

用不同载体在大肠杆菌中表达 汉滩病毒囊膜糖蛋白 G1 和 G2

黄长形 杨为松¹ 杭长寿^{2*} 白雪帆 李光玉

(第四军医大学唐都医院传染科, 西安 710038)

¹(中国预防医学科学院病毒学研究所, 北京 100052)

R373.32

A

摘要 为提高汉滩病毒囊膜糖蛋白 G1 和 G2 的表达水平, 利用两种不同的表达载体 pKK223-3 和 pGEX-4T-1 构建 G1 和 G2 的表达质粒, 其中 pGEX-4T-1 为融合蛋白表达载体。诱导所构建的 G1 和 G2 表达质粒表达 G1 和 G2, 用表达的 G1 和 G2 免疫小白鼠诱导产生的抗汉滩病毒特异性的间接免疫荧光抗体滴度无明显差别, 从而说明表达载体对汉滩病毒 G1 和 G2 在大肠杆菌中的表达水平影响不大, 表达水平都较低。同时, 利用 pGEX-4T-1 构建 G1 和 G2 的部分多肽的表达质粒, 但表达水平较完整的 G1 和 G2 无明显提高。

关键词 汉滩病毒, 囊膜糖蛋白 G1, 囊膜糖蛋白 G2, 表达载体, 大肠杆菌;

外源蛋白在大肠杆菌中的表达水平受编码蛋白质的基因与表达载体质粒双重制约, 只有在编码蛋白质的基因与表达载体相匹配的情况下, 蛋白质才能得到高效表达。换句话说, 一种高效表达载体可以高效表达某些蛋白, 而不能高效表达另一些蛋白质。一种蛋白质可在某一高效载体中得以高效表达, 而在另外一些高效表达载体中就不能高效表达。虽然在表达载体 pBV220 中汉滩病毒 G1 和 G2 蛋白表达水平低, 但使用其它表达载体也许会提高它们的表达量, 因此, 在本研究中我们尝试用其它两种高效表达载体 pKK223-3 和 pGEX-4T-1 表达 G1 和 G2。pGEX-4T-1 是一种高效融合蛋白表达载体, 它消除了外源基因起始信号 ATG 周围核酸序列对其表达水平的影响, 同时融合蛋白有可能减少表达蛋白质对宿主细胞的毒性, 这都有利于外源蛋白在大肠杆菌中的表达。

本研究还利用 pGEX-4T-1 分别表达了 G1 和 G2 蛋白的前半部多肽, 目的有两个: (1) 研究 G1 和 G2 蛋白前半部多肽的免疫特性; (2) 期望能提高表达量。因为 G1 和 G2 编码基因中含有大量大肠杆菌的稀有密码子, 妨碍了 G1 和 G2 在大肠杆菌中的表达, 缩短表达蛋白的长度, 减少稀有密码子, 也许会提高大肠杆菌对目的产物的表达水平。

材料和方法

1 材料

表达载体质粒 pGEX-4T-1 和 pKK223-3 由本室保存, pGEX-4T-1 为融合蛋白表达载体质粒, 质粒

收稿日期: 1996-12-06, 修回日期: 1997-03-24

** 其他作者: 第四军医大学唐都医院传染科 孙水涛 李新红 张文彬 周水兴

pBV76G1 和 pBV76G2 由本室构建,其余实验材料来源见参考文献^[3]。

2 方法

2.1 用 pKK223-3 构建汉滩病毒 G1 和 G2 表达质粒

利用 EcoRI 和 PstI 两个酶切位点将 G1 和 G2 编码区基因克隆到质粒 pKK223-3 中构建表达质粒。质粒构建过程见示意图 1。用酶切图谱方法对克隆的阳性质粒进行鉴定。

