

FIV gp40 七肽重复区基因的克隆表达及其产物的纯化

王春平¹, 朱杰青², 康云¹, 高福³, 田波^{1,2**}

(1. 武汉大学生命科学学院现代病毒学研究室, 湖北武汉 430072; 2. 中国科学院微生物研究所分子病毒室, 北京 100080; 3. Nu.eld Department of Clinical Medicine, John Radclie Hospital, University of Oxford, Oxford OX3 9DU, UK)

Cloning and Expression of Heptad Repeat Region of the *Feline immunodeficiency virus* and Product PurificationWANG Chun-ping¹, ZHU Jie-qing², KANG Yun¹, George F. Gao³, TIEN Po^{1,2**}

(1. Modern Virology Laboratory, College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. Department of Molecular Virology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; 3. Nu.eld Department of Clinical Medicine, John Radclie Hospital, University of Oxford, Oxford OX3 9DU, UK)

Abstract: By using a computational program, Learn Coil-VMF, we determined the two conserved heptad repeat regions (HR1 and HR2) of FIV gp40 protein. The gene of gp40 subdomain including HR1 and HR2 was constructed with PCR method. The HR1 and HR2 were subsequently expressed and purified as a single chain (named 2-Helix) connected by a six aminoacid linker in *E. coli* GST fusion expression system. The single HR1 and HR2 were also cloned and expressed in the same way. Subsequently the 2-Helix' s formation of oligomer was tested. The results showed that the HR1 and HR2 interacted with each other and formed an oligomer.

Key words: *Feline immunodeficiency virus*(FIV); gp40; Heptad repeat region; 2-Helix; Oligomer

摘要: 本研究利用 Learn Coil-VMF 程序预测到 FIV Env 蛋白 gp40 存在两个七肽重复区 (Heptad repeat, HR1 和 HR2), 对包括 HR1 和 HR2 在内的部分 gp40 胞外区基因 (称为 HR1-HR2) 进行了人工合成, 以此基因为模板获得了 HR1 和 HR2 基因的扩增产物, 同时构建了用氨基酸连接子 SGGRGG 将 HR1 和 HR2 连接起来的串联基因 (即 HR1linkerHR2, 命名为 2-Helix), 采用大肠杆菌 GST 融合表达系统对 HR1、HR2 和 2-Helix 蛋白进行了表达, 并对 2-Helix 进行了纯化。同时利用凝胶过滤层析证明 2-Helix 在 PBS 缓冲系统中以寡聚体的形式存在。

关键词: *Feline immunodeficiency virus*(FIV); gp40; 七肽重复区; 2-Helix; 寡聚体

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)01-0022-05

生物膜的融合是许多生物学现象的核心, 例如受精, 囊泡运输, 肌肉的发育以及病毒的感染等。迄今为止, 这些膜融合现象中研究的最透彻的是囊膜病毒的膜融合。囊膜病毒通过其囊膜糖蛋白介导的病毒囊膜和宿主细胞膜的融合来完成侵染过程。大多数囊膜蛋白的胞外区有一个靠近融合肽的七肽重复区 (Heptad repeat, HR1 或者 N-peptide) 和一个靠近跨膜区的七肽重复区 (称为 HR2 或者 C-peptide), 这两段序列与融合蛋白的构象密切相

关, 结构学研究表明这两段七肽重复区能够形成反相平行的六螺旋束结构, 这被认为是融合蛋白融合后构象的核心结构^[1]。研究的较多的有逆转录病毒, 副粘病毒, 正粘病毒等。在逆转录病毒中, 研究的较为清楚的是人免疫缺陷病毒 HIV (*Human immunodeficiency virus*) 的囊膜糖蛋白 gp120/gp41 介导的膜融合^[2]。gp120 通过 CD4 以及一个共受体与靶细胞相互作用^[3], 然后 gp41 启动病毒与细胞之间的融合。gp41 包括许多重要的功能区: 融合肽

收稿日期: 2003-07-15, 修回日期: 2003-07-28

作者简介: 王春平 (1976-), 女, 辽宁省籍, 硕士生, 从事医学病毒研究。

** 通讯作者。Corresponding author. Tel: 027-87869897. E-mail: tienpo@sun.im.ac.cn

(fusion peptide-FP)、七肽重复区(HR1, HR2)以及跨膜区, 许多研究证明 HR1 和 HR2 同源的外源多肽能够抑制 HIV-1 gp120/gp41 介导的细胞融合, 并且这种抑制活性是通过阻断 gp41 蛋白本身 HR 区间的相互作用实现的^[1]。

