

噬菌体基因 蛋白基因的合成、 重组表达及功能分析

张大川, 房国梁, 李琦, 陈江源, 王岚, 李睿, 刘烈炬, 刘志国*
(武汉工业学院生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023)

摘要: 目的: 研究丝状噬菌体基因 V 蛋白(gene V protein, GVP)基因的合成、重组表达及其功能。方法: 根据 GVP 的基因序列, 选择大肠杆菌偏爱的密码子, 设计合成了 8 个寡核苷酸片段, 利用重叠延伸 PCR 合成 GVP 基因序列, 将其与原核表达载体 pET-28a-c(+)质粒重组, 转化大肠杆菌, 获得 GVP 蛋白阳性表达菌株, 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导表达, 产物经 Ni^{2+} -NTA 琼脂糖凝胶层析纯化, 获得目的蛋白 GVP, DNA 结合实验检测其功能。结果: 成功合成出 GVP 基因, 重组体在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导获得高效表达, DNA 结合实验表明 GVP 与单链 DNA 间解离平衡常数 $K_d=7.27 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ 。结论: 重组构建并高效表达的 GVP 蛋白具有较高单链 DNA 结合能力, 可用于食品病原微生物特定单链 DNA 分子的浓缩和分离。

关键词: 基因 V 蛋白(GVP); 大肠杆菌 BL21(DE3); 重组; 表达

Synthesis, Recombinant Expression and Functional Analysis of Filamentousphage Gene V Protein

ZHANG Da-chuan, FANG Guo-liang, LI Qi, CHEN Jiang-yuan, WANG Lan, LI Rui, LIU Lie-ju, LIU Zhi-guo*
(School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: Objective: To explore the gene synthesis, recombinant expression and functions of filamentousphage gene V protein (GVP). Methods: According to the gene sequence of GVP, eight oligonucleotide fragments with the selected *E. coli*-preferred codon were designed, and the GVP gene sequence was synthesized by overlap extension PCR. Then the synthesized sequence was inserted into pET-28a-c(+) plasmid. The recombinant plasmids obtained were transformed into *E. coli* to screen positive isolates of GVP. GVP expression in the positive strains was induced with IPTG. The recombinant proteins were purified by Ni^{2+} -NTA affinity chromatography. Results: GVP gene was successfully synthesized and highly expressed in *E. coli* BL21 (DE3) under the induction of IPTG, and the equilibrium dissociation constant was $7.27 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ between GVP and ssDNA. Conclusion: The recombinant GVP has high affinity with ssDNA and therefore can be used for the ssDNA detection of some pathogenic microorganisms in food.

Key words: gene V protein; *E. coli* BL21 (DE3); recombination; expression

中图分类号: Q782

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)01-0191-04

丝状噬菌体多可感染含 F 因子的大肠杆菌, 基因 V 蛋白(gene V protein, GVP)主要是由 Ff 组的 M13、F1、fd 等丝状噬菌体产生的一种非结构蛋白, 由 87 个氨基酸残基组成, 为噬菌体 DNA 复制所必需, 可使噬菌体 DNA 移动至细菌的细胞膜, 属于单链 DNA 结合蛋白, 而且结合单链核苷酸与碱基序列无直接关系, 该蛋白还可抑制翻译活性, 在病毒、原核生物的 DNA 复制、翻

译及遗传重组等过程中发挥重要作用^[1-3]。

已有研究表明, 利用 GVP 与单链 DNA 非特异性结合的特性, 在核酸与蛋白质相互作用、病原微生物的核酸检测以及 DNA 测序等许多方面可有广泛应用, 如利用某些单链 DNA 结合蛋白筛选生物标本或样品中单链核苷酸片段来研究某些外显子的特性等^[4-6]。可见该类 DNA 结合蛋白作为应用工具有较高的价值。

收稿日期: 2011-07-01

基金项目: 武汉市科技局对外科技合作与交流计划项目(201070934341);

武汉市科技局现代农业技术创新平台项目(201120637175-5)

作者简介: 张大川(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品安全。E-mail: zhangdachuan1985@163.com

