

莫洛尼鼠白血病毒逆转录酶的原核表达纯化及其生物学活性

王贤松, 马雪梅, 孙一

北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100022

摘要: 利用基因重组技术及简化的纯化方法快速制备莫洛尼鼠白血病毒逆转录酶(MMLV-RT)。设计带有酶切位点的引物, PCR 获得 MMLV-rt 基因片段; 再通过定点突变将目的基因的五個可溶性位点进行突变, 测序正确后, 插入到表达载体 pET15b 中构建成重组表达质粒 pET15b-MMLV-rt; 表达产物的纯品通过金属离子(Ni^{3+})配体亲和纯化系统得到。用 SDS-PAGE 分析所纯化产物的大小和纯度, 再用 RT-PCR 对其活性进行鉴定。构建的重组表达质粒 pET15b-MMLV-rt 经 IPTG 诱导得到 N 端带有 6His 的 RT 融合蛋白, 通过 Ni^{3+} 的亲和层析得到纯品蛋白, SDS-PAGE 分析表明其纯度可达 96%, RT-PCR 实验表明具有较高的生物学活性。由此得出利用原核表达及简化的纯化系统可获得纯度为 96% 的逆转录酶纯品, 为大规模生产该酶提供了可靠的保证。

关键词: 逆转录酶, 定点突变, 酶活力

Prokaryotic Expression and Purification of Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase and Verification of the Activity

Xiansong Wang, Xuemei Ma, and Yi Sun

College of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China

Abstract: To produce the reverse transcriptase of moloney murine leukemia virus (MMLV-RT) through gene recombination, MMLV-rt gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with specifically designed primers bearing restriction enzyme sites. Five mutation sites increasing the solution of the target protein were introduced through Site-directed mutation. After verification by sequencing, the gene was cloned into the expression vector pET15b to construct the recombinant plasmid pET15b-MMLV-rt. Purified MMLV-RT was obtained by affinity chromatography (Ni^{3+} -NTA beads). Molecular weight and purity of MMLV-RT were analyzed with SDS-PAGE. Enzyme activity was characterized with RT-PCR. We successfully constructed the recombinant plasmid pET15b-MMLV-rt and obtained the MMLV-RT fusion protein with 6His on the N-terminus. Recombinant protein was purified through Ni^{3+} -NTA beads based affinity chromatography, the purity of which was 96%. The Activity of the enzyme was high. MMLV-RT of 96% purity was obtained with the prokaryotic expression technique, which serves as the basis for mass production of this enzyme.

Keywords: reverse transcriptase, site-directed mutation, enzyme activity

Received: October 8, 2007; **Accepted:** January 10, 2008

Supported by: the Scientific Planning Breakthrough Program of Beijing Municipal Science and Technology Commission (No. D0906003000091), Beijing Science Nova Program (No. 2004B05).

Corresponding author: Xuemei Ma. E-mail: xmma@bjut.edu.cn

北京市科技新星计划(B类)(No. 2004B05)和北京市科委重大项目(No. D0906003000091)资助。

莫洛尼鼠白血病病毒(Moloney murine leukemia virus)逆转录酶(M-MLV RT)是一种 RNA 依赖的 DNA 聚合酶,它可以单链 RNA、DNA 或 RNA-DNA 杂交体为模板进行 cDNA 合成,此酶无 3'-5'核酸外切酶活性,同时它具有 RNase 酶活性^[1,2]。MMLV 逆转录酶的 DNA 聚合酶活性位点与 RNase H 活性位点界限清晰,可在 DNA 聚合酶结构因突变而丧失活性的情况下仍保持有野生型 RNase H 活性,反之亦然^[3,4]。因而, MMLV 逆转录酶不但是实验室生物学研究的常用工具酶,同时也为研究逆转录酶抑制剂类药物提供了很好的模型^[5]。然而,目前 MMLV 逆转录酶的生产受到国外大公司控制。本文旨在建立一种简单快捷的方法制备 MMLV 逆转录酶。

1 材料和方法

1.1 材料

pET15b 载体、宿主菌 DH5 α 购自 Promega 公司; BL21(DE3)plysS 表达菌种由北京协和医科大学黄秉仁教授惠赠; Pfu DNA 聚合酶、Taq 酶、限制性内切酶 *Nde* I/*Xho* I、T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 生物技术公司; 标准分子量蛋白和异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)购自上海 Promega 公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、质粒抽提试剂盒购自天根生化公司; 引物合成和基因测序由上海生工公司完成; 镍-次氨基三乙酸蛋白纯化树脂(Ni-NTA)等纯化试剂购自北京鼎国公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *pET15b-MMLV-rt* 重组质粒的构建