猫免疫缺陷病毒 (*Feline immunodeficiency virus*, FIV), 属于逆转录病毒科, 慢病毒属, 能导致猫进行性免疫缺陷综合症一类似于人类免疫缺陷病毒 (HIV-1)^[4,5]。1987 年, Pedersen NC 首次报道从 California 的猫中分离到具有慢病毒特性的淋巴细胞嗜性病毒^[4]。世界范围内驯养的猫中 FIV 感染的比例为 1%~28%^[6,7]。FIV 与 HIV-1 在形态学、病理学以及基因序列方面更为相似, 因此经常作为研究 HIV-1 的模型^[8]。有实验表明来源于 FIV 的 gp40 的 HR2 同源区段的多肽具有抑制 FIV 与细胞融合的活性^[9], 但关于 FIV gp40 HR1 和 HR2 的结构特性及相互作用特性尚未见报道。本文利用程序预测确定了 FIV gp40 HR1 和 HR2 区的氨基酸序列, 用 PCR 方法人工构建了包括 HR1 和 HR2 在内的部分胞外区基因 (称为 HR1-HR2), 并以此为模

板扩增出 HR1、HR2 以及 HR1linkerHR2(2-Helix) 基因, 利用大肠杆菌 GST 融合表达系统进行了表达和纯化。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

GST 融合表达载体 pGEX-6p-1, 大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)本室保存。GST 融合的鼻病毒 3C 蛋白酶 (以下简称 GST-3C, 与 PreScissionTM 蛋白酶识别相同的氨基酸序列) 由 K.Hudson 和 J.Heath 博士惠赠。

1.2 GST-2-Helix, GST-HR1, GST-HR2 基因的构建

利用 LearnCoil-VM F 程序(<http://nightingale.lcs.mit.edu/cgi-bin/vmf>)^[10] 预测确定 FIV gp40 (Genebank Accession No. NP_040976) HR1 和 HR2 区的位置和长度。HR1 取 632 至 695 位氨基酸, 比预测的 639 至 688 位氨基酸长度多出 14 个氨基酸, HR2 取 730 至 769 位氨基酸, 比预测的 737 至 762 位氨基酸多了 14 个的氨基酸。(图 1)

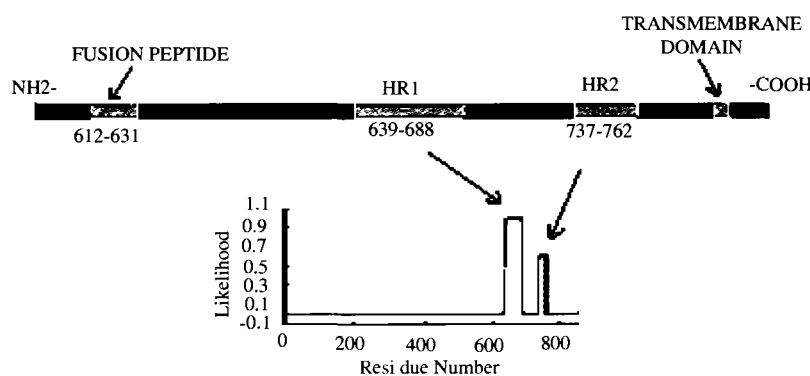


图 1 预测的 FIV gp40 七肽重复区(HR1 和 HR2)位置和长度

Fig.1 Prediction of the heptad repeat regions from FIV gp40

根据要构建的 gp40 七肽重复区基因(即相对应的 632 到 769 位氨基酸, 命名为 HR1-HR2), 参照文献^[11]的方法, 设计了如下引物:

P₁: 5'-GATGGATCCGGTGTCTACTGCTATCGGTATGGTACTCAG TACCACCAGTT-3'
 P₂: 5'-AGTCACCTTTTCCACAGCTTCTTGGTGAGTAGCCAGAACCTGGTGGTACTGAGT-3'
 P₃: 5'-GCTGTGAAAAGGTGACTGAAGCGCTAAAA TCAACAACCTGCGTCTGGTT-3'
 P₄: 5'-CTTCAAACCGATCACCAGAACCTGGTGTTC A GAGTAAC CAGACCAGTTGTT-3'
 P₅: 5'-CTGGTGATCGGTTTGAAGGTTGAAGCTATGG AGAAG TTCTTGACACCGAG-3'

