

# pGEX 载体表达马立克氏病病毒囊膜糖蛋白 gI 基因的最佳条件

丁家波<sup>1</sup> 崔治中<sup>2\*\*</sup>

(<sup>1</sup>扬州大学畜牧兽医学院 扬州 225009)

(<sup>2</sup>山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

**摘 要:**通过聚合酶链式反应(PCR),扩增出马立克氏病病毒特超强毒(vv + MDV)648 株囊膜糖蛋白 gI 基因,并将该基因按正确的阅读框(ORF)克隆到表达性载体质粒 pGEX-6P-1 中谷胱甘肽转移酶(GST)基因的下游。重组质粒(pGEX-gI)经氯化钙转化宿主菌 BL21;通过建立重组菌生长时间与  $OD_{600}$  值间的关系曲线,以及对诱导时间、诱导温度、IPTG 浓度等条件的摸索,根据聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)判定 GST-gI 融合蛋白的最佳表达条件,并经蛋白质印迹试验(Western Blotting)对表达产物进行了验证。将表达产物免疫小鼠,所得抗血清能与 MDV 感染的鸡胚成纤维细胞(CEF)在间接免疫荧光试验(IFA)中,呈较强的细胞膜荧光着色。实验结果表明:IPTG 的最佳浓度为 0.2 ~ 0.5 mmol/L;最适的诱导时期为重组菌生长对数中期;温度对表达几乎没有影响。pGEX 载体表达的融合蛋白至少保留了天然蛋白的部分抗原性。

**关键词:**马立克氏病病毒, gI 基因, 融合蛋白, 间接免疫荧光试验, 蛋白质印迹试验

**中图分类号:** Q513<sup>\*</sup> **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 05-0567-06

由于人们对大肠杆菌的深入研究,以及大肠杆菌的易操作性和廉价性,使之成为表达多种蛋白理想工具。尽管克隆化基因表达出其编码蛋白质的文献不断出现,但每一种新基因都有其独特的表达难度,目前还没有一套通用的确保成功表达每一种蛋白质的方法<sup>[1]</sup>。影响外源基因在 *E. coli* 中表达的因素包括:载体(启动子)、宿主菌的选择、培养条件的控制、cDNA 密码子的选用、mRNA 的一二级结构和表达产物的后处理等<sup>[2]</sup>。对于特定的载体及其最适的宿主菌而言,在表达特定的基因时,理想的培养条件可显著地提高表达量<sup>[3]</sup>。pGEX 为一种优良的谷胱甘肽转移酶(GST)融合蛋白表达载体,已有许多表达成功的报道<sup>[4-6]</sup>。本研究以马立克氏病病毒(MDV)648 株囊膜糖蛋白 gI 基因为研究对象,通过对诱导时间、诱导温度和诱导剂浓度的摸索,探索了表达 MDV gI 基因的最佳表达条件。这为用大肠杆菌表达外源基因,寻找表达的最佳条件提供了一种可以借鉴的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒和菌株

克隆载体 pGEX-6p-1,受体菌 *E. coli* BL<sub>21</sub> 均购于 Pharmacia 公司。648 株 MDV 的病毒

<sup>\*</sup> 国家“863”资助项目(101-05-03-02)

<sup>\*\*</sup> 通讯作者

作者简介:丁家波(1975-),男,汉族,硕士,主要从事细菌和病毒分子生物学的研究。

收稿日期:2000-09-04,修回日期:2001-03-27

基因组 DNA 来自美国禽病和肿瘤研究所。

## 1.2 分子生物学试剂

包括 PCR 试剂盒、限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、IPTG、驴抗山羊 IgG 酶标抗体、DAB 等购于上海华美生物工程公司。硝酸纤维素膜购于 Amersham 公司,山羊抗 GST 抗体购于 Pharmacia 公司;异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗鼠 IgG 抗体购自 Sigma 公司。

