

黑胸大蠊浓核病毒磷脂酶 A₂ 功能区的克隆及其表达*

俞海洋, 张珈敏, 杨波, 蒋洪, 周亮, 卢杰,

陈伍国, 李斗林, 胡远扬**

(武汉大学生命科学院 病毒学国家重点实验室, 湖北武汉 430072)

Cloning and Expression of Phospholipase A₂ Domain of *Periplaneta fuliginosa* Densovirus in *E.coli*

YU Hai-yang, ZHANG Jia-min, YANG Bo, JIANG Hong, ZHOU Liang, LU Jie,
CHENG Wu-guo, LI Dou-lin, HU Yuan-yang**

(State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, 430072, China)

Abstract: The phospholipase A₂ functional domain of PfDNV capsid gene VP1 was obtained by RT-PCR amplification. The amplified fragment was ligated into a pMD18-T vector and sub-cloned into prokaryotic expression vector pET28a and pET26b. The recombinant plasmid pET28a-PLA and pET26b-PLA were used to transform *E. coli* BL21-codonplus (DE3) -RIL competent cells. After induction by IPTG, SDS-PAGE indicated that the highly expressed fusion protein was produced. The fusion protein was purified with Ni-NTA affinity columns and analyzed by Western blot using mouse anti-His monoclonal antibodies. The results demonstrated that the recombinant PLA₂ protein of PfDNV capsid gene was successfully expressed, which should facilitate further studies on the biological properties of the enzyme and its function in virus infection.

Key words: *Periplaneta fuliginosa* densovirus (PfDNV); phospholipase A₂ ; Prokaryotic expression

摘要: 通过 RT-PCR 扩增获得 PfDNV 结构蛋白基因 VP1 含磷脂酶 A₂(PL A₂)功能区片段,将其连接到 pMD18-T 载体上并亚克隆到原核表达载体 pET28a 和 pET26b, 构建阅读框架正确的重组表达载体 pET28a-PLA 和 pET26b-PLA, 转化大肠杆菌 BL21-codonplus(DE3)-RIL, 经 IPTG 诱导, SDS-PAGE 显示得到了目的融合蛋白, 以抗组氨酸的单克隆抗体对经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化的目的蛋白进行了 western blot 鉴定, 结果表明成功表达 PfDNV 结构蛋白 PLA₂, 对于研究该酶的生物学特性及其在病毒对细胞侵染过程中的功能奠定了基础。

关键词: 黑胸大蠊浓核病毒 (PfDNV); 磷脂酶 A₂; 原核表达

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)02-0181-05

浓核病毒(*Densoviruses*)是细小病毒科中具有亚科分类地位的类群^[1], 该类病毒无包膜, 直径为 18-26nm, 正二十面体结构, 基因组为 4000 至 6000 个核苷酸 (nt) 的单链线性 DNA, 能够自主复制, 可以使染毒的宿主细胞出现过分膨胀、细胞核浓染等病理特征^[2]。

黑胸大蠊是在我国城乡室内分布的主要蟑螂

种类^[3], 黑胸大蠊浓核病毒 (*Periplaneta fuliginosa* densovirus, PfDNV)是我室 1991 年在国内首次报道并在国内外第一个分类鉴定的蟑螂浓核病毒^[4]。其病毒理化性质^[5]、基因组结构分析^[6], 与组织病理学方面^[7]的研究均已完成。但长期以来, 由于缺乏稳定的 PfDNV 体外感染的细胞模型, PfDNV 结构蛋白的功能及其复制侵染的分子机理仍不清楚。研

收稿日期: 2005-10-18, 修回日期: 2005-11-07

作者简介: 俞海洋 (1980-), 男, 安徽省籍, 硕士研究生。

** 通讯作者: 胡远扬 (1949-), 男, 教授, 研究方向为昆虫病毒分子生物学。Corresponding author. Tel:027-68754941, E-mail:yyhu@whu.edu.cn

究发现,细小病毒最大结构蛋白(VP1) N-端序列具有磷脂酶 A₂ (PL A₂)基序与分泌型磷脂酶(如:蛇毒和蜂毒等)的基序有较高的同源性^[8]。插入缺失突变证明,该功能域在病毒粒子的侵染过程中发挥调控作用^[9]。