P₆: 5'-TTGGTTCTGGTTGCAACCCAACCTGCATAG CGAACGC GGTGTACAAGAACTT-3'
 P₇: 5'-GGTTGCAACCAGAACCAATTCTTCTGCAAAA TCCCGCCG GAATTGTGGACT-3'
 P₈: 5'-GTTCCAGATGGTCTGGTTGATGGTCATGTTGT AGCGA GTCCACAATTCCGG-3'
 P₉: 5'-AACCAGACCATCTGGAACCACGGTAACATCA CTCTGGG TGAATGGTACAAC -3'
 P₁₀: 5'-CTCGTAGAACTTCTGCTGCAAGTCCTTAGTC TGGTTGTA CCATTCACCCAG -3'
 P₁₁: 5'-CAGCAGAAGTTTACGAGATCATCATGGACA TCGAGC AGAACAACGTTTCAGGGC-3'
 P₁₂: 5'-GCTCTCGAGTCACTTCTGCAGCTGCTGGA TACCTT TTTGCCCTGAACGTTGTT -3'

具体方法简要如下: 奇数引物序列覆盖了所要拼接基因的全部序列, 偶数引物为与目标基因互补且与相邻的奇数引物有 15-18bp 的搭桥区。通过两轮 PCR: 第一轮 PCR 以从 P₁ 到 P₁₂ 的 12 条引物互为模板和引物, 扩增得到一系列大小不同的 DNA。其中包括目的基因, 虽然量极少。第二轮 PCR 以沉淀回收的第一轮产物为模板, 以 P₁ 和 P₁₂ 为上游和下游引物。扩增得到较单一的目的基因, 割胶回收目的 DNA, 得到 HR1-HR2 基因的扩增产物。

用于构建 HR1linkerHR2 (命名为 2-Helix) 的引物:

HL₁: 5'-ACCTCCTCGTCCACCAGACTGCATAGCGAACG
CGGTGTA-3'

HL₂: 5'-TCTGGTGGACGAGGAGGTACTCTGGGTGA
ATGGTAC-3'

经过两轮 PCR, 即第一轮以 HR1-HR2 为模板, 以 P₁ 和 HL₁ 分别为上游和下游引物, 扩增出 HR1linker 基因, 同时以 HR1-HR2 为模板, HL₂ 和 P₁₂ 分别为上游引物和下游引物, 扩增出 HR2linker 基因; 第二轮则 HR1linker 和 HR2linker 互为引物和模板扩增并回收到纯净的 HR1linkerHR2 (2-Helix) 基因。

用于扩增独立 HR1、HR2 的引物:

R₁: 5'-TTTCTCGAGTCACTGCATAGCGAACGCGGTGTA-3'

R₂: 5'-CAAGGATCCATCACTCTGGGTGAATGGTAC-3'

方法和扩增 2-Helix 相似, 以 2-Helix 基因为模板, P₁ 和 R₁ 分别为上游和下游引物扩增出 HR1 基因; 同时以 2-Helix 基因为模板, R₂ 和 P₁₂ 分别为上游和下游引物扩增出 HR2 基因; 其中上游引物和下游引物分别带有 *Bam* HI 和 *Xho* I 酶切位点。

扩增得到的 2-Helix、HR1、HR2 产物回收后, 经过 *Bam* HI/*Xho* I 双酶切, 与用 *Bam* HI/*Xho* I 酶切过的 pGEX-6p-1 在 16℃ 连接过夜, 转化 DH5 α 菌株, 所得克隆经过酶切与 PCR 鉴定以及 DNA 测序确证。

1.3 GST-2-helix, GST-HR1, GST-HR2 蛋白的表达

将 DNA 序列测定正确的重组阳性质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 过夜培养物转接新鲜 2×YT 培养基 37℃ 振荡培养至 OD₅₉₀ 为 0.8~1.0 左右, 加诱导物 IPTG 至终浓度 1mmol/L, GST-2-Helix, GST-HR1 表达菌 4℃ 诱导表达过夜, GST-HR2 表达菌在 37℃ 诱导 4h; 10000g 离心 5min 收集菌体, 加适量 PBS 缓冲液 (140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10mmol/L Na₂HPO₄, 1.8mmol/L KH₂PO₄, pH 7.3) 重悬菌体, 超声波裂解后加入终浓