## 1.3 PCR 产物的扩增

**1.3.1 引物设计:**上游 5'-ATGCGGATCCGACCAGACTCGCAC-3' 下游 5'-ATCCCGGTAC-CACCTACC-3'。在引物中分别设计了限制内切酶 *Bam*HI 和 *Sma*I 位点。

**1.3.2 PCR:**按常规方法进行,反应体积为 50 $\mu$ L,其中 10 $\times$  PCR Buffer 5 $\mu$ L,模板 DNA 约 20ng,引物浓度为 100 $\mu$ mol, dNTP 为 1.25mmol, Tag 酶 2.5U。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 5min 后,按 95 $^{\circ}$ C 1min $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C 1min $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 1min 进行 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。扩增产物在 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳,确定大小后回收。

## 1.4 基因的克隆与鉴定

将回收的 PCR 产物与 pGEX-6P-1 载体分别用 *Bam*HI 和 *Sma*I 消化后,电泳、回收,按常规方法连接、转化宿主菌 BL<sub>21</sub>。通过氨苄青霉素抗性或利用限制内切酶进行筛选和鉴定。将所得的阳性克隆经测序(由大连宝生物工程有限公司完成)验证其阅读框架。

## 1.5 重组质粒最佳诱导表达条件的探索

**1.5.1 重组菌生长曲线的建立:**挑取单个菌落接种于 5mL 含 50 $\mu$ g/mL 氨苄青霉素 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 摇震培养过夜。次日取 500 $\mu$ L 的菌液接种于 50mL 的 LB 培养基中摇震培养,每小时取 3mL 样品,测其 OD<sub>600</sub>,细菌浓度增加较快时,每 0.5h 取一次样品。根据 OD<sub>600</sub>,及其对应的生长时间,作出该重组菌的生长曲线。

**1.5.2 最佳诱导时间的确定:**根据生长曲线,在细菌生长的对数前、中、后期分别取样诱导 4h 以上,按 37 $^{\circ}$ C, 1mmol/L IPTG 浓度进行诱导。待细菌浓度一致时,取 1mL 菌液,离心后,加 1 $\times$  PBS200 $\mu$ L,再加等体积的 2 $\times$  SDS 凝胶加样缓冲液,煮沸裂解 5min, 10000r/min 离心 10min,取 20 $\mu$ L 上清液进行 SDS-PAGE,根据表达量确定最佳的诱导时间。

**1.5.3 最佳诱导温度的确定:**参照宿主菌 BL<sub>21</sub> 所能适应的生长温度范围,分别在 25 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C 诱导表达,根据 SDS-PAGE 确定温度的影响。

**1.5.4 最佳 IPIG 诱导浓度的确定:**在确定的最佳表达条件的基础上,改变 IPIG 的浓度,按 0.0001、0.001、0.1、1.0、10(mol/L)的浓度梯度进行,根据实验结果,调整浓度范围,确定 IPIG 诱导的临界浓度。

## 1.6 重组菌菌体裂解物的凝胶电泳及 Western-blotting

**1.6.1 重组菌菌体裂解物的凝胶电泳:**按常规方法制备 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶。将处理好的样品(包括非重组 pGEX-6P-1 载体质粒转化菌,及未经 IPIG 诱导的重组载体质粒转化菌)取 20 $\mu$ L 上样,用 Bio-RAD 公司 Mini-PROTEAN II 电泳装置,120V, 2h。电泳结束后,考马斯亮兰染色 2h,脱色液( $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{冰乙酸}}:V_{\text{水}}=4:1:5$ )脱色 2h<sup>[7]</sup>。

**1.6.2 重组菌菌体裂解物的 Western-blotting:**为了检测载体所表达的 GST 与 gl 的融合蛋白,取经步骤 1.6.1 节中 SDS-PAGE 电泳后的凝胶,不经染色,直接用 Bio-RAD 公司 Mini

Trans-Blot Electrophoretic cell 转印装置,将其转印于 NC 膜上(0.35mA、3h)。转印结束后,按常规方法进行 Western-blotting<sup>[7]</sup>。一抗使用山羊抗 GST 抗体(1:1000),二抗使用驴抗山羊 IgG 酶标抗体(1:50),最后用 DAB 显色。

