

Construction of RNA-containing Virus-like Nanoparticles Expression Vector with Cysteine Residues on Surface and Fluorescent Decoration

CHENG Yang-Jian¹, LIANG Ji-Xuan², LI Qing-Ge¹

(1. The Key Laboratory of Cell Biology and Tumor Cell Engineering of the Ministry of Education, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005 China;

2. Cancer Research Centre, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Site-directed mutagenesis was performed at the codon 15 of the MS2 bacteriophage coat protein gene which had been cloned to the virus-like particles expression vector containing non-self RNA fragment. The produced expression vector termed pARSC, was transformed to *E. coli* DH5 α . The positive clones were selected and proliferated. The harvested cells were treated with sonication and the supernatant was then subjected to linear sucrose density gradients centrifugation (15% to 60%) at 32 000 r/min for 4 h at 4°C. The virus-like particles VLP-Cy, were collected at 35% sucrose density. The particles were examined by transmission electron microscopy and the spherical viral particles of approximately 27 nm in diameter were found. The isolated VLP-Cy was then chemically modified with fluorescein-5'-maleimide. The covalent fluorescent labeling was confirmed by absorption analysis, SDS-PAGE and MALDI-TOF mass spectroscopy. This is the first report of preparation of RNA-containing natural fluorescent nanoparticles. The study highlights the versatility of MS2 bacteriophage capsids as building blocks for functional nanomaterials construction for a variety of application purposes.

Key words virus-like nanoparticles; MS2 bacteriophage coat protein; cysteine residue; fluorescent decoration

装载 RNA“病毒样”纳米颗粒表面巯基化表达载体的构建及荧光修饰

程扬健¹, 梁基选², 李庆阁¹

(1. 厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005;

2. 厦门大学医学院抗癌研究中心, 厦门 361005)

摘要: 以本实验室构建的能够装载外源 RNA 片段的 MS2 噬菌体“病毒样”颗粒表达载体为基础, 利用定点突变技术将衣壳蛋白基因的第 15 位密码子由编码苏氨酸突变为胱氨酸。表达产物在 35% 蔗糖密度梯度处有一目的产物, 目的产物在透射电镜下呈球形, 直径大小约为 27 nm。用马来酰亚胺-5'-荧光素对表达产物进行化学修饰, 经

收稿日期: 2004-04-21; 修回日期: 2004-08-26

基金项目: 福建省科技重点项目 (编号: 2003Y004)、厦门市科技计划项目和厦门大学自选课题项目资助 [Supported by Fujian Scientific and Technology Foundation (No. 2003Y004), Xiamen Scientific and Technology Program Foundation and Self-selection Program Foundation of Xiamen University]

作者简介: 程扬健 (1975-), 男, 硕士研究生, 专业方向: 生化与分子生物学。E-mail: yjcheng11@163.com

通讯作者。Tel (Fax): 0592-2187363 E-mail: qgl@xmu.edu.cn

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

光谱分析、SDS-PAGE分析和MALDI-TOF MS鉴定,证明巯基在表达产物的外表面,并能与马来酰亚胺-5'-荧光素进行反应。这种携带外源RNA片段的荧光修饰的天然纳米颗粒为制备各种功能性纳米材料提供了新途径。

关键词:“病毒样”颗粒;MS2噬菌体;衣壳蛋白;半胱氨酸残基;荧光修饰

中图分类号:Q939.45 文献标识码:A 文章编号:0379-4172(2005)08-0874-05

具有天然纳米结构的微生物(如病毒),可以自组装成多种形状的生物功能纳米颗粒。根据病毒表达载体的特点通过基因工程改造,可以制备出多种功能性生物纳米材料。最近,这些天然纳米颗粒在靶向性药物载体开发、基因差异分析、细胞定位、分子诊断等方面都已引起人们的兴趣^[1~3]。MS2噬菌体具有材料易得、基因组小等优点,在制备功能性生物纳米材料方面倍受研究者的青睐^[4]。

MS2噬菌体是正义单链RNA病毒,基因组全长为3569 bp共编码4个蛋白,从5'端到3'端依次是成熟蛋白、衣壳蛋白、裂解酶和复制酶^[5]。通过基因工程的方法将成熟蛋白基因、衣壳蛋白基因和衣壳蛋白基因下游长19 bp的发夹结构克隆到表达载体pSE380上^[6],该载体能够将插入的片段转录成RNA,同时合成的衣壳蛋白单体与成熟蛋白及特异RNA结合(含有19 bp的发夹结构),自发组装成180个衣壳蛋白单体包裹成熟蛋白和RNA的“病毒样”颗粒^[7~9]。该“病毒样”颗粒与MS2噬菌体类似,能够耐受核酸酶的降解,具有极强的稳定性^[10]。

