

棉铃虫核多角体病毒泛素基因的克隆表达及抗体制备*

李京京¹, 姚青¹, 杨东叶¹, 余泽华^{1**}, 陈新文²

(1. 华中师范大学昆虫学研究所, 武汉 430079; 2. 中国科学院武汉病毒研究所分子病毒学实验室, 武汉 430071)

Cloning and Expression of Ubiquitin Gene of *Helicoverpa armigera* Single-nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus and its Antiserum Preparation

LI Jing-jing¹, YAO Qing¹, YANG Dong-ye¹, YU Ze-huai^{1**}, CHEN Xin-wen²

(1. Institute of Entomology, Central China Normal University, Wuhan 430079, China; 2. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: Baculoviruses and entomopoxvirus are the viruses which have been reported so far having ubiquitin gene. The ubiquitin gene of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (HaSNPV) was amplified by PCR. Nucleotide analysis showed that it was 252bp, encoded 83 amino acids with a predicted size of 9.24kDa. The PCR product containing ubiquitin gene was inserted into pET-28a expressive vector. The Ubi-His-tag fusion protein was expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The fusion protein was identified by Western blotting with His-tag antibody. The expressions conditions including the concentrations of IPTG and the inducing times were optimized to achieve optional expression. The antibody anti the HaSNPV ubiquitin was produced in rabbit with purified ubiquitin fusion protein, and further study on the function of HaSNPV UBI is underway.

Key words: HaSNPV; Ubiquitin; Gene clone; Prokaryotic expressing; Antiserum

摘要: 昆虫杆状病毒和痘病毒是目前已知唯一编码泛素基因的病毒。通过 PCR 方法, 克隆了棉铃虫核多角体病毒 (HaSNPV) 泛素基因 (Ubiquitin, Ubi)。序列分析表明, 该基因编码区全长 252bp, 编码 83 个氨基酸残基, 预计分子量为 9.24kDa。将泛素基因克隆到原核表达载体 pET-28a 上, 构建重组质粒 pET-Ubi, 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, IPTG 诱导表达融合蛋白。用 His-tag 抗体检测目的蛋白, Western blot 实验证明所表达的蛋白是带有 His-tag 的重组融合蛋白。通过改变 IPTG 浓度和诱导时间对表达条件进行了优化。利用 NF 琼脂糖凝胶亲和和层析柱纯化目的蛋白, SDS-PAGE 鉴定为单一条带, 同时用提纯蛋白制备了特异性抗体, 为进一步的研究打下基础。

关键词: 棉铃虫核多角体病毒; 泛素; 克隆; 原核表达; 抗血清

中图分类号: Q789 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)03-0298-05

泛素 (ubiquitin, Ubi) 是一种由 76 个氨基酸组成的小分子蛋白质^[1], 广泛存在于各种真核生物中, 且蛋白序列高度保守。目前所知, 泛素主要通过泛素-蛋白水解酶复合体通路 (Ubiquitin-proteasome pathway, UPP) 途径高效并高度选择性地对细胞内蛋白进行完全或部分降解, 尤其是半衰期短的, 变性的, 异常蛋白质及某些调节因子和信号转导蛋白等。

该途径参与细胞的多种生理生化过程, 如细胞周期调控、信号转导、转录调节、DNA 损伤修复、细胞程序性死亡等^[2], 在细胞生命周期中起着重要的作用。

自八十年代末以来, 人们先后在一些植物病毒和动物病毒中发现了泛素相关蛋白或泛素化病毒蛋白。非洲猪瘟病毒 (*Africa swine fever virus*, ASFV) 编码一种与泛素连接酶同源的蛋白质^[3]。

收稿日期: 2004-11-17, 修回日期: 2005-01-24

* 基金项目: 国家重点基础研究发现规划项目 (973 计划) (No. 2002CCCA02800), 国家自然科学基金资助项目 (No. 39870039)