* 通信作者: 刘志国(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为生物技术与食品安全。E-mail: zhiguo_l@126.com

野生型的 GVP 广泛存在于细菌中, 但含量较低且不易收集。本研究旨在利用重叠延伸 PCR 方法合成 GVP 基因序列, 与质粒重组并在大肠杆菌中高效表达, 产物经分离纯化后进行单链 DNA(ssDNA)结合力检测, 为食品等病原微生物中单链特性的 DNA 片段分离、浓缩及检测奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 菌株、BL21(DE3)菌株、质粒 pET-28a-c(+)由武汉工业学院生物技术研究室保存; 限制性内切酶 *Xho* I、*Eco*R I、T4 连接酶 日本 Toyobo 公司; 50bp DNA Ladder Marker 宝生物工程(大连)有限公司; 1kb plus DNA Ladder 天根生化科技(北京)有限公司; PCR 产物纯化试剂盒 美国 Axygen 公司; DNA 凝胶回收试剂盒 上海捷瑞生物工程有限公司; *Pfu* DNA 聚合酶、质粒小量制备试剂盒、中分子质量标准蛋白 上海捷瑞生物工程有限公司; 蛋白胨、酵母浸提物 英国 Oxoid 公司; Ni²⁺-NTA 树脂 Novagen 公司; DNA 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 重组子 pET-28a-c(+)-GVP 的构建

利用重叠延伸 PCR 方法^[7]构建目的基因, 参照 GeneBank 上的 GVP 基因序列(Accession No. J02450), 将目的基因中的大肠杆菌稀有密码子改为大肠杆菌偏爱密码子, 在其 5'端加 *Eco*R I 酶切位点, 3'端加 *Xho*I 的酶切位点, 两端各加两个保护碱基。整个基因序列全长 280bp, 将其分 8 段合成 DNA 引物, 相邻两段间各有 18 个碱基互补重叠。

8 段引物分别为: Pr1: 5' - CGGAATTCATGATTAAAGTTGAAATT-3'下划线碱基为 *Eco*RI 酶切位点; Pr2: 5' - GAAACACCAGAACGGGTGGTGAAGTGCCTGAGACGGTTTAATTTCAACTTTAATCAT-3'; Pr3: 5' - CACCCGTTCTGGTGTCTCTCGTCAGGGCAAACCGTATTCAGTGAATGAGCAGCTGTGTT-3'; Pr4: 5' - AATCTTGACCAGACCGGATACTGATTACCCAGATCACGT AACACAGCTGCTCATTTCA-3'; Pr5: 5' - CACCCGTTCTGGTGTCTCTCGTCAGGGCAAACCGTATTCAGTGAATGAGCAGCTGTGTT-3'; Pr6: 5' - AACC GAACTGACCAACTTTGAACGAGGACAGATGAACGGTGTACAGACCCGCGCATAG-3'; Pr7: 5' - AAGTTGGTCAGTTCGGTTCCTGATGATTGATC GTCTGCGCCTGGTTCGGCGAAATAA-3'; Pr8: 5' - ATCTCGAGTTATTTCCGCCGAACAG-3'。下划线碱基为 *Xho* I 酶切位点。

利用相邻引物间重叠互补的核苷酸片段互相搭桥, 并各为模板, 进行 3 轮重叠延伸 PCR^[7], 最终将 8 片段连成目的基因^[8-9], 以此目的基因为模板, Pr1 和 Pr8 分别为上

下游引物进行 PCR, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

分别用 *Eco*R I 和 *Xho* I 于 37℃ 水浴双酶切 4h 目的基因及质粒 pET-28a-c(+), 各自回收后, 将酶切回收的目的基因和质粒用 T4 DNA 连接酶于 16℃ 进行连接反应 10h; 连接产物即重组子转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含有卡那霉素(50 μ g/mL)的 LB 固体培养基上, 筛选阳性菌落, 提取质粒酶切并 PCR 扩增鉴定重组基因, 并送交上海杰瑞生物工程有限公司测序检测。测序结果与设计序列相符的重组子命名为 pET-28a-c(+)-GVP。

