

MS2 病毒样颗粒原核表达优化及颗粒稳定性测试

张国广^{1,2}, 欧阳莹², 刘颖², 黄小君², 陈亮^{2*}

(1.闽南师范大学 生物科学与技术学院, 福建 漳州, 363000; 2.厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门, 361005)

摘要: MS2 噬菌体病毒样颗粒广泛用于构建 RNA 病毒检测中的阳性对照品. 本文基于已构建的表达载体 pCPHA, 优化了表达载体在 BL21(DE3)细胞中的表达条件. 结果表明在 LB 培养基中, 菌液 OD₆₀₀=0.9 时, 加入 IPTG 诱导 6h, 外壳蛋白的表达量达到最大, 电镜下观察到表达出的产物呈现 MS2 噬菌体病毒颗粒结构, 该病毒样颗粒在常温下至少可以保存 60 d, 64℃ 温度时 30 min 内结构保持稳定.

关键词: MS2 噬菌体; 病毒样颗粒; 表达量优化; 稳定性

中图分类号: Q786 文献标志码: A 文章编号: 2095-7122(2014)04-0062-05

Expressional Optimization of Prokaryotic Expression Vector of MS2 Phage and Assay of the Stability of Virus-like Particles

ZHANG Guo-guang^{1,2}, OU Yang-ying¹, LIU Ying¹, HUANG Xiao-jun¹, CHEN Liang¹

(1.School of Biological Science and Biotechnology, Minnan Normal University, Zhangzhou, Fujian 363000, China;

2.School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: Virus-like particle of MS2 bacteriophage was widely used as a kind of positive control in detection of RNA virus. Several expressional conditions of pCPHA vector that pack hemagglutinin (HA) gene segment of avian influenza virus were optimized inside *E. coli* BL21 (DE3) cell. The results showed coat protein expression level reaches the maximum at the broth OD₆₀₀ of 0.9, IPTG induction 6h and LB liquid medium. Expression product morphological structure was the same as MS2 bacteriophage virus particles under scanning electron microscope. The structure of virus-like particle was stable at normal temperature for at least 60d and 64℃ for at least 30min.

Key words: MS2 bacteriophage; virus-like particle; optimization of expression; stability

大肠杆菌 MS2 噬菌体是一种球状病毒,其基因组是全长 3659 bp 的单链 RNA 构成,基因组上主要由四种蛋白基因组成,分别为编码成熟酶蛋白(或 A 蛋白)、外壳蛋白、复制酶蛋白和裂解蛋白的基因,蛋白质是病毒外壳的主要成分,180 拷贝的外壳蛋白和一拷贝的成熟蛋白组成一个完整的病毒外壳,基因组 RNA 被包裹在外壳蛋白内^[1]. 研究文献报道构建出的原核表达载体中在多克隆位点按照顺序插入 5' 非编码序列、成熟酶蛋白基因和外壳蛋白基因序列后, IPTG 诱导能够得到和野生噬菌体形态相同的病毒样颗粒(virusal like particle, VLP),该颗粒内部能够包裹 RNA 分子,且具有耐核酸酶的特性^[2-7]. 如果将一段外源基因片段插入到包装位点的下游,对表达载体进行诱导表达,在表达出蛋白的同时可以将噬菌体自身基因组和外源基因片段转录成 RNA,而后进行的病毒颗粒组装时可以将上述转录出的 RNA 包装入病毒颗粒内形成所谓的盔甲 RNA(Armored RNA)^[2-7]. 盔甲 RNA 技术被广泛应用于 RNA 病毒检测中质控品的

收稿日期: 2014-06-11

作者简介: 张国广(1973-),男,河南省遂平县人,副教授.

* 为通讯作者.