度为 1% 的 TritonX-100, 冰浴 30min, 12 000r/m, 4℃ 离心 25min, 取上清; 电泳鉴定。

1.4 2-Helix 蛋白的纯化

将超声波裂解液离心后的上清液通过经 PBS 平衡的 Glutathione-Sepharose 4B 亲和层析柱, 再用 PBS 洗涤, 用还原型谷胱甘肽溶液 (10mmol/L reduced glutathione, 50mmol/L Tris-HCl pH 8.0) 洗脱, 收集洗脱液得到 GST-2-Helix 蛋白; 该蛋白超滤浓缩达到体积小于 1mL, 加入 19mL 酶切缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl, pH 7.0; 150 mmol/L NaCl; 1mmol/L DTT; 1 mmol/L EDTA, pH 8.0), 加入过量 GST-3C 蛋白酶 5℃ 酶切 16h; 酶切产物再用超滤浓缩再稀释的办法换成 PBS 缓冲液, 用 Glutathione-Sepharose 4B 亲和层析柱亲和除去酶切下的 GST 和 GST-3C, 收集未被亲和的流穿液得到 2-Helix 蛋白, 用截流分子量为 10kDa 的超滤管浓缩至适当浓度, -70℃ 冻存备用。蛋白样品用 Tris-tricine SDS-PAGE 鉴定。

1.5 2-Helix 蛋白的分子筛层析

将经亲和层析纯化的 2-Helix 蛋白进行 Hiload Superdex™ G75 (Pharmacia 公司) 分子筛层析, 操作系统为 Akta explorer 100 (Pharmacia 公司), 缓冲液为 20mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 100mmol/L NaCl; 收集目的蛋白峰进行 Tris-tricine SDS-PAGE 分析。以 52kDa 和 14.3kDa 蛋白质分子量标准进行同样的分子筛层析作为对照。

2 结果

2.1 2-helix, HR1, HR2 序列的亚克隆

利用搭桥 PCR 的方法, 经过两轮 PCR, 第一轮得到大小不一但是含有目的基因的产物, 沉淀回收后并以为之模板, 以 P₁ 和 P₁₂ 为引物扩增出较单一的目的基因, 割胶回收得到了 HR1 - HR2 基因, 以此为模板扩增得到 2-Helix(345bp)、HR1(209bp) 和 HR2(138bp) 基因, 分别将三个片断克隆到 pGEX-6p-1 表达载体(4.9kb)上, 经过酶切鉴定确定所插入的基因大小正确(图 2)。DNA 序列测定证明所得克隆完全正确。

2.2 GST-2-Helix, GST-HR1, GST-HR2 融合蛋白的表达

将所得阳性克隆分别转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达, 载体前导蛋白 (GST) 的大小为 26kDa, 与 2-Helix、HR1 和 HR2 融合后所得的蛋白大小分别约为 38kDa、33kDa 和 31kDa。SDS-PAGE 结果显示所得融合蛋白与估计的大小相符(图 3)。

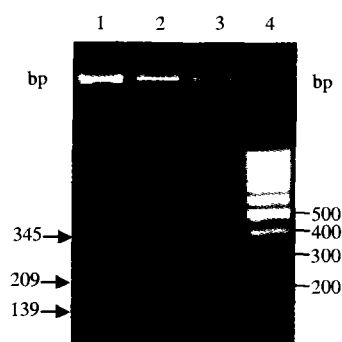


图2 重组质粒酶切分析图

Fig. 2 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmids
1, GST-2-Helix digested by *BamH I/Xho I*; 2, GST-HR1 digested by *BamH I/Xho I*; 3, GST-HR2 digested by *BamH I/Xho I*; 4, DNA molecular weight marker.

性的自然状态下, 由于 HR1 和 HR2 间存在相互作用而使得 2-Helix 蛋白以多聚体的形式存在。

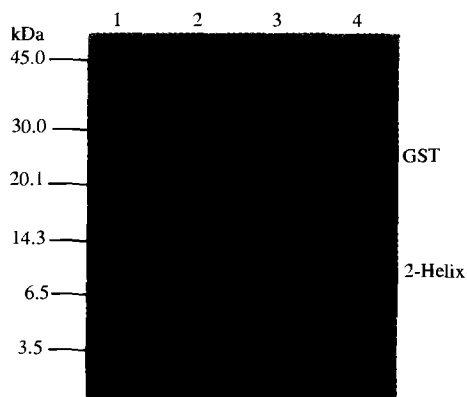


图4 2-Helix 蛋白的纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of purified 2-Helix

1, Protein molecular weight marker; 2, Purified GST-2-Helix; 3, Cleavage of GST-2-Helix; 4, Purified 2-Helix.

