

# 家蚕核型多角体病毒遍在蛋白及结合肽的研究

张文波<sup>1,2)</sup> 林 蓉<sup>3)</sup> 张耀洲<sup>2)</sup>\* 吴祥甫<sup>4)</sup>

(<sup>1)</sup>浙江大学生命科学学院, 杭州 310029; <sup>2)</sup>浙江理工大学生物化学研究所, 杭州 310018;

<sup>3)</sup>浙江大学动物科学学院, 杭州 310029; <sup>4)</sup>中国科学院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

**摘要** 从家蚕核型多角体病毒镇江株 (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus Zhenjiang strain, BmNPV-ZJ) 基因组 DNA 中克隆遍在蛋白 (BmVUB) 基因. 序列分析结果显示, BmVUB 基因长 234 bp, 编码 77 个氨基酸. BmVUB 氨基酸序列内有一致 HTH 序列, 遍在蛋白保守序列 LRLRGG, 参与遍在蛋白-蛋白酶复合体形成的 4 个保守性功能位点 (Lys-29、Cys-48、Cys-63、Gly-76) 及保守的 Gly-Gly-X (X 是疏水氨基酸残基) 蛋白酶切信号序列, 在遍在蛋白保守的 Gly-Gly 后多出由一个氨基酸组成的延伸肽. 原核诱导表达表明 BmVUB 主要以可溶性形式存在, 表达量占总菌蛋白的 50% 以上. 纯化的遍在蛋白浓度为 1.03 ~ 2.46 g/L, 制备抗体, 效价在  $3.2 \times 10^{-5}$  以上. 用噬菌体表面展示技术筛选遍在蛋白结合肽, 所筛选的结合肽可与遍在蛋白特异性结合, 其中结合肽 VAPHHAYAPMRT 对细胞增殖有明显的浓度调控作用, 即低浓度促进细胞生长, 高浓度强烈抑制细胞的生长.

**关键词** 家蚕核型多角体病毒, 遍在蛋白, 噬菌体肽库, 结合肽

学科分类号 Q76

遍在蛋白 (ubiquitin, UB) 是由 76 个氨基酸组成的、进化上高度保守的小分子可溶性多肽<sup>[1]</sup>. 遍在蛋白-蛋白酶体途径 (ubiquitin-proteasome pathway, UPP) 是目前已知最重要的、有高度选择性的蛋白质降解途径. 遍在蛋白通过结合在不同的蛋白质上, 来调节蛋白质的折叠、降解及定位, 参与多种重要细胞生物学过程的调控<sup>[2~5]</sup>. 除此之外, 遍在蛋白还与 DNA 修复、细胞周期调控、信号转导、基因转录等细胞的基本生理过程有关. 近年研究发现, 遍在蛋白还与机体的免疫反应、核糖体生物合成、应激反应、神经系统发育、肿瘤、神经系统疾病 (如帕金森氏病等)、基因的开启关闭及转录因子活化等有着相当密切的关系<sup>[6]</sup>.

已知昆虫病毒和少数细菌中存在编码遍在蛋白或遍在蛋白样蛋白的基因, 编码的遍在蛋白或遍在蛋白样蛋白, 在其感染和致病过程中起关键作用<sup>[7]</sup>. 移码突变实验表明, 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus, AcMNPV) 编码的 UB 蛋白是一种非必需蛋白, 与杆状病毒感染及病毒-宿主的相互作用有关<sup>[8]</sup>. 目前对昆虫杆状病毒遍在蛋白的研究还不多, 其作用也无确凿证据, 昆虫杆状病毒编码的遍在蛋白与其宿主遍在蛋白-蛋白酶体系统之间的相互关系至今仍不清楚, 而 BmNPV 的遍在蛋白在病毒复制和感染过程中所起的作用还未见相关报道. 本文纯化了家蚕核型多角体病毒遍在蛋白

的原核表达产物 (BmVUB), 从噬菌体肽库中筛选结合肽, 测定结合肽的活性. 现将结果报告如下.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

家蚕核型多角体病毒镇江株 (BmNPV-ZJ)、表达载体 pET28 (a)、细菌 (TG1、BL21) 由浙江理工大学生物化学研究所保存, 噬菌体十二肽库 (Ph. D. -12™ Phage Display peptide library,  $1.5 \times 10^{13}$  pfu/ml) 试剂盒、受体菌 ER2738、测序引物 (-96gP III: CCCTCATAGTTAGCGTAACG) 均购自 NEW ENGLAND BIOLAB 公司, 兔抗 M13 噬菌体 IgG 抗体 (1:2 500) 购自 Sigma 公司, 羊抗兔二抗购自上海晶美生物工程有限公司, 新西兰大白兔 (2.5 kg, 雄性) 购自浙江大学医学院实验动物中心.