据此,为了更好的了解 PfdNV 结构蛋白磷脂酶 A₂ 功能域在其生命周期中的功能,本研究构建了含 PfdNV PLA₂ 功能区的重组原核表达载体,表达并纯化了融合蛋白 PLA₂,为进一步阐明它在病毒对细胞侵染过程中的功能打下了良好的基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

黑胸大蠊浓核病毒基因组全克隆质粒 PfdNV-pUC119 由我室构建和保存,原核表达质粒 pET28a 克隆菌株 *E.coli* DH5 和 Top10F' 由本室保存。表达质粒 pET26b 由武汉大学生科院沈萍教授惠赠,表达菌株 BL21-codonplus (DE3)-RIL 由武汉大学生科院唐兵教授惠赠。pMD18-T 载体购自 Takara 公司,Taq 酶和 dNTP 购自中科开瑞公司,T₄DNA 连接酶、M-MLV 逆转录酶、胶回收纯化试剂盒为 MBI 公司产品。TRIZOL 总 RNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司。Ni-NTA His-bond Resin 购自 Novagen 公司,鼠抗 His 单克隆抗体购 Nova-gen 公司,羊抗鼠 IgG 和显色反应底物 NBT/BCIP 购自 SABC 公司,PCR 引物由武汉伯杰公司合成,DNA 序列测定由北京三博远志公司完成。

1.2 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

取罹病的黑胸大蠊后肠,用 TRIZOL 试剂盒提取总 RNA,以 Oligo(dT)为引物,由 M-MLV 逆转录酶催化合成 cDNA 第一链用于 RT-PCR 进行结构基因的扩增。

1.3 PfdNV 结构蛋白基因 PLA₂ 功能区的 PCR 扩增

根据已测定的黑胸大蠊浓核病毒全基因组序列^[6],设计下列四条引物,并在引物的 5' 端引入酶切位点

A1 : 5' GCAAGCTTATGGGATCAGAG3' (*Hind*III)

A2 : 5' GTCTCGAGCGTACCTGA AAC 3' (*Xho*I)

B1 : 5' TAGAGAGCGGGATCCAGTATGGGATCAG 3' (*Bam*HI)

B2 : 5' CGTTCAGAACTCGAGGGCTTCCGTACC 3' (*Xho*I)

以 A1/A2 为一组引物克隆到 pET28a 的 *Bam*HI 和 *Xho*I 位点),B1/B2 为另一组引物(克隆到 pET26b 的 *Hind*III 和 *Xho*I 位点),以 cDNA 第一链为模板,

PCR 扩增:94 °C、预变性 5min;94 °C、45s,45 °C、45s,72 °C、50s,32 个循环;72 °C 延伸 10min。

1.4 PLA₂功能区的TA克隆与鉴定

将约740bp左右的PCR产物分别用玻璃奶DNA回收试剂盒回收,与pMD18-T vector 16 连接过夜,转化大肠杆菌DH5⁺,蓝白斑筛选阳性克隆^[10],经酶切及PCR鉴定获重组质粒pMD18-PLA-A和pMD18-PLA-B,重组子经测序进一步验证。

1.5 重组表达质粒的构建

将鉴定的 pMD-PLA-A 质粒用 *Bam*HI 和 *Xho*I 从克隆载体酶切目的基因片段,琼脂糖凝胶电泳纯化,采用 T4 DNA 连接酶与经 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切的 pET28a 表达质粒 22 连接过夜,转化 CaCl₂ 处理的大肠杆菌 *E.coli*TOP10,提取质粒酶切鉴定。以同样方法将 pMD-PLA-B 和 pET26b 质粒用 *Hind*III 和 *Xho*I 双切之后回收目的基因片段和载体大片段,连接后转化筛选。

