

新基因 *Splt137* 在大肠杆菌中的表达及抗体制备^{*}

尹 崇, 李朝飞, 王立华, 张 萍, 庞 义

(中山大学生物防治国家重点实验室//昆虫学研究所, 广东 广州 510275)

摘 要: 用 PCR 的方法扩增得到斜纹夜蛾核多角体病毒 (*SpltMNPV*) ORF137 全长基因 (*Splt137*)。将其克隆到原核表达载体 pQE30 上, 并转化大肠杆菌 M15, 在 IPTG 诱导下表达了与预期相对分子质量相符的一个 2.7×10^7 的蛋白质, 经过聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化, 免疫家兔制备了抗 *Splt137* 抗体。Western 免疫印迹分析表明, 该抗体适合用作 *Splt137* 蛋白的进一步分析。

关键词: 斜纹夜蛾核多角体病毒; *Splt137*; 原核表达; 抗体

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 04-0075-03

杆状病毒是主要感染昆虫的一类双链环状 DNA 病毒, 在应用上主要作为无公害生物杀虫剂和外源基因的高效表达载体^[1]。斜纹夜蛾核型多角体病毒 (*Spodoptera litura* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus, *SpltMNPV*) 是杆状病毒科核型多角体病毒属的成员, 与其它杆状病毒相比, *SpltMNPV* 对重要的农业害虫斜纹夜蛾具有特异高效的防治效果, 已被本实验室开发成为商品化的杀虫制剂 (注册商品名: “虫瘟一号”), 进一步研究其致病机理, 对通过基因工程途径改造病毒, 提高杀虫效力有重要意义^[2]。

SpltMNPV 基因组全序列测定已经完成并已发表^[3], 通过与其他已经测序的杆状病毒相比, 发现了 29 个 *SpltMNPV* 特有的基因, *Splt137* 是其中之一^[3]。对 *SpltMNPV* 特有基因功能的研究, 将了解该病毒侵染的分子机理, 构建高效广谱的工程病毒提供重要的理论依据。本文为了深入研究 *Splt137* 基因的结构与功能关系, 在大肠杆菌中表达了 *Splt137* 蛋白, 电泳纯化后免疫家兔, 制备了多克隆抗体, 为进一步研究 *Splt137* 蛋白的功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

(1) 昆虫: 斜纹夜蛾幼虫由本实验室养虫室提供, 为人工饲料饲养的健康幼虫, 饲养温度为 $27 \sim 28^{\circ}\text{C}$;

(2) 病毒: *SpltMNPV* G2 株, 大肠杆菌 TG1,

由本实验室保存。pQE30 质粒和质粒提取试剂盒均购自 Qiagen 公司。免疫用新西兰大白兔购自第一军医大学试验兔场;

(3) 主要试剂: 佛氏完全佐剂和佛氏不完全佐剂购自 Gibco BRL 公司; pGEM T Easy 载体, T_4 DNA 连接酶和限制性内切酶购自 Promega 公司; IPTG、X gal 为 Sigma 公司产品; *Taq* 酶购自上海生物工程公司。

1.2 *SpltMNPV* 基因组 DNA 的提取

参照文献 [4] 将多角体悬液 ($10^8 \sim 10^9$ PIB/mL), 加入等体积的碱裂解液 ($0.1 \text{ mol/L Na}_2\text{CO}_3$ 和 0.15 mol/L NaCl , pH 10.5), 37°C , 裂解 15 min, $12\,000 \text{ r/min}$ 离心 5 min, 除去不溶物质。取上清用酚、酚/氯仿 (体积比为 1:1) 和酚/氯仿/异戊醇 (体积比为 25:24:1) 依次轻柔抽提, 上清用 2.5 倍 $\varphi=95\%$ 乙醇沉淀 DNA, $\varphi=70\%$ 乙醇淋洗 DNA 沉淀, 晾干后, 溶于 TE [10 mmol/L Tris (pH 8.0), 1.0 mmol/L EDTA] 中, 4°C 储存备用。

1.3 引物设计及 PCR

根据 *SpltMNPV* G2 株基因组全序列^[3] (GenBank accession No. AF325155), 运用 DNASTAR 软件, 设计一对扩增 *Splt137* 基因全长阅读框的引物。上游引物 SP1:

5'-**GGATCCTCTTTGCCTATAATTTACACGGG**-3',

引入 *Bam*HI 酶切位点 (黑体字所示部分); 下游引物 SP2:

5'-**AAGCTTTTTTATTAAATCGAATATGTG**-3',

引入 *Hind*III 酶切位点 (黑体字所示部分)。PCR 反

* 收稿日期: 2002-04-17

基金项目: 国家“973”专题资助项目 (G20000162209)

作者简介: 尹崇 (1968-), 男, 博士研究生; 通讯联系人, 庞义; E-mail: ls12@zsu.edu.cn

应体系为 50 μ L, 模板为 *Spl*MNPV 基因组 DNA, 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C, 5 min, 1 次; 95 $^{\circ}$ C, 1 min, 50 $^{\circ}$ C, 1 min, 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 后移至 4 $^{\circ}$ C 存放。

