

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101864442 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 20

(21) 申请号 201010176530. 3

(22) 申请日 2010. 05. 19

(71) 申请人 江苏省农业科学院

地址 210014 江苏省南京市钟灵街 50 号

(72) 发明人 王永山 周宇 欧阳伟 范红结

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 张素卿

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 15/66 (2006. 01)

A61K 48/00 (2006. 01)

A61P 31/22 (2006. 01)

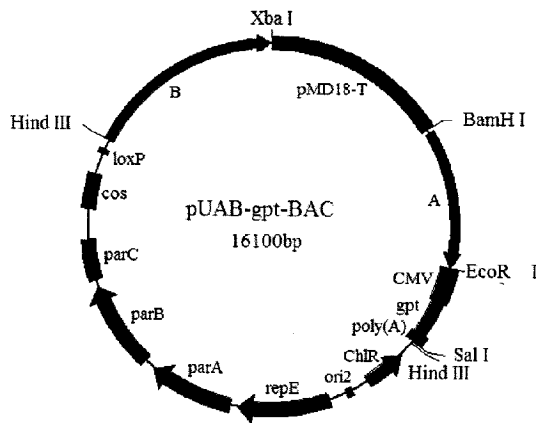
权利要求书 2 页 说明书 7 页 序列表 3 页
附图 3 页

(54) 发明名称

重组火鸡疱疹病毒细菌人工染色体转移载体

(57) 摘要

本发明涉及重组火鸡疱疹病毒细菌人工染色体转移载体,属于生物制药领域。从 E. coli DH5 α 染色体 DNA 中扩增黄嘌呤 - 鸟嘌呤磷酸转移酶基因 gpt 基因,与质粒 pEGFP 中的 CMV 启动子及 poly(A) 连接,,插入到质粒 pUAB 中,构建带有 Egpt 的重组克隆质粒 pUAB-gpt。用 pUC18 克隆单拷贝 BAC 载体制备高拷贝 BAC 载体基本功能序列,插入到 pUAB-gpt 中,获得重组火鸡疱疹病毒细菌人工染色体转移载体 pUAB-gpt-BAC,含 gpt 基因表达盒的核心序列 BAC-gpt,具有氨苄青霉素和氯霉素双抗性。本发明构建的转移载体具有研制重组 HVT 活病毒载体基因工程疫苗的应用前景。



1. 重组火鸡疱疹病毒 HVT 细菌人工染色体 BAC 转移载体 pUAB-gpt-BAC, 其大小为 16 100bp, HVT 非必需区 US2 两侧同源臂 A 和 B 之间为 8800bp, 含黄嘌呤 - 鸟嘌呤磷酸转移酶基因 XGPRT, 简称 gpt 基因, gpt 基因表达盒 Egpt 的核心序列为 BAC-gpt, 具有氨苄青霉素和氯霉素双抗性。

2. 根据权利要求 1 所述的转移载体 pUAB-gpt-BAC, 是通过分子设计构建的, 具体包括:

第一步: 根据 GenBank 登录号: AF291866 的 HVT Fc126 株基因组序列、GenBank 登录号: X00221.1 的 gpt 基因序列和 GenBank 登录号: U55763.1 的质粒 pEGFP-C1 序列设计了以下 PCR 扩增引物:

引物	序列 (5' -3')	酶切位点
gpt-F	GCGCTAGCGTCATGAGCGAAAAATACATCG	Nhe I
gpt-R	ACTGGATCCTTAGCGACCGGAGATTGGCG	BamH I
Egpt-F	GCGAATTCTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAG	EcoR I
Egpt-R	GCGTCGACCGCGTTAAGATACATTGATGAGTTTGGGA	Sal I
A-F	CGGGATCCACATCGGGCCACGTTCCGCC	BamH I
A-R	GCTCTAGAGCGTCGACCGGAATTCGATGAGCTGACGTGTGGA	XbaI, EcoR I
B-F	GGAATTCAAGTCGACGGAAGCTTCCACTAATATGGGCACAC	EcoR I, Sal I, HindIII
B-R	GCTCTAGATGGCCCATCTAGGTGATTAT	Xba I

第二步: 以 E. coli DH5 α 染色体 DNA 为模板, 用引物 gpt-F、gpt-R 扩增外源加压筛选标记基因 gpt, 用 pMD18-T 克隆载体克隆, 获得含有 gpt 基因的阳性克隆质粒 pMD-gpt;

第三步: 用 BamH I 与 Nhe I 双酶切 pEGFP-C1 质粒, 切除 GFP 基因, 同时连接 gpt 片段, 获得含有 gpt 基因的表达质粒 pEgpt; 然后, 以 pEgpt 为模板, 用引物 Egpt-F、Egpt-R 进行 PCR 扩增筛选标记基因 gpt 的表达盒 Egpt, 即 CMV-gpt-poly A, 与 pMD18-T 克隆载体连接, 获得含有 gpt 基因表达盒 Egpt 的克隆质粒 pMD-Egpt;

第四步: 分别用引物 A-F、A-R 和 B-F、B-R 进行 PCR, 以 HVT 感染细胞总 DNA 为模板, 分别扩增 HVT 左 / 右同源臂 A/B, 用 pMD18-T 载体克隆, 分别获得含有 HVT 同源臂 A 和 B 的克隆质粒 pMD-A 和 pMD-B;

