

草鱼呼肠孤病毒 GCRV-GD108 株 VP5 蛋白的原核表达

王杭军^{1,2} 叶 星^{1,2} 田园园¹ 张莉莉¹ 瞿 兰^{1,2} 张 蕊^{1,2}

1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所/农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广州 510380;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要 根据草鱼呼肠孤病毒广东株 GCRV-GD108 编码 VP5 的 M5 基因的 cDNA 序列, 分别设计合成带特定酶切位点的特异引物, 进行 PCR 扩增; 通过酶切与连接, 构建 2 种重组表达载体 pET30c-M5 和 pCold II-M5, 分别转化于大肠杆菌并进行诱导表达; 对培养基、诱导时间、诱导剂浓度和温度等条件进行优化, 确定最适表达体系。通过 SDS-PAGE 和 Western blot 对表达产物进行鉴定。结果显示, 所构建的 2 种 VP5 蛋白原核表达载体, 均在大肠杆菌中成功表达了分子质量大小(约 80 ku)与预期相符的重组蛋白, 表达产物主要存在于包涵体中。诱导表达后的菌体经离心、洗涤与超声破碎, 离心收集包涵体。包涵体通过变性、透析与复性, 获得纯化的重组蛋白, 其中 pET30c-M5/BL21(DE3)工程菌的目的蛋白占全菌蛋白的 22.5%, 纯化后获得了高纯度的重组蛋白(>95%)。比较 2 种表达载体的表达结果, pET30c-M5 具有诱导表达耗时少、获得重组蛋白量大的优势, 可为下一步的研究提供足量的蛋白。

关键词 草鱼呼肠孤病毒 GCRV-GD108 株; M5 基因; 免疫印迹; 原核表达; 纯化

中图分类号 S 917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)02-0097-06

草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)是我国分离鉴定的第 1 株鱼类病毒^[1], 是水生呼肠孤病毒属(*Aquareovirus*, AQRV)中致病力最强的病毒^[2]。GCRV 主要感染、危害草鱼种鱼和一龄草鱼^[3], 引起草鱼出血病, 导致草鱼大量死亡, 给草鱼养殖生产造成巨大损失。

草鱼呼肠孤病毒是迄今研究的最系统的水生呼肠孤病毒^[4], 其基因组由 11 条分节段双链 RNA(double strand RNA, dsRNA)组成^[5]。病毒颗粒呈二十面体对称球形, 可分为外衣壳、中间层、内衣壳和核心 4 个层次^[6]。笔者所在研究室人员近年来开展广东草鱼出血病研究, 已获得草鱼呼肠孤病毒广东株 GCRV-GD108 的全基因组序列^[7]。GCRV-GD108 株的 M5 基因编码分子质量约 80 ku 的 VP5 结构蛋白。该 VP5 蛋白与水生呼肠孤病毒属中包括草鱼呼肠孤病毒、金体美洲鳊呼肠孤病毒(golden shiner reovirus, GSRV)、美洲草鱼呼肠孤病毒(American grass carp reovirus, AGCRV)和胭脂鱼呼

肠孤病毒(golden ide reovirus, GIRV)等的核衣壳蛋白 VP5 的氨基酸同源性的 24%~25%, 与哺乳动物正呼肠孤病毒(mammalian reovirus, MRV)的 $\mu 2$ 及禽呼肠孤病毒(avian reovirus, ARV)的 μA 也有较高同源性(20%)^[7]。 $\mu 2$ 蛋白含有一段 $\mu 2$ 样 NTP 结合保守区域^[8-9], 在 VP5 蛋白中也存在类似保守区域。为进一步确定 GCRV-GD108 株的 VP5 是否也具有 NTPase 活性, 笔者开展 VP5 的原核表达, 构建 2 种原核表达载体 pET30c-M5 和 pCold II-M5, 并对表达和纯化条件进行优化与比较, 旨在为进一步开展 VP5 的功能研究提供试验材料。

1 材料与方法

1.1 材 料

限制性内切酶、pMD19-T 载体克隆试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶与 T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司; 质粒抽提纯化试剂盒购自天根公司; 大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)和 BL21(DE3)pLysS, 原核

