DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.006

论著

文章编号:1000-5404(2002)08-0892-03

鼠源轮状病毒抗原基因的表达载体构建及农杆菌转化研究

李晋涛,吴玉章,费 蕾,唐 艳,邹丽云 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 构建表达鼠源轮状病毒抗原基因vp4的植物载体及农杆菌转化。方法 抗原基因vp4经PCR扩增后直接克隆到pUC-T载体,双酶切目的片断和植物表达载体,以T4连接酶将目的片断与载体相连接,电转化方式将重组质粒转入农杆菌。结果 成功地将目的基因定向克隆到表达载体,并转入到农杆菌中。结论 pUC-T载体可直接进行PCR扩增产物克隆,便于测序;电转化方式可以有效、快速地将大分子量质粒(>10kb)转入农杆菌中。

关键词:轮状病毒;载体构建;电击转化;vp4基因
中图法分类号:R373.2;R394-33;R394.2 文献标识码:A

Construction of murine rotavirus antigen gene expression vector and transformation the recombinant plasmids into *Agrobacterium tumefaciens*

LI Jin-tao, WU Yu-zhang, FEI Lei, TANG Yan, ZOU Li-yun (Institute of Immunology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct plant expressing murine rotavirus antigen gene and transform it into Agrobacterium tumefaciens. Methods PCR product of vp4 gene was directly cloned into pUC-T vector, and the vp4 DNA fragments were cut down by restriction enzymes and inserted into the plant expression vector. The recombinant plasmids were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. Results Murine rotavirus antigen gene vp4 was successfully cloned into the plant expression vector PBI121 and the recombinant plasmids were efficiently transformed into the target bacterium. Conclusion pUC-T vector is a functional vector. Electroporation is a quicky and efficient way to transform large weight molecular plasmids (>10 kb) into *Agrobacterium tumefaciens*.

Key words: rotavirus; vector construction; electroporation; vp4 gene

轮状病毒(Rotavirus, RV)是导致婴幼儿腹泻的重要病因,每年约有60万儿童死于RV腹泻,在我国初步的资料表明每年也有约10万,迄今尚无治疗RV的特效药物。因此预防显得极为重要。为此,世界卫生组织多次呼吁各国科学家研制开发有效的轮状病毒疫苗,指出只有疫苗预防接种才是遏制轮状病毒腹泻惟一有效的手段。本研究以鼠源轮状病毒外壳蛋白基因vp4为抗原基因,将其重组到植物表达载体,以研究病原基因在植物中的表达情况,为最终以转基因植物作为新型口服疫苗奠定基础。

1 方法与材料

1.1 主要试剂

质粒EDIM-VP4由美国俄亥俄州Cincinnati儿童医院的Choi.AH博士馈赠,含鼠源轮状病毒外壳蛋白基因vp4;克隆载体PBI121、根癌农杆菌LBA4404由西南农业大学生物技术中心馈赠;大肠杆菌E.coli XL-Blue由本研究所保存;pUC-T载体、A-tailing试剂盒、T4 DNA ligase、DNA分子量Marker Ⅴ/HindⅢ为上海Sangon公司产品;限制性内切酶为英国New England Lab公司产品;DNA分子量Marker DL 2000、小量质粒抽提试剂盒、Pyrobest DNA聚合酶为大连Takara公司产品、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自德国Roche公司。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39789010)
作者简介:李晋涛(1970-),女,四川省峨眉山市人,博士,讲师,主要从事分子遗传学及分子免疫学方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752236
收稿日期:2001-09-07;修回日期:2002-06-05

1.2 实验仪器

PCR扩增仪为PE公司5700型PCR扩增仪。电脉冲转化仪为Bio-Rad公司产品Gene PulserII

1.3 vp4 PCR扩增

EDIM-vp4质粒XbaI单酶切线性化作为模板,根据GenBank公布的vp4基因编码序列用DNAstar软件设计引物,引物序列由上海Sangon公司合成。PCR反应条件为94 ℃变性5 min后,94 ℃ 60 s,56 ℃ 1.5 min和72 ℃ 2 min,循环30次,72 ℃ 10 min结束反应。PCR总反应体系为线性化质粒DNA模板2 μl,20 pmol/L引物各1 μl,10 mmol/L dNTP 2 μl,10×PCR反应缓冲液5 μl和Pyrobest DNA聚合酶0.5 U,加灭菌双蒸水至总体积50 μl。扩增产物1%琼脂糖电泳,具体操作按参考文献[1]的有关方法进行。

1.4 扩增产物pUC-T载体克隆

PCR产物经1%凝胶电泳后回收纯化,纯化产物用A-tailing试剂盒加A后克隆到PUC-T载体,经氨苄西林及α-互补蓝白斑筛选,挑取白色菌落摇瓶,分别用*Xba*Ⅰ、*Hind*Ⅲ、*Xba*Ⅰ+*Sac*Ⅰ酶切鉴定重组子质粒,命名为pUC/mvp4;将鉴定后的重组子在DNA自动测序仪测序。

