

# 马立克氏病病毒 *pp38* 基因和 1.8kb 转录子之间双向启动子的特性研究

丁家波 崔治中\* 姜世金 孙爱军 孙淑红

(山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

**摘 要** 从马立克氏病病毒(MDV)基因组 DNA 复制原点区某一点,将介于 MDV *pp38* 基因和 1.8kb 转录子之间的双向启动子分割成两个单方向的启动子。以 *pp38* 为报告基因,  $\mu$ UC18 质粒为载体,构建了含不同方向完整启动子序列的 pProf*pp38* 和 pPror*pp38* 质粒,以及含分割后单方向启动子序列的 pdProf*pp38* 和 pdPror*pp38* 质粒。4 种质粒分别转染鸡胚成纤维细胞(Chicken embryo fibroblast, CEF)后,均能检测到 *pp38* 基因的表达。进一步以氯霉素乙酰转移酶(Chloramphenicol acetyltransferase, CAT)为报告基因,构建了含不同方向完整双向启动子的 pProfCAT 和 pProrCAT 质粒,以及含分割后单方向启动子序列的 pdProfCAT 和 pdProrCAT 质粒。通过转染试验,定量分析了完整启动子和分割后启动子在两个方向上的启动活性。实验结果表明,分割后的启动子在两个方向上的启动活性均比相应方向上完整启动子的活性低,其中 1.8kb 转录子方向上的活性下降了 41 倍。

**关键词** 马立克氏病病毒, *pp38* 基因, 1.8kb 转录子, 双向启动子

**中图分类号** Q75 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(2005)03-0363-05

马立克氏病病毒(Marek's disease virus, MDV)是一种细胞结合型疱疹病毒,它能在鸡体内形成以 T 淋巴细胞瘤为特征的各种内脏和组织肿瘤,是养禽业中危害最严重的致肿瘤病毒之一。随着对 MDV 基因组结构的深入研究,与 MDV 致肿瘤相关的 4 个基因:1.8kb 转录子、*pp38* 基因、*meq* 基因和 *ICP4* 基因相继被发现并在不同程度上得到研究<sup>[1-7]</sup>。

在 MDV 基因组 DNA 复制原点的两侧,各含一个 TATA-box、CAAT-box 等启动子特有的保守序列。这是一个双向的启动子,其左右两侧分别是与 MDV 致肿瘤相关的 1.8kb 转录子和 *pp38* 基因<sup>[4,6,8]</sup>。在前期的研究中,我们已经通过 *pp38* 作为报告基因,在体外验证了这一双向启动子的活性,并初步确定了该双向启动子的相对精确的核酸范围<sup>[9]</sup>。由于该双向启动子在病毒基因组 DNA 复制原点两侧有类似对称的功能元件,为了搞清该启动子是两个单向启动子的天然组合,还是本身就是一个完整的启动子。我们将该启动子从 MDV 基因组 DNA 复制原点处某一点分割为两个单方向的各含一个 TATA-box 和 CAAT-box 的启动子,并分别以 *pp38* 和 CAT 作报告基因,通过一系列的转染试验,定性和定量分析了

该启动子的结构和启动活性之间的差异。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

$\mu$ UC18、PCR Kit、T4 DNA 连接酶、X-Gal、IPTG 等均购于大连 TaKaRa 公司;pCAT-Basic 质粒购于 Promega 公司;CAT ELISA 检测试剂盒购自 Roche 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 Qia-gen 公司。原核表达的鼠抗 *pp38* 血清由本实验室冻存<sup>[9]</sup>。9~11 日龄 SPF 鸡胚购于济南斯帕法斯公司;MDV rMd5 株由美国学者 Reddy 馈赠<sup>[10]</sup>。

### 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<sup>[11]</sup>,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<sup>[6]</sup>发表的 *pp38* 基因序列,自行合成一系列引物,用于构建包括整个启动子序列和分割

基金项目 国家自然科学基金资助项目(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: ddingjiabo@sohu.com