第五步: 将 pMD-A 用 EcoR I 和 Xba I 双酶切, pMD-B 用 EcoR I、Sca I 和 Xba I 三酶切, 回收 pMD-A 载体片段和同源臂 B 片段, T4 DNA 连接酶连接, 获得含有 HVT 左 / 右同源臂 A/B 的克隆质粒 pUAB;

第六步: 用 EcoR I 和 Sal I 分别双酶切 pMD-Egpt 和 pUAB, 回收 gpt 基因表达盒 Egpt 和 pUAB 载体片段, T4DNA 连接酶连接, 获得含有筛选标记基因 gpt 表达盒 Egpt 的克隆质粒 pUAB-gpt;

第七步: 用单拷贝 BAC 载体 pIndigoBAC-5 构建高拷贝 BAC 载体克隆质粒 pUC18-BAC: 提取 pUC18 质粒, Hind III 单酶切, 回收 pUC18 目的片段, 与 BAC 载体 pIndigoBAC-5 连接, 电转化宿主菌 DH10B, 加入 37 $^{\circ}$ C 的 SOC 培养基, 并将其转移到 1.5mL 无菌 Eppendorf 管

中,37°C、220r/min 振荡培养 1h,4000r/min 离心 5min,将细菌沉淀涂布于含氯霉素 34 μ g/mL 和氨苄青霉素 100 μ g/mL 的双抗 LB 培养基平板上,挑取克隆,摇菌 16h 后提取质粒,获得高拷贝 BAC 克隆质粒 pUC18-BAC,其中 SOC 培养基为 LB 中含有 0.2mmol/L 葡萄糖,0.1mmol/L MgSO₄ 和 0.1mmol/L MgCl₂;

第八步:将 pUC18-BAC 与 pUAB-gpt 分别用 Hind III 酶切,回收 pUAB-gpt 线性化片段和 BAC 载体的基本功能基因, T4DNA 连接酶连接,获得重组火鸡疱疹病毒细菌人工染色体 HVT-BAC 转移载体 pUAB-gpt-BAC。

3. 权利要求 1 或 2 所述转移载体 pUAB-gpt-BAC 在制备重组 HVT 活病毒载体基因工程疫苗方面的应用。

重组火鸡疱疹病毒细菌人工染色体转移载体

一、技术领域

[0001] 本发明涉及重组火鸡疱疹病毒细菌人工染色体转移载体,具体涉及转移载体的分子设计、技术路线、转移载体及其在研制重组 HVT 活病毒载体基因工程疫苗方面的应用,属于生物制药领域。

二、背景技术

[0002] 火鸡疱疹病毒 (Herpesvirus of turkey, HVT) 是一种无致病性的 α 疱疹病毒,最初于 20 世纪 60 年代末期从火鸡体内分离得到,它属于 MDV-3 型,基因组为线性、双股 DNA 分子,大小约为 160kb。HVT 与鸡的高度传染性、致癌性疾病马立克氏病 (MD) 的病原马立克氏病病毒 (MDV) 在遗传学和血清学上具有相关性,因此,在 70 年代就开始作为预防 MD 的疫苗株在全球得到了广泛的应用。另外, HVT 作为病毒载体携带外源保护性抗原基因方面,与其它病毒载体相比具有许多优势:使用安全,对鸡及其它动物均无致病性;接种鸡体后病毒在鸡体内形成长达数周的病毒血症,且终生潜伏感染,可刺激机体产生较高的抗体水平并维持终生,接种一次即可获得终生免疫。目前,国外已成功利用 HVT 作为载体表达了多种禽病原保护性抗原基因,包括新城疫病毒 (NDV)、血清 1 型 MDV、传染性法氏囊病病毒 (IBDV)、传染性喉气管炎病毒 (ILTV)、禽白血病病毒 (ALV) 等的保护性抗原,而且能抵抗致死剂量病原的感染,表明 HVT 是有效的基因工程疫苗活病毒载体。

[0003] 由于 HVT 基因组庞大,结构复杂,而且具有很强的细胞结合性,在真核细胞中对其进行重组操作和研究,显得困难重重。近年来,细菌人工染色体 (BAC) 技术在疱疹病毒上的应用解决了这一难题。通过构建 HVT 全基因组细菌人工染色体,就可以方便地利用 Red/ET、Cre/loxP 等现代基因重组系统对病毒进行反向遗传操作。在大肠杆菌中就可以完成对 HVT 基因组的遗传修饰,与在真核细胞中相比,该重组技术具有快速有效可靠的优点。

[0004] 目前对于重组 HVT 的构建有两种方法:一种是传统的方法,即利用重组转移载体与病毒基因组共转染,将外源基因如 lacZ 基因等同源重组入病毒基因组中;另一种方法是利用 BAC 进行重组 HVT 的构建。使用传统的方法即同源重组,由于受到 CEF 细胞的制备繁琐、同源重组率低等因素的影响,使得重组 HVT 的构建较为困难,而利用 BAC 技术进行重组 HVT 的构建可以简化繁琐的病毒筛选过程。

三、发明内容

[0005] 技术问题

[0006] 本发明的目的在于,构建含有表达选择标记黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸转移酶基因 (XGPRT, gpt) 和细菌人工染色体 (BAC) 基本功能基因序列的重组 HVT 细菌人工染色体转移载体 pUAB-gpt-BAC,具有氨苄青霉素和氯霉素双抗性,可简化重组病毒筛选过程,在研制重组 HVT 活病毒载体基因工程疫苗方面具有良好的应用前景。

[0007] 技术方案

[0008] 本发明根据大肠杆菌黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸转移酶基因 (XGPRT, gpt) 序列设计引

