

WSSV-VP37 小肽在大肠杆菌中的偏爱型表达

仇知光^{1,2} 刘庆慧^{1*} 黄 捷¹

(¹农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²青岛农业大学, 266109)

摘 要 选用对虾白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)囊膜蛋白 VP37 的功能区段, 利用大肠杆菌密码子偏爱性, 在氨基酸不变的情况下将 VP37 中的密码子通过人工合成改为大肠杆菌偏爱型密码子, 并克隆至表达载体 pBAD/gIII A 中, 构成重组载体 pBAD/gIII A-VP37p'。将重组载体转化入大肠杆菌 Top10 中, 在相同条件下用 L-阿拉伯糖与未优化的重组菌株 Top10-pBAD/gIII A-VP37p 一同诱导。结果显示, 与野生型基因 VP37p 相比, 经密码子优化的 VP37p' 基因表达目的蛋白量占总蛋白的 40.5%, 明显高于野生型 6.5% 的目的蛋白表达量。

关键词 偏爱密码子 VP37 大肠杆菌 表达

中图分类号 S945.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)02-0096-06

Preferential expression of WSSV-VP37 peptide in *E. coli*

QIU Zhi-guang^{1, 2} LIU Qing-hui^{1*} HUANG Jie¹

(¹Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²Qingdao Agricultural University, 266109)

ABSTRACT The expression levels of proteins in *Escherichia coli* appear to be preferential for some special codons. In order to enhance the expression level, we designed a partial sequence of the WSSV-VP37 gene based on the codons of *E. coli* so that its expression level would be optimized. The optimized VP37 fragment was ligated to the expression vector pBAD/gIIA. Then the resulted recombinant pBAD/gIII A-VP37p' was transformed into *E. coli* Top10 and the cells were induced by L-arabinose. SDS-PAGE analysis showed that the content of VP37p' constituted 40.5% of the total proteins. Compared with the wild type recombinant pBAD/gIII A-VP37p, the expression level of the optimized recombinant VP37p' (40.5% of the total proteins) was significantly higher than that of the wild type VP37p (6.5% of the total proteins).

KEY WORDS Codon optimization VP37 *E. coli* Expression

对虾白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)是我国以及东南亚地区等国在对虾养殖中大面积暴发病毒性疾病的主要病原体。自从 WSSV 在全世界大面积流行开始, 国内外学者在分子生物学水平上对 WSSV 的流行病学、理化特性、基因、蛋白结构等进行研究, 现已取得一些突破性进展(Lo *et al.* 1996;

国家自然科学基金课题(30871942)、对虾行业专项(200803012)、国家重点基础研究项目(2006CB101801) 和国家高技术发展计划课题(2006AA100312)共同资助

* 通讯作者。E-mail: liuqh@ysfri. ac. cn

收稿日期: 2010-07-02; 接受日期: 2010-07-22

作者简介: 仇知光(1985-), 男, 硕士研究生, 主要从事生物化学及分子生物学研究。E-mail: noddevil4949@163. com, Tel: (0532)85823062

Yang *et al.* 2001; Tsai *et al.* 2004; Li *et al.* 2007)。

在病毒蛋白中,囊膜蛋白是病毒感染宿主并导致其致病的重要因子。研究表明,WSSV 的某些囊膜蛋白中含有 RGD 细胞外基质蛋白中细胞整合素蛋白家族受体的识别位点,通过 WSSV 中和试验可以延缓 WSSV 的感染过程(Huang *et al.* 2002)。VP37 是 WSSV 重要的结构蛋白。近年来国内外学者已经研究了 VP37 的性质及其与其他囊膜蛋白的一些相互作用,而 VP37 在试验中也表现出可以延缓 WSSV 感染过程(Huang *et al.* 2002; Liu *et al.* 2009; Wu *et al.* 2005),其重要性越来越多地被国内外学者所关注。

大肠杆菌在合成蛋白的过程中对外源基因密码子拥有偏爱性。VP37 的一部分密码子是大肠杆菌稀有的密码子,因此大肠杆菌在进行外源性表达的过程中会出现表达量偏低的情况。对于表达量偏低所采取的策略通常是密码子的优化方法(刘庆慧等 2005),将其片段上的碱基改为大肠杆菌偏爱型密码子,以达到高效表达的目的。

为了研究 WSSV 的防治方法和开发新型生物制剂,本研究选用了 VP37 的一段氨基酸,按照大肠杆菌的密码子偏爱性人工合成 VP37 的寡核苷酸片段,在保证其氨基酸组成与原 VP37 片段的氨基酸组分完全相同的情况下构建其表达载体、诱导表达及分析,为 VP37 的功能研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