收稿日期 2004-09-22,修回日期 2004-11-17

启动子序列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 Sangon 公司合成。启动子的结构及各质粒包含启动子的相对

位置见图 1。以 1.2 中提取的 DNA 为模板,PCR 反应条件 95℃ 5min;95℃ 30s,54℃ 30s,72℃ 30s,共 29 个循环;72℃ 10min。

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( 5' - 3' )	The sites opposite to the ORF of <i>pp38</i> <sup>[6]</sup>	Restri-enzyme sites	Fragment generated/bp
F <sub>pdPro<sup>f</sup> pp38</sub>	AAAgagctcGTTCCGACCAGAGTCCA	- 536 ~ - 519	<i>Sac</i> I	168
R <sub>pdPro<sup>f</sup> pp38</sub>	GTgtcgacTCGAGGCCACAAGAAATT	- 393 ~ - 374	<i>Sal</i> I	
F <sub>pdPro<sup>r</sup> pp38</sub>	AAgtcgacGAGCATCGCGAAAGAGAGA	- 690 ~ - 671	<i>Sal</i> I	161
R <sub>pdPro<sup>r</sup> pp38</sub>	AAAgagctcGCCGAGGTGAGCCAATC	- 552 ~ - 535	<i>Sac</i> I	
F <sub>pPro<sup>f</sup> CAT</sub>	AAggtaccGAGCATCGCGAAAGAGAGA	- 690 ~ - 671	<i>Kpn</i> I	322
R <sub>pPro<sup>f</sup> CAT</sub>	GTgagctcTCGAGGCCACAAGAAATT	- 393 ~ - 374	<i>Sac</i> I	
F <sub>pPro<sup>r</sup> CAT</sub>	AAgagctcGAGCATCGCGAAAGAGAGA	- 690 ~ - 671	<i>Sac</i> I	322
R <sub>pPro<sup>r</sup> CAT</sub>	GAggtaccTCGAGGCCACAAGAAATT	- 393 ~ - 374	<i>Kpn</i> I	
F <sub>pdPro<sup>f</sup> CAT</sub>	TTTggtaccGTTCCGACCAGAGTCCA	- 536 ~ - 519	<i>Kpn</i> I	168
R <sub>pdPro<sup>f</sup> CAT</sub>	GAAgagctcGAGGCCACAAGAAATT	- 393 ~ - 374	<i>Sac</i> I	
F <sub>pdPro<sup>r</sup> CAT</sub>	AAgagctcGAGCATCGCGAAAGAGAGA	- 690 ~ - 671	<i>Sac</i> I	161

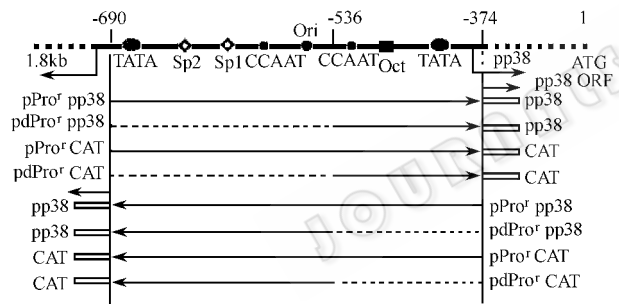


图 1 启动子结构及各质粒包含启动子的位置及方向示意图

Fig.1 The structure of the bi-directional promoter and the parts and directions of the promoter in different construct  
“ - - - ” indicates the deleted region. The numbers are the sites relative to ORF of *pp38* gene as described by Cui *et al*<sup>[6]</sup>.

