维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷 1期
2002年2月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

17(1):92－95
February 2002

对虾白斑病毒 *1197* 基因的表达和产物纯化的研究*

应智伟，周国瑛，龚祖埙**
（中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所，上海 200031）

The Studies on Expression of 1197 Gene of Prawn Baculovirus and on Purifications of the Expressed Product

YING Zhi-wei, ZHOU Guo-ying, GONG Zu-Xun**
(*The Institute of Biochemistry and cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai* 200031, *China*)

Abstract: In previous report we have cloned a putative early and late transcriptional gene 1197 *of prawn baculovirus. In order to detect the biological function of this gene*, 1197 *gene was inserted into expressing vector pGEX-3X. The fusion protein expressed with high yield was obtained, but it was found that the fusion protein locates in inclusion bodies of* E. coli *and it caused trouble in its purfication. We found that the expressed product with MW. of 66kD could be purified from inclusion bodies by using a serious of treatments of inclusion bodies with urea and guanidine hydrochloride and then by sequential FPLC chromatography.*

Key words: Baculovirus of prawn; 1197 *gene*; *Expresson and purification*

关键词：对虾白斑病毒；1997基因；表达和纯化
中图分类号：S966.12　　**文章标识码**：A　　**文章编号**：1003-5125(2002)01-0092-04

1993年以来，我国沿海省份相继发生养殖对虾大批死亡现象，损失严重，引起国内外研究者的重视。经过一段时间的努力研究后，我们报导了引起该病的病原是一种无包含体的杆形病毒[1]。此后，该病毒的一些其他特性及引起对虾的病理学及组织学的变化又陆续见诸于报导[2,3]。前文中我们报导了该病毒的一个早晚期基因1197的克隆和序列分析，并针对此基因设计了二个核酶，在体外成功地对此基因进行了切割[4]。本文报导我们对该基因进行了原核表达，并对表达产物进行了纯化的研究，以期为阐明该基因表达产物的功能打下进一步研究的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

对虾白斑病毒 *1197* 基因来源于本实验室，并构建于 *E61* 质粒之中。菌株 E. coli *DH5a*、E. coli *DE3* 为本组保存。EcoR *I* 及 BamH *I* 内切酶为 *TaKaRa* 公司产品。*pGEX-3X* 为 *Pharmacia* 公司产品。*Taq DNA* 合成酶为 *TaKaRa* 公司产品。其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *pGEX-3X*1197表达质粒的构建　根据已测得1197基因读框3'及5'端顺序合成寡聚核苷酸上游引物 *P1*：5' *CGGGATCCATGTTTAGTGAGAATTTTG*3'；下游引物 *P2*：5' *CGGAATTCTTAACCGCAGCTGCAGTTTC*3 '。用 *E61*质粒为模板，于 50μ*LPCR* 反应混合液中94℃ 5*min* 变性后，经30循环扩增(94℃ 30*s*、55℃ 30*s*、72℃ 1*min*)后再经(94℃ 30*s*、55℃ 30*s*、72℃

收稿日期：2001-05-08，修回日期：2001-07-02
* 基金项目：国家科技部海洋863项目资助(863-819-04-08)
作者简介：应智伟，硕士进修生，现通讯地址：广州第一军医大学98研究生队；E-mail: yingzhiwei@chinese.com
** 通讯作者：龚祖埙，研究员，从事分子病毒学研究。Correspondence author. Tel 021-64746510；E-mail Gongzx@sunm.shcnc.ac.cn

维普资讯 http://www.cqvip.com

10min)。产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定。用低熔点胶方法回收片段。取适量以上纯化产物用 *Eco*R I、*Bam*H I 双酶切,pGEX-3X 用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切,产物经低熔点胶回收方法进行纯化、常规连接和转化。转化的菌株为 DE3 钙细胞。用酶切和 PCR 方法筛选并鉴定含 *1197* 基因的重组表达质粒 pGEX3X-1197,然后经测序确证读框正确。