本文通过定点突变的方法对“病毒样”颗粒表达载体pARS上衣壳蛋白基因的第15位密码子进行突变,使其由编码苏氨酸突变为编码半胱氨酸残基,并用马来酰亚胺-5'-荧光素对其进行共价修饰^[11,12],最后成功获得了装载有外源RNA片段的“病毒样”荧光纳米颗粒。

1 材料和方法

1.1 质粒和菌株

装载SARS病毒RNA片段的“病毒样”颗粒表达载体pARS由本实验室构建(文另发),E. coli DH5α菌株由本实验室保存。

1.2 酶及试剂

马来酰亚胺-5'-荧光素购自Pierce公司;Zip-Tip-18购自Millipore公司;Taq DNA聚合酶、

dNTPs和限制性内切酶Xba^I、Bgl^I、T4 DNA连接酶等均购自TaKaRa公司;低熔点琼脂糖、Gene-RubTM 1 kb DNA Ladder和蛋白质分子量标准购自上海Sangon公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.3 表达载体pARSC的构建

利用定点突变技术对pARS中衣壳蛋白基因的第15位密码子进行改造,使其由编码苏氨酸突变为编码半胱氨酸残基。引物由上海Sangon公司合成,序列如下:

primer-up 5'-AACTGGCGCGTACGTAAAG-TC-3';

primer-cy-down 5'-CACGTCCGACATCCG-CCATTGT-3';

primer-cy-up 5'-ACAA TGCGGATGTGGC-GACGTG-3';

primer-downBgl^I: 5'-GGATTCTGCAGCG-AA TCCAATGATACGGATGAA-3' (下划线部分为酶切位点)。

质粒提取,PCR扩增,重组,DNA片段的回收,酶切、连接、转化及重组子的鉴定参照文献[13]进行。

1.4 超声波破碎和蔗糖梯度离心

挑取阳性克隆单菌落在含有氨苄青霉素的液体LB培养基中过夜培养,取2 mL过夜培养的菌液接种到200 mL含有氨苄青霉素的液体LB培养基中,200 r/min振荡培养4 h(OD₆₀₀ = 0.6~0.8)后,加入终浓度为1 mmol/L的PTG,于37℃、200 r/min诱导培养16 h,4 000 r/min离心10 min收集菌体沉淀,用STE洗涤两次后,重新悬于5 mL超声波缓冲液中(5 mmol/L MgSO₄、0.1 mol/L NaCl、50 mmol/L Tris, pH 8.0)。超声波处理20 s(50% duty cycle Power= 5 watt),冰上放置1 min,再重复处理两次。13 000 r/min离心10 min沉淀细胞碎片,收集上清,用15%~60%的蔗糖梯度密度离心。

1.5 透射电镜观察

巯基化的“病毒样”颗粒 (VLP-Cy) 经蔗糖梯度密度离心后, 用 PBS (pH 7.4) 透析处理, 取 5 μ L 透析好的样品经 1% 的醋酸双氧铀 (pH 7.0) 染色 5 min 后, 在 100 000 \times 透射电镜下观察形态结构。

1.6 马来酰亚胺-5'-荧光素对 VLP-Cy 进行化学修饰和分析

1.6.1 化学修饰

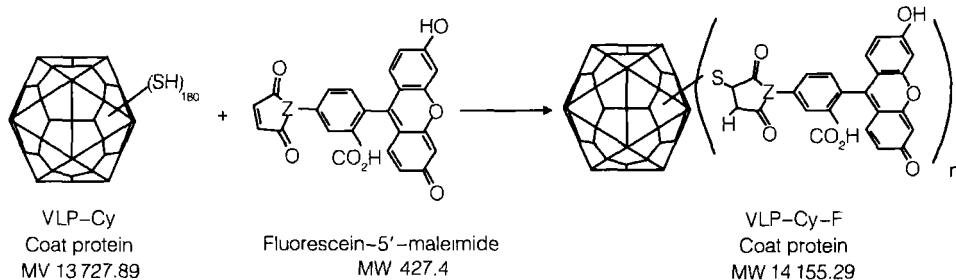


图 1 马来酰亚胺-5'-荧光素对巯基化改造后的“病毒样”颗粒进行共价荧光修饰 ($n \approx 180$)

