

斜纹夜蛾核多角体病毒 *p49* 基因在大肠杆菌中的表达 及其在昆虫细胞中的表达时相分析

曾美珍 王瑾雯 李 镇 龙紫新 王珣章*

(中山大学生物防治国家重点实验室 生物医药中心 广州 510275)

摘 要 利用 PCR 方法从斜纹夜蛾核多角体病毒(SplMNPV)基因组中扩增获得了细胞凋亡抑制基因 *p49* 的完整 ORF 并将其克隆于 pMD18-T 载体,其序列分析结果与文献报道一致。将基因重组于硫氧还蛋白融合表达载体 pThioHis C,在大肠杆菌 BL21(DE3)中获得了稳定表达,表达的 P49 融合蛋白占菌体总蛋白 30%左右,主要以包涵体形式存在。分离纯化重组表达的 SplMNPV P49 蛋白作为抗原,免疫家兔制备得到效价高于 1:10000 的抗重组 P49 蛋白多克隆抗体。应用制备的抗体对受 SplMNPV 感染的 SI 细胞中 P49 蛋白的表达时相进行分析,结果显示 P49 蛋白在细胞感染后 3h 内便可检测到,并在整个感染期间维持着低水平表达。

关键词 SplMNPV, *p49*, 凋亡抑制, 多克隆抗体, 表达时相

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2004)03-0295-04

p49 是继 *p35* 和 *iap* 后在昆虫杆状病毒中发现的第三种细胞凋亡抑制基因,目前只在海灰翅夜蛾核多角体病毒(*Spodoptera littoralis multicapsid nucleopolyhedrovirus*, SplMNPV)和斜纹夜蛾核多角体病毒(*Spodoptera litura multicapsid nucleopolyhedrovirus*, SplMNPV)中有该基因的报导^[1,2]。*p49* 基因被认为是 *p35* 的同源基因,两者的编码产物在 N 端和 C 端具有相当高的同源性,并且具有类似的细胞凋亡蛋白酶 Caspase 的酶切位点^[3,4]。其中, SplMNPV P49 蛋白的功能和作用机制目前已经得到了初步阐明,与 P35 相似,其亦是作为 Caspase 的竞争性底物来抑制 Caspase 对细胞内其它功能蛋白和结构蛋白的酶解活性从而抑制细胞凋亡的发生^[4,5]。而 SplMNPV *p49* 基因目前只通过瞬时表达实验证实具有抑制病毒感染和放线菌素 D 诱导的细胞凋亡的活性[△]。

SplMNPV *p49* 基因长 1320 bp,预计编码 439 个氨基酸、分子量约为 48kD 的蛋白^[2]。本文通过基因重组方法构建了该基因的融合型原核表达载体,在大肠杆菌 BL21 中获得了表达,并利用表达产物纯化后免疫家兔获得的多克隆抗体对 wt SplMNPV 感染的昆虫细胞中 P49 蛋白的表达时相进行了检测分析。

1 材料和方法

1.1 病毒、质粒、菌株和细胞

野生型 SplMNPV 中山大学分离株(Zhongshan University isolated, ZSU)多角体和大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21(DE3)由本实验室保存, SplMNPV 宿主昆虫斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)幼虫由本实验室用半合成人工饲料喂养,其 SI-2H8 细胞系由本实验室自建并保存。载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司, pThioHis C 质粒为 Invitrogen 公司产品。

1.2 试剂

限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。Taq DNA 聚合酶购自加拿大 Genda 工程公司。胶回收试剂盒 QIAquick Gel Extraction Kit 购自 QIAGEN 公司。Big Dye 荧光标记的末端终止物循环测序试剂盒购自美国 PE ABI 公司。

1.3 引物

扩增 *p49* 基因的 PCR 引物由上海博亚生物工程公司合成。为了构建融合型表达载体,上游引物中去除了起始密码子 ATG,下游引物则保留了终止密码子 TAA。上游引物:5'-CTCCTCGAGAAAAGAT-GCGTACTGATACCAACATTG-3',下游引物:5'-CTCTC-TAGATTATATATCTATGTAAATGTTACG-3'。

基金项目 国家自然科学基金重点项目(39730030)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-20-84113964 E-mail: wxz@zsu.edu.cn

作者简介 曾美珍(1977-)女,广西人,助教,硕士,研究方向为基因的表达和调控。E-mail: zeng-meizhen@yahoo.com.cn

收稿日期 2003-08-29,修回日期 2003-01-07

△ 李 镇.斜纹夜蛾杆状病毒的分子生物学.中山大学博士学位论文,2000.