收稿日期: 2012-06-15

基金项目: 广东省重点科技项目(2008A020100016)、广东省海洋渔业科技项目(A200899F01, A201101G01)和广州市和荔湾区科技项目(2009J1-C021 和 20084411115)

王杭军, 硕士研究生, 研究方向: 分子生物学, E-mail: wanghangjun617@yahoo.com.cn

通讯作者: 叶 星, 博士, 研究员, 研究方向: 基因工程与转基因, E-mail: gzyexing@163.com

表达载体 pET30c 与 pCold II 由笔者所在实验室保存; SDS-PAGE 标准蛋白为普欣生物公司的产品; 胶回收试剂盒(E. Z. N. A Gel Extraction Kit)为美国 Omega 公司产品; 其他化学试剂为进口或国产分析纯试剂。

1.2 目的基因的扩增及克隆

为构建 M5 的 pET30c 表达载体, 通过 Primer 等软件对 M5 基因和 pET30c 载体质粒(抗卡那霉素)序列进行分析, 选择 *Xba* I 和 *Xho* I 限制性内切酶酶切位点作为表达载体构建的位点, 同时为去除 pET30c 质粒载体上非必需的 S · Taq 标签、His · Taq 标签等^[10], 设计了 1 对特异引物: 在正向引物中引入核糖体结合位点(粗黑体部分)和 *Xba* I(划线部分)识别位点: 5'-CCCCTCTAG **AAGGAGATATA**-CATATGCTACTCATTCTGCCC -3'; 在反向引物中引入 *Xho* I(下划线部分)识别位点: 5'-TTACTC-GAGATCCCCATGTGGAAGCGG-3'。

为构建 M5 的 pCold II 表达载体, 根据 M5 序列及笔者所在实验室已构建的插入特定片段 pCold II 重组质粒(抗氨苄霉素) pCold II 1700, 该质粒的插入片段约 1 700 bp, 带有 1 对特异限制性内切酶 *Sac* I 和 *Xho* I 酶切位点, 设计 1 对引物: 正向引物 5'-GGAGCTCATGCTACTCATTCTGCCCCAC-3', 反向引物 5'-CCGCTCGAGTTAATCCCCATGTG-GAAG-3', 分别在引物的 5' 端引入 *Sac* I 和 *Xho* I 酶切位点。

以笔者所在实验室构建的 pMD18T-M5 克隆载体, 分别用上述 2 对引物对目的基因片段进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 35 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min 20 s, 33 个循环后, 再于 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 用胶回收试剂盒回收纯化。回收产物克隆入 pMD19-T 载体, 转化于大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在含氨苄霉素(Amp⁺)的 LB 平板上挑选阳性克隆, 经 PCR 鉴定后送上海英骏公司测序。

1.3 重组质粒 pET30c-M5 和 pCold II -M5 的构建与鉴定

对测序鉴定正确的 2 种阳性克隆提取质粒 DNA, 分别用 *Xba* I / *Xho* I 和 *Sac* I / *Xho* I 进行双酶切; pET30c 和 pCold II 1700 质粒同样分别进行双酶切。胶纯化回收各目的片段, 按 T4 DNA 连接酶说明, 建立连接反应。连接产物转入 *E. coli*

DH5 α 宿主菌, 分别在 LB(Kan⁺) 及 LB(Amp⁺) 平板上筛选培养。挑取单个阳性克隆, 扩大培养后进行菌液 PCR, 提取质粒酶切鉴定, 并送上海英骏公司测序。

1.4 重组质粒诱导表达条件优化

1) 宿主菌、培养基及诱导时间的优化。将经测序验证正确的重组质粒 pET30c-M5 和 pCold II -M5 分别转化于大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株中。pET30c-M5 工程菌分别接种于含卡那霉素的 LB 和 TB 液体培养基; pCold II -M5 工程菌分别接种于含氨苄霉素的 LB 和 TB 液体培养基。于摇床中 200 r/min、37 °C 振荡培养至吸光值 D_{600} 为 0.4~0.6, 然后加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达。pET30c-M5 工程菌于 37 °C 诱导, 时间梯度设置为 3~8 h, 每隔 1 h 取样 1 mL; pCold II -M5 工程菌于 15 °C 诱导, 时间梯度为 4~24 h, 每隔 1 h 取样 1 mL。SDS-PAGE 电泳检测样品中目的蛋白的表达。

