~ - 108	+

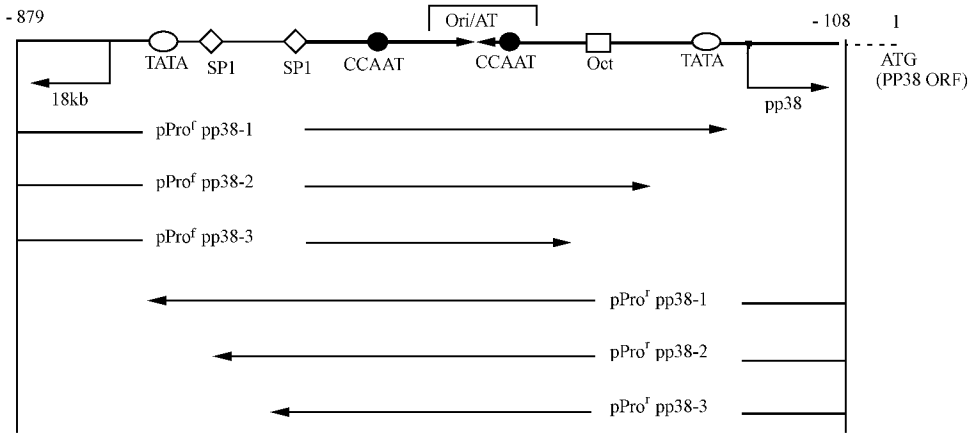


图 3 参照启动子的结构^[9] 确定启动子核心序列的示意图

Fig.3 The strategy to identify the core sequence of the promoter-enhancer region according to this putative structure^[9]

3 讨论

MD 是家禽最重要的肿瘤疾病^[14] ,由于 MDV 是一种严格的细胞结合型病毒 ,其保存和研究相对困难 ,所以人们对它的认识一直比较缓慢^[9] ,早在 90 年代初 ,Bradely 等^[5]就发现在病毒复制原点的两侧 ,分别是两个与肿瘤相关的基因 ,而 Cui 等^[9]1991 年就标明了 pp38 基因的启动子和增强子元件。

以 RB1B MDV 基因组为模板获得的 789bp PCR 产物测序结果分析表明 ,紧邻着 pp38 基因的 CAAT 盒上游是一个多 TA 的反向重复序列 ,以此反向重复序列为界 ,两侧有各自的 TATA 盒和 CAAT 盒 ,由此推测 ,可能我们所研究的双向启动子恰好是两个单一、反向的启动子的天然组合。对于这一假设 ,我们也拟用实验来验证。但即使这样 ,如此紧密相连的两个不同方向的启动子 ,在构建真核表达载体时 ,我们仍可当作一个双向的启动子。

为了验证该启动子的活性 ,我们首先构建了 pUC-pp38 作为基本质粒 ,该质粒中含有 pp38 基因作为报告基因 ,同时将该基因的终止序列克隆进载体中。这不仅由于我们已经具有 pp38 的抗血清 ,也为了使 pp38 基因置于其天然的启动子之下 ,可能达到理想的表达水平。另外 ,pp38 蛋白合成后 ,立即被分泌到细胞浆中 ,在 IFA 试验中 ,能清楚地看到细胞浆呈明亮的绿色 ,细胞核不着色 ,对比明显 ,有利于判断报告基因的表达。终止子的引入 ,也避免了非目的基因的无效转译。为了验证启动子正反两方向活性 ,起初保留了 1.8kb 转录子和 pp38 基因转录起始点下游各 100 多个碱基 ,同样是为了减少未知因素对启动子活性存在的可能影响。

在构建的 pPro^fpp38 和 pPro^rpp38 两个重组质粒

中 ,相对于病毒原有基因结构而言 ,pp38 转录子前导序列中相对于 pp38 基因 ORF 的 - 22 ~ - 107 之间的序列已被删除。在 pPro^fpp38 质粒中 ,启动子以天然状态正向插入 pp38 基因上游 ;在 pPro^rpp38 质粒中 ,启动子反向插入 pp38 基因上游 ,pp38 基因就如同处于人工构建的启动子作用下。但用等量的 pPro^fpp38 和 pPro^rpp38 质粒 ,在同样的转染条件下 ,两者都出现了高效的表达。这显示 ,该启动子可以以两个不同的方向启动 pp38 基因的转录。1999 年 ,Shigekane 等^[13]用该启动子构建了表达氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因的质粒 ,但在 CEF 上并未检测到表达。而我们用同样的启动子检测到 pp38 基因的表达。作者认为 ,该启动子对不同的基因可能显示不同的启动活性 ,或者 pp38 蛋白可能是该启动子的一个反式作用因子。

通过不断减少该调控区碱基数 ,我们初步确定包括两 TATA 框之间约 320bp 的大致范围。任何一方 TATA 盒的切除 ,则明显地影响了该方向的活性。对于 pp38 方向 ,TATA 框和 Oct 元件同时缺失时 ,该方向的启动活性基本丧失 ,SP1 位点的切除对表达强度有一定程度的影响。由于 IFA 不能进行启动子活性的定量分析 ,因此 ,各元件对启动子活性影响程度的大小及该启动子最有效的序列范围仍需利用其它的定量试验来确定。

