

# p7TP2融合蛋白在大肠埃希菌中的表达及其多克隆抗体的制备和应用

袁菊<sup>1,2</sup>, 成军<sup>1</sup>, 洪源<sup>1</sup>, 陶明亮<sup>1</sup>, 靳亚平<sup>2</sup> (1. 首都医科大学北京地坛医院 传染病研究所, 北京 100015; 2. 西北农林科技大学动物科技学院, 咸阳市 712100)

**摘要:** 目的 应用基因芯片技术筛选获得p7蛋白反式调节的新基因, 即丙型肝炎病毒(HCV) p7蛋白反式激活基因p7TP2, 研究其生物学功能。方法 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增其全长cDNA序列, 并构建原核表达载体pET-32a(+)-p7TP2, 转入大肠埃希菌Rosetta-gami B中, 通过异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)诱导表达重组融合蛋白, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析在相对分子量约35 kD处有一条特异的蛋白质条带, 以包涵体形式表达, 并通过蛋白质变性、重折叠及纯化后得到了高纯度融合蛋白, 将重组蛋白免疫新西兰大耳白兔, 制备抗-p7TP2多克隆抗体。结果 经酶联免疫吸附法(ELISA)测定、蛋白印迹(Western blot)和免疫组织化学鉴定, 制备的多克隆抗体具有较高效价和特异性。结论 p7TP2蛋白的表达及多克隆抗体的制备为进一步研究HCV p7TP2蛋白的功能及丙型肝炎的发病机理创造了条件。

**关键词:** p7TP2; 原核表达; 多克隆抗体; 新基因

## Prokaryotic expression of fusion protein and preparation of polyclonal antibody of p7TP2

YUAN Ju<sup>1,2</sup>, CHENG Jun<sup>1</sup>, HONG Yuan<sup>1</sup>, TAO Ming-liang<sup>1</sup>, JIN Ya-ping<sup>2</sup> (1. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 2. College of Animal Science Northwest A&F University, Xianyang 712100, China)

**Abstract: Objective:** To screen the new gene p7TP2 transregulated by HCV p7 protein through gene chip technique and investigate its biological functions. **Methods** The p7TP2 cDNA was amplified by PCR and prokaryotic expression vector pET-32a(+)-p7TP2 was constructed by gene recombination techniques, which were transformed into *E. coli* Rosetta-gami B, for IPTG induced expression. The p7TP2 fusion protein was expressed in the form of inclusion body. A band with 35 kD appeared on SDS-PAGE gel. The protein expressed by carboxyl terminal coding sequence had a high purity after denaturation, refolding and purification. New Zealand rabbits were immunized with p7TP2 fusion protein to prepare polyclonal antibody against p7TP2. The p7TP2 antiserum was obtained and characterized by ELISA, Western blot, immunohistochemistry. **Results** Results showed that the polyclonal antibody had high titer, affinity and specificity. **Conclusions** The study provide a favorable tool for further functional study of HCV p7TP2 and the pathogenesis of hepatitis C.

**Key words:** p7TP2; Fusion protein; Polyclonal antibody

丙型病毒性肝炎是由丙型肝炎病毒(HCV)感染引起的传染病。HCV p7是由HCV基因组2580~2768核苷酸编码, 63个氨基酸残基组成的小的疏水性蛋白, 其编码基因位于结构蛋白和非结构蛋白之间, 可在黑脂膜中形成六聚体阳离子通道, 推测其功能与病毒离子孔道蛋白

(viroporin)类似, 可使细胞内膜结构不稳定化, 以利于成熟的病毒颗粒释放, 这一离子通道可被金刚烷胺和长烷基链的亚氨基糖衍生物抑制<sup>[1-3]</sup>。亚细胞结构分离显示p7为定位在线粒体或内质网衍生的微粒体的膜结构, 由此可以推测p7在HCV生命周期中存在于细胞内或者作为病毒粒子组件起着多重作用<sup>[4]</sup>。

应用基因表达谱芯片技术研究p7蛋白对于宿主

基金项目: 国家自然科学基金攻关项目(C03011402, C30070689)

