

马立克氏病病毒 Rispens 株 B 抗原基因的克隆及其重组鸡痘病毒的构建*

邢 力 彭大新 朱爱华 刘秀梵** 张如宽

(扬州大学农学院动物医学系 扬州 225009)

关键词 马立克氏病病毒, 糖蛋白 B 抗原, 重组鸡痘病毒

分类号 S852.65 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)02-0164-67

马立克氏病病毒(Marek's Disease Virus, MDV)是马立克氏病(MD)的病原,是第一个能用实验证明具有致肿瘤作用的疱疹病毒,也是研究病毒性肿瘤特别是疱疹病毒肿瘤的理想实验模型。MD 还是第一个广泛使用疫苗预防的肿瘤性病毒病。应用免疫扩散沉淀试验检测 MDV 感染的细胞,证实该病毒有 A、B、C 三种主要抗原。其中 B 抗原(gB)是 3 种分子量分别为 100kD、60kD 和 49kD 的糖蛋白的复合物,存在于感染细胞内和细胞膜上以及病毒颗粒的包膜上,并且证明是一种既可引起宿主体液免疫也可引起细胞免疫的非常重要的中和性抗原^[1]。

Rispens 毒株是一株天然弱毒 MDV,属于 MDV 血清学 I 型,被广泛用做疫苗来预防 MD^[2,3],已有 20 多年的商业历史,在 MDV 的单价疫苗中免疫保护效力很高。本文报道了这株病毒 gB 基因的克隆及其构建成重组鸡痘病毒。

1 材料和方法

1.1 病毒和细胞

马立克氏病病毒(MDV)Rispens 株由本室保存;鸡痘病毒(FPV)282E4 株为中国鸡痘病毒鸭鹌化弱毒,购自中国兽药监察所,由本室保存。

9~10 日龄 SPF 鸡胚由本院实验动物房提供。鸡胚成纤维细胞(CEF)按常规方法制作,生长于含 4% 犊牛血清的 F10-199 培养基中。

1.2 质粒和受体菌

FPV 插入载体 pFG1175-1 含有 FPV 复制非必需的基因组 DNA 片段,以此与 FPV 基因组中的特定复制非必需区同源重组,将外源基因带入 FPV 基因组中。外源基因处于痘苗病毒主要早期启动子控制下。该载体中还含有大肠杆菌的 *LacZ* 基因,其编码蛋白分解 X-gal 产生蓝色,借此可筛选、纯化重组 FPV(rFPV)。此载体由王志亮等^[4]构建。

克隆载体 pUC19 和大肠杆菌受体菌 TG1 均购自 Boehringer Mannheim 公司,本室保存。

1.3 培养基

DMEM, Tryptose Phosphate Broth (TPB), F10-199 购自 Sigma 公司,胰蛋白胨酵母抽提物为 Oxoid 公司产品。

1.4 酶,其它化学试剂及试剂盒

核酸限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, T4 DNA 聚合酶, 蛋白酶 K, 溶菌酶, PCR 核心试剂盒,

* 国家 863 计划和江苏省自然科学基金资助项目(No. 960332025)

** 联系作者;参加研究工作还有吴艳涛。

收稿日期:1997-06-27, 修回日期:1998-04-03

Expand™ 高保真 PCR 系统, dig-DNA 标记与检测试剂盒, DOSPER 脂质体转染试剂, 氨基青霉素 (Ampicillin), X-gal, IPTG, HEPES 均购于 Boehringer Mannheim 公司或华美生物工程公司。

MDV-*gB* 单抗由本院崔治中教授惠赠, 本室保存。其它试剂均为国产分析纯。

1.5 DNA 操作

病毒的培养与基因组 DNA 的提取参照文献[5]进行。质粒的制备和纯化以及 DNA 的酶切、连接、大肠杆菌的转化均按文献[6]进行。核酸杂交按 Dig-DNA 标记与检测试剂盒说明书进行。