物,以 *E. coli* DH5 α 染色体 DNA 为模板采用 PCR 方法扩增 *gpt* 基因,用其作为外源筛选基因,与质粒 pEGFP 中的 CMV 启动子及 poly(A) 连接构建 *gpt* 表达盒 Egpt (CMV-*gpt*-polyA),经酶切测序鉴定后,插入到含有火鸡疱疹病毒 (HVT) 非必需区 US2 两侧基因的同源臂克隆质粒 pUAB 中,构建带有筛选基因表达盒的重组克隆质粒 pUAB-*gpt*。将单拷贝细菌人工染色体 (BAC) 载体克隆到 pUC18 中,制备高拷贝 BAC 载体基本功能序列,插入到 pUAB-*gpt* 中,获得重组 HVT 细菌人工染色体转移载体 pUAB-*gpt*-BAC。包括:

[0009] 1、重组火鸡疱疹病毒 (HVT) 细菌人工染色体 (BAC) 转移载体 pUAB-*gpt*-BAC,大小为 16100bp, HVT 非必需区 US2 两侧同源臂 A 和 B 之间为 8800bp 含黄嘌呤 - 鸟嘌呤磷酸转移酶基因 (XGPRT, *gpt*) 基因表达盒 Egpt 的 BAC-*gpt* 核心序列,具有氨苄青霉素和氯霉素双抗性。

[0010] 2、转移载体 pUAB-*gpt*-BAC,是通过分子设计构建的,具体包括:

[0011] 第一步:根据 HVT Fc126 株基因组序列 (GenBank 登录号:AF291866)、*gpt* 基因序列 (GenBank 登录号:X00221.1) 和质粒 pEGFP-C1 序列 (GenBank 登录号:U55763.1) 设计了以下 PCR 扩增引物。

[0012]

引物	序列 (5'-3')	酶切位点
<i>gpt</i> -F	GC GCTAGC GTCATGAGCGAAAAATACATCG	<i>Nhe</i> I
<i>gpt</i> -R	ACT GGATCC TTAGCGACCGGAGATTGGCG	<i>Bam</i> H I
Egpt-F	GC GAATTC TATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAG	<i>Eco</i> R I
Egpt-R	GC GTCGAC CGCGTTAAGATACATTGATGAGTTTGGGA	<i>Sal</i> I
A-F	CG GGATCC ACATCGGGCCACGTTCCGCC	<i>Bam</i> H I
A-R	GC TCTAGA GCGTGCACCG GAATTC GATGAGCTGACGTGTGGA	<i>Xba</i> I、 <i>Eco</i> R I
B-F	G GAATTC AA GTCGAC GG AAGCTT CCACTAATATGGGCACAC	<i>Eco</i> R I、 <i>Sal</i> I、 <i>Hind</i> III
B-R	GC TCTAGA TGGCCCATCTAGGTGATTAT	<i>Xba</i> I

[0013] 第二步:以 *E. coli* DH5 α 染色体 DNA 为模板,用引物 *gpt*-F、*gpt*-R 扩增外源加压筛选标记基因 *gpt*,用 pMD18-T 克隆载体克隆,获得含有 *gpt* 基因的阳性克隆质粒 pMD-*gpt*;

[0014] 第三步:用 *Bam*H I 与 *Nhe* I 双酶切 pEGFP-C1 质粒,切除 GFP 基因,同时连接 *gpt* 片段,获得含有 *gpt* 基因的表达质粒 pEgpt;然后,以 pEgpt 为模板,用引物 Egpt-F、Egpt-R 进行 PCR 扩增筛选标记基因 *gpt* 的表达盒 Egpt,即 CMV-*gpt*-poly A,与 pMD18-T 克隆载体连接,获得含有 *gpt* 基因表达盒 Egpt 的克隆质粒 pMD-Egpt;

[0015] 第四步:分别用引物 A-F、A-R 和 B-F、B-R 进行 PCR,以 HVT 感染细胞总 DNA 为模板,分别扩增 HVT 左/右同源臂 A/B,用 pMD18-T 载体克隆,分别获得含有 HVT 同源臂 A 和 B 的克隆质粒 pMD-A 和 pMD-B;

[0016] 第五步:将 pMD-A 用 *Eco*R I 和 *Xba* I 双酶切,pMD-B 用 *Eco*R I、*Sca* I 和 *Xba* I 三酶切,回收 pMD-A 载体片段和 B 片段,T4DNA 连接酶连接,获得含有 HVT 左/右同源臂 A/B 的克隆质粒 pUAB;

[0017] 第六步:用 *Eco*R I 和 *Sal* I 分别双酶切 pMD-Egpt 和 pUAB,回收 *gpt* 基因表达盒 Egpt 和 pUAB 载体片段,T4DNA 连接酶连接,获得含有筛选标记基因 *gpt* 表达盒 Egpt 的克隆

质粒 pUAB-gpt ;

[0018] 第七步:用单拷贝 BAC 载体 pIndigoBAC-5 构建高拷贝 BAC 载体克隆质粒 pUC18-BAC ;

