DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.034
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

文章编号:1000-5404(2001)07-0827-03

论著

人呼吸道合胞病毒M2-1基因原核表达质粒的构建与表达

辛庆红,李继成,陈杭薇,尤兰华 (北京军区总医院呼吸内科,北京 100700)

提 要:目的 构建人呼吸道合胞病毒(hRSV)M2-1基因原核表达质粒载体,使其于原核细胞中表达。方法 利用Hep-2细胞培养hRSV,提取感染细胞总RNA,通过RT-PCR扩增M2-1基因片段。目的片段与质粒pGEX-2T经*EcoR*Ⅰ、*Xho*Ⅰ双酶切后,连接、转化,筛选出阳性克隆。阳性克隆菌经诱导剂诱导后,表达M2-1融合蛋白。结果 成功地构建了M2-1基因原核表达质粒载体,实现了其于原核中的表达。结论 建立了hRSV基因M2-1原核表达载体,为进一步研究hRSV奠定基础。

关键词:人呼吸合道胞病毒;质粒;表达;逆转录聚合酶链反应;原核细胞
中图法分类号:R373.1;R394 文献标识码:A

Construction and expression of human respiratory syncytical virus M2-1 gene plasmid in prokaryotic cells

XIN Qing-hong, LI Ji-cheng, CHEN Hang-wei, YOU Lan-hua (Department of Respiratory Disease, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing 100700, China)

Abstract: Objective To construct human respiratory syncytical virus (hRSV) M2-1 gene vector and then express the vector in prokaryotic cells. Methods Total RNA of hRSV-infected Hep-2 cells was extracted and M2-1 gene fragment was amplified with reverse transcriptase-PCR (RT-PCR). Digested by *EcoR*Ⅰ and *Xho*Ⅰ, the amplified M2-1 fragment and pGEX-2T were ligated and the product was tranfected to prokaryotic cells. The positive cloned bacteria were indentified with PCR and enzyme digestion and then induced by IPTG to express M2-1 gene. Results The prokaryotic expressing plasmid containing hRSV-M2-1 gene was constructed and the target gene was expressed in objective cells. Conclusion The construction of the vector coding for hRSV-M2-1 gene will provide a foundation for further study on hRSV.

Key words: human respiratory syncytial virus; M2-1 gene; vector; expression; RT-PCT; prokaryotic cell

人呼吸道合胞病毒(Human respiratory syncytial virus hRSV)是婴幼儿下呼吸道感染的主要病因[1]。近年hRSV对成人的感染也引起重视,越来越多的证据证明hRSV是老年人及免疫低下病人的重要的感染病原体[2],人的一生中反复感染是常见的事件[3]。国外对hRSV的研究较多,但也仅限于感染方面,国内研究尚少。陈杭薇等从原发性肺癌手术标本中扩增出hRSV N基因片段[4],这一发现提示hRSV与肺癌的发生可能有关系。hRSV M2-1基因是病毒的调控基因,可能对感染的宿主细胞产生影响。本研究拟构建hRSV M2-1基因的原核表达载体,并在原核中成功表达,以便进一步研究hRSV感染与肺癌的关系。

1 材料与方法

1.1 hRSV的培养

Hep-2细胞(由北师大细胞所馈赠)接种到培养瓶中,37 ℃、5% CO_2培养箱中培养,待细胞长满瓶底80%时,取hRSV Long株(首都儿研所馈赠)接种于含有DMEM培养基的培养瓶中,33 ℃、5%CO_2培养箱中培养3~7 d,待80%细胞发生融合后,用细胞刷刮下,用于提取RNA。

1.2 细胞总RNA的提取

采用TRIZOL试剂盒提取细胞总RNA(GIBCO BRL生产),严格按说明书程序操作,RNA加入75%乙醇混合成悬浮液,取少量悬浮液测量RNA含量(D_{260}=0.276, D_{260}/D_{280}=1.9738),剩余-70 ℃保存备用。

