

文章编号: 1674-7054(2016)01-0082-07

海南五指山美洲商陆抗病毒蛋白 *PAP-I* 基因的原核表达及活性验证

黄超^{1,2,3}, 张丽丽², 邓柳红³, 张春发²

(1. 海南大学 农学院, 海南 海口, 570228; 2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海南 海口, 571101;
3. 海南省蛋白质工程药物重点实验室/海口市生命科学药物工程技术研究开发中心, 海南 海口, 570311)

摘要: 提取春季海南五指山美洲商陆叶片总 RNA, 利用 RT-PCR 技术获得 cDNA, 再根据 Genbank 上公布的 *PAP-I* 基因序列设计引物扩增 *PAP-I* 基因, 并连接到 pET-30a 载体上进行表达, 表达的产物以不溶的包涵体形式存在, 经过变性、镍柱亲和层析纯化, 纯化后的重组蛋白经过 Western Blot 验证表明该基因得到了正确表达, 利用柱上循环复性后的重组 *PAP-I* 蛋白经麦胚提取物转录/翻译偶联系统验证具有抑制蛋白质合成的活性。

关键词: 美洲商陆; 抗病毒蛋白; 载体构建; 原核表达; 海南五指山

中图分类号: Q 786

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2016.01.014

美洲商陆抗病毒蛋白(Pokeweed Antiviral Proteins, PAPs) 是一类天然的广谱抗病毒蛋白, 能抗多种植物和动物病毒^[1-3], 对真菌和细菌也有一定的抑制作用^[4]。其浓度在不抑制寄主细胞蛋白质合成的情况下, 可有效地抑制病毒的增殖, 属于 I 型核糖体失活蛋白(Ribosome-Inactivating Proteins, RIP)^[5]; 该蛋白还具有 RNA N-糖苷酶的活性, 能专一地从真核生物核糖体 60S 大亚基的 28S rRNA 特异位点 A4324 上切下一腺嘌呤, 使核糖体难以与蛋白质合成的延伸因子 EF-2 结合, 从而阻碍了细胞中蛋白质的合成^[6]。目前已从美洲商陆植株体内分离到美洲商陆抗病毒蛋白的很多种, 分离到的 PAP 随季节和植株部位的不同而不同, 纯化自美洲商陆叶片中的 PAP 有 3 种, 来自春季叶片的称为 PAP^I, 来自夏季叶片的称为 PAP^{II}, 来自晚夏(早秋) 时候叶片的称为 PAP^{III}; 从美洲商陆根中纯化的称为¹PAP-R^[4]; 从美洲商陆种子中纯化的称为 PAP-S^[11], 它是目前所发现的商陆蛋白中体外活性最强的^[12]; 从发根农杆菌转化的美洲商陆的发根中, 纯化出一种新型的 I 型 RIP, 命名为 PAP-H^[13]; 还有一种称为 a-PAP, 在美洲商陆所有的器官中都有表达, 在序列上与 PAP-S 类似^[14]。PAP-I 抗病毒蛋白是美洲商陆春季叶片中表达的一种抗病毒蛋白, 近年来为了将该种抗病毒蛋白应用到动植物病毒病的防治上, 广大研究者对其分子结构、蛋白化学和抗病毒机制等领域进行了深入广泛的研究。由于 PAP-I 蛋白仅在春季的商陆叶片中表达, 受季节限制特别明显, 如能在大肠杆菌中成功表达并能进行纯化、复性, 对理论研究和实际应用都具有重大的意义。目前虽然国内外文献多有报道 PAP-I 蛋白的原核表达研究, 但很少有报道 PAP-I 蛋白的抗体, 主要由法国 UFR 分子生物学实验室赠送^[15], 原因可能是 PAP-I 蛋白的免疫原性低, 制备的抗体效价低。笔者通过采用多点分散免疫法, 制备的多克隆抗体效价可以达到 12 万, 可为后续的研究提供很好的检测材料。同时, 通过采用柱上循环复性的方法, 得到的 PAP-I 蛋白通过麦胚提取物转录/翻译偶联系统验证表明, 重组蛋白具有抑制蛋白质翻译的活性, 可以获得有活性的重组 PAP-I 蛋白, 为今后大量用于抗病毒药物的