### 1.2 方法

**1.2.1 BmNPV-ZJ 株基因组 DNA 的提取、克隆、分析及表达:** BmNPV-ZJ 株基因组 DNA 的提取, 按文献 [9] 方法操作. 参照 AcMNPV 和 BmNPV-T3 株 UB 基因 (NCBI) 的相应序列, 设计一对引物, P1, 5' CGGGATCCAT GCAAATATTC ATCAAA 3' (下划线为 *Bam*H I 酶切位点), P2, 5'

\* 通讯联系人.

Tel: 0571-86843190, Fax: 0571-86843198

E-mail: yaozhou@chinagene.com

收稿日期: 2004-06-08, 接受日期: 2004-07-31

GCGAATTCTT AATACCTCC TCGTAA 3' (下划线为 *EcoR* I 酶切位点). PCR 产物鉴定、纯化、T-A 克隆、重组质粒鉴定均按文献 [10] 操作. 阳性质粒 pGEMT BmVUB 由上海博亚公司测序鉴定.

**1.2.2 遍在蛋白的体外表达:** BmVUB 基因的 PCR 纯化产物用 *Bam*H I、*Eco*R I 酶切后, 与载体 pET28 (a) 酶切回收大片段连接, 转化、酶切、PCR 鉴定正确后进行诱导表达, 重组质粒命名为 pETBmVUB. 15% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和灰度扫描法检测目的蛋白的表达量.

**1.2.3 表达产物的纯化和定量:** 超声波处理的表达菌液上清上 His 亲和层析柱后, 以平衡液洗柱, 再分别用含有咪唑浓度为 30 mmol/L、100 mmol/L、200 mmol/L 的洗脱液洗柱, 收集洗脱的蛋白质组分. 考马斯亮蓝法<sup>[11]</sup> 测定纯化 BmVUB 的含量.

**1.2.4 抗体制备、纯化及鉴定:** 用纯化的融合蛋白 (His)<sub>6</sub>-BmVUB 500  $\mu$ g 与等体积的弗氏完全佐剂充分混匀, 免疫新西兰大白兔. 1 周后用同样量的融合蛋白在蛋白和等体积弗氏不完全佐剂加强免疫 1 次; 每隔 1 周加强免疫 1 次, 共免疫 4 次. 第 4 次免疫后 10 天, 颈动脉放血收集血清. 将分离的血清分装存于 -20℃. 纯化的蛋白样品以 10  $\mu$ g 每孔的浓度包被酶标板, 间接 ELISA 法检测 BmVUB 多克隆抗体的效价. 收集血清用硫酸铵沉淀后, Sephadex G-25 凝胶柱脱盐, 透析浓缩后 -20℃ 保存备用. 蛋白质印迹法检测纯化抗体的抗原反应性.

**1.2.5 噬菌体 12 肽库的筛选:** a. 生物洗脱. 将纯化的 BmVUB 用 0.1 mol/L pH 8.6 的 NaHCO<sub>3</sub> 溶液稀释至 100 mg/L, 包被聚乙烯平皿, 3% BSA 封闭, TBST (TBS + 0.1% Tween-20) 快速洗涤 5 次, 每平皿加稀释的肽库 1 ml (约含  $2.0 \times 10^{11}$  PFU), 室温轻摇作用 1 h, TBST 洗涤 10 次, 洗脱未结合的噬菌体, 然后每平皿加 1 ml 0.2 mol/L pH 2.2 的 Gly-HCl 缓冲液以解离结合的噬菌体, 再加入 1 mol/L pH 9.1 的 Tris-HCl 缓冲液 150  $\mu$ l 中和, 收集洗脱液, 得到洗脱的噬菌体. 测定洗脱噬菌体滴度, 计算投入/产出比. 扩增洗脱噬菌体, 测滴度后, 进入下一轮筛选. 共进行 3 轮筛选, 第 2、3 轮包被的 BmVUB 浓度分别为 50 mg/L、10 mg/L, TBST 中 Tween-20 的浓度为 0.5%. b. 噬菌体滴度测定. 将噬菌体进行 10 倍梯度稀释, 取 10  $\mu$ l 与 190  $\mu$ l 对数期的 ER2738 菌液混匀, 37℃ 放置