1.4 SpltMNPV *p49* 基因的 PCR 扩增和克隆

病毒基因组 DNA 的抽提及 PCR 参照文献 [2] 进行。PCR 产物经 1% 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离后,按 QIA-quick Gel Extraction Kit 说明回收目的 DNA 片段,连接于 pMD18-T 载体,按 Big Dye 测序试剂盒说明进行双脱氧链终止法序列分析。

1.5 重组表达质粒 pThioHis-p49 的构建和 *p49* 基因的诱导表达

以 *Kpn* I 和 *Pst* I 双酶切 pMD18-T-p49,将回收的 *p49* 基因片段连于 pThioHis C 上遂构建原核表达载体 pThioHis-p49(图 1)。酶切鉴定重组子。将该重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株,挑单菌落接种于 1.5 mL Amp⁺(100 μg/mL)的 LB 培养基,37℃ 活化过夜后,按 1:50 转接于 1.5 mL LB 培养基(Amp⁺) 37℃ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~1.0,加入不同浓度的 IPTG 进行诱导表达。于诱导后 4h 收获菌体进行 12% SDS-PAGE 检测 P49 蛋白表达情况。

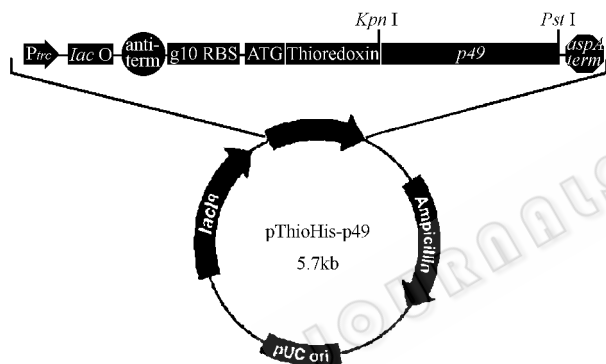


图 1 重组质粒 pThioHis-p49 的图谱

Fig.1 Map of the recombinant plasmid pThioHis-p49

1.6 多克隆抗体的制备

SpltMNPV P49 蛋白抗原的制备及免疫程序参照文献 [6] 的方法进行。收集的抗血清按照文献 [7,8] 所述,以硫酸铵沉淀法纯化 IgG 并以大肠杆菌裂解液吸附法去除交叉反应性抗体,然后用基于 HRP-DAB 显色的 ELISA 和 Western blot 分别测定抗体的效价和特异性。

1.7 SpltMNPV P49 在昆虫细胞中的表达时相分析

SpltMNPV 芽殖病毒粒子来自于感染 SpltMNPV 多角体 4~5d 的斜纹夜蛾幼虫的血淋巴,以无血清 TC-100 培养基稀释 10 倍后,经 0.45 μm 滤膜过滤除菌。将处于对数生长期的 SI 细胞以 2×10^6 个细胞/瓶的密度接种于 25 cm² 细胞培养瓶中,27℃ 生长过夜。待细胞全部附壁后,移出培养基,以 10 PFU/细胞的量接种 SpltMNPV 感染性血淋巴稀释液,室温吸附 60 min,移去病毒接种液,每瓶添加 1 mL 新鲜的含

10% FBS 的 TC-100 培养基,置 27℃ 静置培养。将病毒加入细胞之时定为病毒感染时间零时,分别于感染后 0、3、6、12、18、24、36、48、72 h 收集细胞,利用制备的多克隆抗体对细胞抽提物进行基于 HRP-DAB 显色的 Western blot。

2 结果

2.1 SpltMNPV *p49* 基因的 PCR 扩增、克隆和测序

以 SpltMNPV 基因组 DNA 为模板的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳结果表明,在约 1.35 kb 处有与预期相符的特异扩增片段。将该片段克隆于 pMD18-T 载体,得到重组质粒 pMD18-T-p49。测序结果表明所得的 1.35 kb 基因片段包含 SpltMNPV *p49* 基因的完整 ORF,与文献 [2] 报道的 *p49* 基因序列完全一致。