表达载体 pBAD/gIII A 为本实验室保存;大肠杆菌 Top10 感受态细胞购自 TIANGEN 公司;Pyrobest *Taq* DNA 聚合酶、*rTaq* DNA 聚合酶与标准核酸相对分子质量(DNA Marker DL2000、DL15000)以及全基因技术合成来自大连宝生物公司;限制性内切酶 *Xho*I、*Hind*III 购自 MBI 公司;T4 DNA Ligase 购于北京全式金公司;L-阿拉伯糖与蛋白 Marker 购于上海生工生物工程公司;质粒小提试剂盒购自 Omega 公司。

1.2 方法

1.2.1 偏爱型密码子的设计

将 VP37 含有 55 个氨基酸的部分序列(44aa~99aa)上传至 <http://gcua.schoedl.de/>,根据在线设计软件将其序列改为大肠杆菌偏爱型。在序列的两端加碱基以补全密码子读码框,再加上酶切位点 *Xho*I 和 *Hind*III。将设计好的序列送至大连宝生物公司进行全基因合成。修改后的偏爱型基因称为 VP37p'。

1.2.2 pBAD/gIII A-VP37p' 的重组

将克隆有基因合成序列的菌株划线培养至含有氨苄青霉素的 LB 平板(氨苄青霉素 50 μ g/ml),12h 后挑单克隆菌株至 1ml 新鲜的含 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C (200 r/min)培养过夜。将培养过夜的菌液扩大培养,取 5ml 菌液提取 pMD18-T-VP37p' 质粒(Omega 质粒小提试剂盒),用限制性内切酶 *Xho*I、*Hind*III 对 pMD18-T-VP37p' 质粒以及 pBAD/gIII A 质粒进行双酶切。

双酶切产物经琼脂糖凝胶回收纯化后,用 T₄ DNA 快速连接酶连接酶切的载体和片段,重组质粒转化 *E. coli* Top10 感受态细胞。从含有氨苄青霉素的平板中挑选单克隆,转移至 1ml LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C (200 r/min)培养过夜,进行菌落 PCR、双酶切及测序鉴定。

1.2.3 重组载体 pBAD/gIII A-VP37p' 的表达

将培养过夜的 1ml 培养基按 1:100 接种于 10ml 新鲜的 LB 培养基(含氨苄青霉素 50 μ g/ml)中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至对数生长期(OD₆₀₀=0.5~0.6),加 0.02% L-阿拉伯糖,诱导表达 5h。

1.2.4 表达产物的 SDS-PAGE 检验

将诱导后的产物用 10 000g 离心 1min 后,收集菌体,加入 1ml 裂解液对菌体进行重悬,超声破碎(200W,每次超声 1s,间隔 2s),3min 后,4 $^{\circ}$ C、10 000g 离心 5min,分别收集上清液和沉淀,SDS-PAGE 检测分析。

1.2.5 Western-Blot 免疫印迹法检测表达的蛋白

样品经 12% SDS-PAGE 后,用半干转移法将蛋白转移到 PVDF 膜上,用封闭液(1% BSA)4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,TBS-T 洗涤后再加入 1:10 000 稀释的 HRP-His 抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,洗膜后用 DAB 显色剂显示条带。

1.2.6 表达蛋白的含量分析

采用 Bradford 比色法(Bradford 1997),以牛血清白蛋白为蛋白质标准,对重组菌的包涵体全菌蛋白进行浓度测定,分别上样 1、2、10 μ g pBAD/gIII A-VP37p'重组菌全菌蛋白和未优化诱导的 pBAD/gIII A-VP37p 进行 SDS-PAGE,采用 Gel-pro Analyzer 软件计算目的蛋白相对含量。

2 结果

2.1 VP37p 序列分析

VP37p 序列的大肠杆菌偏爱型由在线网站分析。根据大肠杆菌偏爱密码子分析,在氨基酸不改变的情况下将序列修改为大肠杆菌偏爱型,优化序列与野生型序列对比如图 1 所示。

