

HIV-1gp41 不同片段表达对 *E. coli* 细胞毒性作用分析

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. * 联系人, E-mail: gmchen@public.tpt.tj.cn)

摘要 HIV-gp41 基因在 *E. coli* 中难以表达, 为研究影响其表达的原因, 选择 gp41 不同区域构建表达质粒, 通过在 *E. coli* BL21(DE3) 中进行表达测定其对细菌的毒性作用. 结果表明, IPTG 诱导后除质粒 pET-HN2 表达菌以外其余质粒表达菌大量死亡, 目的基因转录的 mRNA 量也迅速下降, [³H]尿嘧啶释放实验显示释放增加, 说明 GP41 蛋白的毒性作用主要表现为对表达菌细胞膜的破坏而成为其在 *E. coli* 中难以表达的主要原因.

关键词 HIV GP41 蛋白 细胞毒性 *E. coli*

HIV-1 GP41 跨膜蛋白是一种极为重要的 HIV 检测抗原, 由于其抗原决定簇的序列较为保守, 所以在 HIV 检测中作为一项主要指标. 然而全长 gp41 基因在 *E. coli* 中不能有效表达, 推测 GP41 蛋白对大肠杆菌的毒性作用可能是影响其表达的主要因素^[1].

跨膜蛋白特殊的穿膜拓扑结构对细胞膜具有毒性作用, 决定其在大肠杆菌中的表达行为, 如圣利森林病毒(Semliki Forest virus) 6 kD 蛋白、甲型肝炎病毒 3AB 蛋白和 SARS 病毒 E 蛋白^[2~4]能在 *E. coli* 中有效表达; 而丙型肝炎病毒 E1 蛋白、日本脑炎病毒 NS2B 蛋白和轮状病毒 NSP4 蛋白^[5~7]却难以表达. 跨膜蛋白中穿膜螺旋的疏水性及形成的 α -螺旋是许多膜蛋白行使穿膜作用的基本结构, 这种穿膜螺旋借助疏水氨基酸的疏水作用力深入到细胞膜磷脂双层的脂相(疏水核)产生扰动效应, 造成磷脂双层无规则排列而完成穿膜^[8]. 我们前期工作¹⁾表明, GP41 跨膜蛋白 4~26 位和 167~189 氨基酸之间存在 2 个穿膜螺旋, 其中含有任意螺旋的 N1 和 N3 片段在大肠杆菌中均不能获得有效表达, 而不含任何螺旋的片段 N2 却能有效表达. 本文通过对 gp41 不同基因片段的表达及其对 *E. coli* 的毒性研究, 确立影响全长 gp41 基因在 *E. coli* 中表达的原因, 为进一步探索 GP41 蛋白在 HIV 致病变中的作用奠定基础.

1 材料与方法

(i) 实验材料. 质粒 pET-Hgp41, pET-HN1, pET-HN2, pET-HN3, pET-HC 为前期构建^{[9][1]}, 片段 N1, N2, N3, C 在 gp41 基因中的位置见图 1. [³H]尿嘧啶

(3.7×10^{-7} Bq/mL) 购自中国原子能研究所; [α -³²P] dATP/dCTP(370 MBq/mL) 购自北京福瑞生物工程公司; 其余试剂均为国产分析纯.

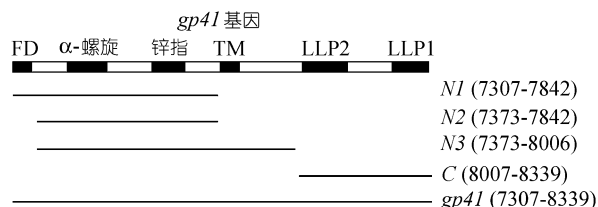


图 1 gp41 不同缺失体构建示意图

(ii) 基因操作. 质粒的转化、细菌总 RNA 的提取和杂交参照文献[10].

(iii) 探针制备. gp41 的 N1 和 C 片段编码区用缺口平移法进行 [α -³²P]dATP/dCTP 标记制成探针 N1 和 C.

(iv) 细菌诱导后生长曲线绘制. 将空质粒 pET-H(作为对照)和表达质粒 pET-Hgp41, pET-HN1, pET-HN2, pET-HN3 及 pET-HC 转化 *E. coli* BL21(DE3), 挑取单菌落接入 3 mL LB 培养液(含 100 μ g/mL AP), 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 按 1:100 转接于 LB 培养液(含 100 μ g/mL AP)中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 A_{600} 约 0.8 时, 加入 IPTG 至 1 mmol/L, 定时取菌液测 A_{600} 值并绘制曲线图.

(v) IPTG 诱导后活菌计数. 取上述 LB 转接培养菌液, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 A_{600} 达 0.5 时加入 IPTG 至 1 mmol/L, 分别在培养 0, 0.5, 1, 1.5, 2 和 2.5 h 后, 在含 100 μ g/mL AP 的 LB 平板上稀释涂布, 18 h 后计数菌落.