1.6 重组蛋白的表达和亚细胞组分分析

将测序鉴定的重组质粒 pET28a-PLA 和 pET26b-PLA 转化大肠杆菌 BL21-codonplus-(DE3)-RIL,挑取单菌落,接入 LB 培养基(kan⁺和 Cm⁺) 37 °C 振荡过夜,然后按 2%的比例转接入新鲜含双抗的 LB 培养基中,37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 至 0.8,加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L。同时设阴性对照,25 °C 继续振荡培养,在不同时间取样,12%SDS-PAGE 电泳检测表达产物。

表达产物的定位:外周质部分的分离参照文献^[11]修改,高速离心收集 IPTG 诱导培养物,将细菌沉淀悬于 30 mmol/L Tris-Cl(pH8.0),20%蔗糖中,室温缓慢摇动 10 min,12 000 g 离心 10 min,沉淀重悬于 5 mmol/L MgSO₄,冰浴 10min,12 000 g 离心 10 min,上清为外周质部分。

胞内可溶和不溶性部分的分离参照文献^[10]操作,菌体沉淀重悬于 1/20 培养基体积的含 50 mmol/L Tris-Cl(pH8.0)、50 mmol/L NaCl、10mmol β-巯基乙醇、10%甘油和 0.1 mg/mL 溶菌酶的溶液中,加入 TritonX-100 至终浓度 0.1%,30 °C 摇动 20 min 后冰浴超声破碎,加入 DNase 和 RNase,冰浴 30min,12 000 g,4 °C 离心 15 min,上清为可溶性部分,沉淀为包涵体。取透析浓缩后的周质组分、菌体超声后的上清以及沉淀电泳分析,其余部分 -20 °C 冻存备用。

1.7 PLA₂ 表达产物的亲和纯化

参照使用说明书,非变性条件下采用特异性亲和 6×组氨酸的 Ni-NTA 柱纯化。首先用平衡液

50mmol/L Na₃PO₄(pH8.0) 500mmol/L NaCl 平衡, 然后将分离的可溶性周质上清以 1mL/min 流速上柱, 收集穿流峰。然后用 50mmol/L Na₃PO₄ (pH6.0)、500mmol/L NaCl 洗涤, 再用此溶液与 50mmol/L Na₃PO₄ (pH6.0), 500mmol/L NaCl、500mmol/L 咪唑进行洗脱。收集各洗脱峰进行 SDS-PAGE 分析。

1.8 PLA₂ 融合蛋白的鉴定

采用 Western 印迹法进行, 将纯化后的蛋白电泳后过夜电转到醋酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 膜用 3%BSA 的 TBS(pH=7.4) 封闭 2h, TBST(加入 0.2% Tween 20) 洗膜 3 次, 鼠抗 6×His 单克隆抗体作为一抗 (1:1000, TBS 稀释), 室温孵育 1h, TBST 洗膜 3 次 (30min), 再加入羊抗鼠的碱性磷酸酶标记的 IgG 二抗血清 (1:1000), 室温孵 1h, 加入底物 NBT/BCIP 显色。

2 结果

2.1 重组 PCR 扩增 PLA₂

用上述表达引物 A1/A2、B1/B2 可分别扩增出约 740bp 的 PL A₂ 功能区片段, 与预期目的基因条带大小相符。序列测定表明其与已报道的序列同源性达 100%。

2.2 重组质粒的酶切鉴定

T 载体连接产物的酶切鉴定如图 1 所示, 重组质粒 pMD18-PLA-A 用 *Bam*HI 和 *Xho*I 进行双酶切, 重组质粒 pMD18-PLA-B 用和 *Hind*III 和 *Xho*I 双酶切, 电泳结果与预期相符, 表明目的基因片段已连入 T 载体。

同样重组表达质粒 pET28a-PLA₂/pET26b-PLA₂ 分别采用 *Bam*HI+*Xho*I/*Hind*III+*Xho*I 进行双酶切, 得到两条条带, 大小分别为 740bp、5.3kb 左右, 与预期分子量大小相符。经测序证明。两种重组质粒中含有目的基因且具有正确的读码框和向位。由此可知得到的是阳性表达载体, 见图 2。

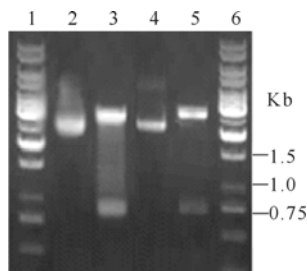


图 1 重组质粒 pMD18-T-S9 的酶切分析

Fig. 1 Restriction analysis of recombinant T-vector
1, DNA Marker; 2, pMD18-PLA-A; 3, pMD18-PLA-A digested with *Bam*HI and *Xho*I; 4, pMD18-PLA-B; 5, pMD18-PLA-B digested with *Hind* III and *Xho*I.