根据 Telesnitsky A 等^[6]报道的 MMLV-rt 全基因序列,设计了 1 对引物(5'-ATC TAG CTA CAT ATG ACA TGG CTG TCT GAT TTT-3', 3'-GAT TTT CTC CCA GTC TCT ATT GAG CTC ATA GCC-5'), 引物的上下游分别引入 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点,经 PCR 扩增出 rt 的基因片段(约 1782 bp)插到 pMD18-T 载体中,获得重组质粒。由于 MMLV-RT 蛋白是非可溶性蛋白,采用普通的变性和复性的纯化方法得到的蛋白酶活性很低。为了提高 MMLV-RT 蛋白的可溶性,设想改变该蛋白的分子结构,在不改变酶活性位点的前提下,把疏水氨基酸突变为亲水氨基酸。通过分析其他病毒逆转录酶的蛋白结构,特别是人类免疫缺陷病毒(HIV-1)的逆转录酶及整合酶的分子

结构,设计位点突变引物^[7],将 432 位上的亮氨酸突变为赖氨酸,433 位上的缬氨酸突变为赖氨酸、434 位上的异亮氨酸突变为赖氨酸、435 位上的亮氨酸突变为赖氨酸以及 436 位点上的丙氨酸突变为赖氨酸,序列如下:

L432K: 5'-G GGA CAG CCG AAA GTA ATA TTG GCC C-3'

V433K: 5'-G GGA CAG CCA CTT AAG ATT CTG GCC C-3'

I434K: 5'-CAG CCA CTA GTC AAG CTT GCC CCC CAT G-3'

L435K: 5'-CA CTA GTC ATT AAG GCC CCC CAT GCA G-3'

A436K: 5'-CTA GTC ATT CTG AAG CCC CAT GCA GTA G-3'

经 PCR 定点突变技术获得位点突变后的 rt 基因,与表达载体 pET15b 构建重组质粒 pET15b-MMLV-rt,测序正确后,转化到表达宿主菌 BL21(DE3)plysS 中表达。

1.2.2 MMLV-RT 蛋白的表达及纯化

pET15b-MMLV-rt 重组质粒转化 BL21(DE3)plysS 后,挑单个菌落于 1 mL LB 培养基(氨苄 100 μ g/mL)中 37°C 摇菌过夜,转接于 9 mL LB 培养基中,至 A_{600} 为 0.6 时加入终浓度为 0.8 mmol/L IPTG 诱导 3.5 h, SDS-PAGE 电泳表达情况。

对诱导表达量高的单菌落进行可溶性鉴定,取诱导后的菌体进行超声裂解,分别取上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳;观察其可溶性情况。

取 3 mL 上清按镍-次氨基三乙酸蛋白纯化树脂(Ni-NTA)亲和层析操作说明书进行纯化。

1.2.3 MMLV-RT 蛋白酶活性的试验

以 MS2 病毒的基因组 RNA 为模板,用包膜蛋白基因的测序引物(MS2-PF: 5'-CCT TTC GGG GTC CTG CTC AAC TT-3 MS2-PR: 5'-CTT AAG CTT CTT CGA CAT GGGTAA TCC T-3)进行 cDNA 的合成: 逆转录采用 10 μ L 逆转录反应体系,0.5 μ L MS2-PF(100 μ mol), 2 μ L 5 \times RT Buffer, 0.5 μ L MMLV-RT, 0.25 μ L RNA 酶抑制剂(40 u/ μ L), 0.5 μ L dNTP 混合物(各 10 mmol), 加 DEPC 处理的双蒸水至 10 μ L。反应条件: 42°C 15 min(逆转录反应); 95°C 2 min(逆转录酶的失活反应)。PCR 扩增: 采用 20 μ L 反应体系,包括 2 μ L cDNA 溶液,特异性上下游引

物各 0.5 μL (10 μmol), TaqMix(2 \times)10 μL , ddH₂O 至 20 μL 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 30 个循环: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。RT-PCR 反应产物用 1%琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果

2.1 MMLV-rt 基因的扩增

MMLV-rt 基因 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 可见约 1800 bp 的片段, 与预期片段大小(1782 bp)一致(图 1)。经测序确定, 432 位上的亮氨酸突变为赖氨酸, 433 位上的缬氨酸突变为赖氨酸、434 位上的异亮氨酸突变为赖氨酸、435 位上的亮氨酸突变为赖氨酸以及 436 位点上的丙氨酸突变为赖氨酸完全正确。