10 min, 加到 3 ml 预热的顶层琼脂中, 涡旋混匀, 倒在预热的 LB/IPTG/X-gal 平板上, 37℃ 倒置培养过夜. 数蓝斑数并计算噬菌体滴度 (TU, 用 pfu/ml 表示). c. 噬菌体 ssDNA 的纯化、测序及序列分析. 随机挑取第三轮筛选的噬菌体蓝斑 20 个, PEG/NaCl 法提取噬菌体 ssDNA, 电泳检测其纯度. 测序后用 SMS、BLAST、Clustal W 1.8 等分析工具进行序列分析. d. 噬菌体阳性克隆的鉴定 (ELISA 法). 夹心 ELISA 法按文献 [12] 方法操作, 分别设原肽库、ER2738 菌液、无关抗原及空白对照; 竞争抑制 ELISA, 方法同夹心 ELISA, 只是在封闭之后加纯化噬菌体 (1:800 稀释) 与 BmVUB (5 mg/L) 的混合液; 梯度竞争抑制 ELISA, 方法同夹心 ELISA, 只在封闭后加梯度稀释的纯化噬菌体 (1:800、1:400、1:200、1:100) 与 BmVUB (5 mg/L) 的混合液.

**1.2.6 特异性结合肽对细胞生长的影响:** 将生长状态良好的 BmN 细胞转入 96 孔细胞培养板中, 培养 2 天. 吸出 96 孔细胞培养板中的培养液, 按每孔 20  $\mu$ l、40  $\mu$ l、80  $\mu$ l、160  $\mu$ l 过滤液 (无菌条件下, 2 层 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤噬菌体上清) 的量加入培养板中, 每个稀释度重复 4 孔, 再加入新鲜培养基至总浓度 300  $\mu$ l, 置培养箱中培养 36 h 后, 用 MTT 法测定细胞的生长状态. 以细胞相对生长指数 (relative cell growth index, *GI*) 代表细胞的生长增殖状态.  $GI = [(实验组 A_{492} - 实验组 A_{570}) / (对照组 A_{492} - 对照组 A_{570})] \times 100\%$ . *GI* 值大于 100% 为刺激细胞生长, *GI* 值小于 100% 为抑制细胞生长.

## 2 结 果

### 2.1 PCR 及重组克隆鉴定

PCR 产物约为 240 bp, 与预期大小一致 (图 1). 测序证明所获得的基因序列是正确的.

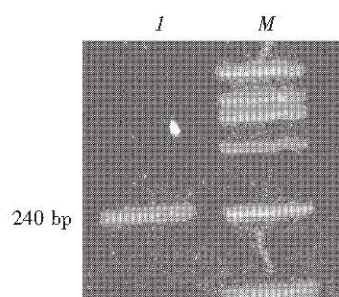


Fig. 1 The PCR product of BmVUB

I: PCR band of BmVUB; M: DNA marker (DL2000).

2.2 序列测定及分析

测序及分析结果表明，BmVUB 基因由 234 个核苷酸组成，编码 77 个氨基酸，分子质量约为 8.6 ku。根据其核苷酸序列推测的氨基酸序列分析发现：BmVUB 内部有一致 HTH 序列，遍在蛋白保守序列 LRLRGG，参与遍在蛋白-蛋白酶复合体形

1 M Q I F I K T L T G K T I T A E T E  
1 ggatccATGCAATATTCATCAAAACATTGACGGGCAAAACCATACCGCCGAAACGGAA  
19 P A E T V A D L K Q K I A D K E G V P V  
61 CCCGCAGACGCGTGGCGGATCTCAAGCAAAAAATTGCCGATAAAGAGGTGTGCCCGTA  
39 D Q Q R L I F A G K Q L E D S K T M A D  
121 GATCAACAAAGACTTATCTTTGCGGGCAACAATTGGAAGATTCCAAAACATATGGCCGAT  
59 Y N I Q K E S T L H M V L R L R G G Y \*  
181 TACAATATTCAAAAGGAATCTACTCTTCATGTGTTCGATTACGAGGAGGGTATTAA

Fig. 2 BmVUB DNA sequence and deduced amino acid sequence of BmNPV-ZJ strain

Shadow part: Helix-turn-helix DNA-binding motifs (HTH); Italic: BmVUB conservative sequence; Bold letters: Possible protein kinase C phosphorylation site.

