

# 细菌-酵母穿梭表达质粒 pGBKT7-LMP1 的构建与鉴定

刘 鹏<sup>1</sup>, 张清秀<sup>1</sup>, 朱振宇<sup>1</sup>, 庾 蕾<sup>2</sup>, 马润泉<sup>1</sup>

(中山医科大学 1. 生化教研室, 2. 法医系, 广东 广州 510089)

**摘要:** 【目的】构建能在酵母中表达 EBV 潜伏膜蛋白 1(LMP1)的穿梭表达质粒 pGBKT7-LMP1。【方法】RT-PCR 方法扩增 EB 病毒 LMP1 全外显子片段, 利用 DNA 重组技术将其定向插入细菌-酵母穿梭质粒 pGBKT7 的 T7 启动子下游。【结果】限制性内切酶酶切和 DNA 测序分析证实 RT-PCR 获得的 LMP1 cDNA 片段与 GenBank 中的数据完全吻合; LMP1 准确克隆入 pGBKT7 的多克隆位点, 未改变读码框架。【结论】成功构建了穿梭质粒 pGBKT7-LMP1。

**关键词:** 疱疹病毒 4 型, 人; 潜伏膜蛋白 1; 聚合酶链反应/方法; 质粒 pGBKT7

中图分类号: Q785; R373.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)05-0348-04

## Construction and Identification of Bacteria-Yeast Shuttle Plasmid pGBKT7-LMP1

LIU Peng<sup>1</sup>, ZHANG Qing-xiu<sup>1</sup>, ZHU Zhen-yu<sup>1</sup>, YU Lei<sup>2</sup>, MA Jian-quan<sup>1</sup>

(1. Department of Biochemistry, 2. Department of medical jurisprudence, Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou 510089, China)

**Abstract:** 【Objective】To construct bacteria-yeast shuttle plasmid pGBKT7-LMP1. 【Methods】The fragment including all the exons of LMP1 was amplified by RT-PCR and was recombined to the downstream of T7 promoter in the shuttle vector pGBKT7. 【Results】It has been proved that the sequence of the RT-PCR product was totally consistent with the data of GenBank by DNA sequencing analysis. The LMP1 cDNA fragment was cloned in the vector pGBKT7 in the right direction, and the open reading fragment of LMP1 was maintained. 【Conclusion】The pGBKT7-LMP1, a bacteria-yeast shuttle plasmid is successfully constructed.

**Key words:** herpesvirus-4, human; latent membrane protein 1; polymerase chain reaction/methods; plasmid pGBKT7

EB 病毒与多种疾病密切相关, 如传染性单核细胞增多症, 非洲儿童恶性淋巴瘤, 鼻咽癌等, 已有的研究结果显示 EB 病毒可编码至少 60 种产物, 其中以潜伏膜蛋白 1 (latent membrane protein 1, LMP1) 最受人关注。LMP1 在 B 淋巴细胞体外转化和永生化的过程中起重要作用; 转化了 LMP1 的细胞不仅在形态上发生了改变, 而且具有使裸鼠致癌的能力<sup>[1]</sup>; LMP1 还影响着肿瘤细胞的生长、分化、表型及退化<sup>[2, 3]</sup>。LMP1 介导的各种生物学功能是由复杂而精细的信号传导系统调控的, 但 LMP1 是通过与哪些蛋白发生直接相互作用从而

对细胞产生上述影响的精确分子机制尚不清楚。本研究采用 RT-PCR 方法获得 LMP1 全外显子片段, 并将其定向克隆入细菌-酵母穿梭质粒 pGBKT7, 为进一步用酵母双杂交系统筛选与 LMP1 直接作用的蛋白质提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株、质粒及细胞

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为本室保存, 穿梭质粒 pGBKT7 购于 CLONTECH 公司; EBV 感染绒猴 B 淋

收稿日期: 2000-12-12

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(994004)

作者简介: 刘 鹏(1973-), 女, 吉林扶松人, 在职博士生, 讲师。

巴细胞株 B95-8 为中山医科大学肿瘤研究所惠赠。

## 1.2 酶和试剂

TRIzol 试剂, 一步法 RT-PCR 试剂盒, 购自 Gibco 公司。无 RNase 的 DNase I, 购自 Promega 公司。限制性内切酶 (*EcoRI*, *BamHI*, *XhoI*, *HindIII*, *StuI*), T4 DNA 连接酶, DNA Markers, 低熔点 Agarose 购自上海生工生物工程公司。

