

## APOPTOSIS: A MECHANISM FOR POLIOVIRUS TO INDUCE CYTOPATHIC EFFECTS

LI Yan Ping HU Yun Zhang HU Ning Zhu SHAO Cong Wen  
HE Ji Hong Qu Su LIANG Yan QIAN Ya Ping  
(Institute of Medical Biology, 650107, Kunming, PRC)

### ABSTRACT

In order to study the relationship between cytopathic effects and apoptosis, we used type-III live attenuated Poliovirus vaccine (Strain: Zhong III-2) to infect the human diploid fibroblast (KMB17) in culture. There were two kinds of different morphological changes occurred during the whole infection by Poliovirus. At the first stage, the typical CPE appeared, the confluent KMB17 fibroblast rapidly shrank and disintegrated 24 hours after Poliovirus infection, through the analysis of light microscopy, fluorescent light microscope, electronic microscopy, flow cytometer and DNA electrophoresis, it were demonstrated that the CPE cells showed the typical apoptotic characteristics of cellular shrinkage, nuclear shrinkage, crescent chromatin around nuclear membrane, DNA breakage (although not typical ladder type). At the second stage, the characteristics of secondary necrosis appeared, cellular lysis and chromatin breakdown were detected by electronic microscopy and flow cytometer. In conclusion, we demonstrated that Poliovirus causes both apoptosis and secondary necrosis in cell culture, the CPE caused by Poliovirus is actually the apoptosis in human diploid fibroblast (KMB17).

**Key words:** Cytopathic effects Apoptosis Human embryonic lung diploid fibroblast

## 钙结合蛋白 D-9K 基因原核表达载体的构建、 表达产物纯化及其多克隆抗体的制备\*

柯碧霞\*\* 王健 沈卫英 高建民\*\* 申庆祥\*\*\*

(上海市计划生育科学研究所 上海 200032 \*\*福建师范大学生物工程学院 福州 350007)

钙结合蛋白(Cabp)D-9k 是小鼠着床时子宫内膜腔上皮和腺上皮分泌的蛋白,最早在小鸡壳腺体和大鼠的小肠中发现<sup>[1]</sup>。由于 CabpD-9k 是跨细胞  $Ca^{2+}$  运输的介质,介导  $Ca^{2+}$  信号转导,在促进胚胎发育<sup>[2]</sup>,滋养层细胞分化,诱导蜕膜反应,以及提高着床效率中起重要的作用<sup>[3,4]</sup>。所以研究子宫内膜  $Ca^{2+}$  信号转导已成为哺乳动物子宫生物学的重要研究对象,并认为有可能通过免疫干扰着床而达到抗生育的效果。

为制备抗 CabpD-9k 抗体和探索 CabpD-9k 在着床中的作用机理,首先必须分离纯化得

到足够量的 CabpD-9k。为此,拟采用基因重组技术制备 CabpD-9k。我们构建了含 CabpD-9k- $\beta$ hCG cDNA 的表达质粒,并在大肠杆菌中表达,先制备含 CabpD-9k- $\beta$ hCG 融合蛋白的包涵体,进而在 AKTA explorer(Pharmacia)中低压液相分析系统上,利用 RESOURCE<sup>TM</sup>RPC(反向

本文 2000 年 1 月 21 日收到,4 月 6 日接受。

\* WHO 资助项目(编号 97826)和国家重点基础研究规划项目(编号 G1999055903)。

\*\*\* 通信联系人。

层析柱)纯化获得融合蛋白,免疫 C57BL 小鼠,制备多克隆抗体。

## 材料与方 法

### 1. 材料

DNA 限制性内切酶和修饰酶购自 Promega 和皓嘉公司。PGEM-T Easy/CabpD-9k 为澳大利亚亨利王子医学研究所馈赠。大肠杆菌 TG-1 和质粒 pBS KS +/-、pT7-7/ $\beta$ hCG 由本实验室保存,pBV220 为复旦大学遗传所馈赠。兔抗人 hCG 抗体由本室制备,碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗购自 Gibco 公司。预染 SDS-PAGE 分子量标准(广谱)购自 Bio-Rad 公司。C57BL 小鼠购自上海西普一必凯(SIPPR/BK)实验动物有限公司。RESOUCETM RPC 柱和 AKTA explorer 为 Pharmacia 公司产品。

