

文章编号:1674-2869(2015)07-0011-05

# 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 Gp64 基因的原核表达

张佑红<sup>1,2</sup>, 熊 瑶<sup>1,2</sup>, 周 锋<sup>1,2</sup>, 徐智鹏<sup>1,2</sup>, 湛 颀<sup>1,2</sup>, 陈杏洲<sup>1,2</sup>

1. 武汉工程大学化工与制药学院, 湖北 武汉 430074;

2. 绿色化工过程教育部重点实验室(武汉工程大学), 湖北 武汉 430074

**摘 要:**苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒囊膜蛋白 Gp64 是杆状病毒感染宿主细胞的重要功能蛋白之一. 通过 Oligo6.0 设计一对特异性引物, 用于扩增 Gp64 基因的部分 DNA 片段, 对聚合酶链式反应扩增得到的 DNA 片段进行纯化, 并对纯化后的双酶切 DNA 片段与经同尾酶双酶切后的原核表达载体 pET28a 进行连接; 对捕获有重组质粒 pET28a-Gp64 的大肠杆菌 BL21(DE3) 细胞进行异丙基硫代半乳糖苷诱导, 通过 SDS-PAGE 对诱导产物进行电泳分析, 结果表明扩增的目的片段获得了表达; 采用电透析的方法纯化了该蛋白, 为进一步制备抗 Gp64 蛋白抗体做准备.

**关键词:**苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒; Gp64 蛋白; Gp64 基因; 表达; 纯化

中图分类号: Q71

文献标识码: A

doi: 10. 3969/j. issn. 1674-2869. 2015. 07. 003

## 0 引 言

苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (AcMNPV) 是杆状病毒科核型多角体病毒属的典型代表, 该病毒的基因组为 134 kb 的环状单一双链 DNA 分子. 由于 AcMNPV DNA 含有大量多克隆序列, 这些序列不是病毒 DNA 复制所必需的, 能容许基因缺失或替换, 故常用作外源基因的表达载体<sup>[1-3]</sup>. AcMNPV 在感染宿主后有非包涵体病毒 (BV) 和包涵体病毒 (OV) 两种表现型<sup>[4-5]</sup>. Gp64 蛋白是 BV 的重要组成部分, 由 512 个氨基酸残基构成, 其分子量约为 64 kD. Gp64 蛋白是第三类过滤性的膜融合蛋白, 主要以二硫键相连的三聚体形式存在于杆状病毒 BV 颗粒的一端, GP64 基因是杆状病毒结构蛋白基因中唯一既有早期启动子又有晚期启动子的基因, 是病毒通过吸附、包吞作用进入宿主细胞的关键功能蛋白基因之一<sup>[6-7]</sup>, 在病毒吸附内吞进入宿主细胞的过程中, 依赖环境中的酸性 pH, 通过与膜融合使病毒粒子进入细胞<sup>[8]</sup>. 本研究通过 PCR 扩增 AcMNPV Gp64 基因中长度为 963 bp 的 DNA 片段, 利用软件计算其编码的蛋白质分子量约 40 kD, 将该基因克隆到原核表达系统中并成功表达截短的 Gp64 基因, 用透析袋电洗脱法对表达的目的蛋白进行纯化, 获得较纯净的 Gp64 蛋白, 利用该蛋白进行大白兔免疫实验制备抗

Gp64 蛋白抗体<sup>[9]</sup>.

## 1 实验部分

### 1.1 材料

大肠杆菌质粒 pET28a 由华中农业大学生命科学院提供, 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 AcMNPV Bacmid 由南阳理工师范学院提供, 大肠杆菌 BL21 (DE3) 和克隆型 DH10B 菌株由本实验室保存.

实验过程所需要的限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, DNA、蛋白质 Marker 以及 pGEM-T Easy Vector (T 载体) 均购自宝生物有限公司.

