

中国牛朊病毒基因的克隆和序列分析

王大伟 王 学 韩生成 田 波*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

饶 子 和

(清华大学结构生物学实验室 北京 100084)

摘 要 从中国牛外周血中分离淋巴细胞,提取基因组 DNA。用所设计引物以聚合酶链式反应扩增出不致病的朊病毒蛋白(PrP^c)基因,并克隆到 pGEM-TEasyVector。序列分析表明所克隆的牛 PrP^c 的片段大小为 795bp,包含了牛朊病毒基因的完整编码区序列。该基因无内含子,同国外报道的已知序列完全相同。

关键词 牛朊病毒基因, PrP^c, DNA 克隆, 序列分析

分类号 S852.65

英国疯牛病的流行和 1997 年诺贝尔生理学 and 医学奖授予朊病毒的发现者——B S Prusiner 使朊病毒研究受到各方面的重视。朊病毒是一种新型的蛋白感染因子,能够引起人和动物的可转移性神经退化疾病,还与老年痴呆症有关^[1,2]。近年来研究证明朊病毒蛋白(PrP^c)是由哺乳动物正常染色体上基因编码的。其蛋白质的错误折叠,使得 PrP^c 的一些 α 螺旋变构为 β 折叠,引起其三维构象的变化而导致致病的 PrP^{Sc} 的产生而发病^[3~9]。但对其三维结构转换的分子机理和构象病产生的关系等许多问题尚待研究。我国是个畜牧业大国,牛羊群体数量大,而且已有存在羊搔痒病的报道^[10]。为研究疯牛病的检测方法和朊病毒的结构生物学,本研究室将克隆我国重要动物朊病毒基因进行较系统研究,本文是第一篇报道。

1 材料和方法

1.1 材料

将二年生中国肉牛的新鲜血液放入含抗凝剂(100ml 溶液中含 0.48g 柠檬酸, 1.32g 柠檬酸三钠, 1.47g 葡萄糖)的消毒容器中,抗凝剂与血体积比为 1:6。

1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶以及限制性内切酶购自 Promega 公司,其它试剂为国产分析纯。

* 通信作者

收稿日期: 1998-07-14

1.3 引物的设计和合成

根据已报道的牛朐病毒基因序列^[11]设计引物,并分别在基因的5'端和3'端引入KpnI和EcoRI位点:

5'端引物: 5' GACTGGTACCATATGGTGAAAAGCCACATAGGC-3'

KpnI

3'端引物: 5' GGCCGAATTCGAAGATAATGAAAACAGGAAG-3'

EcoRI

引物在中国科学院微生物研究所 Beckman Oligo 1000 型 DNA 合成仪上合成。

1.4 方法

1.4.1 牛总 DNA 的提取:取新鲜的牛血液 20ml, 低速离心分离血细胞, 然后按体积比 1:2.5 加入低渗缓冲液 (10mmol / L Tris · HCl, 10mmol / L NaCl, 5mmol / L MgCl₂, pH7.5) 重悬细胞, 再离心。反复几次, 直至沉淀中无红色为止。用 TE 缓冲液 (10mmol / L Tris · HCl, 1mmol / L EDTA, pH8.0) 重悬细胞加入蛋白酶 E (终浓度为 50~70μg / ml) 和 SDS (终浓度为 0.5%), 混匀后 50℃ 保温 3~5h, 在此期间颠倒数次。冷却到 4℃, 加入等体积酚抽提两次, 再用等体积氯仿抽提两次。加入 2 倍体积无水乙醇沉淀 DNA。离心后, 用 70% 乙醇洗沉淀 3~5 次。真空抽干, 无菌水溶解。

1.4.2 聚合酶链式反应扩增牛朐病毒基因:取 1μg 的总 DNA 作为模板, 反应体系为 100μl。PCR 的反应条件为: 第一步, 94℃ 3min; 第二步, 94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1.5min 共进行 5 个循环; 第三步, 94℃ 0.5min, 60℃ 0.5min, 72℃ 1.5min 共进行 30 个循环; 第四步, 72℃ 15min。在 Perkin-Elmer 480 型 DNA 扩增仪上进行。用限制性内切酶消化和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 RCR 产物。

1.4.3 牛朐病毒基因序列分析:提取并用 Promega 公司的试剂盒纯化重组的质粒 DNA, 利用双脱氧终止法在 373A DNA 自动分析仪上进行 DNA 的荧光标记和序列分析。

