

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 200226067

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学  
硕 士 学 位 论 文  
**RNA 假病毒的基因改造及应用**  
**Reconstruction of Virus Like Particle and**  
**Application**

程扬健

指导教师姓名: 李 庆 阁 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2 0 0 5 年 7 月

论文答辩时间: 2 0 0 5 年 7 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2005 年 7 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

中文摘要	1
英文摘要	3
<b>第一章 六个组氨酸短肽标签在假病毒表面的展示及其亲和纯化</b>	<b>1</b>
第一节 引言	1
第二节 材料与方法	3
第三节 结果	9
§ 3.1 pAR-H 载体的构建、诱导表达和验证	9
§ 3.2 VLP-His 耐受核酸酶实验	10
§ 3.3 透射电子显微镜观察	11
§ 3.4 Cobalt IMAC 树脂纯化 VLP-His 和 SDS-PAGE 分析	12
§ 3.5 MALDI-TOF 质谱分析	12
§ 3.6 蔗糖密度梯度离心纯化假病毒	13
§ 3.7 实时荧光 PCR 考察纯化的 VLP-His 中 DNA 的含量	14
第四节 讨论	15
参考文献	17
<b>第二章 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</b>	<b>22</b>
第一节 引言	22
第二节 材料和方法	23
第三节 结果	27
§ 3.1 表达载体 pARSC 的构建	27
§ 3.2 蔗糖梯度密度离心	28
§ 3.3 透射电镜观察	28
§ 3.4 包裹外源 RNA 片段的验证	28
§ 3.4.1 探针杂交信号	29
§ 3.4.1 荧光能量共振转移信号	29
§ 3.5 紫外可见吸收光谱分析和 SDS-PAGE 分析	29
§ 3.6 MALDI-TOF-MS 分析	31
第四节 讨论	32
参考文献	33

<b>第三章 假病毒表达载体多克隆位点的构建和包裹外源 长片段 RNA 的研究</b> .....	<b>35</b>
<b>第一节 引 言</b> .....	<b>35</b>
<b>第二节 材料与方 法</b> .....	<b>36</b>
<b>第三节 结 果</b> .....	<b>40</b>
§ 3.1 pAR-h 表达载体的构建结果 .....	40
§ 3.2 pAR-h 阳性克隆菌产生假病毒的验证 .....	41
§ 3.3 多克隆酶切位点的构建 .....	42
§ 3.4 插入各外源片段的表达载体的构建 .....	42
§ 3.5 插入各外源片段的 PCR 验证 .....	43
§ 3.6 插入各外源片段的阳性克隆表达组装出假病毒 .....	44
§ 3.7 逆转录 PCR 验证假病毒包裹的外源 RNA 片段 .....	45
§ 3.8 电镜观察包裹外源 RNA 片段的重组噬菌体结果 .....	46
<b>第四节 讨 论</b> .....	<b>47</b>
<b>参考文献</b> .....	<b>48</b>
<b>第四章 探针编码技术结合假病毒技术用于 HCV 基因实时 分型</b> .....	<b>51</b>
<b>第一节 引 言</b> .....	<b>51</b>
<b>第二节 材料与方 法</b> .....	<b>54</b>
<b>第三节 结 果</b> .....	<b>58</b>
§ 3.1 六个基因型假病毒表达载体 PCR 验证和测序 .....	58
§ 3.2 假病毒的包裹实验 .....	59
§ 3.3 临床样品的提取 .....	60
§ 3.4 实时 RT-PCR 基因分型体系的建立 .....	60
§ 3.5 临床样品的检测 .....	62
<b>第四节 讨 论</b> .....	<b>62</b>
<b>参考文献</b> .....	<b>64</b>
<b>附录：发表交流论文</b> .....	<b>70</b>
<b>致谢</b> .....	<b>71</b>

CONTENTS

**Abstract (In Chinese)**..... 1

**Abstract (In English)** ..... 3

**Chapter I Display the tag-peptide on the bacteriophage MS2 surface and application** ..... 1

Section I Introduction..... 1

Section II Materials and Methods ..... 3

Section III Results..... 9

    § 3.1 The construction of the pAR-H ..... 9

    § 3.2 The VLP-His resist the RNase and (or) DNase ..... 10

    § 3.3 The TEM images of the VLP-His ..... 11

    § 3.4 Cobalt IMAC purified VLP-His and SDS—PAGE analysis . 12

    § 3.5 MALDI-TOF MS analysis ..... 12

    § 3.6 The sucrose density gradient centrifugation ..... 13

    § 3.7 The result of the real time RT-PCR..... 14

Section IV Discussion ..... 15

References..... 17

**Chapter II Production of the Virus-Like Particles with Cysteine Residues on Their Surface and Covalent Decoration**..... 22

