

海洋噬菌体 EJ(3) 9P1 ORF 172基因的克隆与表达

董浩^{1,2}, 艾云灿^{*}

(1 中山大学 生命科学院, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275 2 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

摘要: 通过 PCR 的方法对海洋噬菌体 EJ(3) 9P1 中 ORF172 基因进行克隆, 并构建了表达载体 pET28-ORF172 转入大肠杆菌 BL21, 在 IPTG 诱导下进行表达, 并通过 SDS- PAGE 对表达结果进行分析。结果成功构建了 ORF172 的表达体系, 为进一步开展噬菌体 EJ(3) 9P1 的尾丝基因结构与功能研究奠定基础。

关键词: 海洋噬菌体; ORF 172 克隆; 表达

中图分类号: Q933 文献标志码: A 文章编号: 1000- 2286(2010) 06- 1253- 04

Cloning and Expression of ORF 172 Gene of a Marine Bacteriophage(EJ(3) 9P1)

DONG Hao^{1,2}, AI Yun-can^{*}

(1 State Key Lab of Biocontrol, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China 2 Department of Life, Jilin Agriculture University, Changchun 130118, China)

Abstract The gene ORF 172 of EJ(3) 9P1, a marine bacteriophage was cloned by PCR and inserted into the prokaryotic expression vector pET- 28a(+). The recombinant plasmid pET28- ORF172 was transformed into the BL21 cell to express the protein by induction with IPTG. The result showed that the system of the ORF 172's expressing had been established. This study provides a useful tool that will prove its efficacy in the studies of gene function of the bacteriophage tail's genes.

Key words marine bacteriophage; ORF 172; cloning; expression

噬菌体是海洋环境中最丰富的生物体种类之一, 多样性极其丰富^[1]。目前已经或正在被测序的海洋噬菌体大约有几十个^[2-4], 与海洋噬菌体的庞大数量相比微不足道。EJ(3) 9P1 是我们实验室自行分离和鉴定的一种海洋噬菌体, 已经完成了全基因组序列测定和分析。噬菌体 EJ(3) 9P1 基因组是一个全长为 173 800 bp 的闭合环状双链 DNA 分子, G + C 含量为 39.6%, 含有 268 个预测的蛋白质编码开放阅读框 (ORFs), 15 个 rRNA 编码基因, 64 个 T4- like 启动子, 32 个不依赖于 rho 因子的转录终止子^[5-8]。其中 ORFs 平均长度为 595 bp, 编码区占基因组的 91.94%。预测的 268 个 ORFs 中有 118 个与已知功能的基因有同源性, 68 个与已知的未表征的基因有同源性, 有 82 个是特有基因, 没有比对上任何已知的序列。使用得最多的起始密码子是 AUG, 有 246 个 ORFs 使用, 占 91.8%, 起始密码子 GUG 和 UUG 则用得比较少。终止密码子 UAA 有 156 个 ORFs 使用, 占 58.2%; UGA 有 90 个 ORFs 使用, 占

收稿日期: 2010- 06- 10 修回日期: 2010- 10- 26

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2006AA09Z420)

作者简介: 董浩 (1979-), 男, 讲师, 博士生, 主要从事微生物学研究, E-mail Donghao_jlau@ 163.com; * 通讯作者:

艾云灿, 教授, 博士生导师, E-mail Lssay@mail.sysu.edu.cn

30.6%; UAG用得最少。其中 ORF172序列分析结果显示与 T4噬菌体的尾丝基因有较高同源性^[9-10]。本文报道克隆和表达 ORF172的研究结果,为进一步开展功能鉴定研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 大肠杆菌 DH5 α (TaKaRa), pET-28b(+)(Novagen), 噬菌体 EJ(3)9P1由本实验室提供。