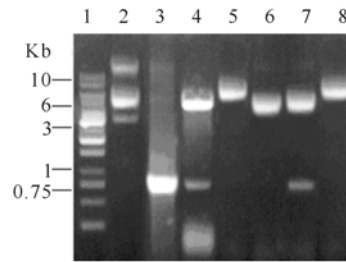


图 2 重组质粒 pET28a-PLA 和 pET26b-PLA 的酶切分析
Fig. 2 Restriction analysis of recombinant plasmid pET28a-PLA and pET26b-PLA

1, Marker; 2, pET28a-PLA plasmid; 3, PCR product of pET28a-PLA; 4, pET28a-PLA digested with *Bam*HI and *Xho*I; 5, pET28a-PLA digested with *Xho*I; 6, pET26b digested with *Hind*III; 7, pET28a-PLA digested with *Hind*III and *Xho*I; 8, pET28a-PLA digested with *Xho*I.

2.3 RLA₂ 蛋白的表达和纯化结果

SDS-PAGE 分析表明, 经 IPTG 诱导, pET28a-PLA 和 pET26b-PLA 转化菌的总蛋白样品中都出现约 29KDa 的特异蛋白带, 与预期分子量大小一致。说明 *Pf*DNV 磷脂酶 A₂ 功能区在 pET28a 和 pET26b 两种表达系统中均得到成功表达。如图 3 所示, pET28a-PLA 融合蛋白在诱导 1h 内就有表达, 而且表达量较大, 在菌体中以包涵体形式存在。凝胶自动扫描分析 pET28a-PLA 重组蛋白占菌体总蛋白的 20%。

表达产物的亚细胞定位显示, pET26b-PLA 重组蛋白在细菌周质空间, 可溶性上清和不溶性沉淀中均有存在 (如图 4 所示)。其中分泌表达占周质总蛋白的 22%, 可溶性表达占上清的 25%, 包涵体占沉淀的 16%。同时, 在周质组分分析中, 29KDa 的表达蛋白带下方还有一条分子量约为 26KDa 的特异蛋白带, 与预计的重组蛋白在周质空间内信号肽被切割后的成熟蛋白分子量相一致, 说明表达产物分泌进入周质空间后大部分可被切割, 但切割效率不完全。

收集周质组分, 经 Ni-NTA 树脂亲和层析进行纯化后表达蛋白的纯度达 85%。图 4 最右边的泳道为纯化后的可溶性蛋白。

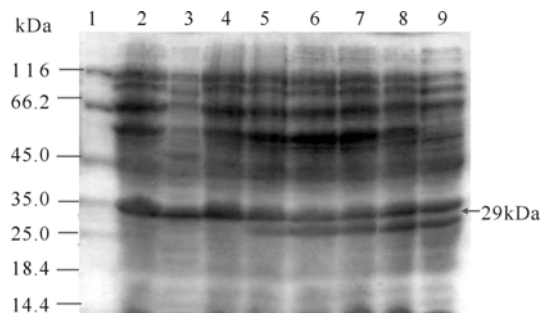


图 3 pET28a-PLA 在不同时间条件下的原核表达

Fig.3 Prokaryotic expression of pET28a-PLA at different time
1, Marker; 2, pET28a induced; 3, pET28a uninduced; 4, pET28a-PLA uninduced 5~9, pET28a-PLA induced 1~5h, respectively.