## 1.3 RT-PCR 引物

由上海生工生物工程公司合成。

RT-PCR 上游引物: 5'-AGGAATTCATGGAA-CACGACCTTGAGA-3'; 下游引物: 5'-AGGGATC-CGTCATAGTAGCTTAGCTGA-3'。上游和下游引物分别对应于 EBV 基因组的 169474 ~ 169456 bp 与 168163 ~ 168181 bp 处, 并且分别引入了限制性内切酶 *EcoRI* 与 *BamHI* 的识别位点(黑体字处)以便于克隆。测序引物: P1, 5'-GTCTGCC-CTCGTTGGAGTTA-3'; P2, 5'-TAATACGACT-CACTATAGGGC-3' (T7 测序引物, 由 CLONTECH 的酵母双杂交试剂盒提供); P3, 5'-ACT-TATTGGAGATGCTCTGG-3'; P4, 5'-TTTTCGT-TTTAAAACCTAAGAGTC-3' (3' DNA-BD 测序引物, 由 CLONTECH 的酵母双杂交试剂盒提供)。

## 1.4 RT-PCR 法扩增 LMP1 cDNA

以下所用的常规方法参照文献[4]和[5], 部分稍加改动。

1.4.1 总 RNA 抽提 用 TRIzol 试剂抽提 B95-8 细胞的总 RNA, DNase I 处理去除 DNA 污染。琼脂糖凝胶电泳观察有无降解, 测定其在  $\lambda_{260}$  与  $\lambda_{280}$  下的吸光度 ( $A_{260}$ ), 计算吸光度比值和总 RNA 的含量。

1.4.2 逆转录反应 使用 SUPERSRIPT™ One-Step™ RT-PCR System 进行逆转录 PCR。反应体系为: 2  $\mu$ L (约为 2  $\mu$ g) 总 RNA 模板, 2 $\times$  反应液 25  $\mu$ L, 下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 溶液 0.6  $\mu$ L, 酶混合物 1  $\mu$ L, 最后用灭菌 DEPC 水补足至 49  $\mu$ L, 50  $^{\circ}$ C 下, 保温 60 min。加上游引物 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, 在 PCR 热循环仪上进行以下反应: 94  $^{\circ}$ C, 2 min; 94  $^{\circ}$ C, 40 s  $\rightarrow$  52  $^{\circ}$ C, 1 min  $\rightarrow$  69  $^{\circ}$ C, 2 min 30 s, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。取 4  $\mu$ L 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

## 1.5 pGBKT7-LMP1 重组质粒的构建

1.5.1 目的基因与 pGBKT7 质粒的酶切及纯化 常规方法制备并纯化质粒。目的基因和 pC-

BKT7 经 *EcoRI* 与 *BamHI* 双酶切后, 用低熔点琼脂糖凝胶电泳回收酶切后的纯化片段。

1.5.2 目的基因与 pGBKT7 的连接反应 pGBKT7 酶切纯化质粒 2  $\mu$ L (约 0.1  $\mu$ g), LMP1 cDNA 酶切纯化产物 4  $\mu$ L (约 0.4  $\mu$ g), T4 连接酶 1  $\mu$ L (1 U), 10 $\times$  反应缓冲液 2  $\mu$ L, 用水补足至 20  $\mu$ L, 16  $^{\circ}$ C 连接 20 h。

1.5.3 重组质粒的转化 CaCl<sub>2</sub> 法制备感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。将 10  $\mu$ L 连接产物加入 100  $\mu$ L 感受态菌中, 冰浴 30 min, 42  $^{\circ}$ C 热休克 90 s, 立即静置冰浴 2 min, 加入 800  $\mu$ L LB 培养基, 37  $^{\circ}$ C 100 r/min 振摇 45 min。分别以 100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、400  $\mu$ L 的量, 用无菌扩散棒将转化产物均匀涂布于 3 块含有 50 mg/L Kanamycin 的 LB 选择平板上, 室温平放 30 min 后, 置 37  $^{\circ}$ C 培养 14 h。