### 2. 表达质粒 pT7-7/CabpD-9k- $\beta$ hCG 的构建与测序

pGEM-T Easy/CabpD-9k 经 EcoRI 酶切,低熔点琼脂糖凝胶电泳回收纯化 CabpD-9k cDNA 片段,与经 EcoRI 酶切脱磷的 pBS KS +/-连接,得到质粒 pBS/CabpD-9k(图 1)。pBS/CabpD-9k 经 NotI 和 ClaI 双酶切,在 dNTP 存在下,经 Klenow DNA 聚合酶将粘性末端填平后,再经低熔点琼脂糖凝胶电泳纯化得到 CabpD-9k/(NotI&ClaI) cDNA 片段,并将它与经 EcoRI 和 BamHI 双酶切后,粘性末端被填平的表达质粒 pT7-7/ $\beta$ hCG 连接,得到重组质粒 pT7-7/CabpD-9k- $\beta$ hCG(图 1),采用 Sanger 双脱氧链终止法测序验证 CabpD-9k- $\beta$ hCG 融合基因的核苷酸序列。重组质粒转化大肠杆菌 DE3 表达融合蛋白 CabpD-9k- $\beta$ hCG。

### 3. pBV220-CabpD-9k- $\beta$ hCG 的构建及其在大肠杆菌 TG-1 的表达

为了进一步提高融合蛋白 CabpD-9k- $\beta$ hCG 的表达量,我们将 CabpD-9k- $\beta$ hCG cDNA 亚克隆到 pBV220 表达质粒中。pBV220 经 EcoRI 和 BamHI 双酶切,粘性末端填平后,低熔点琼脂糖凝胶电泳纯化得到 pBV220/(EcoRI&BamHI) 表达载体,同时 pT7-7/CabpD-9k- $\beta$ hCG 经 NdeI、ClaI 双酶切,其粘性末端填平后得到 CabpD-9k- $\beta$ hCG/(NdeI&ClaI) cDNA 片段。上述片段和载体连接后,经筛选得到 pBV220/CabpD-9k- $\beta$ hCG 重组质粒(图 2),将重组质粒 pBV220/CabpD-9k- $\beta$ hCG 转化到大肠杆菌 TG-1 中,42℃热诱导下,表达融合蛋白 CabpD-9k- $\beta$ hCG。

