文章编号:1000-5404(2006)22-2205-04

论著

铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 末端酶大亚单位 DNA 结合能力的测定

申晓冬[1],张克斌[2],李 明[1],周莹冰[1],蹇 锐[1],胡晓梅[1],陈志瑾[1],饶贤才[1],胡福泉[1] (第三军医大学:[1]基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038,[2]新桥医院医学实验技术中心,重庆 400037)

提 要:目的 检测铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 末端酶大亚单位与噬菌体基因组末端 cos 位点的结合能力。**方法** 通过 PCR 扩增出末端酶大亚单位编码基因 *tls*,经 pMD-T18 载体克隆至表达载体 pQE31 上,IPTG 诱导表达,获得包涵体蛋白,用包涵体裂解液溶解包涵体,通过 Ni-NTA 亲和层析,分离出重组目的蛋白 rTLS,透析复性后,与生物素标记的基因组末端 cos 片段进行结合反应,通过 EMSA 检测 DNA 滞后现象。**结果** 成功构建了表达载体 pQE-*tls*,获得了纯化的具有生物学活性的重组末端酶大亚单位 rTLS,EMSA 结果证实结合 rTLS 后的 cos 片段与无蛋白加入的对照组相比明显滞后。**结论** 重组噬菌体 PaP3 末端酶大亚单位在体外可与基因组末端 cos 片段发生特异性结合,为进一步研究该蛋白的功能奠定了基础。

关键词:末端酶大亚单位;噬菌体 PaP3;EMSA;蛋白表达
中图法分类号:Q55;Q782;Q936 **文献标识码**:A

Determination of binding ability of PaP3's terminase large subunit to cos site

SHEN Xiao-dong[1], ZHANG Ke-bin[2], LI Ming[1], ZHOU Ying-bing[1], JIAN Rui[1], HU Xiao-mei[1], CHEN Zhi-jin[1], RAO Xian-cai[1], HU Fu-quan[1] ([1]Department of Microbiology, College of Medicine, Chongqing 400038, [2]Center of Medical Experiments and Technique, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the binding ability of the terminase large subunit of Pseudomonas aeruginosa bacteriophage PaP3 to the cos site. **Methods** The gene *tls* was amplified from the genome of bacteriophage PaP3 by PCR and subcloned into pMD18-T vector. Then the gene *tls* cut down from the vector was inserted into the plasmid pQE31 which could give a 6-His tag at the N-terminal of the expressed protein. The recombinant vector pQE-*tls* was transformed to *E. coli*. JM109, after induction with IPTG, the expressed bacteria were resuspended and sonicated, then after centrifugation, the inclusion body was obtained. The inclusion body was dissolved with lysis buffer, then the tagged protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography and renatured by dialysis. Finally the DNA-binding ability of the fusion protein rTLS was determined by EMSA. **Results** The expression plasmid pQE31-tls was successfully constructed, and the target protein yield was up to 30% of the total bacterial proteins. After purification and renaturation, the fusion protein rTLS can partially bind the cos fragment. **Conclusion** The fusion protein rTLS was successfully expressed, purified and renatured. The rTLS has the specific DNA-binding activity. The present work lays the foundation for the further research of the gene *tls*.

Key words: terminase large subunit; bacteriophage PaP3; EMSA; protein expression

末端酶(terminase)为双链 DNA 病毒包装过程中比较保守的一个蛋白酶,通常由大小 2 个亚单位组成,其生物学功能是参与病毒基因组 DNA 的剪切以及包装。以末端酶介导的 dsDNA 病毒,通过滚环复制形成多拷贝基因组串联体(concatermeric DNA)。病毒包装开始时,末端酶首先识别基因组串联体上的包装信号切出 1 个末端(termini)并与之结合,然后在 ATP 供能下末端酶将基因组串联体拖至空的前衣壳(precapsid)处并铆钉在前衣壳的门蛋白,然后同样在 ATP 供能下将基因组转移入前衣壳中,当一定量的基因组完

