论著

文章编号:1000-5404(2007)01-0056-03

EB病毒LMP1 C端原核表达质粒的构建

杨玉成,王祎琴,钱 迪,何 芸,黄江菊,洪苏玲 (重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016)

提 要:目的 通过巢式PCR技术扩增EB病毒LMP1 C端,并构建其原核表达重组质粒,经诱导获得EB病毒LMP1 C端蛋白。**方法** 用巢式PCR技术,从B95-8细胞中扩增EBV-LMP1 exon c DNA,克隆至pET-32a载体,转化入原核表达菌BL21,IPTG诱导重组菌株表达,用SDS-PAGE与Western blot对表达产物进行鉴定。**结果** 巢式PCR扩增的LMP1 exon c DNA长度为801 bp,测序结果与LMP1 C端cDNA序列吻合,诱导pET-32a-LMP1c重组原核表达菌株获得大小约48×10^3的LMP1 C端融合蛋白,Western blot表明重组蛋白能与LMP1单克隆抗体特异结合。**结论** 通过巢式PCR成功构建了原核表达载体,获得的EB病毒LMP1 C端融合蛋白为制备国产LMP1单克隆抗体,研究LMP1致瘤机制奠定了基础。

关键词:EB病毒;LMP1;原核表达;克隆

中图法分类号:R373.1;R394-33;R394.3 **文献标识码**:A

Prokaryotic expression plasmid construction of EBV-LMP1 carboxy region

YANG Yu-cheng, WANG Yi-qin, QIAN Di, HE Yun, HUANG Jiang-ju, HONG Su-ling (Department of Otolaryngology, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To amplify EBV-LMP1 carboxy region and express it in recombinant prokaryotic plasmid pET-32a-LMP1c. **Methods** EBV-LMP1 exon c gene was amplified from the B95-8 cell genomic DNA by nest PCR and cloned into plasmid pET-32a. The recombinant plasmid was then transformed into *E. coli*. BL21. The EBV-LMP1 C was expressed as a recombinant fusion protein and detected by Western blotting. **Results** The size of amplified LMP1 exon c DNA was 801 bp, which was the same as the published EBV-LMP1 carboxy region sequence. The recombinant prokaryotic expression plasmid pET-32a-LMP1c was constructed and 48×10^3 fusion protein was expressed in *E. coli*. BL21. The expressed protein was detected with the anti-LMP1 monoclonal antibody by Western blotting. **Conclusion** Recombinant prokaryotic expression plasmid was constructed successfully. The expressed recombinant fusion protein provided the basic material to produce our own anti-LMP1 monoclonal antibody and study the oncogenic role of LMP1.

Key words: Epstein-Barr virus; latent membrane protein 1; prokaryotic expression; clone

EB病毒(Epstein-Barr virus,EBV)是γ疱疹病毒亚科的线性双链DNA病毒,与多种人类疾病相关,与鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma,NPC)的相关性是近年来研究的热点。其中EBV编码的潜伏蛋白1(latent membrane protein 1,LMP1)是众多EBV编码基因中被明确证明唯一能够将体外培养的人和啮齿类动物细胞转化成肿瘤细胞系的致瘤基因,在NPC形成中参与鼻咽上皮细胞的转化,被认为是致NPC发生的病毒癌基因[1]。

B95-8细胞编码的LMP1是由386个氨基酸残基组成的一种跨膜蛋白,分为氨基端、跨膜区和羧基端(carboxy region,C端)3部分。羧基端位于细胞质内,由200个氨基酸残基组成,由LMP1基因外显子C(exon c)编码。LMP1 C端对于LMP1的功能如介导信号转导有重要作用[2],是信号转导途径的主要效应子,但是尚未获得LMP1与信号转导各效应子及其他蛋白之间的直接联系。本研究通过巢式PCR扩增LMP1 exon c,构建重组原核表达质粒,经诱导成功获得EB病毒LMP1 C端蛋白,为进一步制备国产LMP1单克隆抗体,研究LMP1致瘤机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株、培养基、质粒和菌株

绒猴淋巴细胞系B95-8细胞由中山大学肿瘤研究所惠赠;

基金项目:重庆市卫生局重点项目(2003)
Supported by the Key Research Project of Health Bureau of Chongqing (2003)

作者简介:杨玉成(1974-),男,四川省南江县人,博士,主治医师,讲师,主要从事耳鼻咽喉肿瘤基础与临床方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)89011020

通讯作者:洪苏玲,E-mail:hsl_prof@163.com

收稿日期:2005-12-30;修回日期:2006-04-08

小牛血清购自杭州四季清公司；RPMI1640 培养基、pET-32a 质粒、大肠杆菌 JM109、BL21 由重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室配制或保存。