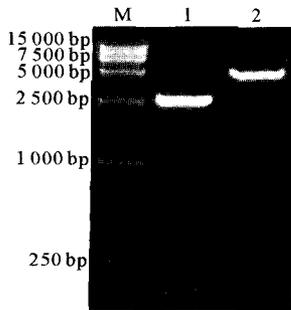
ATGAGACGTC AAGTTGAAGCTGCATTATATGAAGCAATATCCAAAAAGAAAGAAAAGG	Wild-type 野生型
ATGCGTCGTCAGGTTGAAGCAGCACTGTATGAAGCAATTTCAAAGAAGAAAGAGAAA	Optimized 优化后
<u>M R R Q V E A A L Y E A I S K K K E K</u>	Amino acid 氨基酸
CCATAAAGGCATTCGATGAGCTCATA CAAGAAAGAGGTGATGAAATTACACCTTTGACT	Wild-type 野生型
GCCATTAAGCATTGTGAACTGAITCAGGAACGTGGTGATGAAATTACCCCGCTGACC	Optimized 优化后
<u>A I K A F D E L I Q E R G D E I T P L T</u>	Amino acid 氨基酸
ACAATGCAGTATGAAGAGTGGGTAAACCGTACAATAACTCCCTCATTG	Wild-type 野生型
ACCATGCAGTATGAAGAATGGGTATTTCGTACCAITACCCCGTCACTG	Optimized 优化后
<u>T M Q Y E E W V N R T I T P S L</u>	Amino acid 氨基酸

图 1 VP37p 野生型及优化后序列对比

Fig. 1 Comparison of the original and the codon-optimized VP37p gene

2.2 重组载体 pBAD/gIII A-VP37p' 的构建与测序

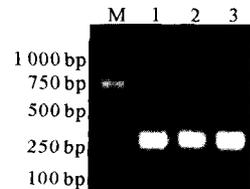
从菌液中提取 pMD18-T-VP37p' 质粒,并将其双酶切,经 1% 琼脂糖电泳检测后,发现在 2 500bp 上方,100bp 与 250bp 之间各有一条特异条带(图 2)。



M: DNA 分子量标准 DL15 000; 1. pMD18-T-VP37p' 酶切后; 2. pBAD/gIII A-VP37p' 酶切后 Lane M: DNA marker DL15 000; Lane 1: pMD18-T-VP37p' after digestion; Lane 2: pBAD/gIII A-VP37p' after digestion

图 2 pMD18-T-VP37p' 质粒及 pBAD/gIII A-VP37p' 质粒经 XhoI / HindIII 双酶切结果

Fig. 2 Digested pMD18-T-VP37p' and pBAD/gIII A-VP37p' with XhoI / HindIII



M: DNA 分子量标准 DL2000; 1~3: pBAD/gIII A-VP37p' 菌落 PCR 鉴定 Lane M: DNA marker DL2000; Lane 1~3: pBAD/gIII A-VP37p' colony PCR

图 3 pBAD/gIII A-VP37p' 菌落 PCR 鉴定结果 Fig. 3 Identification of pBAD/gIII A-VP37p' with colony PCR

挑转化后的阳性单克隆菌落于 1ml 新鲜的 LB 培养基中过夜,经菌落 PCR 鉴定。扩增出来的特异性基因片段大小为 270bp 左右(图 3), XhoI 与 HindIII 双酶切重组载体后,得到 4.1kb 的载体片段和 270bp 的目的

片段(图 2),可初步鉴定此克隆为阳性。将重组质粒送至大连宝生物公司进行测序,测序结果显示与实验设计完全一致,目的基因碱基序列按照预期方式定向插入表达载体,未发现碱基突变,且接口处序列正确,没有读码框架的改变。

2.3 VP37p' 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析

将诱导后的菌液进行超声破碎、离心后,分别取上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,以未诱导的菌液作对照。结果显示,在诱导菌的包涵体内有 1 条大小为 12kD 左右的特异条带,与目的蛋白 12kD 相符(图 4)。初步鉴定此特异性条带为目的条带。

2.4 目的蛋白的 Western-Blot 法检测

用 HRP-His 抗体与转印、封闭后的 PVDF 膜结合,DAB 显色后于 12kD 处有 1 条明显的条带(图 5),可确定为 VP37p' 的表达产物。

2.5 表达蛋白的含量分析

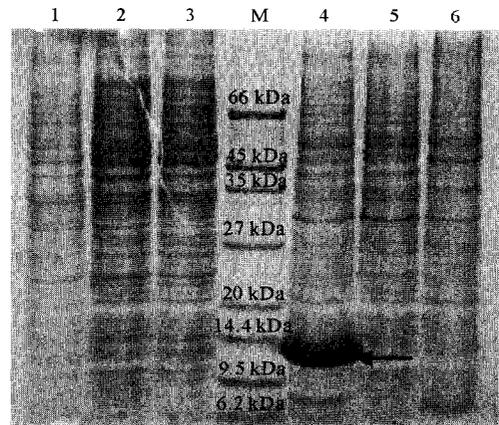
根据 Bradford 蛋白浓度测定法以及 SDS-PAGE 结合 Gel-Pro Analyzer 软件,得到 VP37p 与 VP37p' 目的蛋白占总蛋白的含量分别是 6.5%、40.5%(图 6)。

