

高效抗 HIV-1 膜融合多肽 C22 的光谱学研究

史 钧^{1,2}, 何娇娟¹, 汪世龙^{1*}, 孙晓宇¹, 陈庆榆²

1. 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092

2. 安徽科技学院, 安徽 蚌埠 233100

摘要 艾滋病已给人类社会和经济带来了巨大影响。文章以 HIV-1 膜融合糖蛋白 gp41 的 C 端序列为参照, 设计合成了 C22 多肽的基因序列, 经 PCR 放大以后, 通过 pTMHa30-51 质粒转导进 E. coli BL21 (DE3) 中进行表达, 纯化后得到了 C22 多肽, 表达产物经 SDS-PAGE 电泳分析和质谱验证。结果表明: C22 多肽具有很好热稳定性, 良好的 HIV-1 侵入细胞抑制活性和水溶性, 在实验浓度下对细胞无毒性。通过圆二色谱技术对 C22 的二级结构进行了检测, C22 溶液在 37 °C 条件下, 螺旋比例增加, 而在 80 °C 条件下, 螺旋比例则呈下降趋势。在不同 pH 值条件下, C22 峰值变化较大, 在向酸碱两性方向变化时, C22 的螺旋结构比例均相对有所减少, 无规则卷曲增加, 结构趋向松散。这也表明, 在 pH 6 条件下, C22 可以保持相对稳定的结构。该研究为此类多肽的光谱学性质研究和设计新的 HIV-1 治疗药物提供了理论基础。

关键词 HIV-1; gp41; 多肽抑制剂; 圆二色谱

中图分类号: Q503 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2008)08-1862-04

引言

人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)引起获得性免疫缺陷综合症(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS), 即艾滋病。HIV 属 RNA 逆转录病毒科, 可分为 I 型(HIV-1)和 II 型(HIV-2), 其中 HIV-1 感染率高、危害性大。感染者终生携带病毒, 在一定时间的潜伏期后发病, 全身免疫系统受到严重损害, 最终死亡。C22 是人免疫缺陷病毒 I 型(HIV-1)表面跨膜糖蛋白 gp41 的 C 端一段由 22 个氨基酸组成的多肽。gp41 的 C 端可与 N 端肽段折叠形成一个六螺旋束结构, 引发 HIV-1 包膜与宿主细胞膜的融合作用^[1]。其中 C22 肽段在 gp41 的自折叠过程中起到重要作用, 本实验室根据这一过程首次设计合成的新型 HIV-1 膜融合抑制剂 C22, 可以结合在 gp41 的 N 端以阻止 gp41 的自折叠, 从而达到抑制 HIV-1 侵入细胞的目的。C22 已在体外实验中显示了良好的 HIV-1 侵入细胞抑制活性和水溶性, 在实验浓度下对细胞无毒性(结果另文发表)。为进一步探讨 C22 的结构特点和作用机制, 本研究采用 HPLC、质谱分析和圆二色谱技术对 C22 进行了光谱学研究, 对 C22 的作用机理进行了解释, 为进一步寻找和开发相关艾滋病药

物提供理论基础。

1 材料与试剂

1.1 试剂与仪器

大肠杆菌 DH5 和 BL21 (DE3) 为本实验室保存。质粒 pTMHa30-51 由美国 Cornell 大学馈赠。限制酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; CNBr 购自 Sigma 公司; PCR 扩增体系购自 Takara 公司; PCR 产物回收纯化试剂盒购自博大泰克生物科技有限公司; 盐酸胍和尿素购自国药集团化学试剂有限公司。

引物由上海申能博彩生物科技有限公司合成, DNA 序列测定由北京奥科生物科技有限公司完成。

Sephadex G15 柱(Φ2.3 × 34 cm, 全排 40 mL); Buchi R-200 旋转蒸发仪; Labconco 冷冻干燥机; ABI2000 质谱仪; Agilent 1100 HPLC 工作站; Jasco-715 圆二色吸收光谱仪。