[0019] 提取 pUC18 质粒, Hind III 单酶切, 回收 pUC18 目的片段, 与 BAC 载体 pIndigoBAC-5 连接, 电转化宿主菌 DH10B, 加入 37°C 的 SOC 培养基, 并将其转移到 1.5mL 无菌 Eppendorf 管中, 37°C、220r/min 振荡培养 1h, 4000r/min 离心 5min, 将细菌沉淀涂布于含氯霉素 34 μg/mL 和氨苄青霉素 100 μg/mL 的双抗 LB 培养基平板上, 挑取克隆, 摇菌 16h 后提取质粒, 获得高拷贝 BAC 克隆质粒 pUC18-BAC, 其中 SOC 培养基为 LB 中含有 0.2mmol/L 葡萄糖, 0.1mmol/L MgSO₄ 和 0.1mmol/L MgCl₂ ;

[0020] 第八步:将 pUC18-BAC 与 pUAB-gpt 分别用 Hind III 酶切, 回收 pUAB-gpt 线性化片段和 BAC 载体的基本功能基因, T4DNA 连接酶连接, 获得重组火鸡疱疹病毒细菌人工染色体 HVT-BAC 转移载体 pUAB-gpt-BAC。

[0021] 上述转移载体 pUAB-gpt-BAC 可在制备重组 HVT 活病毒载体基因工程疫苗方面可以得到应用。

[0022] 有益效果

[0023] 利用高拷贝质粒来制备 BAC 载体是一种简单实用的方法, 这种方法制备的 BAC 载体功能序列比从单拷贝质粒得到的具有更多的优点。尽管在理论上, 获得一定量的单拷贝质粒可以通过细菌的大量培养来实现, 但在操作中会不可避免的导致蛋白质污染以及 BAC 载体质粒本身的开环和断链, 给下游克隆工作带来很大的麻烦, 即使用较好的质量纯化试剂盒, 这些问题也难以避免。本发明将单拷贝 BAC 载体 pIndigoBAC-5 插入到高拷贝质粒 pUC18, 成功构建了高拷贝 BAC 克隆质粒 pUC18-BAC, 用于制备 BAC 载体 DNA, 只需要培养少量的细菌即可得到足够数量的 BAC 载体 DNA。

[0024] 为了能成功构建重组 HVT 细菌人工染色体, 在转移载体中选择使用何种筛选标记基因是影响实验过程难易以及成功与否的关键因素。火鸡疱疹病毒与 I 型马立克氏病病毒相似, 都具有比较严格的细胞结合特性, 如果使用非加压筛选标记基因 lacZ 和 EGFP 作为遗传标记基因, 由于在表达非加压选择标记基因的细胞中含有大量的野生病毒, 重组病毒难以筛选出来, 病毒的蚀斑纯化将变得十分困难。本发明选用黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸转移酶基因作为加压筛选标记, 在加压条件下, 霉酚酸 (MPA) 阻断了野生病毒的嘌呤代谢途径, 从而阻断了野生病毒的 DNA 复制, 而经过同源重组将 BAC-gpt 目的片段正确插入到病毒的复制非必需基因 US2 区的重组病毒, 能够表达黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸转移酶, 该酶利用外源黄嘌呤完成了鸟嘌呤的外源补救合成, 从而使得重组病毒 DNA 的复制能够正常进行, 经过几轮筛选野生病毒可全部死亡, 而重组病毒逐渐可得到富集和纯化。

[0025] 为了加强核糖体小亚基对翻译起始序列的识别, 以保证在 CEF 中能够高效表达黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸转移酶, 本发明在扩增正选择标记基因表达盒 Egpt 时, 并不是将编码 151 个氨基酸的 456bp 大小的 gpt 编码框简单的直接克隆到 CMV 早期启动子和 SV40 多聚腺苷酸 (polyA) 尾之间, 而是将 gpt 编码框的起始密码子 ATG 的上游序列按照“KOZAK 规则”进行了优化。

[0026] 本发明的特点和优点如下:

[0027] 1、本发明将单拷贝 BAC 载体 pIndigoBAC-5 插入到高拷贝质粒 pUC18, 成功构建了

高拷贝 BAC 克隆质粒 pUC18-BAC, 用于制备 BAC 载体 DNA, 只需要培养少量的细菌即可得到足够数量的 BAC 载体 DNA。

[0028] 2、本发明选用黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸转移酶基因作为加压筛选标记, 在加压条件下, 霉酚酸 (MPA) 阻断了野生病毒的嘌呤代谢途径, 从而阻断了野生病毒的 DNA 复制, 而经过同源重组将 BAC-gpt 目的片段正确插入到病毒的复制非必需基因 US2 区的重组病毒, 能够表达黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸转移酶, 该酶利用外源黄嘌呤完成了鸟嘌呤的外源补救合成, 从而使得重组病毒 DNA 的复制能够正常进行, 经过几轮筛选野生病毒可全部死亡, 而重组病毒逐渐可得到富集和纯化。

[0029] 3、本发明在扩增正选择标记基因表达盒 Egpt 时, 并不是将编码 151 个氨基酸的 456bp 大小的 gpt 编码框简单的直接克隆到 CMV 早期启动子和 SV40 多聚腺苷酸 (polyA) 尾之间, 而是将 gpt 编码框的起始密码子 ATG 的上游序列按照“KOZAK 规则”进行了优化, 以加强核糖体小亚基对翻译起始序列的识别, 保证在 CEF 中能够高效表达黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸转移酶。

[0030] 4、本发明构建的转移载体 pUAB-gpt-BAC 含 gpt 基因表达盒的核心序列 BAC-gpt, 具有氨苄青霉素和氯霉素双抗性, 可简化重组病毒筛选过程, 在研制重组 HVT 活病毒载体基因工程疫苗方面具有良好的应用前景。