Fig 1 The covalent reaction between the VLP-Cy and fluorescein-5'-maleimide

1.6.2 紫外可见光谱和 SDS-PAGE 分析

取 VLP-Cy-F 和用马来酰亚胺-5'-荧光素处理的对照各 30 μ L 用于紫外可见吸收光谱分析, 同时各取 10 μ L 用于 15% 的 SDS-PAGE 电泳分析。

1.6.3 MALDI-TOF-MS 分析

取 VLP-Cy-F 和 VLP-Cy 各 10 μ L, 用 Millipore 公司的 ZpT pC-18 纯化后用于质谱分析。

2 结果

2.1 蔗糖梯度密度离心

通过蔗糖梯度密度离心在 35% 的蔗糖密度梯度处有一条浅而宽的产物, 用 6 号针头穿壁取出该层 (约 300 μ L) 备用。

2.2 透射电镜观察

取出目的层经过透析处理后, 用 1% 醋酸双氧铀 (pH 7.0) 染色后, 在 100 000 \times 透射电镜下可以观察直径约 27 nm、近似球型的形态均一的结构 (图 2), 说明突变后的衣壳蛋白仍然能够自组装成“病毒样”颗粒。

在 100 μ L 含 50 mmol/L 的 K_3PO_4 , 1 mmol/L 的 EDTA, 1 mmol/L 马来酰亚胺-5'-荧光素 (MW 427)、pH 7.4 的反应液中加入终浓度相当 1~2.5 mg/mL 蛋白量的 VLP-Cy, 室温下避光反应 6 h 后加入 50 mmol/L 的 DTT 终止反应, 并用 Sephadex G-25 (Pharmacia) 分离除去未反应的马来酰亚胺-5'-荧光素。修饰后的“病毒样”颗粒我们称它为荧光标记的“病毒样”颗粒 (VLP-Cy-F) (图 1)。对照用未突变的“病毒样”颗粒 (VLP) 按同样方法处理。

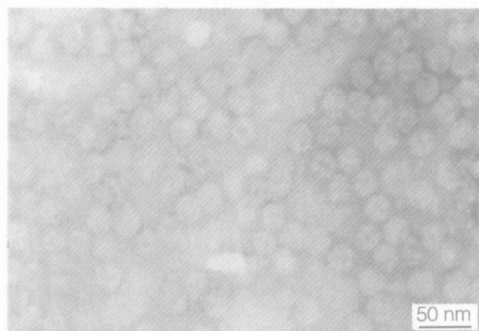


图 2 VLP-Cy 经 1% 的醋酸双氧铀 (pH 7.0) 染色, 100 000 \times 透射电镜形态结构图

Fig 2 The TEM image of the VLP-Cy stained by 1% uranyl acetate (pH 7.0)

2.3 紫外可见吸收光谱分析和 SDS-PAGE 分析

VLP-Cy 能与马来酰亚胺-5'-荧光素反应, 在 492 nm 处出现特征吸收峰; 而 VLP 表面没有半胱氨酸残基, 不会与马来酰亚胺-5'-荧光素反应, 因此在 492 nm 处没有特征吸收峰 (图 3 A)。荧光标记的“病毒样”颗粒 (VLP-Cy-F) 用 15% 的 SDS-PAGE 电泳, 直接在紫外光下可观察到单一条带; 未标记马来酰亚胺-5'-荧光素的“病毒样”颗粒, 在紫外光下观察不到条带 (图 3 B 右)。用考马斯亮蓝