1.2 C22 多肽的设计与合成

以野生型 HIV-1 跨膜蛋白 gp41 的 C 端 22 个氨基酸序列为依据, 设计寡核苷酸模板和引物。在上游引物的 5' 端引入限制性核酸内切酶 Hind III 酶切位点, 同时带入编码 Met 的 ATG, 下游引物的 5' 端引入限制性酶 BamHI 酶切位点。

收稿日期: 2007-08-28, 修订日期: 2007-11-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570376)和上海市基础研究重点项目(06JC14068)资助

作者简介: 史 钧, 1970 年生, 同济大学生命科学与技术学院在读博士研究生, 副教授

*通讯联系人 e-mail: wsl@mail.tongji.edu.cn

PCR 扩增后产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。

将 PCR 产物及载体 pTMHa 经 Hind 和 BamHI 酶切后回收, T4DNA 连接酶处理, 16 ℃ 连接过夜, 将连接产物 pTMHa-C22 转化至大肠杆菌 DH5⁺ 感受态细胞中, 37 ℃ 恒温培养 12~16 h, 挑取单克隆抽提质粒, 经 Hind 和 BamHI 酶切鉴定。

将重组质粒转化至 BL21(DE3) 中大量培养, 以 IPTG 诱导目的蛋白的表达, 离心集菌。超声破菌后离心, 分别收集上清和含包涵体的沉淀, 经 SDS-PAGE 分析目的蛋白的表达部位。融合蛋白经 CNBr 裂解后透析, 反相 HPLC 分离目标蛋白。

1.3 C22 的反相 HPLC 纯化及质谱鉴定

HPLC 在 Agilent 1100 HPLC 工作站上进行。

溶液配制: Buffer A, 0.1% TFA; Buffer B, 0.08% TFA + 70% 乙腈; 泵润滑液: 10% 异丙醇, 配制后超声脱气 15 min; 分析柱为 ZORBAX 300 SB-C18 Ø9.4 mm × 250 mm。使用前清洗管路, 然后关闭阀门洗柱, 将 C18 半制备柱按正确方向连接到 HPLC 上, 以 Buffer A 和 B 分别洗柱, 直到基线走平。洗脱液梯度设定如表 1, 流速为 2 mL · min⁻¹, 将样品以 Buffer A 溶解, 每次 0.5 mL 上样检测。

Table 1 Buffer concentration grades of HPLC

Time	BufferA	BufferB
0~5 min	100%	0
5~45 min	100%~20%	0%~80%
45~47 min	20%~0%	80%~100%
47~52 min	0%~100%	100%~0%
52~59 min	100%	0%

质谱检测在 ABI2000 质谱仪上进行。

1.4 C22 圆二色性的测定

C22 圆二色性谱是用 JASCO-715 型自动记录分光偏振仪测定, 样品浓度为 1×10^{-3} g · mL⁻¹, 温度分别设置为室温(25 ℃)、体温(37 ℃)和高温(80 ℃)。pH 值分别设置为 pH 3, pH 6, pH 9, pH 12。以判断 C22 在不同酸碱条件下的构象变化。配制的溶液在测定温度下平衡后再进行测定, 扫描范围 190~240 nm, 平均残基分子量取 112, 光程为 0.1 cm, 灵敏度为 2 m^o · cm⁻¹, 圆二色谱用平均椭圆度[θ]表示, 单位为 (deg · cm² · dmol⁻¹)。

2 结果

2.1 C22 的制备与纯化

PCR 扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 在约 87 bp 处出现特异性扩增条带, 片段大小与预期理论推算相符(见图 1)。

重组质粒 pTMHa-C22 经 Hind 和 BamHI 酶切后, 得到 5769 和 69 bp 两个片段, 琼脂糖凝胶电泳显示, 酶切片段大小与预期值相符(见图 2)。并经序列分析进一步确认阳性克隆。将正确的克隆转化大肠杆菌 BL21(DE3) 后, 以 IPTG

诱导表达, 经 SDS-PAGE 分析表明, 所表达的目的蛋白主要位于包涵体内, 在相对分子质量约 16 306 处可见一特异性条带(见图 3)。表达产物由 Ni²⁺-NTA 纯化后经 SDS-PAGE 电