1.3 RT-PCR扩增M2-1基因

根据M2基因cDNA序列设计M2-1基因特异性引物,上游为5' TTGGGAATTCATGTCACGAAGGAATCCTGG 3'(黑线标记的为*EcoR*Ⅰ酶切位点),下游为5' GATTATCTCGAGTAACTCTACAACTACTTG3'(黑线标记的为*Xho*Ⅰ酶切位点)。RT-PCR扩增反应体系:RNA 5 μl,10× PCR buffer 2.5 μl,上下游引物各1 μl,dNTP 0.2 μl,酶混合物(RNase 2.25 U,RNasin 8.1 U,Taq酶1 U)1 μl,ddH_2O 14.3 μl,总体积为25 μl,42 ℃ 60 min;94 ℃预变性3 min,然后94 ℃ 1 min,48 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,35个循环,最后72 ℃延伸7 min。

1.4 扩增产物的鉴定

取10 μl RT-PCR产物于2%琼脂糖凝胶中电泳,以标准DNA分子量作标准,在紫外线灯下照相,记录结果。

1.5 RT-PCR产物及质粒酶切

pGEX-2T质粒(由北师大细胞所提供)及目的片段,经*EcoR*Ⅰ、*Xho*Ⅰ(Promega公司产品)双酶切,建立反应体系,利用玻璃毛回收酶切片段,溶于TE液中备用。

1.6 连接反应及重组子的转化

建立如下连接反应,质粒1 μl(0.1 μg),目的片段2 μl(0.4 μg),T_4连接酶1 μl,T_4连接酶buffer 1 μl,ddH_2O 5 μl,总体积10 μl,置16 ℃ 24 h。按文献[5]介绍的方法进行BL-21大肠

基金项目:全军"九五"医药卫生科研基金重点资助项目(98Z061)
作者简介:辛庆红(1965-),男,河北省故城人,硕士研究生,主治医师,主要从事呼吸道感染及肿瘤方面的研究。电话:(0201)7216298044
收稿日期:2000-09-12;修回日期:2001-02-09

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

杆菌感受态细胞的制备及重组子的转化。

1.7 阳性重组子的筛选

1.7.1 利用 PCR 的方法进行初选，取转化出的单个阳性菌落一部分于含有氨苄青霉素的 LB 培养基上划线，用于保存菌种，另一部分加入 25μl 细菌裂解液（50 mmol/ L Tris-HCl、5 mmol/ L EDTA、0.5% NP-40、0.5% Tween），100 ℃煮沸 10 min，12 000 r/ min 5 min，取 5μl 进行 PCR，PCR 反应体系同步骤 1.3，94 ℃预变性 5 min，然后 94 ℃ 1 min，48 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，共 35 个循环，最后 72 ℃延伸 7 min。反应产物于 2%琼脂糖凝胶中电泳，紫外灯下观察结果。

1.7.2 双酶切筛选，将步骤 1.7.1 中阳性菌落摇菌提取质粒，进行 *EcoR* Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶切，紫外灯下观察酶切片段，记录结果。

1.8 阳性重组子 M2-1 基因测序

由宝生物公司完成。

1.9 M2-1 基因蛋白表达的诱导及表达蛋白电泳

取阳性菌落接种于 5 ml LB 培养基中，200 r/ min、37 ℃摇床摇动 5 h 后，加入诱导剂异丙基硫代-β-D-半乳糖苷（IPTG，终浓度为 0.1 mmol/ L），继续培养过夜。取诱导菌 1.5 ml 于 EP 管中，4 000 r/ min 离心，弃上清，向管中加入 PBS 重悬洗涤细菌一次，离心沉淀细菌，弃上清。向管中加入 2× 加样缓冲液 50μl（100 mmol/ L Tris-HCl，100 mmol/ L DDT，4% SDS，0.2%溴酚兰，10%甘油）及 50μl PBS，100 ℃水浴 10 min，置冰上 2 min，10 000 r/ min 10 min 离心，取上清 20μl 于 12%丙烯酰胺凝胶中电泳，标准蛋白分子量做对照，考马斯亮蓝染色，脱色液脱色，日光灯下观察，记录结果。

