

融合 gp67 信号肽的慈菇蛋白酶抑制剂基因在蚕体内表达*

季平^{1***} 肖庆利¹ 何家禄^{1**} 吕鸿声¹ 吴祥甫²

¹(中国农业科学院蚕业研究所农业部家蚕生物技术重点开放实验室 镇江 212018)

²(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

摘要 用 AcMNPV 的 gp67 信号肽与慈菇蛋白酶抑制剂基因(API₂)融合,并整合到昆虫病毒表达载体 Bm-BacPAK6 中,受多角体蛋白基因启动子控制。慈菇蛋白酶抑制剂在蚕体内成功地得到了高效表达。比较了 gp67 信号肽和慈菇蛋白酶抑制剂信号肽在昆虫表达系统中对表达产物的影响,发现表达产物都能分泌到血淋巴中,表达量很相似,但这两种信号肽在表达过程中都没有被切除,且不同信号肽对表达产物的生物活性有很大影响。

关键词 家蚕核型多角体病毒,蛋白酶抑制剂,信号肽,家蚕幼虫

分类号 Q812 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0310-14

细胞内合成的蛋白质释放到胞外机制是多样的,其中主要为信号肽引导蛋白质的分泌,信号肽位于穿膜蛋白的 N 末端,一般由 20~30 个氨基酸组成,N 端 1~5 个氨基酸中含 1 个或几个带正电荷的 Lys 或 Arg,引导新生肽链向膜转移,中央部分是由 7~16 个氨基酸组成的疏水区,能够形成一段 α -螺旋结构,C 端 4~6 个氨基酸是由少数亲水性氨基酸组成的信号肽酶的切割位点。信号肽能有效地引导新生肽穿越原核生物的质膜或真核生物的内质网膜。在大肠杆菌和酵母表达系统中有利用信号肽的成功实例。但在昆虫表达系统中信号肽的应用还处在探索阶段^[1-3]。我们曾报道用含信号肽基因序列的慈菇蛋白酶抑制剂(API)基因 API₄,在蚕体内成功地得到了高效表达^[4]。但表达产物的分子量比天然的 API 大,推测 API 的信号肽未被切除。为了进一步证实信号肽是否被切除,病毒来源的 gp67 信号肽能否被正确识别加工,以及不同信号肽对表达产物的活性和分泌效率是否有影响,进行了本次试验。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株: pKS、pBacPAK8、pU-gp67-S 由上海生物化学研究所保存。pU-gp67-S 中含有可编码 38 个氨基酸的 AcMNPV 的 gp67 信号肽序列。M13mp18-API₂ 由上海生物化学研究所戚正武教授馈赠。API₂ 基因克隆于 M13mp18 的 EcoRI-Hind III 位

* 国家高技术研究发展计划项目资助(No. 102-11-02-06)。

** 通讯作者。

*** 现工作于苏州大学蚕桑学院。

收稿日期:1998-02-10,修回日期:1999-03-22。

点。 API_2 基因比 API_4 基因少 24 个氨基酸组成的信号肽核苷酸序列^[5]。实验中所用的受体菌为 *E. coli* TG1。

1.1.2 病毒、细胞及家蚕: 修饰病毒 Bm-BacPAK6 为上海生物化学研究所保存, CrBK- API_4 前文构建^[4], BmN 细胞及所用的家蚕品种 JY-1 由中国农业科学院蚕业研究所保存。

1.1.3 实验中所用的限制酶、DNA 重组用的酶以及 TC100、FBS、Lipofectin、标准蛋白分子量均为 BRL 产品;牛胰蛋白酶及其作用底物对甲苯磺酰 L-精氨酸甲酯(TAME)为上海生物化学研究所东风厂产品。

1.2 方法

1.2.1 M13 噬菌体的繁殖、复制型 DNA 的制备及基因重组: 按 Sambrook 实验手册^[6] 进行,适当改动。

1.2.2 重组病毒的构建: 病毒 Bm-BacPAK6 DNA 的制备参照 Summers 实验手册^[7] 进行,共转染采用 Lipofectin 共转染法。具体参照文献[4]。

