张二芹,张东林,马 强. 狂犬病病毒 N 基因植物表达载体的构建[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):32 - 33.

狂犬病病毒 *N* 基因植物表达载体的构建

张二芹[1], 张东林[1], 马 强[2]

(1. 南阳师范学院生命科学与技术学院,河南南阳 473061; 2. 河南省农业科学院畜牧兽医研究所,河南郑州 450002)

摘要:以提取的狂犬病病毒总 RNA 为模板,以 N1 和 N2 为引物,反转录为 cDNA,然后再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,将 PCR 产物克隆至质粒 pMD18 - T 中,获得重组质粒 pMD18 - T - *N*,采用 *Hin*dⅢ和 *Bam*HⅠ双酶切法及 PCR 确认正确后,利用 pMD18 - T - *N* 重组质粒为模板,以 N3 和 N4 为引物,成功构建了重组植物表达载体 pBI121 - *N*。

关键词:狂犬病病毒;*N* 基因;植物表达载体 pBI121 - *N*

中图分类号: S852.65^{+}5 **文献标志码:** A **文章编号:**1002 - 1302(2013)12 - 0032 - 02

狂犬病[1-4](Rabies)是由狂犬病病毒(Rabies virus,RV)引起的一种人畜共患的急性中枢神经系统传染病。临床的主要特征为恐水、怕风、咽肌痉挛、流涎、进行性瘫痪,最后因呼吸、循环衰竭而死亡。根据临床表现特点分为狂躁型(脑炎型)和麻痹型(静型)。

狂犬病病毒属弹状病毒科(Rhabdoviridae),狂犬病病毒属(*Lyssavirus*)。狂犬病病毒是 RNA 病毒,病毒颗粒由脂质双层外膜、基因组 RNA 和核蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、G 蛋白(G)和大转录蛋白(L)组成。人和动物感染后,一旦发病,死亡率几乎 100%,严重威胁着人类和动物的生命安全。目前国内主要采用灭活苗和活疫苗等预防为主,但这些预防方法都具有不同免疫劣势。转基因植物疫苗具有生产成本低、易保存及使用方便等特点[5-10]。狂犬病病毒颗粒核蛋白是一种保护性抗原。因此本试验将核蛋白基因与植物表达载体连接,转化到农杆菌中,为今后制备转基因植物疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*E. coli*)DH5α、农杆菌 EHA105,pBI121 植物表达载体由本实验室保存。pMD18 - T 克隆载体购于 TaKaRa 生物工程公司。

收稿日期:2013 - 04 - 15

基金项目:南阳师范学院校级科研项目(编号:nytc2006k52)。

作者简介:张二芹(1976—),女,河南焦作人,博士,副教授,主要从事动物分子病毒学及疫苗的研究。E - mail:zhangerqin76@163.com。

1.2 PCR 引物

用于核蛋白抗原基因(*N*)cDNA PCR 扩增的引物为 N1:5′ - ATGGATGCCGACAAGATTG - 3′和 N2:5′ - TTATGAGTCATTCGAATACG - 3′。

用于核蛋白抗原基因(*N*)植物表达载体构建的引物为 N3:5′ - CCGGATCCACCATGGATGGATGCCGACAAGATTG - 3′,含 *Bam*HⅠ酶切位点和 Kozak 序列;N4:5′ - CCGAGCTCTCATAGCTCATCTTTCTCAGATTATGAGTCATTCGAATACG - 3′,含 *Sac*Ⅰ酶切位点和 SEKDEL 序列。

1.3 酶和试剂

*Hin*dⅢ、*Bam*H、*Sac*、T_4 DNA ligase 购自 TaKaRa 生物工程公司。PCR Master 系统为 TaKaRa 公司产品。其他试剂均为国产分析纯或试剂纯。

1.4 核蛋白抗原基因(*N*)cDNA 的 PCR 扩增

以 N1 和 N2 为引物,Trizol 方法提取总 RNA,以总 RNA 为模板反转录为 cDNA,然后再以 cDNA 为模板进行 RT - PCR 扩增。反应条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 1 min,52 ℃ 退火 1 min,72 ℃延伸 80 s,30 个循环,72 ℃延伸 10 min。

1.5 核蛋白抗原基因(*N*)cDNA 的 PCR 产物的连接转化

由于 PCR 产物的 3′端多了一个不依赖于模板组成的脱氧核苷酸 A,所以利用 T - A 互补原理将 PCR 产物与 pMD18 - T 载体连接,将 PCR 产物用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收,然后用 T4 DNA 连接酶连接,最后将连接产物转化大肠杆菌 DH5α。