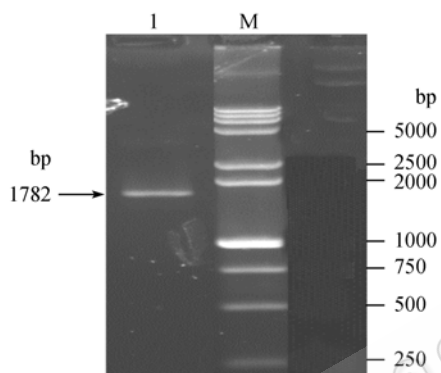


图 1 MMLV-rt 基因位点突变后的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR result of site-directed mutagenesis of MMLV-rt gene
1: PCR products of MMLV-rt; M: DNA marker

2.2 pET15b-MMLV-rt 重组表达载体的构建

将 pMD18-T-MMLV-rt 用 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切消化后, 定向克隆到表达质粒 pET15b 的 *Nde* I 和 *Xho* I 两酶切位点之间, 构建重组表达质粒 pET15b-MMLV-rt。酶切鉴定(图 2)及测序证实序列完全正确。由于该载体带有 6 个 His 序列, 因此表达的 RT 蛋白是带有 6 个 His 的融合蛋白, 这样有利于 RT 酶的纯化。

2.3 MMLV-RT 蛋白的诱导表达

重组质粒转入表达菌 BL21(DE3)pysS 后, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 采用 IPTG(终浓度 1 mmol/L)诱导表达, 收集不同时相的菌液, SDS-PAGE 分析显示, 诱导的样品中呈现 Mr 66.2 kD 左右较高水平的蛋白条带, 而未加 IPTG 的对照组则没有出现相应条带, 表明 rt 基因得到有效的表达(图 3)。

蛋白的表达动力学分析表明, 1 mmol/L IPTG,

37 $^{\circ}\text{C}$, 诱导 3.5 h 即可获得最大量蛋白的表达(数据未提供)。SDS-PAGE 结果分析表明诱导表达的蛋白主要在上清液里(图 4), 突变的引入成功使 MMLV-RT 蛋白以可溶性形式表达, 对蛋白活性的维持和后期的纯化操作都非常有利。

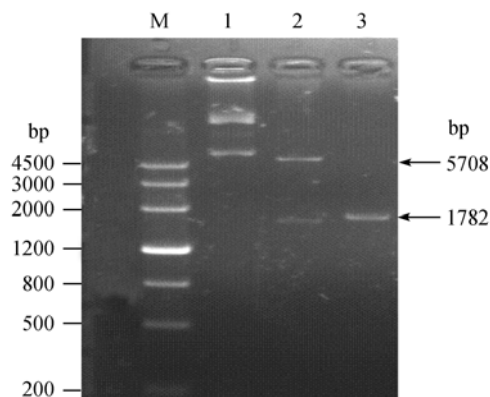


图 2 重组质粒 pET15b-MMLV-rt 双酶切鉴定结果

Fig. 2 Identification results of the recombinant plasmid pET15b-MMLV-rt by two restriction enzymes digestion
1: pET15b; 2: pET15b-MMLV-rt/*Nde* I+*Xho* I; 3: PCR products of MMLV-rt; M: DNA marker

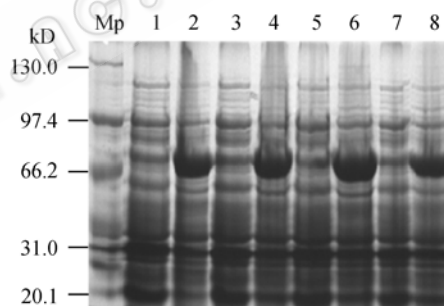


图 3 MMLV RT/6His 重组蛋白的诱导表达结果

Fig. 3 Expression of MMLV RT/6His recombinant protein
Mp: protein marker; 1, 3, 5, 7: recombinant plasmid pET15b-MMLV-rt without IPTG; 2, 4, 6, 8: recombinant plasmid pET15b-MMLV-rt after IPTG

2.4 MMLV-RT 蛋白的纯化

由于 MMLV-RT 蛋白融合了 His, 可以采用 Ni-NTA 亲和层析的方法纯化重组蛋白, 随着咪唑浓度的提高, 洗脱液中的蛋白浓度成梯度上升, 在 NTA-300 时 (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.9, 0.5 mol/L NaCl, 10% Glycerol, 300 mmol/L Imidazole) 得到高纯度的蛋白(图 5)。对纯化的蛋白进行脱盐, 换用储存缓冲液 5X M-MLV RT(250 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 375 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl₂ and 50 mmol/L DTT)洗脱。

