

# 1个白斑综合症病毒基因的克隆 及其在大肠杆菌 M15 中的表达

江世贵, 何建国, 张欣强, 邓敏, 余建秀

(中山大学 生命科学学院, 广东 广州 510275)

**摘要:**根据对虾白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)1个可能编码蛋白的开放读码框(open reading frame, ORF)的序列(WSSV A 基因),结合 pQE30 载体的多克隆位点,设计1对引物进行 PCR,扩增出大小为 0.28 kb 的 A 基因片段。把目的片段克隆到 pGEM-T Easy 载体上,构建出重组质粒 pGT-A,再用引物两端酶酶切出目的片段,并按正确的读码框顺序插入到 pQE30 表达载体上的乳糖操纵子中,构建出带有目的片段的重组质粒 pQE30-A,然后将重组质粒转化大肠杆菌 M15 细胞,经 IPTG 诱导,SDS-PAGE 和 Western blot 显示有与 A 基因预期大小 11 kD 相吻合的融合蛋白带。结果表明,来源于 WSSV 的这一 ORF 是 1 个可表达的基因。

**关键词:**基因克隆和表达;白斑综合症病毒;融合蛋白;Western blot

**中图分类号:**S945.4 **文献标识码:**A

**文章编号:**1005-8737(2003)01-010-04

对虾白斑综合症(white spot syndrome)的研究早期主要集中在病理学、流行病学及综合防治技术等方面,分子生物学方面的研究主要集中于快速诊断技术<sup>[1-5]</sup>。随着白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)基因组文库的建立及 WSSV 基因组全序列测定的完成,对 WSSV 基因结构和功能的研究受到重视。由于 WSSV 的开放读码框(ORF)与已知基因的同源性很低,大多数 ORF 都可能是新的基因,且未知其功能<sup>[6]</sup>。已经报道的 WSSV 基因还很少。

为了开展 WSSV 基因的功能研究,作者利用本实验室邓敏等<sup>[7]</sup>建立的 WSSV 基因组文库,对 WSSV 的 1 个 8.5 kb 左右的 DNA 片段进行测序、分析,从中找到多个可能为编码蛋白基因的开放读码框(ORF)。为研究这些 ORF 是否为可表达的基因,作者选择其中 1 个功能未知的 ORF(该 ORF 与 Van Hulst<sup>[6]</sup>在 WSSV 全序列测定中发现的 ORF110 是同一个 ORF)与

pQE30 表达载体重组,构建重组质粒,并利用大肠杆菌 M15 的 6×His tag 表达系统进行融合表达,旨在为进一步研究 WSSV 的基因功能打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

E15 重组质粒由本实验室邓敏等<sup>[7]</sup>构建,在 pBluescript II KS 中含有约 8.5 kb 的对虾 WSSV 的 DNA 片段;pGEM-T Easy 载体购自 Progam 公司;表达质粒 pQE-30 购自 QIAGEN 公司。大肠杆菌 TG1 为本实验室保存;大肠杆菌 M15 购自 QIAGEN 公司。限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、*Sph*I I 以及 T4DNA 连接酶购自 Boehringer Mannheim 公司;Western blot 检测试剂盒购自 QIAGEN 公司。

### 1.2 目的 DNA 片段的 PCR 引物

根据 A 基因两端的序列和 pQE-30 质粒的多酶切位点,设计了 1 对引物,P-5' - -CGATCCATCGAATGTTTATTATTTC(含 *Bam*H I 酶切位点),P-3' -AAGCTTAGGAACAAAGAAACATTAAAAAT(含 *Hind* III 酶切位点)。引物由上海 Sangon 公司合成。

### 1.3 模板的制备和 PCR

模板制备:1 μL E15 质粒加入 99 μL 双蒸水中,配成 100 μL 体系,取 1 μL 和 5 μL 作为 PCR 模板。按

收稿日期:2002-02-15.

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划资助项目(2001AA621030);中国水产科学研究院重点项目(99-01-02).

作者简介:江世贵(1964-),男,研究员,主要从事海洋生物学研究。Tel:020-84195176. E-mail:jiaugs@21cn.com

通讯作者:何建国.