1.3.1 以 *pp38* 为报告基因系列质粒的构建:包含了 MDV *pp38* 基因的完整阅读框和其终止序列的 pUC-*pp38* 质粒 和完整启动子正向克隆子 pPro<sup>f</sup> *pp38* 和反向克隆子 pPro<sup>r</sup> *pp38* 质粒由本实验室保存<sup>[9]</sup>。以表 1 中 F<sub>pdPro<sup>f</sup> pp38</sub> 和 R<sub>pdPro<sup>r</sup> pp38</sub> 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。获得含分割启动子正向克隆子 pdPro<sup>f</sup> *pp38* 和反向克隆子 pdPro<sup>r</sup> *pp38*, 获得的重组克隆再进一步测序验证。

1.3.2 以 CAT 为报告基因系列质粒的构建:以表 1

中 F<sub>pPro<sup>f</sup> CAT</sub>、R<sub>pPro<sup>r</sup> CAT</sub> 以及 F<sub>pdPro<sup>f</sup> CAT</sub>、R<sub>pdPro<sup>r</sup> CAT</sub> 为引物, RB1B 株 MDV 基因组 DNA 为模板的 PCR 产物分别用 *Kpn* I 和 *Sac* I 双酶消化,并分别与双酶切的质粒 pCAT-Basic 连接转化后,挑取白色菌落鉴定克隆。获得的阳性克隆分别含完整启动子正、反向克隆子 pPro<sup>f</sup> CAT 和 pPro<sup>r</sup> CAT,以及含分割启动子正、反向克隆子 pdPro<sup>f</sup> CAT 和 pdPro<sup>r</sup> CAT,重组克隆进一步测序验证。

1.4 重组质粒的转染

用 Mini Kit 试剂盒纯化各质粒,经定量后保存备用。转染方法参照 Gibco BRL 公司 Lipfectamine 说明书进行。简略步骤如下:对于质粒 pPro<sup>f</sup> *pp38*、pPro<sup>r</sup> *pp38*、pdPro<sup>f</sup> *pp38* 和 pdPro<sup>r</sup> *pp38* 的转染,在 35mm 瓶皿中,放置 1~2 个盖玻片,待细胞长满约 50% 且状态良好时,取 2μg 各转染质粒分别与 4μL Lipfectamine 共混合于 200μL 不含血清的 DMEM 中,孵育 30min 后,补加 1000μL DMEM 混匀后轻轻加入到用 DMEM 洗涤过的 CEF 上,12h 后加入 1.5mL 含 5% 新生牛血清的 DMEM 中。转染后 24、48h 分别取出样品,用冷丙酮固定 10min,自然干燥后,待检。

根据日本学者 Shigekane 等<sup>[12]</sup>的报道,该双向启动子以 CAT 为报告基因时,检测不到 CAT 的表达,而在有 MDV 感染时,启动子的活性很高,CAT 的表达水平也相应较高。故质粒 nCAT-Basic(对照)

pPro<sup>f</sup>CAT、pPro<sup>r</sup>CAT、pdPro<sup>f</sup>CAT 和 pdPro<sup>r</sup>CAT 的转染在分别无 MDV 感染的 CEF 及 rMd5 MDV 感染的 CEF( rMd5-CEF )上进行。在 CEF 的转染方法同 *pp38* 表达质粒 ,对在 rMd5-CEF 的转染 ,将冻存在液氮中的 rMd5 CEF 接种到 80% 长满的 CEF 中 ,需维持 3 ~ 4d ,待细胞刚出现 MDV 特有的细胞病变时开始转染。每次每个样品用 2μg 质粒与 4μL Lipfectamine 共混合于 200μL 不含血清的 DMEM 中。转染 48h 后 ,每个 35mm 的瓶皿用 500μL 裂解液( 0.25mol/L Tris-HCl ,pH 7.0 )收集菌体并于液氮中冻融 3 次 ,12000r/min ,10min 离心后 ,取上清待检。实验同时设无 MDV 感染的 CEF 对照。

### 1.5 间接免疫荧光试验

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℃ 孵育 40min ,1 × PBS 洗涤 3 遍 ,加上异硫氢酸荧光素( Fluorescein Isothiocyanate , FITC )标记的抗鼠 IgG 荧光抗体 ,37℃ 孵育 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。