通讯作者: 成军 Email: jun.cheng.ditan@gmail.com

细胞基因的反式调节作用,发现并鉴定了p7蛋白反式调节的未知功能靶基因,命名为p7TP2,该序列被美国核苷酸序列数据库GenBank收录,收录号码为AY819648,开放读码框长495 bp,编码164个氨基酸残基。

随着人类基因组计划的实施和后基因组时代的来临,越来越多的新基因已经、正在或即将被诠释,p7TP2基因就是其中之一。其生物学功能国内外鲜有报道,为探讨其生物学功能及作用,构建其原核表达载体,进行融合蛋白的表达及多克隆抗体的制备,为进一步验证新基因的功能及探讨其与HCV发病机制提供了前提条件<sup>[5,6]</sup>。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂 肝母细胞瘤细胞系HepG2及大肠埃希菌DH5 $\alpha$ 和原核表达质粒pET-32a(+)为本研究所保存;Rosetta-gami B(DE3)菌株购自Novagen公司;胎牛血清(FBS)购自Hyclone公司;总RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、Taq酶、T4 DNA连接酶、pGEM-T载体购自Promega公司;玻璃奶回收试剂盒购自博大泰克公司;Bam H I、Hind III 购自TaKaRa生物公司;抗-His的单克隆抗体购自Santa Cruz公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG购自北京中山生物公司;二氨基联苯胺(DAB)购自中杉金桥公司;P膜购自MILLIPORE公司,BCA蛋白定量试剂盒购自Sigma公司,ECL显色试剂盒为Amersham产品。

### 1.2 方法

1.2.1 大肠埃希菌稀有密码子分析 应用*E. coli* codon usage analyzer对大肠埃希菌中的稀有密码子进行分析(<http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/codonusage/usage.htm>)。

1.2.2 p7TP2基因的RT-PCR扩增 根据新基因p7TP2的完整开放阅读框和原核表达空载体pET-32a(+)序列设计引物,由上海生工生物有限公司合成。上游引物:5'-CCGGGATCCATGGTGGAGGTGCCAGG-3'(Bam H I位点);下游引物:5'-CCGAAGCTTCTACATGACGACCAGGCC-3'(Hind III位点)。

复苏冻存的HepG2细胞,用含10% FBS的培养液对90 mm培养皿细胞传代,当传至3代时,利用总RNA提取试剂盒获得其总RNA,然后按照Promega公司的反转录试剂盒说明书进行操作,合成cDNA模板,并以此为模板进行PCR反应<sup>[7]</sup>。

1.2.3 pET-32a(+)-p7TP2重组表达载体的构建 根据玻璃奶回收试剂盒说明书回收p7TP2基因的PCR产物,将其与pET-32a(+)空质粒分别用Bam H I和Hind III酶切,玻璃奶回收酶切片段,在T4 DNA连接酶作用下于16℃连接过夜转化到CaCl<sub>2</sub>法制备的感受态细胞DH5 $\alpha$ 中,挑取单菌落于含抗生素的LB液体中摇菌12~16小时(220 r/min, 37℃),应用碱裂解法提取质粒DNA,用Bam H I和Hind III酶切克隆载体pET-32a(+)-p7TP2,再次酶切进行鉴定分析。最后,将酶切鉴定正确的重组表达质粒pET-32a(+)-p7TP2转化大肠埃希菌Rosetta-gami B菌(四环素、卡那霉素、氯霉素抗性),利用菌落PCR和酶切鉴定碱裂解法提取的质粒。

1.2.4 重组蛋白的原核表达及鉴定 将鉴定为阳性的重组质粒转化大肠埃希菌Rosetta-gami B菌,挑单个菌落接种于含有抗生素的LB培养基中,220 r/min, 37℃培养过夜。次日,按1%~5%接种量接种,220 r/min 37℃培养菌至 $A_{600}=0.4\sim0.6$ ,加入终浓度为1.0 mmol/L IPTG,继续37℃培养4小时收集1.0 ml菌液,10 000 r/min离心5分钟;弃上清,加入100 ml Tris-HCl (pH=6.8)悬浮沉淀,加100 ml 2 $\times$ SDS凝胶加样缓冲液及5 ml  $\beta$ -巯基乙醇,煮沸10分钟,10 000 r/min离心5分钟,取15 ml上清进行SDS-PAGE分析。

