

HIV Gag CAP2NC 噬菌体 蛋白酶切割模型的构建*

贾建安^{1)**} 周波^{2)**} 蒋少华¹⁾ 陈秋莉¹⁾ 赵平¹⁾
潘欣¹⁾ 温宗梅²⁾ 邓松华²⁾ 卢洪洲³⁾ 潘卫^{1)***}

(¹⁾第二军医大学微生物教研室, 上海 200433; ²⁾安徽医科大学病理学教研室, 合肥 230032;
³⁾上海市公共卫生中心, 上海 201508)

摘要 HIV 蛋白酶 (protease, PR) 耐药突变的大量出现严重地影响了 AIDS 的治疗. 应用突变 PR 对展示 HIV PR 靶序列随机文库的噬菌体进行切割筛选, 可获得突变 PR 的敏感噬菌体, 该噬菌体可用于针对 HIV PR 耐药突变株的蛋白酶抑制剂 (protease inhibitor, PI) 新药筛选. 为了探索这一可能性, 将包含 HIV PR 靶位点 P2/NC 序列的 Gag 蛋白 CAP2NC 片段展示于噬菌体表面, 并在该片段的 N 端连接一可与人免疫球蛋白分子特异结合的固相化标签序列 LD3, 将该噬菌体固定于人免疫球蛋白包被的酶标板上, 用 HIV SF2 PR 进行切割, 用抗 M13 噬菌体酶标抗体 ELISA 法检测未被切割的剩余噬菌体以反映切割效果. 结果表明, 所构建的噬菌体能被 HIV PR 有效切割, 最大切割效应可达 80% 以上, 其 ELISA 检测值明显下降, 并且该切割效应与 HIV PR 呈明显的量效关系, 能被 PI 类药物 Indinavir (IDV) 特异抑制. 首次成功构建了展示 HIV Gag CAP2NC 片段的噬菌体蛋白酶切割模型, 不仅可为研究 HIV PR 的耐药性变异及其靶序列的适应性变异提供一新的研究平台, 同时也为构建一种全新的 PI 类药物, 尤其是针对耐药的 PI 类药物大规模体外噬菌体筛选模型打下基础.

关键词 人类免疫缺陷病毒, 蛋白酶, 蛋白酶抑制剂, 药物筛选, 噬菌体展示
学科分类号 Q78

HIV 蛋白酶 (HIV PR) 通过切割 HIV Gag 与 Gag-Pol 融合蛋白促进病毒颗粒的成熟, 缺少活性蛋白酶的原病毒 DNA 只能产生无感染性的幼稚型病毒颗粒^[1]. HIV PR 通常作用于 Gag 与 Gag-Pol 中保守的氨基酸序列: Ser-Thr-Xa-Ya-Phe/Pro-Za. 其他的切点位于 Phe 与 Tyr 之间, 也可位于 Met-Met, Phe-Leu, Leu-Ala, Leu-Phe 之间. 作为目前临床治疗 AIDS 的高效抗逆转录病毒疗法 (highly active anti-retroviral therapy, HAART) 的 2 种主力药物之一, 现有的抗 HIV 蛋白酶抑制剂类药物是根据 PR 结构设计的 PR 靶位点 P1-P1' 位相似物, 通过竞争结合 PR 的底物结合部位, 使 PR 无法有效发挥切割作用, 从而达到抑制病毒复制的目的^[2,3]. 然而, 近年来, 对逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的耐药 HIV 变异株的出现, 较大地影响了 HAART 的治疗效果^[4]. 研究表明: HIV PR 的 99 个氨基酸中已发现有 21 个位点可产生与耐药相关的突变, 这些突变可引起 HIV PR 对目前临床应用

的 6 种 PI 药物发生耐受^[4,5]. 因此, 开发新的针对耐药 HIV 的蛋白酶抑制剂 (PI) 类药物已成为抗 HIV 新药开发的重要方向. 然而, 现有的 HIV 体外药物筛选方法主要是竞争法^[6]和底物法^[7,8], 二者均不能直接用于针对耐药突变株的筛选, 因此, 建立新的针对耐药 HIV 的新药筛选模型是抗耐药突变 HIV 新药开发的重要工作之一.

