

· 基础论著 ·

JC 病毒 Agnoprotein 在大肠埃希菌中的表达及纯化

郑铁龙 成军 毛羽 李兴旺 洪源

【摘要】 目的 构建 JC 病毒 Agnoprotein 基因的原核表达载体,表达纯化该蛋白。**方法** PCR 扩增患者脑脊液中 JC 病毒晚期调节蛋白 Agnoprotein 基因,测序正确后克隆入 pET-32a(+)原核表达载体,诱导表达 Agnoprotein 蛋白并纯化。**结果** pET-32a(+)-Agnoprotein 表达出预期分子量大小的具有免疫活性的重组融合蛋白。**结论** 成功地表达纯化了 Agnoprotein 融合蛋白,为进一步研究其生物功能奠定了基础。

【关键词】 JC 病毒; Agnoprotein; 原核表达

Expression and purification of JCV Agnoprotein fusion protein ZHENG Tie-long, CHENG Jun, MAO Yu, LI Xing-wang, HONG Yuan. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Corresponding author: CHENG Jun, Email: cj@genetherapy.com.cn

【Abstract】 Objective To construct prokaryotic expression vector carrying JC virus Agnoprotein gene and to express and purify it. **Methods** We get the JCV Agnoprotein gene from a CFS sample by PCR. After sequencing, the gene was cloned into plasmid pET-32a(+). The expression of Agnoprotein was induced by IPTG. The expressed product was purified. **Results** The Agnoprotein fusion protein was highly expressed with expected molecular weight and immunocompetence. **Conclusions** The successful expression and purification of Agnoprotein fusion protein will be valuable for the study on the biological function of Agnoprotein.

【Key words】 JCV; Agnoprotein; Prokaryotic expression

JC 病毒是一种人群中广泛分布的机会性感染病原,当患者应用免疫抑制剂、HIV 感染时能引起一种严重的致死性的疾病,即进行性多灶性脑白质病(PML)。此外,许多研究证明 JC 病毒与许多肿瘤的发生发展有着重要关系。Agnoprotein 是 JC 病毒晚期表达的唯一的重要调节蛋白,不仅在病毒本身的复制、转录、翻译过程中起重要作用,而且在病毒与宿主细胞的相互作用过程中也十分重要。因此,表达纯化 Agnoprotein 抗原并制备其抗体对于进一步的研究有着重要的意义。

基金项目:北京市科委资助项目(D0906003040291)

作者单位:100011 北京市,北京地坛医院传染病研究所(成军、毛羽、李兴旺);军事医学科学院(郑铁龙)

通讯作者:成军 Email: cj@genetherapy.com.cn

材料和方法

一、标本与试剂

JC 病毒标本从北京地坛医院 1 例艾滋病患者的脑脊液中分离, -70℃ 冰箱保存。PCR 扩增引物由上海生物工程有限公司合成(上游引物: 5'-CGGGATC-CATGGTTCTTCGCCAG-3' 下游引物: 5'-CCGCTCGAGTGTAGCTTTTGTTTCAGG-3')。pET-32a(+) 原核表达载体、DH5 α 工程菌、BL21 工程菌为本室保存。凝胶回收试剂盒、DNA 连接试剂盒均购自博大生物公司, 工具酶 *Bam* H I、*Xho* I 购自大连宝生物公司, T4 连接酶购自 Promega 公司, 其它化学试剂均为国产分析纯。

二、方法

1. 重组表达载体的构建及鉴定: JC 病毒 Agnoprotein PCR 扩增产物纯化后与 pET-32a(+) 同时进行 *Bam* H I、*Xho* I 双酶切, 37℃ 水浴 24 h。1% 琼脂糖凝胶电泳, 玻璃奶法回收目的片段后, 将回收产物与 pET-32a(+) 线性载体于 T4 DNA 连接酶的作用下室温放置 4 h, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 然后涂布于含氨苄青霉素 100 mg/L 的 LB 培养皿中, 37℃ 培养过夜, 挑取单克隆菌落培养, 抽提质粒。用 PCR、*Bam* H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 并同时送北京奥科生物公司测序, 并与 JC 病毒 Mad 1 株 (NCBI 基因号: NC_001699) 序列进行比对。