参 考 文 献

[1] Churchill A E , Biggs P M . Agent of Marek ' s disease in tissue culture . *Nature* ,1967 **215**(100) :528 - 530 .
[2] Nazerian K , Solomon J , Witter R L , *et al.* Studies on the etiology of Marek ' s disease . II . Finding of a herpesvirus in cell culture . *Proc Soc Exp Biol Med* , 1968 ,**127**(1) :177 - 182 .
[3] Okazaki W , Purchase H C , Rumster R R . Protection against

- Marek 's disease by vaccination with a herpesvirus of turkeys. *Avian Dis* , 1970 , **14** (2) : 413 – 429.
- [4] Fukuchi K , Tanaka L , Schierman R , *et al.* The structure of the Marek 's disease virus DNA : the precence of unique expansion in nonpathogenic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1985 , **82** : 751 – 754
- [5] Maotani K , Kanamori A , Ikuta K , *et al.* Amplification of a tandem direct repeat within inverted repeats of Marek 's disease virus DNA during serial in vitro passage. 1986 , *J Virol* **58** : 657 – 659.
- [6] Bradley G , Hayashi M , Lancz G , *et al.* Structure of the Marek 's disease virus *Bam*HI-H gene family : genes of putative importance for tumor induction. *J virol* , 1989 , **63** : 2534 – 2542.
- [7] Bradley G , Lancz G , Tanaka A , *et al.* Loss of Marek 's disease virus tumorigenicity is associated with truncation of RNAs transcribed within *Bam*HI-H. *J Virol* , 1989 **63** (10) : 4129 – 4135.
- [8] Kawamura M , Hayashi M , Furuichi T , *et al.* The inhibitory effects of oligonucleotides , complementary to Marek 's disease virus mRNA transcribed from the *Bam*HI-H region , on the proliferation of transformed lymphoblastoid cells MDCC-MSB1. *J Gen Virol* , 1991 **72** (Pt 5) : 1105 – 1111.
- [9] Cui Z Z , Lee L F , Liu J L , *et al.* Structural analysis and transcriptional mapping of the Marek 's disease virus gene encoding pp38 , an antigen associated with transformed cells. *J Virol* , 1991 , **65** (12) : 6509 – 6515.
- [10] Lee L , Nazerian K , Leinbach S , *et al.* Effect of phosphonoacetate on Marek 's disease virus replication. *J Natl Cancer Inst* , 1976 **56** (4) : 823 – 827.
- [11] Morris B A , Richardson K A , Haley A , *et al.* The nucleotide sequence of the infectious cloned DNA component of tobacco yellow dwarf virus reveals features of geminiviruses infecting monocotyledonous plants. *Virology* , 1992 **187** (2) : 633 – 642.
- [12] Schat K A , Calnek B W , Fabricant J. Characterization of two highly oncogenic strains of Marek 's disease virus. *Avian Pathol* , 1982 **11** : 593 – 605.
- [13] Shigekane H , Kawaguchi I Y , Shirakata I M , *et al.* The bi-directional transcriptional promoters for the latency-relating transcripts of the pp38/pp24 mRNAs and the 1.8 kb-mRNA in the long inverted repeats of Marek 's disease virus serotype 1 DNA are regulated by common promoter-specific enhancers. *Arch Virol* , 1999 **144** : 1893 – 1907.
- [14] Yin Z , Liu J H. *Animal Virology*. 2nd ed. Beijing : Science and Technology Publisher , 1997 : 1050 – 1051.

A Bi-directional Promoter at The Upstream of pp38 Gene from Marek 's Disease Virus

DING Jia-Bo CUI Zhi-Zhong* SUN Shu-Hong JIANG Shi-Jin

(College of Animal Science , Shandong Agriculture University , Taian 271018 , China)

Abstract : Marek 's disease virus (MDV) 's replicating origin is at the upstream of pp38 gene. On both sides of the region , there are several conserved promoter motifs such as TATA-box , CAAT-box , etc , which is regarded as a bi-directional promoter and enhancer. In order to validate the divergent promoting activity in vitro , we cloned MDV pp38 gene open reading frame (ORF) into pUC18 vector , and constructed pUC-pp38 as a basic plasmid. The 789bp PCR fragment which contains the complete sequences of MDV 's replicating origin was cloned at the upstream of pp38 gene in pUC-pp38 at two different directions. The positive clones named as pPro^fpp38 and pPro^rpp38 were transfected into chicken embryo fibroblast (CEF) cells. 24 hours after the transfection , green fluorescence can be seen on the cytoplasm of CEF in immunofluorescent assay (IFA). 48 hours and on after the transfection , the IFA positive cells will be up to 50% and the expression level can be maintained for a few days. The results show that this region has bi-directional promoting activity. 320bp was confirmed as the core sequence of this promoter with PCR technique.

Key words : Marek 's disease virus (MDV) , pp38 gene , Bi-directional promoter