利用噬菌体展示技术, 将外源多肽随机突变体展示于噬菌体构建噬菌体展示文库, 并用特定筛选方法可以获得具有特定性状的突变体, 这一研究手段已广泛应用于各方面的研究. 本研究组已展开 HIV PI 类药物新型噬菌体筛选模型的研究工作, 目前, 已构建展示 HIV PR 靶位点序列随机突变的噬菌体

*国家自然科学基金(30472050), 上海市科技攻关计划(05dz19317)资助项目.

** 共同第一作者. *** 通讯联系人.

Tel: 021-25074371, E-mail: pwpanwei@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-09-18, 接受日期: 2006-11-02

文库^[9], 应用不同 HIV PR 以及耐药突变的 PR 对其进行切割筛选, 理论上可以获得对不同 PR 高敏感性的噬菌体. 如果这些噬菌体能固定于酶标板上, 并能被 HIV PR 有效切割, 并且这种切割效应能很方便地被检测出来, 那么这样的噬菌体切割模型具备了用于 HIV PI 类药物大规模体外筛选的条件.

然而, 展示于噬菌体表面的 HIV PR 靶位点序列能否被 HIV PR 切割? 这一切割效果能否被常规方法(如 ELISA)有效地方便地检测出来? 这些是首先要回答的问题, 也是研发 HIV PI 类药物噬菌体筛选模型的核心问题. 本研究, 将 HIV-1 HXB2 株 CAP2NC DNA 克隆于噬菌体展示载体的人免疫球蛋白结合序列 LD3 的 C 端构建融合蛋白, 构建含有固相化标记的展示 HIV-1 Gag 蛋白 P2/NC 蛋白酶靶位点序列的噬菌体 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC, 用 HIV SF2 PR 对固相化的噬菌体进行切割分析, 用抗 M13 噬菌体酶标抗体 ELISA 法检测 HIV SF2 PR 的切割效果, 以证实构建展示 HIV CAP2NC 片段的噬菌体蛋白酶切割模型的可行性.

1 材料和方法

1.1 质粒、菌种

噬菌粒 pCANTAB5S-LD3 是在噬菌体 PⅢ蛋白的 N 端, 展示 IgG 高活性结合分子 LD3 的重组噬菌体载体, 该载体所带的 IgG 结合分子 LD3 可作为固相化标记^[10~13], 将噬菌体固定于包被人 IgG 的酶标板上. pMD18-T-CAP2、pMD18-T-NC 是以 pMP18-T 为载体的重组质粒, 其目的基因分别编码 HIV-1 型 M 组 B 亚型的代表株 HXB2 株衣壳蛋白(CA)与 P2 蛋白的融合蛋白(CAP2; GenBank NO: AF 033819; CAP2 氨基酸序列为 Gag 蛋白上第 133 位到 430 位氨基酸), 及核衣壳蛋白(NC; GenBank NO: AF 033819; NC 氨基酸序列为 Gag 蛋白上第 431 位到 488 位氨基酸). 上述质粒为本室构建. HIV CAP2NC 片段中存在 2 个 PR 靶位点

CA/P2 和 P2/NC, 本研究, 选择 P2/NC 序列作为 PR 切割对象, 为了避免 CA/P2 位点的影响, 我们对 CA/P2 位点进行了突变, 将第 231 位 L 突变为 G, 232 位 A 突变为 G, 突变后的 CA/P2 位点将不会被 HIV PR 特异性切割. 原核表达载体 pQE30 及其宿主菌 *E.coli* M15 购自德国 QIAGEN 公司. 辅助噬菌体 M13K07, 大肠杆菌 *E.coli* TG1、TOP10F⁺, 为本教研室保存.