作者简介: 李京京 (1980-), 女, 硕士研究生, 主要从事杆状病毒研究。Email: pandali1980@hotmail.com

** 通讯作者: 余泽华 (1945-), 男, 教授。Corresponding author. Email: zehuayu@sohu.com

在单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus I, HSV-I)感染的Hela细胞中,病毒通过其转录因子ICP4诱导宿主的多聚泛素基因的表达,从而影响宿主的泛素系统^[4]。Putterman等人在鸟类逆转录病毒中发现大量宿主编码的游离泛素,数量达到每个病毒粒子中含100个泛素分子^[5]。最近在人免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus I, HIV-I)、猿猴免疫缺陷病毒(Simian immunodeficiency virus, SIV)及鼠白血病病毒(Murine leukemia virus, MLV)中都发现相似数量的游离泛素,其中少量泛素(约30%)与病毒蛋白Gag通过其上的L结构域(Late domain)共价连接,Gag指导病毒粒子装配和出芽,当Gag上的功能单位L结构域缺失时,病毒粒子不能有效释放。且用蛋白酶抑制剂MG132处理被Rous肉瘤病毒感染的细胞后,发现这些被处理细胞中的病毒滴度比没处理的受感染细胞低10~20倍^[6]。推测宿主的泛素蛋白酶系统参与逆转录病毒、线状病毒及棒状病毒的出芽机制。

昆虫杆状病毒和痘病毒是目前唯一编码泛素基因的病毒。同源性比较分析发现,杆状病毒泛素与真核细胞泛素之间的同源性较低,在杆状病毒泛素的羧基端融合了不同长短的短肽,最近发现斜纹夜蛾核多角体病毒(Spodoptera litura nucleopolyhedrovirus, SpltMNPV)中存在一个泛素融合基因Uba256,研究表明Uba256在SpltMNPV感染的SI-zsu-1细胞中加工后形成了泛素与N-糖基化修饰的几丁质结合蛋白Gp37,但对这种融合的意义及延伸肽的功能还不明确^[7]。在Autographa californica nucleopolyhedrovirus (AcMNPV)中,泛素通过一种新型磷脂锚连接到出芽型病毒粒子囊膜的内表面^[8]。目前研究发现甜菜夜蛾核多角体病毒(SeNPV)泛素与抗细胞凋亡蛋白IAP2或IAP3在体外能进行相互作用,推测IAP可能利用病毒泛素对自身和底物泛素化而调控细胞凋亡^[9]。本文对棉铃虫核多角体病毒(Helicoverpa armigera single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus, HaSNPV)的泛素基因进行克隆和分析,在大肠杆菌中表达了HaSNPV泛素蛋白,并制备了特异性抗体,为进一步了解HaSNPV泛素蛋白的结构及功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

HaSNPV分离株由中国科学院武汉病毒研究所分离,大肠杆菌DH5、BL21(DE3)、质粒pET-28a由本实验室保存,pGEM-T载体为Promega公

司产品。

T4DNA连接酶、Tag聚合酶、限制性内切酶、核酸分子量标准均购自宝生物工程(大连)有限公司;RnaseA、咪唑购自美国Sigma公司;蛋白质分子量标准购自天源公司;IPTG、X-Gal为Promega公司产品;PCR回收试剂盒购自Omega;镍琼脂糖凝胶亲和层析柱购自北京卓冠科技有限公司。

1.2 病毒的增殖,纯化和DNA的提取

健康的3龄棉铃虫幼虫饥饿4h,喂食HaSNPV感染的饲料,4~7d后收集具典型症状的虫尸,研磨过滤。滤液500r/min离心10min,取上清,3000r/min离心20min,取沉淀,重复三次后,30%~60%蔗糖梯度离心(17000r/min离心30min),收集多角体沉淀带,4℃保存。

病毒DNA的提取方法参照文献^[10]。

1.3 PCR扩增

根据已知HaSNPV泛素基因^[11]设计上游引物和下游引物,上下游引物5'端分别加上BamH和Sal两个酶切位点。

上游引物:5'CGGGATCCATGCA GATA TTTGTTAAA 3'其中GGA TCC为BamH酶切位点

下游引物:5'ACGCGTTCGACTCA GAAACCA GTT CGAAT 3'其中GTCGAC为Sal酶切位点

以HaSNPV基因组DNA为模板进行,反应条件:94℃预变性5min后进入循环;94℃变性45s,51℃退火50s,72℃延伸1min,35个循环;最后72℃延伸10min。取PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,PCR琼脂糖回收试剂盒回收扩增的目的片段。

1.4 原核表达载体的构建

PCR回收产物与pGEM-T载体连接,连接反应按照pGEM-T连接试剂盒(Promega公司)操作,然后转化感受态大肠杆菌DH5,获阳性克隆pGEM-Ubi,BamHI、SalI双酶切鉴定。从pGEM-Ubi双酶切切下Ubi片段,连接到同样双酶切处理的pET-28a多克隆位点BamHI和SalI之间,连接产物转化大肠杆菌BL21(DE3),挑取克隆,双酶切鉴定并测序(由上海博亚公司完成),获重组质粒pET-Ubi。