Section I Introduction..... 22

Section II Materials and Methods ..... 23

Section III Results.....	27
§ 3.1 Construction of the p ARSC expression vector .....	27
§ 3.2 The sucrose density gradient centrifugation .....	28
§ 3.3 The TEM images of the VLP-Cy .....	28
§ 3.4 The assay of the VLP packaged with foreign fragment .....	28
§ 3.5 The spectral analysis and SDS-PAGE analysis.....	29
§ 3.6 MALDI-TOF-MS assay.....	31
Section IV Discussion.....	32
References.....	33
Chapter III Enlargement of packaging size of foreign RNA fragment by improved the VLP vector .....	35
Section I Introduction.....	35
Section II Materials and Methods .....	36
Section III Results.....	40
§ 3.1 Construction of the pAR-h vector.....	40
§ 3.2 pAR-h vector expressed the VLP.....	41
§ 3.3 The MCS intruded into the pAR-h and pAR-k .....	42
§ 3.4 The construction of the VLP vectors packaged foreign fragments .....	42
§ 3.5 The PCR results of the VLP vectors inserted different forgeign fragments.....	43
§ 3.6 The VLP packaged different foreign.....	44
§ 3.7 The RT-PCR testify the VLP packaged 1415nt foreign RNA fragment .....	45
§ 3.8 The TEM results of the VLP packaged 1415nt foreign RNA fragment .....	46
Section IV Discussion .....	47
References .....	48

Chapte IV HCV genotyping base on VLP technology and probe-encode technology .....	51
Section I Introduction.....	51
Section II Materials and Methods .....	54
Section III Results.....	58
§ 3.1 The PCR results VLP vector and sequence .....	58
§ 3.2 The assay of the VLP packaged.....	59
§ 3.3 The Extraction of the clinical samples.....	60
§ 3.4 Construction of the real-time genotyping system .....	60
§ 3.5 Real time RT-PCR genotyping clinical samples .....	62
Section IV Discussion .....	62
References.....	64
Appendix: Publications.....	70
Acknowledgment.....	71

## 摘 要

本论文围绕着RNA假病毒及探针编码技术展开了研究,研究工作包括His<sub>(6)</sub>-tag标签在RNA假病毒表面的展示和亲和纯化, RNA假病毒表面巯基化及荧光修饰, RNA假病毒表达载体多克隆位点的构建和包裹外源RNA片段的“扩容”实验, 以及用RNA假病毒技术结合探针编码技术对HCV进行基因分型。

第一部分, 用基因工程的方法把噬菌体MS2衣壳蛋白基因及包裹相关的序列构建到pSE380表达载体中, 通过定点突变技术在编码噬菌体MS2的衣壳蛋白基因上N端 $\beta$ -折叠环的中引入唯一的*kpn* I 酶切位点, 在该位点插入编码六个组氨酸的核酸序列。实验证明His<sub>(6)</sub>-tag标签能够展示在假病毒的表面。表面展示有His<sub>(6)</sub>-tag标签的假病毒可以用Co<sup>2+</sup>或Ni<sup>2+</sup>螯合树脂在非变性的条件下进行亲和色谱纯化。

第二部分, 以装载SARS外源RNA片段的RNA假病毒表达载体pAR-S为基础, 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。用马来酰亚胺-5'-荧光素对表达产物进行化学修饰, 实验证明巯基暴露在包裹了目的外源RNA片段的假病毒的外表面, 并能与马来酰亚胺-5'-荧光素进行反应。这种携带外源RNA片段的天然纳米颗粒为制备各种功能性纳米材料提供了新途径。

第三部分, 以RNA假病毒表达载体pAR-k为基础, 通过删除表达载体的冗余序列得到了pAR-h表达载体。将pAR-k质粒和pAR-h质粒进一步引入一个多克隆酶切位点。改造后的质粒称为pAR-k'质粒和pAR-h'质粒。然后对pAR-k'质粒和pAR-h'质粒进行外源RNA片段的扩容实验, 最后获得能够包裹1415nt外源RNA片段的假病毒, 这是迄今为止国内外报道的包裹最长外源RNA片段的假病毒。