2.2 用 pGEX-4T-1 构建汉滩病毒 G1 和 G2 表达质粒

利用 EcoRI 和 SalI 两个酶切位点,将 G1 和 G2 编码区基因克隆到质粒 pGEX-4T-1 中构建表达质粒。详细构建过程见示意图 2。通过此方法构建的表达质粒表达的融合蛋白中,G1 和 G2 的“开放读码框”没有发生改变。构建的表达质粒用酶切方法鉴定。

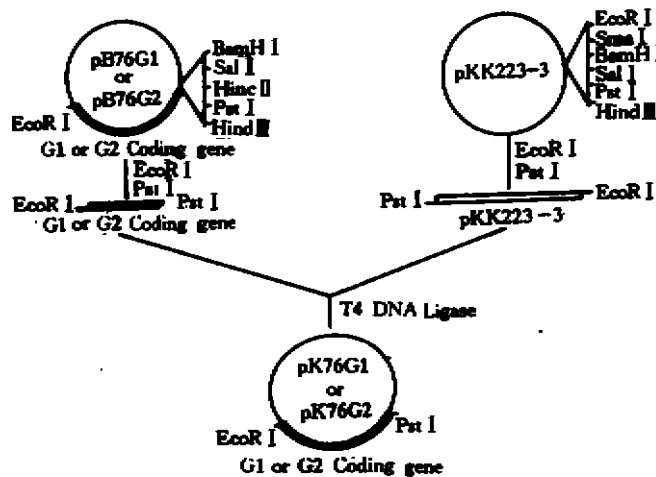


图 1 质粒 pK76G1 和 pK76G2 构建过程示意图

Fig 1 Construction of expressed plasmid pK76G1 and pK76G2

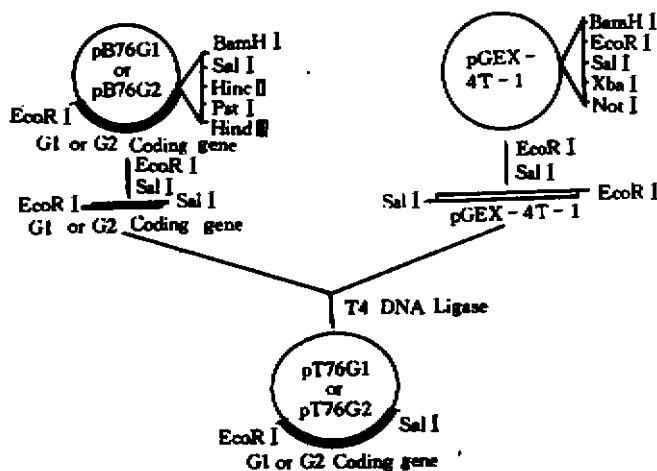


图 2 质粒 pT76G1 和 pT76G2 构建过程示意图

Fig 1 Construction of expressed plasmid pT76G1 and pT76G2

2.3 用 pGEX-4T-1 构建 G1 和 G2 部分编码基因的表达质粒

由于表达载体 pGEX-4T-1 上多克隆酶切位点之后有两个可利用的终止密码子,故利用其构建 G1 和 G2 部分 M 编码基因的表达质粒。

2.3.1 G1 部分编码区基因表达质粒的构建

G1 编码区基因上有一个 ClaI 酶切位点,切点位于 1274 位核苷酸,质粒 pGEX-4T-1 中无此酶切位点,

故选用 Cla I 和 Sal I 酶切缺失 G1 羧基末端的部分核酸序列, 构建表达 G1 氨基末端 421 个氨基酸残基多肽的表达质粒。用 EcoRI 和 Sal I 共同酶切质粒 pT76G1, 回收大片段(约 6.2 kb 大小), 以 Klenow 片段补平酶切位点的粘性末端后, 用 T4DNA 连接酶加以连接。构建过程详见示意图 2~3, 用酶切方法加以鉴定。构建的表达质粒利用了载体质粒的终止密码子, 防止了通读现象发生。