染色后,可观察到 VLP-Cy-F的主要条带稍微滞后,这是因为标记荧光素的衣壳蛋白分子量增大,其前

面有一条较浅的带,则对应于 VLP,说明 VLP-Cy中有部分衣壳蛋白没有标记上荧光素(图 3 B左)。

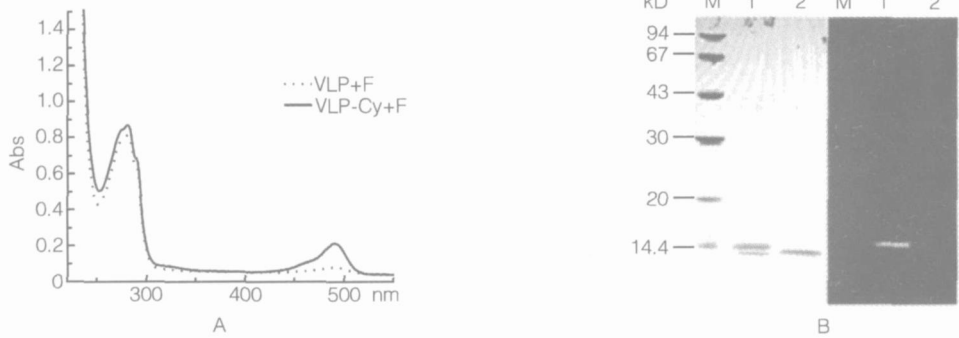


图 3 光谱和 SDS-PAGE 分析

A中虚线为 VLP加马来酰亚胺-5-荧光素 (VLP + F)处理,实线为 VLP-Cy加马来酰亚胺-5-荧光素 (VLP-Cy+ F)处理; B中的左边用考马斯亮蓝染色,右边是染色之前直接在紫外光下观察的结果。M: 蛋白质 marker; 1: VLP-Cy + F; 2: VLP + F。

Fig. 3 Spectral analysis and SDS-PAGE analysis

A, the dash dot line is VLP + F; the solid is VLP-Cy+ F. B is the gel stained with coomassie brilliant blue and at right it is illuminated in the UV light. M: Protein marker; 1: VLP-Cy+ F; 2: VLP+ F.

2.4 MALDI-TOF-MS 分析

通过基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱 (Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 分别检测了 VLP-Cy衣壳蛋白和 VLP-Cy-F衣壳蛋白的分子量,它们分别是 13 728.37 D 和 14 155.53 D

(图 4),与二者的理论分子量(分别是 13 727.89 D 和 14 155.29 D)在误差范围内一致,并且荧光标记的“病毒样”颗粒在 13 728.37 D处还出现了一个小的单电荷峰,这和 SDS-PAGE时出现两条带的结果吻合,因为对 VLP-Cy的 180个衣壳蛋白单体的荧光标记很难做到 100%。

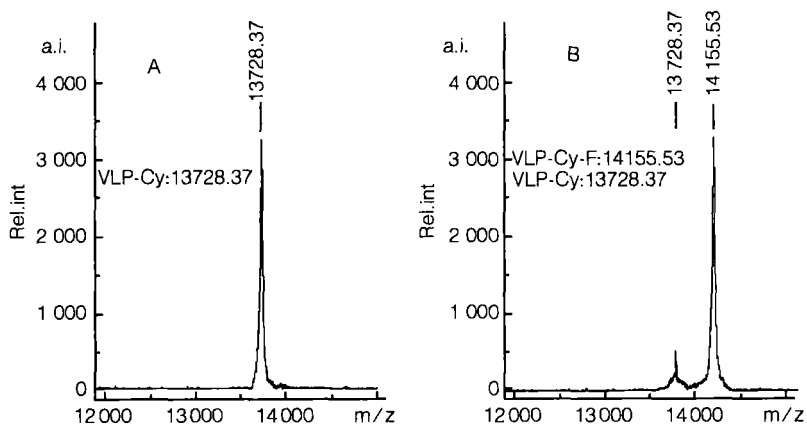


图 4 MALDI-TOFMS 结果

A: 表面巯基化“病毒样”颗粒衣壳蛋白单体 MALDI-TOFMS 图谱; B: 荧光标记的“病毒样”颗粒壳蛋白 MALDI-TOFMS 图谱。

Fig 4 MALDI-TOFMS results

A: The spectra of the coat protein of VLP-Cy; B: The spectra of the coat protein of VLP-Cy labeled with the fluorescein.

3 讨论

野生 MS2 噬菌体的衣壳蛋白单体由 129 个氨基酸残基组成, 其中的 2 个半胱氨酸残基分别由衣壳蛋白基因的第 46 位密码子和 101 位密码子编码, 由于它们都包埋在“病毒样”颗粒三维结构的内部^[14], 无法与马来酰亚胺-5'-荧光素反应。重组产生的第 15 位半胱氨酸残基位于 MS2 噬菌体衣壳蛋白 A 链和 B 链形成的 β 折叠的环中, 衣壳蛋白自组装形成“病毒样”颗粒后, 能把第 15 位半胱氨酸残基展示在“病毒样”颗粒的表面^[15], 因此能与巯基特异性试剂如马来酰亚胺-5'-荧光素发生共价结合反应, 从而形成荧光纳米颗粒。从本研究可知, 对 VLP-Cy 的 180 个衣壳蛋白单体的荧光标记很难做到完全, 关于荧光标记反应产率方面的研究有待进一步深入。

