

深海嗜热噬菌体 GVE2 头尾连接蛋白 EV8 的原核表达和功能分析

周治东¹, 金春英², 吕华¹, 王蔚^{1*}

(1. 国家海洋局第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室, 中国福建 厦门 361005;

2. 华侨大学化工学院, 中国福建 厦门 361021)

摘要: 为了解头尾连接蛋白在噬菌体感染和装配中起的作用, 对高温嗜菌体 GVE2 (virulent bacteriophage of *Geobacillus* sp. E263) 的头尾连接蛋白 EV8 进行了原核表达和功能鉴定. 将 EV8 编码序列克隆入 pGEX4T-2 原核表达载体, 并转染大肠埃希氏菌 BL21. 诱导表达后用 SDS-PAGE 进行鉴定, 显示获得相对分子质量约 36 kD 的谷胱甘肽硫转移酶(GST-EV8)融合蛋白. Western blot 检测发现 EV8 在 GVE2 感染后 2 h 开始表达, 说明该蛋白为噬菌体晚期表达蛋白. 免疫电镜定位表明头尾连接蛋白位于噬菌体头尾的连接处, 为进一步研究高温嗜菌体的组装和表达调控奠定了基础.

关键词: 高温嗜菌体; 头尾连接蛋白; EV8

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2011)02-0115-04

Prokaryotic Expression and Functional Characterization of Head-tail Joining Protein EV8 from Thermophilic Bacteriophage GVE2

ZHOU Zhi-dong¹, JIN Chun-ying², LÜ Hua¹, WANG Wei^{1*}

(1. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration (SOA), Xiamen 361005, Fujian, China; 2. Institute of Chemical Technology, Hua Qiao University, Xiamen 361021, Fujian, China)

Abstract: To investigate the role of head-tail joining protein in viral infection and DNA packaging, the head-tail joining protein EV8 from the deep-sea thermophilic bacteriophage GVE2 was characterized. EV8 encoding gene was cloned into prokaryotic expression vector pGEX4T-2 and transformed into *E. coli* BL21 for expression. The purified proteins characterized by SDS-PAGE and the 36 kD GST-EV8 protein was obtained. The Western blot results demonstrated that the EV8 gene was expressed in the 2 hours of GVE2 infection, implying that it might be a viral late gene. As revealed by immuno-electron microscopy, the gold particles were observed in the junction between the phage head and the phage tail. The result may help to reveal the mechanism of assembly and transcriptional regulation of thermophilic bacteriophage.

Key words: thermophilic bacteriophage; head-tail joining protein; envelope protein 8(EV8)

(*Life Science Research*, 2011, 15(2): 115~118)

海洋存在丰富的微生物资源, 尤其是嗜热微生物已成为国际上的研究热点. 现代理论和环境证据证明嗜热菌是地球上形成的第一类生命形式, 同时嗜热微生物的高温酶在工业和分子生物

学等方面有重要的用途^[1-4].

近年来, 感染嗜热微生物的高温病毒(高温嗜菌体)引起越来越多的科研工作者的关注. 因为, 高温嗜菌体可以作为一种模式系统来研究海

收稿日期: 2010-12-27; 修回日期: 2011-03-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30800857); 福建省自然科学基金计划项目(2010J05074); 国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室开放研究基金项目(HY201102); 中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室开放基金项目(LMB101005)

作者简介: 周治东(1985-), 男, 辽宁新民人, 硕士研究生, 主要从事噬菌体功能蛋白的研究; *通讯作者: 王蔚(1978-), 女, 江苏苏州人, 海洋三所副研究员, 博士, 主要从事海洋分子生物学研究, Tel: 0592-2195518, E-mail: wangw.sz@gmail.com.

洋微生物的生物化学及分子生物学特性,而且它们还影响生物地球化学和生态系统进化过程,包括营养循环、生物分类、生物种群结构、遗传转换、生物进化等^[5-9]。高温嗜菌体的研究不仅可以丰富和发展对生命形式的认识,而且在构建嗜热菌表达系统的人工载体和研究、开发热稳定的工业用高温酶以及分子生物学工具酶等,都有着广泛的应用前景^[10, 11]。

1926年 Kose 首次从嗜热细菌 *Bacillus* 属中分离到高温噬菌体,近年来有一些科学家先后从 *Bacillus*、*Thermus*、*Acidianus*、*Sulfolobus* 等高温细菌和古菌中分离到高温噬菌体,但这些分离到的高温嗜菌体均来自陆地温泉^[12-14]。本实验室在研究中于东太平洋热液区站点 EPR0302 (12° 42'29"N, 104° 02'01"W) 3 033 m 深海水样嗜热菌 *Geobacillus* sp.E263 中首次分离到高温噬菌体 GVE2。我们已对该噬菌体进行了全基因组测序,发现 GVE2 的核酸为单分子线状双链 DNA,基因组大小为 40.8 kb,预测编码 62 个开放阅读框 (Genbank 登录号 NC_009552)^[15]。对开放阅读框分析发现了一个编码 109 个氨基酸的 EV8 基因与已知的噬菌体头尾连接蛋白编码基因具有高度的保守性。