1.6 pMD18 - T - *N* 重组质粒的筛选与鉴定

挑取若干个转化子,分别于 6 mL LB 液体培养基中培养 12 ~ 16 h,碱裂解法抽提质粒后经 1% 凝胶电泳,根据 DNA 分子量的大小,初步筛选阳性质粒;然后取初步筛选的阳性质粒

[23] Jackson T, Ellard F M, Ghazaleh R A, et al. Efficient infection of cells in culture by type O foot - and - mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate[J]. Virology, 1996, 70(8):5282 - 5287.

[24] Heinz B A, Vance L M. Sequence determinants of 3A - mediated resistance to enviroxime in rhinoviruses and enteroviruses[J]. Virology, 1996, 70(7):4854 - 4857.

[25] Lama J, Sanz M A, Carrasco L. Genetic analysis of poliovirus protein 3A:characterization of a non - cytopathic mutant virus defective in killing Vero cells[J]. The Journal of General Virology, 1998, 79(8):1911 - 1921.

[26] Giraudo A T, Beck E, Strebel K, et al. Identification of a nucleotide deletion in parts of polypeptide 3A in two Independent attenuated aphthovirus strains[J]. Virology, 1990, 177(2):780 - 783.

[27] Hemadri D, Tosh C, Sanyal A, et al. Emergence of a new strain of type O foot - and - mouth disease virus:its phylogenetic and evolutionary relationship with the PanAsia pandemic strain[J]. Virus Genes, 2002, 25(1):23 - 34.

进行 *Bam*HⅠ和 *Sac*Ⅰ双酶切，1% 的琼脂糖凝胶电泳分析，进一步筛选阳性质粒；最后将重组质粒进行 PCR 反应，比较 PCR 产物与酶切产物的大小。

1.7　*N* 基因在农杆菌 EHA105 中的克隆

以 pMD18 – T – *N* 为模板，N3 和 N4 为引物，进行 PCR 扩增。反应条件：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 1 min，52 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 80 s，30 个循环；72 ℃延伸 10 min，电泳鉴定。其次将植物表达载体 pBI121 和 N 基因 PCR 产物分别利用限制性内切酶 *Bam*HⅠ和 *Sac*Ⅰ进行酶切。然后利用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒将酶切后的 *N* 基因及 pBI121 载体回收，用 T4 DNA 连接试剂盒连接，16 ℃连接过夜；连接产物经冻融法转化根癌农杆菌 EHA105，液氮中放置 1 min，37 ℃水浴 5 min，28 ℃摇床培养 4 h 后，最后将农杆菌涂于 LB 培养基板（50 μg/mL kan）上，48 ~ 72 h 后观察。

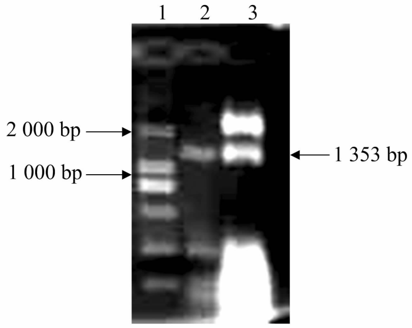
1.8　重组植物表达载体 pBI121 – *N* 的筛选与鉴定

挑若干个转化子，接种在 6 mL LB 液体培养基（50 μg/mL kan）中，28 ℃培养 16 ~ 20 h，碱裂解法抽提质粒后经 1% 凝胶电泳，根据 DNA 分子量的大小，初步筛选阳性质粒，最后用 *Bam*HⅠ和 *Sac*Ⅰ酶切，PCR 鉴定和测序分析。

2　结果

2.1　*N* 基因 cDNA 的 PCR 扩增及 pMD18 – T – *N* 重组质粒的酶切鉴定

用天根生物有限公司 RNA 提取试剂盒提取狂犬病病毒的总 RNA，反转录为 cDNA；再以 cDNA 为模板，PCR 扩增 *N* 基因，纯化回收，与 pMD18 – T 连接，转化到 *E. coli* DH5α 中。碱裂解法提取重组质粒，最后用 *Hin*dⅢ和 *Bam*HⅠ酶酶切鉴定。结果如图 1。