1.5 诱导表达及表达条件的优选

挑取含重组质粒单菌落,接种于含Kan的LB培养基中培养过夜。次日,按1:50的比例接种,培养至A600值0.5~0.6时,加入IPTG至终浓度为1mmol/L,置32℃继续培养4h。离心收集菌体,SDS-PAGE鉴定分析。并且采用不同的IPTG浓度和不同的诱导时间优化蛋白表达。

1.6 融合蛋白的 Western-blot 鉴定

将诱导后重组菌总蛋白经 SDS-PAGE 分离后电转移至硝酸纤维素膜上,0.5g/L 脱脂奶粉封闭,第一抗体为兔抗 His-tag 抗体 (Proteintech Group Inc),第二抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(武汉三鹰生物),DAB 显色(华美生物)。Western-blot 实验步骤参照文献^[10]。

1.7 融合蛋白的分离纯化

扩大诱导培养,收集菌体,按 10mL/g 菌体加细菌裂解缓冲液(50mmol/L NaH_2PO_4 , 300mmol/L NaCl, 1mmol/L PMSF, 1g/L 溶菌酶)溶解菌体,13 000r/min 于 4℃ 离心 15min,取上清。透析后用 Ni-NTA 琼脂糖亲和层析柱纯化目的蛋白:以 5 倍柱体积平衡液(0.5mol/L NaH_2PO_4 , 0.5mol/L Na_2HPO_4 , 0.5mol/L NaCl)平衡后上样,用含不同浓度咪唑的平衡液进行阶段洗脱,收集各阶段洗脱峰,浓缩后 SDS-PAGE 电泳检测纯度。

1.8 抗血清的制备

纯化的泛素融合蛋白免疫新西兰大白兔:初次免疫用 0.5mg 融合蛋白与等体积的完全弗氏佐剂充分混匀乳化,皮下多点注射;两周后第一次加强免疫,取 0.5mg 融合蛋白与不完全弗氏佐剂等体积混匀,背部皮下多点注射,再进行三次加强注射;8 周后,兔耳静脉取血,分离血清,Western-blot 测定抗体效价。颈动脉放血,取血清分装,-20℃ 保存。

2 结果

2.1 泛素基因的克隆与重组质粒的鉴定

根据已报道的 HaSNPV 泛素基因序列设计上游和下游引物,以 HaSNPV 全基因组 DNA 为模板,经 PCR 扩增得到 300bp 左右的特异性片段(图 1A),将扩增产物回收与 pGEM-T 载体连接,酶切鉴定阳性克隆(图 1B)。用 *Bam*HI 和 *Sal*I 从 pGEM-Ubi 双酶切下目的小片段,回收后连接到表达载体 pET-28a 上,双酶切鉴定分子量大小正确(图 1C),对 pET-Ubi 序列测定显示与已知 HaSNPV 的 ubiquitin 序列完全一致。

2.2 泛素融合蛋白的诱导表达

含重组质粒的转化菌经 IPTG 诱导后,在小于 14.4kDa 处出现一条蛋白带,与理论推算目的蛋白的分子量 14kDa 基本一致(图 2A),条带扫描分析融合蛋白的表达量最高可达总蛋白的 16%。表达条件的优化:选取高表达菌株,用 1mmol/L IPTG 于 32℃ 诱导培养,分别于 0h、0.5h、1h、2h、3h、4h 采样,电泳后进行条带扫描分析,各时间段的蛋白表达

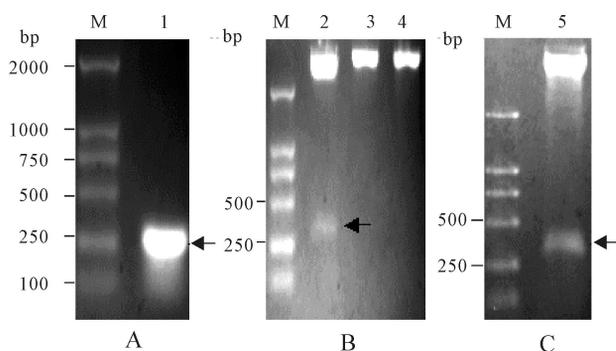


图 1 PCR 扩增和重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 PCR and identification of recombinant plasmid

M, DL2000Marker; 1, PCR product of Ubi; 2, pGEM-Ubi/ *Bam*HI + *Sal*I; 3, pGEM-Ubi/ *Bam*HI; 4, pGEM-Ubi/ *Sal*I; 5, pET-Ubi/ *Bam*HI + *Sal*I.