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470082)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470082)

作者简介:申晓冬(1977-),女,重庆市铜梁县人,博士研究生,主要从事噬菌体基因组方面的研究。电话:(023)68752239,E-mail:shenxiaodong77@yahoo.com.cn
通讯作者:胡福泉,电话:(023)68752240,E-mail:hoofuquan@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-04-10;**修回日期**:2006-07-03

整进入衣壳后，末端酶识别下一个包装信号，特异性的切断并携带后面的基因组串联体离开核衣壳，去寻找下一个空衣壳，重复上述过程[1]。其中，大亚单位行使全酶的主要功能：识别结合前衣壳蛋白；识别剪切基因组多串联拷贝体中特异性包装位点；水解 ATP 为包装提供能量。而小亚单位除了与特异性包装位点结合以启动包装外，主要辅助大亚单位完成其生物学功能[2]。

铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 为我室分离鉴定的 1 株噬菌体，其全基因组测序和初步注释已经完成，并在 GenBank 上登录（登录号为 NC_004466）。该基因组全长 45 503 bp，为一线性双链 DNA 分子。在所有 71 个推定基因中，orf3 编码产物被推定为末端酶大亚单位（terminase large subunit，TLS），与之有较高同源性的几种蛋白均为末端酶大亚单位，分值最高的为紫花苜蓿根部固氮菌（sinohizobium melilot）的推定末端酶大亚单位 GP2，分值 344，E 值 2e-93；随后是 P22 和其他噬菌体的末端酶大亚单位和包装蛋白[3]。本室已初步验证 orf3 编码蛋白具有核酸内切酶的活性[4]，但其是否具有结合包装位点的能力还未知。基于以上认识，本研究拟通过克隆表达 PaP3 末端酶大亚单位 *tls*，检测其表达产物对含包装信号的 DNA 片段的结合能力，为深入研究该基因的功能以及认识噬菌体 PaP3 的包装机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 及其宿主菌 PA6 为本实验室自行分离鉴定；大肠杆菌 JM109 为本室保存；T 载体 pMD-18 T 购于 TaKaRa 公司；表达载体 pQE31 为 T5 启动子，含氨苄青霉素抗性，N 端带有 6 个组氨酸标签，购于 Qiagen 公司。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Hind*Ⅲ、*Bam*HⅠ，T_4 DNA 连接酶购自上海生工；蛋白酶 K、RNA 酶 A，DNA 酶Ⅰ购自华美生物公司；IPTG、X-gal 购自 Promega 公司；Tris 饱和酚购自上海生工；Ni-NTA agarose 购自 Qiagen 公司；质粒小量抽提试剂盒及 DNA 胶回收试剂盒购自上海华舜；化学发光核酸检测试剂盒购自 Pierce 公司。

1.2 方法

1.2.1 pQE-*tls* 重组质粒的构建 依据同源检索推定的 *tls* 编码基因（ORF2867-4315）设计引物扩增 *tls* 全长基因，上游引物：5′-GGATCCAGATACCCAAGAGCGGTT-3′（下划线处为引入的 *Bam*HⅠ酶切位点）；下游引物：5′-AAGCTTTAGACAATACTCCCAAAC-3′（下划线为引入的 *Hind*Ⅲ酶切位点）。利用该引物，以噬菌体 PaP3 基因组为模板，进行 PCR 扩增，电泳检测并纯化 PCR 产物，与 pMD18-T 载体连接后转化至大肠杆菌 JM109，鉴定并提取阳性重组质粒，再经 *Bam*HⅠ、*Hind*Ⅲ双酶切，将目的片段纯化后以适当比例与同样双酶切处理的 pQE31 载体连接，转化至大肠杆菌 JM109，构建含 *tls* 基因的原核表达载体 pQE-*tls*，该表达载体在目的基因上游具有 6 个组氨酸标签。经酶切鉴定后，将含阳性重组质粒的细菌送交上海申友生物技术有限公司测序鉴定。