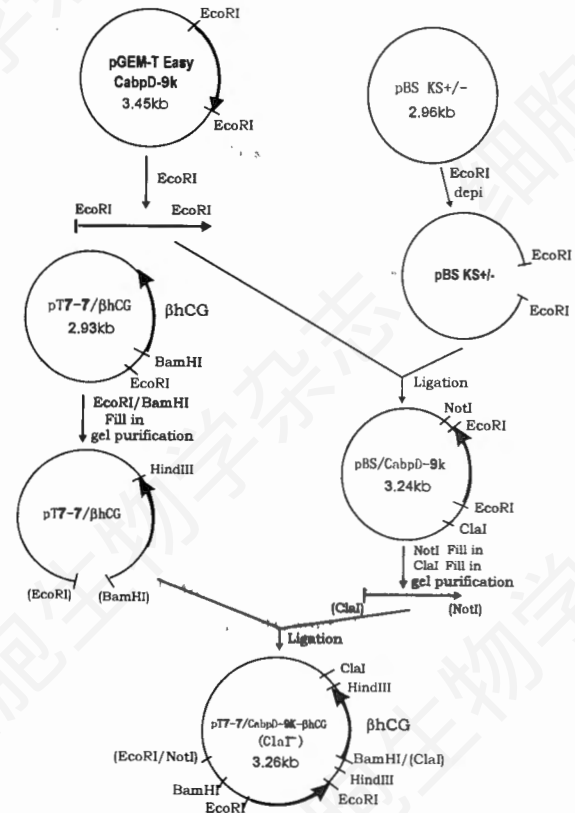


图 1 表达质粒 pT7-7/CabpD-9K- $\beta$ hCG 的构建

### 4. 融合基因表达产物的分析鉴定

取经 42℃热诱导后 2 OD<sub>600</sub>的表达菌,离心后,弃去上清液,加入 400 $\mu$ l 悬浮裂解液(2%SDS, 50mmol/L Tris-HCl pH8.0, 2mmol/L PMSF),混匀后置-20℃冰箱备用。上样时取 20 $\mu$ l 细菌裂解液,加入 4 $\mu$ l 6 $\times$ 上样缓冲液,煮沸离心后,作 12.5%胶浓度 SDS-PAGE 分析。同时以相同条件培养的 pBV220 转化菌和未诱导的含 pBV220/CabpD-9k- $\beta$ hCG 质粒表达菌作为对照,以蛋白分子量标准作为分子量参照。免疫印迹测定(Western blot)操作方法按文献[5]。

### 5. 融合基因表达产物的纯化及鉴定

样品处理:按分子克隆方法<sup>[6]</sup>制备得含融合蛋白的包涵体,包涵体溶于 6mol/L 盐酸胍(50mmol/L Tris-Cl pH 8.0, 100mmol/L DTT), 12,000rpm 离心,取上清,0.22 $\mu$ m 微孔滤膜过滤,滤出液用 RESOUCETM RPC 柱进行分离。

1) 柱平衡:上柱前,抽去泵中气泡,装柱,以 0%—

100%B液(90%乙氰,10%milliQ水,0.1%三氟乙酸)洗柱子至吸收曲线呈水平为止;100%-0%B液洗平,上样前用15ml(5倍柱体积)A液(90%milliQ水,10%乙氰,0.1%三氟乙酸)平衡柱。

2) 上样:A液洗15.1ml后开始记录,16.1ml后注入样品,2分钟后将机器从inject档切换到load档。

3) 柱洗脱:A液洗19.1ml后,以15%B液,85%A液混合物洗涤,直至未结合物被洗净为止;15%-75%B液梯度洗脱15ml(5倍柱体积)。

4) 收集:分别收集45%-51%B液洗脱产物,51%-55%B液洗脱产物,55%-59%B液洗脱产物,59%-63%B液洗脱产物和63%-69%B液洗脱产物。

5) 鉴定:将收集的分离样品以水泵抽去乙氰,冷冻干燥过夜。次日,分别用600 $\mu$ l的双蒸水溶解分离产物。取20 $\mu$ l,稀释40倍,测OD<sub>280</sub>。取相同的OD值的样品,作SDS-PAGE银染和Western blot分析<sup>[8]</sup>,其余的分离产物抽干成粉末后,-20℃保存。

## 6. 免疫方法

C57BL小鼠(鼠龄8周,体重18-20g),每只100 $\mu$ g重组融合蛋白/0.05ml生理盐水,加0.05ml弗氏完全佐剂乳化。第一次注射用弗氏完全佐剂,此后均用弗氏不完全佐剂。背部皮下两点注射,每隔两周注射一次。第三次注射后10天小鼠尾部取血10 $\mu$ l溶于490 $\mu$ l生理盐水中,-20℃保存,作ELISA分析<sup>[7]</sup>。

