

·实验研究·

## EB 病毒 3 种全基因的扩增、克隆及表达<sup>①</sup>

朱振宇 陈尚武 戴克胜 侯孟君 严世荣 黄迪 马涧泉

(中山医科大学生物化学教研室; 广州, 510089)

**摘要** 目的: 扩增克隆及表达 EB 病毒(EBV) 3 种(DNA 酶、胸苷激酶及 BHRF<sub>1</sub>) 全基因片段。方法: 以 B<sub>95-8</sub> 细胞株 DNA 为模板, PCR 扩增 3 种目的基因。酶切鉴定后分别与高效表达载体 pBV 221 连接, 用大肠杆菌 JM103 或 HB101 作为转化的宿主菌。抗氨苄青霉素培养形成单菌落后放大培养, 根据重组质粒的电泳行为粗筛, 再双酶切鉴定。结果: 各种阳性菌经 30℃→42℃变温诱导培养, 超声破碎后其上清液经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 分别新出现一条分子大小为 52 ku, 67 ku 及 17 ku 蛋白区带, 符合 EBV 该 3 种全基因所编码蛋白质大小。凝胶中蛋白质定量扫描结果显示目的蛋白质分别占宿主菌总蛋白质的 23%, 6.7% 和 2.5%。结论: 实现了 EBV 3 种全基因的扩增、克隆及在原核体系的表达。

**主题词** 疱疹病毒 4 型, 人/遗传学; 克隆, 分子; 基因表达调控; 聚合酶链反应; 脱噬作用

中图分类号 R 373.9

## AMPLIFICATION, CLONING, AND EXPRESSION OF 3 INTACT GENE FRAGMENTS IN EPSTEIN-BARR VIRUS

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

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

**Abstract Objective:** Amplification, cloning, and expression of 3 intact gene fragments encoding for DNase, thymidine kinase and BHRF1 protein in Epstein-Barr virus (EBV). **Methods:** 3 target genes were amplified with polymerase chain reaction (PCR) using B<sub>95-8</sub> cells DNA as template. The target genes were ligated to plasmid pBV221 as expression vector respectively. E. coli JM103 and HB101 were used as host cells for transformation. The recombinant clones were screened according to their plasmid DNAs' electrophoretogram. The correct inserted recombinant plasmids were confirmed with double restrictive enzyme cleavage. **Results:** New bands were observed in 10% SDS-PAGE gel of the supernatant obtained from 3 intact gene fragments transformed E. coli induced by changing temperature from 30℃ to 42℃. The molecular weight of the new proteins were about 52 ku, 67 ku and 17 ku coinciding with their theoretic value respectively. The amount of newly expressed proteins scanned by thin layer gel integral scanner accounted for 23.0%, 6.7% and 2.5% of the bacteria total proteins respectively. **Conclusion:** EBV 3 intact gene were successfully amplified, cloned and expressed in E. coli.

**Subject headings** herpes virus 4, human/genetics; cloning, molecular; gene expression regulation; polymerase chain reaction; apoptosis

1964 年从非洲 Burkitt 淋巴瘤发现 EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV), 后证实它属于人类疱疹病毒 4 型。鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是以珠江流域为高发中心的常见恶性肿瘤,

Wolf 等<sup>[1]</sup>发现 NPC 细胞中有 EBV 基因组存在, 确定了 EBV 是影响 NPC 发现、发展及其转归的重要相关因素。Cheng 等<sup>[2]</sup>发现 93% 以上的 NPC 病人血清中有高滴度 EBV-DNA 酶抗体, 并将该检测方

法用于辅助发现早期 NPC。本室根据 EBV 172, 282 bp 全基因序列<sup>[3]</sup> 分别设计 3 对引物(含有一种或两种内切酶位点), 以期分别扩增出 EBV 特异性 DNA 酶(1 460 bp)、胸苷激酶(thymidine kinase, TK, 1 843 bp)及 BHRF1(592 bp)3 种全基因片段, 并实现高效表达, 以获取优质、高产的 3 种重组蛋白质应用于 NPC 的临床诊断及治疗。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

大肠杆菌 JM103、HB101, 质粒 pBV211, 成纤维细胞株均为本室储存; 鼻咽癌病人血清、B95-3 细胞株, 由本校肿瘤研究所提供; 低分子质量 DNA 及蛋白质标准, 多种内切酶均为 Sigma 公司产品。