构建^[2-7],人们认为这种蛋白-RNA复合体的结构与RNA病毒相似,在进行病毒检测操作时基本能准确体现病毒RNA的提取过程,能大大减少操作过程中出现的错误率,另外这种病毒样颗粒自身无法复制,具有很好的生物安全性.之前按照文献^[2-6]步骤在构建高致病性H5N1禽流感病毒实时荧光PCR检测的质控品时发现^[7],构建的载体在原核细胞内诱导表达时假病毒颗粒产量较低,本文探讨了因素对原核细胞基因工程表达菌株MS2外壳蛋白表达量的影响,同时测试了诱导表达出的假病毒颗粒的稳定性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

BL21(DE3) *E.coli*, pCPHA^[7]表达载体为之前构建保存于本实验室;DNase、RNaseA和DNA Marker等试剂购自大连宝生物工程有限公司;IPTG、氨苄青霉素和Protein Marker购自生工生物工程(上海)股份有限公司;5×蛋白缓冲液、SDS-PAGE配制溶液、磷酸盐缓冲液和电转缓冲液等均按分子克隆实验指南^[8]进行配制。

1.2 实验方法

1.2.1 pCPHA的原核表达、表达产物的纯化及颗粒形态观察

将保存的测序正确的pCPHA表达载体转化BL21(DE3) *E.coli*,挑取阳性克隆扩大培养,加入IPTG诱导表达6h;离心收集菌体沉淀,用PBS缓冲液重悬,冰浴中超声破碎至清亮,离心收集上清,得到pCPHA的诱导表达产物,即溶解于上清液中的包裹H5N1 HA片段RNA的MS2 VLP. VLP初步纯化方案采用文献^[8]从大规模裂解物中制备λ噬菌体颗粒章节中用PEG沉淀噬菌体颗粒的步骤进行.将初步纯化的产物用蔗糖密度梯度离心进一步纯化后,用醋酸铀染色5 min,自然干燥2 h,在扫描电镜(JSM6390)下观察其形态,以上操作参考文献^[4]。

1.2.2 病毒样颗粒发酵产量的优化

病毒样颗粒发酵产量的优化中外壳蛋白表达量的比较是通过SDS-PAGE电泳后,观察凝胶上外壳蛋白条带亮度的方法进行.不同条件表达出的蛋白均经过PEG初步纯化后,取样品溶液20 μL与蛋白上样缓冲液混匀,沸水中煮5 min,取10 μL进行SDS-PAGE电泳,在操作过程中保持所有步骤的同步性与可比性,SDS-PAGE操作步骤参照文献^[8]。

1.2.2.1 不同培养基对外壳蛋白产量的影响

将活化的pCPHA菌株分别培养在高浓度肉汤培养基, LB液体培养基, pMAL液体培养基及SOC液体培养基中,均振荡培养至OD₆₀₀为0.9后加入IPTG至终浓度为1 mmol/L,相同条件下,诱导表达6 h。

1.2.2.2 IPTG加入时菌液OD值及诱导时间对外壳蛋白产量的影响

在LB液体培养基中(氨苄青霉素抗性)接种活化的pCPHA菌株,37℃振荡培养,在OD₆₀₀值为0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0时,分别加入IPTG至终浓度为1 mmol/L,诱导表达6 h. LB液体培养的pCPHA菌株振荡培养至OD₆₀₀值为0.9时加入IPTG,在相同条件下,分别诱导表达3 h、4 h、5 h、6 h、7 h、16 h。

1.2.3 病毒样颗粒的时间稳定性和热稳定性测试

将15管100 μL经过初步纯化的VLP溶液分别放置于三种温度条件下(室温、4℃、-20℃),分别在第9 d、18 d、30 d、60 d和第90 d时,通过凝胶电泳观察颗粒中所包裹的RNA的条带亮度,判断VLP的时间稳定性.将超声破碎后表达产物于37℃、45℃、64℃、72℃水浴中各放置30 min后琼脂糖凝胶电泳观察其所包裹的RNA的条带亮度,判断VLP的热稳定性。

