

EB 病毒特异的胸苷激酶基因在大肠杆菌中的表达^①

陈尚武^{1,②} 朱振宇¹ 陈瑞君¹ 黄迪² 马润泉¹

(1 中山医科大学生化教研室; 广州, 510089 2 中山医科大学肿瘤研究所)

提 要 30℃培养基因工程菌, 迅速转移至42℃培养4h 诱导重组质粒中外源 EB 病毒胸苷激酶(EBV TK)基因的表达。菌体蛋白作十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析表明, 重组蛋白分子大小与 EBV TK 分子大小的理论值67ku 相符, 占菌体总蛋白的6%以上。Western blot 分析表明重组蛋白可与混合 NPC 病人血清中 EBV TK 特异性抗体反应, 呈现良好的抗原性。以³HdT 为底物测定菌体总蛋白的 TK 比活性, 结果提示, 重组蛋白具有胸苷激酶活性。研究为 EBV TK 在 NPC 诊断中的应用打下了基础。

主题词 疱疹病毒4型, 人; 胸腺嘧啶激酶类/生物合成; 基因表达调控; 大肠杆菌

中图分类号 R 739.63

大量研究提示 EB 病毒(EBV)与鼻咽癌(NPC)密切相关。有证据表明, EBV 编码一个病毒特异的胸苷激酶(thymidine kinase, TK)^[1], EBV TK 是 EBV 早期抗原成分之一, NPC 病人血清可中和 EBV TK 活性。蛋白印迹(Western blot)分析和酶联免疫吸附测定(ELISA)检测表明 NPC 病人血清中具有 EBV TK 特异的 IgA 和 IgG 抗体^[2]。检测血清对 EBV TK 的免疫学反应, 可望用于 NPC 的早期诊断或临床辅助诊断。本研究根据本室构建的重组质粒 pBVTK 的结构特点^[3], 采用变温诱导重组质粒 pBVTK 中外源 EBV TK 基因的表达, 并对菌体蛋白作十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。以混合鼻咽癌病人血清作抗体来源, 采用 Western blot 方法来鉴定重组蛋白的抗原性。以³HdT 为底物, 测定菌体总蛋白的 TK 比活性, 以此判断重组蛋白的酶活性。

1 材料与方 法

1.1 材料及试剂

1.1.1 生物材料 基因工程菌 pBVTK/HB101; 重组质粒 pBVTK 转化大肠杆菌 HB101(pBVTK 含完整的 EBV TK 基因, 本室构建)。NPC 病人血清, 中山医科大学肿瘤所生化室提供。HRP-Protein A, 上海科欣生物技术研究所产品。

1.1.2 主要试剂 丙烯酰胺, Merck; N,N'-亚甲双丙烯酰胺, Sigma; 考马斯亮蓝 R250, Fluka; Tween-20, 进口分装; DAB, 华美生物工程公司产品。苯甲基磺酰氟(PMSF), 进口分装。Hybond-C Nitrocellulose, 0.45 μmol/L, Amersham 产品, DE-81 paper disc, Whatman 产品。³HdT, 1 mCi/mL, 22 Ci/mmol, 上海原子能研究所产品。

1.2 方 法

1.2.1 诱导目的基因表达 基因工程菌于

① 国家教委博士点基金部分资助; ② 第一作者, 1963年出生, 男, 博士, 现在中山大学生命科学学院昆虫所(广州, 510275)

30℃活化过夜,1:100稀释到LB培养液中,继续在30℃培养至对数生长中期,迅速转移至42℃培养4h,诱导目的基因表达。作为对照,另有一组继续在30℃培养4h,不作诱导处理。

1.2.2 SDS-PAGE^[4] 取基因工程菌诱导和不诱导培养物各1mL离心收集菌体,50mmol/L Tris(pH8.0)洗1次,加40μL凝胶加样缓冲液,振荡混匀,与蛋白质分子质量标准试剂一起,沸水浴5min,8000r/min离心5min,上清上样电泳。

1.2.3 凝胶薄层扫描定量 在595nm处,使用Shimadzu CS-930双波长TLC扫描仪对凝胶进行薄层扫描,根据峰面积计算重组蛋白占菌体总蛋白的比例。

1.2.4 Western blot 电泳方法同前。电泳后不染色,接着进行电转移。取出NC膜,置丽春红S染液染色片刻,标出蛋白质分子质量标准位置,用水漂洗至红色消退。 $\varphi(\text{sln, PBS-T})=0.5\%$ 封膜90min,用此 $\varphi(\text{sln, PBS-T})=0.05\%$ 洗膜2次,再用此溶液按1:200倍稀释NPC病人血清,封于杂交袋中孵育90min,再用此溶液洗膜3次,加1:30 PBS稀释之HRP-protein A,孵育90min,洗膜后,放入DAB显色液(DAB 5mg, PBS 10mL, H₂O₂ 10μL)中显色。