四、附图说明

[0031] 图 1 重组 HVT-BAC 转移载体 pUAB-gpt-BAC 构建的技术路线

[0032] 图 2gpt 与 Egpt 的扩增与克隆

[0033] M:DNA 分子质量标准;1:gpt 片段 PCR 产物;2:pMD-gpt 的 Nhe I 和 BamH I 双酶切产物;3:Egpt 片段 PCR 产物;4:pMD-Egpt 的 EcoR I 和 Sal I 双酶切产物

[0034] 图 3 质粒 pUAB 的酶切图谱

[0035] M:DNA 分子质量标准;1:A 片段 PCR 产物;2:B 片段 PCR 产物;3:pMD-A 的 EcoR I 和 Xba I 双酶切产物;4:pMD-B 的 EcoR I, Sca I 和 Xba I 三酶切产物;5:pUAB 的 EcoR I 和 Xba I 双酶切产物

[0036] 图 4 质粒 pUAB-gpt 的酶切图谱

[0037] M:DNA 分子质量标准;1:pUAB-gpt 的 EcoR I 和 Sal I 双酶切产物

[0038] 图 5 质粒 pUC18-BAC 的酶切图谱

[0039] M:DNA 分子质量标准;1、2:pUC18-BAC 的 Hind III 单酶切产物

[0040] 图 6 转移载体 pUAB-gpt-BAC 的酶切图谱

[0041] M:DNA 分子质量标准;1:pUAB-gpt-BAC 的 BamH I 单酶切产物;2:pUAB-gpt-BAC 的 Xba I 单酶切产物;3:pUAB-gpt-BAC 的 Nhe I 单酶切产物

[0042] 图 7 转移载体 pUAB-gpt-BAC 的分子图谱

五、具体实施方式

[0043] 1 试验材料

[0044] BAC 载体 pIndigoBAC-5 为 Epicentre 公司产品;AxyPrep 质粒小量纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒为 Axygen 公司产品;pMD18-T 克隆载体、X-gal、IPTG、限制性核酸内

切酶、T4DNA Ligase、ATP、dNTP 及 Taq DNA 聚合酶均为 TaKaRa 公司产品;含有绿色荧光蛋白 GFP 基因的表达质粒 pEGFP-C1、E. coli DH5 α 、E. coli DH10B、DMEM 培养基、胰酶为 Invitrogen 公司产品;9~10 日龄 SPF 鸡胚、火鸡疱疹病毒 (Herpesvirus of turkey, HVT) Fc126 株均购自南京天邦生物科技有限公司。引物合成、DNA 序列测定由 Invitrogen 公司完成。

[0045] 2 试验方法

[0046] 2.1 引物设计与合成

[0047] 根据在 GenBank 发表的 HVT Fc126 株全长基因组序列 (GenBank 登录号: AF291866)、黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸转移酶基因 (XGPRT, gpt) 序列 (GenBank 登录号: X00221.1) 以及质粒 pEGFP-C1 序列 (GenBank 登录号: U55763.1) 设计了以下 PCR 扩增引物:

[0048]

引物	序列 (5'-3')	酶切位点
gpt-F	GC GCTAGC GTCATGAGCGAAAAATACATCG	<i>Nhe</i> I
gpt-R	ACT GGATCC TTAGCGACCGGAGATTGGCG	<i>Bam</i> H I
Egpt-F	GC GAATTC TATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAG	<i>Eco</i> R I
Egpt-R	GC GTCGAC CGCGTTAAGATACATTGATGAGTTTGGG	<i>Sal</i> I
A-F	CG GGATCC ACATCGGGCCACGTTCCGCC	<i>Bam</i> H I
A-R	GC TCTAGA GCGTGCACCG GAATTC GATGAGCTGACGTGTGGA	<i>Xba</i> I、 <i>Eco</i> R I
B-F	G GAATTC AA GTCGAC GG AAGCTT CCACTAATATGGGCACAC	<i>Eco</i> R I、 <i>Sal</i> I、 <i>Hind</i> III
B-R	GC TCTAGA TGGCCCATCTAGGTGATTAT	<i>Xba</i> I

[0049] 2.2 gpt 基因与 Egpt 基因的扩增与克隆

[0050] 以 E. coli DH5 α 染色体 DNA 为模板,以 gpt-F、gpt-R 作为引物用 PCR 扩增外源加压筛选标记基因 gpt。PCR 条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5min;94 $^{\circ}$ C 1min,61 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。用 10g/L 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物,可见一条大小约为 500bp 的 DNA 带,回收 gpt 基因的 PCR 产物,用 pMD18-T 载体克隆,提取克隆质粒 pMD-gpt,用 *Nhe* I 和 *Bam*H I 对 gpt 基因克隆质粒 pMD-gpt 进行双酶切鉴定,可见两条大小分别约为 500bp 和 2700bp 的 DNA 带。

[0051] 用 *Bam*H I 与 *Nhe* I 双酶切 pEGFP-C1 质粒,切除 GFP 基因,同时连接 gpt 片段,获得含有 gpt 基因的表达质粒 pEgpt;然后,以 pEgpt 为模板,以 Egpt-F、Egpt-R 作为引物扩增筛选标记基因 gpt 的表达盒 Egpt (CMV-gpt-poly A)。PCR 条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5min;94 $^{\circ}$ C 1min,55 $^{\circ}$ C 90s,72 $^{\circ}$ C 2min,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物经 10g/L 琼脂糖凝胶电泳分析,可见一条大小约为 1300bp 的 DNA 条带。