第三次注射后2周作回忆刺激:0.5mg纯化产物溶解于500 $\mu$ l生理盐水中,腹腔注射,每只小鼠注射100 $\mu$ l。

三天后,摘去小鼠眼球取血,每只得约1ml全血,37℃放置1小时,4℃放置2小时,6000g离心20分钟,取上层血清,-20℃保存备用。

## 结 果

### 1. 表达质粒 pT7-7/CabpD-9k- $\beta$ hCG 的构建与测序

表达质粒 pT7-7/CabpD-9k-hCG 的构建如图1所示。先将 CabpD-9k cDNA 的 EcoRI 片段克隆入 pBS KS+/- 的 EcoRI 位点,得到质粒 pBS/CabpD-9k(图1)。用 EcoRI 从 pBS/CabpD-9k 中切出 CabpD-9k cDNA 片段,粘性末端用 Klenow DNA 聚合酶填平,将其亚克隆入 pT7-7/ $\beta$ hCG 的 EcoRI/BamHI(粘性末端填

平)位点,得到 pT7-7/CabpD-9k- $\beta$ hCG(图1),经 BamHI 酶切后琼脂糖凝胶电泳显示有一条大小约 340bp 的条带,说明 CabpD-9k cDNA 片段是正向插入,其基因的表达受控于 T7 启动子。DNA 序列测定结果也证明 CabpD-9k- $\beta$ hCG 的 DNA 序列与预期的相一致。用该质粒转化大肠杆菌 DE3,结果表明融合蛋白 CabpD-9k- $\beta$ hCG 的表达量偏低,仅占细菌总蛋白的 5%左右(SDS-PAGE 银染数据未显示)。为进一步提高表达量,我们拟用表达载体 pBV220 来表达该融合蛋白。

### 2. 表达质粒 pBV220/CabpD-9k- $\beta$ hCG 的构建及其在大肠杆菌 TG-1 中的表达

表达质粒 pBV220/CabpD-9k- $\beta$ hCG 的构建按图2进行,用 NdeI/ClaI 酶切质粒 pT7-7/CabpD-9k- $\beta$ hCG 得到的 CabpD-9k- $\beta$ hCG/NdeI&ClaI cDNA 片段,两粘性末端均被填平后,亚克隆到 pBV220/EcoRI&BamHI 载体(两粘性末端也均已被填平)中,得到重组质粒 pBV220/CabpD-9k- $\beta$ hCG。该质粒经 SalI、XbaI 酶切后,琼脂糖凝胶显示有 900bp 片段出现,说明质粒含融合基因插入片段,(图3, Lane1)。该质粒经 BamHI 酶切后,琼脂糖凝胶电泳分别显示 320bp、510bp 的条带(图3, Lane2);而用 PstI 酶切能产生 371bp 和 350bp 的条带(图3, Lane4),表明 CabpD-9k- $\beta$ hCG cDNA 片段已按所需方向插入 pBV220 中,即融合蛋白的表达受控于 P<sub>R</sub>P<sub>L</sub> 启动子,被表达的基因全长为 786bp,表达产物为 262 氨基酸残基,其分子量应为 30.1KD。

### 3. 表达产物的免疫印迹分析

重组质粒 pBV220/CabpD-9k- $\beta$ hCG 转化大肠杆菌 TG1。表达菌于 30℃ 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.8-1.0 时,42℃ 热诱导 5 小时,取 20 $\mu$ l 菌体裂解液作 12.5% SDS-PAGE 后,进行 Western blot 分析。Western blot 显示在 34.5KD 处的 CabpD-9k- $\beta$ hCG 融合蛋白条带可被兔抗人 hCG 抗体识别,其分子量与理论推算值相近(图4, Lane3-9)。而空质粒 pBV220 转化菌(图

