

文章编号 :1009-038X(2002)02-0187-04

生长抑素 pcDNA3s/SS 质粒的构建与鉴定

刘建文¹, 乐国伟¹, 施用晖¹, 王志军¹, 汪垣²

(1. 江南大学 食品学院,江苏 无锡 214036 ;2. 中国科学院上海生物化学研究所,上海 200031)

摘 要 :动物生长抑制激素(Somatostatin, SS)基因克隆至含有乙肝表面抗原的 pcDNA3s 质粒载体上,生长抑素基因插入到乙肝表面抗原的 5' 末端,构建生长抑素 DNA 疫苗.经 PCR 反应扩增出含有 SS 和 HBsAg 的融合基因片段,并经测序证实 SS 基因已成功重组到 pcDNA3s 质粒上.

关键词 :生长抑素 ;乙肝表面抗原 ;克隆

中图分类号 :Q 784

文献标识码 :A

Construction and Identification of Somatostatin pcDNA3s/SS Plasmid

LIU Jian-wen¹, LE Guo-wei¹, SHI Yong-hui¹, WANG Zhi-jun¹, WANG Yuan²

(1. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China ;2. Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Science, Shanghai 200031,China)

Abstract :The animal somatostatin(SS,14AA) was cloned into the pcDNA3s vector which contained hepatitis B surface antigen gene(HBsAg gene). The somatostatin gene was inserted at the 5' end of HBsAg gene. Then the somatostatin DNA vaccine was constructed. The fused gene of SS and HBsAg was amplified through PCR. It was approved that the SS gene had been successfully cloned into pcDNA3s vector after sequence examination.

Key words :somatastatin ;HBsAg ;clone

通过调节内分泌系统的激素水平,提高动物生产性能,改善胴体组成,提高肉质和饲料转化率,已成为畜牧业发展的热点和畜牧业生产的增长点.动物体内生长激素(growth hormone, GH)同时受生长激素释放因子(GRF)和生长抑素(Somatostatin, SS)的控制,GRF 促进 GH 分泌,而 SS 抑制 GH 的分泌.将 SS 制成免疫原免疫动物,使其产生 SS 抗体,进而中和体内 SS,提高生长激素水平,可以促进动物生长.

生长抑素是一种抑制动物生长的多肽类激素.SS-14 是 SS 的主要生物活性结构,其分子式为 H-

Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH.天然 SS 呈环状,在 3 位和 14 位半胱氨酸之间有一个二硫键.所有哺乳动物的生长抑素氨基酸序列都相同,没有种属差异.

近年来,国外学者应用 SS 抗血清被动免疫或用化学合成 SS 制成抗原主动免疫,均能使动物体内 SS 水平下降,GH 分泌增多,取得显著的增重效果,但化学合成肽苗成本高,不利于推广^[1,2].国内曾用大肠杆菌表达 SS 基因工程亚单位苗,但产物须经分离纯化,表达产物免疫原性欠佳.徐文忠(1993)将 SS 基因与 HBsAg 基因融合,再插入到痘

收稿日期 2001-09-10 ; 修订日期 2001-12-02.

作者简介:刘建文(1977-),男,福建仙游人,粮食、油脂与植物蛋白工程硕士研究生.

万方数据

苗病毒基因组中,构建 vv-SS/HBsAg 重组疫苗病毒^[3,4].

DNA 疫苗是将编码某种蛋白质抗原的真核重组表达载体直接注射机体,在宿主细胞中表达外源基因,诱导特异性的体液免疫和细胞免疫应答,达到预防和治疗疾病的目的^[5].DNA 疫苗具有亚单位疫苗的安全性和弱毒疫苗的高效性,其制备简单,免疫时间长.DNA 疫苗是近年来研究的热点,其主要在病毒性疾病、寄生虫免疫和抗肿瘤免疫方面发挥作用.

本实验将合成 SS 基因片段克隆到 pcDNA3s 质粒载体上,利用 pcDNA3s 特有的 CMV 病毒启动子,构建成 pcDNA3s/SS DNA 疫苗.以裸露的 pcDNA3s/SS 直接免疫动物,有望在动物体内表达含有 SS 和 HBsAg 的杂合颗粒,降低动物体内的生长抑素水平,从而促进动物生长.DNA 疫苗一般以 pcDNA3 或 PUC 质粒作为真核细胞表达载体.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及质粒 含有质粒 pcDNA3s 的大肠杆菌菌株 *E. coli* JM109,该菌株由中科院上海生物化学研究所提供.质粒 pcDNA3s 上在 *Bam*HI 和 *Eco*RI 位点之间重组有乙肝表面抗原 HBsAg 基因片段.HBsAg 基因片段 *Bam*HI 端与 T7 启动子相邻,*Eco*RI 末端紧接 SP6 启动子.

