

HIV *gp41* 基因分段低温诱导表达*

袁玉华, 毕昌昊, 李 菊, 王学谦, 耿运琪, 陈启民**

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

Low-temperature Induced Expression of HIV *gp41* Gene Segments

YUAN Yu-hua, BI Chang-hao, LI Ju, WANG Xue-qian, GENG Yun-qi, CHENG Qi-min

(College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Clone N3 and C from Human immunodeficiency virus(HIV) *gp41* gene were expressed using the pET expression system. When induced by IPTG at 37°C, both two clones did not express in *E.coli* BL21(DE)3. However, when induced at 16°C, the two clones were both overexpressed, and the amount of the product was about 20% of the total bacteria protein. In Western blotting test, the protein product could react with HIV-positive serum. After IPTG induction, *E. coli* cells had much higher death rate at 37°C than at 16°C; [³H]uridine release assay also showed that after IPTG induction, *E. coli* had a higher release at 37°C. The results suggested that overexpression of the two proteins was due to their decreased toxicity at lower temperature.

Key words: Human immunodeficiency virus (HIV) *gp41* gene; Low temperature induction; Toxic

关键词: HIV *gp41*; 低温诱导; 毒性

中图分类号: R373

文章标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)02-0179-03

人类免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) GP41 跨膜蛋白由于具有特殊的穿膜拓扑结构, 对宿主菌细胞膜产生毒性作用而使其难以在 *E.coli* 中有效表达^[1]。本室前期工作发现 GP41 蛋白中有三个区域对表达菌细胞具有毒性作用, 其分别为: 位于 N 端 2/3 区域(N3 片段: nt7373-8006)的融合肽 (aa512-527) 和跨膜区 (Aa 684-705), 它们含有丰富的疏水性氨基酸; 以及位于 C 端 1/3 区域(C 片段:nt8007-8339)的慢病毒裂解肽 LLP1(aa 826-854)和 LLP2 (aa 768-788), 可形成 2 个两亲性 α 螺旋, 从而对宿主菌产生较强的细胞膜毒性作用使细菌大量死亡, 最终致使 GP41 蛋白难以获得有效表达^[2]。为此我们尝试在低温条件(16°C)下对 HIV-gp41N 端 2/3 和 C 端 1/3 区域在大肠杆菌 BL21(DE)3 中进行诱导表达, 并对低温条件下 GP41 蛋白表达对细菌细胞膜的毒性作用特征进行初步探讨。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

质粒 pET-HN3, pET-HC 为本实验前期构建^[2], 其中片段 N3, C 分别为 *gp41* 基因的 N 端 2/3 (nt7373-8006) 和 C 端 1/3 (nt8007-8339) 区域。表达菌 *E.coli* BL₂₁(DE)₃ 为本室保存。

HIV 阳性血清由中国疾病预防控制中心免疫室惠赠; 蛋白分子量标准, 酶标记羊抗人 IgG 购自北京鼎国生物技术发展中心; IPTG 购自大连宝生物工程有限公; [³H]尿嘧啶(3.7×10⁻⁷Bq/mL)购自中国原子能研究所; 其余试剂为国产分析纯或优级纯。

1.2 基因操作

质粒的提取、转化、LB 培养基制备, 细菌总 RNA 提取和分子杂交等方法参照文献^[3]。

1.3 重组蛋白的诱导表达

收稿日期: 2003-10-27, 修回日期: 2003-11-24

* 基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (2000005512)

作者简介: 袁玉华 (1964-), 男, 天津籍, 博士, 研究方向为分子病毒学。

** 通讯作者: 陈启民 (1944-), 男, 山东籍, 教授, 博导, 研究方向为分子病毒学。

Corresponding author. Tel: 022-23501783; E-mail: qmchen@public.tpt.tj.cn

挑取含有表达质粒 pET-HN3, pET-HC 的 *E. coli* Bl₂₁(DE)₃ 单菌落接入 3mL LB 培养基(含 100 μg/mL 氨苄青霉素), 37℃ 振荡培养过夜, 按 1:100 转接于 LB 培养基(含 100 μg/mL 氨苄青霉素)中 37℃ 振荡培养。当 OD_{600nm} 达 0.5~1.0 时, 取少量菌液留作诱导前的对照, 在其余菌液中加入 IPTG 至 1mmol/L, 分别在 16℃ 培养 5h 后 6000 r/min 离心 5~10min 收集菌体, 加入 loading buffer 100℃ 裂解 5min 后聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.4 免疫印迹试验 (Western blot)

转膜方法详参见分子克隆, SDS-PAGE 后将蛋白从凝胶转移到硝酸纤维膜上 (0.65mA/cm² 过夜), 封闭剂为 5% 的脱脂奶粉, 第一抗体为 HIV 阳性血清, 第二抗体为羊抗人 IgG-AP, 显色剂为 4-氯-1-萘酚(4CN)。显色方法: 将 6mg 4CN 溶于 2mL 甲醇, 在 10mL 冰冷的 PBS 中加入 6μL 30% 过氧化氢, 以上两种溶液均在使用前新鲜配制, 立即混匀, 迅速倒在漂洗后的膜上, 在暗处放置至颜色显现。