2) 诱导温度的优化。pET30c-M5/BL21(DE3) 工程菌在含 Kan 抗性的 LB 培养基中诱导表达, IPTG 终浓度为 1.0 mmol/L, 诱导温度梯度为 16、20、24、28、32、37 °C; 诱导时间为 4 h; pCold II -M5/BL21(DE3) 工程菌在含 Amp 抗性的 LB 培养基中诱导表达, IPTG 终浓度为 1.0 mmol/L, 诱导温度梯度为 15、18、20 °C。SDS-PAGE 电泳检测。

3) 诱导剂浓度的优化。根据上述试验结果, 确定 pET30c-M5/BL21(DE3) 工程菌和 pCold II -M5/BL21(DE3) 工程菌的诱导时间分别为 4 h 和 10 h; 诱导温度分别为 37 °C 和 15 °C。均采用 7 个 IPTG 梯度浓度进行诱导表达, 各取 8 支 15 mL 离心管, 每管装 5 mL 上述含菌培养液。分别加入终浓度为 0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达。诱导后取样进行 SDS-PAGE 检测。

1.5 重组蛋白的大量表达、纯化及 Western blot 分析

选择 pET30c-M5/BL21(DE3) 工程菌, 在经上述试验所确定的合适诱导条件(IPTG 终浓度 0.4 mmol/L、37 °C、4 h)下进行大量诱导表达。诱导表达结束后, 收集菌体, 以结合缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.9), 500 mmol/L NaCl, 5 mmol/L Imidazole)悬浮, 超声破碎, 离心后包涵体用含 2 mol/L 脲的结合缓冲液悬浮, 洗涤 2 次; 再经含 4、

6 mol/L 脲的结合缓冲液各洗涤 1 次,分别保留上清和沉淀;然后用含 8 mol/L 脲的结合缓冲液溶解包涵体。采用逐步透析方法复性蛋白。纯化的重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色,Alpha Image 凝胶成像系统成像后,Gel-Pro analyzer 软件分析纯度。采用湿转法进行 Western blot 检测,一抗为鼠抗 His 单克隆抗体,二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗鼠。

2 结果与分析

2.1 M5 基因序列分析

通过 Blast 比较,GCRV-GD108 的 M5 基因编码的 VP5 蛋白与 MRV μ 2 蛋白及几种已报道的水生呼肠孤病毒属的同源蛋白的同源性均在 20% 以上。Vector 软件比较显示,在 GCRV-GD108 的

VP5 中存在类似于 MRV μ 2 蛋白保守区域 A 的氨基酸序列,405-KGSFKSTI-412,且在 VP5 的 433 位置存在 1 个类似于 μ 2 的 444 位区域 B:dSDxyG。参考 Nibert 等^[9]的研究,将区域 A 和区域 B 的序列整理为表 1。

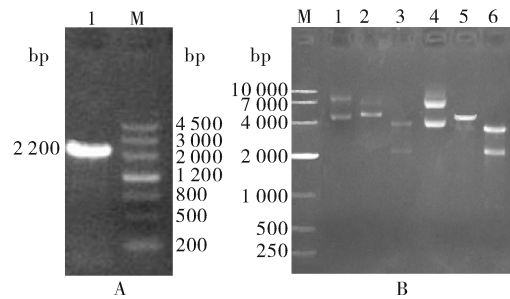
2.2 M5 基因原核表达载体的构建

用实验室已获得的 M5 基因克隆载体 pMD18-T-M5 为模板,设计合成 2 对引物,经 PCR 扩增,得到预期大小约为 2 200 bp 的特异性条带(图 1-A)。克隆于 pMD19-T 载体后的测序结果显示与已知的 ORF 序列相同,无碱基突变。2 种重组表达质粒分别进行单酶切和双酶切,酶切产物电泳结果显示获得的条带与预期相符(图 1-B);测序结果也证实 M5 序列具有正确的编码框,表明 2 种重组表达质粒均构建成功。