1.5.4 阳性克隆的筛选 挑取待测的单克隆于含有 50 mg/L Kanamycin 的 LB 培养液中, 37  $^{\circ}$ C 振荡过夜, 少量法抽提质粒, 用 *EcoRI* 与 *BamHI* 双酶切, *XhoI*, *HindIII*, *StuI* 单酶切, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性质粒。

1.5.5 测序 抽提并纯化质粒, 采用循环测序法方法, 在 377 测序仪 (PE 公司) 上利用 BigDye™ terminator cycle sequencing Ready Reaction 试剂盒进行测序。

## 2 结 果

### 2.1 总 RNA 抽提

用 TRIzol 试剂抽提的 B95-8 细胞总 RNA 的质量良好。  $A_{260}/A_{280} = 2.0$ , 10 g/L 琼脂糖电泳鉴定无降解。

### 2.2 LMP1 cDNA 的 RT-PCR

所设计引物位于 LMP1 全外显子的上下游, 包含起始密码子, 扩增片段大小为 1 174 bp。RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳见一清晰的特异性扩增条带 (图 1), 其大小与理论预期值相符。

### 2.3 pGBKT7-LMP1 重组质粒的鉴定

重组质粒经 *EcoRI* 与 *BamHI* 双酶切, 得到 1 168 bp 与 7 294 bp 两个片段, 而空载质粒上只有 7 294 bp 的单一片段 (图 2)。

为了验证所获得的重组质粒准确无误, 我们又采用多个限制性内切酶进行酶切。经 *XhoI* 酶切, 重组质粒得 378 bp, 8 084 bp 两个片段, 空载质

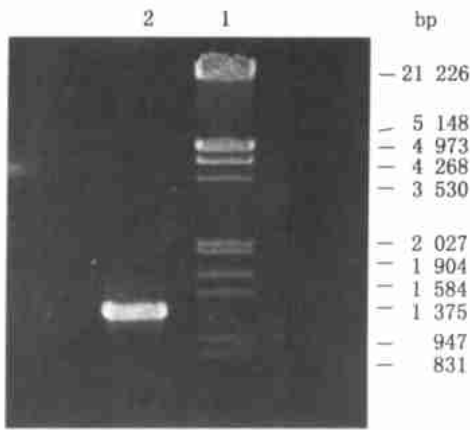


图 1 RT-PCR 产物电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product

Lane 1:  $\lambda$ DNA/ *Hind* III+ *Eco* R I Marker; Lane 2: 1 174 bp RT-PCR product

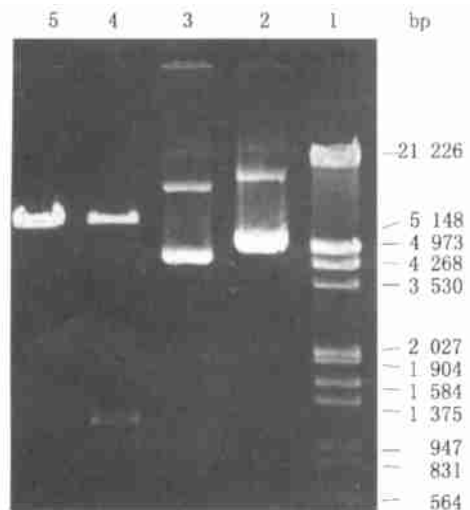


图 2 质粒的 *Eco*R I 与 *Bam*H I 酶切电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of plasmids digested by the *Eco*R I and *Bam*H I

Lane 1:  $\lambda$ DNA/ *Hind* III+ *Eco* R I Marker; Lane 2: plasmid pGBKT 7-LMP1; Lane 3: plasmid pGBKT 7; Lane 4: plasmid pGBKT 7-LMP1 digested by the *Eco*R I and *Bam*H I; Lane 5: plasmid pGBKT 7 digested by the *Eco*R I and *Bam*H I

粒得 7 304 bp 单一片段。经 *Stu* I 酶切, 重组质粒得 8 462 bp 的单一片段, 而空载质粒上无该位点。经 *Hind* III 酶切, 重组质粒得 4 938 bp, 1 498 bp, 2 026 bp 3 个片段, 空载质粒得 4 938 bp, 1 498 bp, 868 bp 3 个片段(图 3)。