2.3.2 G2 部分编码区基因表达质粒的构建

同样利用 pGEX-4T-1 构建 G2 部分编码区基因的表达质粒。为了利用表达载体上的终止密码子, 采用下述方法构建表达 G2 氨基末端 222 个氨基酸残基的多肽表达质粒。

经 EcoRI 和 Sal I 共同酶切的表达载体 pGEX-4T-1 回收后备用。用 EcoRI 和 BstEII 共同酶切质粒 pT76G2, 回收约 0.65 kb 大小的 G2 氨基末端编码区基因。用 T4DNA 连接酶连接上述回收的核酸片段, 连接后用 Klenow 片段将不匹配的 BstEII 和 Sal I 酶切位点的粘性末端补平, 补平后再用 T4 DNA 连接酶加以连接。详细构建过程见示意图 2~4, 同样用酶切方法加以鉴定。

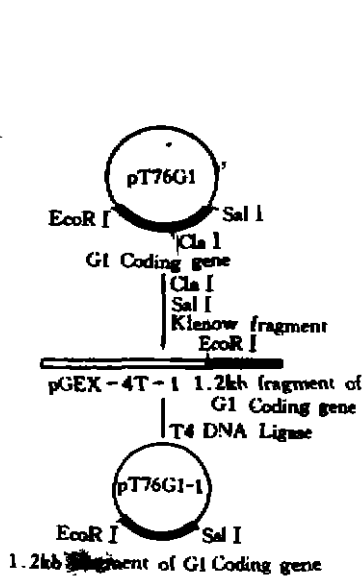


图3 质粒 pT76G1-1 的构建示意图
Fig 3 Construction of expressed plasmid pT76G1-1

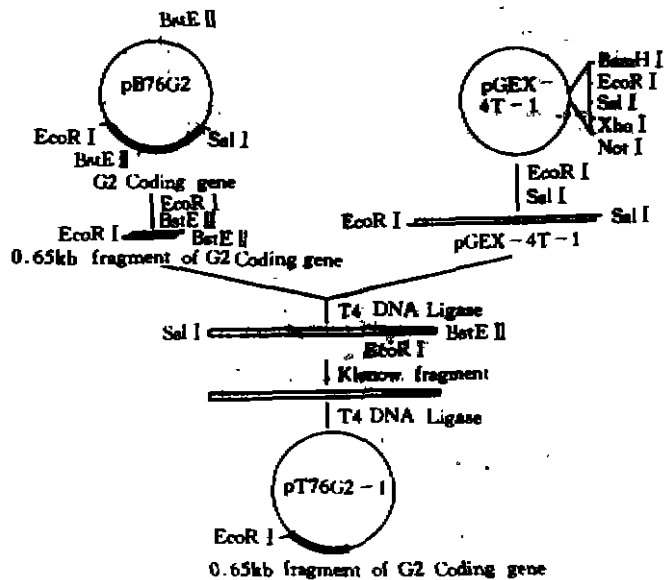


图4 质粒 pT76G2-1 构建的示意图
Fig 4 Construction of expressed plasmid pT76G2-1

表达载体 pKK223-3 和 pGEX-4T-1 启动子 Tac 都需用 IPTG 诱导表达, IPTG 的终浓度均为 1 mmol/L。

2.4 用表达的 G1 和 G2 及 G1 和 G2 氨基末端多肽免疫小鼠。

用诱导表达的细菌免疫小鼠, 免疫方法同参考文献^[2]。用间接荧光法检测免疫小鼠血清中抗汉滩病毒抗体的滴度。

结 果

1 表达质粒的构建

目的质粒的酶切鉴定结果见图 5~8。

用 pKK223-3 构建的 G1 和 G2 表达质粒分别命名为 pK76G1 和 pK76G2。用 pGEX-4T-1 构建的 G1 和 G2 完整编码区基因的表达质粒分别命名为 pT76G1 和 pT76G2。构建的