表 1 呼肠孤病毒科几个成员 VP5/ μ 2 蛋白 NTP 结合保守区域

Table 1 Conserved NTP binding regions in Reoviridae members

病毒 Virus	基因编码蛋白序号 GenPept	区域 A Motif A(KgsgKs)	区域 B Motif B(dSDxyG)	蛋白/大小 Protein/Size
MRV	AAL99936	415-KGSFKSTIM-423	444-DSDEVGEQM-452	μ 2/736 aa
GCRV	AAM92736	410-KGSYKSTII-418	438-DSDALGDSL-446	VP5/728 aa
GIRV	AAM93416	410-KGSFKSTMI-418	438-DSDDLGLDSL-446	VP5/728 aa
GSRV	AAM92748	410-KGSYKSTII-418	438-DSDALGDSL-446	VP5/728 aa
GCRV-GD108	ADT79737	405-KGSFKSTIL-413	433-DSDDAGNTV-440	VP5/726 aa



A: M. DNA marker III; 1. PCR 产物 PCR product of M5;
B: M. DL 10 000 DNA marker; 1~3. pET30c-M5 质粒、单酶切、
双酶切产物 Restriction enzyme digestion of plasmid pET30c-M5;
4~6. pCold II-M5 质粒、单酶切、双酶切产物 Restriction enzyme
digestion of plasmid pCold II-M5.

图 1 VP5 基因的 PCR 产物及 2 种重组质粒的酶切鉴定
Fig. 1 PCR product of VP5 and identification of
recombinant plasmids by restriction enzyme digestion

2.3 重组蛋白的诱导表达及条件优化

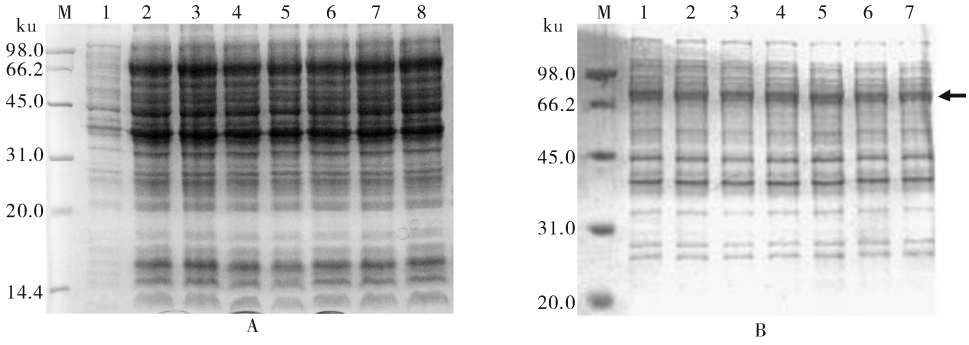
分别对诱导表达过程中的培养基、宿主菌、诱导时间、诱导温度和诱导剂浓度等进行优化。SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示,在 LB 和 TB 培养基中 2 种基因工程菌在 80 ku 位置附近均有目的条带,说

明 VP5 蛋白得到正确表达,但表达量没有明显差异。上清中未检测到目的条带,表明表达产物主要以包涵体形式存在。pET30c-M5 工程菌在 37 $^{\circ}$ C 下诱导,自 4 h 后表达量没有明显增加;pCold II-M5 工程菌在 15 $^{\circ}$ C 下诱导,在诱导 4~10 h 时,表达量随诱导时间有所增加,诱导 10~24 h 时表达量无明显增加。

温度条件梯度诱导结果显示,温度对 pET30c-M5 工程菌表达重组蛋白的量无明显影响。pCold II-M5 工程菌的诱导温度在 20 $^{\circ}$ C 时,重组蛋白表达量有较明显的下降(图略)。诱导剂 IPTG 的终浓度在 0.4~1.0 mmol/L 时重组蛋白均有表达,且在不同 IPTG 浓度下诱导表达量无明显差别(图 2)。