1.1.2 试剂 TaKaRa基因组 DNA 提取试剂盒、TaKaRa质粒提取试剂盒、TaKaRa胶回收试剂盒、各种限制性内切酶、Taq酶、T4连接酶 (TaKaRa); 中范围蛋白质标准分子量 (MBI); G-herView 染料 (SBS)。PBS缓冲液 (pH 7.2); Tris缓冲液 (pH 7.2); TAE电泳缓冲液; Tris-甘氨酸电极缓冲液。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取及 ORF172 序列的 PCR 克隆 按照 TaKaRa基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行操作,提取 EJ(3)9P1噬菌体基因组 DNA。设计的 PCR 扩增引物序列为 5' - TGAGGATCCTATG-GCAACTATCA - 3' (下划线为 *Bam*H I 酶切位点)和 5' - CCCAAGCTTCTGTACTGCC - 3' (下划线为 *Hind* III 酶切位点)。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 3 min; 94 $^{\circ}$ C, 45 s; 57 $^{\circ}$ C, 45 s; 72 $^{\circ}$ C, 90 s 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 10 min。扩增得到的 PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳成像,按照 TaKaRa 胶回收试剂盒说明书操作纯化和回收 ORF172 序列的 PCR 扩增产物, -20 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.2.2 表达载体 pET28-ORF172 的构建及鉴定 提取 pET-28b(+)质粒,与 1.2.1 得到的 PCR 产物分别用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切,酶切产物经电泳切胶和纯化回收后按照 Vector: Insert= 1: 10 进行 T4 连接酶连接,连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞,挑选阳性菌落,通过菌落 PCR 和双酶切进行鉴定。

1.2.3 pET-28-ORF172 的 IPTG 诱导表达 将 pET-28-ORF172 的 BL21(DE3) 转化子分别接种至含有 25 μ g/mL 卡拉霉素的 5 mL LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C, 200 r/min 过夜培养; 按 1% 的接种量接到含有 25 μ g/mL 卡拉霉素的 50 mL LB 液体培养基的三角瓶中, 30 $^{\circ}$ C, 200 r/min, 4 h OD_{600} 达 0.4~0.6 加入 IPTG (100 mmol/L) 500 μ L 至终浓度为 1 mmol/L 诱导,继续 30 $^{\circ}$ C, 200 r/min, 每间隔 1h 取诱导后的菌液 1 mL; 将 1 mL 菌液离心,转移上清至另一新管中待用,细菌沉淀用 50 μ L PBS 溶液重悬, -20 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.2.4 pET-28-ORF172 表达产物 SDS-PAGE 分析 细菌沉淀加入 50 μ L 2 \times SDS 样品缓冲液,振荡 15 s, 100 $^{\circ}$ C 煮 5 min 冷却至室温, 12 000 r/min 离心 2 min 采用 125 g/L 的 SDS-PAGE 胶,浓缩胶 50 g/L, 取 10 μ L 样品电泳,电泳完毕进行银染显色。

2 结果

2.1 ORF172 序列的 PCR 扩增

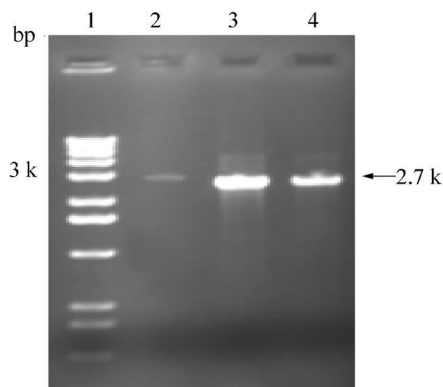
扩增出 ORF172 的特异条带在 2 700 bp 左右,与预测的 2 772 bp 大小相符 (图 1)。

2.2 pET28-ORF172 双酶切分析及菌落 PCR 鉴定

构建的表达载体 pET28-ORF172 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,得到 5.3 kb 和 2.7 kb 2 条片段 (图 2), 分别对应 pET-28 和 ORF172 的大小,与预期结果一致。以 pET28-ORF172 重组子做模板进行 PCR 扩增,得到长度约为 2.7 kb 的片段,与 ORF172 大小相符 (图 3)。

2.3 pET28-ORF172 表达的 SDS-PAGE 分析

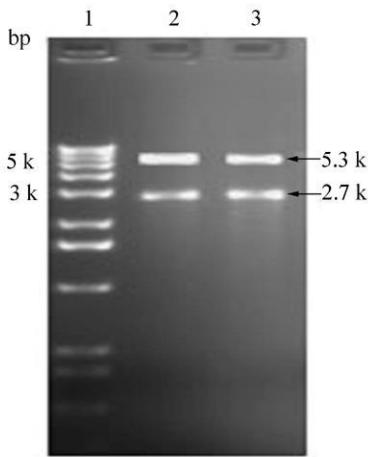
含有重组载体 pET-28-ORF172 的细菌经过 IPTG 诱导表达后,在总蛋白的 66.2~116 kD 分子量