抗-His单克隆抗体与羊抗鼠HRP-IgG按1:200、1:5000稀释分别作为第一、第二抗体。SDS-PAGE后凝胶转膜60 V 6小时,5%脱脂奶粉封闭过夜,分别经第一、第二抗体孵育1~2小时,再加入显色液DAB,室温下轻摇反应<20分钟,显色。

1.2.5 重组蛋白的大量表达、纯化及多克隆抗体的制备 利用发酵罐以同样的条件诱导表达2 L菌液,收集菌体-80℃反复冻融数次,超声波破碎细胞后离心,取上清及沉淀进行电泳。沉淀中的融合

蛋白经变性复性和His亲和柱纯化后，进行SDS-PAGE鉴定。利用BCA蛋白定量试剂盒对融合纯化蛋白进行定量。取雄性新西兰大耳白兔2只（每只体重2 kg），按常规方法进行免疫，第1次免疫蛋白量400 ng/只，并在免疫前采兔耳缘静脉血4 ml，然后间隔2周免疫1次（免疫量为200 ng/只），共免疫4次。

1.2.6 多克隆抗体的鉴定

(1) 酶联免疫吸附测定法（ELISA）：从第一次免疫开始，每次免疫后2周采兔耳缘静脉血，分离血清作为一抗。纯化的蛋白以0.5 μg/孔的浓度包被ELISA板，将免疫前血清及第3次免疫后血清分别稀释6个梯度（1：500，1：2000，1：8000，1：32 000，1：128 000，1：512 000）作为一抗，羊抗兔HRP-IgG（1：2500）作为二抗测定抗体效价。4次免疫后1周从兔颈动脉放血，分离血清后-20℃冻存。

(2) 蛋白印迹法（Western blot）：将纯化的蛋白制样电泳应用SDS-PAGE胶，转膜60 V 6小时，将3次免疫后血清以1：512 000的稀释度作为一抗，羊抗兔HRP-IgG（1：5000）作为二抗，ECL发光检测。

(3) 重组融合蛋白的真核表达：用脂质体2000将pcDNA3.1（-）myc-his-p7TP2转入肝母细胞瘤细胞HepG2，24小时后裂解细胞，裂解液上清电泳应用SDS-PAGE胶，转膜45 V，1.5小时，5%脱脂奶粉封闭2小时，将3次免疫后血清以1：8000的稀释度作为一抗，羊抗兔HRP-IgG（1：5000）作为二抗，ECL发光检测。

(4) 免疫组织化学染色：利用正常肝组织、慢性乙型肝炎肝组织、慢性丙型肝炎肝组织、肾脏组织石蜡切片进行免疫组织化学染色，将切片常规脱蜡和抗原修复后用免疫结束后的血清（1：4000）作为一抗，室温下DAB显色。对照实验：一抗用PBS和免疫前血清替代，其他同上。

