

人巨细胞病毒 cDNA 文库的构建、鉴定及 pp65 阳性克隆筛选*

韩俊** 李艳秋 姜永中 余莉 王明丽***

(安徽医科大学微生物学教研室 合肥 230032)

摘要:为进一步进行人巨细胞病毒(HCMV)后基因组功能的研究,以及为疫苗分子和早期诊断试剂的研制提供有效工具,从HCMV AD169株感染96h的HF细胞中提取HCMV的mRNA,逆转录合成cDNA片段,重组入 λ gt11 EcoR I酶切位点之间,包装蛋白包装,构建HCMV AD169株基因组cDNA表达文库。结果表明,初始HCMV cDNA文库容量为 3.6×10^6 ,重组率为96%;HCMV鼠多克隆抗血清筛选出168个HCMV阳性克隆;地高辛标记pp65特异性寡核苷酸探针原位噬斑杂交筛选出34个pp65阳性克隆,再经PCR扩增,筛选出2个pp65阳性克隆;pp65 PCR扩增产物进一步被Southern blotting证实;3'端测序比较,同源性为98%。为进一步克隆、表达该基因及其产物功能研究奠定基础。

关键词:人巨细胞病毒, pp65, cDNA 表达文库

中图分类号: R373 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 02-0087-04

CONSTRUCTION AND IDENTIFICATION OF HCMV cDNA EXPRESSING LIBRARY AND SCREENING OF pp65 POSITIVE CLONES

HAN Jun LI Yan-Qiu JIANG Yong-Zhong YU Li WANG Ming-Li

(Department of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract: In order to provide effective tool for further studying of the function of HCMV genome, developing of molecular vaccine and diagnostic reagents. Extraction of HCMV mRNA from HF cell infected by HCMV AD169 strain for 96h was reverse transcribed into cDNA, then was cloned into EcoR I-digested lambda gt11. HCMV AD169 strain cDNA expressing library has been constructed after packaging. The volume and the recombination rate of the prime cDNA expressing libraries was 3.6×10^6 and 96%, 168 positive clones of HCMV were screened by immune blotting with anti-HCMV mouse convalescent sera, 34 positive clones were obtained by dot nucleic acid hybridization with DIG-labeled HCMV pp65 gene probe. 2 positive clones were amplified by HCMV pp65 all length primer. The PCR product has been tested by southern-blotting. The PCR product was sequenced and was taken as homology comparison by DNASIS software, and the homology is 98%. To lay the foundation of further cloning, expressing the pp65 gene, further studying of the function of the pp65 product.

Key words: Human cytomegalovirus, pp65, cDNA expressing library

HCMV 为疱疹病毒科 β 属的双股线形 DNA 病毒,人群感染极为普遍。HCMV 与宿主细胞之间相互作用可导致生产性感染、潜伏感染和引起细胞转化。生产性感染是由病毒复制所致,而潜伏感染和细胞转化的具体致病机制至今仍未完全清楚。尽管已知该病毒的全基因组序列^[1],但对病毒基因组编码蛋白质功能、调控等尚未完全了解,大大限制了抗 HCMV 药物、疫苗及诊断方法的进一步发展。

* 安徽省“十五”生物医药重大科技攻关专项课题基金项目 (No.01303003)

** 现在中国预防科学院病毒研究所攻读博士学位

*** 联系人 E-mail: Wangmli@mail.hf.ah.cn, 电话: 0551-5123422

收稿日期: 2003-03-17, 修回日期: 2003-06-05

为进一步进行 HCMV 后基因组功能的研究, 研制分子疫苗和早期诊断试剂, 我们构建了 HCMV AD169 株的表达型 cDNA 文库; 并且从文库中筛选出 pp65 阳性克隆, 为进一步克隆、表达该基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

HCMV 多克隆抗血清由本室自制, 荧光抗体效价为 1; 地高辛标记和检测试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司; QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kit, TimeSaver™ cDNA Synthesis Kit 购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司; Packagene Lambda DNA packing system 购自 Promega 公司。

1.2 细胞

人成纤维细胞 (HF) 制备, 参照文献[2]。

1.3 病毒

病毒的噬斑纯化, 参照文献[3]。

1.4 HCMV AD169 株 cDNA 文库构建

MOI = 10 纯化的 HCMV 悬液感染 HF 细胞, 当 CPE “+ + ~ + + +” 时, 收集细胞, 加入含异硫氰酸胍提取缓冲液, 室温下充分匀浆; Oligo (dT) - 纤维素亲和层析柱收集 mRNA, 紫外分光光度计测定 OD_{260} 和 OD_{280} ; 以提取的 mRNA 为模板合成 cDNA 第一链和第二链, 加上粘性末端, 通过 T4 DNA 连接酶与 λ gt11 臂连接过夜; 22℃ 包装 3h。