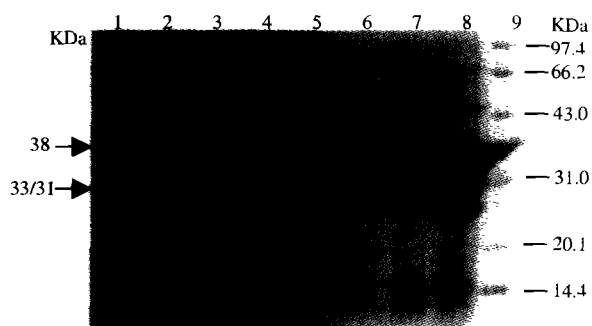


图3 GST 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of fusion protein expression
1, Supernatants of GST; 2, Supernatants of GST-HR1; 3, Depositions of GST-HR1; 4, Flow through parts of GST-HR2; 5, Supernatants of GST-HR2; 6, Depositions of GST-HR2; 7, Supernatants of GST-2-Helix; 8, Depositions of GST-2-Helix; 9, Protein molecular weight marker.

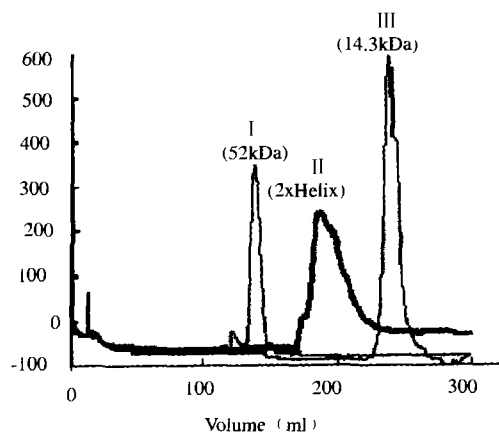


图5 2-Helix 的 Superdex G75 层析

Fig.5 Gel-filtration analysis of 2-Helix

1, 52kDa protein standards in the first running; 2, 2-Helix proteins in the second running; 3, 14.3 kDa protein standards in the third running.

2.3 2-Helix 蛋白的纯化和分子筛层析

融合蛋白酶切以后, 经过 Glutathione-Sepharose 4B 亲和层析, 收集流穿的部分, 浓缩后所得到的蛋白在考马斯亮蓝染色 Tris-tricine SDS-PAGE 情况下均为一条带, 且蛋白条带分子量完全正确(图4)。分子筛层析结果表明 2-Helix 的洗脱峰在 52kDa(图5洗脱峰I)和 14.3kDa(图5洗脱峰III)之间(图5洗脱峰II), 而其单体分子量约 12kDa。由此可见, 在变性的 SDS-PAGE 情况下, 2-Helix 蛋白的分子量为 12 kDa, 而在非变性的 PBS 缓冲系统中流经分子筛时, 分子量是位于 14.3kDa 和 52kDa 之间, 明显大于单体的分子量 12 kDa, 由此可见, 在非变

3 讨论

囊膜病毒融合蛋白两个保守的七肽重复区 HR1 和 HR2 所形成的六螺旋束结构已被认为是融合蛋白在融合后构象的核心结构, 这种结构特征已在逆转录病毒 (HIV-1, SIV, HTLV-1 和 MoMLV)、副粘病毒 (NDV, SV5 和 HRSV)、正粘病毒 (流感病毒) 和丝状病毒 (Ebola 病毒) 得到证实^[12-15]。这说明这些病毒可能利用相似的融合机制。本研究将 FIV 的 Env 蛋白 gp40 的 HR1 和 HR2 人工连接起来 (2-Helix) 进行研究, 这种方法的可靠性已在 HIV-1 和 NDV 的 HR1/HR2 三聚体晶体结构

得到证实^[16,17], 这说明 2-Helix 蛋白所形成的多聚体能够反映 HR1 和 HR2 间的相互作用, 它也能够代表 FIV 的 gp40 融合后构象的核心结构。

逆转录病毒 Env 蛋白 HR 多肽的抑制融合活性已在许多病毒得到了证实, 但 HR1 和 HR2 间存在差异。FIV 的 Env 蛋白 HR2 具有融合抑制活性^[10], 而 HIV-1 的来源于 HR1 的 T21 和 HR2 的 T20 都具有抑制活性^[18,19]。本研究证实 FIV 的 Env 蛋白的 HR1 和 HR2 同样能形成多聚体结构, 说明外源性 HR2 也是通过与 Env 蛋白本身的 HR2 竞争结合 HR1 位点发挥抑制作用的, 这就为进一步筛选融合抑制物提供了参考。