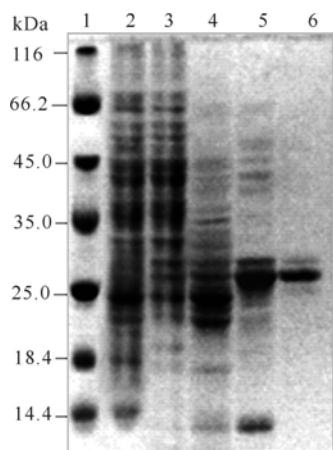


图 4 pET26b-PLA 表达产物的亚细胞定位

Fig.4 The sub-cellular location of pET26b-PLA expressed products

1, Marker; 2, pET26b-PLA uninduced total cell lysate; 3, pET26b-PLA induced pellet fraction; 4, pET26b-PLA induced supernatant fraction; 5, pET26b-PLA periplasmic fraction; 6, Ni-NTA purified pET26b-PLA.

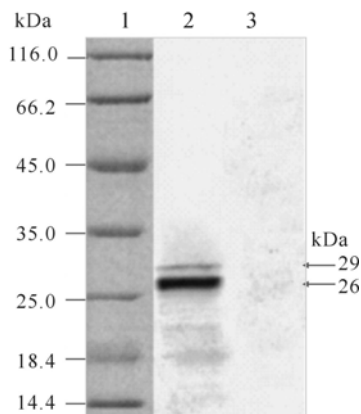


图 5 Western blot 检测

Fig.5 Analysis of western blot

1, Marker; 2, Purified pET26b-PLA fusion protein; 3, Control.

2.4 Western blott 结果

以小鼠抗 6 X His 为一抗进行蛋白质印迹结果显示纯化的 pET26b-PLA 在 26kd 和 29kd 处有明显的免疫杂交带,而作为阴性对照的诱导前细菌裂解上清无任何条带出现。说明 Ni-NTA 树脂亲和层析有效纯化了 pET26b-PLA(图 5)。

3 讨论

磷脂酶 A₂ 是专一性水解磷脂 sn-2 酯键,生成脂肪酸和溶血磷脂的一类酶^[12]。它分为三种类型,分泌型 sPLA₂,胞浆型 cPLA₂ 和非钙离子依赖型 iPLA₂,普遍存在于蜂毒、蛇毒、牛胰腺及炎症患者的炎性滑液中,在脂类膜代谢、信号转导途径、炎症和感染的发生、发展中起重要作用^[13]。

对浓核病毒的基因组序列分析显示, *PfDENV* 最

大的结构蛋白 N 端区域 VP1up 含 PLA₂ 功能区与分泌型 sPLA₂ 的活性区氨基酸序列具有较高的同源性,其第 156-160 位残基的序列 YLGPG 与 sPLA₂ 催化活性区 (catalytic helix) 的保守位点 YXGXXG 相一致,第 179-183 位残基的序列 HDKAY 也符合 sPLA₂ 的钙离子结合区域 (Ca²⁺ binding loop) 的保守位点 HDXXY^[14]。而这两处基序 (motif) 在细小病毒代表种猪细小病毒 (PPV) 和浓核病毒代表种大蜡螟浓核病毒 (GmDENV), 家蚕浓核病毒-I 型 (BmDENV-I) 结构蛋白序列中都是非常保守的^[15,16]。据此推测,该序列所在的区域可能是 VP1 蛋白的重要结构域,可特异性催化磷脂膜的裂解,在病毒粒子对宿主细胞的侵染过程中发挥重要作用。

本研究采用的 pET28a 和 pET26b 原核表达载体表达的产物 C 末端均带有 6 个组氨酸,融合蛋白可以用镍离子亲和柱快速、简便地纯化。鉴定结果表明重组表达质粒在大肠杆菌中获得了高效表达, pET28a 为胞质融合表达载体,诱导表达的融合蛋白分子量约为 29 KDa,表达量较高,基本以包涵体形式存在,可用于制备抗血清。pET26b 通过 N 末端融合 pelB 信号肽可将产物分泌到大肠杆菌内膜 and 细菌外膜之间的周质。在周质内氧化环境下形成二硫键,信号肽被切除,形成可溶性活性蛋白。通过设计引物构建正确阅读框架,诱导表达的融合蛋白分子量为 29 KDa,切除 pelB 信号肽后分子量为 26 KDa。可溶性形式虽然产量一般低于包涵体表达,但不仅很容易纯化,而且省去了包涵体中蛋白的变性、复性等复杂步骤,能使蛋白保持天然构象,可避免细菌蛋白酶的降解,降低蛋白对宿主细胞的毒性作用有利于其免疫原性和活性的保持,这些初始工作为下一步抗血清的制备和对其酶学特性和生物学特性的深入研究奠定了基础。