量见图 3,由图可见,诱导 1h,融合蛋白的表达量已达很高水平,随着时间的延长,表达量并无太大变化;以不同 IPTG 浓度于 32℃ 诱导 1h,蛋白表达量结果见图 4,当 IPTG 浓度为 0.8mmol/L 时,融合蛋白表达量已达最大。

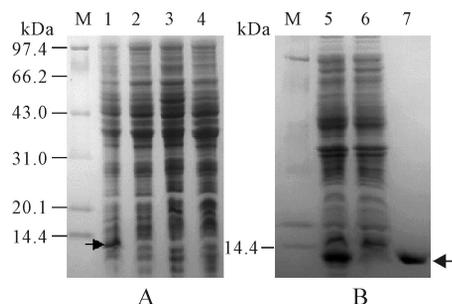


图 2 融合蛋白的表达和纯化

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of Ubi expressed in BL21 (DE3) (A) and purified recombinant Ubi protein (B)

M, Marker; 1/5, pET-ubi transformed BL21 (DE3) with IPTG induction; 2/6, pET-ubi transformed BL21 (DE3) without IPTG induction; 3, pET-28a vector transformed BL21 (DE3); 4, BL21 (DE3); 7, Purified recombinant Ubi protein.

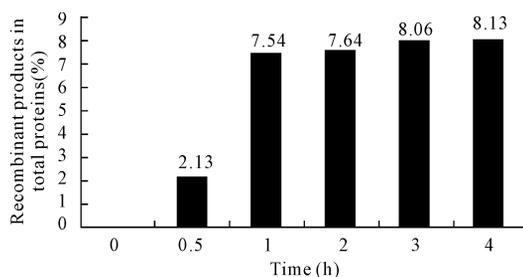


图 3 不同诱导时间对蛋白表达量的影响

Fig. 3 Recombinant products expression induced by different time

2.3 表达产物的纯化

将经过 Ni-NTA 琼脂糖亲和层析柱过柱后的重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳(图 2B),可见胶上

表现为单一条带,融合蛋白的纯度达 90 % 以上。

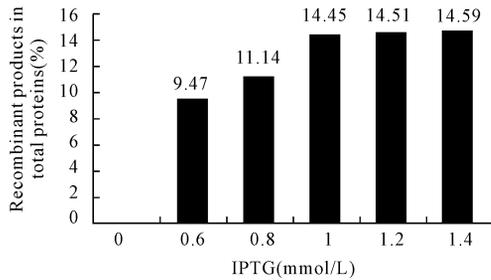


图 4 不同 IPTG 浓度对蛋白表达量的影响

Fig. 4 Recombinant products expression induced by different contents of IPTG

2.4 泛素融合蛋白及特异性抗体的 Western-blot 检测

诱导后重组菌经 SDS-PAGE 电泳,用兔抗 His-tag 抗体进行 Western-blot 检测(图 5A),出现特异的反应条带,28kDa 处是由菌体自身表达带 5 个 His 尾的蛋白与抗体的结合带。以纯化的泛素融合蛋白免疫大白兔,制备抗血清,Western-blot 检测显示出特异性带(图 5B),抗体效价达到 1:2000,大量抗血清的制备为以后的研究工作奠定了基础。

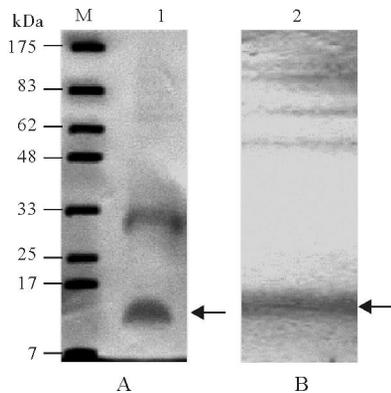


图 5 目的蛋白和抗体的 Western-blot 检测

Fig. 5 Western-blot analysis of Ubi fusing protein(A) and Ubi specific antiserum

M, Marker; 1, Western-blot detected using His-tag antibody; 2, Identification of fusion protein specific antiserum

3 讨论

早在八十年代,人们对真核细胞中的泛素基因及泛素-蛋白酶水解途径已有很深入的研究。目前所知,杆状病毒基因组中都含有编码泛素的基因,但对其功能的研究还处于初始阶段。通过对 AcMNPV 的研究,人们推测病毒泛素可能起到保护病毒复制过程中一些短命功能蛋白免被宿主细胞的 UPP 途径降解的作用^[12]。Guarino 等人通过缺失或突变 AcMNPV 泛素基因试验证明泛素对 AcM-

