

# EB病毒特异性 DNA 酶基因在大肠杆菌中的高效表达<sup>①</sup>

侯孟君<sup>②</sup> 朱振宇 陈尚武 严世荣 黄迪 陈瑞君 马润泉

(中山医科大学生物化学教研室; 广州, 510089)

**摘要** 含 EB病毒特异性 DNA 酶全基因片段的大肠杆菌受变温诱导后,其上清液在十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 时出现一条浓集带,分子质量大小约为 52 ku,符合 EB病毒 DNA 酶全基因编码蛋白质大小。凝胶中蛋白质的定量扫描结果显示该蛋白质占宿主菌总蛋白质的 20%~23%,实现了 DNA 酶全基因在原核体系的高效表达。未见包涵体形成;迅速或缓慢升温所诱导目的蛋白质表达量基本相同。

**关键词** 疱疹病毒 4型;人;基因表达;脱氧核糖核酸酶类 遗传学

中图分类号 R 373.9

EB病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 是 1964 年从非洲 Burkitt 淋巴瘤中发现的,属人类疱疹病毒 4 型。鼻咽癌是以我国华南地区为高发中心的常见恶性肿瘤。1973 年 Wolf 等<sup>[1]</sup>发现鼻咽癌上皮细胞中有 EB病毒基因组存在,确定了 EBV 是影响鼻咽癌发生、发展及其转归的重要相关因素。1979 年 Cheng 等<sup>[2]</sup>发现绝大多数鼻咽癌病人血清中存在有高滴度 EBV 特异 DNA 酶抗体,并将该检测方法用于辅助发现早期鼻咽癌。本室朱振宇<sup>[3]</sup>等根据 EBV 基因全序列<sup>[4]</sup>设计引物并扩增出 EBV-DNA 酶全基因片段 (1 460 bp),与高效表达载体 pBV 221 连接,转化到大肠杆菌 JM 103 中,成功地筛选、鉴定出含正向连接重组体工程菌。本研究在此基础上进一步研究目的基因在宿主菌中表达情况及其影响因素;表达产物的性质、分子质量大小以及表达量等。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

大肠杆菌 JM 103,质粒 pBV 221 转化 JM 103 菌及基因工程菌 (含 pBV 221/EBV-DNA 酶) 均为本室菌种;激发的 Raji 细胞 EBV-DNA 酶,鼻咽癌病人血清,由中山医科大学肿瘤研究所生化室提供;低分子蛋白质标准, Sigma 公司产品。

### 1.2 方 法<sup>[5-8]</sup>

1.2.1 温度诱导培养 分别将大肠杆菌 JM 103,质粒 pBV 221 转化 JM 103 菌及基因工程菌在 30℃ 活

化过夜,按 1:100 稀释比例接种到 Lunia-Bertani (LB) 培养液中,30℃ 振荡培养至 600 nm 吸光度 (A) 为 0.5 时,一部分迅速升温到 42℃ 诱导培养;一部分则在 2 h 内缓慢升温到 42℃,每隔 1 h 各取出 500 mL,最长 6 h

1.2.2 超声破碎制备重组酶粗提液 在 4℃,7 000 r/min 离心 5 min 收集各种培养菌体,用生理盐水洗涤 3 次,以 1:10 的比例加入酶抽提缓冲液,在冰浴中用 MSE 型超声发生器在 22 micros 档破碎 4 次 (每次持续 30 s,间隔 60 s);在 4℃ 经 12 000 r/min 离心 15 min,上清加 2.1 mol/L 甘油即为重组酶粗提液,-20℃ 贮存备用。

1.2.3 蛋白质浓度测定 超声破碎的各样品上清液及以相同方法制备的激发的 Raji 细胞 EBV-DNA 酶粗提液,经适当比例稀释后,以电泳纯的牛血清白蛋白为标准,配成浓度为 0.1 g/L 的应用液。以复管测定 595 nm 吸光度 (A) 数值为纵座标,以蛋白质含量为横座标绘制标准曲线,并进行直线回归,可从该标准曲线求得各样品的蛋白质含量和浓度。

1.2.4 表达产物粗提液十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析 各种细菌经温度诱导培养 4 h 后超声破碎<sup>①</sup> 取上清部分直接进行 SDS-PAGE,而沉淀部分用 7 mol/L 尿素在 37℃ 作用 1 h 后,经 10 000 r/min 离心 10 min,再取上清进行电泳;<sup>②</sup> 经温度诱导培养 4 h 后,取各种细菌全蛋白质进行 SDS-PAGE,并以低分子质量蛋白质