Fig. 1 Gel electrophoresis of C22 gene PCR products

1: DNA marker; 2: Control; 3: PCR product

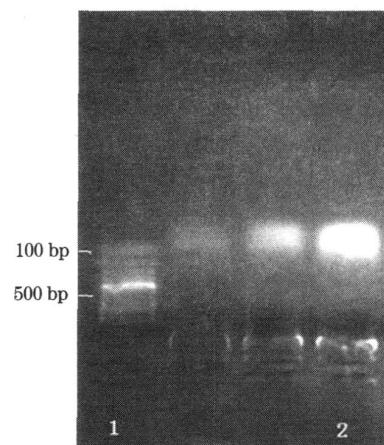


Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pTMHa-C22

1: DNA marker; 2: pTMHa-C22

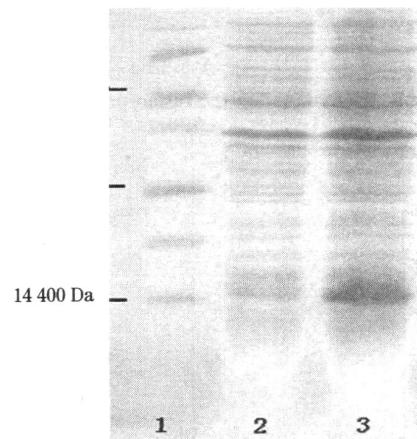


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression

1: Low molecular weight protein marker;
2: Negative control; 3: After induction

泳, 结果仅在约 16 306 Da 处见单一条带(见图 4), 为融合蛋白(见图 7)。蛋白(见图 7)。融合蛋白经 CNBr 裂解纯化, 即得目的多肽 C22。

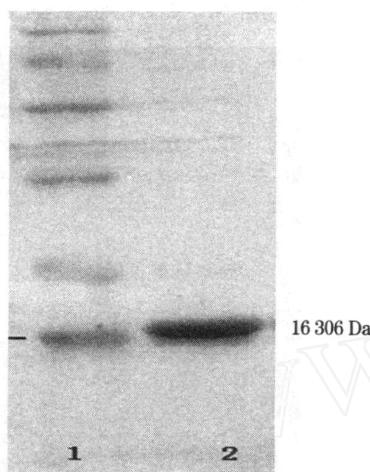


Fig. 4 Purification of fusion protein

1: Marker, 2: Fusion protein after induction

2.2 C22 的 HPLC 纯化及质谱鉴定

融合蛋白质谱结果测得实际分子量为 16 306 Da(见图 5), 与理论分子量 16 306.72 Da 基本一致。

经 CNBr 裂解纯化后的目标多肽经质谱测出的实际分子量为 2 927 Da(见图 6), 与理论值 2 927.36 Da 相符。经 Ni^{2+} -NTA 亲和柱纯化后冷冻抽干, 最后用反相 HPLC 分离目标