1.2.3 蚕体中表达的蛋白样品的采集: 将游离的重组病毒 $5\mu\text{L}$ (5×10^5 pfu) 注射接种 5 龄刚饱食后的家蚕,对照区注射 CrBK- API_4 或 Bm-BacPAK6, 每区 20 头, 25°C 正常饲养家蚕, 5d 后蚕发病。剪腹足在冰上收集血淋巴, $10\ 000\text{g}$ 离心 10min, 上清液 -20°C 保存待测。沉淀的血淋巴细胞, 用生理盐水洗 3 次, 最后用原血淋巴 1/10 体积的生理盐水重悬, 液氮冻溶法裂解细胞, $10\ 000\text{g}$ 离心 10min, 细胞裂解液 -20°C 保存待测。

1.2.4 表达产物的 SDS-PAGE 分子量测定: 血淋巴经 $10\ 000\text{g}$ 离心 10min, 除去血细胞及悬浮的脂肪体, 上清液用 PBS 稀释 5 倍后, 用等体积的 $2 \times \text{SDS}$ 上样缓冲液裂解, 置 100°C 煮 3~5min 后 4°C 放置, 准备上样。电泳用的分离胶浓度为 12%, 堆积胶为 4%, 取 $10\mu\text{L}$ 上样, 用标准分子量蛋白作对照, 电泳结束后, 标定指示剂位置, 用考马斯亮蓝 G-250 染色, 测定各标准蛋白迁移率(Rf 值)作出分子量标准曲线。测定表达产物的 Rf 值, 在标准曲线上查出其分子量。

1.2.5 表达产物在血淋巴中含量的测定: 将 SDS-PAGE 电泳后的凝胶在凝胶干燥仪上干燥, 用 Bio-Rad GS-670 型图像处理仪进行扫描分析, 测定表达产物的相对含量。血淋巴中可溶性蛋白含量的测定, 参照文献[8]。表达产物的绝对含量总蛋白量与相对含量的乘积。

1.2.6 胰蛋白酶抑制剂活性测定: 按文献[4]进行。用上海生化所东风厂的胰蛋白酶活力测定试剂盒进行测定。反应体积为 3mL, 体系中含 0.02mol/L Tris-HCl (pH8.0), 0.01mol/L CaCl_2 , $5\sim 10\mu\text{g}$ 牛胰蛋白酶及 0.52mmol/L TAME, 反应体系中加 $100\mu\text{L}$ 稀释 100~200 倍的血淋巴, 反应温度为 25°C , 在 247nm 下测光吸收增值, 根据被抑制的胰蛋白酶活力数确定慈菇蛋白酶抑制剂的活力。

2 结果与分析

2.1 重组转移载体 pBacPAK-gp API_2 的构建

M13mp18- API_2 的 Rf DNA 用 *EcoRI-Hind* III 酶切, 将 API_2 克隆于 pKS 中, 得到 pKS- API_2 。分离 API_2 的 *Bam* HI-*Xho* I 片段, 克隆于转移载体 pBacPAK8 中, 得到重组转

移载体 pBacPAK-API₂。进一步将 pBacPAK-API₂ 用 *Bam*HI 酶切补平后,再用 *Pst*I 酶切。将 pUgp67-S 用 *Eco*RI 酶切补平、再用 *Pst*I 酶切,获得 gp67 信号肽核苷酸序列,并正向克隆于上述酶切后的载体中,信号肽序列与 API₂ 保持正确的读码框,并受多角体蛋白基因启动子(*ph. p*)控制,pBacPAK-gpAPI₂ 的 *ph. p*、gp67 信号肽序列和 API₂ 基因的连接处序列为:

```

----- ◊ ACGGATCAATTCAATATG.....GCG gta ccc ggg gat cct cta gag tcg acc
           ph . p                gp67 signal sequence                MCS
           tgc agg aat tct GAT CCC.....TAA---
                               API2 gene
  
```

得到重组转移载体 pBacPAK-gpAPI₂。其结构见图 1。

2.2 重组病毒的筛选及表达产物分子量测定

重组转移载体 pBacPAK-gpAPI₂ 与经 *Cuv*I 酶切后线性化的 Bm-BacPAK6 DNA 共转染 BmN 细胞,共转染上清液进行蓝白斑筛选,挑取重组病毒白斑,得到纯化的重组病毒 CrBK-gpAPI₂ 进行扩增,用于接种家蚕。病毒感染的家蚕血淋巴上清液进行 SDS-PAGE 分析,CrBK-API₄ 表达的 API₄ 分子量为 20.5kD,CrBK-gpAPI₂ 的表达产物为 23.4kD(图 2)。而天然 API 成熟肽的分子量为 16.9kD^[4]。根据分子量大小和基因组成可以推算 API₄ 的信号肽和 gp67 的信号肽在表达产物中并未切除。

