

# Epstein-Barr 病毒 DNA 多聚酶基因扩增和表达载体构建

谢民强<sup>1</sup>, 杨解军<sup>1</sup>, 杨林<sup>2</sup>, 张革化<sup>1</sup>

(中山医科大学附属第三医院 1. 耳鼻咽喉科, 2. 传染病科, 广东 广州 510630)

**摘要:**【目的】扩增 Epstein-Barr 病毒(EBV)DNA 多聚酶基因, 构建高效表达载体。【方法】根据 EBV 全基因序列, 在 EBV DNA 多聚酶基因的 3'、5' 端设计一对附加 *EcoRI* 和 *Hind III* 酶切位点的特异性引物, 以 B<sub>95-8</sub> 细胞 DNA 为模板, 采用改良 PCR 方法扩增出 EBV DNA 多聚酶基因(3 044 bp)。用 *EcoRI* 和 *Hind III* 酶切该基因片段并克隆至表达载体 pMAL-p2。采用蓝白斑试验筛选阳性菌落。用 *EcoRI* 和 *Hind III* 酶切分析、鉴定重组体 pEBP。【结果】通过电泳鉴定, PCR 产物为 3 044 bp, 与 EBV DNA 多聚酶基因大小一致。经蓝白斑试验及限制性 DNA 内切酶分析, 成功地筛选到 EBV DNA 多聚酶基因重组表达质粒 pEBP。【结论】本实验成功地扩增出完整 EBV DNA 多聚酶基因, 并构建了高效表达重组体, 为进一步在体外表达、制备 EBV DNA 多聚酶蛋白奠定了基础。

**关键词:** 爱泼斯坦-巴尔病毒; 聚合酶链反应; 克隆; 分子; DNA; 病毒

中图分类号: R373.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)06-0445-03

## Amplification and Construction of Expression Vector of the Epstein-Barr Virus DNA Polymerase Gene

XIE Min-qiang<sup>1</sup>, YANG Jie-jun<sup>1</sup>, YANG Lin<sup>2</sup>, ZHANG Ge-hua<sup>1</sup>

(1. Department of Otolaryngology, 2. Department of Infectious Diseases, Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】To construct an efficient expression vector of the Epstein-Barr virus DNA polymerase gene. 【Methods】Using B<sub>95-8</sub> cell DNA as template, the EBV DNA polymerase gene was amplified by modified PCR with a pair of specific primers which contain the restrictive sites of *EcoRI* and *Hind III*. The amplified fragment of EBV DNA polymerase gene was digested with *EcoRI* and *Hind III*, and then cloned into plasmid pMAL-p2. *E. Coli* TB1 was used as host cells for transformation. The positive recombinant clones were screened by blue-white test. The recombinant plasmids were identified by restriction endonuclease enzyme analysis. 【Results】The agarose gel electrophoresis showed that the amplified fragments were the same size of 3 044 bp as the entire EBV DNA polymerase gene. The recombinant plasmid pEBP containing EBV polymerase gene was successfully selected. 【Conclusion】The modified double enzyme PCR method conducts to amplify a big fragment DNA. The establishment of the recombinant efficient expression vector carrying EBV DNA polymerase gene has provided a base for producing EBV DNA polymerase protein in vitro.

**Key words:** Epstein-Barr virus; clone; molecular; polymerase chain reaction; DNA; viral

自 Old<sup>[1]</sup> 等于 1966 年首先从鼻咽癌患者血清中检测到 Epstein-Barr 病毒(EBV)抗体以来, 大量研究表明 EBV 与鼻咽癌的发生、发展密切相关。

EBV 基因和各种血清学检查<sup>[2,3]</sup> 为鼻咽癌的早期诊断与监测提供了重要手段。但由于目前 EB 病毒各种血清学检查都存在不同程度的假阳性和假

收稿日期: 2000-01-04

基金项目: 广东省自然科学基金(A19970078); 广东省医学科学技术研究基金(A1997169)

作者简介: 谢民强(1956-), 男, 湖南宁乡人, 博士, 教授, 研究方向: 头颈肿瘤临床和早期诊断。

阴性,不能满足临床需要。作者拟用分子生物学和免疫学技术建立一种更敏感和特异的鼻咽癌早期诊断方法。这是一系列研究,现将 EBV DNA 多聚酶基因的扩增和高效表达载体的构建及鉴定报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

1.1.1 细胞、质粒、菌株 B<sub>95-8</sub>细胞株系湖南医科大学肿瘤研究所提供, TB1 菌株、表达质粒 pMAL-p2 为美国 Biolabs 公司产品。

1.1.2 试剂 *Pfu* 和 *rTth* DNA 聚合酶为美国 Clontech 公司产品。dNTP、*Eco*R I、*Hind* III 内切酶、T<sub>4</sub>DNA 连接酶等为美国 Promega 公司产品,回收、纯化试剂盒为 BIO-RAD 公司产品。