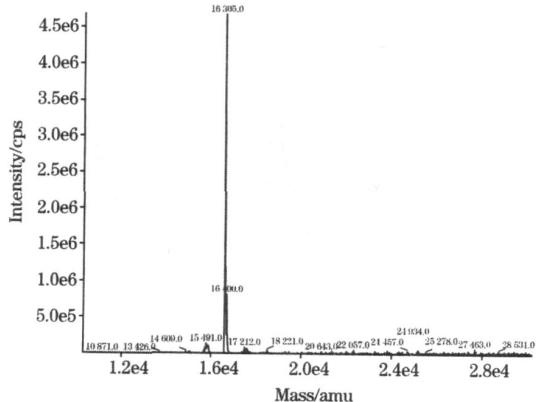


Fig. 5 Determination of the fusion protein with MS

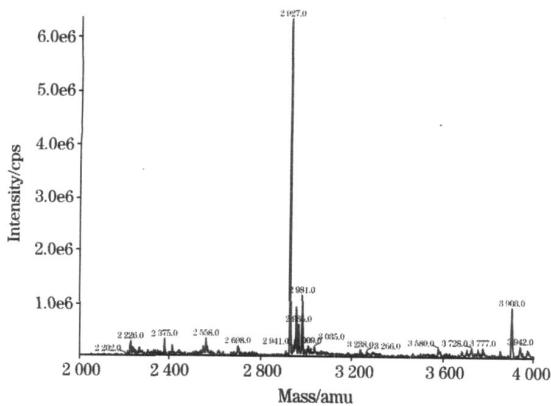


Fig. 6 Determination of the C22 peptide with MS

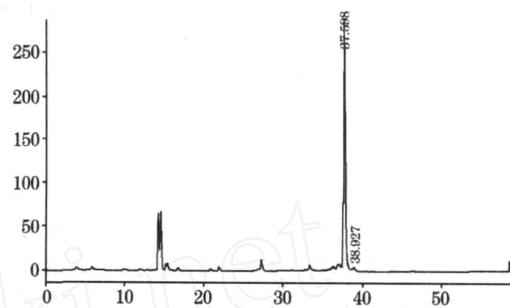


Fig. 7 Purification for C22 peptide by HPLC

2.3 C22 的圆二色性

C22 在 25 及 pH 6 的自然条件下, 圆二色谱显示 195 nm 有一强正峰, 在 204 和 218 nm 分别有两负峰(见图 8), 这是一个典型的螺旋 CD 图谱, 可见 C22 分子中存在螺旋结构, 但以无规卷曲为主。

样品分别在 25, 37 和 80 下处理 10 min, 不同温度下 C22 的 CD 谱见图 9, 各温度下峰值有所变化, 在 37 条件下, 螺旋比例增加, 而在 80 条件下, 融合蛋白螺旋比例则呈下降趋势。但各温度下峰形基本不变, 表明各构象单元组成变化不大, 也说明 C22 具有相当好的热稳定性。

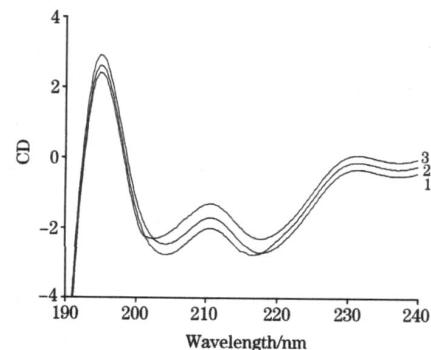


Fig. 8 Far-UV CD spectrum of C22 on different temperature

1: 25 °C; 2: 31 °C; 3: 80 °C

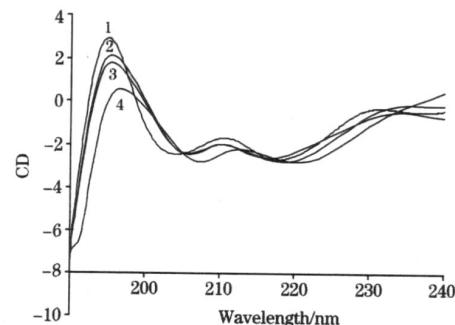


Fig. 9 Far-UV CD spectrum of C22 on different pH

1: 25 °C; 2: 31 °C; 3: 80 °C

在不同 pH 值条件下, C22 峰值变化较大, pH 3, pH 9 和 pH 12 条件下的各峰值均较 pH 6 时有所改变, 其中以 pH 12 条件下变化最为明显, 在向酸碱两性方向变化时, C22 的

螺旋结构比例均相对有所减少，无规则卷曲增加，结构趋向松散，这也表明，在 pH 6 条件下，C22 可以保持相对稳定的结构。

3 讨 论

gp41 介导的 HIV 与细胞的膜融合过程是重要的抑制剂设计位点，而且 gp41 的序列保守性比 gp120 强，引起病毒耐药性变异的机会较小。Enfuvirtide (T-20) 是第一个阻断 HIV-1 侵入靶细胞的抗膜融合类新型抑制剂^[2]，能够有效地抑制 HIV-1 病毒入侵。T-1249 是在 T-20 的基础上发展的抗膜融合多肽抑制剂^[3]，其绑定区域与 T-20 绑定区域有部分重合。