1.2.2 pQE-*tls* 重组质粒在大肠杆菌 JM109 中的诱导表达 将测序鉴定的大肠杆菌工程菌株 pQE-*tls*/JM109 37 ℃过夜振荡培养，次日取过夜菌以 1∶50 的比例加入到 100 ml 新鲜的含氨苄青霉素抗性 LB 培养液中，37 ℃振荡培养至光密度值 $D(600)$ 达 0.5～0.6，加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L，继续培养 5 h 后，5 000×*g* 离心 10 min 收集菌体。

1.2.3 目的蛋白的纯化 用缓冲液 A 吹打洗涤收集的菌体，离心菌体重悬于适量缓冲液 A 中。超声裂菌结束后再次离心，所得沉淀即为包涵体。用裂解缓冲液（8 mol/L 尿素，100 mmol/L NaH_2PO_4，10 mmol/L Tris，pH 8.0）溶解包涵体，然后将该溶液行 Ni-NTA 亲和层析：将含 Ni-NTA 填料的亲和层析柱用裂解缓冲液平衡后，加入包涵体溶解液，然后用洗涤缓冲液（配方同上，pH 6.3）洗涤，收集穿过峰；接着用洗脱缓冲液（配方同上，pH 4.5）洗脱目标蛋白，收集洗脱峰，将各峰产物行 SDS-PAGE 电泳，以鉴定融合蛋白所在位置。

1.2.4 目的蛋白的透析复性 将亲和层析所获得的目的蛋白用裂解缓冲液稀释至浓度为 0.2 mg/ml，将该蛋白溶液放入预处理好的截留分子量为 7×10^3 的透析袋，分别用透析缓冲液Ⅰ（2 mol/L 尿素，30 mmol/L Tris，10 mmol/L 还原型谷胱甘肽，1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽，pH 8.0）、透析缓冲液Ⅱ（0.5 mol/L 尿素，其余同前），在 4 ℃条件下旋涡搅拌器搅拌，各透析 8 h，最后于双蒸水中透析过夜，即可得到复性的 rTLS 蛋白。

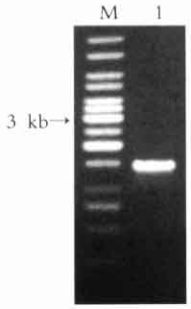
1.2.5 基因组末端特异性片段的合成及其 5′端生物素标记 依据本室前期研究结果，将 PaP3 基因组末端序列 5′-GCCGGCCCCTTTCCGCGTTA-3′及互补序列送至 TaKaRa 公司合成，同时对其 5′端进行生物素标记。然后，将标记好的寡核苷酸序列退火形成带 cos 位点的 dsDNA 片段（后称 cos 片段），并将其稀释成 50 pmol/μl 浓度备用。

1.2.6 凝胶迁移率改变实验（electrophoretic mobility shift assay，EMSA） 检测目的蛋白对 cos 片段的结合能力 DNA 结合反应体系为：5 μl 浓度为 20 μg/μl 的 rTLS 蛋白，10 pmol 的 cos 片段，2 μl 10×结合缓冲液，以及终浓度为 50 ng/μl Poly（dI·dC），50 mmol/L KCl，10 mmol/L $CaCl_2$，2.5% 甘油，最后补充 ddH_2O 至反应体系 20 μl，同时，分别以不加入 rTLS 蛋白，及加入非特异性蛋白 BSA 作为反应的对照组。37 ℃反应 30 min 后，加入 5 μl 含有 0.5 mol/L EDTA 的 5×loading buffer 结束反应。并上样至预先准备好的 5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，以 400 mA 电泳至溴酚蓝染料达到胶下端的 1/3 时，结束电泳。揭胶并转印至带正电的尼龙膜上，按照 Pierce 公司化学发光核酸检测试剂盒步骤，使膜上条带发光，并曝光至胶片上，以观察结果。