下列顺序依次加入各反应物: buffer (10 ×) 5 μL, MgCl<sub>2</sub> 3 μL, dNTP 5 μL, primer 各 5 μL, 模板 DNA 1 μL (或 5 μL), 双蒸水 25 μL (或 21 μL), Taq DNA 多聚酶 (5 u/μL) 1 μL, 总体积 50 μL。反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min (35 个循环); 72 °C 1 min。

#### 1.4 重组质粒 pQE30-A 的构建

按参考文献[8]的方法,用 DEAE-纤维素膜电

泳回收 PCR 产物, 将之克隆到 pGEM-T Easy, 获得重组质粒 pGT-A。然后转化 TG1 感受态细胞, 扩增、提取重组质粒 pGT-A, 进行酶切鉴定。把 pGT-A 双酶切, 获得目的片段, 并用 DEAE-纤维素膜电泳回收。回收到的目的片段和 pQE30 连接, 获得重组质粒 pQE30-A, 然后转化 TG1 感受态细胞, 提取重组质粒进行酶切鉴定, 并对插入片段进行测序鉴定 (委托上海 Sangon 公司进行)。重组质粒 pQE30-A 的构建策略见图 1。

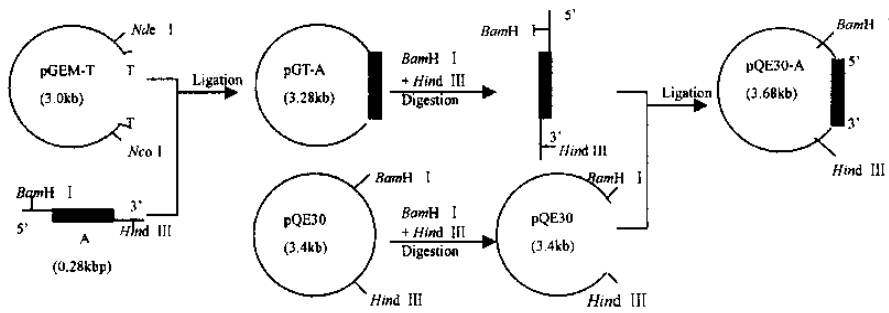


图 1 重组质粒 pQE30-A 的构建

Fig. 1 Construction of the recombinant plasmids pQE30-A

#### 1.5 重组质粒 pQE30-A 的转化及表达产物的检测

用 pQE30-A 转化 M15 感受态细胞。转化后用 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳, 方法参照文献[8]。按 QIAGEN 公司提供的检测试剂盒使用说明书及相关文献[9-12]进行 Western blot。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增

针对 A 基因序列及载体构建的需要, 用设计的引物对质粒 E15 进行 PCR, 扩增出与 A 基因预期大小 0.28 kb 相一致的亮带 (图 2)。

### 2.2 重组质粒的鉴定

重组质粒 pGT-A 经 EcoR I 酶切后显示有 2 条带, 大片段的大小与 pGEM-T Easy 载体大小一致, 小片段的大小与 A 基因扩增产物的一致; 重组质粒 pGT-A 经 BamHI + HindIII 双酶切后同样显示有 2 条带, 大片段的大小与 pGEM-T Easy 载体大小一致, 小片段的大小与 A 基因扩增产物的相吻合 (图 3)。

重组质粒 pQE30-A 经 BamHI + HindIII 双酶

切后显示有 2 条带, 大片段的大小与 pQE30 载体大小一致, 小片段的大小与 A 基因扩增产物的一致 (图 4) 重组质粒 pQE30-A 经过测序鉴定, 证实插入片段无误。

### 2.3 重组质粒 pQE30-A 在大肠杆菌 M15 中的融合表达

重组质粒 pQE30-A 转化大肠杆菌 M15 感受态细胞后, 转化菌经 IPTG 诱导, 菌体 SDS-PAGE 显示有与预期大小相一致的融合表达蛋白带的出现, 表达蛋白大小为 11 kDa。Western blot 表明所表达蛋白为含有 6 × His 的融合蛋白 (图 5)。从图 5 可以看到, 在一定时间内, 随着表达时间的延长, 目的基因的表达产物量明显增加。

## 3 讨论

6 × His tag 表达系统除了具有高效表达的特点外, 也有检测方便的优点, 并有利于后续的研究工作的开展, 因此, 作者使用了这一系统来表达从 WSSV 中克隆的基因。实验结果证明, WSSV 的 A 基因是一个可表达的基因。这一结果为进一步深入研究该基因打下了基础。