1) 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. 南开大学学报, 2004(待发表)

(vi) $[^3\text{H}]$ 尿嘧啶释放实验. 取上述 LB 转接培养菌液, 37°C 振荡培养 1 h 按 $2\ \mu\text{Ci}/\text{mL}$ 在培养液中加入 $[^3\text{H}]$ 尿嘧啶, 当 A_{600} 达 0.5 时, 用 LB 培养液洗涤 3 次, 加入等量预温的 LB 培养液, 再加入 IPTG 至 $1\ \text{mmol}/\text{L}$. 分别在 0, 1, 2, 3, 4 和 5 h 取等菌数培养液高速离心, 取 $200\ \mu\text{L}$ 上清, 闪烁仪测其 $[^3\text{H}]$ 尿嘧啶释放量, 即每分钟脉数(cpm), 结果为 3 次重复实验的均值, 变异系数 $< 15\%$.

(vii) RNA 点杂交. 将质粒 pET-Hgp41, pET-HN1, pET-HN2, pET-HN3 和 pET-HC 表达菌按 1:100 接种量转接 LB 培养基, 37°C 振荡培养到 A_{600} 达 0.5 时加入 IPTG 至 $1\ \text{mmol}/\text{L}$, 分别在 0.5, 1 和 1.5 h 时取菌液提取细菌总 RNA, 取 $20\ \mu\text{g}$ RNA 点膜, 预杂交 2 h 后分别加入 N1 和 C 探针 68°C 杂交过夜, -70°C 过夜曝光.

2 结果

2.1 gp41 片段的表达影响细菌的生长

为了解 gp41 基因不同片段表达对宿主菌生长状态影响, 宿主菌经 IPTG 诱导后绘制细菌生长曲线, 如图 2 所示, 质粒 pET-H 和 pET-HN2 表达菌 A_{600} 值略有增加, 其余质粒表达菌其 A_{600} 值在诱导后 4 h 内均基本保持恒定.

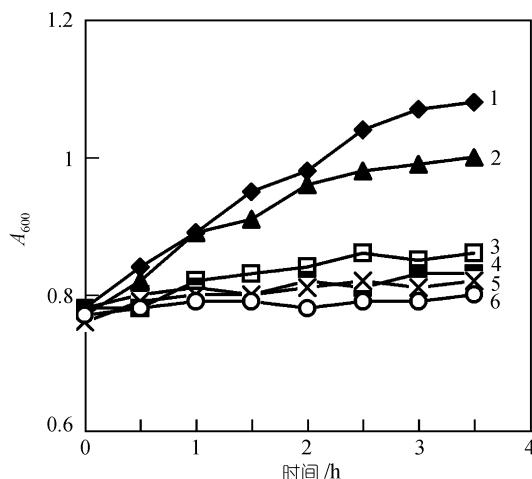


图 2 表达不同 gp41 片段的 BI21(DE3)细菌生长
1 示 pET-H, 2 示 pET-HN2, 3 示 pET-HC, 4 示 pET-HN1, 5 示 pET-HN3, 6 示 pET-Hgp41

2.2 gp41 片段的表达引起细菌的死亡

对 IPTG 诱导后的细菌进行活菌计数, 结果如图 3 所示, 质粒 pET-Hgp41, pET-HN1, pET-HN3 和 pETHC 的表达菌大量死亡, 诱导 4 h 后活菌数从约 $10^8/\text{mL}$ 下降到 $10^5/\text{mL}$ 左右, 而 pET-H 和 pET-HN2 表达菌仅有

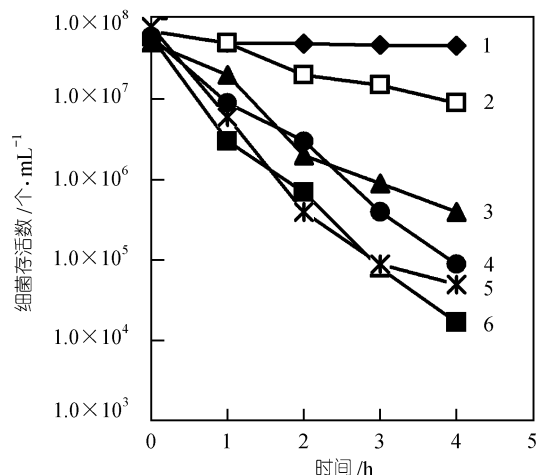


图 3 表达不同 gp41 片段的 BI21(DE3)诱导后细菌存活计数

1 示 pET-H, 2 示 pET-HN2, 3 示 pET-HN1, 4 示 pET-HC, 5 示 pET-HN3, 6 示 pET-Hgp41

少量死亡.