收稿日期: 2015-09-11

基金项目: 海南省重大科技项目(ZDZX2013008-04-03), 海口市重点科技计划项目(2012-060) 和国家自然科学基金项目(31101200)

作者简介: 黄超(1985-), 男, 海南大学农学院 2007 级硕士研究生. E-mail: huangchao_sr@163.com

通信作者: 张春发, 男, 研究员. 研究方向: 农业生物技术. E-mail: zhangchunfa_sr@163.com

研制提供了技术和原料支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株及质粒 大肠杆菌 DH5 α , BL21(DE3) 菌株均由本实验室保存。克隆载体 pMD-18T simple vector 购于 Takara 公司、原核表达载体 PET-30a 购于 Invitrogen 公司。

1.2 酶及试剂 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶购于 Fementas 公司,质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购于 Biomiga 公司、组氨酸标签蛋白纯化试剂盒购自北京康维世纪生物科技有限公司、麦胚提取物转录/翻译偶联系统购于 Promega 公司,福氏佐剂购于 Sigma 公司、cDNA 第1链合成试剂盒购于 Takara 公司,其它试剂均为国产分析纯产品。

1.3 五指山美洲商陆 由中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所从海南五指山采集并鉴定为美洲商陆。

1.4 实验动物 制备多克隆抗体的新西兰长耳兔购于海南医学院。

1.5 总 RNA 的提取 取新鲜的五指山美洲商陆春季的叶片,用 Trizol 试剂提取叶片的总 RNA,具体操作:1) 将新鲜海南五指山美洲商陆叶片直接放入研钵中,加入液氮,快速研磨。按组织: Trizol = 50 ~ 100 mg: 1 mL 加入 Trizol 提取液。转入离心管进行第2步操作。2) 室温放置 5 ~ 10 min,使其充分裂解。3) 12 000 r · min⁻¹ 离心 5 min,将上清转移至新的离心管中,弃沉淀。4) 按氯仿: Trizol = 200 μ L: 1 mL 比例加入,振荡混匀,室温放置 10 min。5) 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r · min⁻¹, 离心 10 min。6) 将上清转移到新的离心管中,加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇 = 25: 24: 1 的混合液,重复步骤 5)。7) 将上清转移到新的离心管中,加入等体积异丙醇,混匀,室温放置 10 min。8) 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r · min⁻¹, 离心 10 min。9) 弃上清,按 1 mL Trizol 加入 1 mL 75% 乙醇的比例加入 75% 乙醇洗涤沉淀。10) 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r · min⁻¹, 离心 5 min,弃上清。11) 室温晾干 5 ~ 10 min。12) 最后用 30 ~ 50 μ L DEPC 处理水溶解 RNA 样品。

1.6 cDNA 第1链的合成 用 oligo-dT 作为引物,用提取的总 RNA 为模板进行 cDNA 第1链的合成,具体操作方法参照 Takara cDNA 第1链合成试剂盒说明书。

1.7 *PAP-I* 基因的扩增 根据 Genbank 上公布的 *PAP-I* 基因的序列,*PAP-I* 基因编码区全长 942 bp, 编码 313 个氨基酸,N 末端有 1 个由 22 个氨基酸组成的信号肽,C 末端有 1 个由 29 个氨基酸组成的稳定区。基因的扩增用于后期原核表达载体的构建,所以去除 N 端的 66 个碱基编码的 22 个氨基酸后,全长共 876 bp。

用 Prime 5.0 软件设计引物,以反转录的 cDNA 链作为模板进行 PCR 扩增。引物序列为 PAPF1: 5'-CGGGATCCGTGAATACAATCATCTACAATGTTGGA-3'; PAPR1: 5'-CCCAAGCTTTCAGAATCCTTCAAAT-AGATCACCA-3',为了构建表达载体的方便,在 *PAP-I* 基因 5'端引入 BamH I 酶切位点,3'端引入 Hind III 酶切位点。下划线为酶切位点的位置。