1.2.5 TK活性测定^[5,6] 胸苷激酶可催化脱氧胸腺嘧啶核苷的磷酸化,磷酸化的产物在微碱性条件下可吸附于具有离子交换活性的DE-81滤纸。如用³HdT作底物,将反应产物滴加于DE-81滤纸上,经洗涤可去除未反应的胸苷,测定吸附于滤纸上胸苷酸的放射剂量,可推算出酶的活性。

收集菌体,25mmol/L Tris(pH8.0)洗2次,加适量抽提缓冲液[25mmol/L Tris(pH8.0),50mmol/L Glucose,10mmol/L EDTA(pH8.0),5mmol/L β-mercaptoethanol,50μg/mL PMSF],超声破细菌,8000r/min离心10min,去沉淀,上清用考马斯亮蓝G250法测定蛋白浓度。取25μL菌体

蛋白液,加入75μL测定缓冲液[50mmol/L Tris(pH7.5),5mmol/L MgCl₂,10mmol/L NaF,10mmol/L ATP,5mmol/L β-mercaptoethanol,50μg/mL PMSF,2μmol/L ³HdT(22Ci/mmol),混匀,37℃保温60min。取40μL反应液滴加于DE-81滤纸上,立即浸于乙醇($\varphi=95\%$)中,并洗3次,再用无水乙醇洗1次。70℃烘烤1h,置液体闪烁计数器测放射性核素计数(min⁻¹)值,并计算比放射性活度(比活性)/1×min⁻¹·mg⁻¹。

2 结果

2.1 SDS-PAGE

基因工程菌经诱导培养后,菌体蛋白SDS-PAGE表明较对照的未诱导菌多出一浓染的电泳条带,其位置正好与标准牛血清白蛋白电泳带基本齐平,与EBV TK的分子质量67ku相符(图1)。于595nm处对凝胶进行薄层扫描,结果表明,重组蛋白占菌体总蛋白6%以上。

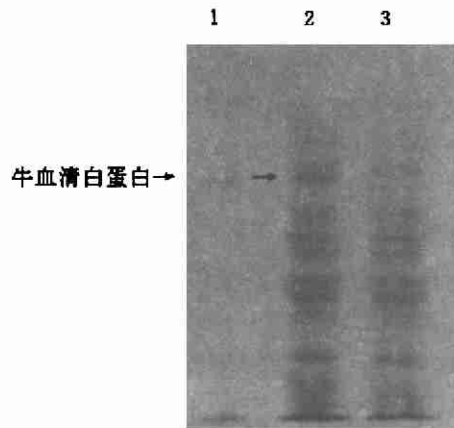


图1 菌体蛋白SDS-PAGE电泳

1. marker; 2. 诱导培养的基因工程菌; 3. 未经诱导的基因工程菌; 箭头示重组蛋白带

2.2 重组蛋白的抗原性

以往的血清学研究证明,NPC病人血清中具有抗EBV特异性TK抗体^[2,7~10]。本研究即以NPC病人血清作为抗体来源,用

Western blot 方法来检测重组 EBV TK 的抗原性。结果表明,重组蛋白可与 NPC 病人血清中特异性抗体结合。将 NPC 病人血清作 1:200 倍稀释,结合条带仍清晰可见(图2),而未诱导的基因工程菌在重组 EBV TK 相应的区带则看不到显色的条带,说明重组蛋白具有良好的抗原性和特异性。

2.3 胸苷激酶活性

以不同样品的菌体总蛋白作为酶制剂,测定其胸苷激酶的比活性(表1)。结果表明,基因工程菌诱导培养后,其 TK 比活性明显高于未诱导培养菌,提示 TK 活性来源于外源 EBV TK 基因的诱导表达产物。

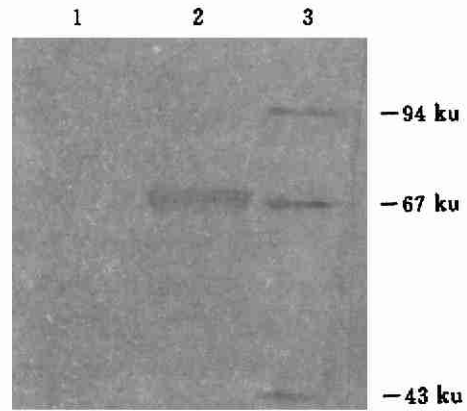


图2 重组蛋白 EBV TK 的 Western blot 检测
1. 未经诱导的基因工程菌; 2. 诱导培养的基因工程菌(显示 67 ku 的阳性条带); 3. 蛋白 marker

表 1 胸苷激酶活性

样 品	蛋白质量浓度 (g/L)	放射性活度计数 (min ⁻¹)	比活性 (1×min ⁻¹ ·mg ⁻¹)
诱导培养菌	1.13	5821	5.1×10 ⁵ (1000%)
未诱导培养菌	1.08	504	4.7×10 ⁴ (9.1%)