## 1.7 重组蛋白抗原活性的验证

**1.7.1 重组菌表达产物的回收:**将大量制备的重组菌菌体裂解上清液,进行 SDS-PAGE,染色后,参照标准蛋白分子量 marker 的大小,切下大小约 63kD 的特异蛋白条带,将其冻干并碾成粉末<sup>[8]</sup>。

**1.7.2 小鼠的免疫:**将碾碎的粉末与 PBS 等体积混和后,取 0.2mL(约 20 $\mu$ g 抗原)腹腔注射 2 只健康小鼠。每周免疫一次,第五次免疫后 10d 采血,析出血清并置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

## 1.8 间接免疫荧光试验(IFA)

将 vvMDV 株 RB1B 及 vMDV 株 GA 感染在 96 孔板长成单层的鸡胚成纤维细胞(CEF),待出现明显病毒蚀斑时,用丙酮/乙醇(3:2)固定,同时以未感染病毒的 CEF 板作对照,将制备的血清及未免疫小鼠的血清作 1:10,1:50,1:100 的递度稀释,按照常规方法进行免疫荧光试验。简要步骤为:按每孔 100 $\mu$ L 稀释血清加到固定的 CEF 单层中,37 $^{\circ}$ C 湿润环境中孵育 60min $\rightarrow$ PBS 冲洗 3 次 $\rightarrow$ 加 1:60 稀释 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体 50 $\mu$ L/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 60min $\rightarrow$ PBS 冲洗 3 次 $\rightarrow$ 加覆 50% 甘油的 PBS,在荧光显微镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒构建结果

**2.1.2 重组质粒的酶切鉴定:**PCR 扩增产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳后,得到一个与预期片段大小(945bps)相符的片段<sup>[11]</sup>。将初步筛选得到的可疑阳性质粒用 *Bam*HI 和 *Sma*I 双酶切,结果与期大小一样,结果如图 1。

**2.1.3 重组质粒的测序结果:**与已发表的 648 株 gI 基因序列一致<sup>[9]</sup>,且阅读框正确。

### 2.2 GST-gI 融合蛋白检测

**2.2.1 重组菌菌体裂解物的凝胶电泳:**取重组菌裂解产物进行 10% SDS-PAGE,考马斯亮兰 R250 染色,同时作非重组 pGEX-6P-1 质粒菌的培养物对照。结果表明:重组菌体裂解物可在分子量 63kD 处看到一条特异的蛋白条带,与预期大小的融合蛋白一致。而非重组的 pGEX-6P-1 质粒菌培养物样品中,在与理论值一致的 29kD 处出现明显条带,其它非经 IPTG 诱导的质粒菌未出现明显表达条带<sup>[11]</sup>。

**2.2.2 重组菌裂解物的 Western-Blotting:**将 SDS-PAGE 电泳后的凝胶进行转印,利用 GST 抗体,进行 Western-blotting。结果在重组菌裂解样品中,确定了 63kD 的蛋白条带为含 GST 的融合蛋白带,结果见图 2。

### 2.3 重组质粒表达最佳条件

**2.3.1 根据  $OD_{600}$  与重组菌的培养时间,绘制重组菌的生长曲线。**结果显示,重组菌在转移培养 2h 进入对数生长期,4.5h 后将由生长期转入迟缓期。

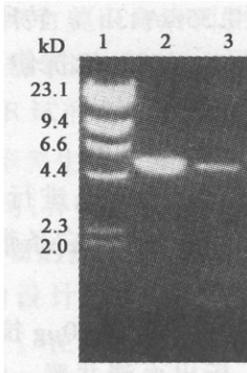


图1 重组质粒酶切鉴定

Fig.1 Enzyme analysis of the recombinant

1.  $\lambda$ DNA/*Hind* III; 2. pGEX-6p-1/*Bam* HI;  
3. pGEX-gI/*Bam* HI/*Sma* I.