① 国家教委博士点基金资助课题; ② 第一作者, 1966 年出生,女,硕士,讲师,现在广东省中医院工作 (广州, 510120); 陈尚武现在中山大学生命科学院昆虫研究所

Marker为对照;电泳条件为恒流 20 mA,电泳 4 h,经 3.3 mol/L 甲醛固定,用考马斯亮蓝 (Coomassie blue) R250 染色过夜,再用 1.2 mol/L 冰乙酸脱色至背景无色。根据蛋白质 Marker 的迁移率在半对数坐标纸上作出标准曲线,计算出诱导表达的 DN A酶的迁移率,经计算机线性回归处理,计算出目的蛋白质的分子质量。

1.2.5 凝胶中的蛋白质定量扫描 上述电泳凝胶,用日本产 Shimadzu CS-910 薄层凝胶积分扫描仪在 555 nm 处进行扫描,记录诱导表达蛋白质峰的面积及全细菌蛋白质峰的总面积,计算目的蛋白质占宿主菌总蛋白质的比例。

## 2 结 果

### 2.1 温度诱导培养的影响

结果显示,诱导培养 1 h 其表达量很少,而 2~ 6 h 的表达量基本一致。

### 2.2 样品蛋白质含量 ( $p_B$ )测定

各样品的蛋白质浓度测定结果见表 1

表 1 各样品蛋白质含量 ( $p_B/g \cdot L^{-1}$ )

样品(粗提液)	蛋白质
大肠杆菌 JM103	3.6
pBV221 转化的 JM103	4.6
未诱导的正向重组菌	4.6
经诱导的正向重组菌	6.2
激发的 Raji 细胞	3.2

结果表明经温度诱导的正向重组菌的蛋白质表达量较各对照组为高。

### 2.3 重组蛋白质的水溶性

经温度诱导的正向重组菌经超声波破碎后的上清和沉淀的 SDS-PAGE 结果(图 1)显示绝大部分蛋白质在上清中,且有一新的浓集带出现,未见包涵体形成;迅速或缓慢升温所诱导的目的蛋白质表达量基本相同。

### 2.4 重组蛋白质的分子质量大小

各种细菌全蛋白质 SDS-PAGE 结果(图 2)显示正向重组菌有特征性的 52 ku 目的蛋白质表达,且经温度诱导后表达量明显增加。

### 2.5 重组蛋白质的表达量

凝胶中的蛋白质定量扫描结果(图 3)显示:经温度诱导的正向重组菌表达的 EBV-DN A酶(52 ku 处)含量占宿主菌总蛋白含量的 20%~ 23%(图中

最高峰),而未诱导者仅 2%~ 3%;对照组的 pBV221 转化菌、激发的 Raji 细胞在相应的位置的蛋白带仅占总蛋白的 1%~ 2%。表明 EBV-DN A酶全基因不仅克隆、筛选成功,而且在大肠杆菌 JM103 中实现了高效表达,并可受温度诱导来调控表达量。



图 1 工程菌上清与沉淀蛋白质的 SDS-PAGE  
1. 迅速升温诱导工程菌上清; 2. 迅速升温诱导工程菌沉淀;  
3. 缓慢升温诱导工程菌上清; 4. 缓慢升温诱导工程菌沉淀

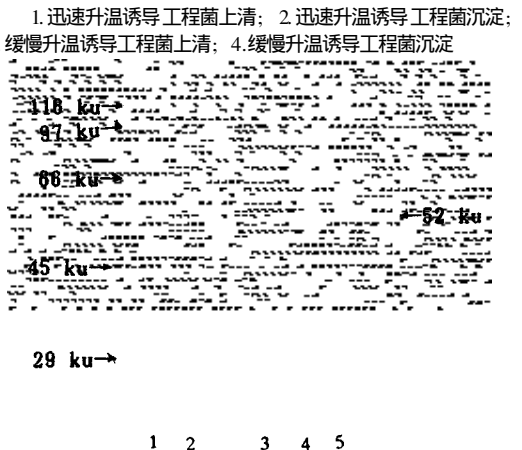


图 2 对照及工程菌全蛋白质的 SDS-PAGE  
1. 低分子质量蛋白质 Marker; 2. 宿主菌; 3. pBV221 转化的宿主菌; 4. 未经诱导的基因工程菌; 5. 经变温诱导的基因工程菌