### 1.2 实验方法

1.2.1 PCR 引物的设计与合成 根据 EBV 全基因序列<sup>[4]</sup>设计一对引物,在计算机上检测其特异性良好。引物I: 5'-GTTGAATTC ATG TCTGGGGG-AC-TCTTC-3'(下划横线为 *Eco*R I 酶切位点);引物II: 5'-TCTAAGCTTCCCTCACTTTGGGTCTTAG-3'(下划横线为 *Hind* III 酶切位点),由上海生物工程公司合成。

1.2.2 目的基因的获得及鉴定 ①从 B<sub>95-8</sub>细胞中抽提模板 DNA<sup>[5]</sup>;取 B<sub>95-8</sub>细胞 1×10<sup>6</sup>个,加入 400 μL 裂解液(含蛋白酶 K)56 °C 过夜,酚-氯仿抽提,用 pH 7.6 的 TE 缓冲液悬浮 DNA,取 2 μL 作 PCR 反应模板。②PCR 扩增 EBV DNA 多聚酶基因<sup>[6,7]</sup>;应用扩增长片段 DNA 的 PCR 方法,加 *Pfu* 和 *rTth* 两种 DNA 聚合酶,反应总体积 30 μL,包括模板 DNA 2 μL,引物 I、II 各 0.3 μmol/L, dNTPs 20 μmol/L, *pfu* 和 *rTth* 各 1.5 U。离心混匀后加液态石蜡 100 μL,按下列温度和时间开始循环:93 °C, 30 s; 55 °C, 100 s; 72 °C, 120 s; 35 个循环,从第 10 个循环开始每个循环延伸时间逐次延长 5 s,最后 72 °C 延伸 10 min。③扩增片段的回收纯化:采用 BIO-RAD 公司 DNA 回收纯化试剂盒回收、纯化目的基因片段,琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.3 EBV DNA 多聚酶基因重组表达载体构建<sup>[8,9]</sup> ①用 *Eco*R I 和 *Hind* III 分别双酶切 PCR 产物和载体 pMAL-p2。②将酶切后的酶基因片段和载体混合,加入 T<sub>4</sub>DNA 连接酶,16 °C 水浴过夜。

③重组体转化大肠杆菌 TB1,取钙化菌 100 μL,加重重组体 10 μL,常规操作。再取转化菌 10 μL 涂布于表面涂有 X-gal 和 IPTG 的琼脂糖平板(含 Amp)上,37 °C 过夜培养。

## 2 结果

### 2.1 EB 病毒 DNA 多聚酶基因片段的获得

PCR 扩增产物电泳(图 1)后回收得到 3 044 bp 目的基因片段。

### 2.2 重组体的鉴定

挑取白色菌落扩增培养,抽提质粒 DNA,电泳时重组粒较空白质粒(6 721 bp)明显泳行缓慢。进一步酶切鉴定,用 *Eco*R I 消化重组质粒,电泳显示其与理论值 9 765 bp 相符,再用 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切重组质粒,电泳结果示重组质粒被酶切为两

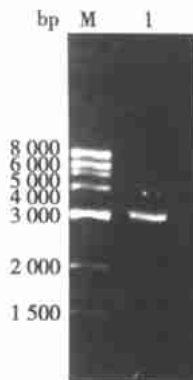


图 1 EBV DNA 多聚酶基因的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of EBV-DNA polymerase gene

M: 1 kb DNA marker; 1: EBV-DNA polymerase gene (3 044 bp)

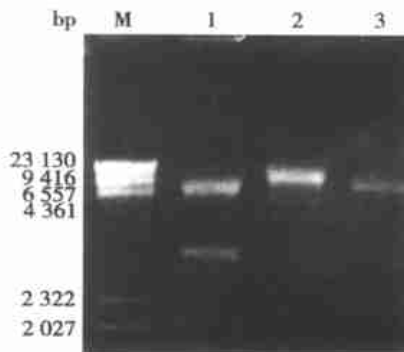


图 2 重组体的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction endonuclease enzyme analysis of recombinant vector pEBP

M: λ DNA/ *Hind* III markers; 1. *Eco*R I and *Hind* III cleaved recombinant vector pEBP; 2. *Eco*R I cleaved recombinant pEBP; 3. *Eco*R I cleaved pMAL-p2