1—DNA marker DL2000；2—*N*基因cDNA的PCR产物；3—pMD18T-*N* 酶切产物

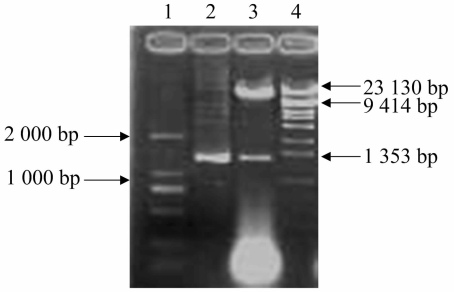
图1　*N* 基因 cDNA 的 PCR 扩增及克隆载体酶切鉴定

2.2　重组植物表达载体 pBI121 – *N* 的酶切鉴定

以 pMD18T – *N* 为模板，以 N3 和 N4 为引物，扩增 *N* 基因的 PCR 产物。用 *Bam*HⅠ和 *sac*Ⅰ分别酶切 *N* 基因和 pBI121 植物表达载体，回收、连接，冻融法转化到农杆菌 EHA105 中。以碱裂解法少量提取重组质粒 pBI121 – *N*，然后用 *Bam*HⅠ和 *Sac*Ⅰ进行酶切，用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳，其结果如图 2。

2.3　序列测定

以纯化的 pBI121 – *N* 重组质粒为模板，用特异引物进行序列测定，结果表明插入的片段与预期设计完全相吻合，阅读框架正确，从而进一步确定了表达重组表达质粒构建的正确。



1—DNA marker DL2000；2—*N*基因的PCR产物；3—重组质粒pBI121-*N* 的酶切产物；4—DNA marker λ/*Hin*dⅢ

图2　*N* 基因 PCR 扩增及重组植物表达载体 pBI121-*N* 酶切鉴定

3　讨论

狂犬病（Rabies）又称恐水症，是由狂犬病病毒（Rabies virus，RV）引起的一种人畜共患的急性中枢神经系统传染病。人和动物感染后，一旦发病，死亡率几乎 100%，严重威胁着人类和动物的生命安全。因此该病以预防为主，但是需注射疫苗 5 次，比较繁琐。1992 年 Mason[9] 提出了转基因植物疫苗（可食性疫苗）的概念，即利用分子生物学技术把外源基因导入到植物细胞中，在植物中能够大量表达外源基因的一种生物技术。目前口蹄疫病毒、轮状病毒和乙肝病毒的抗原基因已转化到植物中并获得表达，表达的蛋白质具有一定的免疫效果。由于植物疫苗具有免疫活性好、生产制备容易、价格低以及适于口服等优点，因此转基因植物疫苗将是狂犬病疫苗的一个研究方向。本研究构建了狂犬病病毒 *N* 基因的表达载体，为转基因狂犬病植物疫苗的研制奠定了基础。

参考文献：

[1]殷　震，刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京：科学出版社，2000：65 – 66.

[2]赵云蛟，钱爱东. 狂犬病病毒全基因组进化研究进展[J]. 动物医学进展，2009，30（11）：83 – 86.

[3]李　影. 狂犬病病毒核蛋白序列测定与分析比较[D]. 长春：吉林农业大学，2003.

[4]于翔翔，谭有将，姚文荣，等. 狂犬病毒核蛋白在昆虫细胞中的表达及免疫原性的研究[J]. 西南师范大学学报：自然科学版，2009，34（5）：107 – 110.

[5]Schuyler S K. Targeting and expression of antigenic proteins in transgenic plants for production of edible oral vaccines[J]. *In Vitro* Cellular&Development Biology，2002，38（3）：231 – 236.

[6]Twyman R M，Stoger E，Schillberg S，et al. Molecular farming in plants：host systems and expression technology[J]. Trends in Biotechnology，2003，21（12）：570 – 578.

[7]Sala F，Manuela R M，Barbante A，et al. Vaccine antigen production in transgenic plants：strategies，gene constructs and perspectives[J]. Vaccine，2003，21（7 – 8）：803 – 808.

[8]张二芹，李世访，钱爱东，等. 转猪轮状病毒 *VP6* 基因烟草植株的获得[J]. 中国兽医学报，2006，26（2）：173 – 174.

[9]张二芹，王会岩，张同旭. 外源基因在转基因植物中表达量的优化研究进展[J]. 河南农业科学，2008（1）：8 – 12.

[10]张二芹，王　云，高婉丽，等. 转猪轮状病毒 *VP6* 基因烟草的杂交检测[J]. 河南农业科学，2008（8）：130 – 132.