### 1.6 CAT ELISA 检测

按照 CAT ELISA( Roche , Cat. No. 1363727 )说明书进行 ,简略步骤如下 :吸取 200μL 细胞裂解液 ,和梯度稀释的参照样品 ,加入到 96 孔检测板中 ,37℃ 孵育 1h ,弃去裂解液 ,用洗涤液洗 5 遍 ,加入 200μL 工作浓度的地高辛 Digoxigenin 标记的抗 CAT 的抗体 ,37℃ 孵育 1h ,洗涤 5 遍 ,加入 200μL 工作浓度的过氧化物酶( Peroxidase , POD )标记的抗 Digoxigenin 抗体 ,37℃ 孵育 1h ,洗涤 5 遍 ,加底物后显色 10 ~ 30min ,在 405nm 光波下 ,读取数值。根据参照样品值绘制标准曲线 ,并计算所测样品的 CAT 浓度。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的鉴定

用表 1 中各对引物 ,以 RB1B 株 MDV 基因组 DNA 为模板 ,经 PCR 反应后 ,得到了含完整启动子序列的 322bp 和分割后启动子序列的 168bp 的 PCR 产物。PCR 产物经酶切 ,连接和转化后 ,挑取部分菌落 ,用限制性内切酶初步筛选阳性克隆。获得的所有阳性质粒均进行序列测定 ,结果与预期吻合<sup>[6]</sup>。

### 2.2 *pp38* 在重组质粒转染 CEF 中的表达

CEF 单层在分别经重组质粒 pPro<sup>f</sup>*pp38* 和 pPro<sup>r</sup>*pp38* 转染后 24h ,用鼠抗 *pp38* 血清进行间接免疫荧光试验( Indirect Fluorescent Assay , IFA ) ,均能在 CEF

细胞上观察到绿色荧光( 图 2-A ) ,48h 后 CEF 的阳性细胞比例接近 50%。没有插入启动子的 pUC-*pp38* 质粒转染 CEF 在 IFA 试验中观察不到荧光( 图 2-B )。pdPro<sup>f</sup>*pp38* 和 pdPro<sup>r</sup>*pp38* 在转染后 24h 和 48h 后 ,也能观察到一部分细胞表面有微弱的绿色荧光 ,但荧光的强度和阳性细胞的比例均比含相应完整启动子的质粒低。在荧光显微镜下观察到的阳性细胞的比例和荧光强度结果见表 2。

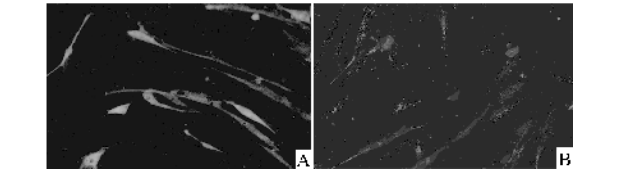


图 2 重组质粒 pPro<sup>f</sup>*pp38* 转染 CEF 48h 的 IFA 结果  
Fig.2 The fluorescence from cytoplasm of CEF cells when the recombinant plasmid pPro<sup>f</sup>*pp38* was transfected for 48 hours in IFA with anti-*pp38* serum derived from mouse  
A. The transfection of pPro<sup>f</sup>*pp38* plasmid ; B. The transfection of pUC-*pp38* plasmid ( control ) .

表 2 不同质粒转染 CEF 的 IFA 阳性细胞比例和荧光相对强度

Table 2 The fluorescence intensity and cell positive ratio in IFA with different plasmids			
Plasmid	Direction	The ratio of positive cells 48h post transfection	The fluorescent intensity in IFA
pPro <sup>f</sup> <i>pp38</i>	<i>pp38</i>	20 ~ 30%	+++
pPro <sup>r</sup> <i>pp38</i>	1.8kb transcript	30 ~ 50%	++++
pdPro <sup>f</sup> <i>pp38</i>	<i>pp38</i>	10%	++
pdPro <sup>r</sup> <i>pp38</i>	1.8kb transcript	1 ~ 2%	+
pUC - <i>pp38</i>	No promoter	0	-

“ + ” represents the fluorescence intensity in IFA for detection of *pp38* according to subjective judgement .