1.6 PCR 扩增

参照 Boehringer Mannheim 公司 PCR 试剂盒说明书建议的方法。

1.7 转染和重组鸡痘病毒(rFPV)的纯化

1.7.1 转染: 在 50mL 方瓶中培养原代 CEF, 形成单层后接种 FPV 0.5 mL, 3~4 h 后做转染; 在一 Eppendorf 管中, 用 HBS (20 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, pH7.4) 溶解 5 μ g 新鲜沉淀的质粒 pFG-BR1175-1 至 50 μ L 体积; 另一管中将 15 μ L DOSPER 脂质体溶于 35 μ L HBS 中; 合并两管内容物, 轻轻吹吸混匀后室温静置 15~30 min; 用无血清 DMEM 培养液洗已接种 FPV 的细胞 2 遍, 弃去残液; 直立方瓶, 每瓶加无血清 DMEM 培养基 2.5 mL; 质粒-脂质体混合物吹吸一次悬浮, 全部滴入培养基中, 平放方瓶, 轻轻转动混匀, 然后于 6% CO₂ 培养箱中 37°C 培养; 6 h 后, 每瓶加入预热至 37°C 含 10% FCS 的培养基 2.5 mL, 37°C 培养过夜, 再更换成含 1% FCS 的培养液继续培养。

1.7.2 rFPV 的纯化: 待转染细胞出现 80% 病变后, 用巴氏吸管吹下细胞, 反复冻融 3 次, 收获病毒。于直径为 50nm 细胞培养皿中做成次代 CEF 细胞, 形成单层后, 接种上述的收获病毒, 待出现 80% 以上细胞病变后铺 0.8% 的营养琼脂 (含 200 μ g/ml X-gal), 于 6% CO₂, 37°C 条件下继续培养。48h 后, 用巴氏吸管吸出蓝色病变细胞, 冻融 3 次后, 用以接种新制备的次代 CEF。重复上述步骤, 直到纯化出重组病毒。

1.8 间接免疫荧光试验 (IFA)

以 rFPV 感染 CEF 细胞, 72 h 后制片, 荧光显微镜下观察。

2 结果和讨论

2.1 MDV *Rispens* 株 *gB* 基因 PCR 扩增结果

2.1.1 扩增引物的设计与合成: 引物根据文献[7,8]设计, 序列如下:

P₁ - -CCA CTG CAG ATG CAC TAT TTT AGG CGG AAT TGC ATA TTT (39 mer)

P₂ - -CGC CGA ATT CAG AAG GAA AGC ATC GAG CAA TCA C (34 mer), 由中国科学院上海细胞生物研究所合成。

2.1.2 PCR 产物大小: PCR 反应结束后, 取 5 μ L 反应产物在 0.7% 的琼脂糖凝胶中电泳, 结果扩增出了一条约 2.9kb 的单一一条带 (图 1)。

2.1.3 PCR 产物鉴定及克隆: PCR 产物特异性鉴定采用了点杂交的方法。PCR 产物经过琼脂糖凝胶电泳纯化后, 点于硝酸纤维素膜上, 同时也将 CEF DNA 和用作探针的 DNA 点膜, 分别作为阴性和阳性对照。结果 (图 2), MDV *gB* 基因探针只与 PCR 产物及阳性对照反应, 表明它们具有同源性; 选用了几种限制性内切酶分析此 PCR 产物 (图 3), 进一步证实所扩增出的约 2.9kb 条带为 MDV 的 *gB* 基因。随后, 以 Pst I/EcoR I 双酶切消化, 克隆进 pUC19 中 (图 4), 构建 pMGB。

2.2 MDV *Rispens* 株 *gB* 基因在 FPV 中的表达

2.2.1 *gB* 基因 FPV 插入载体的构建: pMGB 与鸡痘病毒插入载体 pFC1175-1 分别用 EcoRI 和 HindIII 酶切, 然后于 12°C 以 T4 DNA 聚合酶修平酶切产生的粘性末端, 再用 PstI 酶切。建立连接反应体系, 将 *gB* 基因定向克隆至 pFG1175-1 中。菌落杂交筛选理想重组子, 酶切分析 (图 5) 后命名为 pFGBR1175-1。