### 1.2 方 法

EBV 的 3 种全基因片段的获得见文献<sup>[4-5]</sup>, 采用常规 PCR 扩增、产物电泳及纯化后酶切鉴定。3 种基因与载体酶切、连接、转化及鉴定见文献<sup>[4-9]</sup>, 按原核克隆及酶切鉴定技术常规进行。EBV-DNA 酶及 TK 基因在大肠杆菌中表达及其活性测定见文献<sup>[6-8]</sup>。凋亡细胞 DNA 裂解片段的抽提见<sup>[9, 10]</sup>, 150×g 离心 10 min 收集细胞, 加入裂解缓冲液(5×10<sup>-3</sup> mol/L Tris·HCl, pH7.5; 5×10<sup>-3</sup> mol/L EDTA; 1×10<sup>-4</sup> kg/L 蛋白酶 K, 0.5% Tween-20), 50℃温浴 3h 后, 于 4℃, 27000×g 离心 20 min。取上清, 加入 0.13 mol/L NaCl 和 66% 重蒸乙醇溶液以沉淀裂解的 DNA 片段, 重悬于缓冲液(1×10<sup>-2</sup> mol/L Tris·HCl, pH7.5; 5×10<sup>-3</sup> mol/L EDTA; 1% SDS), 氯仿-异戊醇(24:1)抽提两次。适量 TE 缓冲液溶解后, 经 1.8% 琼脂糖凝胶电泳 0.015 A×12 h, 溴化乙锭染色后紫外线下观察、摄影。

## 2 结 果

### 2.1 EBV 的 3 种全基因片段的获得

PCR 扩增产物电泳结果见图 1。根据电泳迁移率计算, 分别与 3 种全基因片段的理论值大小相符。

### 2.2 3 种全基因克隆、表达及鉴定结果综合比较

#### 2.2.1 EBV 3 种全基因的克隆、表达及鉴定结果

有关 DNA 酶基因及 TK 基因的克隆、表达及鉴定, 详见文献<sup>[4-8]</sup>。EBV-BHRF1 全基因片段通

过 *Nco* I 和 *Sal* I 位点与表达载体 pBV221 定向连接后, 转化宿主菌大肠杆菌 HB101。经抗氨苄青霉素培养基粗筛, 根据上述两种内切酶消化产物电泳迁移率进行筛选及鉴定。

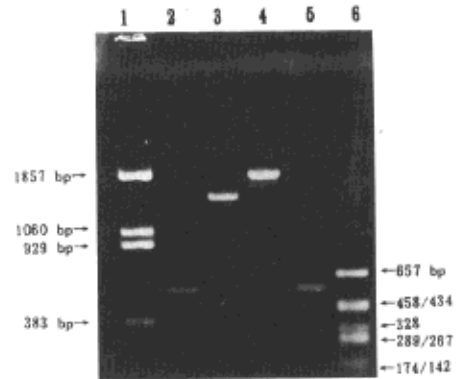


图 1 EBV 的 3 种全基因片段的 PCR 扩增产物电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of EBV three intact gene fragments

lane 1: pBR322/*Bst* N I; lane 2: nuclear antigen-1 gene fragment (564 bp) as control; lane 3: DNase gene fragment (1 460 bp); lane 4: thymidine kinase gene fragment (1 843 bp); lane 5: BHRF1 gene fragment (592 bp); lane 6: pGEM7Zi/*Hae* III

#### 2.2.2 EBV-BHRF1 基因表达产物 SDS-PAGE 电泳

结果见图 2。经 30℃→42℃变温诱导培养阳性菌的上清液与对照组相比较出现一条蛋白带, 其位置与烟草花叶病毒外壳蛋白(17.5 ku)基本齐平, 与其理论值 17.0 ku 相符。

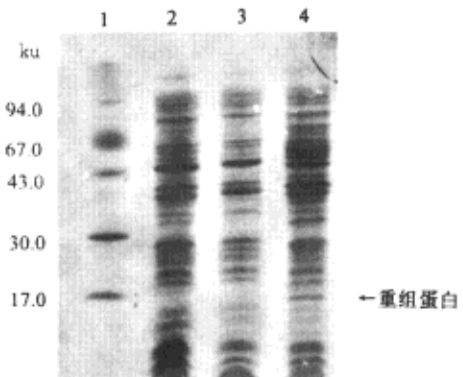


图 2 重组 BHRF1 蛋白 10%SDS-PAGE 电泳

Fig. 2 10%SDS PAGE of recombinant BHRF1 protein

lane 1: Protein Marker; lane 2: pBV221/*E. coli* HB101; lane 3: pBV-BHRF1/*E. coli* HB101 cultured at 30℃; lane 4: pBV-BHRF1/*E. coli* HB101 induced by changing temperature 30℃→42℃