2 结果

2.1 hRSV 培养及细胞总 RNA 电泳

用 Hep-2 细胞培养 hRSV，3 d 后可见少量融合细胞，5 d 后可见大部分发生融合。提取细胞总 RNA 后，琼脂糖电泳，可见 RNA 宽带。

2.2 RT-RCR 扩增 M2-1 基因片段

可见清晰条带，片段大小为 620 bp，阴性对照未见特异性片段，见图 1。

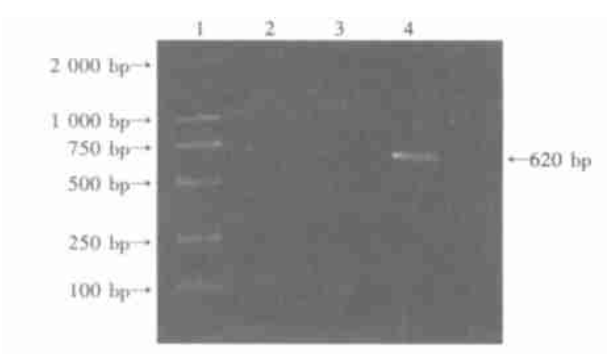


图 1 hRSV M2-1 基因 RT-PCR

Fig 1 hRSV M2-1 gene amplification by RT-PCR

1: DL2000 DNA marker; 2: H_2O blank control; 3: Normal Hep-2 cell control; 4: M2-1 gene fragment amplified by RT-PCR

2.3 阳性重组子的筛选

阳性质粒经过双酶切后，可见 620 bp 大小的片段，见图 2。

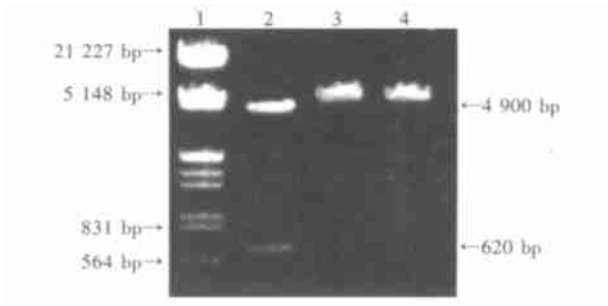


图 2 重组 pGEX-2T M2-1 基因的酶切鉴定

Fig 2 Identification of recombinant by enzyme digestion

1: λ/ *EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ DNA marker; 2: Recombinant M2-1 pGEX-2T vector digestion by *EcoR* Ⅰ and *Xho* Ⅰ; 3, 4: Recombinant M2-1 pGEX-2T vector digestion by *EcoR* Ⅰ and *Xho* Ⅰ

2.4 M2-1 基因测序

从 3′ 端测序，共测 540 bp，与基因库中 hRSV M2-1 基因对比发现有 23 个密码子发生突变，其中 16 个密码子为同义突变，7 个密码子为点突变，见图 3。

1	TTTTCACCGT CATCACCGAA ACGCGCGAGG CAGATCGTCA GTCAGTCACG
51	ATGAATTGCT CGAGTAACTC TACAACTACT TGTTATTACT ATGCAAGTTA
101	TACTACAAGG ATATTTGTCA GGTAGTATCA TTATTTTTGG CATGGTCATT
151	TGTATCACTA ACAGTTAATT CTTTTGGGTT GTTGATGGTT ATGCTCTTGT
201	GGATATCCAA TGTGTTTTTG ATGGTTTTCT TCAATACGTC TGCTGGCAAT
251	CTTTTTAACA GATGGATAGT TTGTTTATTG TTTTTCCTGT TGCTTTCAAT
301	ATATGATATG ACAGTATTGT ACACTCTTAT CTTGGGTGAA TTTAGCTCTT
351	CATTGTCTCT CAGTTTTTTG ATATCATCAC TATTGAGTTC AGTGAGGAGT
401	TTGCTCATGG CAACACATGC TGATTGTTTA GTTATATTAT TTATTGATCC
451	TATATAACTC TCTAGCACTC CAACTACACC AAGAGCATAC TCTTCTGTTC
501	TGTCCAACTC TGCAGCTCCA CTTATTTCTG ATAAGGTATC TATACTTTTA
551	TCCATAGACT TAAGTATTCT GTTTAACATA AAGTTTTTGTC TTACGACGAG
601	TGCATGGGGT GGCCATTCAA AATAATTATG ACTAAAATGA CATCTCTTAC