1.5 HCMV AD169 株 cDNA 文库鉴定

1.5.1 初始文库滴度和容量的测定: 用噬菌体稀释液将 1μL 原始库液作 1:10、1:100、1:1,000、1:10,000 稀释, 分别加入 100μL Y1090 过夜培养物中, 于 37℃ 保温 30min, 加顶层琼脂迅速混匀, 铺于 LB 平板上, 37℃ 倒置培养 6 ~ 18h, 根据下列公式计算滴度, 取其平均值, 滴度 (pfu/mL) = 噬斑数 × 稀释倍数 × 10^3 /铺平板的稀释噬菌体 μL 数。计算库容量的公式为: 文库的容量 = 滴度 × 体积。

1.5.2 初始文库重组率的测定及重组子克隆的挑取: 按 1.5.1 方法制备梯度稀释噬菌体和 Y1090 细菌的混合物, 将此混合物加入 X-gal 和 IPTG, 并加入顶层琼脂迅速混匀铺平板, 37℃ 倒置培养过夜, 次日计数蓝白斑的比例, 计算文库的重组率。并挑取无色噬斑, 经复筛后点印硝酸纤维素膜。

1.6 免疫学筛选

将噬斑点印的硝酸纤维素膜置于含 20% 小牛血清的封闭液; 加一抗 (纯化 HCMV 鼠多抗); 加二抗 (HRP 标记的羊抗鼠 IgG); DAB 显色。

1.7 原位杂交筛选

按地高辛标记和检测试剂盒说明书操作。HCMV pp65 寡核苷酸探针片段序列及位置参考文献[4]设计, 序列为 5'ctt cct gga ggt aca agc cat acg cga3', 位点为 1318 ~ 1348 核苷酸。

1.8 阳性 λ 噬菌体 DNA 的提取及 HCMV pp65 全长 PCR 扩增

取上述阳性 λ 噬菌体, 加 100μL Y1090 细菌 ($A_{600} = 0.6$), 大量扩增, 10% PEG6000 冰浴过夜, 16,000 r/min × 2h, 弃上清; 加蛋白酶 K 终浓度为 50μg/mL, 56℃ 作用 1h; 常规酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 抽提两次; 取抽提的 DNA 5μL, 加入 HCMV pp65 全长寡核苷酸引物 (上游 5'ggg aat cca tgg agt cgc gcg gtc gcc gtt g3', 下游 5'gga agc ttt caa cct cgg

tgc ttg ggc g3') 各 2 μ L, 以 94 $^{\circ}$ C 预变性 10min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2min 在 PCR 仪上作用 35 个循环。

1.9 Southern blotting

pp65 全长 PCR 产物及 HSV-1 DNA *Eco*R I 酶切片段在 6% 聚丙烯酰胺-尿素变性胶 (7mol/L) 100V 电泳 2h, 在 Tris-甘氨酸缓冲液中 200mA 转印至硝酸纤维素膜上, 其余步骤及探针制备同原位杂交。

1.10 pp65 阳性克隆的 3' 端 DNA 序列测定及同源性分析

pp65 PCR 扩增产物经 DNA 自动测序仪进行 3' 测序, 并将序列送 GenBank, 利用 DNASIS 软件作序列同源性比较。

2 结 果

2.1 HCMV mRNA 含量的测定

$A_{260}/A_{280} = 1.94$, mRNA 的含量为 $A_{260} = 0.64 \times 40\mu\text{g/mL} = 25.6\mu\text{g}$ 。

2.2 HCMV 库容量的测定和重组率的计算

根据以 1:10, 1:100 等不同稀释度平板上的噬菌斑数计算文库的容量为 3.6×10^6 重组子。根据蓝白斑筛选计算重组率为 96%。

2.3 免疫学检测与核酸杂交筛选结果

免疫学筛选出 168 个可能的 HCMV 阳性克隆 (图 1), 在此基础上 pp65 核酸探针杂交筛选出 34 个 pp65 阳性克隆 (图 2)。

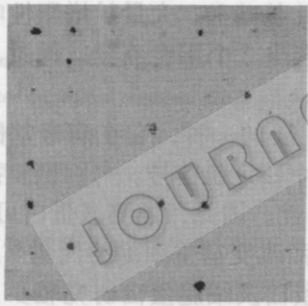


图 1 HCMV 多克隆抗血清筛选结果

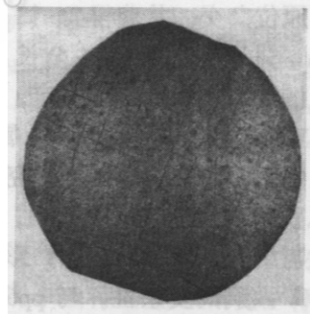


图 2 HCMV pp65 探针筛选结果

2.4 pp65 阳性克隆 PCR 扩增结果及 Southern blotting 结果

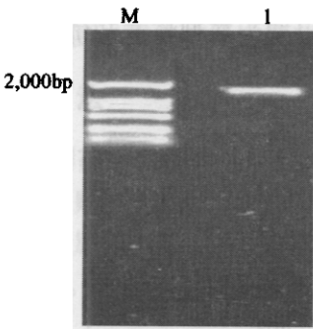


图 3 HCMV pp65 cDNA 阳性克隆 PCR 扩增产物
M 标准分子量标准,
1 重组噬菌体 DNA 扩增片段 (约 1.7kb)