1.8 PCR 产物的克隆 将 PCR 产物回收后与 pMD-18T simple vector 连接,转化 DH5 α 感受态细胞,经双酶切验证,将获得的阳性单克隆送南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

1.9 原核表达载体的构建 重组质粒经 BamH I 和 HindIII 双酶切后,胶回收试剂盒回收目的基因片段,用 T4-DNA 连接酶连接到经同样双酶切后的表达载体 pET-30a 中,得到重组质粒 pET-30a-PAP-I,并转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态菌株,均匀涂布在含有 100 μ g · mL⁻¹ Kan 的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 下培养 16 h 后挑取单菌落在含有 100 μ g · mL⁻¹ 的 Kan 的 LB 液体培养基上振荡培养过夜,提取质粒进行双酶切验证。

1.10 目的基因的表达 将 0.5 mL 含有重组质粒的表达菌株加入到 50 mL 的 LB 培养基(内含 100 μ g · mL⁻¹ 的 Kan) 中置于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中振荡培养,测其 OD 值,待 OD 达到 0.8 时用 IPTG 诱导表达,再离心收集菌体进行 SDS-PAGE 分析。单因子试验得到最适的 IPTG 诱导浓度与最佳诱导时间。

1.11 天然蛋白的抗血清制备、效价测定和 Western blot 分析 采用新鲜的五指山美洲商陆春季叶片,经硫酸铵分级沉淀、离子交换层析、葡聚糖凝胶 G25 脱盐后得到高纯度的 *PAP-I* 蛋白,加入等体积福氏佐剂乳化混匀后,每次免疫剂量为 1 mL 乳化抗原溶液(内含 200 μ g 天然蛋白),采用多点皮下注射新西兰长耳兔,总共免疫 5 次。期间取适量血来测试抗血清的效价,待效价达到最高值后取全血,离心收集抗血

清。用间接法 ELISA 测定所制备的抗血清的效价,用纯化后的表达蛋白为抗原,HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗,TMB(四甲基联苯胺) 显色。

1.12 麦胚提取物转录/ 翻译偶联系统活性验证 根据 TNT® Coupled Wheat Germ Extract Systems 说明书 4. B 所述,按照表 1 所述加入反应体系,分为阴性对照组,阳性对照组,实验组 1,2,3,4,5 和 6。其中采用超纯水作为阴性对照组,实验组中重组 PAP-I 蛋白的浓度为 $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,即实验组 1,2,3,4,5 和 6 中重组 PAP-I 蛋白的含量分别为 0.2 ,0.4 ,0.6 ,0.8 ,1,1.2 μg ,总体系为 50 μL ,混匀后分别在 5 ,10 ,15,20 , 25 min 时,用 bio-Tek Flx800 荧光酶标仪于 560 nm 处测试荧光读数。

表 1 重组 PAP-I 蛋白活性验证体系

Tab.1 The activity verification system of PAP-I recombinant protein

反应体系 Reaction system	阴性对照 Negative control	阳性对照 Positive control	1	2	3	4	5	6
TNT Wheat Germ Extract	25	25	25	25	25	25	25	25
TNT Reaction Buffer	2	2	2	2	2	2	2	2
TNT RNA Polymerase(SP6)	1	1	1	1	1	1	1	1
Amino AcidMixture Minus Leucine, $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Amino AcidMixture Minus Methionine, $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Rnasin Ribonuclease Inhibitor, $40\text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	1	1	1	1	1	1	1	1
Luciferase Control DNA, $0.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	0	2	2	2	2	2	2	2
重组 PAP-I 蛋白	0	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
Nuclease-Free Water	20	18	17.8	17.6	17.4	17.2	17	16.8
to a final volume of (μL)	50	50	50	50	50	50	50	50

注: 抑制率 = (阳性对照荧光值 - 试验组荧光值) / (阳性对照荧光值 - 阴性对照荧光值) * 100%

对于大部分麦胚提取物转录/ 翻译偶联反应中,50% 的提取物浓度是比较合适的。在转录/ 翻译偶联反应液在冰上融化后需要进行涡旋混匀一下。沉淀物的复溶需要在室温下涡旋混匀 30 s