|                           |                                                                      |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| BmNPV ZJ                  |                                                                      |
| BmNPV                     |                                                                      |
| BVDV                      | MELFSNELLYKTYKQKPAGIVEPVYDINGCPLFGESSGIHPQSTLKLPHQRKKWLQLYQQ         |
| <i>Bombyx mori</i> (UBI2) |                                                                      |
| <i>Bombyx mori</i> (UBI)  |                                                                      |
| Prim. cons.               | MELFSNELLYKTYKQKPAGIVEPVYDINGCPLFGESSGIHPQSTLKLPHQRKKWLQLYQQ         |
|                           | motif 1                                                              |
| BmNPV ZJ                  | MQIFIKTLTG KTITAETEPAETVAD                                           |
| BmNPV                     | MQIFIKTLTG KTITAETEPAETVAD                                           |
| BVDV                      | RLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRGGMQIFVKTLTG KTITLEVEPSDTIEN          |
| <i>Bombyx mori</i> (UBI2) | MQIFVKTLTG KTITLEVEPSDTIEN                                           |
| <i>Bombyx mori</i> (UBI)  | MQIFVKTLTG KTITLEVEASDTIEN                                           |
|                           | *****                                                                |
| Prim. cons.               | RLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRGGMQIFVKTLTG KTITLEVEPSDTIEN          |
|                           | motif 2                                                              |
| BmNPV ZJ                  | LKQKIA DKEGVPVDQQLIFAGKQLED SKTMADYNIQKESTLHMLVLRRLR GGY             |
| BmNPV                     | LKQKIA DKEGVPVDQQLIFAGKQLED SKTMADYNIQKESTLHMLVLRRLR GGY             |
| BVDV                      | VKAKIQ DKEGIPPDQQLIFAGKQLED GRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLR GGGP             |
| <i>Bombyx mori</i> (UBI2) | VKAKIQ DKEGIPPDQQLIFAGKQLED GRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLR GGAKKRKKKNY      |
| <i>Bombyx mori</i> (UBI)  | VKAKIQ DKEGIPPDQQLIFAGKQLED GRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLR GGTI             |
|                           | * * * * *                                                            |
| Prim. cons.               | VKAKIQ DKEGIPPDQQLIFAGKQLED GRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLR GGY3KRKKKNY      |
| BmNPV ZJ                  |                                                                      |
| BmNPV                     |                                                                      |
| 3VDV                      | AVCKKITN HEKCHYSIM DKLTAFFGIMPRGTTTPRAPYRFTALLKVRRLGLETGWA           |
| <i>Bombyx mori</i> (UBI2) | STPKKIKHKKKKYKLAVLRFYKVDENGKIHLRRECTGEQCGAGVFMAVMDRHYCGKCHSTMVFKDDDK |
| <i>Bombyx mori</i> (UBI)  | EPSLRILAMKYNCEKMICR KCYARLHPRATNCRKTKCGHTNNLRPKKKIKD                 |
| Prim. cons.               | 333KKI332K3C333I3RFYKVD223333RL3PR3T33R333333TA3L33R3333322TMVFKDDDK |

Fig. 3 Comparison of deduced amino acid sequences of BmVUB

Red: Completely conserved amino acid; Green: Largely coserved amino acid; Black: Variably conserved amino acid.

2.3 重组表达质粒的构建、诱导表达及纯化

诱导表达结果表明，培养细菌裂解液在分子质量约 9 ku 处有一浓的条带，与预期分子质量大小一致。经灰度扫描分析其表达量占全菌蛋白的

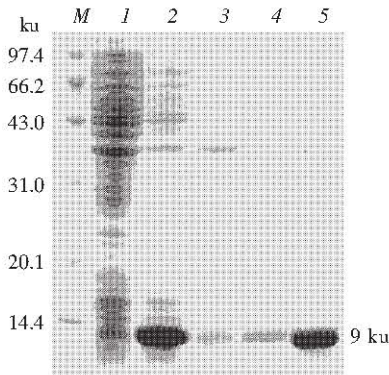
成的 4 个保守性功能位点（Lys-29、Cys-48、Cys-63、Gly-76）及保守的 Gly-Gly-X（X 是疏水氨基酸残基）蛋白酶切割信号，在遍在蛋白保守的 Gly-Gly 后多出由一个氨基酸组成的延伸肽（图 2）。

对 BmNPV-ZJ、BmNPV、牛病毒性腹泻病毒（bovine viral diarrhea virus, BVDV）、*Bombyx mori* (UBI2) 和 *Bombyx mori* (UBI) 的遍在蛋白氨基酸序列进行同源对比排列，发现其氨基酸序列存在 3 个保守的基序（motif），motif 1 的保守序列为：KTIT {X} E {X} E {X}<sub>3</sub>T {X}<sub>4</sub>K {X} KI {X}（X 为疏水性氨基酸），motif 2 的保守序列为：DKEG {X} P {X}<sub>2</sub>QQRLIFAGKQLED（X 为疏水性氨基酸），motif 3 的保守序列为：{X}<sub>2</sub>T {X}<sub>2</sub>DYNIQKESTLH {X} VL RLR（X 为疏水性氨基酸）。其中 motif 2 的保守性最强，包括在多聚遍在蛋白化过程中起关键作用的 K<sup>48</sup> 氨基酸，motif 3 的保守性稍弱，其中有在单遍在蛋白化过程中起关键作用的 K<sup>63</sup> 氨基酸（图 3）。

