

马立克氏病病毒A抗原基因在原核系统中的表达

杨宝华** 闵永洁* 王启松* 陈溥言 蔡宝祥

(南京农业大学兽医系, 南京 210014)

(复旦大学遗传所, 上海 200433) *

鸡马立克氏病是由病毒(Marek's Disease Virus, MDV)引起的鸡的一种传染性肿瘤病。

目前主要靠细胞苗进行预防, 这种方法不仅麻烦而且也不经济。随着对MDV的深入认识和近几年来生物技术的兴起, 国外已在MDV基因工程苗方面取得了很大成绩。我国还刚刚起步。

免疫扩散试验可将MDV抗原分为A、B、C三类。A抗原基因大小为1,440bp编码480个氨基酸, B抗原基因^[1], 磷蛋白38kDa基因也已定位测序, 有文献报道唯有磷蛋白38kDa, 基因部分片段表达成功。为了发展我国的MDV工程苗, 我们在1988年根据当时的文献资料(A基因序列), 首先开展了MDV A抗原基因的表达研究, 该基因由PCR法克隆获得。

材料与 方法

(一)材料

pKK223-3质粒、*E. coli* JM105由复旦大学遗传所基因合成室提供; pBSA1.4k克隆株是PCR法克隆的MDV A抗原基因克隆株, 本单位自制^[1]; 限制酶EcoR I、Pst I系Boeinger Mannheim Co.产品; SPA-HRP购自上海生物制品研究所; 兔抗MDV A抗原血清本单位自制; CNBr购自上海化学试剂供应站进口分装; 抗火鸡疱疹病毒(HVT)A抗原杂交瘤腹水由南京农业大学钱建飞博士提供; 异丙基硫代半乳糖苷IPTG; 是Sigma公司产品。

(二)MDV A抗原基因表达质粒的构建

1. 质粒DNA的少量提取: 参考Ish-Horowitz方法^[4]。

2. DNA限制酶消化反应以及DNA片段与载体的连接反应、琼脂糖凝胶电泳分析: 均参考文献[5]。

3. 细菌转化: 采用氯化钙法^[6]。

4. 原位杂交: 参考文献[5], 探针为PCR P I和PCR P II^[1]。

(三)表达产物的鉴定与分析

1. 少量发酵后用Dot-ELISA筛选^[1]; 30μl过夜菌接种至3ml LB中37℃摇瓶培养2h后用终浓度1mmol/L IPTG诱导, 在诱导1、2、3、4h后分别取菌液0.5ml, 离心收集菌体, 加100μl含1% SDS PBS, 100℃5min, 取2μl点样进行Dot-ELISA鉴定。

2. SDS-PAGE和Western-blotting^[7-10]; 电泳结束后用考马斯亮蓝染色, 或将凝胶取出进行转印, 然后进行Dot-ELISA反应。

(四)表达产物的纯化

1. HVT A抗原单抗亲和柱的制备: 参考文献[11]经ELISA试验证明, HVT A抗原单抗与MDV GA株培养上清、大肠杆菌表达产物反应, 因此我们用HVT A抗原单抗制备了亲和层析柱。

2. 大量发酵及全部纯化步骤: 将10ml振荡培养过夜的工程菌接于1L LB中, 37℃振荡培养1.5h, 以终浓度0.2mmol/L IPTG诱导3h。离心收菌, 菌体用PBS洗一遍后悬浮于100ml PBS中, 超声波破菌后以10k rpm离心10min, 上清加1/40体积20%硫酸铵毒素沉淀, 以10k rpm离心10min, 上清再以33%饱和硫酸铵沉淀, 冰浴2h后, 10k rpm离心10min, 沉淀悬于10ml PBS中再对PBS透析过夜, 测总蛋白。上HVT A抗原单抗亲和层析柱, 洗脱并收集样品, 测OD_{280nm}值, 收集蛋白峰。取样进行

本文于1991年8月24日收到。

**现在工作地址: 深圳动植物检疫局

SDS-PAGE, 蛋白转印后ELISA检测。

结 果

(一)MDV A抗原基因表达载体的构建

1. pBSA1.4k质粒经EcoR I -Pst I 双酶切后得到MDV A1.4kb基因,与相同酶切的pKK 223-3连接,转化*E.coli* JM105, 在含氨苄青霉素培养基中筛选。

2. 原位杂交筛选: 经Amp LB筛选的菌落任挑100个,用PCR P I和PCR P II末端标记 γ -³²P-ATP为探针,杂交自显影获5个杂交阳性菌落,编号为pKA1、pKA2、pKA3、pKA4、pKA5。

3. 酶切鉴定: 将杂交阳性pKA1—pKA5菌株分别振荡培养过夜,用碱变性法提取质粒DNA,进行EcoR I -Pst I 酶切电泳鉴定,结果表明pKA1、pKA2和pKA3切出了1.4kb目的基因(图版 I -A)。