Note: inhibition rate = (fluorescence value of positive control-fluorescence value of test group) / (fluorescence value of positive contro-fluorescence value of a negative control) * 100%; 50% of the extract concentration is appropriate for the most wheat germ extract transcription / translation coupling reaction. Vortex is needed after the ice melted in the transcription / translation coupling reaction; vortex needs 30 seconds when the precipitate was reconstituted at room temperature

2 结果与分析

2.1 PAP-I 基因的扩增结果 设计带有酶切位点 BamH I 和 Hind III 的特异引物,以五指山美洲商陆春季叶片的 cDNA 做模版,扩增出 PAP-I 基因,全长 876 bp,结果如图 1 所示。

2.2 原核表达载体的构建 将 PCR 扩增产物与 pMD 18-T simple vector 连接后挑阳性克隆送测序,将阳性克隆质粒用 BamHI/Hind III 双酶切,琼脂糖凝胶电泳回收目的片段后与经相同两种酶酶切后的 pET 30-a 载体连接后转化。提取质粒 DNA 进行双酶切鉴定来筛选阳性克隆,结果见图 2。测序结果与文献 [6] 报道的序列完全一致,未发现有碱基突变及移码突变,表明表达载体构建成功。

2.3 pET30a-PAP-I 表达载体工程菌的诱导表达 将鉴定好的已经含有构建好的表达载体的菌液接种于含 kan($50\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 LB 三角瓶中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡培养至 OD 为 0.8,加入终浓度分别为 0.4 ,0.6,0.8 和 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 分别诱导 5 h,各取 10 mL 菌液离心收集菌体经超声波破碎后取沉淀进行 SDS-PAGE 分析表达情况,分子质量大小约为 30 kD。与天然纯化后的 PAP-I 蛋白条带位置一致,并且随着 IPTG 浓度的升高,目的蛋白的表达量有比较显著的升高,在 IPTG 浓度为 $0.6\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,蛋白的富集量有明显上升,之后随着 IPTG 浓度的升高,蛋白的表达量开始逐渐下降,因此,确定最佳的 IPTG 诱导浓度为 $0.6\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,见图 3。

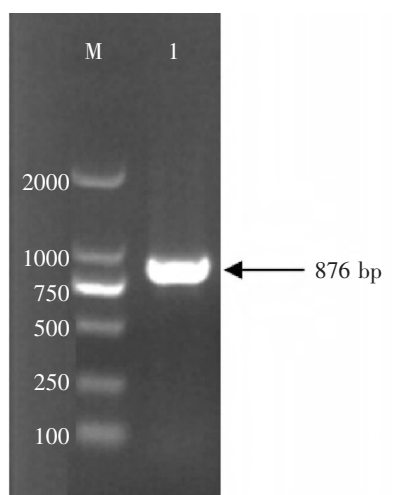


图 1 *PAP-I* 基因目的片段的 PCR 扩增验证
M: DNA 分子质量标准 DL2000; 1: PCR 产物
Fig. 1 PCR amplification of *PAP-I* gene
M: DNA Marker DL2000; 1: PCR product

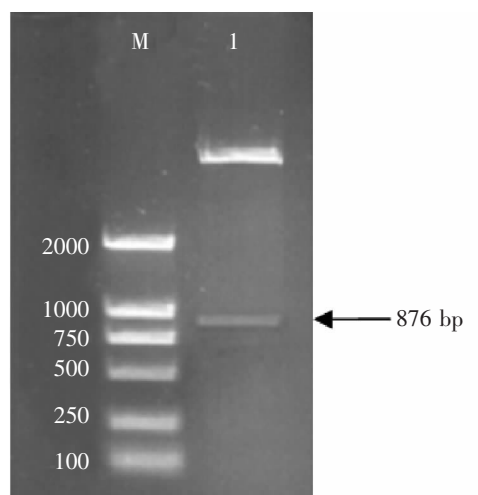


图 2 原核表达载体 pET30a-PAP-I 双酶切鉴定
M: DNA 分子质量标准 DL2000; 1: 酶切产物
Fig. 2 Identification of the pET30a-PAP-I recombinant
M: DNA Marker DL2000; 1: Digested product