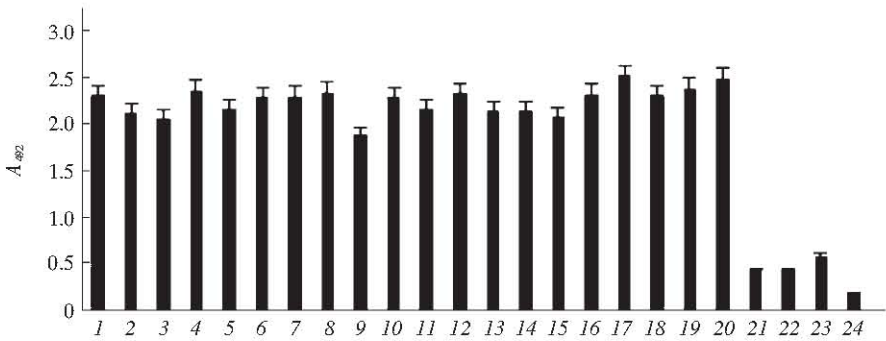
50% 以上。超声波裂解后，电泳结果显示：表达产物 90% 存在于上清中，说明 pETBmVUB 表达产物主要以可溶性形式存在，BmVUB 纯化的电泳结果为单一条带（图 4）。Bradford 法测得纯化 BmVUB



的浓度为 1.03 ~ 2.46 g/L.



**Fig. 4 The SDS-PAGE existing-state and the purified protein of pETBmVUB expressed in *E. coli***  
M: Low molecular mass protein marker; 1: BL21 control; 2: *E. coli* BL21/pET BmVUB induced by IPTG; 3: Precipitate after centrifugation of broken *E. coli* BL21/pET BmVUB; 4: Supernatant fraction after centrifugation of broken *E. coli* BL21/pETBmVUB; 5: Purified BmVUB protein.



**Fig. 5 Sandwich ELISA of phage peptide**  
1 ~ 20: phage clone; 21: *E. coli* ER2738 host strain; 22: 12-mer peptide library; 23: unrelated antigen control; 24: blank control.

2.7 竞争 ELISA 法检测结果

为进一步确认所筛选克隆的特异性，以纯化的 BmVUB 包被酶标板，分别用 1:800 稀释和梯度稀释的筛选噬菌体克隆作为竞争物，进行竞争和梯度竞争抑制实验. 结果所筛选的 20 个克隆均可不同程度地抑制各克隆的 ELISA 反应，且抑制能力与噬菌体浓度呈正相关（图 6）.

2.4 抗体制备、纯化及鉴定

经第四次加强免疫 10 天后采血，ELISA 法测得抗血清的效价达到  $3.2 \times 10^5$ . Western blotting 实验表明，纯化的抗体（1:10 000 稀释）与诱导表达的 (His)<sub>6</sub>-BmVUB 有特异性反应，而与正常兔血清无反应.

2.5 筛选富集效果

测定每轮洗脱噬菌体滴度及投入/产出比，结果表明随着洗脱次数的增加，特异性结合噬菌体数也随之增加，第三轮比第一轮得率高 1 000 倍.

2.6 夹心 ELISA 法检测结果

用纯化的 BmVUB 包被，检测筛选噬菌体的特异结合性. 结果显示，所挑选的 20 个噬菌体克隆均可与 BmVUB 特异性结合 ( $A_{492} > 1$ )，而阴性、空白及无关抗原不能与 BmVUB 特异性结合 ( $A_{492} < 1$ )（图 5）. 上述结果表明，经过 3 轮筛选，阳性克隆得到了有效的富集.

2.8 结合噬菌体克隆的序列测定及分析

随机取 10 个结合噬菌体克隆的 ssDNA 进行测序. 12、13、15、17、18 号克隆的推测氨基酸序列完全相同（命名为 ubj-1），21、22 号序列也相同（命名为 ubj-2），11、14、30 号的序列各不相同（分别命名为 ubj-3、4、5）（表 1）. 其中 FDARSNTVLVGA（ubj-1）出现频率最高，可能是特异性克隆.