#### 2.2.4 BHRF1 表达产物的抗凋亡活性初步检测

BHRF1 蛋白产物因为与 bcl-2 有 38% 的氨基酸序列相同, 而具有抑制细胞凋亡的作用。图中可见 BHRF1 表达产物与对照组相比, 具有明显的抑制细胞凋亡的作用, 且可被鼻咽癌病人血清特异性中和。

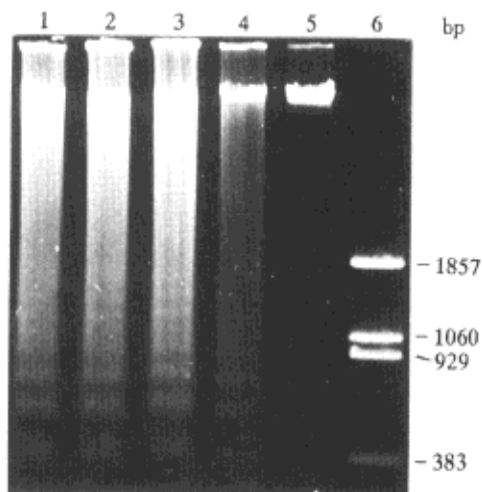


图 3 不同处理后培养 24 h 的成纤维细胞 DNA 电泳

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of DNA from fibroblast cells cultured with different conditions for 24 hours

lane 1: without FCS cultured for 24 h as control (apoptosis model); lane 2: control plus supernatant from pBV221/HB101; lane 3: control plus supernatant from pBV-BHRF1/HB101 and sera from nasopharyngeal carcinoma (NPC) patients; lane 4: control plus supernatant from pBV-BHRF1/HB101 without NPC patients' sera; lane 5: normal cells DNA; lane 6: pBR322/Bst NI (Marker)

### 3 讨论

#### 3.1 外源基因的表达水平

在原核细胞表达体系, 外源基因的表达水平可从小于宿主细胞总蛋白的 1% 到大于 30% 不等。影响目的基因表达效率的因素较多, 包括目的基因的大小、表达产物的稳定性、SD 序列与起始密码 ATG 间的距离以及载体与宿主细胞的相容性等。本研究所表达的 EBV 3 种全基因片段均在 2 kb 以内, 所用载体均为 pBV221 (其表达效率可达 20% 左右<sup>[11]</sup>), 而 SD 序列与起始密码 ATG 间的距离有较大差别, DNA 酶基因为 32 bp, 而 TK 基因和 BHRF1 基因则分别为 5 bp 和 6 bp。3 种基因工程菌在相同的变温诱导条件下的表达量分别为 23%, 6.7% 和 2.5%。可见要实现外源基因的高效

表达除选择适宜宿主和载体外, 还应充分利用原核细胞的强启动子和 SD 序列等调控元件的作用。

#### 3.2 有关表达产物的生物学特性

已分别有文献报道用 RNA 反转录获得的目的基因或用内切酶消化 EBV 基因组以获得编码 DNA 酶、TK 及 BHRF1 基因片段的主要部分在原核细胞克隆表达, 其表达产物均具有较高的生物学活性, 但其抗原性均明显降低——无论用血清免疫学方法还是原位杂交(免疫印迹法)均证实<sup>[12]</sup> 其表达产物的抗原性减弱为 50% 左右。本文通过 PCR 扩增所获得编码 DNA 酶的完整的基因片段, 选用高效表达载体将其转化到大肠杆菌中, 经变温诱导后基本实现了高效表达(表达量分别占宿主菌蛋白总量的 23%, 6.7% 和 2.5%), 表达产物粗提液不仅具有较高的生物学活性, 如分别有较强的 DNA 酶和 TK 酶活性, BHRF1 产物有抑制细胞程序性死亡的作用, 而且其活性可被鼻咽癌病人血清特异性中和 80% 以上, 可能与本研究所表达的蛋白质较为完整、准确有关, 但其具体机制尚待进一步研究。