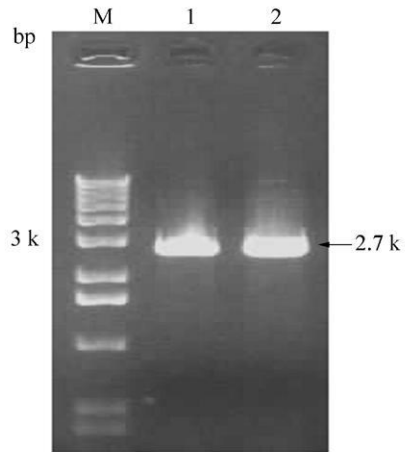
1 marker 2 3 4 ORF172.

图 1 ORF172 PCR 扩增结果

Fig 1 PCR products of ORF172



1: marker 2 3 pET28- ORF172 双酶切产物。
1: marker 2, 3 pET28- ORF172
图 2 pET28- ORF172 双酶切鉴定结果
Fig 2 Results of recombinant plasmid



M: marker 1, 2 PCR 产物。
M: marker 1, 2 PCR products
图 3 pET28- ORF172 菌落 PCR 鉴定结果
Fig 3 PCR products of the recombinant plasmid's strain

范围之间有 1 条蛋白表达带 (图 4 箭头所指), 大小约 97 kD, 与预测的 ORF172 蛋白分子量相符。pET-28-ORF172 在诱导表达后第 4-5 h 表达量最大。

3 讨论

随着致病性细菌耐药性的加剧, 以及免疫抑制病人的并发症发生率增高, 人类正面临着严峻的现实——重新回到“抗生素发现以前的时代”。目前寻找有效的抗菌制剂已成为现代医药工业中的紧要问题。在这样的时代背景下, 噬菌体治疗的研究重新进入人们的视野^[11]。

有尾噬菌体 (tailed phage) 在噬菌体中数量最多, 且壳体结构变化最大, 最常见的有尾噬菌体包括 T4 T7 P22 λ φ29 等^[12]。有尾噬菌体的壳体由头部和尾部组成, 头部和尾部通过颈部相连, 头部通常呈二十面体对称, 尾部呈螺旋对称。在已测序的海洋噬菌体中, 绝大部分是有尾噬菌体。T4 噬菌体长尾丝的装配和附着于尾板 6 个角顶由 8 个基因控制。其中 4 个基因 (37, 36, 39, 34) 的相应蛋白质为尾丝的结构组分; 其余 4 个基因 (38, 57, 63, Wac) 起附属和催化作用^[13-14]。T4 感染机制涉及二组尾丝蛋白与宿主细胞表面受体相互作用, 这些蛋白分别是长尾丝和短尾丝, 围绕噬菌体尾的基板每个对称安排 6 个补充物识别宿主感染。长尾丝负责起始, 病毒可逆的附着于宿主细胞。至少 3 个长尾丝结合以后, 短尾丝不可逆的结合它的受体, 当尾鞘其后收缩时, 短尾丝起不能伸展的作用, 阻止噬菌体颗粒从细胞表面收缩, 因此保证尾管进入细胞包膜^[15]。

目前关于噬菌体尾丝基因的报道不多, 噬菌体尾部的结构与功能是决定感染宿主范围的第一个关键因子^[16], 研究噬菌体尾丝基因的结构和功能多样性非常必要。前期工作显示, ORF172 与 T4 噬菌体尾丝基因有较高同源性, 我们尝试克隆和表达 ORF172 以便开展功能鉴定研究。起初考虑到由于 ORF172 蛋白分子量大, 希望采用胞外表达载体将 ORF172 蛋白重组表达后分泌到胞外, 但是结果发现表达量极少或者分泌量很少。因此, 本实验采用胞内原核表达载体 pET-28(b+) 进行胞内重组表达,