2.2 重组表达质粒 pThioHis-p49 的酶切鉴定

重组子经 *Kpn* I + *Pst* I 双酶切得到预期的 1.35 kb 和 4.4 kb 两基因片段,证明重组表达载体构建正确。经 Expasy 网站上的 Compute pI/Mw 软件分析,Trx 蛋白分子量约为 14 kD, SpltMNPV P49 蛋白分子量约为 48 kD,而 Trx-P49 融合蛋白分子量约为 62 kD。

2.3 SpltMNPV *p49* 在 *E. coli* 中的表达

融合了 Trx 的 SpltMNPV *p49* 基因可在 BL21 中稳定表达。SDS-PAGE 结果显示,不同浓度的 IPTG (0.1~2.0 mmol/L) 诱导 4h 后的全菌裂解液中均可检测到 62 kD 目的融合蛋白。在 IPTG 浓度为 0.1~1.0 mmol/L 时, P49 融合蛋白的诱导表达量较高(图 2)。用 Lab Image 软件对凝胶扫描图像进行分析,目的蛋白约占菌体总蛋白的 30% 左右。将菌体细胞超声破碎并离心,分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 结果显示目的蛋白主要以包涵体形式存在(图 3)。

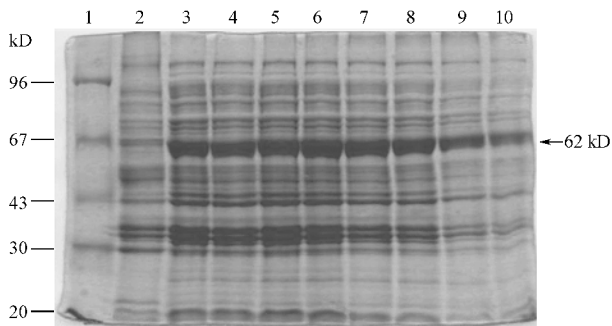


图 2 IPTG 对 *p49* 基因诱导表达影响的 SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE for the effect of IPTG on P49 expression

1. Protein standard; 2~10. Cells lysates of BL21 induced with 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 mmol/L IPTG correspondingly.

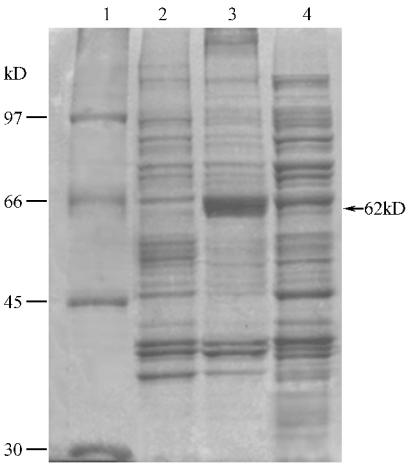


图3 表达产物的可溶性鉴定

Fig.3 Characterization of solubility of the expression products

1. Protein standard ; 2. Cell lysates of uninduced BL21 ; 3. Inclusion bodies ; 4. Supernatant of cells lysates of induced BL21.

2.4 兔抗 SpltMNPV P49 多克隆抗体的制备及其效价和特异性

用制备型 SDS-PAGE 分离纯化的 SpltMNPV P49 免疫新西兰白兔 ,获得该蛋白的抗血清。以免疫前血清为阴性对照 ,ELISA 测定的该抗血清的效价高于 1:10000(表 1)。由于表达的 P49 蛋白融合了大肠杆菌硫氧还蛋白 Trx ,抗血清中可能含有与大肠杆菌蛋白交叉反应的非特异性抗体 ,为此先用硫酸铵沉淀法纯化 IgG ,然后采用大肠杆菌裂解液吸附法去除交叉反应的抗体。Western blot 表明 ,经吸附后的抗体与目的融合蛋白显示了很强的反应 ,而与空载的大肠杆菌裂解液几乎没有反应 ,说明吸附后的抗体具有较强的抗 SpltMNPV P49 专一性(图 4)。