图 3 M2-1 基因测序图（3′-5′反义链 540 bp）

Fig 3 M2-1 gene sequence (3′-5′ antisense strand 540 bp)

2.5 融合蛋白电泳

筛选出的阳性重组子经过诱导剂的诱导，融合蛋白电泳可见 48× 10^3 的条带，见图 4。

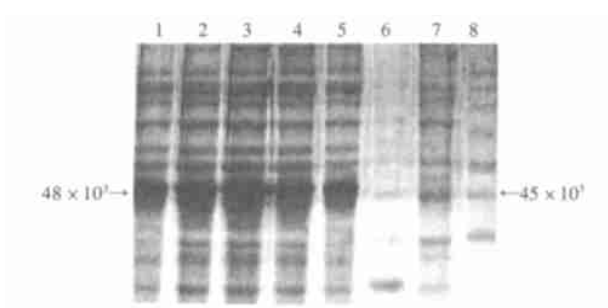


图 4 M2-1 基因融合蛋白的表达

Fig 4 Expression of hRSV M2-1 gene fusion protein in *E. coli* BL-21 cells

1—5: Expressio of hRSV M2-1 gene fusion protein in *E. coli* BL-21 cells; 6: Control of recobinant pGEX-2T protein expression in *E. coli* cells; 7: Control of normal *E. coli* BL-21 protein expression; 8: Standard protein molecular weight marker

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

3　讨论

国外对 RSV 的研究较深入, M2-1 基因的克隆及表达载体的构建均有报道, 国内这方面研究尚未见报道。本研究利用 RT-PCR 的方法克隆出 M2-1 基因完整的阅读框片段, 利用定向连接的方法构建了原核表达载体, 通过 PCR 和酶切的方法确定载体与目的基因连接成功, 重组的载体转化至 BL-21 大肠杆菌中, 经过 IPTG 诱导, 蛋白电泳可见特异性的融合蛋白, 证明 M2-1 融合蛋白在原核中表达成功。

利用 RT-PCR 扩增 M2-1 基因的关键环节是要有足够的 hRSV mRNA 模板, 以往的方法是从病毒培养液中沉淀 hRSV, 然后再提取 mRNA, 需要病毒培养液量较大, 步骤繁琐, 设备昂贵。我们参考文献[6] 并改进了获取 RSV mRNA 的方法, 摒弃了病毒培养液, 直接从 hRSV 培养细胞中提取细胞总 RNA, 方法简单, 经济, 材料容易获得。为了获得高丰度的 hRSV mRNA, 接种时 Hep-2 细胞的状态很重要, 细胞最好处于对数生长期。收获细胞时应把握时机, 接种 hRSV 后, 观察细胞形态第 1 天没有明显变化, 第 3 天可见少量细胞发生融合, 第 5 天约 80%的细胞发生融合, 第 7 天可见很多细胞死亡, 我们分别于第 1、3、5、7 提取细胞总 RNA, 取同量 RNA 作模板进行 RT-PCR, 第 1 天标本没有扩增出 M2-1 基因片段, 第 3 天扩增的量较少, 第 5 天扩增量较大, 第 7 天扩增量有下降, 感染第 1～3 天病毒繁殖最活跃, 但病毒拷贝数少, 感染第 7 天很多细胞死亡, 大量的病毒进入培养液中, 由此可见, 当大部分细胞发生典型融合病变时收获细胞是获得高丰度 hRSV mRNA 的最佳时机。