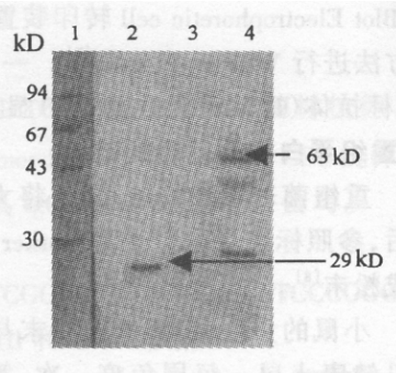


图2 重组质粒的 western-blotting

Fig.2 Western-blotting of the *E. coli* BL<sub>21</sub> lysates containing fusion protein

1. Protein molecular weight marker; 2. Lysate of pGEX-6P-1 with IPTG inducing; 3. Lysate of pGEX-6P-1 without IPTG inducing; 4. Lysate of pGEX-gI with IPTG inducing.

**2.3.2 不同时期诱导的重组菌体裂解上清液的 SDS-PAGE 结果见图 3。该电泳结果表明,在重组菌培养 2.5 ~ 4.5h 时进行诱导将有最大的表达量。**

**2.3.3 不同温度诱导的重组菌体裂解上清液的 SDS-PAGE 结果见图 4。该电泳结果表明,诱导温度对重组菌的表达无明显影响。**

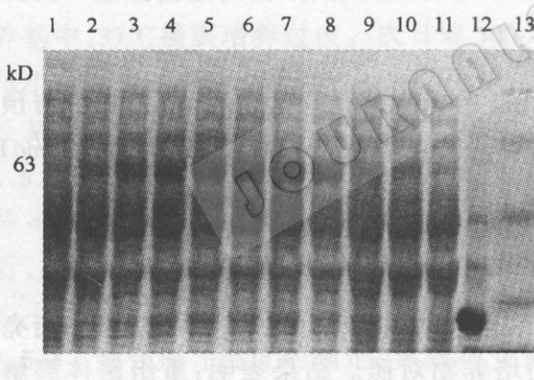


图3 不同时间诱导的菌体裂解物电泳

Fig.3 SDS-PAGE of the recombinant showing great difference caused by inducing time

1 ~ 11. Lysates of the recombinant cultivated for 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0 h, respectively; 12. Lysate of pGEX-6P-1 with IPTG, inducing; 13. Protein molecular weight marker.

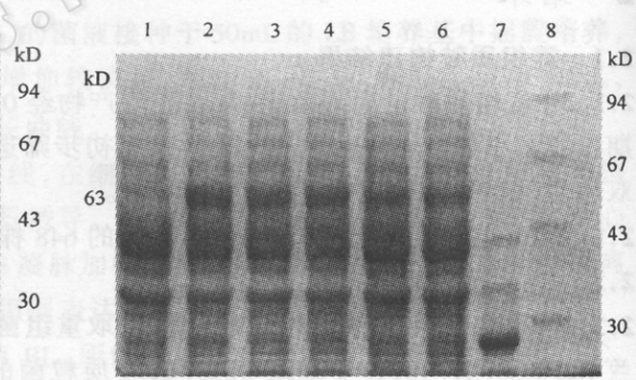


图4 不同温度诱导的重组菌体裂解物电泳

Fig.4 SDS-PAGE of the recombinant showing little difference caused by inducing temperature

1. Lysate of pGEX-gI without IPTG inducing; 2 ~ 6. Lysates of the recombinant cultivated at 25°C, 28°C, 30°C, 37°C, 40°C, respectively; 7. Lysate of pGEX-6P-1 with IPTG inducing; 8. Protein molecular weight marker.