2 结果

2.1 大肠埃希菌稀有密码子分析 密码子使用率低于10%时为大肠埃希菌稀有密码子。p7TP2共编码164个氨基酸，其中稀有密码子为43个，高达

26%，且稀有密码子续出现，见图1。故采用在诱导过程中能补充稀有密码子的Rosetta-gami B大肠埃希菌。

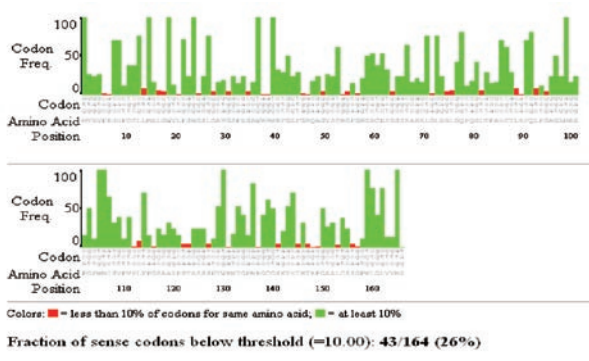


图 1 p7TP2基因对于大肠埃希菌稀有密码子分析

2.2 p7TP2基因的RT-PCR扩增与pET-32a（+）-p7TP2载体的构建 RT-PCR技术扩增获得的495 bp左右的产物与理论片段大小符合，见图2；构建的重组表达载体pET-32a（+）-p7TP2经Bam H I和Hind III双酶切后，显示正确的酶切图谱，见图3，重组载体pET-32a（+）-p7TP2图谱，见图4。

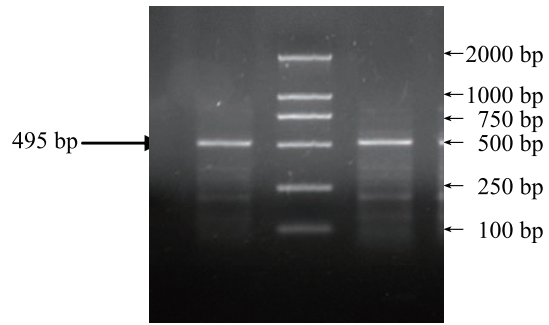


图 2 p7TP2基因的RT-PCR电泳图

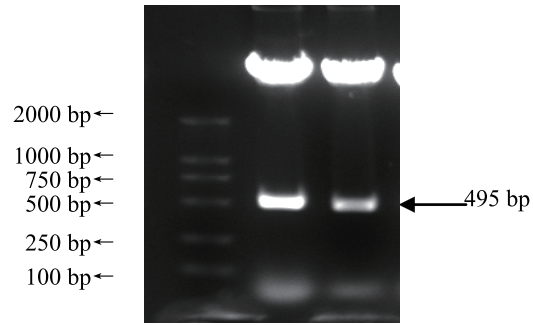


图 3 pET-32a（+）-p7TP2的Bam H I和Hind III酶切





## 2.5 多克隆抗体的制备和鉴定

2.5.1 直接ELISA法检测血清的效价 以纯化的蛋白包被ELISA板，将免疫前血清及第3次免疫后血清作为一抗，羊抗兔HRP-IgG（1：2500）作为二抗测定抗体效价，结果显示血清抗-p7TP2滴度为1：512 000。

2.5.2 蛋白质印迹检测 将纯化的蛋白作为抗原，将3次免疫后血清以1：512 000的稀释度作为一抗，羊抗兔HRP-IgG作为二抗，ECL发光检测到纯化的蛋白位于约33 kD处，未检测到其他蛋白质，见图9左。

2.5.3 p7TP2蛋白的真核表达 将转染pcDNA3.1（一）myc-his-p7TP2的HepG2细胞裂解液上清经SDS-PAGE胶电泳，将3次免疫后血清以1：8000的稀释度作为一抗，羊抗兔HRP-IgG作为二抗，ECL发光检测到真核蛋白位于约14 kD处，见图9右。