个片段,大小约 3 000 bp 和 6 700 bp,表明重组质粒是由 pMAL-p2 和 EB 病毒 DNA 多聚酶基因组成(图 2)。

### 3 讨论

#### 3.1 PCR 扩增长片段 DNA 方法的探讨

传统 PCR 技术只能扩增 2~3 kb 以内短片段,更长者则难以有效扩增。关于 EB 病毒 DNA 多聚酶基因的完整扩增国内尚未见报道。我们通过多次试验,反复摸索,终于扩增出了长达 3 044 bp 的完整 EB 病毒 DNA 多聚酶基因。以下几点是关键:①模板 DNA 必须高度纯化;②应在缓冲液中加入一定量的甘油以提高聚合酶的稳定性;③选用错配率较低的耐热 DNA 聚合酶,本试验选用具有 3'~5'外切酶活性的 *Pfu* 酶和 5'~3'外切酶活性的 *rTth* 酶,两种酶混合使用,有效地纠正了复制过程中的错配;④热循环参数的设置亦很重要,本实验采用较高退火温度,延伸时间也较长,且从第 10 个循环开始每个循环延伸时间逐次延长 5 s,从而有效地防止了非特异性扩增。

#### 3.2 如何选择高效表达载体

本试验选用的 pMAL-P2 质粒为 M13 和 PBR322 组装,含有一个可调控的强启动子,有指导高效翻译的 S-D 序列和抗插入移码的 AUG 序列,能在原核细胞中高效表达外源基因。它的另一个特点是含有 Plac-lacZ 组件(多聚接头),通过选用相应的 LacZ 基因型的 TB1 菌,就可利用蓝-白斑试验筛选阳性菌落。pMAL-p2 的一个最显著的特点是虽然表达蛋白率仅占细菌总蛋白量的 5%~10%,但它能将融合蛋白分泌到细胞外,使其免遭宿主细胞蛋白酶的降解,亦使蛋白纯化操作变得简单易行。

#### 3.3 构建 EB 病毒 DNA 多聚酶基因表达载体的意义

鼻咽癌为中国南方高发恶性肿瘤,其发生、发

展及转归与 EB 病毒密切相关。有关 EB 病毒的多抗原抗体反应在鼻咽癌患者与正常人群之间差别很大,而且出现早于病理确诊。本试验成功地构建了 EB 病毒 DNA 多聚酶基因表达载体,为进一步在体外大批量生产高纯度的 EB 病毒 DNA 多聚酶蛋白,进而以该酶蛋白作为抗原,建立更敏感和特异的 EB 病毒血清学诊断方法奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Old L J, Boyse A E, Dettgen H F, *et al.* Precipitation antibody in human serum to an antigen present in cultured Burkitts lymphoma cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 56: 1699.
- [2] Stolzenberg M G, Debouze S, Ng M, *et al.* Purified recombinant EBV deoxyribonuclease in serological diagnosis of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 1996, 66(3): 337.
- [3] Vokes E E, Liebowitz D N, Weichselbaum R R. Nasopharyngeal carcinoma [J]. *Lancet*, 1997, 350(9084): 1087.
- [4] Bear R, Bankier A T, Biggin M, *et al.* DNA sequence and expression of the B95.8 Epstein-Barr virus genome [J]. *Nature*, 1984, 310: 207.
- [5] Feinmesser R, Miyazaki I, Cheung R, *et al.* Diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by DNA amplification of tissue obtained by fine needle aspiration [J]. *Engl J Med*, 1992, 326(1): 17.
- [6] Smith-Vaughan H C, Sriprakash K S, Mathews J D, *et al.* Long PCR-Ribotyping of nontypeable haemophilus influenzae [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33: 1192-1195.
- [7] Banes W M. PCR amplification of up to 35kb DNA with fidelity and high yield from  $\lambda$  bacteriophage templates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(3): 2216.
- [8] 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯. 分子克隆(实验指南)[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 候云德, 等主译. 第 2 版. 北京: 科学技术出版社, 1992. 1~1062.
- [9] 彭秀玲, 袁汉英, 谢毅, 等. 基因工程实验技术[M]. 第 2 版. 湖南: 科学技术出版社, 1998. 1~213.

(编辑 刘清海)

(上接第 444 页)

- [8] Boekstegers P, Kainz I, Giehl W, *et al.* Subchronic exposure of cardiomyocytes to low concentrations of TNF attenuates the positive inotropic response not only to catecholamines but also to cardiac glycosides and high calcium concentrations [J]. *Mol Cell Biochem*, 1996, 156(2): 135.
- [9] Barber A E, Coyle S M, Marano M A, *et al.* Glucocor-

ticoid therapy alters hormonal and cytokine responses to endotoxin in man [J]. *J Immunol*, 1993, 150(5): 1999.

- [10] Chang C K, Llanes S, Schurer W. Effect of dexamethasone on NF KB activation tumor necrosis factor formation and glucose dyshomeostasis in septic rats [J]. *J Surg Res*, 1997, 72(2): 141.

(编辑 张敏瑞)