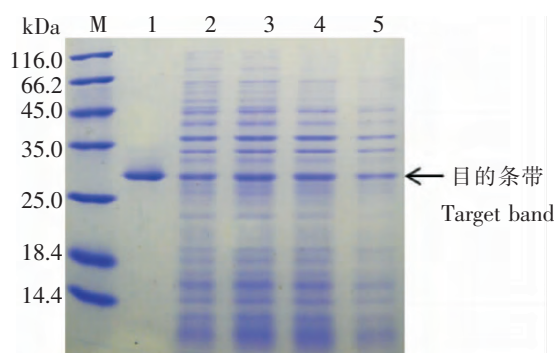


图 3 不同 IPTG 浓度诱导 PAP-I 的原核表达
M. 蛋白分子量标准; 1. 天然纯化后的 PAP-I 蛋白; 2~5. 分别为 0.4, 0.6, 0.8 和 1.0 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导表达产物

Fig. 3 *PAP-I* Prokaryotic expression at different concentrations of IPTG
M. Protein marker; 1. Natural purification of *PAP-I*; 2-5: Expression products induced by IPTG at 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mmol·L⁻¹, respectively

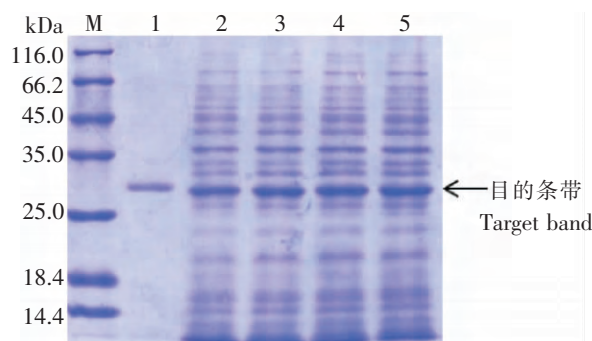


图 4 不同诱导时间 PAP-I 的原核表达
M. 蛋白分子量标准; 1. 天然纯化后的 PAP-I 蛋白; 2~5. 分别为 2, 4, 6 和 8 h IPTG 诱导表达产物

Fig. 4 *PAP-I* Prokaryotic expression induced by IPTG at different time
M. Protein marker; 1. Natural purification of *PAP-I*; 2-5: Expression products induced by IPTG at 2, 4, 6 and 8 h, respectively

将已鉴定并含有构建好的表达载体的菌液接种于含 kan (50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 LB 三角瓶中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡培养至 OD 为 0.8, 加入终浓度为 0.6 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 分别诱导 2, 4, 6, 8 h, 各取 10 mL 菌液离心, 收集菌体经超声波破碎后取沉淀进行 SDS-PAGE 分析表达情况(图 4)。从图 4 可见, 随着 IPTG 诱导时间的延长, 目的蛋白的表达量在 4 h 时有逐渐上升的趋势, 之后随着时间的延长目的蛋白的表达量维持在相同的程度, 因此, 根据省时的原则选择 4 h 为最佳诱导时间。

2.4 天然 PAP-I 蛋白抗血清的效价测定 通过间接 ELISA 法测得 PAP-I 蛋白抗体的效价为 12 万(表 2)。

表 2 天然 PAP-I 蛋白抗血清的效价测定

Tab.2 The titer determination of the natural PAP-I protein antiserum

血清稀释浓度	阴性对照	1: 10 000	1: 40 000	1: 80 000	1: 100 000	1: 120 000
Serum dilution concentration	Negative control					
450 nm 吸光值	2.458	3.113	3.081	2.924	2.853	2.524
Light absorption value						

2.5 重组蛋白的纯化及 Western blot 验证 离心收集菌体,将经过超声波破碎的包涵体沉淀,用包涵体洗涤液洗 3 遍后再溶解于 8 M 的尿素溶液中,离心取上清液经 0.22 μm 的细菌滤器过滤,再按照组氨酸标签蛋白纯化试剂盒上的说明书所示进行上样、平衡,待基线平衡后用 300 ~ 500 mmol · L⁻¹ 的咪唑梯度洗脱液进行洗脱,收集到的蛋白经 SDS-PAGE 验证(图 5),经纯化后的目的蛋白条带清晰,条带大小也与预期的相符合,纯化效果良好。