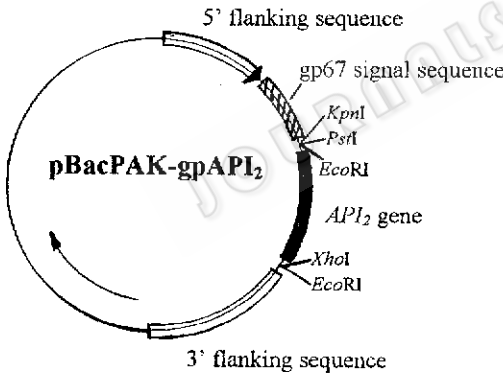


图 1 重组转移载体 pBacPAK-gpAPI₂ 的构建
Fig.1 Construction of recombinant transfer vector pBacPAK-gpAPI₂

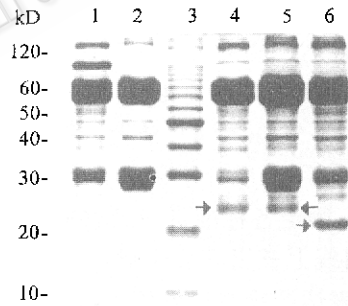


图 2 SDS-PAGE 测定重组病毒感染家蚕血淋巴中表达产物的分子量

Fig.2 Molecular weight of expressed product in silkworm larvae
1. Bm-BacPAK6 infected; 2. Mock infected;
3. Standard weight marker; 4. CrBK-gpAPI₂ infected (4th)
5. CrBK-gpAPI₂ infected; 6. CrBK-API₄ infected

2.3 血淋巴中表达产物含量的测定

表达产物经 SDS-PAGE 电泳,脱色后用凝胶干燥仪干燥,用 Bio-Rad GS-670 图像分析仪进行扫描处理。测得 CrBK-API₄ 感染的血淋巴上清液中表达的 API 占可溶性蛋白含量的 9%,CrBK-gpAPI₂ 感染的血淋巴上清液中表达的 API 占可溶性蛋白含量的 7%。血淋巴中可溶性蛋白总量测定表明:CrBK-API₄ 感染的血淋巴上清液中为 40mg/mL,CrBK-gpAPI₂ 感染的血淋巴上清液中为 55mg/mL。从而得到血淋巴中表达的慈菇蛋白酶抑制剂的绝对含量:CrBK-API₄ 感染的血淋巴中为 3.6mg/mL,CrBK-gpAPI₂ 感染的血淋

巴中为 3.8mg/mL。两者的绝对表达量差别不大。

2.4 表达的慈菇蛋白酶抑制剂的活性测定

将收集的血淋巴原液 10 000g 离心 10min, 上清液用 0.001mol/L 的 HCl 稀释 100~200 倍, 进行胰蛋白酶抑制剂活性测定。以未重组慈菇蛋白酶抑制剂基因的 Bm-BacPAK6 病毒感染的血淋巴作空白对照。CrBK-gpAPI₂ 感染的血淋巴中活力为 7.4×10^4 u/mL 血淋巴上清, CrBK-API₄ 感染的血淋巴中活力为 4.29×10^5 u/mL 血淋巴上清。前者占后者活力的 17%, 可以看出 gp67 的信号肽会影响表达产物的活性。同样它们各自的细胞裂解液也进行了活性测定, CrBK-API₄ 和 CrBK-gpAPI₂ 中分别为 1.1×10^4 u/mL 和 0.9×10^4 u/mL (见图 3)。