### 1.2 方法

1.2.1 有 AcMNPV Bacmid 全基因组提取 具体 AcMNPV Bacmid DNA 抽提方法参见 Guide to BEVS and Insert cell culture Techniques.

1.2.2 引物设计及 PCR 根据在 NCBI 上面搜索出的 1500 bp 大小 Gp64 基因的 DNA 序列, 去掉其跨膜区域周围约 500 个碱基. 利用 DNAMAN 分析其酶切位点, 通过 Oligo6.0 设计 1 对特异性引物, 引物两端分别添加 EcoR I 和 Sal I 限制酶切位点, 由武汉安基生物公司合成: 上游引物为 5'-CG-GAATTCGTAAGCGCTATTGTTT-3'; 下游引物为: 5'-CGCGTCGACTTAAATGTTTCATTTTCAGCAA-3'. 用实验室保存的菌种提取的 AcMNPV Bacmid 质

收稿日期: 2015-03-30

基金项目: 湖北省自然科学基金 (2013CFA101)

作者简介: 张佑红 (1964-), 男, 湖南浏阳人, 教授, 博士研究生导师. 研究方向: 基因工程.

粒为模板,通过 PCR 合成 Gp64 基因,扩增的目的片段大小为 963 bp. DNA 变性温度为 95 ℃ 3 min; PCR 共进行 31 个循环:94 ℃ 1 min,50 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,最后再在 72 ℃ 进行延伸反应 10 min,4 ℃ 保存备用.

**1.2.3 Gp64 基因表达载体的构建** 将特异性片段进行 Ta 克隆,验证得到的正确克隆产物进行 *Sal* I 和 *Eco* R I 双酶切,对酶切产物进行凝胶回收纯化后与经过 *Xho* I、*Eco* R I 双酶切和凝胶回收的原核表达载体 pET28a 进行连接反应,反应体系 10  $\mu$ L. 将连接产物转化到 DH10B 感受态细胞,培养 12 h 后对平板上的菌落进行鉴定,包括菌 PCR 检测,酶切验证和测序验证,对目的重组质粒命名为 pET28a-Gp64<sup>[10]</sup>. 其中 DNA 纯化过程参见天根凝胶回收试剂盒,其它实验步骤参见第三版分子克隆手册.

**1.2.4 Gp64 基因的诱导表达及电透析纯化** 制备野生型 *E. coli* BL21( DE3) 感受态细胞,用于重组质粒 pET28a-Gp64 的转化. 培养 12 h 后挑取鉴定正确的目的克隆菌接种于 10 mL LB 培养基中,37 ℃ 摇床培养过夜,次日按体积比 10% 转接到 100 mL 的 LB 培养基中培养 3 h,并向菌液中加入终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG<sup>[11]</sup>,在此作对照试验,其中选择相同的样品不加入诱导剂. 30 ℃,200 r/min 诱导表达 5 h 后,收集菌液并处理样品<sup>[12]</sup>. 对处理后的样品进行 SDS-PAGE 分析. 收集表达细菌,6 000 r/min 离心 10 min 后称重. 1 g 细菌量用 20 mL 的缓冲液 PBS 重悬. 混匀后超声破碎细胞超声 5 s,间隔 5 s,10 min 后 6 000 r/min 室温离心 10 min. 再用 20 mL 的漂洗缓冲液(2 mol/L 尿素,质量分数 0.5% 曲拉通,1 mmol/L EDTA)重悬后混匀将得到的较纯净的 Gp64 蛋白染色后点样,大概点样 500  $\mu$ L,将得到的胶块考马斯亮蓝染色 15 min. 脱色过夜至蛋白胶无蛋白位置无色. 将目的蛋白所在的区域用洁净的小刀切下来,装入处理好的透析袋中,加入 1 mL Tris-Gly 缓冲液,置 4 ℃ 30 min. 取事先放置在 4 ℃ 的 Tris-Gly 缓冲液加入到核酸电泳仪,将含有目的蛋白的透析袋放入,电泳 2~3 h,每间隔 1 h 更换预冷的缓冲液. 电泳结束后,将透析袋放入 pH8.0 的 PBS 缓冲液中透析过夜. 透析结束后,取透析液蛋白电泳分析纯化结果<sup>[13]</sup>.