2. 蛋白的诱导表达: 将鉴定正确的 pET-32a(+) -Agnoprotein 表达载体转化 *CaCl*₂ 法制备的 *E. coli* BL21 感受态细胞, 菌液在含 150 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养皿中进行 4 区划线, 37℃ 培养过夜, 活化后涂布于含氨苄青霉素 100 mg/L 的 LB 培养皿中, 于 37℃ 培养过夜, 挑取比较大的单克隆在 200 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养液中摇菌, 再将其在含 250 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养皿中进行 4 区划线, 挑取单克隆在含 300 mg/L 氨苄青霉素的液体 LB 中培养, 提取质粒酶切鉴定, 由此筛选出的重组子抗性比较高, 更适于原核表达。将阳性菌种分别接种于 LB 液体培养基内, 同样接种对照菌 pET-32a(+) 培养至 $A_{600} = 0.6$ 。分别加 IPTG 使其终浓度达到 0 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L, 25℃、30℃ 和 37℃ 诱导培养。将诱导菌液置于冰上 5 min, 然后 10 000 r/min 离心 30 s, 收集沉淀, 加入 100 μ l 浓度为 1 mmol/L 的 Tris-Cl (pH 6.8) 悬浮, 再加入 100 μ l 2 \times SDS 上样缓冲液、5 μ l β -巯基乙醇, 煮沸 3 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 将上清转移至另一新管。

3. 目的蛋白的检测: 将处理好的样品在 12% 的 SDS-PAGE 上电泳, 依次点样, 电压 8 V/cm, 当指示剂进入分离胶后, 电压升至 15 V/cm, 继续电泳至指示剂达分离胶底, 关闭电源。考马斯亮蓝进行染色, 脱色后可见菌体全蛋白电泳条带, 分别与未诱导的菌体全蛋白电泳带比较。

4. Western blot 检测目的蛋白: 将鼠 His probe 单克隆抗体与羊抗鼠 HRP-IgG 按 1:2500、1:2500 分别稀释作为第一、第二抗体。SDS-PAGE 后凝胶转膜, 5% 脱脂奶粉封闭过夜, 分别经第一、第二抗体孵育, 化学发光法显色。

5. 重组蛋白的大量制备纯化:用1 L的LB摇菌,当 A_{600} 值约为0.5时,IPTG 37℃诱导,诱导后4.5 h收获菌体。将离心所得菌体反复冻融4次,称重后每克菌体中加入10 ml超声缓冲液。混匀置冰上,用超声法破碎菌体,超声条件如下:功率200 W,超声10 s、停10 s为一个循环,每25个循环后暂停5 min,共50个循环。完成后取1 ml,4℃分离上清、沉淀,分别按常规方法制样后取15 μ l进行SDS-PAGE分析。离心收集超声裂解产物的沉淀部分。洗涤3遍后,收集沉淀溶解于缓冲液中(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、5 mmol/L EDTA),0.22 μ m的滤膜过滤后,测定蛋白浓度,加入50%的甘油,-80℃低温保存。

结 果

一、PCR

10 × Buffer(100 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、100 mmol/L KCl、1% Triton X-100、20 mmol/L MgCl_2 pH 8.8) 2 μ l,模板2 μ l,2.5 mmol/L dNTP 1.6 μ l,10 mmol/L引物0.6 μ l,Taq酶1 U,用水补至总体积为20 μ l。反应条件为:94℃ 4 min预变性后,94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 30 s 35个循环,72℃ 7 min充分延伸后4℃终止。2%琼脂糖凝胶电泳,检测到与预期片段大小相符的核酸电泳图片(图1、2)。在紫外灯下切取该片段,以玻璃奶核酸回收试剂盒回收目的片段。