4, Lane 1) 及未经诱导的表达菌(图 4, Lane 2) 与 hCG IgG 呈阴性反应。

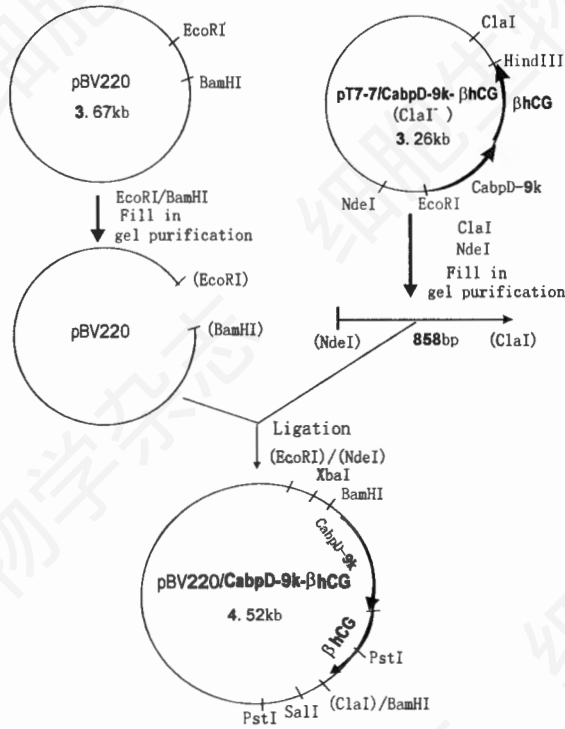


图 2 表达质粒 pBV220/CabpD-9k-βhCG 的构建

4. 融合基因表达产物的纯化及鉴定

将收集的纯化产物作 Western blot, 结果显示: 和未经诱导及诱导表达菌的裂解液相比, 洗脱液 B 的三个浓度梯度区间(51%—55%, 55%—59%, 59%—63%)的洗脱产物在相似的位置均有一特异性条带出现。该条带的分子量大小(34.5KD)和理论值相近(图未出示)。

5. 融合蛋白多克隆抗体的制备

用纯化的融合蛋白包被 96 孔板(40μg/100μl 孔), 经抗融合蛋白抗体和辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠抗体反应后, 用邻苯二胺进行显色。小鼠抗体的滴度为 1:250,000—1:650,000 (图 5)。这说明该抗原能有效地诱发抗体的产生。

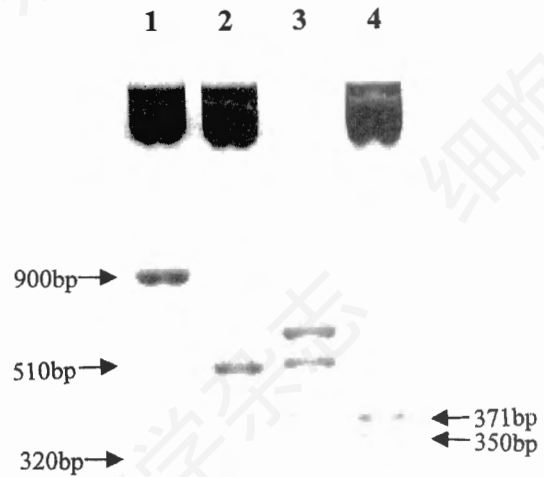


图 3 表达质粒 pBV220/CabpD-9k-βhCG 的酶切鉴定图谱

1. SalI/XbaI;
2. BamHI;
3. 低分子量 Marker (pBR322/MspI), 从大到小的 6 条主带是 622、527、404、307、238/242bp;
4. PstI。

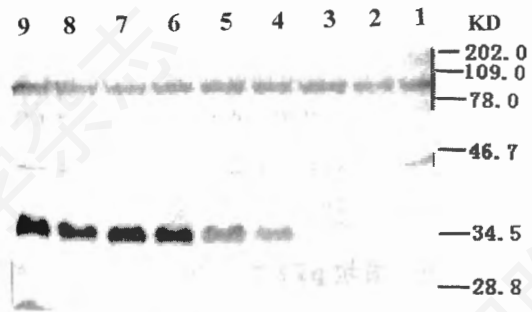


图 4 重组质粒 pBV220/CabpD-9k-βhCG 转化菌诱导表达的 Western blot 分析

1. 诱导的母体质粒 pBV220 转化菌;
2. 未经诱导的重组质粒 pBV220/CabpD-9k-βhCG 表达菌;
- 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 分别为含重组质粒 pBV220/CabpD-9k-βhCG 表达菌诱导 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 小时。