1.5 IPTG 诱导后细菌平板计数

取 LB 转接培养菌液, 37℃ 振荡培养至 OD_{600nm} 达 0.5 时加入 IPTG 至 1mmol/L, 分别在 37℃ 和 16℃ 培养 0h、0.5h、1h、1.5h、2h、2.5h, 在含 100 μg/mL AP 的 LB 平板上进行活菌计数。

1.6 [³H]尿嘧啶释放实验

取上述 LB 转接培养菌液, 37℃ 振荡培养至 1h 按 2μCi/mL 在培养液中加入 [³H]尿嘧啶, 当 OD_{600nm} 达 0.5 时, 用 LB 培养液洗涤三次, 加入等量的 LB 培养液, 再加入 IPTG 至 1mmol/L。分别在 37℃ 和 16℃ 培养 0h、1h、2h、3h、4h、5h、6h 取菌液高速离心, 取 200μL 上清, 闪烁仪测 cpm。

2 结果与讨论

gp41 基因 N3 和 C 片段在 BL21(DE)₃ 中于 37℃ 和 16℃ 诱导后的聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹结果分别见图 1, 2, 37℃ 诱导条件下 pET-HN3, pET-HC 均不能在大肠杆菌中有效表达, 而在 16℃ 条件下可获得高效表达, 其表达量约占菌体总蛋白的 10%~20%。免疫印迹结果显示在 N3 和 C 的相应表达位置 25kDa 和 16kDa 处分别有一条明显的反应带, 表明表达的重组蛋白与 HIV 阳性血清有着良好的反应性。

对 37℃ 和 16℃ 两种温度下 IPTG 诱导菌的活菌计数显示: 37℃ 条件下质粒 pET-HN3, pET-HC 的表达菌在加入 IPTG 后即开始大量死亡, 诱导 4h 后

活菌数从约 10⁸/mL 下降到 10⁵/mL 左右, 而 16℃ 条件下 pET-HN3 和 pET-HC 表达菌在诱导过程中仅有少量死亡 (图 3)。

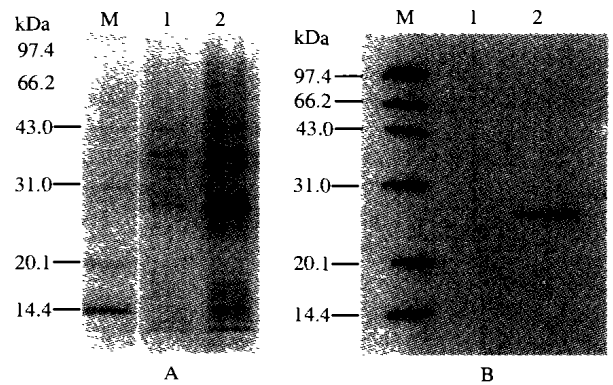


图 1 片段 N3 诱导表达产物的检测

Fig. 1 Analysis of induced protein from N3 fragment

A, SDS-PAGE; B, Western blot. M, molecular weight standard; Lane 1, total protein from uninduced *E. coli* Bl₂₁(DE)₃ (pET-HN3); 2, total protein from induced *E. coli* Bl₂₁(DE)₃ (pET-HN3).

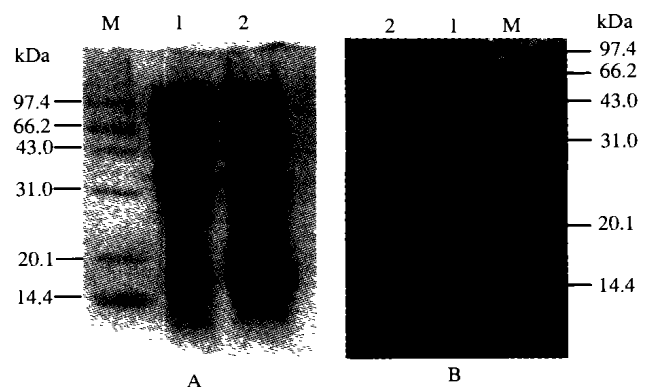


图 2 片段 C 诱导表达产物的检测

Fig. 2 Analysis of induced protein from C fragment

A, SDS-PAGE; B, Western Blot. M, molecular weight standard; Lane 1, Total protein from uninduced *E. coli* Bl₂₁(DE)₃ (pET-HC); 2, Total protein from induced *E. coli* Bl₂₁(DE)₃ (pET-HC).