1.5 vp4表达载体的构建

*Xba*Ⅰ+*Sac*Ⅰ双酶切pUC/mvp4重组子质粒,回收目的片断,定向插入PBI121;经卡那霉素平板筛选后,挑取单菌落摇瓶,*Xba*Ⅰ、*Xba*Ⅰ+*Sac*Ⅰ酶切鉴定,命名为PBI/mvp4,见图1。

1.6 PBI/mvp4重组子的农杆菌转化

参照文献[2]将OD值为0.6~0.8的农杆菌液20 ml离心后,去离子水洗两次,重悬于1 ml 10%甘油;以40 μl菌液加入2 μl(约50 ng)重组质粒,充分混匀;参数设置:电穿孔杯为0.1 cm,电容25 μF,电阻200 Ω,电场强度从10 kV/cm,12 kV/cm依

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

次递增到 20 kV/ cm, 共 6 个电场强度梯度。经电击后加入 LB 0.8 ml和 1 mol/ L 葡萄糖 20 μl 混匀, 转入 1.5 ml 离心管, 28 ℃ 225 r/ min 振荡培养 3 h; 取 100 μl 铺于含链霉素 125 μg/ ml、卡那霉素 50 μg/ ml的 LB 平板上, 28 ℃培养 36 h 观察结果。

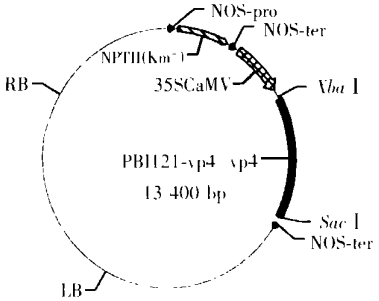


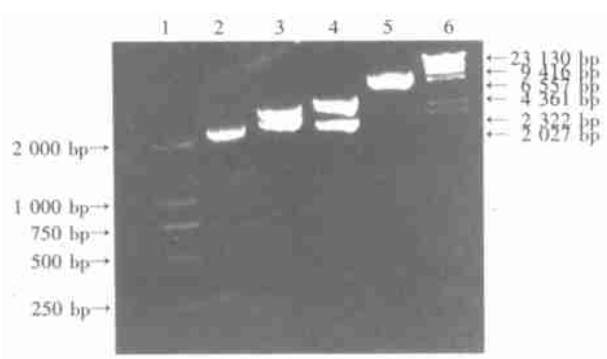
图 1　vp4 重组子质粒表达载体构建示意图

Fig 1　Schematic diagram of constructing vp4 recombinant plant expression vector

2　结果

2.1　pUC/vp4 重组子的鉴定

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后可见一条大小约为 2.3 kb 的亮带, 说明所设计的引物与模板 DNA 特异性结合, 所选用的 Pyrobest DNA 聚合酶扩增高、特异性强。直接用 T4 连接酶将纯化、加 A 的 PCR 产物连接到 pUC-T 载体中; 用 *Hind* Ⅲ、*EcoR* Ⅰ、*Xba* Ⅰ + *Sac* Ⅰ 对重组质粒进行酶切鉴定。vp4 不含 *EcoR* Ⅰ 酶切位点, 载体上有一个 *EcoR* Ⅰ 位点, 因此 *EcoR* Ⅰ 将重组子质粒线性化; vp4 上第 1 906 bp 有一个 *Hind* Ⅲ位点, 载体插入点下游有一 *Hind* Ⅲ位点, *Hind* Ⅲ将重组子切成大约 1.9 kb、3.2 kb 两个片断, 说明插入片断含有 *Hind* Ⅲ位点, 且以反向插入; *Xba* Ⅰ + *Sac* Ⅰ 双切将重组子切成大约 2.3 kb、2.8 kb 两个片断, 说明插入片断与扩增目的片断大小相符, 见图 2。将 pUC/ vp4 重组子送上海生工测序, 由于使用了高保真 DNA 酶进行 PCR 扩增, 总长为 2 324 bp 的目的基因片断与 GenBank (NO. 2745833)所公布的数据一致。