Western 结果显示纯化后的蛋白在相对分子质量约 30 kD 的地方出现特异性反应条带(图 6),与预期相符,而阴性对照则无条带出现,证实该蛋白为目的蛋白。

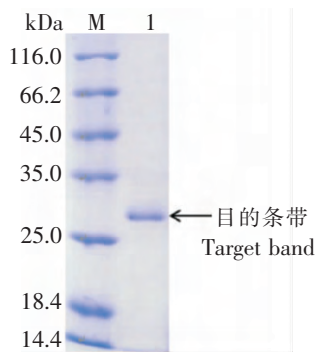


图 5 表达蛋白经镍柱亲和层析纯化后的 SDS-PAGE 分析
M: 蛋白分子质量标准; 1: 纯化后 PAP-I 蛋白
Fig.5 SDS-PAGE analysis of expressed protein after Ni-Agarose affinity chromatography
M: Protein Marker; 1: Purified protein PAP-I

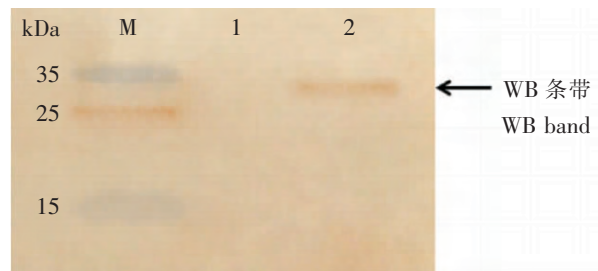


图 6 PAP-I 纯化蛋白的 Western blot 鉴定
M: 蛋白分子质量标准 1: 阴性对照; 2: PAP-I 纯化蛋白
Fig. 6 Western blot identification of purified protein PAP-I
M: Protein marker 1: Negative control; 2: purified protein PAP-I

2.6 重组蛋白活性的验证结果 从图 7 中可以看出,采用荧光素酶方法来监测重组 PAP-I 蛋白抑制蛋白质合成的活性是稳定的、可行的。加样后的第 5 min 荧光素酶质粒在麦胚提取物转录/翻译偶联系统中得到了转录和翻译,合成出荧光素酶,通过荧光酶标仪可以检测到荧光,随着时间的增加荧光值逐渐减小。随着重组蛋白浓度的增加,荧光值逐渐降低,以 10 min 为例,0.2 μg 重组蛋白对荧光素酶表达的抑制率 84.1%; 0.4 μg 重组蛋白对荧光素酶表达的抑制率可以达到 87.3%; 0.6 μg 重组蛋白对荧光素酶表达的抑制率可以达到 88.9%; 0.8 μg 重组蛋白对荧光素酶表达的抑制率可以达到 89.6%; 1.0 μg 重组蛋白对荧光素酶表达的抑制率可以达到 95%; 1.2 μg 重组蛋白对荧光素酶表达的抑制率可以达到 99.9%。

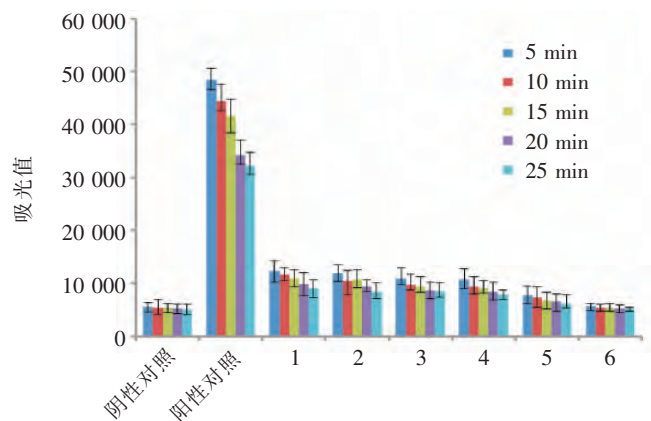


图 7 PAP-I 重组蛋白的活性鉴定
Fig. 7 The activity identification of recombinant protein PAP-I