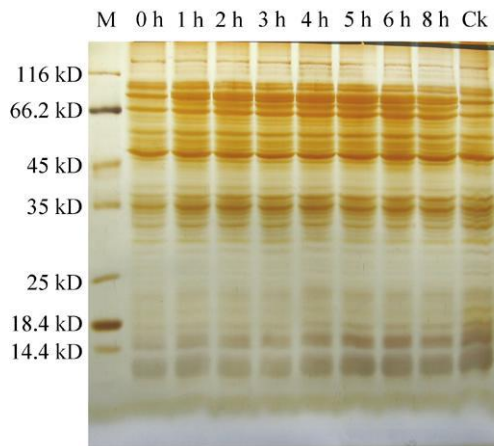


图 4 含重组载体 pET-28-ORF172 的细菌诱导表达的总蛋白 SDS-PAGE 分析
Fig 4 SDS-PAGE of the recombinant plasmid's strain

在 IPTG 诱导下能够成功表达, 不过重组表达量依然不高, 不利于后续的分离纯化工作。我们将进一步研究改进克隆和表达策略, 或者通过改进亲和层析标签设计来提高诱导表达规模, 从中纯化重组表达的 ORF172 蛋白, 希望为进一步开展噬菌体 EJ(3)9P1 的尾丝基因结构与功能研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Hendrix R W, Smith M C, Burns R N, et al. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages - all the world's a phage[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 2192- 2197.
- [2] Culley A I, Lang A S, Suttle C A. High diversity of unknown picorna-like viruses in the sea[J]. Nature 2003, 424 (6952): 1054- 10547
- [3] Desplats C, Krusch H M. The diversity and evolution of the T4-type bacteriophages[J]. Res Microbiol 2003, 154(4): 259- 267
- [4] Papke R T, Doolittle W F. Phage evolution - new worlds of genomic diversity[J]. Curr Biol 2003, 13(15): R606- 607
- [5] 艾文灿, 孟繁梅. 噬菌体: 在细菌致病机理及生物技术中的作用[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [6] Sullivan M, Waterbury J, Chisholm S. Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium *Prochlorococcus*[J]. Nature 2003, 424: 1047- 1051.
- [7] Miller E S, Kutter E, Mosig G, et al. Bacteriophage T4 genome[J]. Microbiol Mol Biol Rev 2003, 67(1): 86- 156
- [8] Miller E S, Heidelberg J E, Eisen J A, et al. Complete genome sequence of the broad-host-range vibriophage KVP40 - comparative genomics of a T4-related bacteriophage[J]. J Bacteriol 2003, 185(17): 5220- 5233
- [9] Bonaterra A, Mari M, Casalini L, et al. Biological control of *Monilia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism[J]. Int J Food Microbiol 2003, 84: 93- 104
- [10] Borysowski J, Weber-Dabrowski B, Górski A. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents[J]. Exp Biol Med 2006, 231: 366- 377.
- [11] Cheng Q, Nelson D, Zhu S, et al. Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme[J]. Antimicrob Agents Chemother 2005, 49: 111- 117.
- [12] Chhabri-Chennoufi S, Canchaya C, Buttin A, et al. Comparative Genomics of the T4-Like Escherichia coli Phage JS98 - Implications for the Evolution of T4 Phages[J]. J Bacteriol 2004, 186(24): 8276- 8286
- [13] Gonzalez JM, Saiz-Jimenez C. A simple fluorimetric method for the estimation of DNA-DNA relatedness between closely related microorganisms by thermal denaturation temperatures[J]. Extremophiles 2005, 9: 75- 79.
- [14] Kanamaru S, Ishiwata I, Suzuki T, et al. Control of bacteriophage T4 lysozyme activity during the infection process[J]. J Mol Biol 2005, 346: 1013- 1020
- [15] Loeffler JM, Djurkovic S, Fischetti V A. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia[J]. Infect Immun 2003, 71: 6199- 6204
- [16] Marsich E, Zuccato P, Rizzi S, et al. Helicobacter pylori expresses an autolytic enzyme - gene identification, cloning and theoretical protein structure[J]. J Bacteriol 2002, 184(22): 6270- 6279