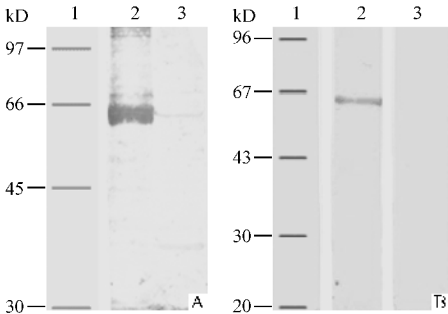


图4 Western blot 测定抗体的特异性

Fig.4 Characterization of the specificity of anti-P49 polyclonal antibodies by Western blot

A. Recombinant P49 's Western blot with the antisera unadsorbed by *E. coli* lysates ; B. Recombinant P49 's Western blot with the antibodies adsorbed by *E. coli* lysates. 1. Protein standard ; 2. Lysates of induced positive *E. coli* transformant ; 3. Lysates of induced *E. coli* transformed by pThioHis C. The 14kD Trx band has migrated outside the gel ,thus is not shown in this figure.

表 1 酶联免疫吸附测定(ELISA)结果(OD_{450})

Table 1 The results of ELISA (OD_{450})			
Dilution proportion	① Normal sera	② Antisera	①/②
1:2000	0.340	2.778	8.171
1:5000	0.283	1.680	5.936
1:10000	0.258	0.875	3.391

The values are the mean results of three parallel experiments. When ①/② \geq 2.1 , the ELISA result is positive.

2.5 SpltMNPV P49 在昆虫细胞中的表达时相

以抗 P49 多克隆抗体对 SpltMNPV 感染后不同时段的 S1 细胞抽提物的 Western blot 结果显示 , 48kD 的 P49 蛋白从感染后 3h 内 72h 均可检测到 ,其表达时相符合早期基因的特征。而在整个感染期间 ,其表达量始终维持在低水平(图 5)。SpltMNPV P49 蛋白的 91 ~ 95 位氨基酸序列 TVTD⁹⁴G 是细胞凋亡蛋白酶 Caspase 典型识别序列和切割位点 ,但是在各时间点均未检测到该蛋白酶切后的片段 ,可能是因为 SpltMNPV 对 S1 细胞的低感染率和 P49 蛋白的低水平表达使得该片段的量太微弱而检测不出。

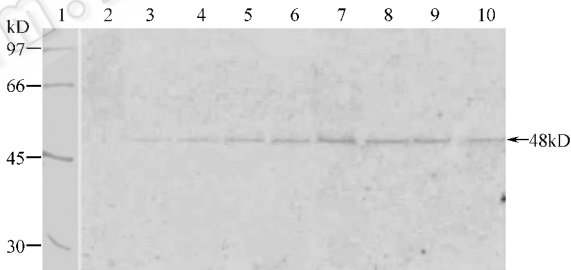


图5 P49 蛋白在受感染 S1 细胞中的表达时相

Fig.5 Time course of wt P49 expression in SpltMNPV infected S1 cells
Monolayers of S1-2H8 cells were infected with AcMNPV at an MOI of 10 and harvested at various time points post infection and prepared as cell extracts

1. Protein standard ; 2 ~ 10. Time course of wt P49 expression in SpltMNPV infected S1 cells. The hours post infection is indicated above the lanes.

3 讨论

SpltMNPV *p49* 基因的表达调控和凋亡抑制机制目前尚未见报道。由于凋亡抑制基因是杆状病毒宿主特异性的重要决定因子^[9] ,研究 SpltMNPV 的凋亡抑制基因 *p49* ,对于揭示 SpltMNPV 宿主专一性的分子生物学机制从而拓宽其杀虫谱具有重要理论意义和实际应用价值。

SpltMNPV P49 蛋白及其抗体对于研究 *p49* 的凋亡抑制机制及其在宿主细胞内的表达调控是必要的。而直接从感染的细胞中提取组成型表达的 P49

蛋白比较困难,本文采用基因重组的方法构建该基因的原核表达载体,使之在大肠杆菌中稳定表达 P49 蛋白。虽然表达的重组蛋白由于形成包涵体而不具备生物学活性,但作为制备抗血清的免疫原却已足够。其免疫家兔获得的高效价抗体可用于检测 SpltMNPV 感染昆虫细胞后 P49 蛋白的表达。

p49 是杆状病毒另一个细胞凋亡抑制基因 p35 的同源基因,两者被认为具有相似的作用机制^[3-5]。在研究 AcMNPV p35 时发现,p35 基因行使抗细胞凋亡功能的关键的不是其蛋白在细胞内的水平,而是它在细胞内的表达时间^[10]。本文利用制备的 P49 多克隆抗体对 wt SpltMNPV 感染细胞内 P49 的表达时相进行分析,证实 P49 在病毒感染的早期开始表达,这与对其基因启动子的分析结果一致。然而不同于 AcMNPV p35 的是,SpltMNPV p49 只具有早期启动子模体 TATA^[2],而 p35 则兼具了晚期启动子模体 TAAG^[11],这提示两者在体内的表达调控是不同的,显然它们在功能和机制上仍存在着差别。