G1 和 G2 缺失基因的表达质粒命名为 pT76G1-1 和 pT76G2-1。

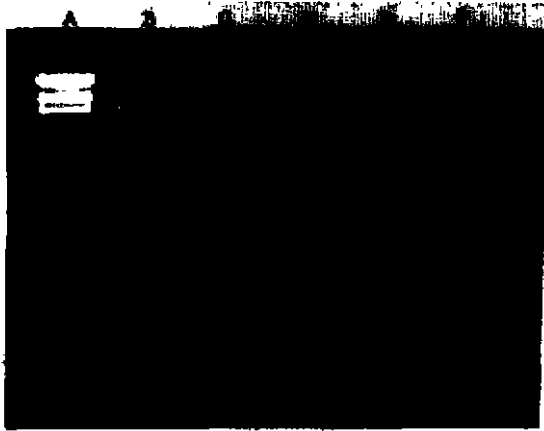


图 5 质粒 pK76G2 限制性内切酶分析

Fig 5 The analysis of plasmid pK76G2 with restriction endonucleases

(A. λ DNA/HindIII; B. EcoRI; C. EcoR I and Pst I; D. BamHI; E. Hinc II; F. BstE II)



图 6 质粒 pT76G1 限制性内切酶分析

Fig 6 The analysis of plasmid pT76G1 with restriction endonucleases

(A. λ DNA/HindIII; B. EcoRI; C. EcoRI and SalI; D. BamHI; E. Cla I; F. Pvu II)

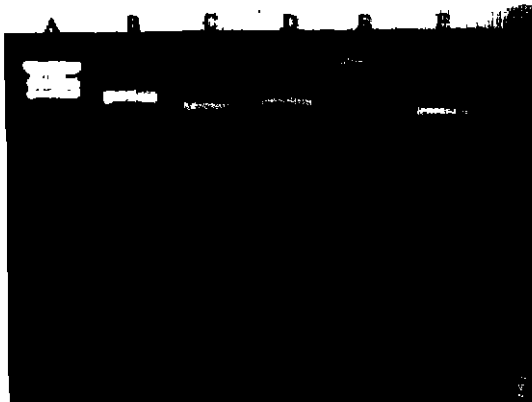


图 7 质粒 pT76G1-1 限制性内切酶分析

Fig 7 The analysis of plasmid pT76G1-1 with restriction endonucleases

(A. λ DNA/HindIII; B. EcoR I; C. EcoR I and Sal I; D. BamHI; E. HindIII; F. Pvu II; G. Cla I)



图 8 质粒 pT76G2-1 限制性内切酶分析

Fig 8 The analysis of plasmid pT76G2-1 with restriction endonucleases

(A. λ DNA/HindIII; B. EcoRI; C. BamHI; D. BstE II; E. Hinc II)

2 G1 和 G2 的表达

经 SDS-PAGE 发现,用 pKK223-3 构建的 G1 和 G2 表达质粒 pK76G1 和 pK76G2,表达 G1 和 G2 的水平仍然很低,看不出明显表达的蛋白质条带;而在用 pGEX-4T-1 构建的 G1 表达质粒 pT76G1 诱导后的 SDS-PAGE 凝胶上明显可见一分子量约为 108kD 表达产物

带,但 G2 表达质粒 pT76G2 诱导后在 SDS - PAGE 凝胶上仍未见明显的表达产物,表达产物 SDS - PAGE 结果见图 9 和图 10。

表达质粒 pT76G1 - 1 和 pT76 G2 - 1 诱导表达后的 SDS - PAGE 凝胶上也未见明显的预期表达产物带,见图 11。



图 9 pK76G1 和 pK76G2 表达产物 SDS - PAGE 的结果

Fig 9 The SDS - PAGE expression product of plasmid pK76G1 and pK76G2 (A. Protein molecular weight standard; B. pKK223 - 3, Induction; C. pK76G1, Non - induction; D. pK76G1, Induction; E. pK76G2, Non - induction; F. pK76G2, Induction)