### 2.3 CAT 在重组质粒转染 rMd5 MDV 感染 CEF 中的表达

重组质粒 pPro<sup>f</sup>CAT、pPro<sup>r</sup>CAT、pdPro<sup>f</sup>CAT 和 pdPro<sup>r</sup>CAT 及非重组 pCAT-Basic 载体 ,在转染 CEF 和 rMd5 感染的 CEF 后 48h 收获细胞。裂解细胞的处理样品 ,经 CAT ELISA 测定的 CAT 浓度值见表 3。每种质粒转染进行了 3 ~ 5 个重复。如果按 *pp38* 基因转录方向 ,含完整启动子的质粒 pPro<sup>f</sup>CAT 转染产生的 CAT 活性是分割后启动子的 1.5 倍 ,表 3 中 pPro<sup>f</sup>CAT 对 pdPro<sup>f</sup>CAT。如果按 1.8kb 转录子方向 ,完整启动子的质粒 pPro<sup>r</sup>CAT 转染产生的 CAT 活性是分割后启动子活性的 41 倍 ,表 3 中 pPro<sup>r</sup>CAT 对 pdPro<sup>r</sup>CAT。另外 ,MDV 的感染使 *pp38* 方向和 1.8kb 转录子方向的活性均得以加强 ,1.8kb 转录子方向启动活性的增强尤其明显。

表 3 不同方向含完整启动子和分割后启动子质粒转染细胞对 CAT 表达的影响比较

Table 3 Comparison of CAT expression levels under the complete or divided promoters in opposite directions in uninfected , or rMd5-infected CEFs transfected with a set of CAT reporter plasmids					
Transfected CEFs	Complete or divided promoters in CAT reporter plasmids for transfection				
	Mock control pCAT-Basic	pPro <sup>f</sup> CAT	pdPro <sup>f</sup> CAT	pPro <sup>r</sup> CAT	pdPro <sup>r</sup> CAT
Uninfected	3 ± 0 ( 3 ~ 3 , n = 4 )	4 ± 0 ( 4 ~ 4 , n = 4 )	4 ± 0 ( 4 ~ 4 , n = 3 )	4 ± 0 ( 4 ~ 4 , n = 4 )	4 ± 0 ( 4 ~ 4 , n = 3 )
	3 ± 0 ( 3 ~ 3 , n = 4 )	52 ± 6.28 ( 41 ~ 60 , n = 5 )	34 ± 3.1 ( 29 ~ 39 , n = 4 )	781 ± 55.1 ( 704 ~ 842 , n = 4 )	19 ± 2.1 ( 16 ~ 23 , n = 5 )

The CAT expression levels were presented in concentrations ( pg/mL ) of the lysates prepared as in Materials and Methods. The statistics analysis was made between each pairs. For each sample , numerical figures represent following data : mean ± S.E. , ranges and repeated numbers transfection assay with a given reporter plasmid. CAT activity was compared for each pairs related each factors such as CEF infection status , the complete or divided promoter and the direction of the bi-directional promoter. For *pp38* direction ( forward ) , CAT activity in complete promoter is 1.5 times as that in the divided promoter (  $p < 0.05$  ). For 1.8kb direction ( reverse ) , CAT activity in complete promoter is 41 times as that in the divided promoter (  $p < 0.01$  ).