**1.2.5 抗 Gp64 蛋白抗体制备及特异性检测** 以 Gp64 蛋白为抗原,进行大白兔免疫实验. 汲取 1 mL 蛋白溶液(400~600 ng/mL)对大白兔进行双腿静脉注射. 在饲养间隔 14 d 和 28 d 后进行第 1

次和第 2 次加强针注射. 继续培养 11 d 后取静脉血,收集抗体进行抗体利用蛋白印记进行特异性检测. 其中特异性一抗 1:4 000 进行稀释. 羊抗兔二抗 1:8 000 进行稀释.

## 2 结果和分析

### 2.1 重组质粒 pET28a-Gp64 的构建

图 1、2 为重组质粒 pET28a-Gp64 的构建的电泳图.

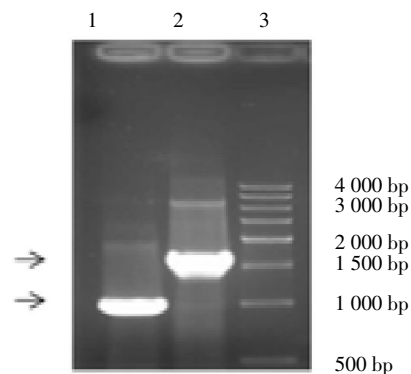


图 1 全长和截短 Gp64DNA 序列 PCR 电泳图

Fig.1 PCR-Electrophoreses about Gp64 and truncate Gp64 DNA sequence

注:1.中在 1 000 bp 处有明显条带;2.中在 1 500 bp 处有

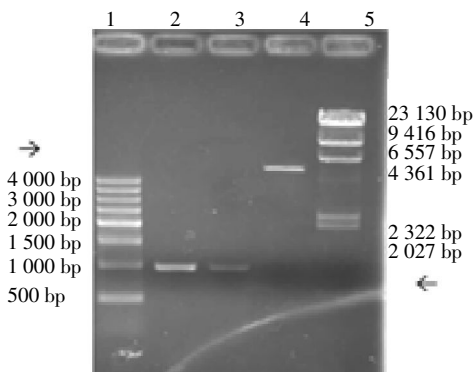


图 2 Gp64 和 pET28a 凝胶回收后电泳图

Fig.2 Electrophoreses after gel extraction about Gp64 and pET28a

注:1 为 500 bp Marker;2、3 为截短 Gp64 片段;4 为 pET28a 载体;5 为  $\lambda$ Hind III

PCR 后通过电泳得到截短 Gp64DNA 图,结果显示与预期结果相同,在 1 000 bp 左右位置有亮带. 所需要的目的 DNA 经过凝胶电泳纯化,通过 DNA 电泳可知纯化得到的较纯净的 DNA,用于做连接反应,目的在于增加连接效率.

### 2.2 重组质粒 PCR 检测和酶切检测

挑选 3 个重组子做菌落 PCR 检测,其结果如图 3 所示,都能扩增出很明显的目的片段. 然后,将选择 1、2 号进一步进行酶切检测,分别采用 *Eco* R V 和

*EcoR* I 双酶切, *EcoR* I 和 *EcoR* V 单酶切. 根据质粒图谱分析重组子采用 *EcoR* I 和 *EcoR* V 单酶切出现 6 300 bp 左右条带; 采用 *EcoR* V 和 *EcoR* I 双酶切出现 1 381 bp 和 4 914 bp 条带. 选择正确的重组子进行测序检测, 捕获所需要的目的重组子.