3 讨论

针对海南五指山美洲商陆 *PAP-I* 基因,构建原核表达载体 pET30a-PAP-I 进行原核表达,研究了 pET30a-PAP-I 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的表达与

纯化的方法,克隆的基因在宿主细胞中的表达量受到多种因素的影响,为确保外源基因得到最佳的表达,笔者对目的蛋白的表达条件进行了优化。通过实验获得了优化的诱导条件,在 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 为最佳的诱导浓度。最佳诱导时间为 4 h。对目的条带用 Ni-Agarose 亲和层析柱纯化,对纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果表明,纯化的目的蛋白为单一条带,纯化效果良好,经 SDS-PAGE 和 Western 验证,得到的蛋白为 PAP-I 目的蛋白。50 mL 发酵液可以获得 0.25 mg 的重组 PAP-I 蛋白,表达量较其他蛋白表达量低,这可能是由于 PAP-I 蛋白切除原核生物核糖体 23S RNA 上的腺嘌呤,对宿主细胞具有一定的毒性^[7]。

本试验使用纯化后的天然蛋白作为抗原,采用多点免疫法来免疫兔子,分别对大腿、小腿、背部、脚掌、皮下等位点注射抗原,同时在几次免疫中交替使用完全佐剂和不完全佐剂,最终获得高效价的多克隆抗体,很好地克服 PAP-I 蛋白免疫原性低的问题。

由于 PAP-I 蛋白在美洲商陆叶片中的含量低,而且仅在春季叶片中表达,受季节限制特别明显,通过生物工程技术,利用微生物发酵大量生产 PAP-I 是较为可行的方法。真核表达系统虽然表达的蛋白有活性,但是表达量少,而且后续的诱导、纯化条件复杂。大肠杆菌表达系统是目前应用最广泛的原核表达系统,但表达出的重组蛋白无法进行正确折叠,表达的蛋白没有活性,因此,需要进行复性条件的优化。目前实验室水平的复性基本上是通过降低复性液的浓度来进行透析,本试验采用柱上循环复性的方法对重组蛋白复性,复性后的重组蛋白在浓度为 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对荧光素酶表达的抑制率为 84.1%;在浓度为 $1.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对荧光素酶表达的抑制率可以达到 99.9%,显现出较强的抑制蛋白质合成的活性。

目前,利用大肠杆菌来表达 PAP-I 蛋白的蛋白量还不高,一方面可以通过缺失突变,将 C 末端的 25 个氨基酸缺失突变来降低其对宿主细胞的毒性^[8],另外,可以通过对表达条件进行优化,比如低温诱导、分段补充营养物质来提高表达效率。虽然本实验得到了有活性的重组蛋白,但复性的效率还比较低,大概只有 10% 的重组蛋白可以通过柱上循环复性获得成功,今后需要通过改变复性条件来提高复性的效率。如能改善表达效率与复性效率低的问题,PAP-I 蛋白就能更好地应用于农业生产和医药开发上。

参考文献:

- [1] Chen z C, White R F, Antoniow J F, et al. Effect of pokeweed antiviral protein (PAP) on the infection of plant viruses [J]. Plant Pathol, 1991, 40(4): 612 - 20.
- [2] Picard D, Kao C C, Hudak K A. Pokeweed antiviral protein inhibits brome mosaic virus replication in plant cells [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(20): 20069 - 20075.
- [3] Uckun F M, Rustamova L, Vassilev A O, et al. CNS activity of Pokeweed anti-viral protein (PAP) in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) [J]. BMC Infect Dis, 2005, 5: 9.
- [4] Zoubenk O O, Uckun F, Hur Y, et al. Plant resistance to fungal infection induced by nontoxic pokeweed antiviral protein mutants [J]. Nature Biotechnology, 1997, 15(10): 992 - 996.
- [5] Domashevskiy A V, Goss D J. Pokeweed Antiviral Protein, a Ribosome Inactivating Protein: activity, Inhibition and Prospects [J]. Toxins, 2015, 7(2), 274 - 298.
- [6] Gessner S L, Irvin J D. Inhibition of elongation factor 2-dependent translocation by the pokeweed antiviral protein and ricin [J]. J Biol Chem, 1980, 255(8): 3251 - 3253.
- [7] Irvin J D. Purification and partial characterization of the antiviral protein from *Phytolacca americana* which inhibits eukaryotic protein synthesis [J]. Arch Biochem Biophys, 1975, 169(2): 522 - 528.
- [8] Irvin J D, Kelly T, Robertus J D. Purification and properties of a second antiviral protein from *Phytolacca Americana* which inactivates eukaryotic ribosomes [J]. Arch Biochem Biophys, 1980, 200(2): 418 - 425.
- [9] Kurinov I V, Uckun F M. High resolution X-ray structure of potent anti-HIV pokeweed antiviral protein-III [J]. Biochemical Pharmacology, 2003, 65(10): 1709 - 1717.
- [10] Bolognesi A, Barbieri L, Abbondanza A, et al. Purification and properties of new ribosome-inactivating proteins with RNA N-glycosidase activity. Biochim Biophys Acta, 1990, 1087(3): 293 - 302.
- [11] Barbier L, Aron G M, Irvin J D, et al. Purification and partial characterization of another form of the antiviral protein from the seeds of *Phytolacca americana* L. (pokeweed) [J]. Biochem J, 1982, 203(1): 55 - 59.

- [2] Honjo E, Dong D, Motoshima H, et al. Genomic clones encoding two isoforms of pokeweed antiviral protein in seeds (PAP-S1 and S2) and the N-glycosidase activities of their recombinant proteins on ribosomes and DNA in comparison with other isoforms [J]. J Biochem, 2002, 131(2): 225 – 231.
- [3] Park S W, Lawrence C B, Linden J C, et al. Isolation and characterization of a novel ribosome-inactivating protein from root cultures of pokeweed and its mechanism of secretion from roots [J]. Plant Physiol, 2002, 130(1): 164 – 178.
- [4] HARTLEY M R, LORD J M. Genetics of ribosome-inactivating proteins [J]. Mini Rev Med Chem, 2004, 4(5): 487 – 492.
- [5] 赵玉, 王锡锋, 周广和, 等. 2 个不同缺失型美洲商陆抗病毒蛋白基因在大肠杆菌中的表达 [J]. 植物病理学报, 2005, 35(3): 270 – 273.
- [6] Lin Q, Chen Z C, Antoniw J F, et al. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the antiviral protein from *Phytolacca Americana* [J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17(4): 609 – 614.
- [7] Zarling J M, Moran P A, Haffar O, et al. Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to CD4 + cells by monoclonal antibodies [J]. Nature, 1990, 347(6288): 92 – 95.
- [8] Tumer N E, Hwang D J, Bonness M. C-terminal deletion mutant of pokeweed antiviral protein inhibits viral infection but does not deplete host ribosomes [J]. PNAS, 1997, 94(8): 3866 – 3871.

Expression and Identification of Pokeweed Antiviral Protein *PAP-I* Gene in *Escherichia coli* in Wuzhi Mountain in Hainan Island

HUANG Chao^{1, 2, 3}, ZHANG Lili², DENG Liuhong³, ZHANG Chunfa²

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Hainan Key Laboratory of Protein Engineering and Drug Development / Haikou Technology Research and Development Center for Life Science Drug Engineering, Haikou, Hainan 570311, China)

Abstract: Total RNA was extracted from pokeweed leaves in spring at Wuzhi Mountain in Hainan, and cDNA was obtained using RT-PCR technology. After the gene *PAP-I* was amplified according to the primers which were designed based on the sequence published on the Genbank. The *PAP-I* gene was connected to the vector pET-30a for expression. The product was in the form of insoluble inclusion body. This product was denatured and purified through nickel column chromatography. The purified recombinant protein was verified by Western Blot, which indicated that the gene was expressed correctly. The recombinant protein *PAP-I* was proved to have the activity to inhibit the protein synthesis through wheat germ extract transcription/translation coupling system.

Keywords: pokeweed; antiviral protein; vector construction; prokaryotic expression; Wuzhi Mountain.