1.4 *Spl*137 基因原核表达载体的构建

原核表达载体的构建策略如图 1 所示。质粒提取、DNA 片段回收、连接、转化均按文献 [5] 进

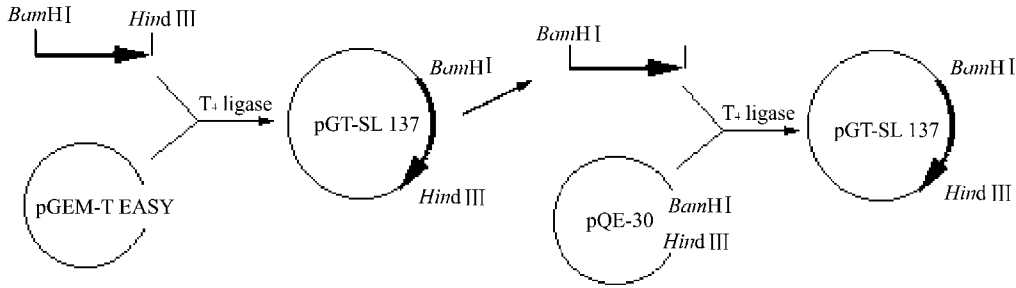


图 1 原核表达载体 pQE SL137 的构建
Fig 1 Construction of recombinant plasmid pQE-SL137

1.6 制备抗体

参照文献 [5] 的方法, 表达产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 直接从凝胶上切下与预期相对分子质量相符的诱导表达蛋白带, 反复通过 7 号注射针头, 佛氏佐剂乳化后免疫家兔, 制备抗体。

1.7 抗体检测

参考文献 [5], 用未经转化的大肠杆菌 M15 菌体蛋白吸附的方法, 除去抗血清中的菌体交叉反应抗体。吸附后的抗体, 用 Western 免疫印迹检其特异性。Western 免疫印迹按试剂盒 (Roche Molecular Biochemicals) 说明操作。抗体以 1 : 1 000 用 1 $\times$ 封闭液稀释。

2 结 果

2.1 重组质粒的构建

用 PCR 方法从 *Spl*MNPV 基因组中扩增 *Spl*137 基因, 扩增片段为 708 bp。将 *Spl*137 基因克隆到 pQE30 表达载体上, 转化大肠杆菌 M15, 挑选阳性克隆, 纯化质粒, 用 *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切鉴定, 结果与预期大小一致 (图 2)。用 pQE30 测序引物进行测序鉴定, 结果表明, 插入片段与已经发表的全序列中该片段完全一致, 而且正确插入到了表达载体的克隆位点。

2.2 *Spl*137 在大肠杆菌中的表达

含 *Spl*137 的重组质粒 pQE SL137 转化大肠杆菌 M15 后, 经 IPTG 诱导可表达与预计相对分子质量相符, 为 2.7×10^7 的蛋白质 (图 3)。从诱导后 30 min 即可见诱导蛋白的产生, 诱导后 4 h, 表达

行。重组质粒 pQE SL137 经过酶切鉴定后, 进一步用 pQE30 测序引物, 经 ABI PRISM 377 (ersion3.3) 自动分析仪进行测序, 鉴定插入片段的正确性。

1.5 *Spl*137 在大肠杆菌中的表达

鉴定后的重组质粒 pQE SL137 转化大肠杆菌 M15, 用 1 mmol/L IPTG 诱导表达, 表达产物用 $w=10\%$ 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

量达到最大, 并保持稳定 (图 3a)。表达异源蛋白的同时, 菌体的生长受到一定的抑制, 当 A_{600} 为 0.5 时加入诱导物 IPTG, 培养 5 h 后, A_{600} 为 1.0, 而未加 IPTG 的对照组 A_{600} 达到 2。

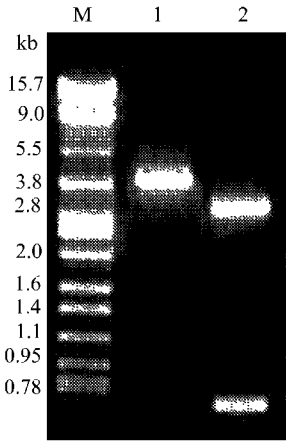


图 2 重组质粒 pQE-SL137 的酶切鉴定

Fig 2 Identification of recombinant pQE-SL137
M λ DNA 经 *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI 三酶切作为相对分子质量参照;
1 pQE-SL137 经 *Eco*RI 酶切;
2 pQE-SL137 经 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切

2.3 *Spl*137 抗体的制备与检测

直接从聚丙烯酰胺凝胶上将诱导表达的蛋白质切割, 佛氏佐剂乳化后免疫家兔, 制备抗血清, 用未转化的大肠杆菌 M15 裂解液吸附除去交叉反应抗体。而后经 Western 免疫印迹对抗体进行检测, 诱导后的 M15 样品, 呈现明显且特异的免疫阳性