1.2　试剂和试剂盒

T_4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ、*Ex Taq* 酶、λ-Eco T14 I digest 标准、DL2000 标准、pMD18-T 载体、DNA 胶回收试剂盒均购自 TaKaRa（大连）公司。质粒提取试剂盒、Cycle-pure kit 购自 Omega 公司。异丙基硫代-β-D 半乳糖苷（IPTG）购自北方同正生物技术有限公司。Hi Trap Chelating HP 5 ml 购自 Amersham Biosciences 公司，蛋白质预染 Ladder 购自 Fermentas 公司，鼠抗人 LMP1 单克隆抗体购自 DAKO 公司，辣根过氧化酶标记的山羊抗小鼠 IgG（二抗）、浓缩型 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥公司。

1.3　主要仪器

聚合酶链反应（PCR）扩增仪为 PE-Cetus 公司 2400 型，Gel Doc100 凝胶成像仪和全波长分光光度计为 BIO-RAD 公司产品。基因测序仪为 ABI 公司的 3100 型。

1.4　细胞培养及 DNA 抽提

B95-8 细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基培养，置于 37 ℃、5% CO_2 的饱和水汽二氧化碳培养箱。72 h 后收集细胞，参照 DNA 抽提试剂盒说明提取细胞基因组 DNA。

1.5　巢式 PCR 扩增合成 EBV-LMP1exon c 基因片段

依据原型株 B95-8 细胞的基因序列（GenBank NC 001345）用 Premier 5.0 自行设计 PCR 引物。第 1 轮 PCR 以 B95-8 细胞基因组 DNA 为模板，扩增包含 LMP1 基因全长序列（168 036 ~ 169 713 nt）。1 号上游引物：5′-CGCTTTTCTAACACAAACACACGCT -3′（169 713 ~ 169 689 nt）；2 号下游引物：5′-GACAGACAGTGTGGCTAAGGGAGTG -3′（168 036 ~ 168 061 nt）。扩增产物 1 678 bp，连入 T 载体（TA 克隆）构建重组载体 pMD18-T-LMP。第 2 轮 PCR 扩增 LMP1 基因的第 3 外显子（exon c）（168 163 ~ 168 963 nt）。根据读码框设计引物，3 号上游引物（含有 *Eco*R Ⅰ 酶切位点）：5′- GCCCGAATTCTTAGGTATCTGGATCTACTTATTG-3′（168 963 ~ 168 940 nt）；4 号下游引物（含有 *Xho* Ⅰ 酶切位点）：5′-GCGCTCGAGtGTCATAGTAGCTTAGCTGAACTG-3′（168 163 ~ 168 185 nt）。由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR 反应液组成：*Ex Taq* 酶（5 U/μl）0.15 μl，10 × PCR 缓冲液 2.5 μl，dNTP（各 2.5 mmol/L）2 μl，上游引物（10 μmol/L）2.0 μl，下游引物（10 μmol/L）2.0 μl，模板为 pMD18-T-LMP 重组载体 0.5 μl，加灭菌纯水至 25 μl。PCR 循环参数：94 ℃ 5 min；94 ℃ 50 s，55 ℃ 50 s，72 ℃ 55 s，35 个循环；72 ℃ 8 min。扩增目的片段 801 bp。

1.6　pET-32a-LMP1c 重组克隆构建与鉴定

含目的片段的 PCR 产物经纯化回收后与质粒 pET-32a 用 *Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切，胶回收酶切产物，混合后用 T_4 DNA 连接酶在 16 ℃连接过夜。连接产物转化感受态 JM109，氨苄青霉素平板粗筛，挑取阳性单克隆，提取质粒进行酶切鉴定及质粒通用引物 PCR 鉴定，经鉴定正确的重组质粒送重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室进行序列测定。

1.7　pET-32a-LMP1c 重组克隆的诱导表达

将鉴定正确的重组质粒 pET-32a-LMP1c 转化感受态 BL21，氨苄青霉素平板粗筛，挑取阳性单克隆，37 ℃摇菌过夜，1∶100 稀释菌液后继续培养 2 ~ 6 h，检测 *D*（600 为）0.3 ~ 0.8 时，加入不同终浓度的 IPTG，分别于 30 ℃、37 ℃下诱导培养 1 ~ 6 h 后取样，离心收集菌体，弃上清，用预冷的 PBS 重悬，超声破碎菌体 10 min，再离心取上清，加入 SDS 凝胶加样缓冲液，100 ℃ 加热 5 min 变性蛋白。进行蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析。