3 讨论

MD( Marek's Disease )是家禽最重要的肿瘤疾病之一 ,也是到目前为止能够被致弱的 MDV 疫苗有效预防 and 控制的肿瘤疾病 ,因而在比较医学上 ,它是研究病毒性肿瘤的发生和预防机制的理想的动物模型。但是由于 MDV 是一种严格的细胞结合型病毒 ,因此对该病毒的研究一直滞后于其它的疱疹病毒<sup>[6]</sup>。早在 90 年代初 ,Bradely 等<sup>[2]</sup>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<sup>[6]</sup>1991 年就指明了这是一个双向的启动子 ,并且标明了该双向启动子中的 Sp1、OCT 等增强子元件。

为了验证该启动子的活性 ,我们利用已构建的 pUC-*pp38* 基本质粒<sup>[9]</sup> ,将分割后的启动子克隆进 *pp38* 基因上游。根据转染后 CEF 的 IFA 结果 ,发现分割后两个单方向的启动子仍然具有一定的启动活性。但是在同样的转染条件下 ,分割后的启动子活性明显减弱。为了定量分析完整启动子和分割后启动子在活性上的差异 ,我们采用 CAT 作为报告基因。转染的试验结果显示了 *pp38* 方向上的显著差异 (  $p < 0.05$  ) ,以及 1.8kb 转录子方向上的极显著差异 (  $p < 0.01$  )。根据这一结果 ,我们认为该双向启动子序列并不是两个单向的启动子简单的机械串连 ,其完全的活性必须依赖于其结构的完整性。

1999 年 ,Shigekanel 等<sup>[12]</sup>用该启动子构建了表达 CAT 基因的质粒 ,但在 CEF 上并未检测到表达 ,当用 MDV 感染的细胞做转染时 ,体现了极强的启动子活性 ,本研究的实验结果也证实了这一点。需要提出的是 ,用 CAT ELISA 检测 CAT 活性时 ,精确读数为 10pg ,本试验在以 CAT 为报告基因 ,无 MDV 感染时测量值为 4 ,略高于不含启动子的质粒 pCAT-Basic 的测量值 3 ,差异显著 (  $p < 0.05$  )。据此可以认为含启动子的 CAT 系列表达质粒 ,能在 CEF 中进行微弱的表达 ,但由于测量值均在 10 pg 以下 ,其准确性难以保证 ,故本实验结果中将其判为阴性。

根据转染结果 ,有 MDV 感染时 ,完整启动子的活性在两个不同方向上都明显增强 (表 3 ) ,推测 MDV 感染能够引起某些未知因子激活该双向启动子。由于分割后的启动子在 1.8kb 方向上的活性降低了近 40 倍 ,而对 *pp38* 方向上活性只降低了 1.5 倍。很可能启动子在被分割后 ,未知激活因子的作用位点存在于近 *pp38* 基因端 ,由于作用位点依然存在 ,故对 *pp38* 的影响相对较小。有趣的是 ,当用同样的启动子以 *pp38* 作报告基因时 ,却能检测到 *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 ,对这一推测 ,我们正在用实验证实。

参 考 文 献

[ 1 ] Fukuchi K , Tanaka L , Schierman R , *et al.* The structure of the Marek's disease virus DNA : the presence of unique expansion in non-pathogenic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1985 , **82** : 751 - 754.

[ 2 ] 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. *J Virol* , 1986 , **58** : 657 - 659.

[ 3 ] Bradley G , Hayashi M , Lancz G , *et al.* Structure of the Marek's disease virus BamHI-H gene family : genes of putative importance for tumor induction. *J Virol* , 1989 , **63** : 2534 - 2542.

[ 4 ] Bradley G , Lancz G , Tanaka A , *et al.* Loss of Marek's disease virus tumorigenicity is associated with truncation of RNAs transcribed within BamHI - H. *J Virol* , 1989 , **63** ( 10 ) : 4129 - 4135.

[ 5 ] Kawamura M , Hayashi M , Furuchi T , *et al.* The inhibitory effects of oligonucleotides , complementary to Marek's disease virus mRNA transcribed from the BamHI-H region , on the proliferation of transformed lymphoblastoid cells MDCC-MSB1. *J Gen Virol* , 1991 , **72** ( Pt 5 ) : 1105 - 1111.

[ 6 ] 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.

[ 7 ]

Xie Q , Anderson A S , Morgan R W . *Marek's disease virus* ( MDV ) ICP4 , pp38 , and meq genes are involved in the maintenance of transformation of MDCC-MSB1 MDV-transformed lymphoblastoid cells . *J Virol* , 1996 **70**( 2 ) :1125 – 1131 .