1.3 重组子 pET-28a-c(+)-GVP 的表达

将重组子 pET-28a-c(+)-GVP 转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 涂布于含有卡那霉素(50 μ g/mL)的 LB 固体培养基上, 挑取单菌落接种于含有卡那霉素(50 μ g/mL)的 2mL LB 液体培养基中 37℃ 培养过夜, 吸取少量过夜培养液按 1:100 的比例转接到新鲜 LB(含有卡那霉素 50 μ g/mL)培养基中, 于 37℃ 摇床培养至 OD_{600nm} 为 0.6~0.8, 加入异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)(终浓度 1.0mmol/L)诱导 10h^[10]。收集菌体提取蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.4 重组蛋白的纯化

将诱导后的菌液于 4℃、8000r/min 离心 20min, 弃上清液, 细菌沉淀用 1/10 的裂解液 (NaH₂PO₄ 20mmol/L、NaCl 0.5mol/L、1% TritonX-100, pH7.4)重悬, 超声波破碎, 4℃、12000r/min 离心 20min, 收集上清液, 加入终质量浓度为 5 μ g/mL 的 DNase 和 RNase, 30℃ 水浴 30min。使用 Ni²⁺-NTA 琼脂糖层析柱纯化上清液中的目的蛋白, 进行 SDS-PAGE 分析。

1.5 优化重组蛋白的表达条件

1.5.1 IPTG 浓度对 GVP 蛋白表达的影响

按 1.3 节方法分别用浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2mmol/L 的 IPTG 进行诱导 4h, 收集菌体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.5.2 诱导时间对 GVP 蛋白表达的影响

根据 1.5.1 节所得最佳浓度的 IPTG 分别诱导 1、2、4、6、8h, 收集菌体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析。

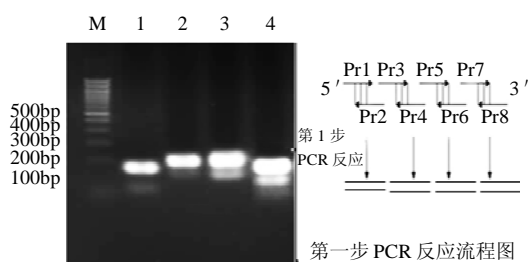
1.6 重组蛋白与单链 DNA 结合力的分析

纯化后的 GVP 蛋白与 Ni²⁺-NTA 琼脂糖凝胶相偶联。偶联后的凝胶各取 50 μ L, 分别加入浓度分别为 0.018、0.036、0.072、0.108、0.144、0.180mol/L 的 pET-28a-c(+)单链 DNA(质粒 pET-28a-c(+))95℃ 变性 10min, 立即冰浴 30min, 混匀, 20℃ 孵育 1h, 3000 \times g 离心 5min, 弃上清液; 用洗涤液(磷酸钠 20mmol/L、NaCl 0.5mol/L, pH7.4)洗两次, 加入 100 μ L 洗脱液(磷酸钠 20mmol/L、NaCl 0.5mol/L、咪唑 500mmol/L, pH7.4)洗脱, 3000 \times g 离心 5min, 取上清液。测上清液单链 DNA 浓度, 绘制饱和曲线和 Scatchard 图。

2 结果与分析

2.1 目的基因的合成及重组基因的鉴定

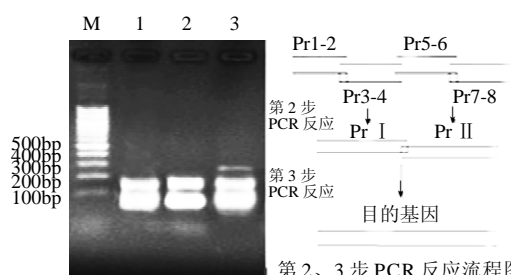
经过第1轮重叠延伸PCR将8段引物合成4段核苷酸序列(图1)。纯化回收合成的4段序列,进行第2轮重叠延伸PCR,进一步合成两个更大的片段,最后第3轮重叠延伸PCR合成目的基因片段(图2)。提取转化的大肠杆菌DH5 α 阳性菌落质粒,经双酶切和PCR扩增,阳性重组质粒可以切出与目的基因大小一致的片段,均为280bp(图3)。阳性重组质粒测序结果与设计完全相符,序列完整且阅读框正确。



