

• 实验研究 •

EBV-DNA 酶全基因扩增克隆和鉴定^①朱振宇^{1,②} 严世荣² 黄迪³ 陈尚武¹ 马润泉¹

(1 中山医科大学生物化学教研室; 广州, 510089)

2 湖北郧阳医学院生物化学教研室 3 中山医科大学肿瘤所生化室)

提 要 根据 Bear 的 EB 病毒(EBV)基因全序列,设计包括 EBV 特异性 DNA 酶全基因的一对引物,在引物上设计有一个 *Sal* I 切点,以便于克隆。选用蛋白酶 K 裂解的 Raji 细胞 DNA 为模板,扩增出一条 1 460 bp 的特异条带,纯化后经 *Taq* I 酶切形成 1 198 bp 和 262 bp 的两个片段,证实该扩增片段即为 EBV 特异性 DNA 酶的全基因片段。以 JM103 为宿主菌,以高效表达质粒 pBV221 为载体,按常规方法作酶切、连接、转化,最后在含氨苄青霉素的培养基上挑取单菌落扩大培养,用快速法少量制备质粒 DNA。根据质粒电泳结果粗筛,再行 *Bam* H I 酶切初步鉴定,确定质粒大小为 5 117 (1 451+3 666)bp 的菌落为阳性克隆。先后用 *Bam* H I 和 *Taq* I 消化阳性重组体,以形成 1 200 bp 和 3 917 bp 两片段的确定为正向连接重组体。本实验首次将 EBV-DNA 酶全基因片段克隆到高效表达载体 pBV221 上获得成功。

主题词 爱波斯坦-巴尔病毒; 聚合酶链反应; 克隆,分子; DNA 酶基因

中图分类号 R373.9

自 80 年代初开始了对 EBV 的分子生物学研究以来,已在序列分析、文库构建及克隆表达等多方面都取得了重大进展。有关 EBV-DNA 酶基因的克隆表达,虽有文献报道,但其获得目的基因的手段主要是通过内切酶消化或经 RNA 反转录,所获得的目的基因不够完整、准确。本研究首次选用 PCR 扩增的方法获得完整的 EBV-DNA 酶基因,并与高效表达载体 pBV221 连接,在大肠杆菌 JM103 中克隆表达。

1 材料与方 法

1.1 生物材料

Raji 细胞株, pBV221, JM103 均为本室

细胞株、菌种。

1.2 PCR 扩增试剂

1.2.1 引物 由本室根据 EBV 全基因序列设计^[1],带有 *Sal* I 切口,广州金华公司合成,引物 I 序列为: 5' - GCAGTC-GACTTCTTTGGTCC - 3'; 引物 II 为: 5' - TTGATTATTCCCCGTCGAC - 3'。

1.2.2 PCR 试剂盒 复旦科技开发公司产品。

1.3 分子生物学试剂

内切酶类,如 *Sal* I, *Taq* I, *Bam* H I; 其他酶类,如碱性磷酸酶, T₄ 连接酶; DNA 分子量标记等皆为 BRL 公司产品。

1.4 实验方法

1.4.1 目的基因的获得及鉴定 (1)Raji 细胞 DNA 的抽提:取 Raji 细胞 1×10^6 个,加

① 国家教委博士点基金资助课题;

② 第一作者,1966 年出生,男,博士,讲师

裂解缓冲液 $100\ \mu\text{l}^{[2]}$, 56°C 水浴 2 h, 95°C 水浴变性 7 min, $10\ 000\ \text{r/min}$ 离心 5 min, 取上清 $1\sim 2\ \mu\text{l}$ 作模板。(2)EBV-DNA 酶全基因的扩增: 常规 PCR 操作^[3,4], 总体积 $100\ \mu\text{l}$ 。(3)扩增片段酶切鉴定^[4,5]。①纯化: 用酚-氯仿抽提, 无水乙醇沉淀, TE 溶解。②酶切鉴定: *Taq* I 酶消化已纯化扩增产物, 酶切产物电泳鉴定。

1.4.2 基因与载体酶切、连接及转化^[4-9]