### 2.3 目的蛋白的表达及纯化

通过诱导实验, 对样品进行相同处理后, 采用质量分数 12% SDS-PAGE 电泳图得到如下图 5 所示, 其中加入诱导剂进行诱导的菌种在 29~44 kD 之间明显产生大量的蛋白质, 与理论上目的蛋白 40 kD 相符合. 所以目的蛋白成功诱导表达. 图 6 显示, 经过电透析纯化的蛋白纯度较高, 符合下一步实验的要求.

### 2.4 抗体的制备及特异性检测

利用制备的抗体进行 WB 实验结果如下图 7 所示, 其中检测抗原为电透析纯化的 Gp64 蛋白. 图 7 说明制备的抗体具有识别 Gp64 蛋白能力, 该图中抗原按照一定的稀释度点样, 当样品量高时, 得到的条带不单一表明抗体的纯度不高. 由于免疫试验所提供的蛋白纯度不够, 杂蛋白对抗体的特异性有一定的影响. 可以利用电透析纯化的目的蛋白对所制备的抗体进行纯化, 增加抗体的特异性.

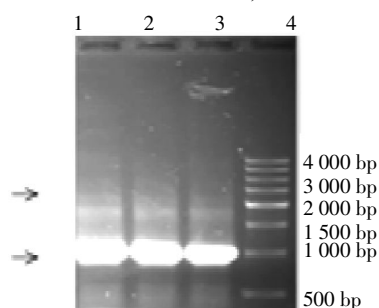


图 3 PCR 检测重组子电泳图片

Fig.3 PCR electrophoreses about recombination bacterial colony

注: 图中 1 000 bp 处的亮带为目的 DNA 所在位置

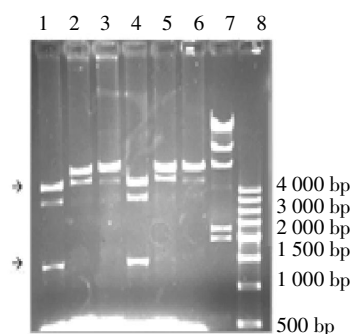


图 4 酶切检测重组子电泳图片

Fig.4 Electrophoreses about recombination DNA

注: 图 4 中 1, 2, 3 分别为 1 号质粒 *EcoR* V 和 *EcoR* I 双酶切, *EcoR* I 和 *EcoR* V 分别单酶切结果; 4, 5, 6 分别为 2 号质粒 *EcoR* V 和 *EcoR* I 双酶切, *EcoR* I 和 *EcoR* V 分别单酶切结果 7 为  $\lambda$ Hind III, 8 为 500 bp Marker