为了保证 M2-1 基因阅读框完整, 上游引物是从起始密码子开始的一段 M2-1 基因序列, 下游引物设计在 M2-1 基因终止密码子的下游, 这样翻译的 M2-1 基因蛋白具有完整性。上游引物 5′端连接 *EcoR* Ⅰ 酶切位点, 下游引物 5′端连接 *Xho* Ⅰ 酶切位点, 这样 M2-1 于载体可以进行定向连接, 与平端连接相比省去鉴定连接方向的麻烦。我们采用 PCR 筛选 DNA 文库的方法来筛选阳性重组子[7], 省时、筛选量大, PCR 筛选阳性的重组子再进行酶切鉴定, 双重筛选鉴定的方法确保了阳性重组子的连接成功。

pGEX-2T 启动子与克隆位点之间连接着谷光甘肽-S转移酶(GST)基因阅读框, M2-1 基因位于 GST 下游, 因此表达的 M2-1 蛋白是一种融合蛋白, 这种蛋白不易被大肠杆菌的酶破坏, 具有高度的稳定性, 并且利用亲和层析方法很容易纯化。

RSV Long 株是 50 年代分离出来的病毒株, 经历了近 50 年的传代培养, 通过测序发现 M2-1 基因有 23 个密码子突变, 其中 16 个密码子突变碱基位于第 3 位上, 这样的突变不改变翻译的氨基酸, 7 个密码子突变碱基位于第 2 位上, 其翻译的氨基酸将发生改变, 尽管如此, M2-1 基因仍具有高度保守性。

M2-1 基因表达载体的构建及其蛋白的表达具有理论和实际意义: ①利用 RT-PCR 方法成功地克隆出 M2-1 基因, 而且 M2-1 基因具有高度保守性, 将此用于临床检测具有现实意义。②hRSV 与肿瘤的关系国外尚未见报道, hRSV M2-1 原核表达载体的构建为其真核载体构建以及进一步研究 hRSV 与肺癌的关系奠定实验基础。③hRSV 感染对人类威胁很大, 人们一直努力寻求高效安全的疫苗, 尽管疫苗的研究技术和方法有了长足的发展, 已经制备了多种类型的疫苗如基因重组疫苗、hRSVcDNA 疫苗、F 或 G 抗原表位多肽疫苗等, 但并没有重大突破, 临床上没有得到实际的应用。目前 hRSV 的被动免疫仍是其它方法不能代替的治疗手段。M2-1 基因载体构建和蛋白表达, 能否用于疫苗免疫和被动免疫研究, 值得进一步探讨。④M2-1 基因蛋白对 hRSV 转录连续通读起着重要作用, 但其作用机制尚不清楚, 构建 M2-1 表达载体有助于研究 M2-1 蛋白的作用机制。

参考文献:

[1] Crowe J E Jr. Immune responses of infants to infection with repiratory viruses and live attenuated respiratory viruses candidate vaccines[J]. Vaccine, 1998, 16(14—15): 1 423—1 432.

[2] Fleming D M, Cross K W. Respiratory syncytial virus or influenza[J]? Lancet, 1993, 342(8 886-8 887): 1 507—1 510.

[3] Aslan T, Fassas A B, Desikan R, *et al*. Patients with mutiple myeloma may safely undergo untologous transplantation despite ongoing RSV infection and no ribavirin therapy[J]. Bone Marrow Transplant, 1999, 24(5): 505—509.

[4] 陈杭薇, 邬光惠, 周　景, 等. 肺癌呼吸道合胞病毒感染与 K-ras 基因突变的研究[J]. 诊断病理学杂志, 2000, 7(1): 50.

[5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 主编. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1999. 42—48.

[6] Van Milaan A J, Sprenger M J, Rothbarth P H, *et al*. Detection of respiratory syncytial virus by RNA-polymerase chain reaction and differentiation of subgroup with oligonucleotide probes[J]. J Med Virol, 1994, 44(1): 80—87.

[7] CW 迪芬巴赫, GS 德维克斯勒, 主编. PCR 实用指南[M]. 黄培堂, 余炜源, 陈添弥, 等译. 北京: 科学出版社, 1997. 321—326.

(编辑　郭建秀)

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