1.1.2 一般化学试剂 一般化学试剂采用国产分析纯试剂.

1.1.3 主要分子生物学试剂 DNA 限制性内切酶 *Kpn*I、*Bam*HI 酶,RNaseA 酶,T₄ DNA 连接酶:购自华美公司 琼脂糖,低熔点琼脂糖:购自美国 Sigma 公司 抗生素氨苄青霉素(Amp):齐鲁制药厂产品.

1.1.4 试剂盒 柱式胶回收试剂盒,上海华舜公司产品 抗污染标准 PCR 扩增试剂盒,上海生工公司产品.

1.1.5 生长抑素基因片段 为上海皓嘉公司合成并纯化.

生长抑素基因片段序列:

CATG GCT GGC TGC AAG AAC TTC TTC
TGG AAG ACT TTC ACA TCC TGT G
CATG G TAC CGA CCG ACG TTC TTG AAG
AAG ACC TTC TGA AAG TGT AGG ACA CC-
TAG

*Kpn*I start Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys

Thr Phe Thr Ser Cys *Bam*HI

生长抑素基因片段两端分别为 *Kpn*I 和 *Bam*HI 粘性末端,并含有起始密码子 ATG.

1.1.6 PCR 引物 根据 pcDNA3s 和 SS 基因,可设计一对引物,上游引物 1 为 5' CATGGCTGGCT-GCAAGAAC3',下游引物 2 为 5' GATTTAGGT-GACACTATAG3'.上游引物为生长抑素基因部分片段,下游引物为 pcDNA3s 质粒 DNA 上的 SP6 基因片段.可扩增出 SS 和 HBsAg 融合基因片段,全长为 1 000 bp.引物由上海皓嘉公司合成.

1.2 实验方法

1.2.1 质粒的少量提取 按碱裂解法进行酚氯仿抽提后乙醇沉淀,参照文献^[6,7].用 RNA 酶消化 RNA,经酚氯仿抽提去除 RNA 酶,无水乙醇沉淀后加适量的 TE 溶解,即得到纯化的 pcDNA3s 质粒.

1.2.2 重组质粒的构建 分别用 *Kpn*I 酶和 *Bam*HI 酶对 pcDNA3 质粒进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳回收 6 Kb 片段.回收 6Kb 片段与带有粘性末端的 SS 基因片段,经 T₄DNA 连接酶定向连接,过夜,SS 基因片段插入到 HBsAg 的 5'-末端,这样就构建成 pcDNA3s/SS 质粒.

1.2.3 重组质粒 DNA 的转化 参照文献^[8],将上述重组连接混合物 CaCl₂ 法转化大肠杆菌 *E. coli* JM109,用含 50 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 选择培养基筛选转化子,于 37℃ 培养 24 h.

1.2.4 重组质粒的鉴定 挑取数个菌落在含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中发酵培养,用碱裂解法抽提并纯化质粒,制备出来的质粒经 PCR 扩增鉴定.于 PCR 反应管中加入 10 倍反应缓冲液(含 15 mmol/L MgCl₂)5 μL,4 倍 dNTP 混合物(每种 2.5 mmol/L)4 μL,上游引物 1 μL(约 10⁻⁴ mol),下游引物 1 μL(约 10⁻⁴ mol),TaqDNA 聚合酶(2~3 U)1 μL,DNA 模板(5 ng)2 μL,无菌去离子水 36 μL,液体石蜡 30 μL.PCR 扩增参数为:第 I 循环:94℃ 变性 300 s 第 II 循环:94℃、维持 45 s,55℃、维持 45 s,72℃、维持 45 s,共 35 个循环;第 III 循环:72℃ 延伸 300 s.取 10 μL 反应液,用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,并以标准 DNA 作参照物分析结果.PCR 扩增按 PCR 试剂盒说明书进行.

1.2.5 序列分析 对重组质粒进行 DNA 测序,以双脱氧链终止法测序,由大连宝生物公司完成.