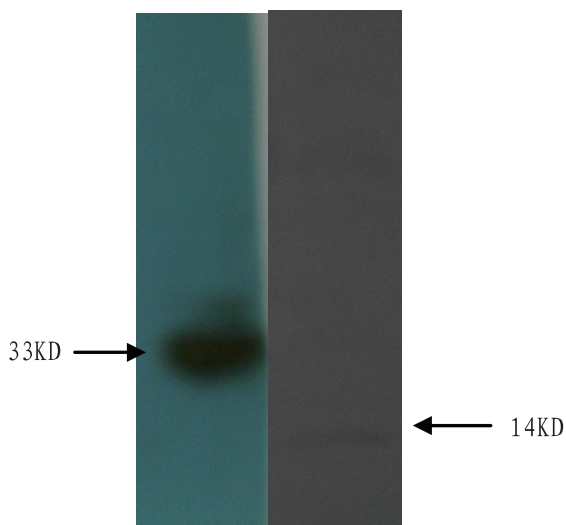


图9 p7TP2蛋白印迹鉴定

注：1. p7TP2融合蛋白；2. p7TP2蛋白在真核细胞中过表达

2.5.4 免疫组织化学染色 利用正常肝组织、肾脏组织石蜡切片进行免疫组织化学染色，将切片常规脱蜡和抗原修复后用免疫结束后的血清（1：4000）作为一抗，室温下DAB显色。对照实验中，一抗用PBS和免疫前血清替代，其他同上，阳性信号呈现棕黄色颗粒。结果显示p7TP2蛋白主要位于细胞的胞浆中，且在正常肝组织中表达量较高，主要呈区带性分布，并在肝静脉周围表达增强，见图10。在正常肾组织中也主要定位于细胞浆，主要分布在肾小管周围，见图11。

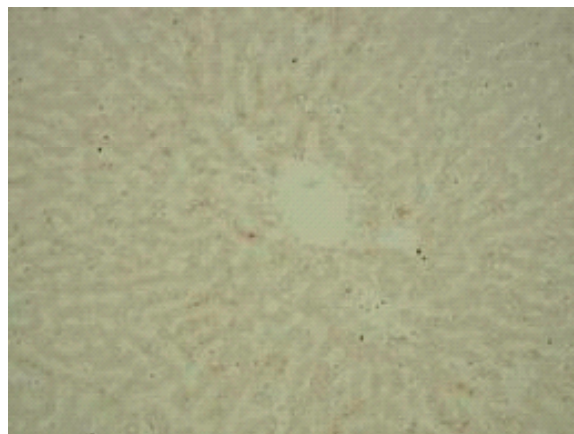


图10 正常肝组织表达p7TP2蛋白

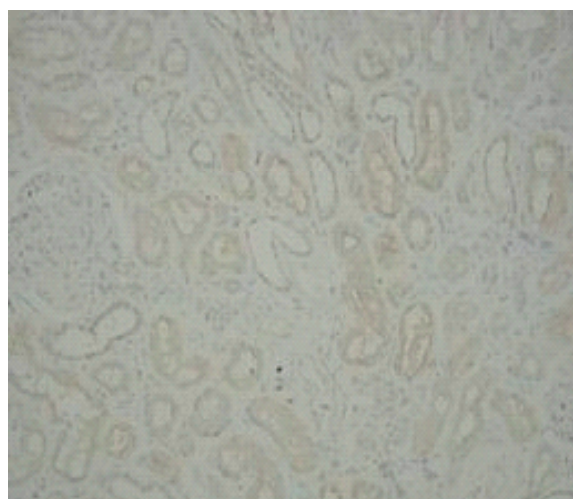


图11 正常肾组织表达p7TP2蛋白

## 3 讨论

多数氨基酸密码子不只一个，而不同生物使用这61种密码子的偏爱性不同。当外源目的基因mRNA在大肠埃希菌中过量表达，由于密码子偏爱性不同，会因为缺乏某种或某几种tRNA，直接导致翻译终止或错误。tRNA不足会造成翻译停顿、早期翻译停止、移码突变和氨基酸错掺等问题。Rosetta菌株是经过修饰，专用于带有大肠埃希菌稀有密码子的真核蛋白表达的菌株。经提高稀有tRNA水平，这些蛋白的表达会大幅度提高<sup>[8-11]</sup>。p7TP2基因在*E. coli* codon usage analyzer中分析其稀有密码子含量较高，大于26%，部分稀有密码子连续出现，目的蛋白在大肠埃希菌BL21中全部翻译表达但量较少，且由于稀有密码子的原因表达了一些截短蛋白，而在能补充稀有密码子的Rosetta菌株中则大量表达了全长目的蛋白。