2.4 重组蛋白的纯化

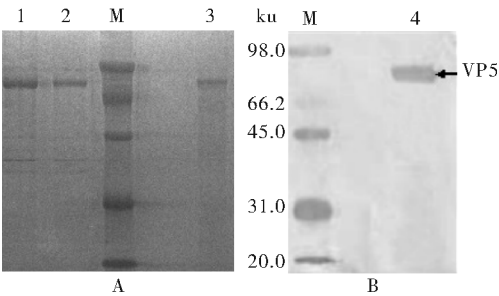
基因工程菌经诱导表达、超声破碎后,离心收集包涵体。包涵体经 2、4、6 mol/L 脲洗涤除去杂蛋白后,用含 8 mol/L 脲的结合缓冲液溶解变性;再通过透析复性,得到纯化的重组蛋白,纯度达 95% 以上。纯化样品的 SDS-PAGE 及 Western blot 结果见图 3。



A: M. Protein marker; 1. pET30c-M5 未诱导 Non-induced of pET30c-M5; 2~8. pET30c-M5 经 0.4~1.0 mmol/L IPTG 诱导(梯度为 0.1 mmol/L) The induced expression of pET30c-M5 with different IPTG concentration; B; M. Protein marker; 1~7. pCold II-M5 经 0.4~1.0 mmol/L IPTG 诱导(梯度为 0.1 mmol/L) The induced expression of pCold II-M5 with different IPTG concentration.

图 2 不同浓度 IPTG 对重组蛋白表达的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE analysis for the expression product of VP5 with different IPTG concentrations



A: M. Protein marker; 1. 包涵体经 2 mol/L 脲洗涤 Inclusion bodies washed by buffer with 2 mol/L urea; 2. 蛋白溶解于 8 mol/L 脲 The VP5 protein dissolved in buffer with 8 mol/L urea; 3. 纯化的蛋白 Purified protein; B; M. Protein marker; 4. 纯化的蛋白 Purified VP5 protein.

图 3 纯化重组蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

Fig. 3 SDS-PAGE and Western blot analysis of the purified protein

3 讨 论

呼肠孤病毒科中哺乳动物正呼肠孤病毒(MRV)的 $\mu 2$ 蛋白已有较多的研究。MRV $\mu 2$ 蛋白在每个病毒颗粒中约 20 个拷贝,是位于核衣壳内部的结构蛋白; $\mu 2$ 具有 NTPase 活性,在病毒核内转录中也起到一定作用^[11-14];Parker 等^[15] 研究发现 $\mu 2$ 与微管相连并促进其稳定,且影响包涵体的形成。MRV 的 $\mu 2$ 和 $\lambda 1$ 蛋白、轮状病毒(rotavirus)的 NSP2 蛋白、禽呼肠孤病毒的 μA 蛋白为具有同源性的蛋白,并均已被证实具有 NTPase 和 RNAase 活性^[11,16-19]。水生呼肠孤病毒属中已知的几种呼肠孤病毒 GCRV、GIRV、GSRV 等的 VP5 蛋白与 $\mu 2$ 同

源,也被推测具有 NTPase 和 RNAase 活性^[3,20]。本研究中 GCRV-GD108 的 M5 基因编码的蛋白序列与 MRV $\mu 2$ 蛋白及上述水生呼肠孤病毒属的 VP5 的同源性均在 20% 以上,且具有相似的 NTP 结合保守区域。 $\mu 2$ 的该保守区域中的 2 个赖氨酸, Lys415 和(或) Lys419 被证实对于 $\mu 2$ 的 NTPase 活性是必需的^[20]。本研究的 VP5 中也存在相应的 2 个赖氨酸(Lys405 和 Lys409),因此推测 VP5 也应具有 NTPase 活性。

大肠杆菌原核表达系统具有表达量高、培养周期短及价格低廉等特点。pET 系统是目前在大肠杆菌中表达重组蛋白的最常用系统,试验中用到的 pET30c 表达载体是采用 *T7lac* 启动子;pCold 系统是利用大肠杆菌冷休克基因 *CspA* 启动子序列的蛋白质表达系统,在 T7 系列中许多蛋白可以在 pCold 系统中得到可溶表达^[21]。笔者构建了 M5 基因的 pET30c-M5 和 pCold II-M5 表达载体,并分别在 BL21(DE3)宿主菌中表达;还将所构建的 2 种表达载体分别转化到 BL21(DE3)pLysS 菌株中进行诱导表达。与 BL21(DE3)相比, BL21(DE3)pLysS 含有表达 T7 溶菌酶的基因,被认为能够降低目的基因的背景表达水平^[22],但本试验结果显示 2 种宿主菌的目的蛋白及其背景表达并无明显差别。TB 培养基是一种通用培养基,配制中加入了磷酸盐缓冲液并引入碳源,比 LB 培养基营养更丰富,有研究显示,使用 LB 培养基没有获得可溶性表达,但在 TB 培养基中则可得到可溶表达^[23]。本试验也试用了