2 实验结果

2.1 pcDNA3s/SS 质粒的构建

pcDNA3s/SS 质粒的构建见图 1.

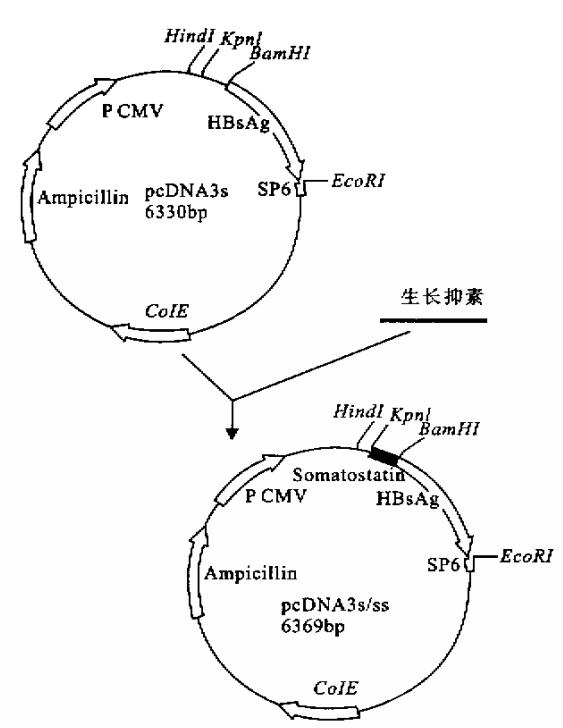
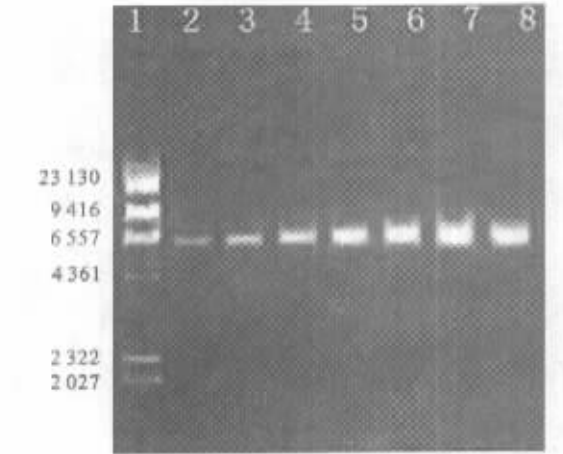


图 1 生长抑素 pcDNA3s/SS 融合质粒构建图

Fig.1 Construction of somatostatin pcDNA 3s/SS plas-
mid

2.2 转化子的获得

重组连接反应混合物对 JM109 进行转化后,涂布在含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 固体平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,次日出现转化子,而不加 SS 基因片段的阴性对照平板则是空白. pcDNA3s 经 *Kpn*I 和 *Bam*HI 双酶切,并经低熔点琼脂糖凝胶回收后成为线性 DNA,结果见图 2. 表明线性 DNA 不能转入到 JM109 中,因此无转化子.



1 为 $\lambda\text{DNA} + \text{HindIII}$ 标准分子式量; 2 为 *Kpn*I 和 *Bam*HI 酶双酶切; 3、4 分别为 *Kpn*I 和 *Bam*HI 酶单酶切, 5 为 6 000 bp 质粒 pcDNA3s.

图 2 pcDNA3s 质粒的单酶切与双酶切图

Fig. 2 Restriction enzyme analysis of pcDNA 3s/SS
plasmid

2.3 转化子的 PCR 扩增鉴定

为了确证目的基因已经克隆至载体上,用引物 1(生长抑素的部分基因片段)和引物 2(SP6)对融合质粒进行 PCR 扩增,结果扩增出 1 000 bp 的条带,该条带为 SS 和 HBsAg 的融合片段. 结果表明 SS 基因片段已插入到 HBsAg 的 5'末端,见图 3.



1 为 PCR Markers, 2 为 PCR 反应物扩增条带.

图 3 质粒 pcDNA3s/SS 的 PCR 扩增图

Fig. 3 PCR amplification and analysis of pcDNA3s/SS
plasmid

PCR Marker 的相对分子质量从上到下分别为 1 543,994,697,515,377 bp.