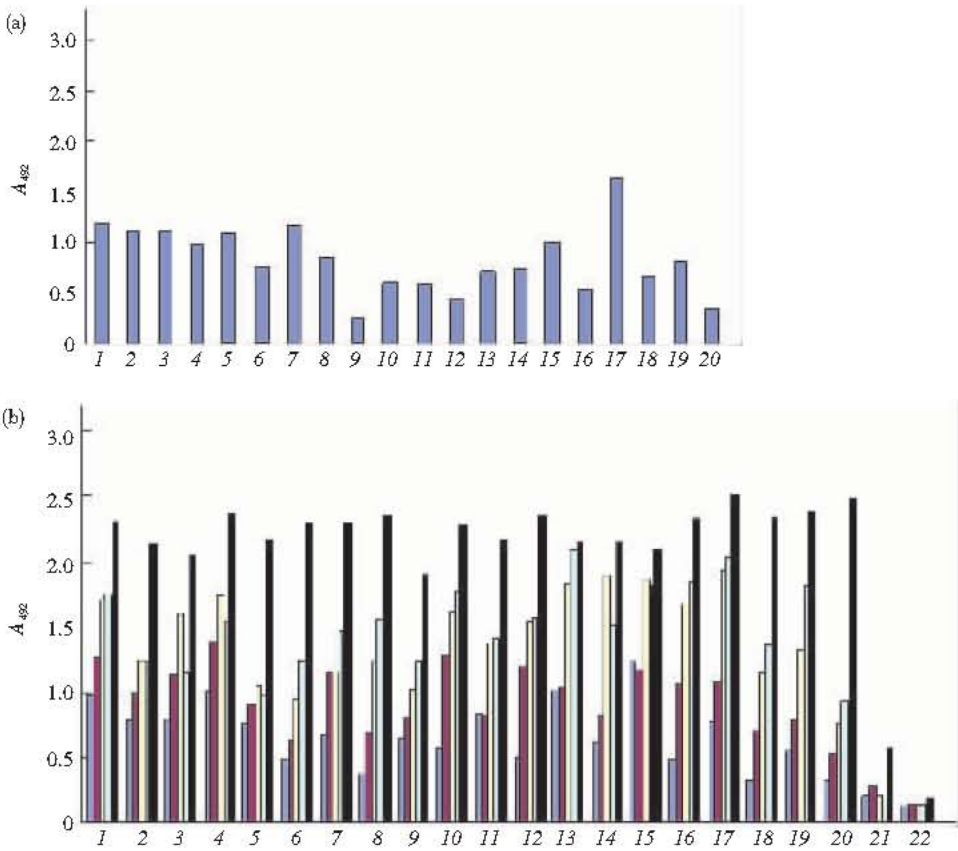


Fig. 6 Competitive inhibition ELISA of selected phage clone

(a) Competitive inhibition ELISA of selected phage clone. (b) Grads competitive inhibition ELISA of selected phage clone. 1~20: Phage clone; 21: 12-mer peptide library; 22: Blank control. ■: 1:100; ■: 1:200; ■: 1:400; ■: 1:800; ■: Noninhibition.

Table 1 The sequence of amino acid deduced from DNA sequence

| Number of phage clone      | Sequence of amino acid |
|----------------------------|------------------------|
| ubj-1 (12, 13, 15, 17, 18) | FDARSNTVLVGA           |
| ubj-2 (21, 22)             | TSMHFNPTRYDR           |
| ubj-3 (11)                 | NWHMQNTRTLLY           |
| ubj-4 (14)                 | VAPHHAYAPMRT           |
| ubj-5 (30)                 | ASTIHPNLRPTT           |

分别用这些氨基酸序列进行 BLAST 搜索, 发现清道夫受体、整合素、氨肽酶及蔗糖合成酶等蛋白质氨基酸序列中包含这些结合肽序列.

2.9 特异性结合肽对细胞生长的影响

特异性噬菌体克隆扩增上清作用 BmN 细胞 36 h 后, MTT 法检测显示: 与原肽库、ER2738 受体菌对照组相比, 14 号阳性噬菌体上清对细胞的作用具有明显的浓度依赖性, 即低浓度时刺激细胞