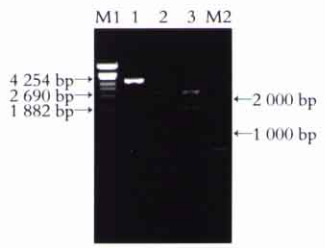
1.8　重组蛋白的 Western blot 方法鉴定

用 Hi Trap Chelating HP 5 ml 纯化 LMP1 重组融合蛋白，按上述方法进行 SDS-PAGE 后，蛋白质转膜到 PVDF 膜，与一抗（鼠抗人 LMP1 单抗，以 5% 脱脂奶按 1∶1 000 稀释）共孵育 2 h，漂洗去掉 PVDF 膜上的多余抗体，加入二抗（辣根过氧化物酶结合的羊抗鼠 IgG，1∶2 000 稀释）孵育 1 h，DAB 显色观察结果。

2　结果

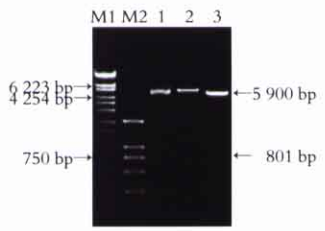
2.1　EBV-LMP1 C 端基因片段的 PCR 扩增、克隆及测序

以 B95-8 细胞 DNA 为模板，1、2 号引物进行第 1 轮 PCR，获得 1 678 bp 的产物，构建的重组载体 pMD18-T-LMP，酶切鉴定正确（图 1），双向序列测定正确。第 2 轮 PCR 以 pMD18-T-LMP 重组载体为模板，3、4 号引物扩增获得长度为 801 bp 的 EBV-LMP1 exon c 基因片段，克隆入 pET-32a 获得重组原核表达载体 pET-32a-LMP1c，经 *Eco*R Ⅰ 单酶切和 *Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ 双酶切鉴定正确（图 2）。质粒通用引物 PCR 鉴定正确。pET-32a-LMP1c 双向序列测定后，用 Blast 软件和 DNAssist 1.02 软件对比分析，801 bp 的克隆片段序列与已知 GenBank 上 B95-8 细胞来源的 LMP1exon c 序列吻合，重组载体读码框正确。



M1：λ-EcoT14 I digest 标准；M2：DL2000 标准；1：重组载体 pMD18-T-LMP *Eco*R Ⅰ 单酶切；2：pMD18-T 载体 *Eco*R Ⅰ 单酶切；3：重组载体 pMD18-T-LMP *Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切

图 1　重组载体 pMD18-T-LMP 酶切鉴定电泳图

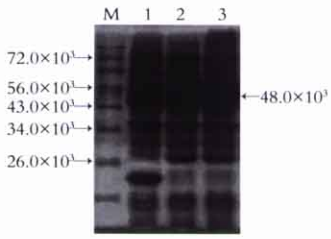


M1：λ-Eco T14 I digest 标准；M2：DL2000 标准；1：重组载体 pET-32a-LMP1c；2：重组载体 pGEM-11zf-LMP1c *Eco*R Ⅰ 单酶切；3：重组载体 pET-32a-LMP1c *Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切

图 2　重组载体 pET-32a-LMP1c 酶切鉴定电泳图

2.2 EBV-LMP1 C 端重组融合蛋白的诱导表达

重组载体 pET-32a-LMP1c 序列用蛋白质分子量预测软件 ExPASy (Expert Protein Analysis System) (http://www.expasy.org/tools/) (Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva) 分析，预测可融合表达 447 个氨基酸，分子量大小约 48×10^3，其中有 267 个氨基酸与原型 LMP1 C 端同源。重组载体 pET-32a-LMP1c 转化大肠杆菌 BL21，挑取阳性克隆摇菌过夜，1∶100 扩增培养 2～3 h，加入 0.8 mmol/L IPTG，在 37 ℃下诱导 4 h 后表达量最高。SDS-PAGE 电泳结果显示在分子量大小约 48×10^3 处出现高表达蛋白质条带，与理论设计的融合蛋白质大小一致(图 3)。



M：蛋白质预染 Ladder；1：对照空载体 pET-32a 经 IPTG 诱导表达；2：重组载体 pET-32a-LMP1c 未经 IPTG 诱导；3：重组载体 pET-32a-LMP1c 经 IPTG 诱导表达