TB 培养基进行工程菌的培养与诱导表达,但仍然未能获得可溶性的目的蛋白。

温度对本试验中 pET 载体系统的 VP5 蛋白表达无明显影响;pCold 系列载体是采用低温诱导的方法,使大肠杆菌自身的蛋白质合成受到抑制,诱导后非目的蛋白条带较 pET 系统的少。与 pET 系统相比,pCold 系统被认为可提高蛋白质的可溶性^[21]。本试验中 pCold 系统的诱导温度在 15℃ 时蛋白表达水平较高,同时 pCold 系统的非目的蛋白的表达量也较 pET 系统的少,但由于低温培养诱导,单位体积的细菌量较少,1 L 培养基中诱导后的总菌量仅 1.5 g 左右,而 pET 的总菌量可达 5 g,目的蛋白的量也偏低;再者 pCold 系统低温诱导需要较长时间(10 h 以上),而 pET 系统只需要 4 h 即可达到最大表达量。综合对耗时与表达产物产量的研究结果,笔者认为 pET 系统更适用于大量表达 VP5 蛋白。

参 考 文 献

- [1] 陈燕桑,江育林.草鱼出血病病毒形态结构及其理化特性的研究[J].科学通报,1983,28(18):1138-1140.
- [2] RANGEL A A,ROCKEMANN D D,HETRICK F M,et al. Identification of grass carp hemorrhage virus as a new group of aquareovirus[J].J Gen Virol,1999,80:2399-2402.
- [3] ATTOUI H,FANG Q,JAAFAR F M,et al. Common evolutionary origin of aquareoviruses and orthoreoviruses revealed by genome characterization of golden shiner reovirus, grass carp reovirus, striped bass reovirus and golden ide reovirus(genus *Aquareovirus*, family *Reoviridae*)[J].J Gen Virol,2002,83:1941-1951.
- [4] 方勤,朱作言.水生呼肠孤病毒研究进展[J].中国病毒学,2003,18(1):82-86.
- [5] 柯丽华,方勤,蔡宜权.一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性[J].水生生物学报,1990,14(2):153-159.
- [6] 方勤,SANKET S.草鱼呼肠孤病毒的三维重构与衣壳蛋白特性[J].中国科学 C 辑:生命科学,2005,35(3):231-237.
- [7] YE X,TIAN Y Y,DENG G C,et al. Complete genomic sequence of a reovirus isolated from grass carp in China[J].Virus Res,2012,163:275-283.
- [8] NOBLE S,NIBERT M L. Core protein $\mu 2$ is a second determinant of nucleoside triphosphatase activities by reovirus cores[J].J Virol,1997,71(10):7728-7735.
- [9] NIBERT M L,KIM J. Conserved sequence motifs for nucleoside triphosphate binding unique to turreted *Reoviridae* members and *Coltivirus*[J].J Virol,2004,78(10):5528-5530.
- [10] DESRIAN I,FERRI S,SODE K. Functional expression of *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase flavin domain in *Escherichia coli*[J].Biotechnol Lett,2010,32:855-859.
- [11] NOBLE S,NIBERT M L. Characterization of an ATPase activity in reovirus cores and its genetic association with core-shell protein $\lambda 1$ [J].J Virol,1997,71(3):2182-2191.
- [12] COOMBS K M. Stoichiometry of reovirus structural proteins in virus,ISVP,and core particles[J].Virol,1998,243(1):218-228.
- [13] DRYDEN K A,FARSETTA D L,NIBERT M L,et al. Internal structures containing transcriptase-related proteins in top component particles of mammalian orthoreovirus[J].Virol,1998,245(1):33-46.
- [14] YIN P,CHEANG M,COOMBS K M. The M1 gene is associated with differences in the temperature optimum of the transcriptase activity in reovirus core particles[J].J Virol,1996,70(2):1223-1227.
- [15] PARKER J S L,BROERING T J,NIBERT M L,et al. Reovirus core protein $\mu 2$ determines the filamentous morphology of viral inclusion bodies by interacting with and stabilizing microtubules[J].J Virol,2002,76(9):4483-4496.
- [16] SU Y P,SHIEN J H,LIU H J,et al. Avian reovirus core protein μA expressed in *Escherichia coli* possesses both NTPase and RTPase activities[J].J Gen Virol,2007,88:1797-1805.
- [17] BISAILLON M,LEMAY G. Characterization of the reovirus $\lambda 1$ protein RNA 5'-triphosphatase activity[J].J Biol Chem,1997,272(47):29954-29957.
- [18] BISAILLON M,BERGERON J,LEMAY G. Characterization of the nucleotide triphosphate phosphohydrolase and helicase activities of the reovirus $\lambda 1$ protein[J].J Biol Chem,1997,272(29):18298-18303.
- [19] VASQUEZ-DEL C R,GONZALEG-NILO F D,RIADI G,et al. Histidine triad-like motif of the rotavirus NSP2 octamer mediates both RTPase and NTPase activities[J].J Mol Biol,2006,362(3):539-554.
- [20] KIM J,PARKER J S L,MURRAY K E,et al. Nucleoside and RNA triphosphatase activities of orthoreovirus transcriptase cofactor $\mu 2$ [J].J Biol Chem,2004,279(6):4394-4403.
- [21] XIA B,INOUE M,ETCHEGARAY J P,et al. Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*[J].J Biol Chem,2001,276(38):35581-35588.
- [22] SAMBROOK J,LASEL D W. 分子克隆 [M]. 3 版. 黄培堂,译.北京:科学出版社,2003:1232-1236.
- [23] 陈亚洁,李劲松.登革 2 型病毒 NS3 蛋白 NTPase/RNA 解旋酶结构域的原核表达及活性研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2005,25(11):890-894.