3 讨 论

有关 EBV TK 的克隆表达体系,国外曾有过报道^[6,7],但表达的均是融合蛋白。本研究成功地实现了 EBV TK 基因在大肠杆菌中的表达。根据本实验所用重组质粒 pB-VTK 的结构,理论上读码框架正确,表达的重组蛋白应是非融合蛋白^[3]。研究表明,表达产物具有良好的抗原性和酶活性。可望将重组 EBV TK 作为一个 EBV 相关蛋白抗原的来源,应用于 NPC 的早期诊断或临床辅助诊断。同时,对于研究 EBV TK 的性质和作用、EBV 及其表达产物与 NPC 的关系以及 EBV TK 介导的 NPC 及其他肿瘤的基因治疗均有一定的价值。

据报道,用 pBV 系列质粒表达一些外源基因,其产物一般可达细菌总蛋白的 20% 以上。我们的结果低于这一水平,影响因素可能是多方面的。外源基因置于 P_L 和 P_R 两个强启动子的控制下,获得高效转录一般问题不

大,对产量的影响可能主要在翻译及翻译后阶段。由 mRNA 翻译成蛋白质的限速阶段发生在翻译起始,mRNA 5' 端翻译起始区的长短和组成可影响基因的表达水平。研究表明,一些基因在自身的 SD 序列控制下比在载体 SD 序列控制下的表达水平高。另外,重组质粒中 SD 序列与 ATG 间的距离为 5 个碱基,不同于自然状态下,可能也会影响到表达水平。EBV TK 分子较大,一般分子越大,表达的产量越低。还有表达产物的稳定性和受体菌的选择等均影响重组蛋白的量,这些有待进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Littler E, Zeuthen J, McBride AA, *et al.* Identification of an Epstein-Barr virus-coded thymidine kinase. *EMBO J*, 1986, 5(8):1959
- 2 Littler E, Baylis SA, Zeng Y, *et al.* Diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by means of recombinant Epstein-Barr virus proteins. *Lancet*, 1991,

- 337:8743
- 3 陈尚武,黄 迪,陈瑞君,等.EB病毒特异的胸苷激酶基因的定向克隆.中华实验和临床病毒学杂志,待发表
 - 4 Sambrook J,Fritsch EF,Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor,1989. 353~387
 - 5 Littler E,Arrand JR. Characterization of the Epstein-Barr virus encoded thymidine kinase expressed in heterologous eukaryotic and prokaryotic systems. J Virol,1988,62(10):3892
 - 6 Liu MY,Par CY,Shieh SM,*et al.* Cloning and expression of a cDNA encoding the Epstein-Barr virus thymidine kinase gene. J Virol Methods, 1992,40:107
 - 7 Littler E,Newman W,Arrand JR. Immunological response of nasopharyngeal carcinoma patients to the Epstein-Barr-Virus-coded thymidine kinase expressed in *Escherichia coli*. Int J Cancer,1990,45:1028
 - 8 De Turenne-Tessier M,Ooka T,Calender A,*et al.* Relationship between nasopharyngeal carcinoma and high antibody titers to Epstein-Barr virus-specific thymidine kinase. Int J Cancer, 1989,43:45
 - 9 Hsu TY,Pai CY,Shieh SM,*et al.* Use of antigen expressed in bacteria for detection of EBV-specific thymidine kinase antibodies in sera from patients with nasopharyngeal carcinoma. J Med Virol,1992,38(3):214
 - 10 曹小龙,黄 迪.鼻咽癌病人血清中EBV特异性胸苷激酶抗体测定的初步研究.癌症,1993,12(4):311

(1995-11-26收稿 1996-07-06修回)

EXPRESSION OF THE GENE CODING EPSTEIN-BARR VIRUS-SPECIFIC THYMIDINE KINASE IN *Escherichia coli*

Chen Shangwu Zhu Zhenyu Chen Ruijun Huang Di Ma Jianquan

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

The EBV TK gene in the recombinant pBVTK was induced to express by varying culture temperature,culturing at 30°C to desired density and then shifting to another incubator at 42°C and shaking for 4 hours. The analysis of SDS-PAGE for bacterium total proteins indicated that the recombinant protein was similar to the calculated relative molecular mass of EBV TK,67 ku,and the proportion of recombinant protein in total bacterium proteins was found to be about 6%. The results of Western blot showed that the recombinant protein could be recognized by the specific antibody in a pool of NPC patient's sera,representing good antigenicity. The ³HdT was used as the substrate to assay TK specific activity of total bacterium proteins and the results suggested the recombinant protein had enzyme activity of thymidine kinase. The study laid foundation for application of recombinant EBV TK in the diagnosis of NPC.

Subject headings Epstein-Barr virus; thymidine kinase/biosynthesis; gene expression regulation; *Escherichia coli*