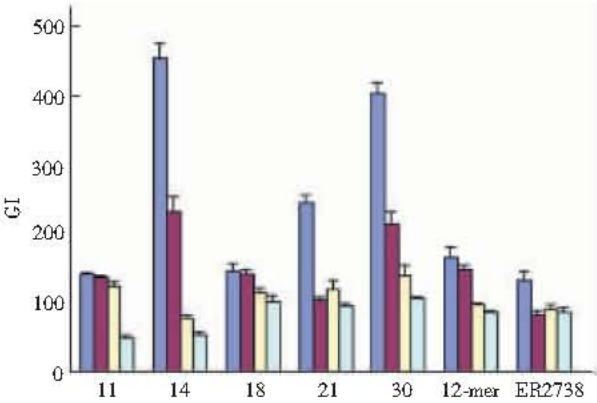


Fig. 7 MTT assay of BmN cell after exposing to various concentrations of phage for 36 h

11, 14, 18, 21, 30: phage clone; 12-mer: Ph. D.-12™ phage display peptide library; ER2738: *E. coli* ER2738 host strain. ■: 1:20; ■: 1:40; ■: 1:80; ■: 1:160.

生长, 高浓度时抑制细胞生长, 差异性显著 ( $P < 0.05$ ); 18 号与对照组的作用基本相同, 能促进细胞增殖; 21、30 号在低浓度时也可促进细胞生长, 随着浓度的增加细胞生长有所下降, 但无浓度依赖性, 差异不显著; 11 号与对照组在低浓度时无显著性差异, 而在高浓度时则差异显著, 表现为强烈抑制细胞的生长 (图 7)。

### 3 讨 论

遍在蛋白是杆状病毒出芽病毒的一个结构蛋白, 与磷脂共价结合而被锚定在病毒颗粒囊膜的内膜上。推测其功能可能与病毒颗粒的装配或出芽过程有关, 遍在蛋白锚定在膜上也可能是病毒感染早期必需的<sup>[13]</sup>。但与杆状病毒的 polyhedrin、p10、gp37 等基因相比, 对病毒遍在蛋白的研究较少。因此, 研究病毒遍在蛋白基因、结构和功能, 了解病毒的进化、侵染、病毒与宿主之间复杂的相互作用, 优化疾病的防治方案, 筛选防治疾病的新药物, 开发新的生物杀虫剂, 构建新型高效表达载体等都有着重要的意义。

本实验用经过亲和层析纯化的遍在蛋白作为筛选分子进行生物淘选, 避免了非特异噬菌体的“富集”, 极大地提高了筛选的特异性和敏感性。经过 3 轮筛选后, 第 3 次淘洗比第 1 次淘洗的产率高出 1 000 倍, 噬菌体高度富集。通过夹心 ELISA、竞争 ELISA、梯度竞争 ELISA 等方法鉴定结果表明, 第 3 轮所挑取 20 个噬菌体克隆对遍在蛋白具有较强的结合能力, 证明所筛选出来的克隆是遍在蛋白的特异性结合肽克隆。所筛选的短肽序列分析发现: ubj-1 序列与哺乳动物 (人、兔等) 的巨噬细胞清道夫受体 (macrophage scavenger receptor) N 端 23 ~ 31 位氨基酸有 88% 的同源性; 与整合素  $\alpha 8$  (integrin  $\alpha 8$ ) 有 72% 的同源性; Ubj-2 与一些植物的蔗糖合成酶、retinoblastoma-binding protein 1-like 1 (鼠) 等有较高的同源性; ubj-3 与 activated p21cdc42Hs kinase (人)、protein-tyrosine kinase (人) 等激酶的 C 端有 77% 的同源性; ubj-3 与 AT22221p、CG2910-PB (A) (果蝇)、ORF48 (I 型马疱疹病毒) 有同源性; ubj-4 与氨肽酶的 C 端 (动物)、CG4467-PA (果蝇) 有 80% 的同源性。这表明, 遍在蛋白可能通过这些短肽或同源序列与包含这些短肽或同源序列的蛋白质相互

作用, 参与蛋白质的降解、折叠及内化等过程, 进而影响蛋白质的生物学功能。

活性小肽作为营养添加剂、药物、疫苗、免疫刺激物及药物先导化合物等的研究与开发是目前食品与医药科技发展的一大趋势。从噬菌体肽库中筛选有活性的遍在蛋白结合肽, 对以遍在蛋白为靶标的药物设计及遍在蛋白新功能的发现都有很重要的理论和实际应用意义。本实验得到的 5 个噬菌体阳性克隆, 除 18 号外其余各克隆对细胞增殖均有影响但作用不完全相同。推测其作用差别的原因, 可能跟遍在蛋白与结合肽的结合能力、所结合的部位或亲和力不同有关。下一步我们将对所得到的活性小肽作深入研究, 为小肽药物的设计开发奠定基础。