1.2.2　pGEX3X-1197 在大肠杆菌 DE3 中的表达

培养含 pGEX3X-1197 质粒的大肠杆菌 DE3 单菌落过夜,按 1∶100 比例加入到 300mL LB(含氨苄基青霉素 60μg/mL)培养瓶中,37℃ 摇 3h(OD_{600} = 0.4～0.6)。加 IPTG 到 0.2mmol/L 浓度,诱导表达 5～6h。取少量 200μL 菌液及未加 IPTG 诱导的对照菌 200μL,6 000r/min 离心 1min。沉淀用少量 PBS 洗一遍。离心后加入 50μL 2×样品缓冲液煮沸 20min,进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.3　表达产物的纯化

1.2.3.1　用谷胱甘肽(GST)亲和层析柱分离纯化融合蛋白　经诱导表达的菌液于 6 000r/min 离心 10min,沉淀用 200mL PBS 悬浮,6 000r/min 离心 10min,沉淀再用 80mL PBS 悬浮,置于 100mL 的烧杯内,冰浴下进行超声波破菌,10 000/min 离心 10min 得上清和沉淀。上清加去垢剂 Triton-X-100 至终浓度为 1%,上预先用 PBS 平衡的谷胱甘肽 S-转移酶(GST)亲和层析柱。用 PBS 洗约 10 个柱体积去除杂质,再用 10mmol/L 还原型谷胱甘肽和 50mmol/L Tris-HCl(pH8.0)洗脱,收集样品。SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.2.3.2　用 FPLC 方法纯化融合蛋白　包涵体处理:300mL 菌液破菌,10kr/min 离心 10min,沉淀悬浮于 3mL 裂解缓冲液(50mmol/L Tris-HCl (pH8.0),10mmol/L EDTA,100mmol/L NaCl),加 12mg 脱氧胆酸,400μL 10×DNA 酶缓冲液,15μL DNA 酶,37℃ 2h.10kr/min 离心 5min,沉淀用 3mL 裂解缓冲液悬浮,加 Triton X-100 至 0.5% 浓度,室温 5min。10kr/min 离心 5min,沉淀再用 3mL 裂解缓冲液悬浮,加尿素至 8mol/L 浓度,室温 1h。缓慢加入 27mL 溶解缓冲液(2% SDS,10% 甘油,5mmol/L EDTA,10mmol/L DTT,50mmol/L Tris-HCl),摇匀后对 PBS 透析,更换透析三次,间隔 2h 以上。10r/min 离心 5min,收集上清。沉淀加 3mL 6mol/L 盐酸胍,室温 1h,再缓慢加入 27mL 溶解缓冲液,对 PBS 透析后,10kr/min 离心 5min,收集上清。合并两次上清。

FPLC 方法进行分离纯化融合蛋白:将处理后的包涵体样品进行适当的浓缩后,用 A 缓冲液(50mmol/L PBS,pH7.4)透析。样品经微孔滤膜过滤后,上样 2mL。设计程序,泵入不同流速的 A 及 B 缓冲液(50mmol/L PBS,1N NaCl,pH7.4),形成 NaCl 浓度梯度,洗脱离子交换柱。收集样品,进行 SDS-PAGE。

1.2.4　表达产物的复性处理

包涵体的处理过程中,经 8mol/L 尿素室温 1h 处理沉淀及缓慢加入 27mL 溶解缓冲液溶液后,不直接对 PBS 透析,而是分别对 6mol/L 尿素、4mol/L 尿素、2mol/L 尿素和 PBS 依次透析。所得的样品经离心后,上清液经谷胱甘肽 S-转移酶(GST)亲和层析柱进行分离纯化。

2　结果

2.1　表达质粒 pGEX3X-1197 的构建与鉴定

根据已测得的对虾白斑病毒 *1197* 基因序列的 3′端和 5′端的序列,合成寡聚核苷酸上游引物 P1 和下游引物 P2,用 E61 质粒为模板 PCR 扩增后,得到对虾白斑病毒 *1197* 基因,连接到 pGEX-3X 载体上,然后进行酶切鉴定和 PCR 鉴定(图 1)。