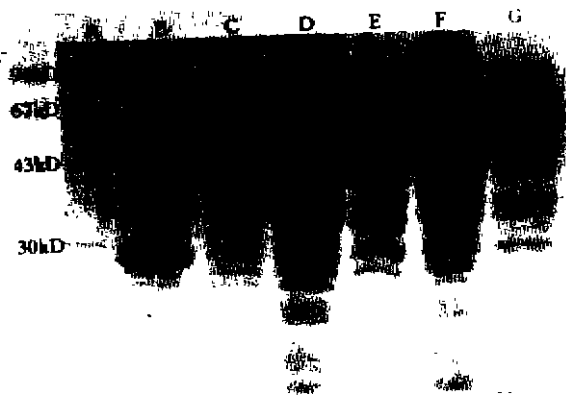


图 10 pT76G1 和 pT76G2 表达产物 SDS - PAGE 的结果

Fig 10 The SDS - PAGE of expression product of plasmid pT76G1 and pT76G2 (A. Protein molecular weight standard; B. pGEX - 4T - 1, Induction; C. pT76G1, Non - induction; D. pT76G1, Induction; E. pT76G2, Non - induction; F. pT76G2, Induction; G. pT76NP, Induction)

3 表达的蛋白质免疫小鼠

6 个表达质粒诱导后的菌体裂解液都能刺激小鼠产生抗汉滩病毒特异性抗体,但抗体滴度无明显差别,详细结果见表 1。

表 1 不同表达质粒表达的 G1、G2 及其多肽免疫小鼠抗汉滩病毒抗体的滴度
Table 1 The antibody IFA titer of sera of mice immunized with expressed G1 and G2

鼠号 Mouse No	抗体滴度 Antibody titer					
	pK76G1	pK76G2	pT76G1	pT76G2	pT76G1 - 1	pT76G2 - 1
1	1:320	1:320	1:320	1:640	1:640	1:320
2	1:160	1:320	1:160	1:320	1:640	1:320
3	1:160	1:160	1:160	1:160	1:320	1:320
4	1:80	1:160	1:40	1:40	1:160	1:160
5	1:40	1:160	1:40	1:20	1:160	1:160
6	1:40	1:20	1:20	-	1:160	1:160

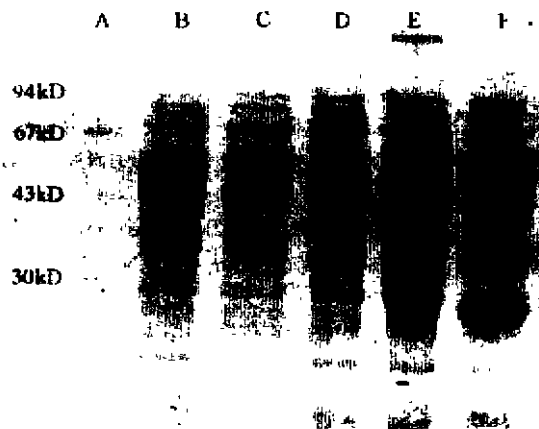


图 11 pT76G1-1 和 pT76G2-1 表达产物 SDS-PAGE 的结果

Fig 11 The SDS-PAGE of expression product of plasmid pT76G1-1 and pT76G2-1 (A. Protein molecular weight standard; B. pGEX-4T-1, Induction; C. pT76G1-1, Non-induction; D. pT76G1-1, Induction; E. pT76G2-1, Non-induction; F. pT76G2-1, Induction)