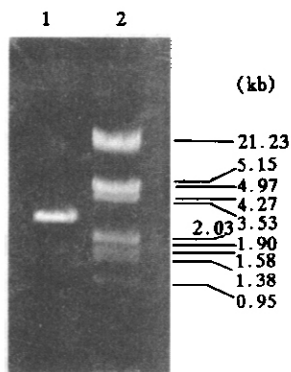


图1 PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

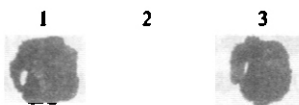
1. MDV Rispens 株; 2. λ DNA/EcoRI + HindIII.

图2 点杂交分析 PCR 产物的特异性

1. PCR 扩增产物; 2. CEF DNA;

3. 用作探针的 DNAs.

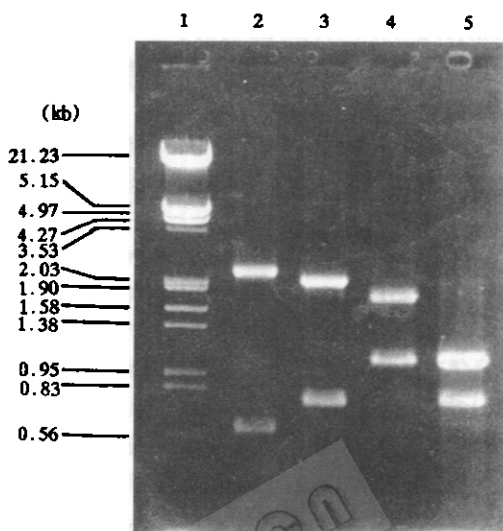


图3 PCR 产物的酶切分析

1. λ DNA/EcoRI + HindIII; 2. PCR 产物/HindII;

3. PCR 产物/EcoRV; 4. PCR 产物/BamHI;

5. PCR 产物/BamHI + EcoRV.

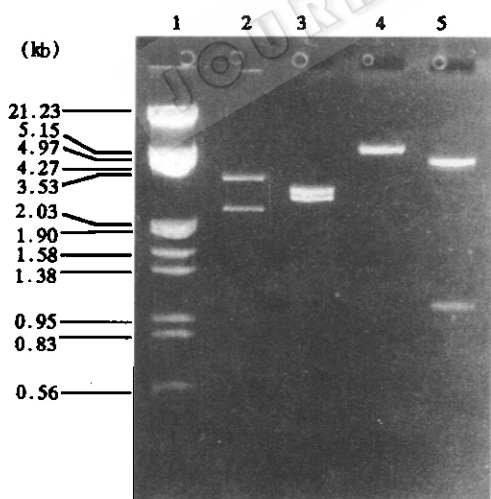


图4 pMGB 的酶切分析

1. λ DNA /EcoRI + HindIII; 2. pMGB /HindIII; 3.

pMGB /EcoRI + PstI; 4. pMGB /PstI;

5. pMGB /BamHI + EcoRV.

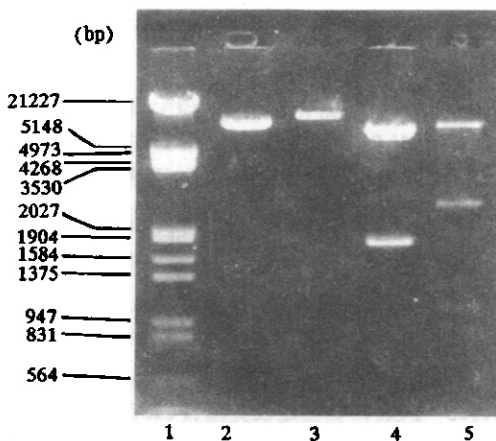


图5 pFGBR1175-1 的酶切分析

1. λ DNA/EcoRI + HindIII; 2. pFG1175-/PstI;3. pFGBR1175-1/PstI; 4. pFG1175-1/EcoRV
+ BamHI.