目前,大肠埃希菌是基因工程领域中应用最广泛的原核表达系统,因为其具有方案简单、操作简单、成本低廉、基础生物学和分子遗传背景清楚,且生物安全性高等特点<sup>[12]</sup>。pET-32a(+)载体属于pET载体系列的一种,含T7-Tag的编码序列和His-Tag的编码序列,表达蛋白的N-端有T7-Tag,C-端有His-Tag,因此可用T7-Tag亲和层析或His-Tag亲和层析进行纯化。本实验主要利用His-Tag亲和层析进行蛋白纯化,回收率较高且蛋白较纯,浓度也比较高,用BCA蛋白定量试剂盒检测其浓度可达1g/L,为进一步的免疫动物、蛋白质免疫印迹、酶联免疫吸附、免疫组织化学及蛋白的其他生物学活性的研究提供了前提。

融合蛋白作为抗原不仅使蛋白质纯化变得容易,而且使制备的抗体有较高的免疫原性。用酶联免疫吸附试验检测免疫血清中的抗目的蛋白的滴度远高于抗GST滴度,且用GST抗原中和抗体后,免疫血清与GST基本不反应,却仍保持与目的蛋白的反应,具有较好的特异性<sup>[13]</sup>。本实验也通过蛋白质免疫印迹从原核表达纯化蛋白和真核细胞过表达蛋白两个方面进一步验证了多克隆抗体特异性和较高的效价。免疫组织化学结果表明,p7TP2蛋白在正常肝组织及肾组织均有表达,且在细胞内主要定位于细胞浆,在肝组织主要集中在肝静脉周围呈区带性分布,在肾组织集中在肾小管区域,这是对p7TP2蛋白的生物学功能的进一步认识,国内外鲜有报道,同时制备的p7TP2多克隆抗体也为下一步关于p7TP2的形态和机能研究奠定了良好的基础,期望能对临床HCV感染标本的检测、治疗药物的开发和丙型肝炎发病机制等领域产生重大影响。

#### 参考文献

- [1] Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are

- important for RNA replication[J]. *J Virol*,2002,76:5326-5338.
- [2] Griffin SD, Harvey R, Clarke DS, et al. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria[J]. *J Gen Virol*,2004,85:451-461.
- [3] Branza-Nichita N, Durantel D, Carrouée-Durantel S, et al. Antiviral effect of N-butyldeoxynojirimycin against bovine viral diarrhea virus correlates with misfolding of E2 envelope proteins and impairment of their association into E1-E2 heterodimers[J]. *J Virol*,2001,75:3527-3536.
- [4] Griffin S, Clarke D, McCormick C, et al. Signal peptide cleavage and internal targeting signals direct the hepatitis C virus p7 protein to distinct intracellular membranes[J]. *J Virol*,2005,79:15525-15536.
- [5] Yang GP, Ross DT, Kuang WW, et al. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes[J]. *Nucleic Acids Res*,1999,27:1517-1523.
- [6] Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring[J]. *Science*,1999,286:531-537.
- [7] 袁菊,郭江,成军,等. HCV p7蛋白反式调节基因p7TP2的克隆化及生物信息学分析[J]. *世界华人消化杂志*,2006,14:581-587.
- [8] Brinkmann U, Mattes RE, Buckel P. High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product[J]. *Gene*,1989,85:109-114.
- [9] Seidel HM, Pompliano DL, Knowles JR. Phosphonate biosynthesis: molecular cloning of the gene for phosphoenolpyruvate mutase from *Tetrahymena pyriformis* and overexpression of the gene product in *Escherichia coli*[J]. *Biochemistry*,1992,31:2598-2608.
- [10] Rosenberg AH, Goldman E, Dunn JJ, et al. Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli*, demonstrated with a versatile codon test system[J]. *J Bacteriol*,1993,175:716-722.
- [11] Del Tito BJ Jr, Ward JM, Hodgson J, et al. Effects of a minor isoleucyl tRNA on heterologous protein translation in *Escherichia coli*[J]. *J Bacteriol*,1995,177:7086-7091.
- [12] 陈宏. 基因工程原理与应用[M]. 北京:中国农业出版社,2005.
- [13] 李改丽,王百忍,费玲玲,等. COX-2的基因克隆和多克隆抗体制备[J]. *生物化学与生物物理进展*,2003,30:478-482.

收稿日期:2009-05-14