[ 8 ]

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 .

[ 9 ]

丁家波 , 崔治中 , 孙淑红 , 等 . 马立克氏病病毒 pp38 基因上游的一个双向启动子 . *微生物学报* 2004 **44**( 2 ) :162 – 166 .

[ 10 ]

Reddy S M , Lupiani B , Gimeno I M , *et al* . Rescue of a pathogenic *Marek's disease virus* with overlapping cosmid DNAs :Use of a pp38 mutant to validate the technology for the study of gene function . *Proc Natl Acad Sci USA* , 2002 , **99** :7054 – 7059 .

[ 11 ]

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 .

[ 12 ]

Shigekane H , Kawaguchi Y , Shirakata M , *et al* . The bi-directional transcriptional promoters for the latency-relating transcripts of the pp38/pp24 mRNAs and the 1.8kb-mRNA in the long inverted repeats of *Marek's disease virus* serotype 1 DNA are regulated by common promoter-specific enhancers . *Arch Viro* , 1999 , **144** , 1893 – 1907 .

Study on the characterization of the bi-directional promoter between pp38 gene and 1.8kb mRNA transcripts of Marek's disease viruses

DING Jia-bo CUI Zhi-zhong\* JIANG Shi-jin SUN Ai-jun SUN Shu-hong  
( College of Animal Science , Shandong Agricultural University , Tai'an 271018 , China )

**Abstract :** The bi-directional promoter between pp38 gene and 1.8kb mRNA transcripts of *Marek's disease viruses* ( MDV ) was divided into two single-direction promoters from the replication of MDV genomic DNA . The pp38 gene was cloned into pUC18 vector for plasmid pUC-pp38 . Then the complete bi-directional promoter was cloned into pUC-pp38 in two directions to form plasmids pPro<sup>f</sup>pp38 and pPro<sup>r</sup>pp38 , and the divided two single directional promoters were cloned in pUC-pp38 for plasmids pdPro<sup>f</sup>pp38 and pdPro<sup>r</sup>pp38 . 24 to 48 hours after transfection to chicken embryo fibroblast ( CEF ) cells , the expression of pp38 could be detected in above 4 samples with Indirect Immuno-fluorescent Assay ( IFA ) . In order to analysis the activity of the promoter quantificationally , CAT was used as the report gene . The complete or divided promoters were cloned into pCAT-Basic vector for plasmids pPro<sup>f</sup>CAT , pPro<sup>r</sup>CAT , pdPro<sup>f</sup>CAT and pdPro<sup>r</sup>CAT . The activity of CAT was measured from the lysed CEF cells , when they were transfected for 48 hours by the above four plasmids , respectively . The results showed the activity of the divided promoters reduce on both directions , especially for the direction of 1.8kb mRNA transcript , nearly down to 1/41 .

**Key words :** *Marek's disease virus*( MDV ) , pp38 gene , 1.8kb mRNA transcript , Bi-directional promoter

Foundation item :Chinese National Natural Science Foundior( 30070544 )  
\* Corresponding author . Tel 86-538-8241560 ;Fax 86-538-8241419 ; E-mail :zzcui@sdau.edu.cn  
Received date 09-22-2004

本 刊 广 告 索 引

企 业	版 位	企 业	版 位
镇江东方生物工程设备技术有限公司	封底	上海国强生化工程装备有限公司	文前Ⅲ/Ⅳ
GE Healthcare Bio-sciences( 原 Amersham Biosciences )	封二	镇江达森发酵设备有限公司	文前Ⅴ
冷泉港生物科技股份有限公司	封三	上海保兴生物设备工程有限公司	文前Ⅵ
尼康仪器( 上海 )有限公司	文前Ⅰ	扬中市威柯特生物工程设备公司	文后Ⅰ
北京陆桥技术有限责任公司	文前Ⅱ		