2　结果

2.1　PCR 扩增 *tls* 基因

PCR 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后,在 1.5 kb 处有 1 条特异的扩增条带,与 BLAST 确定的 *tls* 基因大小(1 449 bp)一致(图 1)。

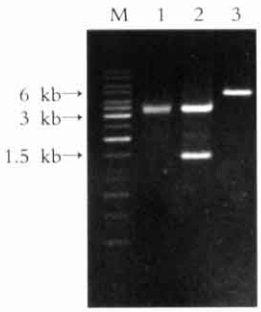


M:DNA 分子量标准; 1: *tls* 基因扩增产物

图 1　*tls* 基因的 PCR 扩增结果

2.2　重组质粒 pQE-*tls* 的鉴定

融合表达质粒 pQE31-*tls* 为 T5 启动子控制下的 *tls* 基因和其 5 端 6 个组氨酸序列的融合,可产生的 N 端代有 6 个组氨酸标签的融合蛋白 rTLS。用限制性内切酶 *Hind* Ⅲ和 *Bam*H Ⅰ对重组质粒 pQE31-*tls* 进行双酶切鉴定,可切出 1 条约 1.5 kb 的条带,与预期结果一致(图 2 泳道 2)。测序结果也证实插入片段与 *tls* 基因序列完全一致。



M: DNA 分子量标准; 1:重组质粒 pQE-*tls*; 2: pQE-*tls* 经 Hind Ⅲ/*Bam*H Ⅰ双酶切; 3: pQE-*tls* 经 *Bam*H Ⅰ酶切

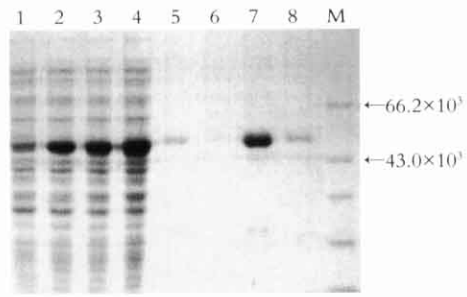
图 2　重组质粒 pQE-*tls* 的酶切鉴定

2.3　pQE-*tls* 重组质粒在大肠杆菌 JM109 中的诱导表达和目的蛋白的纯化

工程菌 pQE-*tls*/JM109 在 0.5 mol/L IPTG 诱导下 5 h 在约 56×10^3 处可见目的蛋白表达。收集裂解细菌后,离心获得包涵体并将其溶解,包涵体溶液经 Ni-NTA 亲合层析,目标蛋白主要在洗脱峰中,SDS-PAGE 电泳结果显示蛋白纯度达 90% 以上(图 3 泳道 7)。

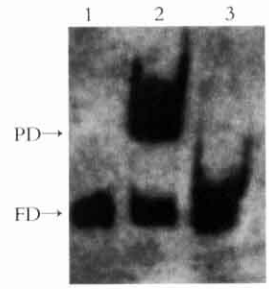
2.4　目的蛋白的 DNA 结合能力

通过透析复性,获得了具有生物学活性的重组蛋白 rTLS。将该蛋白进行 EMSA 实验后显示(图 4),在含有 10 mmol/L $CaCl_2$ 的缓冲液中,rTLS 蛋白可以与 cos 片段结合,与未加入 rTLS 蛋白的对照相比,结合 rTLS 蛋白后的 cos 片段明显滞后(泳道 2 之 PD,protein-DNA complex),虽然其结合并不完全,但 rTLS · DNA 复合物在 5% 的非变性 PAGE 凝胶中可被分离开。另外,加入了非特异性蛋白 BSA 的对照组中 DNA 却无滞后(泳道 3 之 FD,free DNA),这充分说明了噬菌体 PaP 3 大亚单位具有特异性结合 DNA 片段的能力。



1:大肠杆菌 JM109; 2 – 4: pQE-*tls*/JM109 诱导表达的重组蛋白 rTLS; 5,6:pQE-*tls*/JM109 菌体裂解上清; 7:亲和层析的洗脱峰; 8:亲和层析的穿过峰; M:蛋白质分子量标准