2.4 DNA 测序

DNA 序列分析表明,SS 5'末端为 *Kpn*I 和起始密码子 ATG,3'末端为 *Bam*HI 序列. 所有基因顺序与原来设计完全一致. 重组质粒的部分 DNA 序列为(下划线为 SS 基因片段):

5'-GGTAC CATGG CTGGC TGCAA
GAACTTCTTC TGAAGACTT
TCACATCCTG TGGATCCAT GGAGAGCA-
CA ACATCAGGAT TCCTAG GACC CCT-
GCTCGTG TTACAGGCGG GGTTTTTCTT
GTTGACAAGA
ATCCTCACAA TACCACAGG-.....3'

3 讨 论

DNA 疫苗是近年来国内外研究的热点,它是将编码外源蛋白的基因表达载体直接导入机体内,使机体产生特异性免疫应答. 本实验以 pcDNA3s 为真核表达载体,pcDNA3s 带有 CMV(巨细胞病毒强启动子),CMV 启动子能很好地启动外源基因的表. 一般认为 CMV 启动子比 RSV(肉瘤病毒启动子)、SV40 启动子的活性高,是目前公认比较理想

的启动子^[10].

该质粒还带有乙肝表面抗原基因(HBsAg),将外源生长抑素基因片段插入到 HBsAg 基因片段的 5'末端,从而构建出 pcDNA3s/SS 重组质粒 DNA. 外源 SS 基因与 HBsAg 基因融合,能在机体内表达出 SS/HBsAg 杂合颗粒,并且能将外源 SS 基因暴露于颗粒表面,有利于刺激机体产生抗体.

由于 HBsAg 基因的 5'末端,中部 112 氨基酸附近或 3'末端均可融合外源基因,并将外源基因暴露于所表达的杂合颗粒表面. 但基因在 HBsAg 基因多个位点的融合的比较表明,3'末端 223 位氨基酸密码处的 AccI 位点是最理想的融合位点. 但该方法费用高,因而选用 5'端融合的方法.

本实验由于双酶切位点 *Kpn*I 和 *Bam*HI 的距

离较近,仅隔 8 个碱基,有可能在经单酶切之后,部分质粒未能切下 8 bp 小片段,在经 *T*₄DNA 连接酶可能会发生重连,但是未加 SS 连接液在筛选平板上并未出现转化子,说明本实验已完全双酶切,不同的粘性末端则不会发生自连,并且通过 PCR 扩增亦可进一步排除这种现象. 由于 SS 基因片段仅有 50 bp,重组质粒与载体质粒 DNA 相对分子质量相近,采用酶切鉴定,在琼脂糖凝胶电泳中无法区分,因此采取随机挑取菌落,通过提取质粒 DNA,用 PCR 扩增并测序的方法来弥补,实验表明该方法是可行的.

生长抑素 DNA 疫苗的构建成功,有望在畜牧生产中用于促进动物生长,具有实际应用前景,其动物生理实验正在进行中.

参考文献：

[1] SPENCER G S G. A novel approach to growth promotion using auto-immunisation against somatostatin I ,effects on growth and hormone levels in lambs[J]. **Livestock Production Science**,1983,(10) 25.

[2] SPENCER G S G. A novel approach to growth promotion using autoimmunization against somatostatin III , effects in a commercial breed of sheep [J]. **Livestock Production Science**,1985(13)43~52.

[3] 徐文忠. 促生长激素与乙肝表面抗原融合基因在痘苗病毒中的表达 [J]. **生物化学与生物物理学报**,1993,25(2) :119 – 126.

[4] 徐文忠. 促进动物生长的新型基因工程疫苗研究 [J]. **中国科学(B)**, 1993,23(12) :1272 – 1277.

[5] WOLLF J A. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo[J]. **Science**,1990,(247) :1465 – 1468.

[6] SAMBROOK J,FNTSCH D F,MANIATIS T. Molecular cloning :A laboratory manual,Inded[M]. New YorK :Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989. 16 – 19.

[7] EYAL RAZ. Intradermal gene immunization :The possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses [J]. **Pro Natl Acad Sci**, 1994,(91) 9519 – 9523.

[8] 彭秀铃. 基因工程实验技术[M]. 长沙 湖南科学技术出版社,1997.

[9] 李永明. 实用分子生物学方法手册[M]. 北京 科学出版社,1998.

[10] KOWALCZYK D W, ERTL H C J. Immune responses to DNA vaccines[J]. **Cell Mol Life Sci**,1999,(55) :751 – 770.

(责任编辑 李春丽)