泳道 M. DL100 DNA Ladder; 泳道 1. Pr1- Pr2 合成片段 Pr1-2; 泳道 2. Pr3- Pr4 合成片段 Pr3-4; 泳道 3. Pr5- Pr6 合成片段 Pr5-6; 泳道 4. Pr7- Pr8 合成片段 Pr7-8。

图1 第1轮重叠延伸PCR

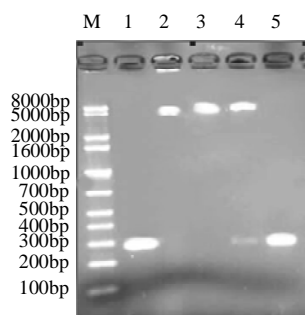
Fig. 1 The first step of overlap extension PCR



泳道 M. DL100 DNA Ladder; 泳道 1. 片段 Pr1-2 与 Pr3-4 合成片段 Pr I; 泳道 2. 片段 Pr5-6 与 Pr7-8 合成片段 Pr II; 泳道 3. 片段 Pr I 与 Pr II 合成目的基因。

图2 第2、3轮重叠延伸PCR

Fig. 2 The second and third steps of overlap extension PCR



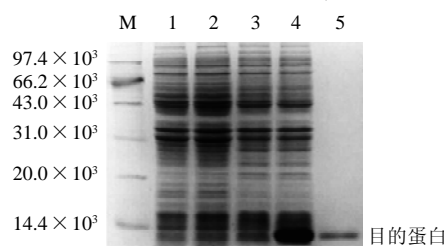
泳道 M. 1.1kb plus DNA Ladder; 泳道 1. 合成的 GVP 目的基因; 泳道 2. 质粒 pET-28a-c(+); 泳道 3. 重组子 pET-28a-c(+)-GVP; 泳道 4. 重组子 pET-28a-c(+)-GVP EcoR I 和 XhoI 双酶切; 泳道 5. 重组基因 pET-28a-c(+)-GVP 的 PCR 产物。

图3 重组基因电泳分析

Fig. 3 Electrophoretic analysis of recombinant genes

2.2 重组质粒在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达及重组蛋白的纯化

SDS-PAGE实验结果显示在相对分子质量 13×10^3 处出现了表达条带(图4), 分子质量大小与预期一致, 说明 GVP 蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中成功表达。使用 Ni²⁺-NTA 树脂纯化目的蛋白, 纯化效果较好(使用 Quantity One 软件分析计算纯度达 90% 以上)。



泳道 M. 蛋白相对分子质量标准; 泳道 1. 未诱导的 BL21(DE3)-pET-28a-c(+)-全菌蛋白; 泳道 2. 未诱导的 BL21(DE3)-pET-28a-c(+)-GVP 全菌蛋白; 泳道 3. 经 IPTG 诱导的 BL21(DE3)-pET-28a-c(+)-全菌蛋白; 泳道 4. 经 IPTG 诱导的 BL21(DE3)-pET-28a-c(+)-GVP 全菌蛋白; 泳道 5. 纯化后的重组(GVP)蛋白。

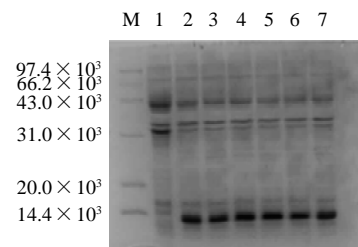
图4 重组蛋白的表达及纯化

Fig. 4 Expression and purification of recombinant protein

2.3 重组蛋白表达条件的优化

2.3.1 IPTG 浓度对 GVP 蛋白表达的影响

在 IPTG 浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2mmol/L, 各诱导 4h, 发现在 0.8mmol/L 时, 目的蛋白表达量最高(图5)。