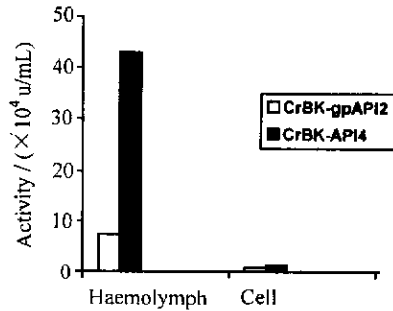


图3 家蚕血淋巴中表达的慈菇蛋白酶抑制剂活力

Fig. 3 The activity of the expressed arrowhead proteinase inhibitor

3 讨论

表达产物的分泌及功能活性的产生与信号肽有一定的关系。在大肠杆菌及酵母表达系统中已成功地开发了带有信号肽的分泌型表达载体。但信号肽在昆虫表达系统中的应用还很有限, 得出的结论有 3 种, 即: 1. 信号肽能被信号肽酶正确识别和切割, 能促进产物的分泌, 如蜜蜂毒肽的信号肽能提高木瓜蛋白酶的分泌效率 5~9 倍^[2], *egt* 和 gp67 信号肽与 HIV-1 的 gp120 融合可以提高产物的分泌效率 6~20 倍^[9]; 2. 信号肽能使产物分泌至细胞外但在不正确位点切割, 如表达的髓磷脂结合糖蛋白(MAG)^[10]; 3. 信号肽不能引导分泌表达, 如淀粉酶的信号肽不能引导木瓜蛋白酶的分泌表达^[2]。此外也有报道 gp67 能引导蝎毒素的分泌表达, 但信号肽是否被识别和切割没有直接的证据。我们的实验发现 gp67 信号肽和慈菇蛋白酶抑制剂(API)本身的信号肽都能使表达产物释放到血淋巴中, 表达量相似, 但信号肽在翻译后并未切除。API₄ 的分子量大于天然 API 分子量, 是由于 24 个氨基酸组成的信号肽和 C-端 7 个尾肽未被切除之故(数据未显示)。而融合 gp67 信号肽的 API₂, 因 gp67 信号肽由 38 个氨基酸组成, 再加上融合处接点序列而比 API₄ 多 27 个氨基酸。信号肽未被切除, 表达产物能释放到血淋巴中, 推测是由于病毒感染对机体细胞的损害造成的, 另外也可能与产物的结构和性质有关。

通过表达产物的生物活性比较发现不同信号肽对表达的慈菇蛋白酶抑制剂活力有很大影响, 融合 gp67 信号肽的慈菇蛋白酶抑制剂活力只有含自身信号肽的慈菇蛋白酶抑制剂活力的 17%, 可能是 gp67 信号肽未被切除而影响了 API 的蛋白构象。抑制剂的功能域受到影响, 使表达产物的活力明显降低。

参 考 文 献

[1] A. Miyajima, J. Schreurs, K. Otsu *et al.* *Gene*, 1987, 58:273~281.

- [2] D. C. Tessier, D. Y. Thomas, H. E. Khouri *et al.* *Gene*, 1991, **98**:177~183.
- [3] L. C. Iacono-Connors, C. S. Schmaljohn, J. M. Dalrymple *et al.* *Infect Immun*, 1990, **58**:366.
- [4] 季 平, 张志芳, 何家禄等. 生物化学与生物物理学报, 1997, **29**(1):17~23.
- [5] 许文峰, 戚正武等. 生物化学与生物物理学报, 1993, **25**(3):207~215.
- [6] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, New York; Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [7] M. D. Summers, G. E. Smith, *A Manual of Methods for Baculovirus Insect Cell Culture Procedures*, Texas, Agriculture Experiment Station Bulletin, 1987, 1555.
- [8] M. M. Bradford, *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**:248~254.
- [9] C. L. Murphy, J. R. McIntire, D. R. Davis *et al.* *Protein Expre. Purif.*, 1993, **4**:349~357.
- [10] J. Attia *et al.* *Methods in Molecular Biology*, Baculovirus Expression Protocols, Edited by Richardson C. D., 1995, **39**:363~384.

Expression of the Arrowhead Proteinase Inhibitor Gene Fused gp67 Signal Sequence in the Silkworm Larvae*

Ji Ping¹ Xiao Qingli¹ He Jialu² Lu Hongsheng¹ Wu Xiangfu²

¹(Key Laboratory of Silkworm Biotechnology, Ministry of Agriculture, Sericultural Research Institute, CAAS, Zhenjiang 212018)

²(Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

Abstract The arrowhead proteinase inhibitor *API*₂ gene derived from *API*₄ gene by PCR. *API*₂ gene was fused to gp67 signal sequence, and recombinant into the lineared Bm-BacPAK6 DNA digested with *Cvu*I. The recombinant virus CrBK-gp *API*₂ was selected. *API*₂ gene was successfully expressed in silkworm larvae. Compared the function of gp67 and *API* signal sequence in insect expression system, found that the two signal peptides didn't be cleaved. The amount of secreted protein is almost same in the insect cell system. But it has been observed that different signal peptides greatly affected the bioactivity of the expressed gene products.

Key words *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV), proteinase inhibitor, signal peptide sequence, silkworm larvae

* Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 863-102-11-02-06)。