FIV 的存在给全世界的驯养和野生的猫带来了巨大的危害。与此同时, 在 HIV 被人类发现后的十多年以来, 人们一直不懈的努力寻找一种防治 HIV 的疫苗和药物, 而同属于逆转录病毒科慢病毒属的 FIV 便因为其形态学、病理学以及基因序列方面与 HIV 的接近而成为 HIV 的研究模型之一, 特别是 2002 年 FIV 疫苗的研制成功, 为研制 HIV 的疫苗提供了一定程度的借鉴。

本研究结果表明: 在诱导表达的温度为 37℃ 时融合蛋白的可溶性表达存在区别, GST-HR1 少部分可溶, 可能与 HR1 区的含有高比例的疏水氨基酸有关, GST-HR2 很大一部分可溶, 因为 HR2 区含有相对较少的疏水氨基酸, GST-2-Helix 是几乎完全不可溶的, 可能由于 HR1 比 HR2 长很多而造成疏水氨基酸暴露在溶液中导致不可溶。

本文结果为进一步分析该蛋白结构及相应功能打下了基础。

参考文献

- [1] Eckert D M, Kim P S. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition [J]. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 777-810.
- [2] Freed E O, Martin M A. The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(41): 23883-23886.
- [3] D'Souza M P, Harden V A. Chemokines and HIV-1 second receptors. Confluence of two fields generates optimism in AIDS research[J]. *Natl Med*, 1996, 2(12): 1293-1300.
- [4] Pedersen N C, Ho E W, Brown M L, *et al*. Isolation of a Tlymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome[J]. *Science*, 1987, 235(4790): 790-793.
- [5] Siebelink K H, Chu I H, Rimmelzwaan G F, *et al*. Feline immunodeficiency virus (FIV) infection in the cat as a model for HIV infection in man: FIV-induced impairment of immune function [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1990, 6(12): 1373-1378.
- [6] Ishida T, Washizu T, Toriyabe K, *et al*. Feline immunodeficiency virus infection in cats of Japan[J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1989, 194(2): 221-225.
- [7] Yamamoto J K, Hansen H, Ho E W, *et al*. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission[J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1989, 194(2): 213-220.
- [8] Bendinelli M, Pistello M, Lombardi S, *et al*. Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen[J]. *Clin Microbiol Rev*, 1995, 8(1): 87-112.
- [9] Medinas R J, Lambert D M, Tompkins W A, *et al*. C-Terminal gp40 Peptide Analogs Inhibit Feline Immunodeficiency Virus: Cell Fusion and Virus Spread[J]. *J Virol*, 2002, 76(18): 9079-86.
- [10] Singh M, Berger B, Kim P S, *et al*. LearnCoil-VMF: computation alevidence for coiled-coil-like motifs in many viral membrane-fusion proteins[J]. *J Mol Biol*, 1999, 290(5): 1031-41.
- [11] Zhu J Q, Zhang C W, Rao Z, *et al*. Biochemical and biophysical analysis of heptad repeat regions from the fusion protein of Menangle virus, a newly emergent paramyxovirus[J]. *Arch Virol*, 2003, 148(7): 1301-16.
- [12] Weissenhorn W, Dessen A, Calder L J, *et al*. Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses[J]. *Mol Membr Biol*, 1999, 16(1): 3-9.
- [13] Lamb R A, Joshi S B, Dutch R E. The paramyxovirus fusion protein forms an extremely stable core trimer: structural parallels to influenza virus haemagglutinin and HIV-1 gp41[J]. *Mol Membr Biol*, 1999, 16(1): 11-9.
- [14] Skehel J J, Wiley D C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin[J]. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 531-69.
- [15] Eckert D M, Kim P S. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition[J]. *Annu Rev Biochem*. 2001; 70: 777-810.
- [16] Zhu J, Li P, Wu T, *et al*. Design and analysis of post-fusion 6-helix bundle construct of heptad repeat regions from Newcastle disease virus F protein[J]. *Protein Engineering*, 2003 in press.
- [17] Tan K, Liu J, Wang J, *et al*. Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997, 94(23): 12303-12308
- [18] Wild C, Oas T, McDanal C, *et al*. A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 10537-10541.
- [19] Wild C T, Shugars D C, Greenwell T K, *et al*. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(21): 9770-9774.