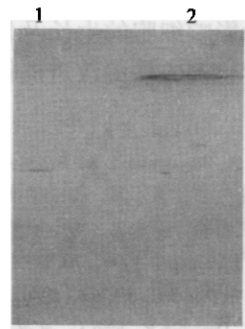


图 4 Southern blotting 结果
1 HSV-1 DNA *Eco*RI 酶切片段,
2 pp65 全长 PCR 产物

阳性克隆进行 PCR 扩增, 筛出 2 个阳性克隆出现应有的特异性条带, 片段大小为 1.7kb, (图 3)。硝酸纤维素膜上有一明显的紫兰色条带 (图 4), 而 HSV-1 DNA *EcoR* I 酶切片段没有反应条带。

2.5 测序结果

3' 端测序鉴定, 与 GenBank 比较, 同源率为 98%。pp65 于 486aa 处发生点突变, 由脯氨酸变为甘氨酸 (P486A), GenBank 接受号 (accession number) 为 AY301013。

3 讨论

Martinez 等^[5]在 1986 年构建了 HCMV AD169 株 cDNA 文库, 此后, 不少学者在此基础上做了大量的工作。但国内尚未见报道。而进行 HCMV 后基因组学研究的关键是高质量 cDNA 文库的构建。

HCMV DNA 的合成经历两个顶峰, 发生在感染后 18~24h 和 60~80h, 所以我们采用经噬斑纯化的 HCMV (MOI=10) 感染 1×10^5 HF 细胞 96h 提取的总 RNA, 采用 Quick-PrepTM Micro mRNA Purification Kit 快速分离 mRNA 无需纯化总 RNA 的中间步骤, mRNA 的得率为 25.6 μ g。文库的容量、重组率是鉴定 cDNA 文库质量的重要指标, 本文库的容量为 3.6×10^6 重组子, 蓝白斑筛选初步提示重组率为 96%, 可满足从文库中筛选稀有基因的需要。

在筛库的过程中, 我们采取不断缩小筛选范围, 试验方法从易到难的策略, 大大节约了工作量, 并保证结果的可靠性。首先运用免疫学筛选出 168 个 HCMV 阳性克隆, 继而采用原位杂交, 共获得 34 个 pp65 阳性克隆; 在此基础上, 大量扩增阳性噬菌体, 提取 DNA, 进行 HCMV pp65 全长片段的扩增, 共筛选出 2 个阳性克隆, 通过 Southern blotting 及测序对产物进行了鉴定, 获得了预期结果。

HCMV 的晚期结构抗原 pp65 属于被膜蛋白中最主要的一种, 它在病毒基因调节, 复制过程中起着重要的作用。研究表明: pp65 具有 2 个核定位信号, 与细胞膜接触后, pp65 可以快速进入受染细胞核内, 发挥其蛋白激酶活性。因此, 推测该蛋白可能在磷酸化后参与细胞染色质的缩合, 影响细胞分裂全程从而改变宿主细胞的代谢^[6]。但是, 鉴于 HCMV 致病的复杂性, 与 pp65 相互作用的病毒蛋白及细胞蛋白研究较少, 因此, 我们从 cDNA 文库筛选 pp65 阳性克隆, 继而定向克隆至载体, 进行克隆表达及其产物功能的研究。

在此平台上我们可以筛选更多的基因, 从而研究 HCMV 基因及其产物与宿主细胞相互作用, 影响细胞的生长及发育的过程及机制; 以期为新型疫苗和抗病毒药物的研制及血清学检测方法的改进提供了新的思路和研究手段。

参考文献

- [1] Sissons J G P, Borysiewicz L K, Rodgers B, *et al.* *Immuno Today*, 1986, 2 (7): 57~61.
- [2] 王明丽, 唐久来, 胡 闻, 等. *动物学报*, 2000, 46 (2): 167~174.
- [3] 韩 俊, 王明丽, 姜永忠, 等. *安徽医科大学学报*, 2001, 36 (4): 257~259.
- [4] Plota D M. *J Virology*, 1996, 70 (4): 2086~2094.
- [5] Martinez J, St Jeor S C. *J Virol*, 1986, 60 (2): 531~538.
- [6] Schmolke S, Drescher P, Jahn G, *et al.* *J Virol*, 1995, 69 (2): 1071~1078.