(二)表达产物的检测

1. Dot-ELISA试验: 振荡培养过夜的工程菌经IPTG诱导无表达产物,对数时期诱导1—4 h皆呈阳性反应,3株工程菌的表达结果一致。

2. 表达产物分子量的测定: 将pKA3振荡培养至对数期经IPTG诱导,分别于1, 2, 3, 4

h取样进行SDS-PAGE电泳,接着蛋白转印后ELISA显色,表达产物条带明显(图版 I -B),根据LMW Marker电泳带位置计算R_f值,绘制标准曲线,由标准曲线查得MDV A基因表达产物分子量为56kDa。

(三)表达产物的纯化

1L发酵液的粗提物透析后上亲和柱,收集洗脱峰,用紫外分光光度法^[12]测得蛋白总量为1.68mg。

讨 论 与 结 论

将pKK223-3用作表达载体构建的文献报道不乏其例^[13,14], Jaffex 等人表达人的 α -Tubulin,受体菌为D1210,诱导后2h产率达26%。我们将MDV A抗原基因(1.362bp与pKK223-3构建了表达载体,从发酵试验所获得的资料看,表达产率较低,可能与该载体的基因容量、MDV A抗原基因密码子属真核细胞偏爱而影响到转录和翻译合成,可能还与所采用的受体菌不同而受影响。另一个重要原因就是表达产物在积累过程中有部分降解,在IPTG诱导1, 2h经Western-blotting ELISA检测,在56kDa条带下方有模糊不清的ELISA显色反应。诱导3h产物趋于稳定。因此我们认为该产物在菌体内只能达到一种量的平衡。

参 考 文 献

- [1] 杨宝华等: 南京农业大学博士论文, p.35, 1991.
- [2] Ross, J.N. et al., *J. Gen. Virology*, 70: 1798—1804, 1989.
- [3] Cui, Z.Z. et al., *Virus Genes*, 3: 4, 309—322, 1990.
- [4] Ish-florowicz D. et al., *Nucleic Acids Res.*, 9: 2989, 1981.
- [5] Maniatis, T. et al., *Molecular cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
- [6] Mandel, M. et al., *J. Mol. Biol.*, 53: 154, 1970.
- [7] Burnette, W. H., *Analytic Biochem.*, 112: 195—203, 1981.
- [8] Talbet, P.V. et al., *J. Immunol. Meth.*, 73: 177—188, 1984.
- [9] Towbin, H. et al., *Proc Natl. Acad. Sci.*, 76: 4350—4354, 1979.
- [10] Salinovich, O. et al., *Analytic Biochem.*, 156: 341—347, 1989.
- [11] 武建国等: 实用临床免疫检验, 江苏科技出版社, p.41, 1989.
- [12] 北京大学生物系主编 生物化学实验指导, 人民教育出版社 p.85.
- [13] Frost, J.N. et al., *Biochemistry*, 23: 4470—4475, 1984.
- [14] Jaffex, B.M. et al., *Biochemistry*, 27: 1869—1880, 1988.

Expression of Marek's Disease Herpesvirus A Antigen Gene in Prokaryotic System

Yang Baohua Ming Yongji* Wang Qisong* Chen Puyan Cai Baoxiang

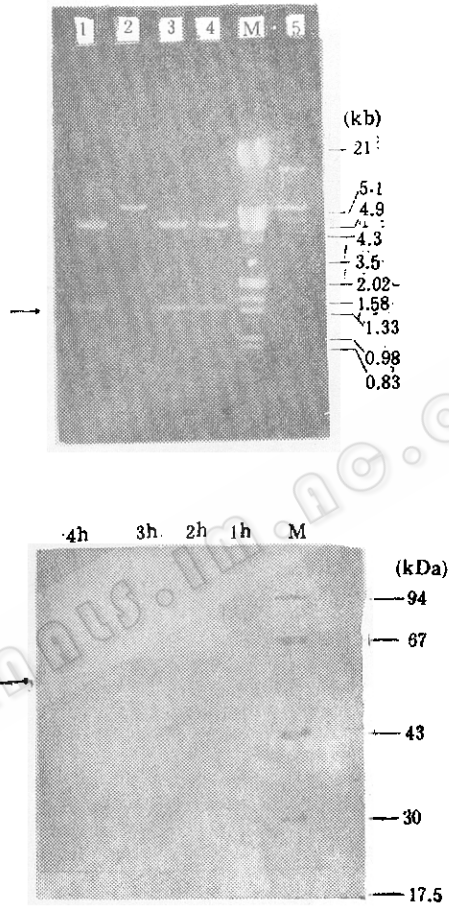
(Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014)

*Jiangnan University, Shanghai 200433) *

Sepereted 1.4kb MDV A antigen gene was ligased to pKK223-3 plasmid and transformed to *E.coli* JM105 strain. As the result, three expression clones have been obtained by situ-hybridization and restriction enzyme digestion. Growing cells to midlog phase at 37°C adding IPTG and continuing growth, the MDV A antigen was expressed and produced by the three strains through Dot-ELISA screening and detecting. Furthermore, the molecular weight of expressed products is 56kDa, with SDS-PAGE and Western-blotting experiments, responding to previous reports.

Key words MDV A antigen gene, expression in prokaryotic system

Yang Baohua et al., Expression of Marek's disease herpesvirus A antigen gene in *prokaryotic* system



A. 杂交阳性克隆质粒DNA酶切分析
B. pKA₃菌株发酵不同时期产物检测