## 讨 论

本研究报道了编码融合蛋白 CabpD-9k- $\beta$ hCG 基因表达质粒 pBV220/CabpD-9k- $\beta$ hCG 的构建及其表达,表达产物纯化及多克隆抗体的制备。CabpD-9k 基因和  $\beta$ hCG 基因融合表达,可用抗 hCG 抗体来检测融合蛋白的表达,有利于表达产物的纯化鉴定。

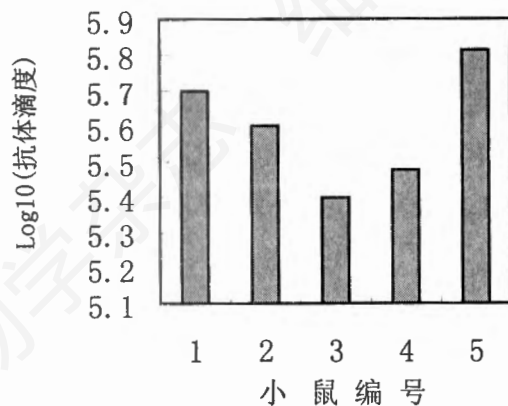


图5 C57BL 小鼠第三次免疫后第10天小鼠血清抗体滴度

CabpD-9k- $\beta$ hCG 融合蛋白仅在诱导后表达,且在 42℃热诱导 5 小时时达到最高,约占细菌总蛋白的 12.5%,诱导 6,7,8 小时后表达量没有明显变化,说明融合蛋白的表达对细胞没有明显的毒副作用。蛋白免疫印迹分析结果表明,表达融合蛋白显示与兔抗人 hCG 特异免疫反应,由于融合基因经测序证实读框是正确的,hCG $\beta$  能获得表达,CabpD-9k 基因理应得到正确表达。

为了进一步验证免疫小鼠血清中抗 CabpD-9k- $\beta$ hCG 抗体的可靠性。我们又构建了表达质粒 pGEX-4T-2-CabpD-9k,表达了 GST-CabpD-9k 融合蛋白,融合基因全长 1035bp,编码 345 个氨基酸,表达产物的分子量应为 38.0KD。表达产物作 SDS-PAGE,转移至硝酸纤维素膜上后,以抗 CabpD-9k- $\beta$ hCG 血清为一抗作 Western blot,结果显示,抗

CabpD-9k- $\beta$ hCG 抗体和 GST-CabpD-9k 融合蛋白呈特异免疫结合(图 6, Lane2 中箭头所指的主带,分子量约为 38.0KD),说明免疫小鼠血清中含有我们所需的能特异识别 CabpD-9k 的抗原表位。图 6 Lane2 中,除主带外尚有显色较弱的条带,可能是降解产物,该产物在作 SDS-PAGE 银染时也出现类似的条带。

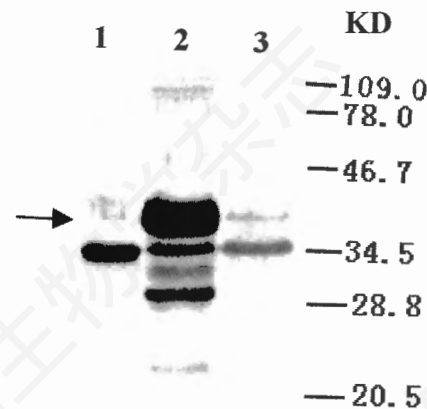


图6 重组质粒 pGEX-4T-2-CabpD-9k 转化菌诱导表达的 Western blot 分析

1. 纯化的 CabpD-9k- $\beta$ hCG 融合蛋白;
2. IPTG 诱导的含重组质粒 pGEX-4T-2-CabpD-9k 表达菌;
3. 未经诱导的含重组质粒 pGEX-4T-2-CabpD-9k 表达菌。