以上限制酶的酶切结果均表明, 目的基因以正确的方向插入了质粒 pGBK T7 的多克隆位点。

### 2.4 测序

DNA 测序的结果表明: ①我们所获得的 LMP1 cDNA 与 GenBank 所公布的相应序列完全相符; ②

LMP1 cDNA 以正确方向插入 pGBKT7, 且未发生读码框架的改变(图 4)。

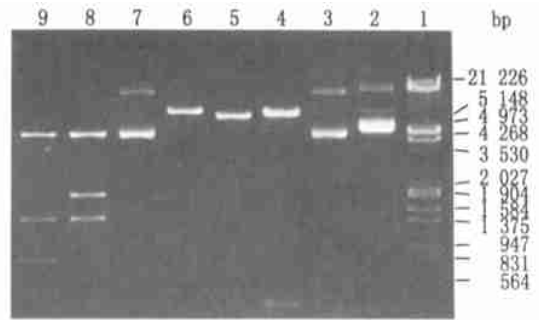


图 3 质粒的 *Xho* I, *Stu* I, *Hind* III 酶切电泳

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of plasmids digested by the *Xho* I, *Stu* I and *Hind* III

Lane 1:  $\lambda$ DNA/ *Hind* III+ *Eco* R I Marker; Lane 2: plasmid pGBKT7-LMP1; Lane 3: plasmid pGBKT7; Lane 4: plasmid pGBKT7-LMP1 digested by the *Xho* I; Lane 5: plasmid pGBKT7 digested by the *Xho* I; Lane 6: plasmid pGBKT7-LMP1 digested by the *Stu* I; Lane 7: plasmid pGBKT7 digested by the *Stu* I; Lane 8: plasmid pGBKT 7-LMP1 digested by the *Hind* III; Lane 9: plasmid pGBKT 7 digested by the *Hind* III

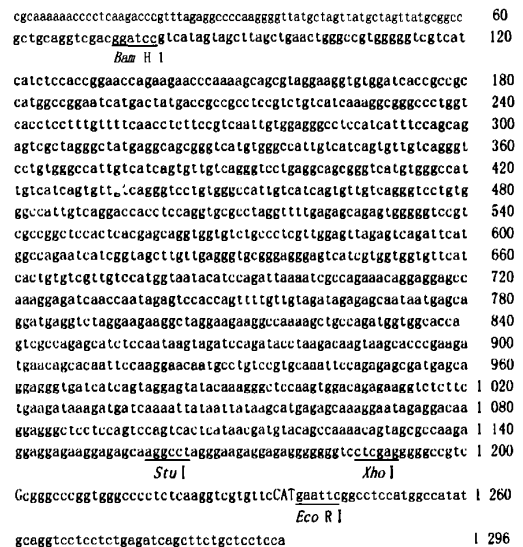


图 4 穿梭质粒 pGBKT7-LMP1 中 LMP1 cDNA 的测序

Fig. 4 The sequencing result of LMP1 cDNA fragment in the shuttle plasmid pGBKT7-LMP1

Sequences underlined are sites of restriction endonucleases. Sequences in boldface are parts of the vector plasmid pGBKT7 linking to LMP1 cDNA. And the sequence capitalized is the initiation coden of LMP1

### 3 讨论

EBV-LMP1 的生物学功能十分广泛, 涉及到细胞转化、增殖、分化和凋亡等各个方面, 包括: ①

可上调 B 细胞标志和细胞粘附因子 CD23、CD40、CD45 等的表达,下调 CD10 的表达,激活细胞粘附分子 LFA<sub>1</sub>, LFA<sub>3</sub>, ICAM<sub>1</sub> 等的表达<sup>[6]</sup>。② LMP1 能明显改变细胞的生物学行为,促进其的生长、增殖,使其表型倾向更进一步转化<sup>[7]</sup>。③ LMP1 还能诱导或上调某些基因的表达,如抗凋亡基因 A20,原癌基因 *Bcl-2*, 抑癌基因 p53 等。近年来有关 LMP1 作用机制方面的研究日益增多,目前普遍认为 LMP1 是通过肿瘤坏死因子受体相关因子(tumor necrosis factor receptor-associated factors, TRAFs)途径和肿瘤坏死因子受体相关死亡结构域(tumor necrosis factor receptor-associated death domain, TRADD)途径磷酸化抑制蛋白(inhibitor  $\kappa$ B $\alpha$ , I  $\kappa$ B $\alpha$ ), 激活核因子(nuclear factor, NF- $\kappa$ B), 从而对细胞发挥作用的<sup>[8,9]</sup>。LMP1 的作用机制非常复杂,尚待阐明。本研究中穿梭质粒 pGBKT7-LMP1 的构建,使得用酵母双杂交系统筛选与 LMP1 直接作用的蛋白质成为可能,为进一步阐明 LMP1 的信号传导途径提供了基础。