本研究所设计的 C22 正是在 T20 和 T-1249 的序列基础上进行改进而来，综合了 T-1249 和 T-20 作用位点，并具有肽

段较短，能够更加深入与 N 端多肽疏水槽相结合的特点，可以有效阻止病毒侵入细胞。

自 1969 年 Greenfield 最早用 CD 光谱数据检测蛋白质和多肽的构象以来^[4]，远紫外圆二色已成为分析蛋白质和多肽二级结构的重要方法，对于分析多肽的疏水基团^[5]以及不同方式得到的多肽的二级结构的差异分析^[6]都有重要意义。

本文通过圆二色谱分析发现，C22 尽管肽链很短，但仍形成了部分螺旋结构，且该结构在高温下比例变化不大，显示了较好的热稳定性。在酸碱极性条件下，C22 分子结构趋向松散，表明在中性条件范围内，C22 可以有效保持其分子结构紧密的活性状态，更易于和 gp41 的 N 端结合，从而起到良好的抑制 HIV-1 侵入细胞的作用。

本研究初步探讨了 C22 对 HIV-1 抑制作用的分子机理，为进一步探讨以 gp41 为靶位点设计 HIV-1 膜融合多肽抑制剂提供了理论和实验依据。

参 考 文 献

- [1] Mercedes Armand-Ugón, Arantxa Gutiérrez, Bonaventura Clotet, et al. Antiviral Research, 2003, 59: 137.
- [2] Jason LaBonte, John Lebbos, Peter Kirkpatrick. Nature Reviews Drug Discovery, 2003, 2(5): 345.
- [3] Joseph J Eron, Roy M Gulick, John A Bartlett, et al. The Journal of Infectious Diseases 2004; 189: 1075.
- [4] Greenfield N, Fasman G D. Biochemistry, 1969, 8: 4108.
- [5] WEI Xiao-fang, DING Xi-ming, LIU Hui-zhou(魏晓芳, 丁西明, 刘会洲). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2000, 20(4): 556.
- [6] LIU Zhi-gang, ZHU Jian-qi, HUANG Hai-zhen, et al(刘志刚, 朱健琦, 黄海珍, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(5): 879.

Studies on the Spectral Characteristics of Efficient HIV-1 Fusion Inhibitor C22

SHI Jun^{1,2}, HE Jiao-juan¹, WANG Shi-long^{1*}, SUN Xiao-yu¹, CHEN Qing-yu²

1. School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China

2. Anhui Science and Technical University, Bengbu 233100, China

Abstract Acquired immune deficiency syndrome (AIDS) is increasing its negative influences on human society and economy. In the present paper, HIV-1 cell fusion peptide inhibitor C22 was expressed and purified based on the C-terminal sequence of HIV-1 membrane fusion glycoprotein gp41. The gene coding for C22 was totally synthesized using gp41 gene as a template and amplified by PCR. The cloned C22 gene was confirmed by restriction endonuclease and sequence analysis and then cloned into plasmid pTMHa30-51. The prepared plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and the expressing products were analyzed on SDS-PAGE and tested with mass spectrum. The results indicated that C22 showed high HIV-1 fusion inhibiting capacity, meanwhile, with good thermal stability and water-solubility, and showed no cell toxicity in tested concentrations. The spectral characteristics were tested with circular dichroism (CD). When treated at different temperature in solution condition, the content of helix of C22 increased at 37 °C while decreased sharply at 80 °C. The peak value changed significantly with different pH values. The content of helix of C22 decreased as pH varied toward acid and alkali and the random coiling increased, which led to a relaxed structure. This result indicated that the C22 structure is stable with pH 6. This research may provide a theoretic foundation for the new type HIV-1 peptide inhibitor designing and spectral characteristics study.

Keywords HIV-1; Gp41; Peptide inhibitor; Circular dichroism

* Corresponding author

(Received Aug. 28, 2007; accepted Nov. 28, 2007)