为研究高温噬菌体 GVE2 的 EV8 基因编码蛋白的功能,我们对该基因进行了克隆表达和抗体制备,用 Western blot 的方法分析了该蛋白在 GVE2 感染过程中的表达,并通过免疫电镜对蛋白进行了定位。我们的结果为进一步研究高温噬菌体的组装和表达调控奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 试剂及菌株

限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、蛋白酶 K、*T*₄ DNA 连接酶及 Marker DL2000 购自 TaRaKa 公司;聚醚二砜膜(PVDF)购自美国 Millipore 公司;谷胱甘肽 Sepharose 4B 亲和层析柱胶及空柱购自通用医疗技术公司;小鼠抗谷胱甘肽硫转移酶(GST)单克隆抗体、3, 3'-二氨基联苯胺(DAB)、羊抗小鼠辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗均购自北京天根生化科技有限公司;胶体金购自 Sigma 公司;pGEX-4T-2、大肠埃希氏菌 BL21(DE3)为本室保存。

1.2 噬菌体 DNA 的提取

将 100 mL 噬菌体富集液培养至噬菌体效价

为 $10^8 \sim 10^9$ PFU /mL, 6 000 g 离心 15 min, 去除培养液中的菌体及细胞碎片,收集上清再以 10 000 g 离心 15 min, 弃沉淀,上清中加入 DNAase 和 RNAase (终浓度为 10 mL/L), 37 °C 消化 30 min 后 75 °C 温浴 10 min, 再加入蛋白酶 K (终浓度 50 mg/L), 10% 十二烷基肌氨酸 (终浓度为 0.5%) 和 10% SDS (终浓度 0.5%), 56 °C 温浴 1 h。用酚 / 氯仿法抽提噬菌体 DNA。

1.3 EV8 的分子克隆

根据 EV8 蛋白的编码序列设计一对引物:上游引物 PF: 5' -GCGGATCCATGAATCCTGGA-CAATTCCG-3' ; 下游引物 PR: 5' -CGACTC-GAGTTAGCCATCCGCCGCCACCC-3'。引物中分别加上了 *Bam*H I 和 *Xho* I 限制性酶切位点。PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

以噬菌体基因组 DNA 为模板扩增 EV8 基因,反应条件是:95 °C 预变性 5 min, 而后 95 °C 变性 40 s, 58 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 3 min, 循环 35 次,最后 72 °C 延伸 7 min。琼脂糖凝胶电泳检测并利用紫外分光光度计检测其纯度和含量。

1.4 EV8 融合载体的构建

*Bam*H I 及 *Xho* I 对 PCR 产物和载体 pGEX-4T-2 分别进行双酶切,经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离回收,将这两种 DNA 片断用 *T*₄ DNA 连接酶在 16 °C 连接过夜,连接反应液转化感受态 *E. coli* BL21。通过氨苄青霉素平板抗性筛选,克隆进行质粒提纯,双酶切电泳及 DNA 测序鉴定得到正确的 pGEX4T-2-EV8 融合表达载体。

1.5 pGEX4T-2-EV8 融合载体的诱导表达

取 50 μ L 培养过夜的阳性克隆菌液,加入含有氨苄的 5 mL LB 培养基中,于 37 °C 在转速为 220 r/min 摇床培养 3 h 左右,当菌浓度 A_{550} 为 0.5 ~ 1.0 之间时,加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 诱导表达 5 h,离心收集菌体,进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。按照上述方法对阳性克隆进行大量诱导表达,离心收集菌体,参照 Sepharose 4B 说明书进行蛋白纯化。

1.6 抗血清制备

用纯化的 pGEX4T-2-EV8 蛋白免疫 SD 大鼠,初次免疫用弗氏完全佐剂,抗原量约为每只 200 μ g,于腹线两侧皮下多点注射。3 周后,加强免疫,抗原量同首次,加弗氏不完全佐剂,以后每隔 2 周加强免疫 1 次,共免疫 4 次。最后 1 次免疫后 7 d,由颈动脉取血,分离血清冻存于 -20 °C 中^[16]。

1.7 蛋白印迹(Western Blot) 检测重组蛋白

将聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白转印至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶液 4℃ 孵育 12 h, 抗鼠 GST 抗体为一抗(稀释比 1:1000) 室温孵育 1 h, TTBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 然后用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (稀释比 1:500) 室温孵育 1 h, TTBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色至出现目的条带, 超纯水终止反应。