图 3 重组载体 pET-32a-LMP1c 诱导后产物 PAGE 电泳图

2.3 EBV-LMP1 C 端重组融合蛋白的鉴定

用 LMP1 单克隆抗体为一抗进行 Western blot 分析，结果显示，经 IPTG 诱导后，重组载体 pET-32a-LMP1c 在大小约 48×10^3 处出现与 LMP1 单抗特异性结合条带，而对照 pET-32a 未出现特异性结合条带，表明重组载体 pET-32a-LMP1c 表达的融合蛋白含有 LMP1 C 端部分，与我们理论设计的一致。

3 讨论

LMP1 是由 EB 病毒编码的潜伏膜蛋白，由于它能转化鼠成纤维细胞、人原代 B 细胞和人上皮细胞，因而被认为是癌基因[4]。LMP1 可能类似于肿瘤坏死因子受体家族成员 CD40，通过参与细胞内信号传导网络，调控细胞的增殖或凋亡[3]。LMP1 的主要功能位于羧基端(C 端)细胞质区，LMP1 C 端的功能结构域主要参与激活 NF-κB，JNK，p38 和 JAK/STAT 等信号传递系统[4,5]，因此认为 LMP1 蛋白的 C 端和/或某些结构域可能是 LMP1 致瘤机制的关键部位。

基因序列决定了蛋白质的氨基酸序列，蛋白质不同区段的一级氨基酸序列决定着该蛋白质功能的特异性。B95-8 细胞 LMP1 exon c 编码 267 个氨基酸残基，包括 LMP1 全部羧基端及部分跨膜区[1,4]。在原核细胞表达真核基因时，目的基因必须无内含子序列，一般用 mRNA 反转录成的 cDNA 作为目的基因。张雪雁等[6]用 RT-PCR 反转录 LMP1 C 端 597 bp，构建了原核表达质粒。我们经过序列对比分析，结果显示 LMP1 exon c 碱基互补序列与 LMP1 mRNA C 端 801 bp 完全一致，理论上让我们可以省去复杂的 RT-PCR，用上下游引物调整方向及序列互补性，而直接用 PCR 扩增 LMP1 DNA 来构建表达质粒。本研究中，我们用巢式 PCR 扩增 LMP1 基因 exon c DNA 成功构建重组原核表达质粒 pET-32a-LMP1c，经双向测序及序列对比分析，读码框与 LMP1 mRNA C 端 801 bp 完全一致，表达的融合蛋白质经 PAGE 胶电泳及 Western blot 鉴定正确。

原核表达具有快速、经济、表达量高的优点，在原核表达中载体的选择特别重要。在众多原核表达载体中，pET 系列表达载体有其独特的优势，表达的融合蛋白以可溶性形成存在于细胞质中，并且有 6 个组氨酸标签，易于层析纯化[7]，应用较为广泛。本研究选择 pET-32a 作为载体，成功构建了表达 LMP1 具有重要功能的 C 端 267 个氨基酸的融合蛋白，且诱导方便，表达量高。经纯化后的重组 LMP1 蛋白可以通过噬菌体显示技术筛选随机肽库获得高亲和力的结合拮抗基序，从而有助于阐清 LMP1 C 端功能的分子机制及找到新药作用靶标，同时获得的 LMP1 蛋白可以用来免疫动物，有希望制备国产单克隆抗体，并对 EBV 相关肿瘤的免疫机制研究及疫苗开发奠定基础。

(致谢：本研究在重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室完成，感谢实验室老师无私的帮助！)

参考文献：

[1] Burgos J S. Involvement of the Epstein-Barr virus in the nasopharyngeal carcinoma pathogenesis[J]. Med Oncol, 2005, 22(2): 113－121.

[2] 金 奇. 医学分子病毒学[M]. 北京：科学出版社，2001：763－781.

[3] Kilger E, Kieser A, Baumann M, *et al*. Epstein-Barr virus－mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor[J]. EMBO J, 1998, 17(6):1700－1709.

[4] Eliopoulos A G, Young L S. LMP1 structure and signal transduction [J]. Semin Cancer Biol, 2001,11(6): 435－444.

[5] Ding L, Li L L, Yang J, *et al*. Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 modulates nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase protein by activating nuclear factor-kappaB p65 in human nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(9): 1881－1889.

[6] 张雪雁，汤 郡，杨 英，等. Epstein-Barr 病毒 LMP1 蛋白羧基端的克隆与原核表达[J]. 热带医学杂志，2003, 3(2): 128－132, 175.

[7] 罗德炎，曾 政，李 非，等. 布氏杆菌 PBP_{39} 蛋白抗原表达及免疫效果的研究[J]. 第三军医大学学报，2005, 27(9): 817－820.

(编辑 栗 嘉)