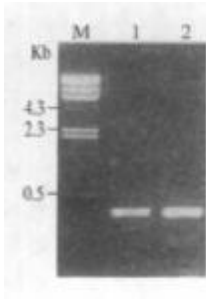


图2 A基因PCR扩增结果  
Fig.2 PCR amplification of A gene from plasmid E15  
M.  $\lambda$ DNA/ *Hind*III + *Eco*R I Marker II  
1. 1  $\mu$ L DNA template  
2. 5  $\mu$ L DNA template

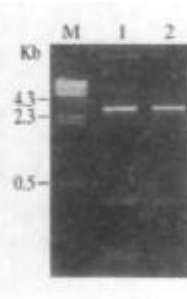


图3 重组质粒 pGT-A 的酶切结果  
Fig.3 Restriction analysis of recombinant plasmids pGT-A  
M.  $\lambda$ DNA/ *Hind*III + *Eco*R I Marker II  
1. pGT-A/ *Eco*R I  
2. pGT-A/ *Bam*H I + *Hind*III

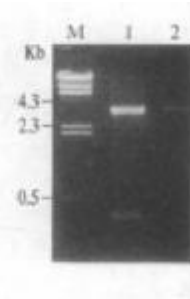


图4 重组质粒 pQE30-A 的酶切结果  
Fig.4 Restriction analysis of recombinant plasmids pQE30-A  
M.  $\lambda$ DNA/ *Hind*III + *Eco*R I Marker II  
1. pQE30-A/ *Bam*H I + *Hind*III  
2. pQE30/ *Eco*R I

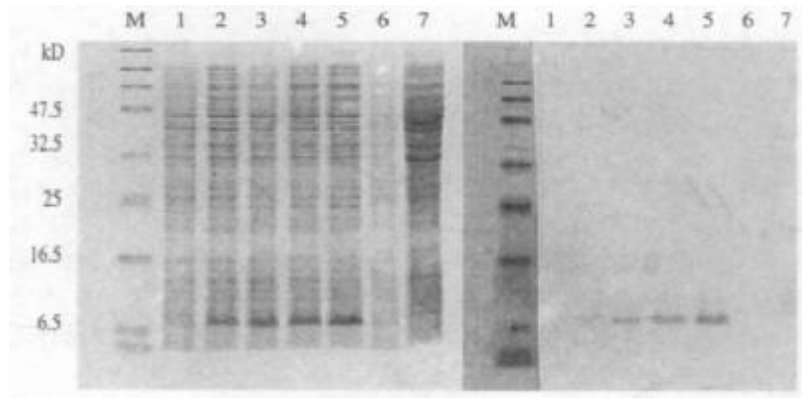


图5 A基因表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot

Fig. 5 SDS-PAGE and Western blot analysis of expression products of A gene in *E. coli* strain M15

M. Protein marker; 1. Noninduced control; 2-5. Time courses of expression in 1 h, 2 h, 3 h and 4 h;

6. Noninduced M15; 7. Induced M15.

实验中发现,在用重组 pQE30 质粒转化 M15 的过程中,其转化效率比起转化 TC1 细胞低很多,其原因可能和各自的遗传背景有关,因为 TC1 里面不含质粒,当用重组 pQE30 质粒转化 TC1 的感受态细胞时,只要质粒能进入细胞的都能在 Amp 抗性板上生长。与此相比, M15 细胞本身就具有了一个含有 Kan 抗性基因的质粒 pREP4,在用重组表达质粒转化时,在重组 pQE30 质粒进入 M15 感受态细胞的同时,会造成 M15 自身原有 pREP4 质粒的丢失,因此

在 Amp 和 Kan 双抗板上生长的是既成功转入重组表达质粒,同时自身原有质粒得以保存的重组菌,因此 M15 转化效率比起 TC1 要低一个数量级。

在进行本实验设计时,曾经考虑直接使用转录有重组 pQE30 质粒的 TC1 细胞进行目的蛋白的表达,而不进一步使用 M15,因为从原理上来说,TC1 细胞本身也只有乳糖操纵子的调控作用,只是没有 M15 严格,但作者在表达 WSSV 的另一个基因时发现,当克隆有该基因的重组质粒转化 TC1 之后,重组