①用 *Sal* I 在 37°C 分别酶切纯化的 DNA 酶基因片段和 pBV221, 2 h 后两管分别加入碱性磷酸酶 37°C 水浴 1 h, 用 $5\ \text{mmol/L}$ EDTA 和 0.5% SDS 终止反应。分别用酚-氯仿抽提, 重蒸乙醇沉淀, 干燥后 TE 溶解以纯化去磷酸化的 DNA。②目的基因与载体的连接: 去磷酸化的 DNA 酶基因和 pBV221 用 *T*₄ DNA 连接酶于 16°C 水浴连接 16 h 形成连接重组体。③重组体转化大肠杆菌 JM103: 取按常规方法制备的感受态细菌 $100\ \mu\text{l}$, 加连接重组体 $10\ \mu\text{l}$, 混匀后冰浴 30 min, 再在 42°C 作用 2 min, 将转化物转移到盛有 $1\ \text{ml}$ LB 培养液 (含氨苄青霉素, Amp) 的培养瓶中, 37°C 微振荡培养 1 h, 取 $10\ \mu\text{l}$ 转化菌涂布于含 Amp ($50\ \text{mg/L}$) 的琼脂糖平板上, 37°C 培养至有单菌落形成。

1.4.3 阳性菌落的筛选和鉴定^[4,5] ①据细菌质粒的电泳行为粗筛: 大量挑取单菌落分别在 $5\ \text{mL}$ LB 培养液中接种, 37°C 振荡培养 4~6 h, 加终浓度为 $170\ \text{mg/L}$ 氯霉素, 继续在 37°C 振荡培养 8~10 h 以扩增质粒。常规碱裂解法抽提重组质粒 DNA, 微量电泳法粗筛阳性菌落。②酶切重组体初步鉴定阳性克隆: *Bam* H I 消化粗筛的阳性质粒, pBV221 作为对照, 37°C 水浴 2 h, 酶切产物凝胶电泳鉴定。③双酶切阳性质粒确定重组体连接方向: *Bam* H I 和 *Taq* I 酶切阳性质粒, 据其产物电泳行为确定连接方向。

2 结 果

2.1 EBV-DNA 酶基因片段的获得

PCR 扩增结果见图 1, 第 3 泳道为单一扩增带, 位于 Marker $1\ 857\ \text{bp}$ 和 $1\ 060\ \text{bp}$ 之间, 与 DNA 酶全基因片段理论值 $1\ 460\ \text{bp}$ 相符。

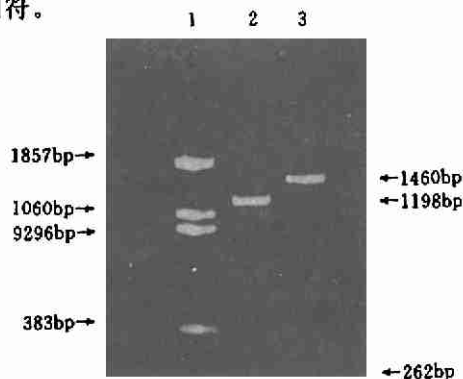


图 1 DNA 酶全基因片段及其 *Taq* I 酶切鉴定电泳
1 pBR322/*Bst* N 1; 2 纯化的 DNA 酶全基因片段/*Taq* I; 3 EBV-DNA 酶全基因片段 ($1\ 460\ \text{bp}$)

2.2 PCR 扩增产物的酶切鉴定

Taq I 消化纯化的 PCR 扩增产物结果见图 1, 第 2 泳道消化产物为两条分子量较小的条带, 片段大小分别与 $1\ 198\ \text{bp}$ 和 $262\ \text{bp}$ 的理论值相符, 可确定该 $1\ 460\ \text{bp}$ 的 DNA 片段即为 EBV-DNA 酶全基因片段。

2.3 阳性克隆的筛选

大批转化菌微量质粒碱裂解法抽提质粒的电泳结果显示阳性菌落的重组质粒 DNA 较重新环化的空白质粒 DNA 的迁移率为慢。

2.4 酶切质粒初步鉴定

Bam H I 消化重组质粒及 pBV221, 电泳结果重组质粒分子大小为 $5\ 117\ \text{bp}$, 与质粒和目的基因相加 ($3\ 666 + 1\ 451\ \text{bp}$) 理论值相符。

2.5 双酶切重组质粒确定连接方向

Bam H I 和 *Taq* I 双酶切重组体质粒及重新环化的 pBV221, 电泳结果显示 3 株重组质粒皆可被消化为 $1\ 200\ \text{bp}$ 和 $3\ 917\ \text{bp}$ 的两片段 (图 2), 表明该 3 株阳性菌的重组体皆为正向连接; 若为反向连接, 应为 $252\ \text{bp}$ 和 $4\ 865\ \text{bp}$ 的两片段。