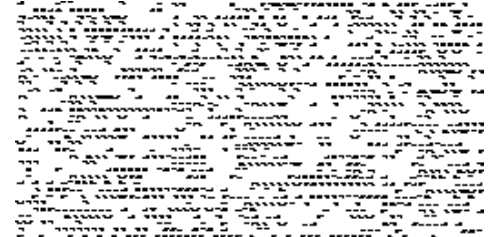


图 3 经变温诱导工程菌全蛋白质定量扫描  
最高峰为目的蛋白质峰

### 3 讨论

外源目的基因在原核细胞中要实现高效表达, 需要一个强的、可调控的原核启动子以进行高效转录; 同时须有指导高效翻译的 SD 序列和避免发生通读的转录终止信号。本研究所用的基因工程菌的重组体即由 EBV-DNA 酶全基因片段与符合上述高效表达要求的质粒 pBV221 构成, 且其  $P_R P_L$  串联启动子受温度敏感基因  $C_{I_t}$  控制。有文献报道<sup>[9]</sup>该表达质粒须立即升温至  $42^\circ\text{C}$  并诱导培养 4~6 h 才能实现高效表达, 本研究结果表明: ① 通过简单的变温 ( $30^\circ\text{C} \rightarrow 42^\circ\text{C}$ ) 诱导, 使抑制启动子的  $C_I$  蛋白失活,  $P_R P_L$  开始启动, 可在 2 h 内完成转录、翻译过程, 表达量较不诱导者明显增加, 且目的蛋白质占宿主菌总蛋白质含量的 20% 以上, 实现了高效表达, 而诱导 4~6 h 产量基本相同。② 绝大部分菌体蛋白质在上清中, 电泳时出现一条浓集带, 未形成包涵体; 迅速升温与 2 h 内缓慢升温到  $42^\circ\text{C}$  所诱导目的蛋白质表达量基本相同。

### 参 考 文 献

1 Wolf H, Zur H H, Becker V, *et al.* EB virus genomes

in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature New Biol*, 1973, 244(2): 245

2 Cheng Y C, Chen T Y, Glaser R, *et al.* Frequency and levels of antibodies to Epstein-Barr virus-specific DNase are elevated in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 77: 6162

3 朱振宇, 严世荣, 黄迪, 等. EBV-DNA 酶全基因扩增克隆和鉴定. *中山医科大学学报*, 1995, 16(4): 5

4 Bear R, Bankier A, Biggin M, *et al.* DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 1984, 310: 207

5 鲁子贤. 蛋白质和酶学研究方法. 北京: 科学技术出版社, 1989. 1~328

6 Nutter L M, Grill S P, Li J S, *et al.* Induction of virus enzymes by phorbol esters and n-butyrate in Epstein-Barr virus genome carrying Raji cells. *Cancer Research*, 1987, 47: 4407

7 陈海峰, 黄迪. 鼻咽癌患者血清中抗 Epstein-Barr 病毒特异性 DNase 抗体检测方法探讨. *生物化学杂志*, 1989, 5: 131

8 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993. 1~662

9 张智清, 姚立红, 侯云德. 含  $P_R P_L$  启动子的原核高效表达载体的组建及其应用. *病毒学报*, 1990, 6(2): 111

(1996-04-17 收稿 1997-03-06 修回)

## HIGH LEVEL EXPRESSION OF THE EPSTEIN-BARR VIRUS SPECIFIC DNASE IN *E. coli*

Hou Mengjun Zhu Zhenyu Chen Shangwu Yan Shirong Huang Di Chen Ruijun Ma Jianquan

(Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

A new concentrated band was observed in 10% SDS-PAGE gel of the supernatant obtained from EBV-DNase gene fragment transformed *E. coli* induced by changing temperature. The molecular weight of the new protein was about 52 ku coinciding with its theoretic value. The amount of newly expressed protein scanned by thin layer gel integral scanner ranged between 20% ~ 23% of the bacteria total proteins. The expression levels of target protein had no difference in *E. coli* induced by increasing temperature rapidly or gradually.

**Subject headings** herpes virus 4, human; gene expression; deoxyribonuclease/genetics