1.4.4 DNA 操作:质粒提取, 限制性内切酶酶切分析, DNA 连接和 *E. coli* 转化, 聚丙烯酰胺凝胶电泳等参照文献 [12] 进行。DNA 片段的分离和回收采用 Clontech 公司的 DNA 纯化试剂盒。

2 结果和讨论

2.1 中国牛朐病毒基因的 PCR 扩增

根据已报道的牛朐病毒基因序列, 设计并合成了引物, 为了方便检测, 分别在 5'端和 3'端引入 KpnI 位点和 EcoRI 位点。我们采用两步法 PCR 扩增, 退火温度首先采用 55℃, 经 5 个循环后, 采用 60℃ 完成后面的扩增反应。结果在 800bp 左右扩增出一条很清楚的条带 (图 1)。已报道的序列中^[11], 含有 Pst I 位点、Nco I 位点和 Kpn I 位点, 经对 PCR 产物进行酶切消化, 初步鉴定为牛朐病毒基因 (图 1)。

2.2 牛朐病毒基因的克隆及酶切分析

将 PCR 扩增产物经酶切鉴定后, 同 Promega 公司的 pGEM-T Easy Vector 连接, 并转

化 *E. coli* DH5 α , 经兰白斑筛选, 挑选白斑并提取质粒。采用限制性内切酶消化鉴定, 结果见图 2, 表明已获得牛朊病毒基因克隆。

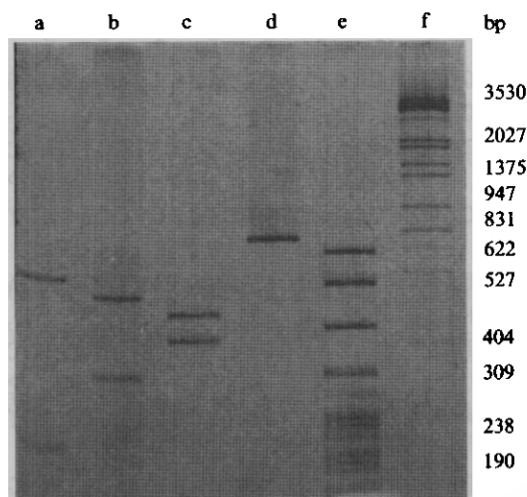


图 1 牛朊病毒基因的 PCR 产物及酶切鉴定

Fig.1 Restriction analysis of PCR products of Chinese bovine prion protein gene

a. NcoI; b. KpnI; c. PstI; d. PCR products; e. Marker: pBR322/ MspI; f. Marker: λ DNA / EcoRI + Hind III.

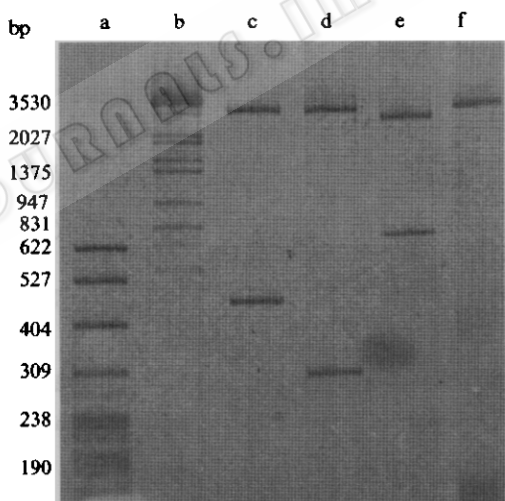


图 2 含牛朊病毒基因的重组质粒的酶切分析

Fig.2 Restriction analysis of recombinant plasmid which contained Chinese bovine prion protein gene

a. Marker: pBR322/ MspI; b. Marker: λ DNA/EcoRI + HindIII; c. PstI; d. KpnI; e. EcoRI; f. BamHI.