[0052] 用 10g/L 琼脂糖凝胶电泳,回收 PCR 产物目的片段,与 pMD18-T 载体连接,转化 E. coli DH5 α 感受态细菌,涂布于 15g/L 琼脂 LB 平板 (含 Amp 100 μ g/mL),挑白色菌落培养,抽提质粒,获得含有 gpt 基因表达盒 Egpt 的克隆质粒 pMD-Egpt。将克隆质粒 pMD-Egpt 用 *Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切后,用 10g/L 琼脂糖凝胶电泳分析,可见两条大小分别约为 1300bp 和 2700bp 的条带 (图 2)。

[0053] 2.3HVT 同源臂克隆质粒的构建

[0054] 用 9~10 日龄 SPF 鸡胚制备原代鸡胚成纤维细胞 (CEF), 在 75cm×75cm 细胞培养瓶中培养 24h, 当细胞长成单层后, 接种 100PFU 毒量的 HVT。待 70% 细胞出现病变, 收取病毒感染细胞, 冻融三次, SDS 碱裂解法提取病变细胞总 DNA。

[0055] 以 A-F、A-R, B-F、B-R 为引物, 以 HVT 感染细胞总 DNA 为模板进行 PCR, 分别扩增出 HVT Fc126 株 US2 基因两侧的左、右同源臂 A 和 B, 同源臂 A 约 2000bp (核苷酸序列位于 137758~139758) 和同源臂 B 约 2700bp (核苷酸序列位于 140762~143442)。PCR 条件: 95℃ 5min; 94℃ 1min, 57℃ 1min, 72℃ 3min, 进行 30 个循环后 72℃ 延伸 10min。用 10g/L 琼脂糖凝胶电泳, 回收 PCR 产物, 用 pMD18-T 载体克隆, 分别获得含有 HVT 同源臂 A 和 B 的克隆质粒 pMD-A 和 pMD-B。

[0056] 然后, 用 BamH I 和 EcoR I 双酶切分析 pMD-A, EcoR I、Sca I 和 Xba I 三酶切分析 pMD-B, 进一步测序确认。然后, 将 pMD-A 用 EcoR I 和 Xba I 双酶切, pMD-B 用 EcoR I、Sca I 和 Xba I 三酶切, 回收 pMD-A 载体片段和 B 片段, T4 DNA 连接酶连接, 转化 DH5 α 感受态细菌, 提取重组质粒, EcoR I 和 Xba I 双酶切鉴定, 获得含有 HVT 左/右同源臂 A/B 的克隆质粒 pUAB。将克隆质粒 pUAB, 用 EcoR I 和 Xba I 双酶切, 8g/L 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见二条长度分别约 4700bp 和 2700bp 的 DNA 片段, 与 pMD-A 载体片段和 B 片段的理论值相符合 (图 3)。

[0057] 2.4 筛选标记基因克隆质粒的构建

[0058] 用 EcoR I 和 Sal I 分别双酶切 pMD-Egpt 和 pUAB, 8g/L 琼脂糖凝胶电泳回收 gpt 基因表达盒 Egpt 和 pUAB 载体片段, DNA 胶回收试剂盒纯化, T4 DNA Ligase 连接, 转化 DH5 α 感受态细菌, 涂布在用 LB 配制的 15g/L 琼脂皿上 (含 Amp 100 μ g/mL), 37℃ 培养 14h, 挑单菌落接种入 LB (含 Amp 100 μ g/mL), 振荡培养 12h, 用质粒纯化试剂盒提取质粒, EcoR I 和 Sal I 双酶切鉴定, 获得含有筛选标记基因 gpt 表达盒 Egpt 的克隆质粒 pUAB-gpt。

[0059] 将克隆质粒 pUAB-gpt, 经 EcoR I 和 Hind III 双酶切, 8g/L 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见二条长度分别约 7300bp 和 1300bp 的 DNA 片段, 与 pUAB 和 Egpt 基因片段的理论值相符合 (图 4)。

[0060] 2.5 高拷贝 BAC 克隆质粒的构建

[0061] 用单拷贝 BAC 载体 pIndigoBAC-5 构建高拷贝 BAC 载体克隆质粒。其方法是: 提取 pUC18 质粒, Hind III 单酶切, 回收 pUC18 目的片段, 与 BAC 载体 pIndigoBAC-5 连接, 电转化宿主菌 DH10B (电转条件为: 0.1cm 电转杯, 2500V、200 Ω 、25 μ F), 电击完成后立即加入 37℃ 的 SOC 培养基 (LB 中含有 0.2mmol/L 葡萄糖, 0.1mmol/L MgSO₄, 0.1mmol/L MgCl₂), 并将其转移到 1.5mL 无菌 Eppendorf 管中, 37℃、220r/min 振荡培养 1h, 4000r/min 离心 5min, 将细菌沉淀涂布于含氯霉素 (Chl, 34 μ g/mL) 和氨苄青霉素 (Amp, 100 μ g/mL) 的双抗 LB 培养基平板上, 挑取克隆, 摇菌 16h 后提取质粒, 获得高拷贝 BAC 克隆质粒 pUC18-BAC。

[0062] 将高拷贝 BAC 克隆质粒 pUC18-BAC, 经 Hind III 单酶切, 用 8g/L 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见 2 条长度分别约 7500bp 和 2700bp 的 DNA 片段, 与 pUC18 和 BAC 载体基本功能基因线性化片段的理论值相符合 (图 5)。