二、双酶切及序列鉴定

重组质粒构建成功后(重组质粒模式图见图2),*Bam* H I、*Xho* I双酶切重组质粒(图3),并送测序,与Mad1型JC病毒序列比对,二者序列完全一致。

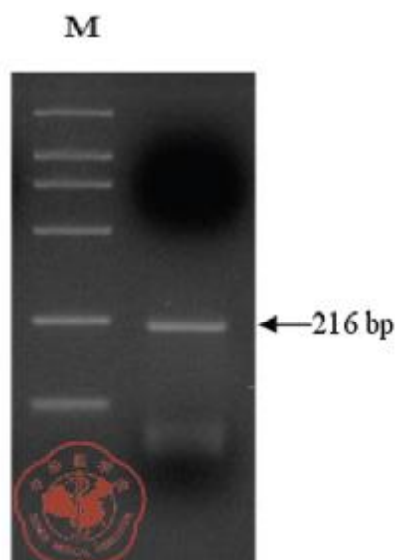


图1 Agnoprotein 基因片段 PCR 扩增

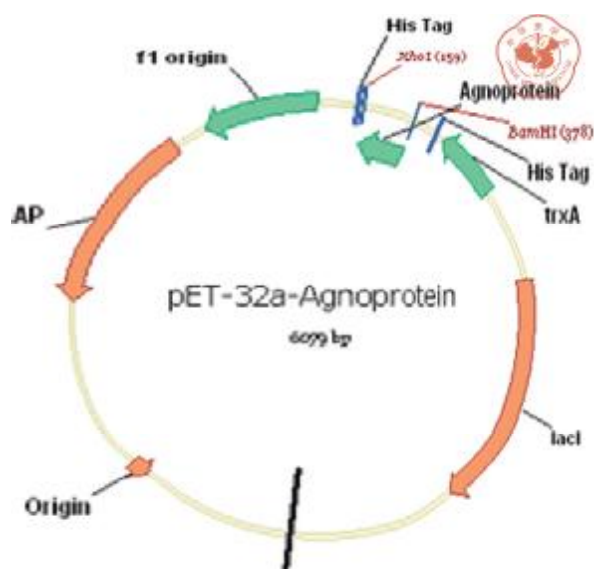


图2 pET32a(+)-Agnoprotein 原核表达载体构建模式图

三、Agnoprotein 融合蛋白的诱导表达

将鉴定正确的表达载体转化 BL21 大肠埃希菌,活化后转摇于含氨苄青霉素 0.4 g/L 的 LB 培养基中, A_{600} 值约 0.6 时加入 IPTG 1 mmol/L 诱导,分别于 3.5 h、5 h、9 h、11 h、20 h 取样,SDS-PAGE 分析菌体总蛋白,可见目的蛋白的大量表达(图 4)。并用 Western blot 鉴定表明融合蛋白表达成功(图 5)。该融合蛋白分子量大约 29 kD 左右,表达量大,在 3.5 ~ 20 h 均有理想表达。

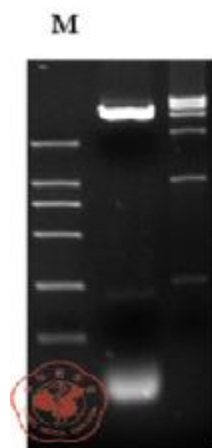


图 3 pET32a(+) -Agnoprotein 表达载体 *Bam* H I/*Xho* I 酶切鉴定

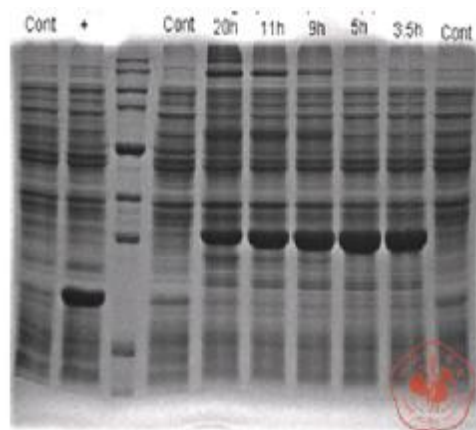


图 4 pET32a(+) -Agnoprotein 蛋白表达时间分布

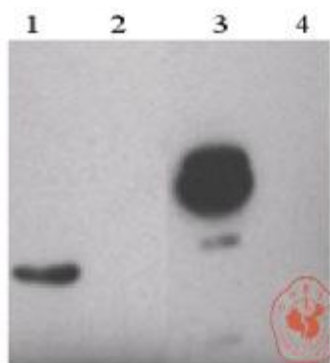


图 5 Western blot 结果

1. pET32a(+)空载体诱导;2. pET32a(+)空载体对照;3. Agnoprotein 融合蛋白;4. Agnoprotein 融合蛋白未诱导对照

四、Agnoprotein 抗原融合蛋白纯化

将大量诱导表达 3 h 的菌液于 9000 r/min、4℃ 离心收集菌体,反复冻融 3 次,超声破碎菌体,12 000 r/min 离心 30 min,SDS-PAGE 分析可知其为包涵体形式存在。经超声、洗涤、过滤后的融合蛋白 SDS-PAGE 电泳分析其纯度 >90%,满足应用要求。