**2.3.4 不同 IPTG 浓度诱导的重组菌体裂解上清液 SDS-PAGE 结果见图 5。通过 Tanon GIS 凝胶分析软件绘制表达量与 IPTG 浓度的关系曲线。结果显示,当 IPTG 浓度为 0.2 ~ 0.5mmol/L 时,外源蛋白表达量最大,在 0.01 ~ 0.2mmol/L 之间时,有一定量表达,而当 IPTG 浓度低于 0.01mmol/L 时,未见表达。**

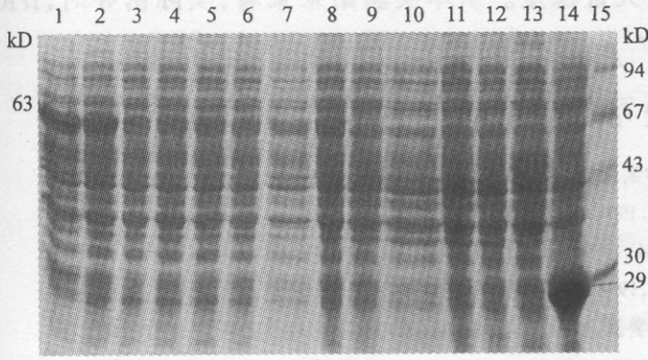


图 5 不同 IPTG 浓度诱导的重组菌体裂解物电泳

Fig.5 SDS-PAGE of the recombinant showing great difference caused by the concentration of IPTG

1~12. Lysates of the recombinant induced with IPTG concentration of 1.0, 0.2, 0.1, 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.004, 0.0002, 0.0001, 0 (mmol/L), respectively; 13. Lysate of pGEX-gI without IPTG inducing; 14. Lysate of pGEX-6P-1 with IPTG inducing; 15. Protein molecular weight marker.

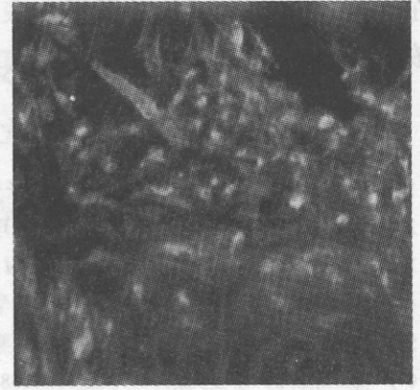


图 6 重组蛋白抗血清与 MDV 感染的鸡胚成纤维细胞 (CEF) 的免疫荧光试验结果 (阳性)

Fig.6 Anti-serum of the expression react with MDV infected CEF in FA (positive)

## 2.4 表达产物抗原性的检测

将重组融合蛋白免疫老鼠后,取其血清作 1:50 稀释后分别与 648 株、CVI988 株和 GA 株 MDV 感染的鸡胚成纤维细胞做间接免疫荧光试验 (IFA),结果重组蛋白抗血清菌出现了较强的阳性荧光染色 (图 6),非重组的 GST 蛋白抗血清在 IFA 中为阴性<sup>[11]</sup>。

## 3 讨论

由于 MDV 是严格的细胞结合型病毒<sup>[10]</sup>,为验证表达产物的抗原性,作者将重组的 gI 表达产物免疫老鼠,取老鼠血清与 MDV 感染的鸡胚成纤维细胞 (CEF) 进行间接免疫荧光试验 (IFA),结果获得了较强的荧光反应。这表明,用大肠杆菌表达的 gI 蛋白至少保留了部分天然的抗原构象,也进一步验证了大肠杆菌表达系统在免疫学上的应用意义<sup>[11]</sup>。

在 western-blotting 结果中,63kD 与 29kD 之间出现几条特异性条带,本实验多次重复,结果一样。作者推测,这是由于重组蛋白在化学键较弱的地方断裂的结果。