3 讨论

在 WSSV 病毒蛋白中,VP37 是定位于囊膜的一种重要的蛋白,拥有一个保守的 RGD 位点,由 R、G、D 3 个氨基酸组成(Huang *et al.* 2002; 许 华等 2008)。RGD 是一种细胞外基质蛋白中细胞整合素蛋白家族受体的识别位点,有吸附作用,近年来受到了很多研究者的关注,推测此位点在 WSSV 感染宿主的过程中起着重要的作用(Ruoslahti *et al.* 1986)。Wu 等(2005)和 Tsai 等(2006)进行了 WSSV 一系列外膜蛋白抗体的中和试验,发现大多数的外膜蛋白抗体都可以延缓 WSSV 的感染过程,其中包括 VP37;Liang 等(2005)研究发现 VP37 是与对虾细胞结合的重要蛋白;Liu 等(2006)表达并纯化了 VP37 蛋白,并研究了其与细胞结合的机理。近期研究表明,VP37 含 RGD 位点的 55 个氨基酸是与对虾细胞作用的功能区段(待发表),因此获得 VP37p' 的高表达产物,为深入开展其在 WSSV 感染中的作用提供必要基础。

诸多研究证明,密码子在基因表达的过程中有着重要的调控作用(Qian *et al.* 2006)。在大肠杆菌体内,所编码蛋白的密码子出现的频率不同,大肠杆菌对不同编码密码子的偏爱性也不同。利用密码子的优化可以促进目的蛋白的表达,可以高效地得到某一特定的蛋白(刘庆慧等 2005a; 张雅丽等 2004; 李春丽等 2005)。Han 等(2010)通过修改密码子研究了人体内一种甲酰胺在大肠杆菌中的表达,推测修改密码子以达到减少 GC 含量的目的,增加表达量。Wang 等(2010)认为,密码子的优化不仅仅可以促进基因表达,还有利于核酸的定点突变的修改。

VP37 (ORF1050) 共含有 843 个核苷酸,编码 281 个氨基酸(Huang *et al.* 2002; 刘庆慧等 2005b),其中 RGD 结合位点在 31~33 氨基酸处。在本研究中,只选用了前 55 个氨基酸,包含了 RGD 结合位点。在 VP37p 的 55 个氨基酸中,由 AGA 编码的精氨酸两个,ATA 编码的异亮氨酸 3 个,CTC、TTA、TTG 编码的亮

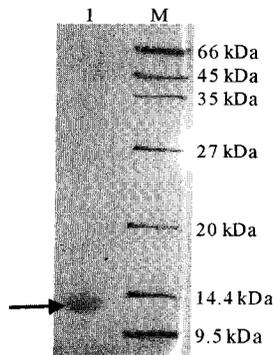


M: 蛋白质小分子量 Marker; 1. pBAD/gIII A 空质粒诱导上清; 2. pBAD/gIII A-VP37p' 未诱导上清; 3. pBAD/gIII A-VP37p' 诱导上清; 4. pBAD/gIII A-VP37p' 诱导包涵体(箭头指示目的蛋白); 5. pBAD/gIII A-VP37p' 未诱导包涵体; 6. pBAD/gIII A 空质粒诱导包涵体

Lane 1: Total soluble proteins of *E. coli* pBAD/gIII A after induction; Lane 2: Total soluble proteins of *E. coli* pBAD/gIII A-VP37p' before induction; Lane 3: Total soluble proteins of *E. coli* pBAD/gIII A-VP37p' after induction; Lane 4: Total inclusion body of *E. coli* pBAD/gIII A after induction (arrow shows VP37p protein); Lane 5: Total inclusion body of *E. coli* pBAD/gIII A-VP37p' before induction; Lane 6: Total inclusion body of *E. coli* pBAD/gIII A-VP37p' after induction

图 4 VP37p' 基因表达产物的 SDS-PAGE 结果

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of pBAD/gIII A-VP37p' expressed in *E. coli*



M: 蛋白质小分子量 Marker;