1.8 免疫电镜定位

取效价为 $10^8 \sim 10^9$ PFU/mL 的噬菌体液 20 μ L 滴在覆有福尔马膜和碳支持膜的铜网上, 吸附 30 min 后用滤纸吸干菌液, 待自然干燥后以 2% BSA 于 4℃ 封阻 1 h; 用 PBS 稀释 40 倍的抗血清室温下反应 1 h 后, 用 PBS 溶液洗涤 3 次, 用 80 倍稀释的羊抗鼠 IgG 胶体金(金颗粒直径 10 nm, Sigma 产品)的 PBS 溶液标记 1 h, 以 PBS 充分洗涤后用 3% 的醋酸铀染色后在透射电子显微镜 (JEOL 100 CXII, Japan) 下观察。

2 结果

2.1 EV8 序列分析

利用 BLAST X 程序在 NCBI 数据库中比对发现, EV8 与芽胞杆菌噬菌体 11143 的头尾连接蛋白的氨基酸序列一致性为 48%。分析 EV8 的结构域发现 Phage_H_T_join 结构域为噬菌体头尾连接蛋白常见结构。因此 GVE2 噬菌体的 EV8 被预测为头尾连接蛋白。

2.2 EV8 基因的 PCR 扩增

对 EV8 基因进行 PCR 扩增, 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 研究发现在 320 bp 左右出现特异性扩增条带 (图 1), 与预期大小相符, 初步表明用 PCR 方法成功扩增了 EV8 基因。

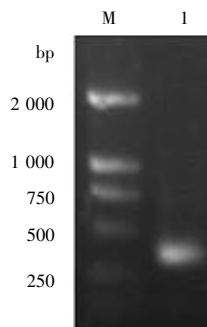


图 1 EV8 基因的 PCR 扩增产物电泳结果

M: Marker DL2000; 1: EV8 基因扩增产物。

Fig.1 Agarose gel electrophoresis analysis of the PCR product of EV8

M: Marker DL2000; 1: PCR products of EV8.

2.3 融合载体的构建与序列测定

将 PCR 扩增产物插入到质粒 pGEX-4T-2 构建 pGEX-4T-2-EV8 重组质粒。构建的重组质粒双酶切后在 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 在 320 bp 有一清晰的条带(见图 2 箭头所指条带), 与目的基因的大小基本相符, 表明重组质粒构建成功。

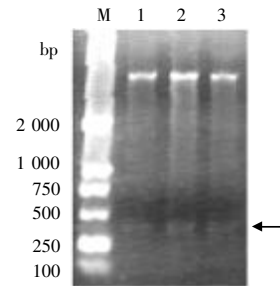


图 2 重组质粒的双酶切鉴定

M: Marker DL2000; 1~3: BamHI/XhoI 双酶切 pGEX-4T-2-EV8 质粒。

Fig.2 Double digestion of recombinant plasmid

M: Marker DL2000; 1~3: BamHI/XhoI digestion of plasmid pGEX-4T-2-EV8.

2.4 GST-EV8 蛋白的纯化

将蛋白进行纯化后用 12% SDS-PAGE 电泳检测, 发现大约在 36 kD 左右处出现表达条带 (图 3), 与目的蛋白大小相符, 证明目的蛋白表达和纯化成功。

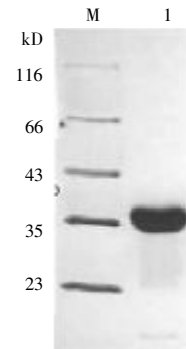


图 3 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

M: 蛋白 Marker; 1: 纯化的 GST-EV8 蛋白。

Fig.3 SDS-PAGE of purified protein

M: protein marker; 1: purified GST-EV8 protein.

2.5 EV8 基因在噬菌体中的表达分析

用噬菌体 GVE2 感染宿主菌, 分别在感染后 0.5、1、2、4、6、8 h 取宿主菌进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, Western blot 印迹杂交分析。结果显示, GST-EV8 的抗体与感染 GVE2 噬菌体 2、4、6、8 h 后宿主菌的一个蛋白产生反应, 显示出一条特殊的杂交带 (图 4), 说明该条带为 EV8 基因编

码蛋白.

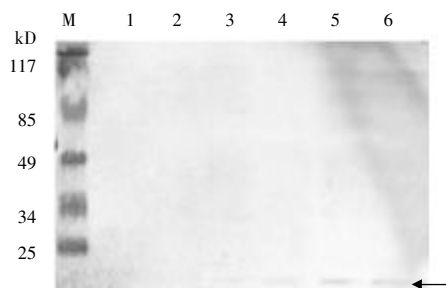


图 4 EV8 蛋白表达时期的 Western blot 印迹杂交分析

M: 蛋白 Marker; 1~6: 感染后 0.5、1、2、4、6、8 h 的宿主菌用 EV8 特异性抗体进行 Western blot 印迹分析.