讨 论

影响外源基因在大肠杆菌中表达水平的因素包括:载体(启动子)和宿主菌的选择,培养条件的控制,外源蛋白编码基因密码子及 mRNA 二级结构等^[3]。启动子是影响外源基因表达水平的关键因素,外源蛋白对启动子有一定的选择性,虽然目前所用表达载体上的启动子都为强启动子,但一种外源蛋白在含不同启动子的载体中表达水平不一致。基于这一点,我们选择了与 pBV220(P_RP_L)含有不同启动子的表达载体 pKK223-3(P_{tac})和(pGEX-4T-1(P_{tac}))重新构建汉滩病毒 G1 和 G2 的表达质粒,期望能够提高 G1 和 G2 的表达水平,实验结果证实用 pKK223-3 和 pGEX-4T-1 构建的 G1 和 G2 表达质粒不能明显提高 G1 和 G2 的表达水平。

在这种情况下,我们分析了 G1 和 G2 编码区基因密码子,发现 G1 和 G2 中含有大量大肠杆菌的稀有密码子,稀有密码子越多,外源蛋白在大肠杆菌中的表达水平越低。我们想通过缺失突变的方法表达部分 G1 和 G2 的多肽,也许多肽的表达量较高;同时还可研究 G1 和 G2 的缺失突变体的免疫原性等特性。故利用内切酶分别构建了 G1 和 G2 的缺失突变体表达质粒,它们分别含有 G1 编码区基因的 5' 末端 1234 个碱基和 G2 编码区基因的 5' 末端的 665 个碱基,实验结果证实它们的表达量较完整 G1 和 G2 无明显提高,因为用这两种表达质粒表达的多肽免疫小鼠后,小鼠产生抗汉滩病毒抗体的滴度无明显升高。

Schmaljohn^[4]和石晓宏^[5]分别用重组痘苗病毒和杆状病毒成功地表达了汉滩病毒的 G1 和 G2 蛋白,但表达水平都较低,表达的 G1 和 G2 免疫小鼠所诱导产生的抗汉滩病毒抗体的滴度都低于本研究的结果,综合上述结果,我们认为要高效表达汉滩病毒囊膜糖蛋白 G1 和 G2 很难在大肠杆菌中高效表达,要高效表达汉滩病毒的 G1 和 G2 糖蛋白,可能需要对它们的编码基因进行一定的改造。

参 考 文 献

- 1 黄长形, 杨为松, 杭长寿等. 在大肠杆菌中分别表达汉滩病毒囊膜糖蛋白 G1 和 G2. 中国病毒学, 1997, 12(4): 313-321
- 2 黄长形, 李光玉, 杨为松等. 原核细胞表达的肾综合征出血热病毒核蛋白免疫原性和免疫保护作用的研究. 中国病毒学, 1995, 11(3): 225-229
- 3 隋广超, 胡美洁. 影响大肠杆菌中外源基因表达的因素. 生物化学和生物物理进展, 1994, 21(2): 128-132
- 4 Schmaljohn CS, Chu YK, Schmaljohn AL *et al.* Antigenic subunits of Hantaan Virus expressed by baculovirus and vaccinia virus recombinants. J Virol, 1990, 64(7): 3162-3170
- 5 石晓宏, 宋干, 杭长寿等. 重组杆状病毒表达汉坦病毒结构蛋白在实验动物中的免疫应答. 中华微生物学和免疫学杂志, 1995, 15(4): 238-241

Expression of Hantaan Virus Envelope Glycoproteins G1 and G2 in *E. coli* with Differential Expression Vector

Huang Changxing Yang Weisong Hang Changshou *et al*

(Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038)

For increasing the expression level of Hantaan virus envelope glycoproteins G1 and G2 in *E. coli*, the expression vector pKK223-3 and pGEX-4T-1 were used for constructing G1 and G2 expression plasmids, pGEX-4T-1 was a fusion-protein expression vector plasmid. The results showed that the expression levels of Hantaan virus envelope glycoproteins G1 and G2 with differential expression vector plasmids were not obvious different. The expression levels of the portion of G1 and G2 proteins were about the same with the complete G1 and G2.

Key words Hantaan virus, Envelope glycoprotein G1, Envelope glycoprotein G2, Expression