表面巯基化“病毒样”颗粒的直径大小约为 27 nm, 其表面含有 180 个巯基, 如果在“病毒样”颗粒表面修饰上亲和配体, 可以用亲和层析的方法对“病毒样”颗粒进行快速纯化, 也可以用多种不同的亲和配体和巯基特异荧光物质 (如 FAM、Texas red Cy5 等) 同时对表面巯基化“病毒样”颗粒进行修饰, 使它们标记上一种荧光物质的同时也标记上一种相应的配体, 这样就可以得到一种荧光物质对应一种配体的功能性纳米颗粒, 应用于免疫诊断等方面的研究。

“病毒样”颗粒能够包裹特异的 RNA 片段, 但 19 bp 发夹结构的下游序列特异性不强, 通过基因工程的方法还可以进行序列替换, 使“病毒样”颗粒携带多种 RNA 片段^[16] (如 SARS、HCV、HM 等 RNA 片段), 进一步通过表面修饰 (如结合上亲和配体), 最终获得功能性“病毒样”纳米颗粒, 这些多功能的天然纳米颗粒在靶向性基因治疗、功能基因分析、细胞定位、分子检测等方面都有独特的应用价值, 这方面的研究正在进行中。

参考文献 (References):

[1] Brown W L, Mastio R A, Wu M. RNA bacteriophage capsid-mediated drug delivery and epitope presentation. *Heriviology*, 2002, 45(4-6): 371~380

[2] Hooker J M, Kovacs E W, Francis M B. Interior surface

modification of bacteriophage MS2. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(12): 3718~3719

[3] Stockley P G, Mastio R A. Use of fusions to viral coat proteins as antigenic carriers for vaccine development. *Vaccine*, 1999, 18(3-4): 251~258

[4] Valegard K, Liljas L, Fridborg K, Unge T. The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2. *Nature*, 1990, 345(6270): 36~41

[5] Gohmohammadi R, Valegard K, Fridborg K, Liljas L. The refined structure of bacteriophage MS2 at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol*, 1993, 234(3): 620~639

[6] Healk G, Hill H R, Stockley P G, Hollingdale M R, Taylor-Robinson A W. Expression and immunogenicity of a liver stage malaria epitope presented as a foreign peptide on the surface of RNA-free MS2 bacteriophage capsids. *Vaccine*, 1999, 18(3-4): 251~258

[7] Ni C Z, Syed R, Kodandapani R, Wickersham J, Peabody D S, Ely K R. Crystal structure of the MS2 coat protein dimer: implications for RNA binding and virus assembly. *Structure*, 1995, 3(3): 255~263

[8] Peabody D S, AlBitar L. Isolation of viral coat protein mutants with altered assembly and aggregation properties. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(22): E113

[9] Wang S, True H L, Seitz E M. Direct genetic selection of two classes of R17/MS2 coat proteins with altered capsid assembly properties and expanded RNA-binding activities. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(8): 1649~1657

[10] Lima S M, Peabody D S, Silva J L, de Oliveira A C. Mutations in the hydrophobic core and in the protein-RNA interface affect the packing and stability of icosahedral viruses. *Eur J Biochem*, 2004, 271(1): 135~145

[11] Wang Q, Kalaydar E, Lin T, Johnson J E, Finn M G. Natural supramolecular building blocks: Wild-type cowpea mosaic virus. *Chem Biol*, 2002, 9(7): 805~811

[12] Wang Q, Lin T, Johnson J E, Finn M G. Natural supramolecular building blocks: Cysteine-added mutants of cowpea mosaic virus. *Chem Biol*, 2002, 9(7): 813~819

[13] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001

[14] Peabody D S. A via platform for chemical modification and multivalent display. *J Nanobiotechnology*, 2003, 1(1): 1~8

[15] Peabody D S. Translational repression by bacteriophage MS2 coat protein does not require cysteine residues. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(15): 6017~6027

[16] Pasloske B L, Walkerpeach C R, Obermoeber D, Winkler M. A modified RNA technology for production of ribonuclease resistant viral RNA controls and standards. *J Clinica Immunobiology*, 1998, 36(12): 3590~3594