### 参 考 文 献

- 1 Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 1998, **67**: 425 ~ 479
- 2 Jesenberger V, Jentsch S. Deadly encounter ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, **3** (2): 112 ~ 121
- 3 Orlowski R Z. The role of the ubiquitin proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death Differ*, 1999, **6** (4): 303 ~ 313
- 4 MacLaren A P, Chapman R S, Wyllie A H, *et al.* p53-dependent apoptosis induced by proteasome inhibition in mammary epithelial cells. *Cell Death Differ*, 2001, **8** (3): 210 ~ 218
- 5 Muiyang Li, Brooks C L, Wu-Baer F, *et al.* Mono-versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science*, 2003, **302** (5652): 1972 ~ 1975
- 6 Ghosh M, Huang K, Berberich S J. Overexpression of Mdm2 and MdmX fusion proteins alters p53 mediated transactivation, ubiquitination, and degradation. *Biochemistry*, 2003, **42** (8): 2291 ~ 2299
- 7 李朝飞, 庞 义. 泛素-蛋白水解酶复合体通路与病毒感染. *生物工程学报*, 2004, **20** (2): 151 ~ 156  
Li Z F, Pang Y. *Chin J Biotech*, 2004, **20** (2): 151 ~ 156
- 8 Reilly L M, Guarino L A. The Viral ubiquitin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus was not essential for viral replication. *Virology*, 1996, **218** (1): 243 ~ 247
- 9 王文兵, 季 平, 吴 峻, 等. 家蚕 NPV SOD 基因序列和大肠杆菌中表达. *生物化学与生物物理学报*, 1999, **31** (4): 405 ~ 408  
Wang W B, Ji P, Wu J, *et al.* *Acta Biochem Biophys Sin*, 1999, **31** (4): 405 ~ 408
- 10 Sambrook J, David W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd. Xi'an: Xi'an World Publishing Corporation, 2002. 1.35 ~ 8.113
- 11 Bradford M M. A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** (1~2): 248 ~ 254
- 12 Kay B K, Kasanov J, Yamabhai M. Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries. *Methods*, 2001, **24** (3): 240 ~ 246
- 13 Guarino L A, Smith G, Dong W. Ubiquitin was attached to membranes of baculovirus particles by a novel type of phospholipid anchor. *Cell*, 1995, **80** (2): 301 ~ 309

## Study on *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus (BmNPV) Ubiquitin and Its Binding Peptides

ZHANG Wen-Bo<sup>1,2)</sup>, LIN Rong<sup>3)</sup>, ZHANG Yao-Zhou<sup>2)</sup>\*, WU Xiang-Fu<sup>4)</sup>

<sup>(1)</sup> College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

<sup>(2)</sup> Institute of Biochemistry, Zhejiang University of Sciences, Hangzhou 310018, China;

<sup>(3)</sup> College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

<sup>(4)</sup> Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute for Life Science, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract** The ubiquitin (UB) gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus Zhenjiang strain (BmNPV-ZJ) was cloned and sequenced. Sequencing analysis shows that the BmVUB gene, which contains 234 nucleotides encoding 77 amino acids, contains a conservative HTH, a conservative LRLRGG and four conservative functional sites: Lys-29, Cys-48, Cys-63, Gly-76 which play important roles in ubiquitin-proteasome complex formation. It also shows that the C-terminal amino acid was redundant which locate at the downstream of conservative Gly-Gly proteinase cleavage signal sequence which characterizes as Gly-Gly-X (X was hydrophobic amino acid). The BmVUB gene was induced and highly expressed in *E. coli* BL21. The results of gel scanning and Bradford protein assay show that the BmVUB protein was about 9 ku and the yield consists of 50 percent of total bacterial protein. The concentration of purified BmVUB protein was 1.03 ~ 2.46 g/L. The high titer antibody was obtained from rabbits immunized with the (His)<sub>6</sub>- BmVUB fusion protein and ELISA shows that the titer of antibody was over  $3.2 \times 10^5$ . Peptides binding ubiquitin were obtained from phage displayed peptide library using BmNPV-ZJ ubiquitin purified with His-affinity chromatography as a ligand. Five short peptides were identified which displayed obvious biological activity. Peptide VAPHHAYAPMRT could regulate the cell proliferation and further more this function which depends on the concentration variation, namely low concentration could promote the cell proliferation, whereas high concentration will inhibit the proliferation.

**Key words** BmNPV, ubiquitin, phage display peptide library, binding peptide

\* Corresponding author. Tel: 86-571-86843190, Fax: 86-571-86843198, E-mail: yaozhou@chinagene.com

Received: June 8, 2004 Accepted: July 31, 2004