第四部分, RNA假病毒作为质控品结合探针编码技术, 建立了简



单、快捷、高通量，同时又便于质量控制的HCV基因分型方法。该方法在对23份厦门地区EILSA检测阳性临床标本进行基因分型时，其中有4份标本RT-PCR不能扩增，其余19份都准确定出基因型。

**关键词：**RNA假病毒；亲和纯化；荧光修饰；包裹外源RNA；探针编码技术；基因分型

## ABSTRACT

This dissertation consists of four parts. The first part is the His-tag peptides displaying on the surface of viral like particles (VLP) and Affinity chromatography purified, the second part is that displayed cysteine residues on viral like particles surface and fluorescent modified, the third part is that MCS introduced into the VLP expression vector and the enlargement of packaging size of foreign RNA fragment by improved VLP expression vector pAR-k and the last part is HCV genotyping base on VLP technology and probe-encode technology.

In the first part, we have constructed a plasmid expression vector for the coat protein and maturase protein of RNA bacteriophage MS2 called pAR-K. The expression vector has a unique *kpn* I restriction site at the bacteriophage MS2 coat protein gene N-terminal  $\beta$ -hairpin loop central part. Insertion of DNA oligonucleotides codened tag-peptides at this *kpn* I site allows the production of MS2 coat proteins having tag-peptide sequences expressed at the central part of the  $\beta$ -hairpin loop. The MS2 coat protein with His-tag peptide is able to self-assembled to be viral like particles (VLP), and the His-tag peptide can expose on the surface of the particle. The VLP with His-tag peptides on it surface (VLP-His) enables to purify with cobalt IMAC resin under native condition.

In the second part, Site-directed mutagenesis was performed at the codon 15 of the MS2 bacteriophage coat protein gene, which has 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 $\alpha$ . The positive clones were selected and

proliferated. The harvested cells were treated with sonication and the supernatant of sonication was then subject to linear sucrose density gradients centrifugation (15% to 60%) at 32,000 rpm for 4h at 4°C. The virus-like particles, VLP-Cy, were collected at 35% sucrose density. The particles were examined by transmission electron microscopy, which revealed the presence of spherical viral particles of approximately 27 nm in diameter. The thiolated 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. These studies highlight the versatility of MS2 bacteriophage capsids as building blocks for functional nanomaterials construction with a variety of applications.

In the third part, we reported here the construction of vectors that could co-express both maturase protein and coat protein of MS2 bacteriophage. These proteins could form VLP that contain a foreign RNA fragment through self-assembly. A modified expression vector, pAR-h, was first constructed from pAR-k by cutting the sequence between its *Pst* I restriction site and the terminator. Then we compared the induced VLP in their abilities of packaging foreign RNA fragments of varied length. The results showed that foreign RNA fragment as long as 1415bp could be packaged by pAR-h' induced VLP while only 1000bp could at most be packaged by pAR-k' induced VLP. The enlargement of packaging size of foreign RNA fragment by improved VLP expression vector forms the base for widespread applications.

In the last part, HCV genotyping base on VLP technology and probe-encode technology. The feasibility of this method was first tested by detecting the six different genotypes of HCV in China with constructed VLP RNA templates. The robustness of this approach was then validated by genotyping of the six different genotypes with HCV clinical samples.

**Keywords:** Virus-like particle/Psuedo-virus; Affinity chromatography; Fluorescent decoration; Probe encode technology; Genotyping

# 第一章 六个组氨酸短肽标签在假病毒表面的展示及其亲和纯化

## 第一节 引言

目前,有许多关于病毒作为功能性载体和病毒表面展示抗原表位的研究<sup>[1, 2]</sup>。并且抗原表位通常是和病毒的衣壳蛋白以融合的形式存在,这就使外源短肽展示在病毒颗粒的表面变得灵活、容易。如 M13 丝状 DNA 噬菌体通常用于构建较大外源片段的抗体库,来获得已知或未知的亲和配体<sup>[3]</sup>。而 RNA 噬菌体用于外源肽的展示也备受研究者的青睐,则是由于这类噬菌体的结构已在分子层次上研究得非常的深入。