Prokaryotic expression of GCRV-GD108 VP5 protein

WANG Hang-jun^{1,2} YE Xing^{1,2} TIAN Yuan-yuan¹
ZHANG Li-li¹ QU Lan^{1,2} ZHANG Rui^{1,2}

1. Pearl River Fishery Research Institute,CAFS/Key Lab of Tropic & Subtropic Fisheries
Resource Utilization and Aquaculture,Ministry of Agriculture,Guangzhou 510380,China;
2. College of Fisheries & Life,Shanghai Ocean University,Shanghai 201306,China

Abstract Grass carp reovirus (GCRV) has a genome consisting of 11 double-stranded RNA, and possesses several structural proteins. The VP5 protein is one of the structural proteins in the core capsid encoded by the M5 gene of GCRV-GD108, a reovirus strain which was isolated from grass carp cultured in Guangdong and had been identified by our lab recently. Primers with restriction enzyme digesting sites were designed based on the cDNA of M5 gene. The amplification products of M5 gene were digested and cloned into prokaryotic expression vectors. Two recombinant protein expression vectors, pET30c-M5 and pCold II-M5, which had been identified by PCR, enzyme digestion and sequence analysis, were transformed into *E. coli* strains, respectively. Then the recombinant expression strains were induced. The effects of culture medium, induction time, temperature and IPTG levels were analyzed, and suitable conditions for the expression of the target protein were proposed. The results of SDS-PAGE and Western blot showed that the target protein VP5 with molecular weight around 80 ku was obtained, but the recombinant protein was mainly presented in inclusion bodies. The inclusion bodies were then denatured, dialyzed and renatured to get the recombinant protein. The target protein, which was expressed by pET30c-M5/BL21(DE3) accounted for 22. 5% of the total bacteria proteins, and was highly purified (>95. 0%). The pET30c-M5 is considered to be an engineering strain suitable for large scale expression for it cost less time of inducing and got higher production than pCold II-M5.

Key words GCRV-GD108; M5 gene; Western blot; prokaryotic expression; purification

(责任编辑:边书京)