从图 5 和温度诱导结果分析,温度仅影响细菌的生长速度,对外源蛋白的表达几乎无影响。但不同的诱导时期对细菌表达量的影响是极为明显的;图 4 表明,重组菌在培养 2.5~4.5h 时将有最大的表达量,而此时正是细菌生长的对数中期。因而,实际操作中,在对重组菌诱导表达时,可根据生长曲线,迅速找到诱导的最佳时间。以 IPTG 作为诱导剂,其作用是与阻遏蛋白结合,起解阻遏作用。因此当所加入的 IPTG 量足以封闭所有阻遏蛋白位点时,即为理论上的最佳浓度。IPTG 浓度过高时,将会作为毒性物质,影响细菌的生长。在对 IPTG 诱导浓度实验时,当 IPTG 使用浓度达 4mmol/L 时,细菌的生长受到明显的抑制;结合图 6 可以看到,当 IPTG 浓度在 0.01mmol/L 以下时,表达量与未加 IPTG 时一样,无可见表达条带;当 IPTG 浓度在 0.01~0.2mmol/L 之间时,呈一定量的表达;当 IPTG 浓度

在 0.2mmol/L 以上时,外源蛋白表达量大且稳定。从本实验结果来看,实际诱导时,IPIC 浓度在 0.2 ~ 0.5mmol/L 之间最适。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] F. 奥斯伯等(颜子颖等译). 精编分子生物学实验指南. 北京:科学出版社,1998.
- [ 2 ] 隋广超,胡美浩. 生物化学与生物物理进展,1994,21(2):128 ~ 132.
- [ 3 ] Jelenc P C, Kurland C G. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(7):3174.
- [ 4 ] 吴 锐,蔡 军,赵 崇,等. 中华医学杂志,1998,78(3):272 ~ 274.
- [ 5 ] 成大荣,徐建生,董国雄,等. 中国预防兽医学报,1999,21(5):349 ~ 353.
- [ 6 ] Marshall D. R. *Virology*, 1993, 19(5):638 ~ 848.
- [ 7 ] Frederick M A, Roger B, Robert E K, *et al*. Short protocol in molecular biology. 3th ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1995.
- [ 8 ] J. 萨姆布鲁克, E. F 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯(金冬雁等译). 分子克隆实验指南. 第二版. 北京:科学出版社, 1995.
- [ 9 ] 崔治中,何良梅. 中国病毒学,2000,15(2):180 ~ 187.
- [ 10 ] Calnek B W, Addinger H K. *Azian Diseases*, 1970, 14:219 ~ 233.
- [ 11 ] 丁家波,崔治中,徐建生,等. 中国预防兽医学报,2001,23(1):7 ~ 10.

## STUDIES ON *IN VITRO* EXPRESSION FOR gI GENE OF MAREK'S DISEASE IN *E. COLI* BY pGEX VECTOR\*

Ding Jiabo<sup>1</sup> Cui Zhizhong<sup>2\*\*</sup>

(<sup>1</sup> Veterinary Medical college, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

(<sup>2</sup> Animal Science and technology College, Shangdong Agriculture University, Taina 271018, China)

**Abstract:** Glycoprotein I Gene (gI) was amplified from genomic DNA of Marek's disease virus (MDV) 648 strain by polymerase chain reaction (PCR). PCR product was cloned into pGEX-6p-1 according to the right open reading frame (ORF). The expression of GST-gI fusion protein was studied in detail on many factors including temperature, timing and IPTG. The curve for  $OD_{600}$  and the growing time of the recombinant bacteria is also established, which is helpful to find the optimal inducing time. GST-gI fusion protein was identified by SDS-PAGE and Western-blotting, and the result shows that the best concentration of IPTG is 0.2 ~ 0.5mmol/L and inducing time have great effects on expression while temperature has little. The fusion protein was injected into mouse five times to identify its antigenicity and the result is positive in indirect fluorescent assay IFA.

**Key words:** Marek's disease virus (MDV), gI gene, Fusion protein, Indirect fluorescent assay (IFA), Western-blotting

\* Supported by project of Chinese National Programmes for High Research and Development (NO.101-05-03-02)

\*\* Corresponding author