自从 1961 年 Loeb 和 Zinder 发现 RNA 噬菌体以来<sup>[4]</sup>,以 RNA 噬菌体作为系统模型已被用于探讨分子生物学中的各种问题。RNA 噬菌体结构简单容易培养,用它来解释翻译起始以及基因表达调控方面特别有优势。使它成为在分子水平上研究核酸-蛋白质和蛋白质-蛋白质相互作用的模式系统<sup>[5-7]</sup>。

MS2 噬菌体是正义单链 RNA 病毒,基因组全长为 3569nt,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<sup>[8-11]</sup>。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 19nt 的发夹结构克隆到表达载体 pSE380 上,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 19nt 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 的假病毒<sup>[12-16]</sup>。该假病毒与 MS2 噬菌体类似,能够耐受核酸酶的降解,具

有较好的稳定性<sup>[17]</sup>。

衣壳蛋白二聚体结合复制酶起始区的 19nt 的核苷酸发夹结构（称翻译操纵基因或 TR 序列），触发噬菌体 RNA 包入衣壳内<sup>[18-23]</sup>。但是装配并不要 RNA，而完整的 RNA 分子甚至仅是 19nt 核苷酸发夹结构能够促进衣壳蛋白的聚合反应<sup>[24-26]</sup>。RNA 在衣壳形成过程中所起的作用目前还不是很清楚，但是重组的衣壳蛋白在缺少特异性结合位点的 RNA 时，含类似发夹结构的异源的 RNA 分子能被包入衣壳内<sup>[27-32]</sup>。用 X 射线晶体学和 NMR 等手段对 19nt 的核苷酸片段掺入衣壳的结构研究，使人们在分子水平上理解核酸—蛋白质相互作用取得了巨大的进展<sup>[33-36]</sup>。

多聚组氨酸能与多种过渡金属和过渡金属螯合物结合，因此带暴露多聚组氨酸（一般 6 个）的蛋白能与固化  $\text{Co}^{2+}$  或  $\text{Ni}^{2+}$  的树脂结合，用适当缓冲液洗去杂蛋白，再用可溶的竞争性螯合剂洗脱可以回收靶蛋白，该方法已广泛用于蛋白质的纯化<sup>[37-40]</sup>。

当前，国内外还没有关于在病毒颗粒表面展示亲和短肽用于亲和纯化的报道。显然，如果我们能将多聚组氨酸展示到 MS2 的表面，并用  $\text{Co}^{2+}$  或  $\text{Ni}^{2+}$  螯合树脂对其进行亲和纯化。这将拓展了亲和纯化的概念和应用范围。为了证实这个想法的可行性，我们用基因工程的方法把噬菌体 MS2 衣壳蛋白基因及包裹相关的序列构建到 pSE380 表达载体 *trc* 启动子的下游，通过定点突变技术在编码噬菌体 MS2 的衣壳蛋白基因上 N 端  $\beta$ -折叠环的中间突变成一个唯一的 *kpn* I 酶切位点<sup>[41-43]</sup>，用 *kpn* I 限制性内切酶切开该载体并插入编码六个组氨酸的核酸序列（图 1-1）。组氨酸短肽在衣壳蛋白组装成假病毒时能够展示在其表面。表面展示有六个组氨酸的假病毒可以用  $\text{Co}^{2+}$  或  $\text{Ni}^{2+}$  螯合树脂在非变性的条件下进行亲