[0063] 2.6 重组 HVT-BAC 转移载体的构建

[0064] 将 pUC18-BAC 与 pUAB-gpt 分别用 Hind III 酶切, 经 8g/L 琼脂糖凝胶电泳, 分别

回收 pUAB-gpt 线性化片段和 BAC 载体的基本功能基因, DNA 胶回收试剂盒纯化, T4DNA Ligase 连接, 转化 E. coli DH5 α 感受态细菌, 涂布在用 LB 配制的 15g/L 琼脂平皿上 (含 Amp 100 μ g/ml, Chl 34 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 培养 14h, 挑单菌落接种入 LB (含 Amp100 μ g/ml, Chl 34 μ g/mL), 振荡培养 12h, 用质粒纯化试剂盒提取质粒, 获得重组火鸡疱疹病毒细菌人工染色体 (HVT-BAC) 转移载体 pUAB-gpt-BAC, 大小为 16100bp, 左、右同源臂 A 和 B 之间为核心序列 BAC-gpt, 大小为 8800bp, 具有氨苄青霉素和氯霉素双抗性 (Amp 100 μ g/ml, Chl 34 μ g/mL), 在制备重组 HVT 活病毒载体基因工程疫苗方面可以得到应用。

[0065] 上述转移载体 pUAB-gpt-BAC 分别用 BamH I、Xba I、Nhe I 单酶切, 8g/L 琼脂糖凝胶电泳分析, 分别获得 3071bp、5415bp、7741bp 三条带; 2429bp、5306bp、8492bp 三条带; 7089bp、9138bp 两条带; 与 DNA 片段理论值相符合 (图 1、图 6)。

序列表

<110> 江苏省农业科学院	
<120> 重组火鸡疱疹病毒细菌人工染色体转移载体	
<130> 说明书	
<160>8	
<170>PatentIn version 3.1	
<210>1	
<211>30	
<212>DNA	
<213> 人工	
<220>	
<221> 引物 gpt-F	
<222>(1).. (29)	
<223>	
<400>1	
gcgctagcgt catgagcgaa aaatacatcg	30
<210>2	
<211>29	
<212>DNA	
<213> 人工	
<220>	
<221> 引物 gpt-R	
<222>(1).. (27)	
<223>	
<400>2	
actggatcct tagcgaccgg agattggcg	29
<210>3	
<211>39	
<212>DNA	
<213> 人工	
<220>	
<221> 引物 Egpt-F	
<222>(1).. (27)	
<223>	
<400>3	
gcgaattcta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattag	39
<210>4	
<211>36	

<212>DNA	
<213> 人工	
<220>	
<221> 引物 Egpt-R	
<222>(1).. (28)	
<223>	
<400>4	
gcgtcgaccg cgттаagata cattgatgag tttgga	36
<210>5	
<211>28	
<212>DNA	
<213> 人工	
<220>	
<221> 引物 A-F	
<222>(1).. (28)	
<223>	
<400>5	
cgggatccac atcgggccac gttccgcc	28
<210>6	
<211>42	
<212>DNA	
<213> 人工	
<220>	
<221> 引物 A-R	
<222>(1).. (42)	
<223>	
<400>6	
gctctagagc gtcgaccgga attcgatgag ctgacgtgtg ga	42
<210>7	
<211>41	
<212>DNA	
<213> 人工	
<220>	
<221> 引物 B-F	
<222>(1).. (41)	
<223>	
<400>7	
ggaattcaag tcgacggaag cttccactaa tatgggcaca c	41
<210>8	

<211>28

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<221> 引物 B-R

<222>(1)..(28)