#### 参考文献:

- [1] Zheng X, Yuan F, Hu L, *et al.* Effect of a  $\beta$ -lymphocyte and NPC-derived EBV-LMP1 gene expression on *in vitro* growth and differentiation of human epithelial cells [J]. *Int J Cancer*, 1994, 57(5): 747.
- [2] Hu L F, Chen F, Zhen Q F, *et al.* Differences in the

growth pattern and clinical course of EBV-LMP1 expressing and non-expressing nasopharyngeal carcinomas [J]. *Eur J Cancer*, 1995, 31A(5): 658.

- [3] Cherney B W, Sgadari C, Kanegane C, *et al.* Expression of the Epstein-Barr virus protein LMP1 mediates tumor regression *in vivo* [J]. *Blood*, 1998, 91(7): 2491.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南 [M]. 第2版. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1995. 46, 55~56, 322~323.
- [5] 刘予川, 明文玉, 银巍, 等. PS-2 基因的克隆及其在肝癌中的表达 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, 16(1): 1.
- [6] Roberts M L, Cooper N R. Activation of a Ras-MAPK-dependent pathway by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for cellular transformation [J]. *Virology*, 1998, 240(1): 93.
- [7] 张蕾, 刘鸿瑞, 刘彤华, 等. EB 病毒基因 LMP1 和 EBNA2 对支气管上皮细胞的转化 [J]. *中华病理学杂志*, 1999, 28(4): 277.
- [8] Devergne O, McFarland E C, Mosialos G, *et al.* Role of the TRAF binding site and NF-Kappa B activation in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induced cell gene expression [J]. *J Virol*, 1998, 72(10): 7900.
- [9] Cahir-McFarland E D, Izumi K M, Mosialos G. Epstein-Barr virus transformation: involvement of latent membrane protein 1-mediated activation of NF- $\kappa$ B [J]. *Oncogene*, 1999, 18(49): 6959.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 347 页)

- [2] Dietzel J, Hirzmann J, Preis D, *et al.* Ferritin of *Schistosoma mansoni*: sequence comparison and expression in female and male worms [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, 50(2): 245.
- [3] VonDarl M, Harrison P M, Bottke W. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of two ferritins: soma ferritin and yolk ferritin, from the snail *Lymnaea stagnalis* L [J]. *Eur J Biochem*, 1994, 222(12): 353.
- [4] 周俊梅, 余新炳, 吴忠道, 等. 日本血吸虫卵黄铁蛋白基因的体外扩增及重组逆转录病毒 pLXSN-Fer1 重组质粒的构建 [J]. *中国人兽共患病杂志*, 2000, 16(1): 32.
- [5] Ulmer J B, Donnelly J J, Parker S E, *et al.* Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein [J]. *Science*, 1993, 259(23): 1745.
- [6] Clemens L E, Basch P F. *Schistosoma mansoni*: effect of transferrin and growth factors on development of schisto-

soma *in vitro* [J]. *J Parasitol*, 1989, 75(3): 417.

- [7] Moll H. Immune responses to parasites: the art of distinguishing the good from the bad [J]. *Immune Today*, 1996, 17(4): 551.
- [8] Couson P S, Smythies L E, Betts C, *et al.* Nitric oxide produced in the lungs of mice immunized with the radiation-attenuated schistosome vaccine is not the major agent challenge parasite elimination [J]. *Immunology*, 1998, 93(1): 55.
- [9] Boulanger D, Reid G D F, Sturrock R F, *et al.* Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni* [J]. *Parasite Immunol*, 1991, 13(3): 473.

(编辑 张敏瑞)