和色谱纯化。

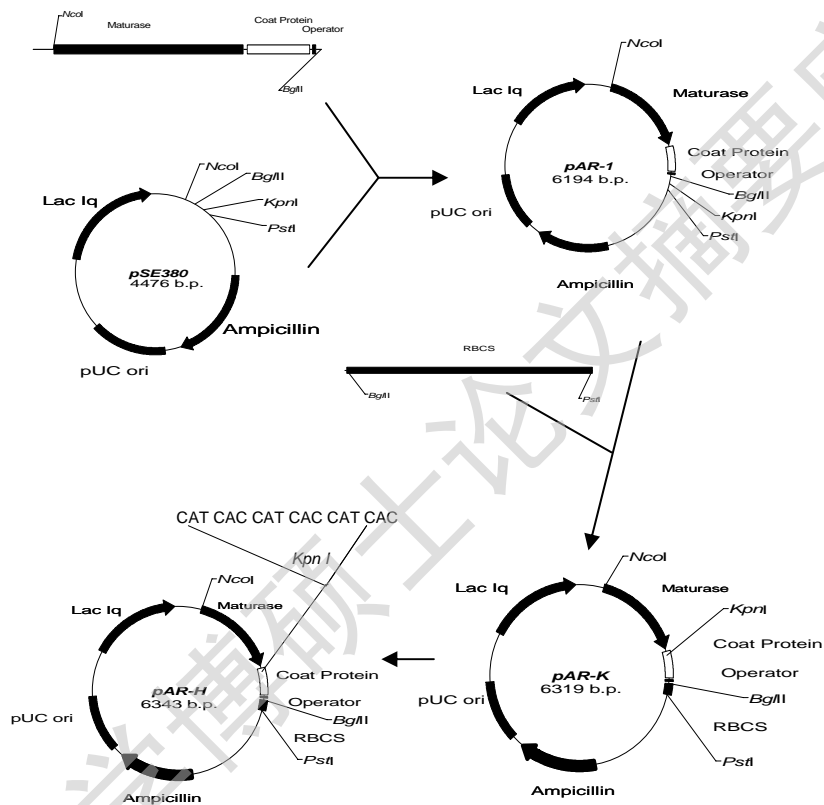


图 1-1 pAR-H 表达载体的构建

Figure 1-1. The demonstration of construction of pAR-H expression vector

## 第二节 材料与方法

### § 2.1 *E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞的制备

挑取单菌落至 2 mL LB 液体培养基中，37°C 振荡过夜。取 500  $\mu$  L 过夜培养的菌液，接种于 50 mL LB 液体培养基中，培养至 OD<sub>600</sub>

的值为 0.3 左右, 转移到 50 mL 灭过菌的离心管中, 冰浴 30 min 后, 在 4℃ 条件下 4, 000 rpm 离心 10 min。弃去上清, 加入 30 mL 0.1mol/L 的  $MgCl_2$ - $CaCl_2$  溶液悬浮沉淀, 冰浴 5 min, 在 4℃ 条件下 4, 000 rpm 离心 10 min。弃去上清, 加入 2mL 含 15% 甘油的  $CaCl_2$  (浓度为 0.1mol/L) 溶液悬浮细胞, 每管按 200  $\mu$ L 分装, -80℃ 保存备用。

## § 2.2 质粒的提取

挑取单菌落, 接种于 5mL LB 液体培养基中 (含氨苄 100  $\mu$ g/mL), 37℃ 振荡培养过夜。12, 000rpm 离心 30s 收集菌体于 1.5mL eppendorf 管中, 并弃去上清, 重复 2~3 次。加入 100  $\mu$ L 溶液 I, 旋涡混合器振荡使沉淀完全悬浮。加入 200  $\mu$ L 溶液 II, 轻轻翻转几下, 使菌体裂解。加入 150  $\mu$ L 溶液 III, 轻轻翻转几下, 置冰浴 5min。12, 000rpm 离心 10min。取上清, 加入等体积的酚-氯仿-异戊醇, 振荡混匀, 14, 000rpm 离心 5min。取上清, 加入 2 倍体积无水乙醇, -20℃ 放置 20min。在 4℃ 条件下 14, 000rpm 离心 10min。弃去上清, 沉淀用 70% 乙醇洗二次, 室温干燥。加入 50  $\mu$ L 的 TE 缓冲液溶解沉淀, -20℃ 储存备用<sup>[44]</sup>。

## § 2.3 DNA 片段的回收

DNA 片段用胶回收试剂盒回收。切下含 DNA 的琼脂块 (尽可能小), 放入 1.5 mL Eppendorf 管中。按每 100mg 琼脂糖加入 300  $\mu$ L S1 溶液的比例加入 S1 溶液, 置 55℃ 水浴 10min, 每 2min 颠倒混匀一次。若琼脂糖重量小于 100mg, 用 ddH<sub>2</sub>O 补充至 100mg。务必确保琼脂糖块完全溶化, 高浓度的 Agarose 胶 (>2%) 及一些特殊的胶需要增加 S1 溶液的使用量。加入 1/3 S1 溶液体积的异丙醇, 混匀, 55℃ 水浴 1min。(总体积此时为 500  $\mu$ L) 将溶化后的 Agarose



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