菌生长到一定浓度后其菌液浓度开始下降,菌液变清,出现大量线状的分散聚合物,而非正常的雾状,估计这些线状聚合物为死亡菌体,推测出现这种情况的原因是因为该基因所表达的目的蛋白对 TG1 细胞的代谢具有阻断作用或毒性作用;然而相应地在重组 M15 细胞中,当加入诱导物 IPTG 后,菌液却不因为目的蛋白的大量产生而变清,说明该基因的产物蛋白对大肠杆菌 M15 细胞的代谢没有阻碍作用或毒性作用。考虑到目的产物对 TG1 影响,我们在表达 A 基因时选择了本文所用的设计路线。

#### 参考文献:

- [1] Lighter D V. A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp [M]. Louisiana: World Aquaculture Society, 1996.
- [2] Lo C F, Ho C H, Peng S E, et al. White spot syndrome baculovirus (WSSV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods[J]. Dis Aqu Org, 1996, 27: 215 - 225.
- [3] Lo C F, Ho C H, Chen C H, et al. Detection of tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSSV) in penaeid brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs[J]. Dis Aqu Org, 1997, 30: 53 - 72.
- [4] 何建国,周化民,江静波.白斑综合症杆状病毒致病性特征[J]. 热带海洋, 1999, 18(1): 59 - 67.
- [5] 江世贵,何建国,吕玲,等.白斑综合症病毒对斑节对虾亲虾的感染及垂直传播的初步研究[J]. 中山大学学报, 2000, 39(增刊): 164 - 171.
- [6] Van Hulten M C W, Witteveldt J, Peters S, et al. The white spot syndrome virus DNA genome sequence[J]. Virology, 2001, 286: 7 - 22.
- [7] 邓敏,何建国,吕玲,等.斑节对虾白斑综合症病毒部分基因组文库及核酸探针检测法[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 161 - 166.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] Elena Núñez, Xin Wei, Carmen Delgado, et al. Cloning, Expression, and Purification of Histidine - Tagged preS Domains of Hepatitis B Virus [J]. Prot Expr Purif, 2001, 21: 183 - 191.
- [10] Sawomir Dabrowski, Józef Kur. Cloning, Overexpression, and Purification of the Recombinant His - Tagged SSB Protein of *Escherichia coli* and Use in Polymerase Chain Reaction Amplification[J]. Prot Expr Purif, 1999, 16: 96 - 102.
- [11] Sawomir Dabrowski, Józef Kur. Cloning and Expression in *Escherichia coli* of the Recombinant His - Tagged DNA Polymerases from *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus woesei* [J]. Prot Expr Purif, 1998, 14: 131 - 138.
- [12] Sawomir Dabrowski, Gabriela Sobiewska, Jadwiga Maciuska, et al. Cloning, Expression, and Purification of the His - Tagged Thermostable - Galactosidase from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and Some Properties of the Isolated Enzyme [J]. Prot Expr Purif, 2000, 19: 107 - 112.

## Cloning of a gene from WSSV and expression in *Escherichia coli* M15

JIANG Shi-gui, HE Jian-guo, ZHANG Xin-qiang

DENG Min, YU Jian-xiu

(Life Science School, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** An ORF for coding protein was found in sequence analysis of WSSV DNA (named WSSV A gene). Its DNA sequence is the same to the ORF110 which was reported by Van Hulten et al (2001), and its function is unknown. A pair of primers was designed according to the known sequences of the ORF and the MCS of the pQE30 vector. The fragments of 0.28 kb (A gene) were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were cloned into the pGEM-T Easy vector to get the recombinant plasmid pGT - A and then the recombinant expression plasmid pQE30-A was obtained after pGT-A was digested and the target gene was cloned into the expression vector pQE30. The recombinant expression plasmids were transferred, respectively, into the *E. coli* strain M15. After the recombinant strain was induced by IPTG, the target expression products of A gene showed a fusion protein band by SDS-PAGE, corresponded to molecular mass positions of 11 kD. A further confirmation was obtained by Western blot. The result indicates the ORF is an expressible gene.

**Key words:** gene cloning and expression; WSSV; fusion protein; Western blot

**Corresponding author:** HE Jian - guo.