2 结果与分析

2.1 pCPHA表达载体的表达

pCPHA表达载体转化BL21(DE3) *E.coli*后构建的工程菌株加入IPTG诱导表达6 h后的产物,经系列纯化后在扫描电镜下可以观察到直径大约为26 nm的颗粒状蛋白粒子(图1),其形态与MS2病毒颗粒类似,表明本研究构建的pCPHA工程菌株经诱导后可以表达出预期的VLP。

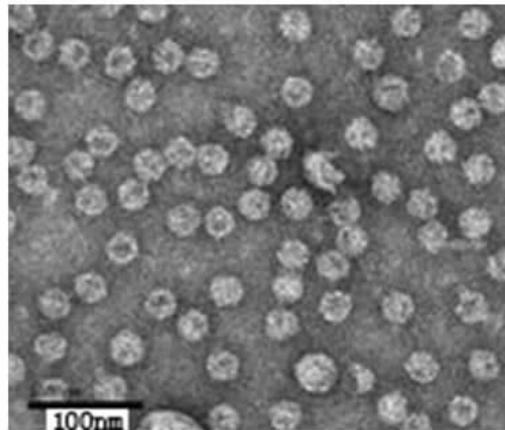


图 1 pCPHA 载体表达产物的电镜观察结果

2.2 病毒样颗粒表达量的优化

2.2.1 培养基对外壳蛋白表达量的影响

pCPHA 菌株在高浓度肉汤、LB、pMAL、SOC 四种培养基中诱导表达 6 h 后，表达产物 SDS-PAGE 电泳结果表明培养基对 MS2 外壳蛋白的表达量有一定影响(图 2 箭头所示)，高浓度肉汤培养基中外壳蛋白表达量很小，另外 3 种培养基中外壳蛋白的表达量差别不明显。

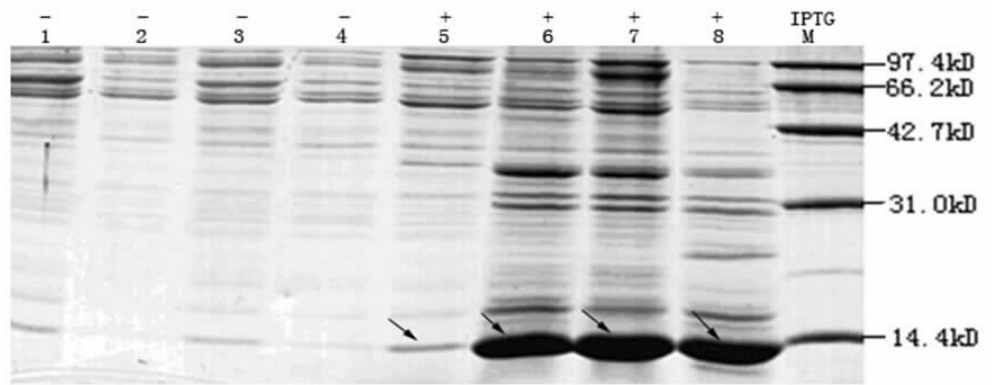


图 2 pCPHA 诱导表达受培养基的影响效果

注:1 和 5 均为高浓度肉汤培养基;2 和 6 均为 LB 培养基;3 和 7 均为 pMAL 培养基;4 和 8 均为 SOC 培养基;M 为 protein Marker

2.2.2 诱导初始菌液 OD 值对外壳蛋白产量的影响

pCPHA 菌株不同 OD₆₀₀ 时加入 IPTG 诱导 6 h，表达产物 SDS-PAGE 电泳结果表明在 OD₆₀₀ 值为 0.9-1.0 时加入 IPTG 得到的外壳蛋白量较大(图 3 箭头所示)。