2.3 牛朊病毒基因的序列分析

将含有牛朊病毒基因的克隆, 活化并提取质粒, 在 373A DNA 自动分析仪上进行序列分析, 结果见图 3。

序列分析结果表明获得了含中国牛朊病毒基因的克隆。此克隆包含了朊病毒的完整

```

1  ATGGTGAAAAGCCACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGTGGCCAT
   M V K S H I G S W I L V L F V A M
   GTGGAGTGACGTGGGCCTCTGCAAGAAGCGACCAAAACCTGGAGGAGGAT
   W S D V G L C K K R P K P G G G W
101  GGAACACTGGGGGGAGCCGATACCCAGGACAGGGCAGTCCTGGAGGCCAAC
    N T G G S R Y P G Q G S P G G N
    CGTTATCCACCTCAGGGAGGGGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATGGAGGTGG
    R Y P P Q G G G G W G Q P H G G G
201  CTGGGGGCCAGCCTCATGGAGGTGGCTGGGGCCAGCCTCATGGAGGTGGCT
    W G Q P H G G G W G Q P H G G G W
    GGGGTCAGCCCCATGGTGGTGGCTGGGGACAGCCACATGGTGGTGGAGGC
    G Q P H G G G W G Q P H G G G G
301  TGGGGTCAAGGTGGTACCCACGGTCAATGGAACAAACCCAGTAAGCCAAA
    W G Q G G T H G Q W N K P S K P K
    AACCAACATGAAGCATGTGGCAGGAGCTGCTGCAGCTGGAGCAGTGGTAG
    T N M K H V A G A A A A G A V V G
401  GGGGCCTTGGTGGCTACATGCTGGGAAGTGCCATGAGCAGGCCTCTTATA
    G L G G Y M L G S A M S R P L I
    CATTTTGGCAGTGACTATGAGGACCGTTACTATCGTGAACATGCACCG
    B F G S D Y E D R Y Y R E N M H R
501  TTACCCCAACCAAGTGTACTACAGGCCAGTGGATCAGTATAGTAACCAGA
    Y P N Q V Y Y R P V D Q Y S N Q N
    ACAACTTTGTGCATGACTGTGTCAACATCACAGTCAAGGAACACACAGTC
    N F V H D C V N I T V K E H T V
601  ACCACCACCACCAAGGGGGAGAACTTCACCGAAACTGACATCAAGATGAT
    T T T T K G E N F T E T D I K M M
    GGAGCGAGTGGTGGAGCAAATGTGCATTACCCAGTACCAGAGAGAATCCC
    E R V V E Q M C I T Q Y Q R E S Q
701  AGGCTTATTACCAACGAGGGGGCAAGTGTGATCCTCTTCTCTTCCCCTCCT
    A Y Y Q R G A S V I L F S S P P
    GTGATCCTCCTCATCTCTTTCCTCATTTTTCTCATAGTAGGATAG
    V I L L I S F L I F L I V G *

```

图3 中国牛朊病毒基因全长核苷酸序列和推导的氨基酸序列

Fig.3 Chinese bovine prion protein DNA and predicted amino acid sequence

编码区序列,全长 795bp。此基因中不含内含子,与已报道的牛朊病毒序列完全相同^[11]。

致谢 本室邱并生和刘玉乐研究员对本研究提供了有益的建议,庄蔚华小姐整理和打印本文。特此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 田 波.病毒学报,1985,1:190~196.
- [2] 王 学,田 波.中国病毒学,1997,12(4):302~308.
- [3] Prusiner S B. *Science*, 1982,216:136~144.
- [4] Prusiner S B. *Science*, 1997, 278:245~251.

- [5] Stahl N, Baldwin M A, Teplow D B *et al.* *Biochemistry* 1993, **32**:1991~2002.
- [6] Pan K M, Baldwin M, Nguyen J *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**:10962~10966.
- [7] Aguzzi A, Weissmann C. *Nature*, 1997, **389**:795~798.
- [8] Rick R, Hornemann S, Wilder G *et al.* *FEBS Lett*, 1997, **413**:282~288.
- [9] Donne D G, Viles J H, Groth D *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**:13452~13457.
- [10] 冯光泽. 畜牧兽医学报, 1987, **18**(2):114~119.
- [11] Goldmann W, Hunter N, Martin T *et al.* *J Gen Virol*, 1991, **72**:201~204.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

CLONING AND SEQUENCING OF THE CHINESE BOVINE PRION PROTEIN (PrP^C) GENE

Wang Dawei Wang Xue Han Shengcheng Tian Bo*

(Institute of Microbiology Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Rao Zihe

(Laboratory of Structural Biology, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract The total DNA was isolated from lymphocyte of peripheral blood of Chinese cattle. The PrP^C gene was amplified by polymerase chain reaction, using two primers. It was then cloned into pGEM-T Easy Vector. The result of DNA sequencing was indicated that the 795bp amplified fragment contains the entire PrP^C coding sequence, which has no intron and is same as the published gene sequence.

Key words Bovine prion protein gene, PrP^C, DNA cloning, Sequence analysis

* Correspondence author