2.3 GP41 片段穿透 BL21(DE3)细胞膜

为了解 gp41 基因片段表达引起宿主菌死亡的确切原因, 用 $[^3\text{H}]$ 尿嘧啶掺入释放实验检测 GP41 蛋白对宿主菌细胞膜的毒性作用, 从图 4 可以看出, gp41 不同基因片段表达后均导致其表达菌产生不同程度的 $[^3\text{H}]$ 尿嘧啶释放(5 h 其 $[^3\text{H}]$ 尿嘧啶释放量在 67 ~ 163 之间, 而空质粒 pET-H 对照菌为 24), 说明这些片段的表达均使表达菌细胞膜通透性增加而产生毒性.

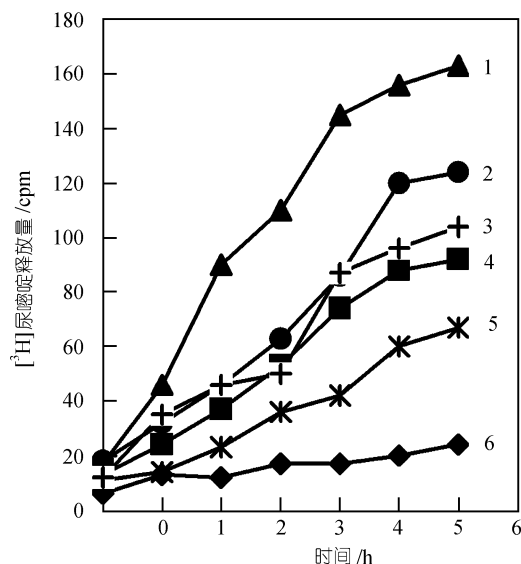


图 4 表达不同 gp41 片段的 BI21(DE3)诱导后 $[^3\text{H}]$ 尿嘧啶释放

1 示 pET-Hgp41, 2 示 pET-HN3, 3 示 pET-HC, 4 示 pET-HN1, 5 示 pET-HN2, 6 示 pET-H

尽管片段 N2 能够有效表达,但也能使表达菌细胞膜通透性增加,所引起的细胞透性最低(67 cpm),而 GP41 全长蛋白则为最高(163 cpm).

2.4 诱导后引起 gp41 片段转录迅速下降

用 RNA 点杂交检测 gp41 不同基因片段的转录情况,如图 5 所示, IPTG 诱导后除 N2 以外其余目的基因转录的 mRNA 量急剧下降,尤其以 gp41 全长基因的转录本下降最为明显,表明不同片段的表达对细胞膜透性的影响不同,透性的增加导致菌体大量死亡,目的 mRNA 量明显下降.

综上所述, GP41 蛋白对细菌胞膜的毒性致使细菌大量死亡,最终导致 GP41 蛋白难以获得有效表达.

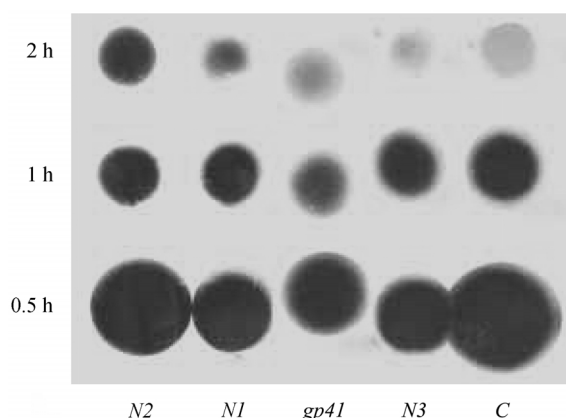


图 5 表达不同 gp41 片段的 BI21(DE3)诱导后 RNA 点杂交

3 讨论

由于 GP41 蛋白在临床检测中的重要性,因此在 *E. coli* 中表达 GP41 制备大量廉价 GP41 蛋白格外重要. 研究证实, gp41 全长基因难以在原核细胞中表达^[1],但影响其表达的确切原因和机理目前尚无报道. 本研究发现,可能是由于 GP41 蛋白特殊的穿膜拓扑结构致使其不同区域对表达菌产生不同的毒性作用, IPTG 诱导后细菌平板计数直接证明了这一点;而^{[3]H}尿嘧啶掺入释放实验结果表明,这些 GP41 蛋白片段会对其表达菌具有穿膜毒性,最终导致细菌的大量死亡以及目的 mRNA 的下降.