我们下一步工作是,利用多克隆抗体进行 CabpD-9k 在着床中的功能的研究。制备单克隆抗体,进一步研究 CabpD-9k- $\beta$ hCG 作为抗着床的新型避孕疫苗的可行性。

## 摘 要

本研究构建了 pBV220/CabpD-9k- $\beta$ hCG 表达质粒,在大肠杆菌 TG-1 中进行表达,得到了 CabpD-9k- $\beta$ hCG 融合蛋白。SDS-PAGE 分析显示融合蛋白的分子量约为 34.5KD。Western blot 结果表明,融合蛋白与兔抗人 hCG IgG 特异结合。用纯化的融合蛋白免疫 C57BL 小鼠,制备了多克隆抗体,这为进一步研究钙结

合蛋白 D-9k 在着床中的功能和子宫内膜  $Ca^{2+}$  信号转导奠定了基础。

关键词: 钙结合蛋白 D-9K 大肠杆菌  
克隆和表达 多克隆抗体

### 参 考 文 献

- [1] Inpanbutr, N. et al., 1994, *Biology of Reproduction*. **50**:561-571.  
[2] Stachecki, J. J. and Armant, D. R., 1996, *Development*. **122**:2485-2496.  
[3] Sakoff, J. A. and Murdoch, R. N., 1994,

*Journal of Reproduction and Fertility*. **101**: 97-102.

- [4] Jun Wang, et al., 1998, *Development*. **125**: 4293-4302.  
[5] 申庆祥等, 1995, 生物化学与生物物理学报, **27**(2):129-136.  
[6] Sambrook, J. et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd edition). Cold Spring Harbor Laboratory, Press, U. S. A. .  
[7] 徐宜为, 1991, 《免疫检测技术》第六章“免疫酶技术”, 科学出版社.

## THE CONSTRUCTION OF PROKARYOTIC EXPRESSION VECTOR FOR THE GENE ENCODING THE CALCIUM BINDING PROTEIN D-9K, PURIFICATION OF THE EXPRESSED PRODUCT AND PREPARATION OF ITS POLYCLONAL ANTIBODY

KE Bi Xia\* WANG Jian SHEN Wei Ying GAO Jian Min\* SHEN Qing Xiang  
(Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai, 200032;  
\* Biological Engineering College, Fu Jian Teacher's University, Fu Zhou, 350007)

### ABSTRACT

The expression plasmid pBV220/CabpD-9K- $\beta$ hCG was constructed, then was transferred into *E. Coli* TG-1 to express the fusion protein CabpD-9K- $\beta$ hCG. The result of SDS-PAGE showed that CabpD-9K- $\beta$ hCG had an apparent molecular weight of 34.5KD. Western blot analysis indicated that the product CabpD-9K- $\beta$ hCG could be recognized specifically by the rabbit-anti-human hCG IgG. Finally we immunized C57 BL mouse with the purified fused protein to acquire the polyclonal antibody which would lay a foundation of the study on the CabpD-9K function and endometrial calcium signal transduction.

Key words: Calcium binding protein D-9K *E. coli* Cloning and expression Polyclonal antibody

## 诱导嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*) 细胞凋亡样变化的研究

艾斯卡尔·依米提

庞延斌

(新疆维吾尔自治区维吾尔医研究所 乌鲁木齐 830001)

(华东师范大学生物系 上海 200062)

细胞凋亡(apoptosis)即程序性细胞死亡(Programmed Cell Death)是一种细胞生理性死亡形式,在活体组织中的细胞可以通过细胞凋亡消亡,不致引起周围细胞的损伤。细胞凋亡是一个主动过程,它是机体在生理条件下受刺

激后经过多种途径的信号传递导致细胞产生一系列形态和生物化学方面的改变而引起的细胞死亡,与创伤和疾病引起的坏死(Necrosis)是不相同的<sup>[1,2]</sup>。

本文 1999 年 9 月 1 日收到,2000 年 4 月 28 日接受。