致谢: 武汉大学生科院微生物遗传室沈萍教授和唐兵教授对本研究给予了大力支持和热情帮助,在此表示衷心地感谢。

References

- [1] Tijssen P, Bergoin M. Densocleosis viruses constitute an increasingly diversified subfamily among the parvoviruses [J]. *Seminars in Virology*, 1995, 6: 347-355.
- [2] Lv H S (吕鸿声). *Insect viruses and insect viruses diseases (昆虫病毒与昆虫病毒病)* [M]. Beijing: Science press, 1982: 125-128.
- [3] Wu F Z (吴福祯). *Several kinds of Cockroach in Chinese Periplaneta Genus and their distribution, growth characteristics and*

- economic importance [J]. *Acta Entomologica Sinica* (昆虫学报), 1982, 25 (4): 416-422.
- [4] Hu Y Y, Huang Y D, Liang D R, (胡远扬, 黄远达, 梁东瑞) *et al*. The discovery of the *Periplaneta fuliginosa* inclusion body Virus[J]. *J Wuhan Univ (Natural Science Edition)* (武汉大学学报-自然科学版), 1991, 1: 114.
- [5] Hu Y, Zheng J, Iizuka T, *et al*. A densovirus newly isolated from the smoky-brown cockroach *Periplaneta fuliginosa* [J]. *Arch Virol*, 1994, 138: 365-372.
- [6] Guo H, Zhang J, Hu Y. Complete nucleotide sequence and genomic organization of *Periplaneta fuliginosa* densovirus [J]. *Chinese Sci Bull*, 2000, 45 (19): 1782-1786.
- [7] Liu W B, Hu Y Y, Zhang J M (刘文斌, 胡远扬, 张珈敏). Cytopathology of *Periplaneta fuliginosa* Densovirus [J]. *J Hubei Univ (Natural Science Edition)* (湖北大学学报-自然科学版), 1998, 20 (1): 90-93.
- [8] Zadori Z, Szelei J, Lacoste M C, *et al*. A viral phospholipase A₂ is required for parvovirus infectivity [J] *Dev cell*, 2001, 1: 291-302.
- [9] Girod A, Wobus C, Zadori Z, *et al*. The Vp1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A₂ domain required of virus infectivity [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83: 973-978.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* [M]. 2nd Ed, New York: Cold Spring Harbor Press Laboratory Press, 1989.
- [11] Yang H J, Zhang J, Luo W X, (杨海杰, 张军, 罗文新) *et al*. Construction and application of an efficient, stable secretion prokaryotic expression vector [J]. *Letters in Biotechnology (生物技术通讯)*, 2003, 14 (6): 494-498.
- [12] Murakami M, Nakatani Y, Atsumi G, *et al*. Regulatory functions of phospholipase A₂ [J]. *Crit Rev Immunol*, 1997, 17: 225-283.
- [13] Balsinde J, Balboa M A, Insel P A, *et al*. Regulation and inhibition of phospholipase A₂ [J]. *Annu Rev Pharmacol*, 1999, 39: 175-189.
- [14] Dennis A. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes [J]. *Trends Biochem Sci*, 1997, 22: 1-2.
- [15] Canaan S, Zadori Z, Ghomashchi F, *et al*. Interfacial Enzymology of Parvovirus phospholipases A₂ [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (15): 14502-14508.
- [16] Li Y, Zadori Z, Bando H, *et al*. Genome organization of the densovirus from *Bombyx mori* (BmDENV-1) and enzyme activity of its capsid [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82: 2821-2825.