#### 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 Bear R, Bankier A, Biggin M, *et al.* DNA sequence and expression of the B 95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 1984, 310: 207
- 4 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
- 5 陈尚武, 陈瑞君, 黄 迪, 等. EB 病毒胸苷激酶基因的扩增. *中国病毒学*, 1996, 11(3): 287
- 6 侯孟君, 朱振宇, 陈尚武, 等. EB 病毒特异性 DNA 酶基因在大肠杆菌中的高效表达. *中山医科大学学报*, 1997, 18(2): 110
- 7 陈尚武, 朱振宇, 陈瑞君, 等. EB 病毒特异的胸苷激酶基因在大肠杆菌中的表达. *中山医科大学学报*, 1996, 17(4): 256
- 8 朱振宇, 黄 迪, 陈瑞君, 等. 重组 EB 病毒 DNA 酶的生物学特性及其临床应用的初步研究. *中山医科大学学报*, 1997, 18(3): 171

(下转第 30 页)

出量明显下降,外周血管阻力增加。病理解剖显示心包积液,部分犬出现胸腔积液,心室腔明显扩大,室壁变薄。光镜检查示心肌细胞水肿、脂肪变性、少数坏死溶解,间质充血、细胞浸润。本实验模型的临床、血流动力学及心脏病理改变与文献报道相符。本研究应用自制的埋藏式起搏器,费用低廉,在国内首次成功制作该模型,为我国广泛开展CHF的实验研究提供了1个切实可行的较理想的非缺血性CHF动物模型。

(本研究承中山医科大学孙逸仙纪念医院内科严荣教授悉心指导,特此致谢)

### 参 考 文 献

- 1 Armstrong P W, Stopps T P, Ford S E, *et al.* Rapid ventricular pacing in the dog: pathophysiological studies of heart failure. *Circulation*, 1986, 74(5): 1075
- 2 Travill C M, Williams T D M, Pate P, *et al.* Haemodynamic and neurohumoral response in heart failure produced by rapid ventricular pacing. *Cardiovasc Res* 1992, 26: 783
- 3 谷伯起. 心血管病理学. 北京: 人民卫生出版社, 1992. 1~14
- 4 Pye M P, Cobbe S M. Mechanisms of ventricular arrhythmias in cardiac failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res* 1992, 26: 740
- 5 Komamura K, Shannon K P, Pasipoularides A, *et al.* Alteration in left ventricular diastolic function in conscious dogs with pacing-inducing heart failure. *J Clin Invest*, 1992, 89(6): 1825
- 6 Redfield M M, Aarhus L L, Wright R S, *et al.* Cardiorespiratory and neurohumoral function in a canine model of early left ventricular dysfunction. *Circulation*, 1993, 87(6): 2016
- 7 Coleman III H N, Taylor R R, Pool P E, *et al.* Congestive heart failure following chronic tachycardia. *Am heart J*, 1971, 81(6): 790

(1997-02-20 收稿 1997-11-15 修回)

(上接第6页)

- 9 Prigent P, Blanpied C, Aten J, *et al.* A safe and rapid method for analyzing apoptosis-induced fragmentation of DNA extracted from tissues or cultured cells. *J Immunol Methods* 1993, 160: 139
- 10 朱振宇, 潘景轩, 赵群, 等. 地塞米松诱导裸鼠细胞程序性死亡的研究. *中国病理生理杂志*, 1996, 12(2): 113
- 11 张智清, 姚立红, 侯云德. 含P<sub>R</sub>PL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
- 12 Stolzenberg M C, Ooka T. Purification and properties of Epstein-Barr virus DNase expressed in Escherichia coli. *J Virol*, 1990, 64: 96

(1997-04-28 收稿 1997-11-26 修回)

### · 简 讯 ·

## 中国工程院吴咸中院士受聘为我校名誉教授

1997年12月1日下午在我校永生楼四楼讲学厅举行了由颜光美副校长主持并代表黄洁夫校长授予中国工程院院士、原天津医学院院长吴咸中教授为我校名誉教授授聘仪式。吴咸中院士长期从事普通外科医疗工作,尤其是中西医结合治疗急腹症研究方面有高深造诣。在授聘仪式后,吴咸中院士还作了题为“中西医结合治疗重症胰腺炎”的学术报告,通过大量临床资料充分论证了中西医综合治疗重症胰腺炎的效果。报告会吴咸中院士在侯灿教授、吴伟康教授陪同下参观了我校中西医结合研究所,他对研究所近期的发展成绩表示极大关注。

(冯世容)