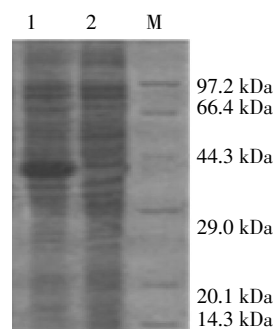


图 5 目的蛋白诱导表达

Fig.5 Expression about purpose protein

注: 图中 1 为表达菌种加入诱导剂后的样品; 2 为表达菌种未加如诱导剂后处理样品. M 为 Marker

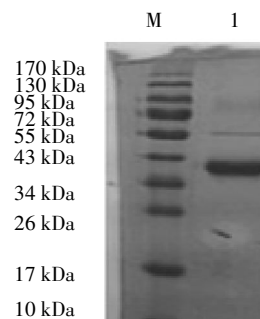


图 6 目的蛋白纯化图片

Fig.6 Purification about purpose protein

注: 其中 M 为 Marker, 1 为目的蛋白

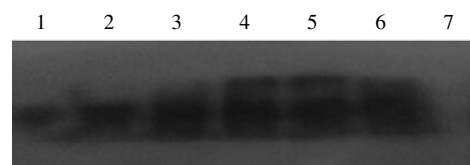


图 7 蛋白印迹

Fig.7 Western Blot

注: 1~6 为不同浓度 Gp64 蛋白; 7 为 marker 泳道

## 3 讨论

Gp64 蛋白是核型多角体病毒囊膜上的一个经糖基化修饰的功能蛋白, 在病毒入侵宿主细胞和出芽型病毒转运过程中都起重要作用<sup>[14]</sup>. 为了进一步研究杆状病毒 Gp64 蛋白在病毒感染宿主过程表达检测及寻找其相互作用蛋白, 制备高效价的抗 Gp64 蛋白抗体是极为重要的一步. 我们对 Gp64 基因的完整读码框进行扩增, 并将构建的重组载体导入 BL21( DE3) 表达菌, 多次对诱导条件进行摸索, 同时更换表达菌等尝试无法获得原核表达的 Gp64 蛋白(结果未显示). 分析原因可能是 Gp64 蛋白为囊膜蛋白, 它的跨膜区域会阻止蛋白质的折叠, 从而影响目的蛋白的合成<sup>[10-11]</sup>; 其次稀有密码子对蛋白翻译的影响, 目标蛋白跨膜区域周

围存在较多的稀有密码子,在翻译时出现了翻译障碍导致蛋白合成终止而无法合成目的蛋白<sup>[9]</sup>.通过分析,切除其跨膜区域后,将重新构建的重组子导入到 BL21 表达菌中实现了 Gp64 截短蛋白基因在大肠杆菌中的表达.对表达的蛋白进行电透析纯化.其中使用 6×His 标签进行纯化,但是表达的蛋白为包涵体蛋白,在洗涤变性过程中,高盐浓度对于镍柱吸附效率影响很大,纯化量及纯度远远达不到要求(结果未显示),故采用电透析纯化.利用该蛋白进行大白兔免疫实验得到了特异性结合 Gp64 蛋白的抗体,为 Gp64 蛋白后续的表达检测及研究其相互作用的蛋白奠定了基础.

## 致 谢

感谢湖北省科技厅的资助!

## 参考文献:

- [1] KOST T A, CONDREAY J P, JARVIS D L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(5): 567-575.
- [2] CHEJANOVSKY N. Using the baculovirus insect cell system to study apoptosis [J]. *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols*, 2007(388): 435-446.
- [3] STEWART M E, B N. Baculovirus expression of beak and feather disease virus (BFDV) capsid protein capable of self-assembly and haemagglutination[J]. *Journal of Virological Methods*, 2007, 141(2): 181-187.
- [4] WANG S, FANG L. Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Vaccine*, 2007, 25(49): 8220-8227.
- [5] COX M M. Progress on baculovirus-derived influenza vaccines [J]. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 2008, 10(1): 56-61.
- [6] JAN K, SILVIA L, NICOLA G A. The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines[J]. *Nature*, 2008(10): 1024-1030.
- [7] LI Z F, GARY W. Functional analysis of the transmembrane (TM) domain of the autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus GP64 protein: substitution of heterologous TM Domains [J]. *Journal of Virology*, 2008(8): 3329-3341.
- [8] LI Z F, GARY W. Baculovirus GP64 disulfide bonds: the intermolecular disulfide bond of autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus GP64 is not essential for membrane fusion and virion Budding [J]. *Journal of Virology*, 2010(8): 8584-8595.
- [9] 李国辉,唐琦,胡朝阳.家蚕核型多角体病毒囊膜蛋白 GP64 的原核表达 [J]. *微生物学杂志*, 2011, 31(4): 90-94.  
LI Guo-hui, TANG Qi, HU Zhao-yang, et al. prokaryotic expression of silk worm (bombyx mori) nucleopolyhedrovirus GP64 gene [J]. *Journal of Microbiology*, 2011, 31(4): 90-94. (in Chinese)
- [10] LINDLEY K M, SU J L, PAULA K. Production of monoclonal antibodies using recombinant baculovirus displaying gp64 - fusion proteins [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2000, 234(2): 123-135.
- [11] 金晶,蔡亦红,类延花,等. HCMV pp65 截短蛋白原核表达条件优化[J]. *微生物学志*, 2005, 25(3): 28-32.  
JIN Jing, CAI Yi-hong, LEI Yan-hua, et al. Optimization of prokaryotic expression of truncated HCMV pp65 protein [J]. *Journal of Microbiology*, 2005, 25(3): 28-32. (in Chinese)
- [12] 徐智鹏,张佑红,陈杏洲,等. 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 Gp64 蛋白的优化表达[J]. *湖北大学学报*, 2014, 36(1): 21-24.  
XU Zhi-peng, ZHANG You-hong, CHEN Xing-zhou, et al. Optimal expression of Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus Gp64 protein in E. coli [J]. *Journal of Hubei University: Natural Science*, 2014, 36(1): 21-24. (in Chinese)
- [13] 黄轶,华超,徐江英,等. 透析袋电洗脱法在蛋白质回收和纯化中的应用 [J]. *南京军医学报*, 2003, 25(1): 33-34.  
HUANG Yi, HUA Chao, XU Jiang-ying, et al. Application of the dialysis bag electroelution method in protein recovery and purification [J]. *Journal of Nanjing Military Medical College*, 2003, 25(1): 33-34. (in Chinese)
- [14] ZHANG YH, WEI W, XU P et al. The cell cycle phase affects the potential of cells to replicate Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus [J]. *Acta Virologica*, 2012, 56: 133-137.