2.5 MMLV-RT 蛋白酶活性的初步检测

用 RT-PCR 来检测制备的 MMLV-RT 蛋白酶活性。以 MS2 病毒(ssRNA 病毒)的基因组 RNA 为模

板,用包膜蛋白基因的测序引物(MS2-PF和MS2-PR)进行 RT-PCR,得到 1700 bp 大小的片段,结果表明重组蛋白具有较好的生物活性(图 6)。由于引物的特异性不好,故产生一些非特异性条带。

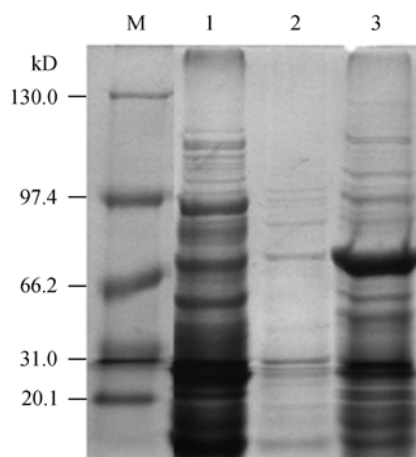


图 4 MMLV RT/6His 重组蛋白可溶性鉴定

Fig. 4 Identification of solubility properties of MMLV RT/6His

M: protein marker; 1: recombinant plasmid pET15b-MMLV-rt without IPTG; 2: precipitate; 3: supernatant of bacterial body after ultrasonic disruption

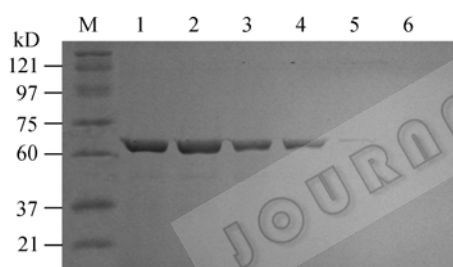


图 5 重组蛋白纯化过柱后洗脱结果

Fig. 5 The result of MMLV-RT/6His recombinant protein after elution and purification

M: protein marker; 1~6: elution by NTA-300

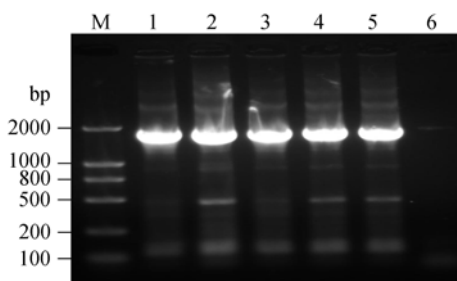


图 6 MMLV-RT/6His 蛋白酶活性实验

Fig. 6 Activity assay of MMLV-RT/6His

M: DNA marker; 1~5: results of RT-PCR with MMLV-RT/6His; 6: non-template control

3 讨论

MMLV-RT 是一种重要的工具酶,在生物研究中具有广泛的应用。本文介绍了该酶的表达及简便的纯化方法,从基因克隆,可溶性位点突变到蛋白表达、活性检测。本实验表达的 MMLV-RT 蛋白由于融合的组蛋白标签只有 6 个氨基酸残基,对蛋白酶的折叠影响小,使获得的蛋白构象接近天然的蛋白,从而保证其生物活性。同时在该实验中运用定点突变技术,使难溶的包涵体变成了可溶性良好的蛋白。因为以包涵体形式存在的聚集大分子不具有正确的三维结构(天然结构),它们在水溶液中通常不溶解且没有活性。通过蛋白的可溶性突变很好解决了这一难题,让蛋白在非变性条件下纯化更容易得到活性蛋白。

在获得活性 MMLV-RT 蛋白酶的基础上,我们将继续研究该酶的分子结构,分别筛选出逆转录酶的模板作用位点、引物作用位点和底物作用位点并进行酶的改造,得到一批药物筛选模型;为后续预测、设计、验证抗逆转录病毒药物提供基础。

REFERENCES

- [1] Aggarwal AK. Crystallization of DNA binding proteins with oligodeoxynucleotides. *San Diego Methods*, 1990: 153-190.
- [2] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**: 3389-3402.
- [3] Georgiadis MM, Jessen SM, Ogata CM, Telesnitsky A, Goff SP, and Hendrickson WA. Mechanistic implications from the structure of a catalytic fragment of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Structure*, 1995, **3**: 879-892.
- [4] Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 1987, **8**: 93-99.
- [5] Esnouf R, Ren J, Ross C, Jones Y, Stammers D, Stuart D. Mechanism of inhibition of HIV-I reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nut Struct Bid*, 1995, **2**: 303-308.
- [6] Telesnitsky A, Goff SP. Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA. In *Retroviruses* (Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE eds.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- [7] Das D, Georgiadis MM. A directed approach to improving the solubility of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Protein Sci*, 2001, **10**(10): 1936-1943.