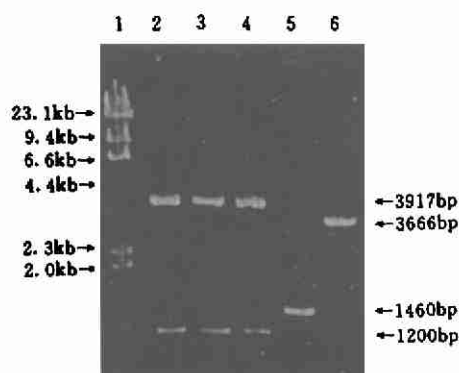


图2 双酶切鉴定重组体的连接方向

1 DNA/Hind III; 2,3,4 重组体 DNA/Bam HI + Taq I; 5 EBV-DNA 酶全基因片段; 6 pBV221/Bam HI + Taq I

3 讨 论

3.1 关于高效表达载体的选择问题

在原核细胞中要高效表达外源基因,首先要有一个强的原核启动子,即指导 RNA 转录的一段 DNA 序列,且这个启动子应是可调控的。除高效转录外,还需要能指导高效翻译成蛋白质的序列,即 SD 序列。

高效表达质粒 pBV221 均符合以上要求,且 pBV221 具有 *Sal* I 内切酶位点,正适合 DNA 酶基因的连接插入。pBV221 的另一个显著特点是可以受温度变化的诱导,即温度由 30℃ 升到 42℃ 可以激发外源基因大量地表达,从而便于对外源基因表达的调节和控制。pBV221 还具有极高的表达效率,用其表达 IL2, rIFN 和 TNF 的蛋白量可达细菌蛋白总量的 20% 以上。后来的实验中证实(另文发表)其对 DNA 酶基因的表达量高达宿主总蛋白的 20%~25%。

3.2 重组体正反向连接的鉴定

本实验 *Sal* I 消化 EBV-DNA 酶基因片段及 pBV221,所暴露的粘性末端相同,目的基因与载体有正向和反向连接的两种可能,微量质粒 DNA 制备——琼脂糖凝胶电泳法粗筛, *Bam* HI 酶切初步鉴定的阳性克隆重

组体还须作进一步的正反向连接的鉴定。EBV-DNA 基因片段仅有 *Taq* I 单一位点(位于该基因的 198 bp 处)而无 *Bam* HI 位点; pBV221 却仅有 *Bam* HI 的单一位点,而无 *Taq* I 酶切位点。用这两酶消化重组体质粒可确定重组体的连接方向:①若重组体为正向连接,双酶切后形成 1200 bp 和 3917 bp 的两片段;②若为反向连接,则形成 252 bp 和 4865 bp 的两片段。图2中所示的3株阳性菌落的重组体均为正向连接。本室还对其表达产物的生化特性进行了进一步的研究,证实可用其作为抗原来检测鼻咽癌病人血清中特异性抗体的水平^[10]。

参 考 文 献

- 1 Baer R, Bankier AT, Biggin M, et al. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 1984, 310: 207
- 2 Feinmesser R, Miyazaki I, Cheung R, et al. Diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by DNA amplification of tissue obtained by fine-needle aspiration. *Engl J Med*, 1992, 326(1): 17
- 3 朱平. PCR 基因扩增实验操作手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1992. 1~328
- 4 Lenonard GD, Mark DD, James FB 著(田勇泉, 江国健主译). 分子生物学方法. 长沙: 湖南科技出版社, 1990. 1~322
- 5 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯著(金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 等主译). 分子克隆(实验指南). 第2版. 北京: 科学出版社, 1992. 1~1062
- 6 张智清, 姚立红, 侯云德. 含 P₆PL 启动子的原核高效表达载体的构建及其应用. *病毒学报*, 1990, 6(2): 111
- 7 Chen MR, Hsu TY, Chen JY, et al. Cloning and characterization of cDNA clones corresponding to transcripts from the *Bam*HI 1 G region of the Epstein-Barr virus genome and expression of BGLF2. *J Gen Virol*, 1991, 72: 3047
- 8 Sally A, Rowe M, Finke I, et al. The characterization of the EBV alkaline deoxyribo-nuclease cloned and expressed in *E. coli*. *Nucleic Acids*