分析 GP41 蛋白 N 端各个片段可以发现,片段 N2 在近 N 端含有 1 个亮氨酸拉链区和 1 个 α -螺旋区,且二者均为两亲性 α -螺旋,具有穿膜作用^[11],但由于其疏水性较 N1 和 N3 低,故对宿主细胞膜的毒性作用较低,未造成宿主细胞的大量死亡,因而能有效表达. N1 片段 N 端前 26 个氨基酸是 GP41 蛋白的融合

肽,富含疏水氨基酸,功能是介导 HIV 包膜同宿主细胞膜的融合, N3 片段含有的跨膜区同样也富含疏水氨基酸,具有锚定病毒包膜和宿主细胞膜作用. 而疏水氨基酸在穿膜过程中的作用就是通过嵌入到脂双层的疏水区,对脂双层产生扰动效应,诱发形成非脂双层导致细胞膜透性增加,造成对细胞的毒性^[8],故较 N2 片段疏水性更强的 N1, N3 片段对宿主细胞的毒性作用也可能更大,最终导致 N1, N3 难以在宿主菌中有效表达.

片段 C 中存在 2 段慢病毒裂解肽 LLP1 和 LLP2,其可分别形成两亲性 α -螺旋,并富含精氨酸,而亲水性的精氨酸穿入细胞膜疏水区可能会引起细胞质膜结构及功能改变,推测片段 C 中富含的精氨酸为其产生细胞膜毒性的主要原因.

Browne 等人^[7]研究发现,轮状病毒 NSP4 蛋白的表达同样对大肠杆菌产生细胞膜毒性作用,表现为宿主菌 IPTG 后生长停滞,^{[3]H}尿嘧啶释放增加,发现靠近跨膜区的胞内部分赖氨酸含量较高. Ciccaglione 等人^[5]也发现,乙肝病毒 E1 蛋白跨膜疏水区和靠近跨膜区的精氨酸-339 和赖氨酸-370 与细胞毒性有关; Chang 等人^[6]认为删除日本脑炎病毒 NS2B 蛋白 C 端 6 个氨基酸(LKTTKR)可降低其细胞毒性作用. Cole 等人^[12]对 HIV 包膜蛋白不同区域的抗菌活性的研究结果表明来自 GP41 蛋白的跨膜区及 LLP1 中的 2 个 15 氨基酸肽均具有抗菌活性,尽管这种杀菌作用在细菌体外发生,但很可能与本研究蛋白在细菌体内的作用有共同的作用机理.

本研究用不同的实验方法发现 GP41 蛋白对细胞膜的穿膜作用致使细菌大量死亡,这可能为其难以表达的主要原因. 同时,尽管 gp41 基因不同片段的表达均对宿主细胞膜有毒性作用,但由于 N2 对宿主细胞较低的毒性作用,而使 N2 片段的表达并未造成细胞大量死亡并能有效表达,认为 GP41 蛋白的疏水性及带正电荷的精氨酸可能是其产生细胞毒性的主要因素.

致谢 本工作为高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(批准号: 2000005512).

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 Biotechnol*, 1996, 45(3): 211 ~ 216
- 2 Sanz M A, Perez L, Carrasco L, et al. Semliki Forest virus 6 kD

- protein modifies membrane permeability after inducible expression in *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem*, 1994, 269(16): 12106 ~ 12110
- 3 Ciervo A, Beneduce F, Morace G. Polypeptide 3AB of hepatitis A virus is a transmembrane protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 249(1): 266 ~ 74
- 4 Shen X, Xue J H, Yu C Y, et al. Small envelope protein E of SARS: Cloning, expression, purification, CD determination, and bioinformatics analysis. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(6): 505 ~ 511
- 5 Ciccaglione A R, Marcantonio C, Costantino A, et al. Hepatitis C virus E1 protein induces modification of membrane permeability in *E. coli* cells. *Virology*, 1998, 250(1): 1 ~ 8
- 6 Chang Y S, Liao C L, Tsao C H, et al. Membrane permeabilization by small hydrophobic nonstructural proteins of Japanese encephalitis virus. *J Virol*, 1999, 73(8): 6257 ~ 6264
- 7 Browne E P, Bellamy A R, Taylor J A. Membrane-destabilizing activity of rotavirus NSP4 is mediated by a membrane-proximal amphipathic domain. *J Gen Virol*, 2000, 81: 1955 ~ 1959
- 8 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. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1371: 265 ~ 283
- 9 陈晨, 刘坤, 王金忠, 等. 人免疫缺陷病毒跨膜蛋白 gp41 在大肠杆菌中的表达. *南开大学学报(自然科学版)*, 2001, 34(3): 54 ~ 59
- 10 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 著. 分子克隆实验指南. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002
- 11 Peisajovich S G, Shai Y. Viral fusion proteins: Multiple regions contribute to membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, 1614: 122 ~ 129
- 12 Cole A M, Liao H I, Ganz T, et al. Antibacterial activity of peptides derived from envelope glycoproteins of HIV-1. *FEBS Letters*, 535(2003): 195 ~ 199
- (2003-09-11 收稿, 2003-12-08 收修改稿)