2.2.2 MDV-gB 基因在 rFPV 基因组中的整合:斑点杂交结果(图 6), gB 基因探针只与 pFGBR1175-1、rFPV 基因组 DNA 呈现阳性反应,表明所纯化出的 rFPV 中已插入 MDV-gB 基因。

2.2.3 MDV-gB 基因在 rFPV 中的表达:MDV-Rispens 株及 rFPV 感染的 CEF 细胞中出现的细胞病变在荧光显微镜下呈现出黄绿色荧光,CEF 及 FPV 感染的 CEF 中未见荧光。表明插入 FPV 基因组中的 MDV-gB 基因得到了表达。

2.3 讨论

MDV 是一种严格细胞结合性病毒,在细胞培养中极少游离出来,所以提纯病毒基因组 DNA 构建基因组文库来克隆其功能基因很困难,为此采用了 PCR 技术。文中所用 FPV 属于疫苗毒株,应用起来安全,而且具有与 MDV 相同的宿主,这为进一步研究 gB 在 MDV Rispens 株免疫反应中的机理提供了方便,本文为此打下了基础。



图 6 点杂交筛选 rFPV
1. CEF DNA; 2. 3. 6. rFPV DNA;
4. FPV DNA; 5. pFGBR1175- DNA

MDV 是一种严格细胞结合性病毒,在细胞培养中极少游离出来,所以提纯病毒基因组 DNA 构建基因组文库来克隆其功能基因很困难,为此采用了 PCR 技术。文中所用 FPV 属于疫苗毒株,应用起来安全,而且具有与 MDV 相同的宿主,这为进一步研究 gB 在 MDV Rispens 株免疫反应中的机理提供了方便,本文为此打下了基础。

参 考 文 献

[1] Isfort R J, Sithole I, Kung H J *et al.* *J Virol*, 1986, 59(1):411~419.
[2] Rispens B H, Vanvloten H J, Mastenbroek N *et al.* *Avian Disease*, 1972, 16(1):108~125.
[3] Mass H J L, Borm F, Vandekieft G. *World's Poult Sci J*, 1982, 38(1):163~175.
[4] 王志亮,彭大新,张如宽等. *病毒学报*, 1996, 12(1):48~54.
[5] Morgan R W, Cantello J L, Medermott C H. *Avian Disease*, 1990, 34(1):345~351.
[6] 萨姆布鲁克 J 等主编,金冬雁等译. *分子克隆实验指南*. 第二版. 北京:科学出版社, 1992. 16~17.
[7] Ross L J N, Sanderson M, Scott S O *et al.* *J Gen Virol*, 1989, 70(3):1789~1804.

CLONING OF GLYCOPROTEIN B GENE FROM STRAIN RISPENS OF MAREK'S DISEASE VIRUS AND CONSTRUCTION OF RECOMBINANT FOWLPOX VIRUS

Xing Li Peng Daxin Zhu Aihua Liu Xiufan Zhang Rukuan

(Department of Veterinary Medicine, Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract Purified DNAs from Chicken Embryo Fibroblast (CEF) cultures infected with MDV strain Rispens were used as templates. Specific fragment with the size of about 2.9kb was successfully amplified through Polymerase Chain Reaction(PCR) and identified to be gB gene of MDV by dot blot hybridization with a digoxigenin-labelled MDV gB specific oligonucleotide probe.

The gB gene from strain Rispens was cloned into pUC19 and FPV insertion vector pFG1175-1 to construct plasmid pMGB and pFGBR1175-1 respectively. DOSPER liposome-mediated transfection with insertion vector DNA pFGBR1175-1 was performed on CEF monolayers infected with FPV 3-4 h earlier. Recombinant FPV was clone purified. Immunofluorescence Assay (IFA) showed that MDV gB gene had been expressed in FPV.

Key words Marek's disease virus, Glycoprotein B antigen, Recombinant fowlpox Virus.

* Project of Chinese National Programs for High Technology Research and development(No. 960332025)