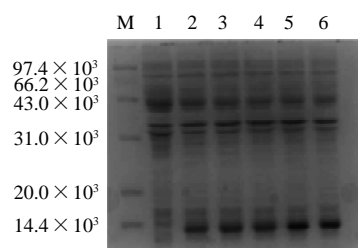
泳道 M. 蛋白分子质量标准; 泳道 1. 未诱导的 BL21(DE3)-pET-28a-c(+)-GVP 全菌蛋白; 泳道 2~7 分别为 IPTG 浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2mmol/L 诱导的 BL21(DE3)-pET-28a-c(+)-GVP 全菌蛋白。

图5 诱导剂 IPTG 浓度对重组蛋白 GVP 表达的影响

Fig. 5 Effect of IPTG on the expression of recombinant GVP

2.3.2 诱导时间对 GVP 蛋白表达的影响

以 0.8mol/L 的 IPTG 分别诱导 1、2、4、6、8h, 结果显示诱导 6h 时目的蛋白表达量最大(图6)。



泳道 M. 蛋白分子质量标准; 泳道 1. 未诱导的 BL21(DE3)-pET-28a-c(+)-GVP 全菌蛋白; 泳道 2~6 分别为诱导 1、2、4、6、8h 的 BL21(DE3)-pET-28a-c(+)-GVP 全菌蛋白。

图6 诱导时间对重组蛋白 GVP 表达的影响

Fig. 6 Effect of induction time on the expression of recombinant GVP

2.4 重组 GVP 蛋白与单链 DNA 结合实验结果分析

GVP 蛋白与单链 DNA 结合呈现饱和性, 饱和结合量为 0.04mol/mol GVP, 与双链 DNA 结合量为 0.013mol/mol GVP, 结合程度明显低于单链 DNA(图 7)。根据 Scatchard 作图法^[11], 以结合的 ssDNA 浓度 / 游离的 ssDNA 浓度对结合的 ssDNA 浓度作图, 得到一条高度相关直线(图 8), 由此可计算 GVP 蛋白与单链 DNA 结合的解离常数 K_d 值为 7.27×10^{-5} mol/L。

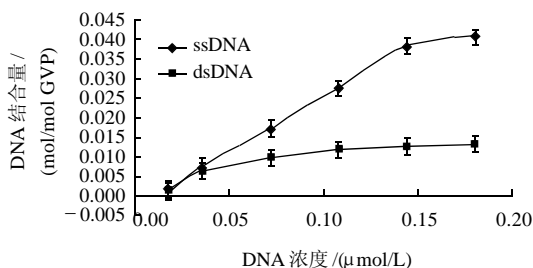


图 7 重组 GVP 与 DNA 的结合曲线
Fig. 7 Curve of DNA binding capacity of GVP

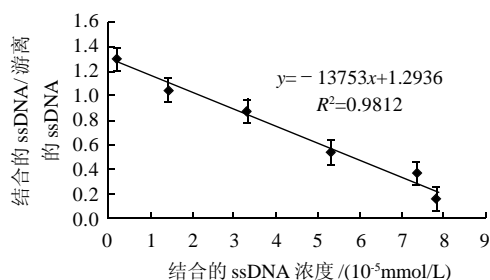


图 8 重组 GVP 与 ssDNA 结合力的线性关系图
Fig.8 Linear relationship between binding ssDNA concentration/free ssDNA concentration ratio and free ssDNA concentration

3 讨论

在大肠杆菌表达体系中, 由于外源蛋白在大肠杆菌中的表达受多种因素的影响, 如启动子和终止子的强弱、SD 序列、密码子的偏爱性、基因二级结构、宿主菌的遗传背景、培养条件等, 其中尤以密码子的偏爱性最为重要^[12]。因此为了实现 GVP 基因在大肠杆菌中的高效表达, 采用基因全合成的方式, 使用大肠杆菌偏爱密码子替换原密码子, 从基因水平上进行优化。