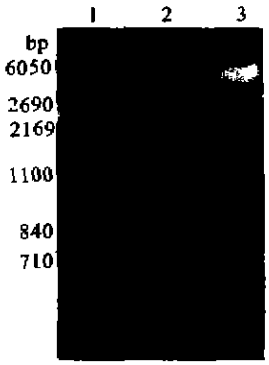

图 1　pGEX3X-1197 酶切和 PCR 鉴定

1,DNA 标准;2,PCR 产物;3,pGEX3X-1197 经 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切.

Fig.1　PCR product and cleavage of pGEX3X-1197 by *Eco*R I and *Bam*H I

1,DNA marker;2,PCR product;3,pGEX3X-1197 cleaved by *Eco*R I and *Bam*H I.

2.2　pGEX3X-1197 在大肠杆菌 DE3 中的表达和产物纯化

维普资讯 http://www.cqvip.com

pGEX-3X 表达质粒本身可编码 26kD 的 GST (谷胱甘肽 S-转移酶)，当插入含外源读框的 DNA 片段后，可表达出连接外源基因产物的，融合蛋白，可用 GST 亲和柱纯化。但 *1197* 基因在 pGEX-3X 表达质粒中表达后，产物存在于包涵体内(图 2)，因此无法直接用 GST 亲和柱进行纯化。

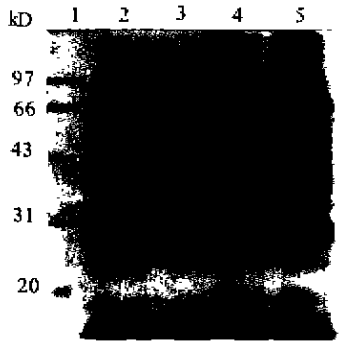

图 2 *1197* 基因表达产物的 SDS-PAGE

1、低分子量标准蛋白；2、对照菌超声波破菌后上清；3、IPTG 诱导菌的超声波破菌后上清；4、对照菌超声破菌后沉淀；5、IPTG 诱导菌超声波菌后沉淀。

Fig. 2 SDS-PAGE of the expression product of viral 1197 gene

1, Protein marker; 2, The supernatant of *E. coli* without IPTG; 3, The supernatant of *E. coli* with IPTG; 4, The pellet of *E. coli* without IPTG; 5, The pellet of *E. coli* with IPTG.

图 3 包涵体经处理后的 SDS-PAGE

1、低分子量标准蛋白；2、经 8mol/L 尿素处理包涵体产物上清；3 沉淀进一步经 6mol/L 盐酸胍处理后上清。

Fig 3 SDS-PAGE of inclusion bodies after treatment with urea and guanidine hydrochloride

1, Protein marker; 2, The supernatant of inclusion bodies after treatment with urea; 3, The supernatant of inclusion bodies after sequential treatment with guanidine hydrochloride.

对包涵体进行 8M 尿素处理后，可以在透析后的上清中得到含量较高的融合蛋白(图 3)。利用梯度尿素进行逐步透析后，再用 GST 亲和柱进行分离仍然得不到纯化的融合蛋白。

将包涵体处理后得到的上清样品用 FPLC 阴离子交换层析方法进行分离，结果除流出液峰外，还出现 4 个小峰(图 4)，对每一个峰进行 SDS-PAGE 鉴定，发现在 NaCl 浓度相当于 30% 时，即峰 2 含有分子量相当于 66kD 的蛋白。根据分子量的估计，此蛋白应为我们需要的融合蛋白(图 5)。