NPV 的复制并不是必需的,但对病毒粒子的产量有影响^[13],且已有大量研究揭示了逆转录病毒囊膜中少量泛素参与病毒出芽增殖机制,推测杆状病毒泛素可能参与病毒粒子的出芽或组装。真核生物泛素通过 UPP 途径参与许多细胞生命过程,杆状病毒中的泛素是否也会参与细胞凋亡调控、细胞周期调控等重要功能呢? UPP 途径中的泛素连接酶 E3 将泛素附着到底物上,在真核生物中许多 Ring finger 蛋白具有 E3 活性,杆状病毒基因组也编码一些蛋白,如细胞凋亡抑制蛋白(inhibiting apoptosis proteins, IAPs)、极早期基因产物 2 (IE2) 等。哺乳动物中, IAPs 蛋白通过自身的泛素化和降解来调控细胞凋亡^[14],杆状病毒 IAPs 与其它真核生物中的 IAPs 高度保守,且已有试验证明 SeNPV 泛素与 IAP2 或 IAP3 在体外能相互作用,因此,杆状病毒泛素有可能参与细胞凋亡调控。Prickhod ko 等报道, AcMNPV IE2 抑制宿主细胞周期进展, Ring finger 基元的单一突变使其丧失抑制细胞分裂的能力,因此, IE2 作为 E3 对一个或多个宿主细胞周期调控因子泛素化^[15],但杆状病毒泛素是否可以和病毒 IE2 相互作用影响宿主细胞周期,还有待于进一步研究。

本文采用基因工程技术在大肠杆菌中表达了 HaSNPV 泛素蛋白,对其做了系统研究,得到较纯的泛素蛋白,并制备了抗血清,但在用所制备抗体做 Western-blot,检测 HaSNPV 感染的美国棉铃虫细胞 (*Heliothis Zea*, HZ) 中,没有出现特异的反应条带,可能是 HaSNPV 的泛素表达量太低。下一步工作将通过杆状病毒泛素结构的研究进一步揭示其功能。

参考文献

- [1] Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, *et al.* Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1975, 72:11-15.
- [2] Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein-degradation[J]. Annu Rev Biochem, 1996, 30: 405-439.
- [3] Hingamp P M, Leyland M L, Webb J, *et al.* Characterization of a ubiquitinated protein which is externally located in African swine fever virions[J]. J Virol, 1995, 69:1785-1793.
- [4] Kemp L M, Latchman D S. The herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP4 specifically induces increased transcription of the human ubiquitin B gene without affecting the ubiquitin A and C genes[J]. Virology, 1988, 166:258-261.
- [5] Putterman D, Pepinsky R B, Vogt V M. Ubiquitin in avian leukosis virus particles[J]. Virology, 1990, 176:633-637.

- [6] Akash Patnaik, Vincent Chau, John W. Wills. Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97:13069-13074.
- [7] Li Z, Gong Y, Yin C, *et al.* Characterization of a novel ubiquitin fusion gene Uba256 from *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus[J]. Gene, 2003, 303:111-119.
- [8] Guarino L A, Smith G, Dong W. Ubiquitin is attached to membranes of baculovirus particles by a novel type of phospholipid anchor[J]. Cell, 1995, 80:301-309.
- [9] 牛国栋, 张忠信. 利用双杂交系统对 SeNPV 泛素与抗细胞凋亡蛋白相互作用的研究[J]. 中国病毒学, 2004, 19:49-53.
- [10] 黄培堂. 分子克隆实验指南[M]. 第三版, 北京:科学出版社, 2002.
- [11] Xinwen Chen, Wilfred F. J. Ijkel, *et al.* The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome[J]. J Gen Virol., 2001, 82:241 - 257.
- [12] Arthur L H, Dean J K, Patricia M R, *et al.* Functional character of the ubiquitin variant encoded by the baculovirus *Autographa californica*[J]. Biochemistry, 1996, 35:5385-5394.
- [13] Reilly L M, Guarino L A. The viral ubiquitin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus is not essential for viral replication[J]. Virology, 1996, 218:243-247.
- [14] Yili Y, Shengyun F, Jane P J, *et al.* Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasome in response to apoptotic stimuli [J]. Science, 2000, 288:874-877.
- [15] Prichodko E A, Miller L A. Role of baculovirus IE2 and its RING finger in cell cycle arrest [J]. J Virol, 1998, 72:684-692.