Fig. 4 Western blot of GVE2-infected *Geobacillus* sp. E263

M: protein marker; 1~6: GVE2-infected *Geobacillus* sp. E263 at 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 h p.i. (hour post-infection)

2.6 EV8 蛋白的定位分析

免疫电镜结果显示, 噬菌体与 EV8 抗体金颗粒标记的样品中可以观察到抗原-抗体免疫复合物, 复合物分布在噬菌体头尾连接处 (图 5), 说明 EV8 蛋白是噬菌体 GVE2 的一个头尾连接蛋白.

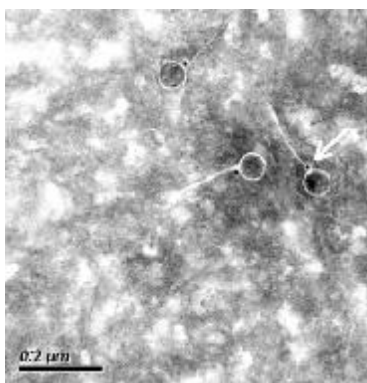


图 5 EV8 蛋白的定位分析

箭头所指为标记的金颗粒.

Fig.5 Localization of EV8 protein by immunoelectron microscopy

The arrow indicated gold particles.

3 讨论

近年来, 对高温病毒在自然生态系统中所起作用的研究成为大家关注热点的同时, 高温病毒还用于地球生物化学、分子生物学及地球生命起源等问题的研究^[17, 18]. 根据宿主范围来分, 高温病毒可分为高温古菌病毒 (archaeal viruses) 和高温细菌病毒 (bacterial viruses), 高温细菌病毒又称

为高温噬菌体 (thermophilic bacteriophages). 与高温古菌病毒相比, 高温噬菌体的研究还很少^[19].

本研究对高温噬菌体 GVE2 的头尾连接蛋白 EV8 进行了原核表达和功能鉴定. 原核表达采用高效的 GST 融合表达载体 pGEX4T-2, 该载体表达产品可通过亲和层析法纯化, 操作简单, 用凝血酶即可进行酶切除去 GST, 进而获得所需要的蛋白产品. SDS-PAGE 检测发现纯化所得蛋白相对分子质量为 36 kD. 用 Western Blot 分析时相表达, 发现在噬菌体感染 2 h 就能够检测到清晰的杂交带, 随着时间的推移条带逐渐加深, 说明该蛋白确实在噬菌体感染晚期出现, 免疫电镜定位发现, EV8 抗体特异地标记在噬菌体头部和尾部相连的颈部, 符合 EV8 作为结构蛋白发挥的头尾连接功能. 下一步工作准备大量表达重组蛋白, 而后纯化、酶切除去载体蛋白, 获得目的蛋白, 并进一步研究该蛋白在噬菌体侵染和装配过程中的作用.

参考文献 (References):

- [1] CORLISS J B, DYMOND J, GORDON L I, *et al.* Submarine thermal springs on the galapagos rift[J]. *Science*, 1979, 203 (4385): 1073-1083.
- [2] LOPEZ-GARCIA P, DUPERRON S, PHILIPPOT P, *et al.* Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilonproteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge [J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(10): 961-976.
- [3] POSTEC A, URIOS L, LESONGEUR F, *et al.* Continuous enrichment culture and molecular monitoring to investigate the microbial diversity of thermophiles inhabiting deep-sea hydrothermal ecosystems [J]. *Current Microbiology*, 2005, 50 (3): 138-144. [4] NERCESSIAN O, FOUQUET Y, PIERRE C, *et al.* Diversity of bacteria and archaea associated with a carbonate-rich metalliferous sediment sample from the rainbow vent field on the Mid-Atlantic Ridge[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7 (5): 698-714.
- [5] SAKAKI Y, OSHIMA T. Isolation and characterization of a bacteriophage infectious to an extreme thermophile, *thermus thermophilus* HB8[J]. *The Journal of Virology*, 1974, 15(6): 1449-1453.
- [6] ZILLIG W, PRANGISHVILI D, SCHLEPER C, *et al.* Viruses, plasmids and other genetic elements of thermophilic and hyperthermophilic Archaea[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1996, 18(3): 225-236.
- [7] PRANGISHVILI D, STEDMAN K M, ZILLIG W. Viruses of the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus* [J]. *Trends in Microbiology*, 2001, 9(1): 39-42.
- [8] BETTSTETTER M, PENG X, GARRETT R A, *et al.* AFV1, a novel virus infecting hyperthermophilic archaea of the genus *Acidianus*[J]. *Virology*, 2003, 315(1): 68-79.

(下转 135 页)