图 3　末端酶大亚单位融合蛋白的表达及亲和纯化



1:未加入 rTLS 的 cos 片段; 2:加入 rTLS 后的 cos 片段; 3:加入非特异性蛋白 BSA 后的 cos 片段

图 4　H6-TLS 蛋白与 cos 片段的结合

3　讨论

在 dsDNA 噬菌体的发育过程中,噬菌体的尾部与细菌表面蛋白结合后,通过尾丝蛋白将噬菌体基因组 DNA 注入宿主菌体内。接着,利用宿主细菌的连接酶,链状的基因组通过末端的突出的互补的单链序列连接后环化。然后,基因组开始以 θ 复制方式即双向复制的方式,产生出许多子代的环状 DNA。在感染的末期,DNA 的复制转向 σ 复制即滚环复制方式,产生"多串联拷贝体基因组 DNA",这个链状多串联体一般由 10 ~ 12 个单拷贝基因组首尾相连组成[5]。其中单个基因组之间的某些特殊序列是为包装的信号位点,为末端酶识别并作用的底物。这段 DNA 一般为 200 bp左右的序列,其间含有许多的元件分别与末端酶大亚单位、小亚单位以及某些宿主因子结合,以形成

稳定的核酸蛋白复合物完成噬菌体的包装。例如λ噬菌体末端酶大亚单位gpA，结合与剪切的位点cosN位于多串联拷贝体DNA的－22～＋24 bp处，该蛋白结合于cosNL(G_2C)与cosRL($G_{11}C$)，并在1 bp位及对应互补链的12 bp处剪切，形成5′突出的单链12 bp黏性末端[2]。在离体实验中，末端酶大亚单位同样也可以和DNA位点结合，这在不同噬菌体如λ噬菌体、乳酸杆菌噬菌体SPP1、T_4噬菌体等的末端酶大亚单位中都已检测到[6,7]。

本研究通过克隆表达获得了重组末端酶大亚单位rTLS，经纯化复性后，在含有Ca^{2+}离子的缓冲溶液中，显示了其具有与DNA结合的能力，EMSA试验中rTLS·DNA复合物明显后滞，而加入非特异性蛋白BSA却无滞后，充分说明了铜绿假单胞菌噬菌体PaP3末端酶大亚单位可与含包装信号的DNA结合。本研究表明，不同于在Mg^{2+}离子缓冲液中，rTLS蛋白所显示出的核酸内切酶活性由于Ca^{2+}离子的存在，使得该蛋白特异结合而不水解DNA，该现象也出现于其他的噬菌体末端酶大亚单位[8]，这也进一步证实了orf3编码产物能行使末端酶大亚单位的功能。

EMSA结果显示rTLS与噬菌体PaP3基因组末端序列有结合能力，但其结合能力并不完全，虽然多次优化反应条件，仍有约40%的DNA并未与之结合(图4泳道2)。推测这可能跟缺乏小亚单位或某些宿主因子的辅助有关。在对λ噬菌体末端酶大亚单位gpA的研究中，gpA首先要结合至包装位点cos中的cosN亚单位中cosRL($G_{11}C$)上，在此过程中，小亚单位gpNu1必须首先与cos位点中的R3元件结合，宿主因子IHF同时与I元件结合，暴露出cosRL位点，为gpA与DNA结合和剪切做准备[9]。同时gpA在体外如若没有gpNu1的辅助，更多显示的是一种非特异性的DNA结合能力[10]。然而，本实验研究结果显示噬菌体PaP3的末端酶大亚单位本身就具有特异结合DNA的能力，提示了该蛋白的特性。