讨 论

Agnoprotein 是 JC 病毒晚期表达的一个重要的调节蛋白,它并不包装进入病毒颗粒,但是它对于病毒的复制、表达、包装成熟起着重要的作用。通过定点突变发现 Agnoprotein 突变株比野生株的复制能力要低得多^[1]。JC 病毒的 Agnoprotein 蛋白能与大 T 抗原结合而下调病毒基因的表达及病毒颗粒的复制^[2],甚至它能与细胞内参与 JCV 基因表达的相关因子 YB-1 相互作用而下调 JCV 的蛋白表达^[3]。

JC 病毒 Agnoprotein 蛋白在宿主细胞内主要定位于核周质^[4],也有少量进入核内,对于宿主细胞的影响很大。组成性表达 Agnoprotein 蛋白的小鼠成纤维细胞 NIH3T3 中,发现细胞周期紊乱,细胞多停留于 G2/M 阶段^[5],其主要机制是上调细胞周期调节蛋白 p21 的表达而发挥生物学功能。Agnoprotein 对于细胞 DNA 的修复也起着干扰作用。在顺铂的毒性效应下,表达 Agnoprotein 的细胞更加容易被损伤,而表现出更严重的染色体断裂、异染色质的形成^[6]。除此之外,也有报道证明 Agnoprotein 能与 HIV-1 的调节蛋白 tat 相互结合而出现一系列有趣的生物现象。当 JCV 与 HIV-1 共感染时,HIV-1 的滴度会轻微的下降^[7],但是 JC 病毒的拷贝数会上升,也许这是 JC 病毒在 HIV-1 阳性患者中有着高感染率和致病性的原因之一。Agnoprotein 在神经胶质细胞中表达能抑制其分化和促进它们的凋亡,可能在进行性多灶性脑白质病的发病过程中起着重要作用。

因此,Agnoprotein 蛋白作为 JC 病毒表达的一个小调节蛋白,在病毒本身、病毒与细胞的相互作用中有着多种生物学功能。要彻底充分了解它的功能,对蛋白本身的分析就很重要。因此,我们表达纯化该抗原,并制备了其多克隆抗体,为下一步的生物学功能探讨奠定了坚实基础。

参 考 文 献

- 1 Ng SC, Mertz JE, Sanden-Will S, et al. Simian virus 40 maturation in cells harboring mutants deleted in the agnogene. J Biol Chem, 1985, 260: 1127-1132.
- 2 Safak M, Barrucco R, Darbinyan A, et al. Interaction of JC virus agno protein with T antigen modulates transcription and replication of the viral genome in glial cells. J Virol, 2001, 75: 1476-1486.
- 3 Safak M, Khalili K. Physical and functional interaction between viral and cellular proteins modulate JCV gene transcription. J Neurovirol, 2001, 7: 288-292.
- 4 Nomura S, Khoury G, Jay G. Subcellular localization of the simian virus 40 agnoprotein. J Virol, 1983, 45: 428-433.
- 5 Darbinyan A, Darbinian N, Safak M, et al. Evidence for dysregulation of cell cycle by human polyomavirus, JCV, late auxiliary protein. Oncogene, 2002, 21: 5574-5581.
- 6 Darbinyan A, Siddiqui KM, Slonina D, et al. Role of JC virus agnoprotein in DNA repair. J Virol, 2004, 78: 8593-8600.
- 7 Kaniowska D, Kaminski R, Amini S, et al. Cross-interaction between JC virus agnoprotein and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Tat modulates transcription of the HIV-1 long terminal repeat in glial cells. J Virol, 2006, 80: 9288-9299.

(收稿日期: 2007-11-27)

(本文编辑: 王丹静)

郑铁龙, 成军, 毛羽, 等. JC 病毒 Agnoprotein 在大肠埃希菌中的表达及纯化[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2008, 2(1): 19-23.