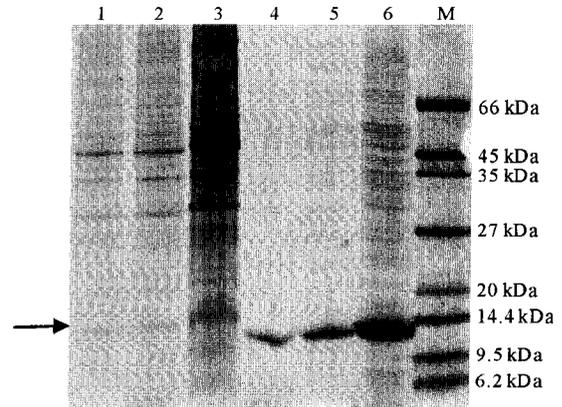
1: VP37p'诱导沉淀转印显色结果

Lane 1: pBAD/gIII A-VP37p' protein;

Lane M: Protein molecular weight marker

图 5 VP37p'表达产物的 Western Blotting 结果

Fig. 5 Western Blotting analysis of pBAD/gIII A-VP37p' inclusion body



1~3: VP37p'包涵体诱导,上样量分别为 1、2、10 μ g(箭头示目的蛋白);4~6: VP37p'包涵体诱导,上样量分别为 1、2、10 μ g(箭头示目的蛋白);M: 蛋白质小分子量 Marker

Lane 1~3: Inclusion body of VP37p' applied with 1, 2, 10 μ g of protein (arrow indicates target protein); Lane 4~6: Inclusion body of VP37p' applied with 1, 2, 10 μ g of protein (arrow indicates target protein); Lane M: Protein molecular weight marker

图 6 SDS-PAGE 分析重组 VP37p'相对含量分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the relative content of recombinant VP37p'

氨酸共 4 个,AAG 编码的赖氨酸 3 个,CCC 编码的脯氨酸 1 个(图 1),这些密码子在大肠杆菌中都是难以表达的密码子,因此将其基因导入大肠杆菌中后表达量较小。人工合成的 VP37 编码基因将密码子改为大肠杆菌偏爱型密码子,经对比鉴定后,显示优化后的 VP37p'明显增加了目的蛋白的表达量,经过 Western-Blotting 鉴定确定其为目的蛋白,实现了 VP37p 的高效表达。

参 考 文 献

- 刘庆慧,黄 捷,韩文君. 2005a. WSSV 3 个编码蛋白的基因密码子偏爱性分析. 海洋水产研究, 26(4): 1~7
- 刘庆慧,黄 捷,韩文君,王清印. 2005b. WSSV-VAP1 基因克隆与序列分析. 中国水产科学, 12(3): 352~356
- 许 华,黄 捷,杨官品. 2008. 对虾白斑综合征病毒蛋白质组的研究进展. 海洋水产研究, 29(2): 118~124
- 张雅丽,杨国庆,郭 英,陈永福. 2002. 密码子优化的牛精蛋白基因在大肠杆菌中的表达. 高技术通讯, 4: 42~46
- 李春丽,阮 晖,陈正华,陈其新,何国庆. 2005. 重组人 β 防御素 3 在大肠杆菌中的表达和活性分析. 中国生物化学与分子生物学报, 21(5): 705~708
- Bradford, M. M. 1997. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal. Biochem. 72: 248~254
- Huang, C., Zhang, X., Lin, Q., Xu, X., Hu, Z., and Choy, L. H. 2002. Characterization of a novel envelope protein VP281 of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry. J. Gen. Virol. 83: 2 385~2 392
- Li, Z., Lin, Q., Chen, J., Wu, J. L., Lim, T. K., Loh, S. S., Tang X., and Hew, C. L. 2007. Shotgun identification of the structural proteome of shrimp white spot syndrome virus and iTRAQ differentiation of envelope and nucleocapsid subproteomes. Mol. Cell Proteomics, 6: 1 609~1 620
- Liang, Y., Huang, J., Song, X. L., Zhang, P. J., and Xu, H. X. 2005. Four viral protein of white spot syndrome virus (WSSV) that attach to shrimp cell membranes. Dis. Aquat. Org. 66: 81~85
- Liu, Q. H., Huang, J., Han, W. J., Liang, Y., Lu, C. L., and Wang, Q. Y. 2006. Expression, purification and characterization of WSSV-VP37 in *Pichia pastoris*. Aquaculture, 258: 55~62
- Liu, Q. H., Zhang, X. L., Ma, C. Y., Liang, Y., and Huang, J. 2009. VP37 of white spot syndrome virus interact with shrimp cells. Letters in Applied Microbiology, 48: 44~50
- Lo, C. F., Ho, C. H., Peng, S. E., Chen, C. H., Hsu, H. E., Chiu, Y. L., Chang, C. F., Liu, K. F., Su, M. S., Wang, C. H., and Kou,