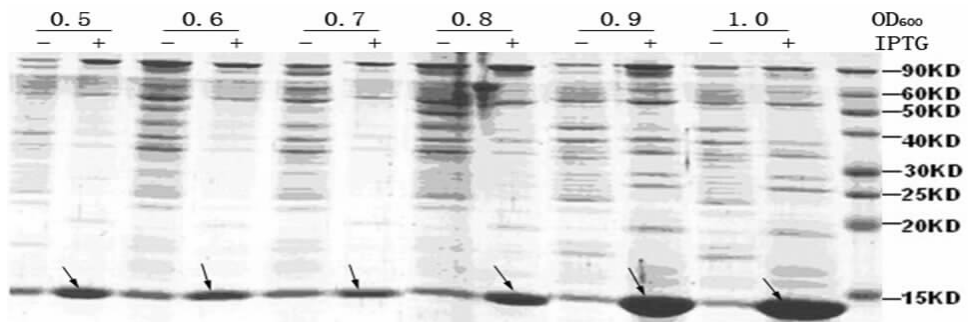


图 3 pCPHA 在不同 OD₆₀₀ 值下诱导表达结果

2.2.3 诱导时间对外壳蛋白产量的影响

IPTG 诱导表达开始后外壳蛋白的产量随着诱导时间的增加而缓慢增加,从蛋白条带的亮度比较诱导 6 h 后表达量达到最大,因此最佳诱导表达时间为 6 h(图 4 箭头所示).

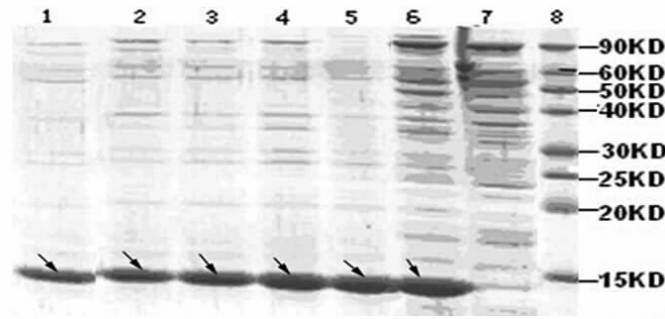


图 4 不同诱导时间对 pHACPI 诱导表达效果的影响

注:1-6 分别指诱导表达 3 h、4 h、5 h、6 h、7 h、16 h,7 没有加入 IPTG,8 蛋白 Marker

2.3 病毒样颗粒的时间稳定性实验结果

PEG 初步纯化的 VLP 时间稳定性实验结果表明,该颗粒在室温条件下放置 30 d(图 5),4℃条件下放置 60 d,-20℃条件下保存 90 d,然后用 RNase A 或/和 DNase I 酶切后,凝胶电泳仍然可以观察到约 1000bp 的目标荧光条带,说明本研究表达的 VLP 对内部包裹 RNA 有很好的保护,即该颗粒结构具有良好的时间稳定性.

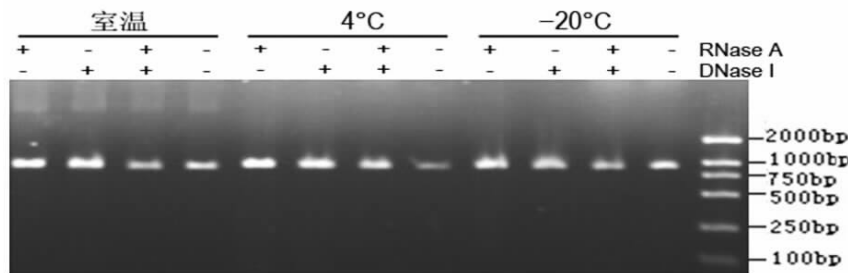


图 5 病毒样颗粒室温、4℃、-20℃保存 30 d 后单双酶消化电泳结果

2.4 病毒样颗粒的热稳定性实验结果

表达菌株诱导表达后,超声破碎上清于室温、37℃、45℃、64℃、72℃水浴中各放置 30 min 后琼脂糖凝胶电泳结果表明,病毒样颗粒在室温、37℃、45℃和 64℃的温度中放置 30 min 仍然存在清晰的约 1000 bp 的目的荧光条带(图 6),说明表达的 VLP 有很好的热稳定性,即使在 64℃的高温中也至少在 30 min 内能够保持颗粒的稳定.同时也观察到只有在 45℃时候细菌自身 RNA 在 30 min 内能被自身的核酸酶消化掉,温度高于或低于 45℃的处理中泳道内都呈现有细菌自身 RNA 的残留,推测细菌自身的核酸酶最适温度在 45℃左右.