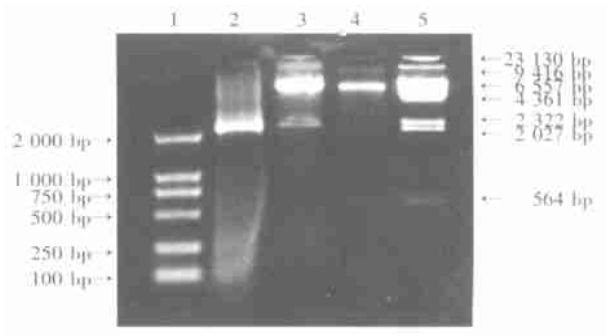
1: DL2000 DNA marker; 2: PCR product of vp4; 3: Restriction map of recombinant plasmids pUC/ vp4 digested by *Hind* Ⅲ; 4: Restriction map of recombinant plasmids pUC/ vp4 digested by *Xba* Ⅰ + *Sac* Ⅰ; 5: Restriction map of recombinant plasmids pUC/ vp4 digested by *Xba* Ⅰ; 6: λ/ *Hind* Ⅲ DNA marker

图 2　PUC/ vp4 重组质粒的酶切鉴定, 1% 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig 2　Electorophretic recombinant map of recombinant pUC/ vp4 on 1% agarose gel

2.2　PBI/ vp4 重组子植物表达载体的鉴定

挑取在卡那霉素平板生长的单菌落摇瓶, 小量质粒抽提试剂盒抽提质粒; 用 *Xba* Ⅰ、*Xba* Ⅰ + *Sac* Ⅰ 酶切, 1% 胶电泳可见 *Xba* Ⅰ 将重组子线性化, *Xba* Ⅰ + *Sac* Ⅰ 将重组子切成大小分别为 2.3 kb(目的片断)和 12 kb(载体)两个片断, 见图 3。



1: DL2000 DNA marker; 2: PCR product of vp4; 3: Restriction map of recombinant plasmids PBI121/ vp4 digested by *Xba* Ⅰ + *Sac* Ⅰ; 4: Restriction map of recombinant plasmids PBI121/ vp4 digested by *Xba* Ⅰ; 5: λ/ *Hind* Ⅲ DNA marker

图 3　PBI121/ vp4 重组质粒的酶切鉴定, 1% 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig 3　Electorophretic recombinant map of recombinant PBI121/ vp4 on 1% agarose gel

2.3　重组子转化农杆菌

电击转化可改变的参数有电场强度、电容和电阻。这些因素中主要是电场强度影响细胞的通透性, 随着电场强度的增加, 细胞的通透性增加, 外源 DNA 进入细胞的几率增大, 但细胞的存活率随之降低。当电容为 25 μF, 电阻为 200 Ω, 随着电场强度从 10 kV/ cm 到 20 kV/ cm 梯度递增, 转化率从 $2\times10^2/\mu g$ 增加到 $3.5\times10^4/\mu g$, 达到最高转化率, 再增加电场强度, 则由于细胞存活率下降, 其转化率也下降, 见图 4。

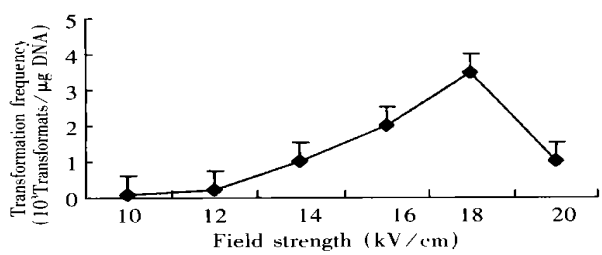


图 4　电场强度对转化率的影响

Fig 4　Effect of electric field strength on the efficiency of transformation rate

3　讨论

本研究选用 pUC-T 载体作为一个中间载体, 将 PCR 产物直接克隆到其上, 不仅具有连接效率高、便于测序(有 M13+/M13−、T7、SP6 等测序引物序列)的优点, 而且还可利用其上丰富的多克隆位点, 巧妙地在目的基因两端接上与表达载体相匹配的双酶切位点, 为下一步的定向克隆做好准备。作者曾尝试在 PCR 引物上直接引入双酶切位点(酶切位点前已加了 3 个保护碱基), 但不知何原因 PCR 产物不能被识别酶切, 导

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

致连接失败。一个可能的原因是酶切位点前的保护碱基存在碱基偏爱性，即有些碱基的构象利于某些酶识别，有些则相反，其中的机制有待进一步探讨。相对而言，采用PUC-T载体不失为一种PCR引物上直接引入酶切位点失败时行之有效的一种方法。

由于本研究中涉及的质粒片段较大（约13.4 kb），其连接及转化的效率都很低，尤其在进行农杆菌的转化时。以往资料认为，电转化优于冻融法或钙离子依赖感受态细胞转化法，简便、转化效率高，可获得较理想的结果。本研究发现，电转化小分子质粒（4 kb）时，其转化效率可达$10^7/\mu g$，而用钙离子依赖感受态细胞转化法，其转化率为$10^6/\mu g$，相差不大；但进行大分子质粒（13.4 kb）转化时，其转化效率（最高为$3.5\times 10^4/\mu g$）明显降低，而用反复冻融法转化法时转化率极低，仅为$10^2/\mu g$。因此，本研究认为进行大分子质粒转化时，采用电转化法为首选途径。同时我们发现，LB培养基加葡萄糖（250 mmol/L）和采用YEB培养基进行农杆菌的培养具有相同的培养效果。