<223>

<400>8

gctctagatg gcccatctag gtgattat

28

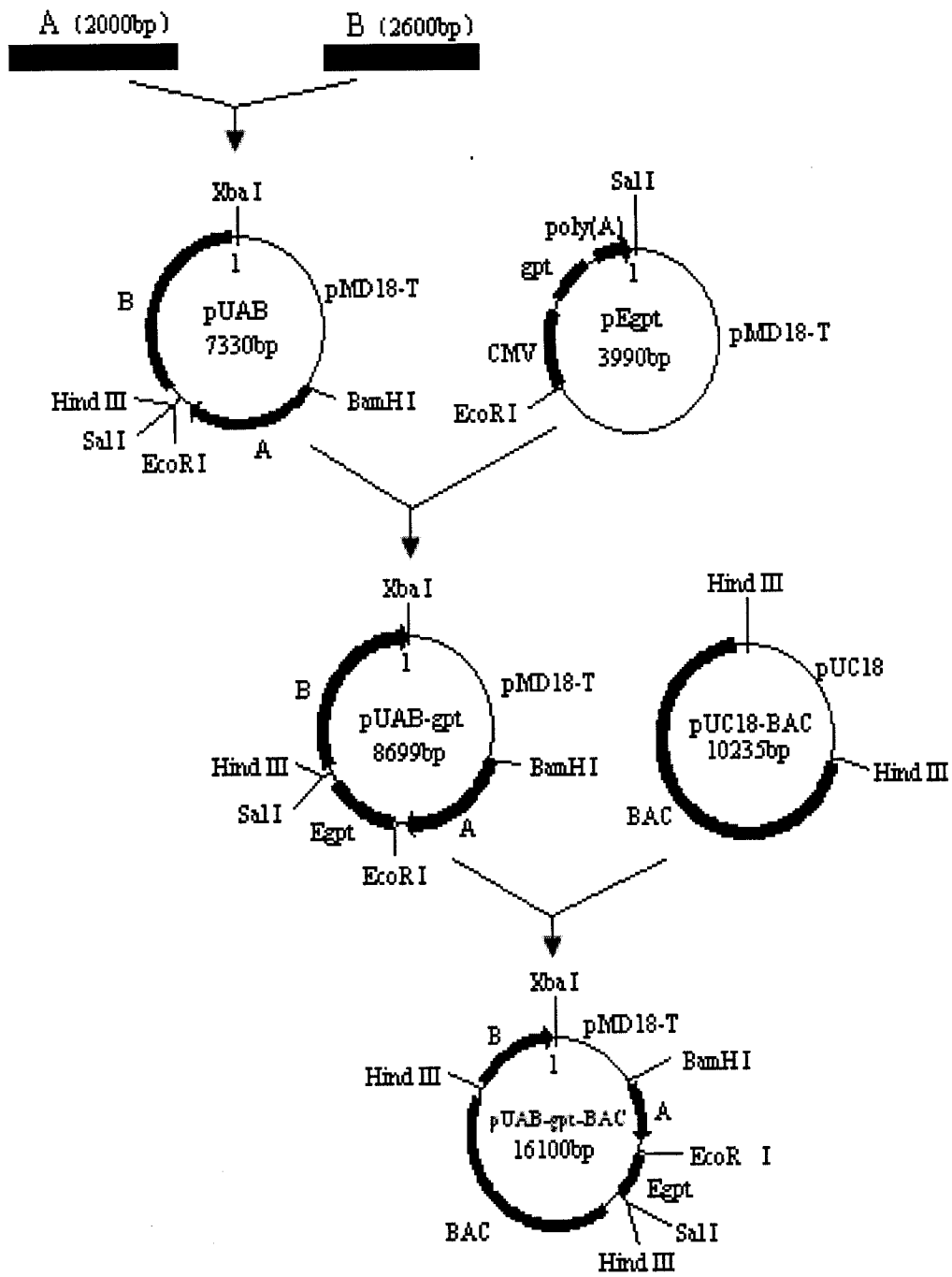


图 1

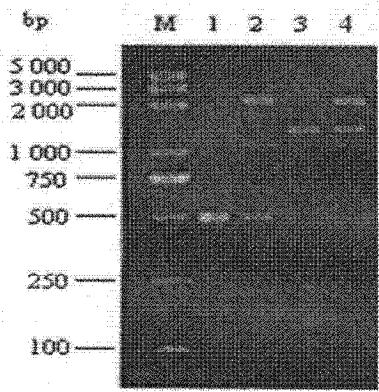


图 2

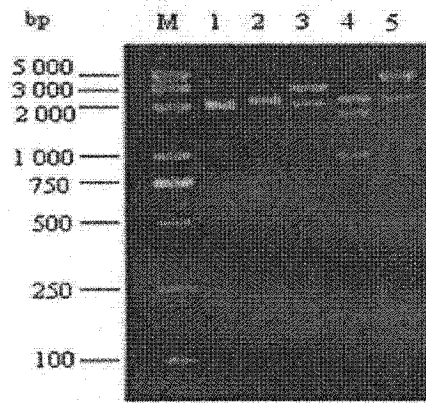


图 3

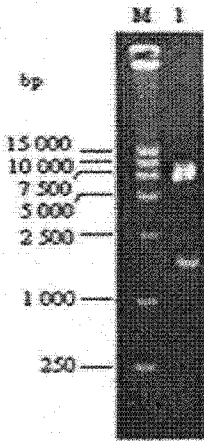


图 4

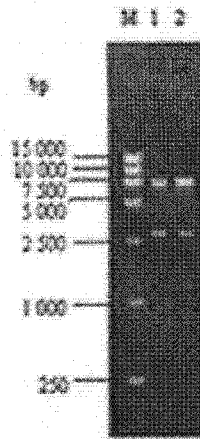


图 5

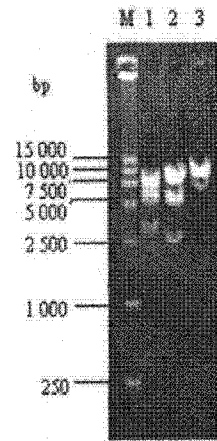


图 6

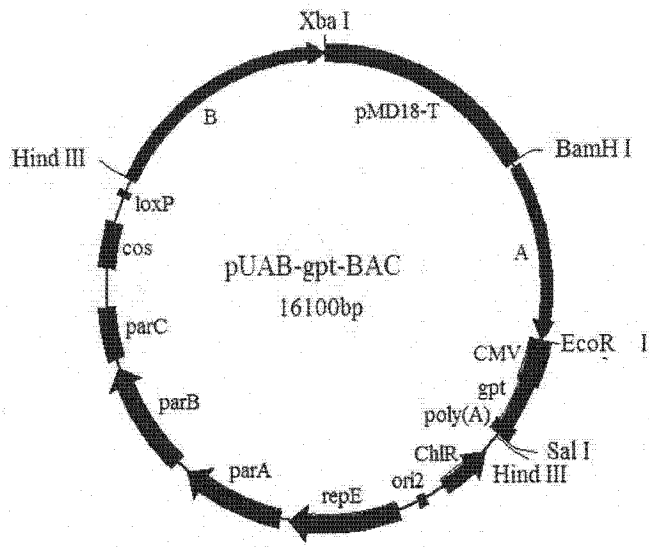


图 7