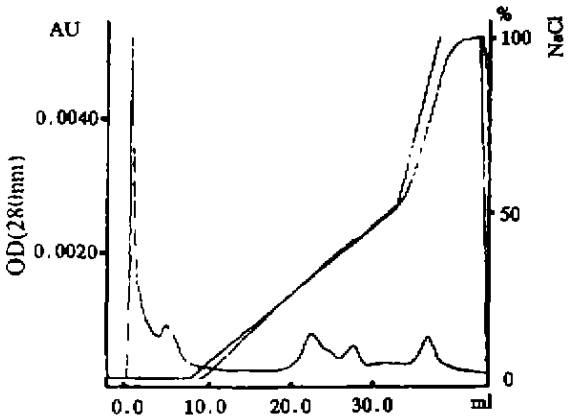

图 4 FPLC 柱层析纯化

Fig. 4 The profile of FPLC chromatogram

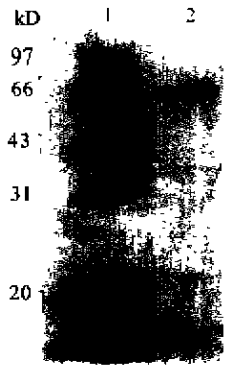

图 5 FPLC 分离纯化的融合蛋白

1、低分子量标准蛋白；2、纯化后的融合蛋白。

Fig. 5 The SDS-PAGE of purified fusion protein by FPLC

1, Protein marker; 2, Purified fusion protein.

3 讨论

对虾白斑病毒能在虾体头胸甲部产生白斑症状，是一种近年来新发现的病毒，几乎所有的病毒基因组的开放阅读框或基因结构及其产物的功能目前

维普资讯 http://www.cqvip.com

尚未能阐明。已报导的 1197 基因在 5′端非编码区具有 TATA box 和 GTGT 结构域以及 AAGGTT 早期基因启动子元件,因此是早期能转录的基因,同时该基因还具有晚期转录启动子元件 ATAAG。该读框共含 1 197bp,编码 398 个氨基酸,分子量为 455581 道尔顿。我们推测,这可能是一个分子量不很大的参与病毒复制的病毒蛋白调控因子,但其真正的生物功能尚缺少实验证据。我们用 pGEX-3X 表达作为载体,克隆构建表达质粒 pGEX3X-1197,在大肠杆菌中进行诱导和表达。与我们已研究的其他基因产物不同,该基因产物位于大肠杆菌的包含体中,虽然对包含体进行裂解后,可以获得表达量较高的产物,但纯化产物的难度很大,由于包含体裂解以及蛋白质的分离需要去垢剂,如 SDS、尿素、盐酸胍等,因而分离到表达产物常常是变性的,不能进一步用 GST 亲和层析柱纯化分离。我们使用蛋白质复性的一般方法,即逐步从高浓度到低浓度的尿素溶液进行透析,仍不能使表达产物进行很好复性,因为 GST 的亲和层析柱仍然不能结合。我们最终用尿素和盐酸胍处理和透析包涵体后,用 FPLC 阴离子层析,在 NaCl 梯度浓度相当 30%时,成功地纯化得到该基因表达的融合蛋白,从而使进一步研究其生物功能成为可能。当然,由于尿素引起的变性作用,是否会影响该蛋白质功能,尚需进一步实验证明。

参考文献

[1] 彭宝珍,任家鸣,沈菊英,等. 急性致死性对虾病的杆状病毒病原研究[J]. 病毒学报,1995,11(2):151-157.

[2] Yang F, Wnag W, Chen R Z, *et al*. A sumple and efficient method of purification of prawn baculovirus DNA[J]. J Virol Methods, 1997, 67:1-4.

[3] Huang Tie, Song X, Yu J, *et al*. Baculoviral hypodermal and pathology of the explosive epidemic disease of shrimp[J]. Marine Fisheries Res, 1995, 16:1-7.

[4] 周国瑛,吴建华,沈学仁,等. 核酶对对虾白斑病毒的一个可能的早晚期基因的体外切割[J]. 生物化学与生物物理学报,2000,32(3):253-257.