本研究选用植物表达载体进行目的基因的构建，为利用植物作为生物反应器打下基础。与传统的疫苗表达系统如细菌系统、酵母系统和哺乳动物细胞系统相比，植物表达系统生产疫苗有以下的优点[7,8]：①植物的组织、细胞、原生质体均能在离体条件下诱导再生成一个完整的植株，且培养、种植条件简单易成活，可降低成本。②植物表达系统生产的蛋白质疫苗可进行正确加工，保持了自然状态下的免疫原性。③转基因植物生产的疫苗不会感染人体，因而更具有安全性。④转基因植物细胞是可以启动粘膜免疫的有效途径。其机制可能是植物细胞壁给抗原提供了一种生物微囊，后者可保护抗原不被消化道酶所降解，并有缓释作用。⑤植物表达系统生产的疫苗可以直接储存在植物种子和果实中，易于长距离运输和普及推广。⑥转基因植物中的外源基因可通过植物杂交的方式进行基因重组，生产高效的多价口服疫苗。

近年来轮状病毒疫苗的研究策略有两种途径：一种是研制减毒活疫苗，另一种是亚单位疫苗。但其活疫苗的稳定性以及由于病毒毒力回复带来的安全性问题是减毒活疫苗面临的本质上的缺陷，亚单位疫苗的研制策略是运用基因工程方法进行轮状病毒重组多肽疫苗的研究，目前尚没有成功的先例。植物基因转化技术的发展和完善为上述问题的解决提供了可以选择的另一途径。1995年以来开展了以番茄、香蕉生产口服食品疫苗。麻疹病毒抗原、狂犬病毒糖蛋白、天花病毒表面抗原均在番茄中获得成功表达[3~6]。

轮状病毒外壳蛋白VP4是病毒中和反应的主要目标，经胰蛋白酶裂解成蛋白VP5或VP8（P蛋白）两部分，可增强病毒的感染性。由于VP4作为同源抗原具有良好的异源中和抗体，因此以VP4作为抗原基因进行转基因番茄的表达研究，将为研制开发有效的轮状病毒疫苗探索一条新的途径。

参考文献：

[1] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. Second Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1~50.
[2] Hofgen R, Willmitzer L. Storage of competent cells for Agrobacterium transformation[J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16(20): 9 877.
[3] Huang Z, Dry I I, Webster D, *et al*. Plant-derived measles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice[J]. Vaccine, 2001, 19(15-16): 2 163—2 171.
[4] Gil F, Brun A, Wigdorovitz A, *et al*. High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants[J]. FEBS Lett, 2001, 488(1-2): 13—17.
[5] Richter L J, Thanavala Y, Arntzen C J, *et al*. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(11): 1 167—1 171.
[6] Tacket C O, Mason H S, Losonsky G, *et al*. Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes[J]. J Infect Dis, 2000, 182(1): 302—305.
[7] Langridge W H. Edible vaccines[J]. Sci Am, 2000, 283(3): 66—71.
[8] Haq T A, Mason H s, Clements J D, *et al*. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants[J]. Science, 1995, 268(5 211): 714—716.

（编辑 汪勤俭）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)08-0894-01

妊娠合并卵巢两性母细胞瘤扭转破裂1例

A case report of pregnancy complicated with torsive and ruptured gynandroblastoma

王晓峰，夏华琼 （重庆市涪陵中心医院妇产科，重庆 408000）

患者，吴某，27岁，因停经3月下腹疼痛3 h，于2001年1月2日入院。本次月经2000年9月26日，停经后无明显早孕反应，于入院前3 h睡觉中突然觉下腹疼痛，为持续性隐痛，阵发性加剧，以左下腹痛为甚，同时伴头昏、心慌。入院后查体，T 36.8 ℃，P 120次/min，BP 10.5/5.6 kPa，贫血貌，痛苦病容，心肺未发现异常，腹部膨隆，肌紧张，脐下两横指扪及色块，界线不清，妇科检查宫颈软，子宫大小界线不清，盆腔内包块近5月孕大，有压痛、反跳痛、腹肌紧张，B超检查子宫增大3月孕，宫内见完整胎儿图像，有胎心搏动，在子宫的上方见12 cm×7.8 cm×10 cm大小的包块，边界完整，内为低液混合回声。入院后2 h在硬膜外

（下转897页）

作者简介：王晓峰（1955—），女，重庆市涪陵区人，主治医师，主要从事妇产科方面的研究。电话：(023)72223057

收稿日期：2002-03-08；修回日期：2002-06-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net