## Prokaryotic expression of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedro virus Gp64 gene

ZHANG You-hong<sup>1,2</sup>, XIONG Yao<sup>1,2</sup>, ZHOU Feng<sup>1,2</sup>, XU Zhi-peng<sup>1,2</sup>, CHEN Jie<sup>1,2</sup>, CHEN Xing-zhou<sup>1,2</sup>

1.School of Chemical Engineering & Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China;

2.Key Laboratory for Green Chemical Process(Wuhan Institute of Technology), Ministry of Education, Wuhan 430074, China

**Abstract:** Gp64 protein is one of important function proteins in baculovirus virion during infectious process. Specific primers were designed by Oligo6.0 to amplify and purify a truncated fragment of silk worm *autographa californica* multiple nucleopolyhedro virus Gp64 gene with polymerase chain reaction. The purified target DNA fragment was subjected to double enzymatic digestion with *EcoR* I and *Xho* I while prokaryotic expression vector pET28a was cut by *EcoR* I and *Sal* I, then the ligation between the two products was carried out; *E.coli* BL21 (DE3) cells that had caught the recombinant plasmid pET28a-GpP64 were induced with isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, the induced product was then analyzed with SDS-PAGE. And the results show that the amplified target is expressed. The protein was purified by electro dialysis, which makes for the preparation of anti Gp64 antibody.

**Keywords:** AcMNPV; Gp64 protein; Gp64 gene; expression; purification

本文编辑:张 瑞

---

(上接第 4 页)

## Preparation of nanometer silica in impinging streams reactor

ZHOU Yu-xin, WEI Xin-yu, LIU Zhao-xia, GUO Jia

1.School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China;

2.Key Laboratory of Green Chemical Process (Wuhan Institute of Technology), Ministry of Education, Wuhan 430074, China

**Abstract:** In the submerged circulating impinging stream reactor, nano silica was prepared by the reaction-precipitate method. Nine water sodium silicate and sulfuric acid were used as raw materials, and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was used as a dispersant. The optimal technical conditions to prepare nano silica are the concentration of sodium silicate of 0.3 mol/L, the concentration of sulfuric acid of 20%, the pH 5 of reaction ends, the rotational speed of propeller of 800 r/min, the reaction time of 70 mins, and the addition amount of CTAB of 0.4 g/L. The prepared nano silica was characterized by transmission electron microscope. The nano silica is approximately spherical in shape, and its particle size is about 11 nm, meanwhile it has good dispersion and high purity with product yield over 98%. The nano silica meets 2010 pharmaceutical stand.

**Key words:** impinging stream reactor; response-precipitation; nano silica

本文编辑:张 瑞