在对 SpltMNPV p49 基因的研究中发现 P49 蛋白被 Caspase 切割为 40kD 和 10kD 大小两片段,从而推测其是作为竞争性底物抑制 Caspase 活性来抑制细胞凋亡^[5,6]。本文以制备的 SpltMNPV P49 的多克隆抗体对 SpltMNPV 感染后不同时间的 SI 细胞抽提物进行 Western blot 分析,并未检测到 P49 蛋白被切割后的片段,可能是因为 P49 蛋白本底水平太低的缘故,因此推测其基因的启动子为一弱启动子。

SpltMNPV p49 基因的功能和机制以及其启动子的性质尚需进一步的实验来证明。

参考文献

- [1] 杜全胜,齐义鹏,Nor Chejanovsky. 一个新的杆状病毒凋亡抑制基因的克隆及鉴定. 武汉大学学报(自然科学版),1998,44:521-522.
- [2] 李镇,龙繁新,张余光,等. SpltMNPV p49 基因的克隆和序列分析. 中山大学学报(自然科学版),2000,39:73-76.
- [3] Stefan J R, Martin R, Scott J S, et al. Mechanism-based inactivation of caspases by the apoptotic suppressor p35. *Biochemistry*, 2001,40:13274-13280.
- [4] Pei Z F, Reske G, Huang Q H, et al. Characterization of the apoptosis suppressor protein P49 from the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *J Biol Chem*, 2002,277(50):48677-48684.
- [5] Stephen J Z, Jennifer J S, Justin A W, et al. Baculovirus apoptotic suppressor P49 is a substrate inhibitor of initiator caspases resistant to P35 *in vivo*. *EMBO*, 2002,21(19):5130-5140.
- [6] 姚华建,于嘉林,金元,等. 甜菜坏死黄脉病毒外壳蛋白基因的表达及其表达产物抗血清的制备. 病毒学报,1994,10(1):39-43.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989,862-897.
- [8] 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用. 第2版,武汉:武汉大学出版社,1994,362-366.
- [9] Kamita S G, Majma K, Maeda S. Identification and characterization of the p35 gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus-induced apoptosis. *J Virol*, 1993,67:455-463.
- [10] Hershberger P A, LaCount D J, Friesen P D. The apoptotic suppressor p35 is required early during baculovirus replication and is targeted to the cytosol of infected cells. *J Virol*, 1994,68:3467-3477.
- [11] Clem R J, Fechemer M, Miller L K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science*, 1991,254:1388-1390.

Expression of SpltMNPV p49 Gene in *Escherichia coli* and Determination of The Time Course of Its Expression in Insect Cells

ZENG Mei-Zhen WANG Jin-Wen LI Zhen LONG Qing-Xin WANG Xun-Zhang*

(State Key Laboratory for Biocontrol/Biopharmaceutical Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The apoptotic suppressor p49 gene was amplified by PCR from the genome of *Spodoptera litura multicapsid nucleopolyhedrovirus* (SpltMNPV) and cloned into the pMD18-T vector. Sequence analysis verified the cloned fragment. The gene was then inserted into thioredoxin fusion expression vector pThioHis C and expressed stably in *E. coli* BL21 (DE3) by induction with IPTG. The expression products were about 30% of the total bacteria proteins and existed as inclusion bodies. Specific antibodies with a high titre of over 1:10000 were obtained by immunizing rabbits with the purified fusion protein and was used to determine the time course of P49 expression in SpltMNPV-infected SI cells. The results showed that P49 expression startups within 3 hours post infection and remains low level during the whole course of infection.

Key words: SpltMNPV, p49, Anti-apoptosis, Polyclonal antibody, Time course of expression