反应带，而未诱导的 M15 对照组则呈阴性反应 (图 3b)，说明所制备的抗体适合用作以后有关 *Splt137* 功能的研究。

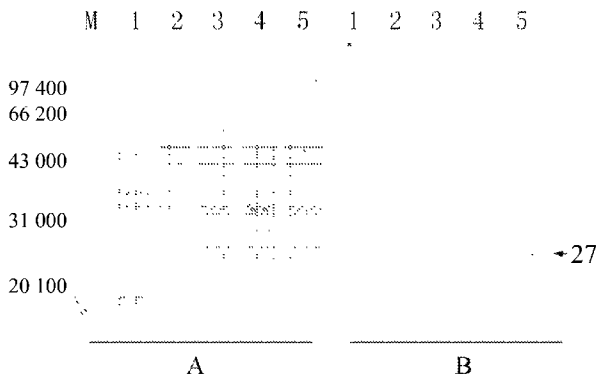


图 3 *Splt137* 在大肠杆菌 M15 中表达的 SDS-PAGE (a) 和 Western blot (b) 分析

Fig. 3 SDS-PAGE and Western blot analysis of *Splt137* expressed in *E. coli* M15

经重组质粒 pQE-SL137 转化的大肠杆菌 M15
1 为未诱导的对照菌株；2—5 分别为用 1 mmol/L IPTG 诱导后培养 1、2、3 和 4 h 的菌株

3 讨 论

Splt137 是 *SpltMNPV* 的特有基因之一，*SpltMNPV* 的 29 个特有基因单个或成双地分散在 139 kb 的整个基因组当中，唯有 ORF137 (*Splt137*) 所在的区段，同时有 5 个特有基因连在一起，是拥有特有基因最多的区段 [3]，这一现象提示该区段可能代表了 *SpltMNPV* 更多的特性。因为在已经公开的基因当中没有它的同源基因，所以有关 *Splt137* 的分子生物学特性和功能的研究无可因循的线索，需从基本工作开始探索。

本文将 *Splt137* 基因克隆到 pQE30 载体进行表达。插入了 *Splt137* 基因的重组质粒 pQE SL137 能够在 大肠杆菌 M15 中大量表达，虽然一定程度上影响了细菌的生长，但表达产物 *Splt137* 能够在 大肠杆菌中稳定存在 (图 2)，因而通过大量培养细菌可以获得足够的蛋白作为抗原。本研究制备多克隆抗体所用家兔不是无菌动物，家兔体内本身含有 大肠杆菌的交叉反应抗体，如果所制备抗体用于真核细胞中抗原的检测，这些交叉反应抗体不会造成的影响，而用于大肠杆菌中目的抗原的检测，这些交叉抗体需经过预吸附除去以排除干扰。本文制备的抗体经预吸附处理后，能够特异性识别诱导表达的蛋白，而不与未诱导大肠杆菌有明显的交叉反应 (图 3b)，表明所制备抗体可以用作 *Splt137* 功能的进一步研究。

参考文献:

[1] MILLER L K. Introduction to the baculovirus //MILLER L K. The baculovirus[M] . New York: Plenum Press, 1997: 1—6.
[2] 庞义, 胡志红, 杨凯. 重组昆虫杆状病毒 //黄大 . 农业微生物基因工程 [M] . 北京: 科学出版社, 2001: 271—315.
[3] PANG Y, YU J, WANG L, et al. Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome [J] . Virology, 2001, 287: 391—404.
[4] O'REILLY D R, MILLER L K, LUCKOW V A. Baculovirus expression vectors A laboratory manual[M] . New York: W H Freeman and Company, 1992: 139—179.
[5] SAMBROOK J, FRISTCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual[M] . 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Expression of a New Gene *Splt137* in *E. coli* and Preparation of Antiserum

YIN Chong, LI Zhao fei, WANG Li hua, ZHANG Ping, PANG Yi

(State Key Laboratory for Biocontrol, Sun Yat sen(Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: One of *Spodoptera litura* multinucleocapsid nuclear polyhdrosis virus (*SpltMNPV*) unique ORFs ORF137 (*Splt137*) was obtained by PCR method from genome DNA. The PCR products were cloned into the pGEM T easy vector to get the recombinant plasmid (pGT-SL137). The *Splt137* was recombined *in vitro* with expression vector pQE30 and transformed into *E. coli* M15. The M15 strain, containing *Splt137* recombinant plasmid, expressed a 27 000 protein in agreement with the prospected molecule after the induction with IPTG. The expressed protein was used to raise antiserum. Western blot analysis indicated that the antiserum could react with the corresponding protein, and was suitable to be used for further analysis of *Splt137* protein.

Key words: *SpltMNPV*; *Splt137*; procaryotic expression; antibody