本实验中将 GVP 基因分成了 8 段, 其中的第 1 段和第 8 段为 26bp, 相对较短, 并设计了酶切位点, 以便于扩增全长 DNA 片段及方便装入载体中。重叠延伸 PCR 过程中, 重叠碱基的数目既决定了每个片段的长度, 又决定了扩增的效果, 重叠数目过低不利于延伸的正确进行。因此本实验采用每段重叠 18bp, 以提高重叠延伸 PCR 的特异性^[13-14]。

丝状噬菌体编码的 GVP 蛋白为 87 个氨基酸残基, 相对分子质量为 9682。本实验得到的重组 GVP 相对分子质量约为 13000, 主要由目的基因与载体 pET-28a(+)中表达氨基末端的一段 $6 \times \text{His}$ 标签的序列进行融合表达所致, 这样即可实现目的蛋白在宿主菌中的高效表达, 同时 His 标签又为后续的重组蛋白分离纯化提供了方便, 利用重组蛋白上 His 标签与 Ni^{2+} 亲和层析柱间高的亲和力, 洗涤杂蛋白纯化目的蛋白。

通过 DNA 结合实验显示出重组 GVP 蛋白具有较好的单链 DNA 结合能力, 对同一起来源的双链 DNA 亲和作用明显较低。结果表明所得的重组 GVP 蛋白与天然的 GVP 蛋白功能相同或相似, 属于 DNA 结合蛋白。

参考文献:

- [1] MOU T C, GRAY C W, GRAY D M, et al. The binding affinity of Ff gene 5 protein depends on the nearest-neighbor composition of the ssDNA substrate[J]. Biophysical Journal, 1999, 76(3): 1537-1551.
- [2] MOU T C, GRAY C W, TERWILLIGER T C, et al. Ff gene 5 protein has a high binding affinity for single-stranded phosphorothioate DNA[J]. Biochemistry, 2001, 40(7): 2267-2275.
- [3] WEN J D, GRAY D M. Selection of genomic sequences that bind tightly to Ff gene 5 protein: primer-free genomic SELEX[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(22): e182. doi: 10.1093/nar/gnh179.
- [4] ZOU Wenquan, ZHENG Jian, GRAY D M, et al. Antibody to DNA detects scrapie but not normal prion protein[J]. PNAS, 2004, 101(5): 1380-1385.
- [5] 王霞, 李轶女, 赵巧玲, 等. ApNPV 编码的 DNA 单链结合蛋白基因 lef-3 的克隆与分析[J]. 蚕业科学, 2005, 31(2): 145-150.
- [6] AYRES M D, HOWARD S C, KUZIO J, et al. The complete DNA sequence of autographa californica nuclear polyhedrosis virus[J]. Virology, 1994, 202(2): 586-605.
- [7] HOROTON R M, PULLEN J K, PEASE L R, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction [J]. Gene, 1989, 77(1): 51-59.
- [8] ZEIDLER M, STEWART G E, BARRACLOUGH C R, et al. New variant Creutzfeldt-Jakob disease: neurological features and diagnostic tests[J]. Lancet, 1997, 350: 903-907.
- [9] WILESMITH J W, RYAN J B, HOFFMAN R, et al. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological features 1985 to 1990[J]. Veterinary Record, 1992, 130(5): 90-94.
- [10] MOORE J, BOSWELL S, HOFFMAN R, et al. Mutant H-ras over-expression inhibits a random apoptotic nuclease in myeloid leukemia cells[J]. Leukemia Research, 1993, 17 (8): 703-709.
- [11] 祝庆麟. Scatchard 作图及其参数求解法[J]. 中国医学科学院学报, 1986, 8(6): 466-472.
- [12] 王云龙, 李玲玲, 李晨阳, 等. 猪 γ 干扰素基因的合成、表达及纯化[J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(7): 511-514.
- [13] 陈国梁, 张金文, 陈宗礼, 等. 重叠 PCR 一步法对三种淀粉合成酶融合基因的构建[J]. 甘肃农业大学学报, 2010, 45(3): 38-43.
- [14] 符勇耀, 李正国, 李泮志, 等. 优化重叠 PCR 法进行单链抗体基因扩增和点突变[J]. 生物技术通报, 2009(7): 150-155.