本研究所进行的EMSA试验，采用了Pierce公司化学发光核酸检测试剂盒，该检测系统利用生物素与亲和素之间的特异性结合作用。利用生物素标记DNA，同时将亲和素与HRP(辣根过氧化物酶)结合，通过HRP作用于荧光蛋白发光，以此来检测DNA条带的位置。化学发光法目前已经广泛应用于蛋白免疫分析和核酸杂交检测中，相较于传统的同位素检测方法具有标记探针稳定性高，检测灵敏度高，无同位素污染等优越性。通过该检测系统，本研究迅速有效地检测到了目的蛋白与DNA的特异结合。

病毒包装是一个独特的生物学现象，该过程简单迅速，病毒可以指数级的速度生产后代。对病毒包装的研究是众多科研工作者的兴趣所在，因为该过程完全不同于细胞型生物体，仅由为数不多的几个蛋白相互协作完成，通过对这些包装中所涉及蛋白的研究，不仅可以揭示一些生物学个性，更可以针对这些蛋白确定可靠和低副作用的抗病毒药物靶点。末端酶作为dsDNA 20面体病毒和噬菌体包装过程中1个高度保守的蛋白酶，将末端酶大亚基作为抗病毒包装药物作用的靶点，具有实际应用的前景。Emery等[11]寻找到针对HCMV末端酶的苯并咪唑核糖核酸酶，Bogner等[12]也发现了抑制HSV-1末端酶亚单位的化合物BDCRB和BAY38-4766。因此，对末端酶大亚单位的研究将会为一些动植物病毒性疾病的防治和酿造业中噬菌体污染的控制提供了新的途径。

参考文献：

[1] CATALANO C E. The terminase enzyme from bacteriophage lambda: a DNA-packaging machine[J]. Cell Mol Life Sci, 2000, 57(1): 128－148.

[2] MALUF N K, YANG Q, CATALANO C E. Self-association properties of the bacteriophage lambda terminase holoenzyme: implications for the DNA packaging motor[J]. J Mol Biol, 2005, 347(3): 523－542.

[3] 张克斌，金晓琳，朱军民，等. 铜绿假单胞菌噬菌体PaP3基因组的初步注释[J]. 第三军医大学学报，2002，24(4)：381－384.

[4] 申晓冬，胡福泉，李 明，等. 噬菌体PaP3推定基因tls核酸内切酶活性的初步验证[J]. 解放军医学杂志，2006，31(3)：196－198.

[5] BECKER A, MURIALDO H. Bacteriophage lambda DNA: the beginning of the end[J]. J Bacteriol, 1990, 172(6): 2819－2824.

[6] XU S Y, FEISS M. Structure of the bacteriophage lambda cohesive end site. Genetic analysis of the site (cosN) at which nicks are introduced by terminase[J]. J Mol Biol, 1991, 220(2): 281－292.

[7] GUAL A, CAMACHO A G, ALONSO J C. Functional analysis of the terminase large subunit, G2P, of Bacillus subtilis bacteriophage SPP1[J]. J Biol Chem, 2000, 275(45): 35311－35319

[8] ARENS J S, HANG Q, HWANG Y, *et al*. Mutations that extend the specificity of the endonuclease activity of lambda terminase[J]. J Bacteriol, 1999, 181(1): 218－224.

[9] GAUSSIER H, ORTEGA M E, MALUF N K, *et al*. Nucleotides regulate the conformational state of the small terminase subunit from bacteriophage lambda: implications for the assembly of a viral genome-packaging motor[J]. Biochemistry, 2005, 44(28): 9645－9656.

[10] YANG Q, CATALANO C E. Kinetic characterization of the strand separation ("helicase") activity of DNA packaging enzyme from bacteriophage lambda[J]. Biochemistry, 1997, 36(35): 10638－10645.

[11] EMERY V C, HASSAN-WALKER A F. Focus on new drugs in development against human cytomegalovirus[J]. Drugs, 2002, 62(13): 1853－1858.

[12] BOGNER E. Human cytomegalovirus terminase as a target for antiviral chemotherapy[J]. Rev Med Virol, 2002, 12(2): 115－127.

(编辑 陈聪连)