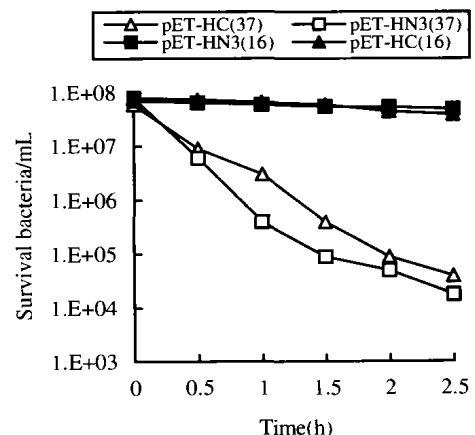


图 3 诱导后细菌存活计数

Fig. 3 Postinduction survival counting of *E. coli* Bl₂₁(DE)₃

用 ^3H 尿嘧啶掺入释放实验了解不同温度条件下质粒 pET-HN3, pET-HC 的表达对宿主菌细胞膜毒性作用, 图 4 显示: 37℃ 条件下诱导质粒 pET-HN3, pET-HC 的表达菌 5h 时, ^3H 尿嘧啶释放量达到 106 和 124cpm; 而在 16℃ 条件下诱导表达菌 5h ^3H 尿嘧啶释放量仅达 30 和 38 cpm, 重复实验均显示 16℃ 条件下 ^3H 尿嘧啶释放量远低于 37℃ 诱导的释放量。

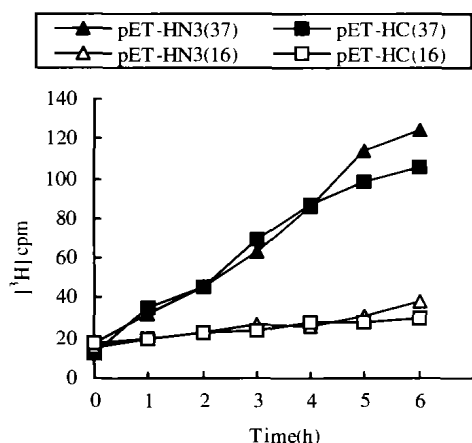


图 4 诱导后细菌 ^3H 尿嘧啶释放

Fig. 4 Postinduction ^3H uridine release of *E. coli* BL₂₁(DE)₃

上述实验结果说明, 37℃ 条件下诱导目的蛋白的表达对细菌膜的穿膜毒性作用致使细菌大量死亡, 使目的蛋白难以获得有效表达, 而在 16℃ 条件下能有效的降低这种细胞膜的毒性作用, 减少宿主菌的死亡, 而使目的蛋白获得有效表达。本文同时对 gp41 全长基因进行低温诱导, 发现尽管温度已降至 10℃, 仍未见明显表达带(结果未显示), 分析可能是由于全长 GP41 蛋白具有较片段 N3 和 C 更强的细胞毒性, 即使低温也不能有效降低其细胞膜毒性作用而使自身获得有效表达。

利用 *E. coli* 表达外源基因具有操作简便, 成本低廉等优点。但 HIV-1GP41 蛋白无论全长还是分段在大肠杆菌中均难以获得有效表达^[2]。Mujacic 等^[4]

对 TEM- β -lactamase 进行 37℃ 诱导时发现表达产物会发生降解, 而 24℃ 诱导能抑制这种降解, 增加蛋白表达量, 他们认为这是由于冷休克蛋白促进了目的蛋白的折叠从而能抵抗宿主菌蛋白酶对其的降解, 而本文中免疫印迹反应并未发现目的蛋白的降解, 同时由于穿膜蛋白疏水氨基酸在穿膜过程中通过嵌入到脂双层的疏水区, 对脂双层的脂相(疏水核)产生扰动效应, 造成磷脂双层无规则排列, 导致细胞膜透性增加, 对细胞产生毒性^[5]。因而我们认为 GP41 蛋白低于 37℃ 诱导表达可能是由于下列原因: 1) 低于 37℃ 条件下细菌表达的冷休克蛋白作为分子伴侣与诱导表达的 P41 蛋白结合, 改变其折叠构象, 阻碍穿膜拓扑结构的形成, 从而减弱对细菌细胞膜的毒性作用。2) 低于 37℃ 状态下细菌细胞膜脂质相变性质不利于 GP41 蛋白的穿膜, 也就降低了对细胞的毒性。

由于膜蛋白对细菌细胞膜的毒性作用限制了其在原核表达系统中的高效表达, 本实验证实低温表达技术可能是改善某些膜蛋白在原核系统中表达的有效途径。

参考文献

- [1] Sohn M J, Lee M E, Park H S, *et al.* Overexpression and purification of human immunodeficiency virus type 1 env derived epitopes in *Escherichia coli*[J]. *J Biotechnol.* 1996, 45(3): 211-6.
- [2] 袁玉华, 毕昌昊, 李菊, 等. 影响 HIV-gp41N 端 1/2 在 *E. coli* 中表达的两段氨基酸序列界定[J]. *南开大学学报(自然科学版)* (已印刷).
- [3] 萨姆布鲁克, J. 弗里奇, E F, 曼尼阿蒂斯, T 著. 分子克隆试验指南[M]. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [4] Mujacic M, Cooper K W, Baneyx F. Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in *Escherichia coli*: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein[J]. *Gene.* 1999, 238: 325-332.
- [5] Mangavel C, Maget-Dana R, Tauc P, *et al.* Structural investigations of basic amphipathic model peptides in the presence of lipid vesicles studied by circular dichroism, fluorescence, monolayer and modeling[J]. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1998, 1371: 265-283.