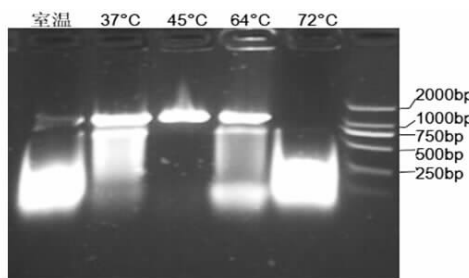


图 6 病毒样颗粒的热稳定性实验

3 结论与讨论

MS2 噬菌体被广泛用于制备 RNA 病毒检测的质控品,但其在大肠杆菌中的表达量却需要提高,本研究对之前构建的 pCPHA 工程菌株表达量进行了优化,探讨了培养基、加入诱导物时菌液浓度及诱导表达时间对外壳蛋白表达的影响, LB、pMAL、SOC 培养基均适合用于该工程菌株表达,工程菌株的初始诱导 OD₆₀₀ 为 0.9 时开始加入 IPTG,诱导 6h 后外壳蛋白的表达量可以达到最大,经过优化后假病毒颗粒的产量得到一定程度的提高.病毒样颗粒的时间稳定性和耐热性检测结果表明该病毒样颗粒在长时间存放和高温处理中能有效对其内部包裹的 RNA 进行保护.根据本文对 VLP 热稳定性的研究结果优化了工程菌超声破碎上清液中 RNA、细胞碎片及杂质蛋白去除这一步骤.采用将细胞破碎液 45℃静置 30 min 或 37℃中放置 8 h,用菌体破碎液中细菌自身的核糖核酸酶消化其中的 RNA;然后放入 64℃水浴中处理 30 min,在 64℃温度下细胞碎片及其它一些杂蛋白也会很快变性而沉淀下来,有利于后续对假病毒颗粒的纯化.文献[2-6]一般都是通过加入过量 RNase A 后 37℃消化除去的细菌菌体破碎液中 RNA 杂质的,大量制备中添加强量 RNase A 进行 RNA 的消化会增加成本,采用优化方案后既降低了纯化成本又简化了操作.

参考文献:

- [1] 贾盘兴. 噬菌体分子生物学——基本知识和技能[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [2] Pasloske B L, Walkerpeach C R, Obermoeller R D, et al. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(12): 3590-3594.
- [3] Cheng Yangjian, Niu Jianjun, Zhang Yongyou, et al. Preparation of His-Tagged armored RNA phage particles as a control for real-time reverse transcription-PCR detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus[J]. Journal of clinical microbiology, 2006, 44(10): 3557-3561.
- [4] 奚敏, 张国广, 于广福, 等. 含口蹄疫病毒 IRES RNA 病毒样颗粒表达载体的构建[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(9): 31-35.
- [5] Zhan Sien, Li Jinming, Xu Ruihuan, et al. Armored long RNA controls or standards for branched DNA assay for detection of human immunodeficiency virus type 1[J]. Journal of clinical microbiology, 2009, 47(8): 2571-2576.
- [6] Song Liqiong, Sun Shipeng, Li Bo, et al. External quality assessment for enterovirus 71 and coxsackievirus A16 detection by reverse transcription-PCR using armored RNA as a virus surrogate[J]. Journal of clinical microbiology, 2011, 49(10): 3591-3595.
- [7] 张国广, 郭迟鸣, 欧阳莹, 等. 病毒样颗粒为阳性对照的 H5N1 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2014, 53(3): 416-421.
- [8] Joseph Sambrook, Russell David W. 分子克隆实验指南[M]. 第三版. 黄培堂等译. 北京: 科学出版社, 2002.

[责任编辑: 喻玉萍]