1.2 试剂

HIV SF2 PR 为 HIV-1 型 B 亚型 SF2 株 PR, 由美国 Scripps 研究所 Elder 教授惠赠^[14]. HIV PI 类药物 Indinavir(Crixivan)由 Merck 公司生产, 由上海公共卫生中心卢洪洲教授惠赠. LD3 纯化蛋白为 pET32a(+)/BL21 系统(购自 Novagen 公司)表达, 由本室自制. DNA Taq 酶、PCR 溶液 DNA 回收试剂盒, 购自上海申能博彩科技公司, T4 DNA 连接酶 (Ligation High kit)购自 TOYOBO 公司, 限制性内切酶 *Stu* I、*Sal* I、*Bam*H I 均为 TaKaRa 公司产品, 辣根过氧化物酶标记鼠抗 M13 噬菌体单克隆抗体 (anti-M13-HRP monoclonal conjugate) 购自 Amersham Pharmacia 公司. 质粒 DNA 提取试剂盒, DNA 凝胶回收试剂盒购自杭州维特洁公司. 金属螯合亲和层析介质(Ni-NTA)购自德国 QIAGEN 公司.

1.3 引物

对 HIV-1 CAP2 和 NC DNA 片段进行 PCR 扩增的引物见表 1. 用于扩增 CAP2 片段的上游引物 C1Bu-stu 引入 *Stu* I、*Xba* I 酶切位点. 用于扩增 NC 片段的下游引物 C1Ld-6 引入 *Sal* I 酶切位点, 上游引物 C1Lu-1a 引入 CAP2 片段 3'端重叠区域; 用于测序的下游引物 pCANTAB5-S6 为 5' GTA AAT GAA TTT TCT GTA TGA GG 3'; 用于分别扩增 CAP2NC DNA 和带有人免疫球蛋白结合序列 LD3 的 LD3-CAP2NC DNA, 构建表达载体的上游引物 C1bu-bam、LCu-bam 均引入 *Bam*H I 酶切位点. 上述引物委托 Invitrogen 公司合成.

Table 1 Primers for amplification of DNA fragments encoding HIV CAP2NC and LD3

Name	Description	Sequence(5'~3')
C1Bu-stu	Sense of cap2	5' gg <i>AGG CCT</i> TCT AGA CCG ATC GTT CAG AA 3'
C1Bd-12	Antisense of cap2	5' GTT ACC ACG CTG CAT CAT GAT GGT AGC AGA GTT GGT AAC CTG AGA CAT AG 3'
C1Lu-1a	Sense of nc	5' ATC ATG ATG CAG CGT GGT AAC TTC CGT AAC CAG CGT AAA ATC GTT AAA TGC TTC AAC T 3'
C1Ld-6	Antisense of nc	5' gggg <i>GTC GAC</i> GTT AGC CTG ACG TTC GGT GCA GTC 3'
C1bu-bam	Sense of cap2	5' gggg <i>GGA TCC</i> TCT AGA CCG ATC GTT CAG AA 3'
LCu-bam	Sense of ld3	5' gggg <i>GGA TCC</i> CCG GCC TCT AGA Gag 3'

Restriction enzyme sites were italic.

1.4 HIV CAP2NC DNA 的 PCR 合成

以 pMD18-T-CAP2 质粒为模板, 以 C1Bu-stu 和 C1Bd-12 为引物扩增 CAP2 片段; 以 pMD18-T-NC 质粒为模板, 以 C1Lu-1a 和 C1Ld-6 为引物扩增 NC 片段, Taq 酶 1 U, 50 μ l 反应体积, 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 40 s; 56 $^{\circ}$ C 40 s; 72 $^{\circ}$ C 60 s; 30 个循环. PCR 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析.

取 CAP2 与 NC 扩增产物各 1 μ l 混合, 以 C1Bu-stu 和 C1Ld-6 为引物扩增 CAP2NC 片段, Taq 酶 1 U, 50 μ l 反应体积, 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 40 s; 55 $^{\circ}$ C 40 s; 72 $^{\circ}$ C 80 s; 30 个循环. PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析、试剂盒溶液回收.

1.5 展示 HIV CAP2NC DNA 的噬菌粒构建

将 CAP2 与 NC 重叠 PCR 溶液回收产物 *Stu* I 和 *Sal* I 双酶切过夜, 试剂盒回收. 将 HIV CAP2NC DNA 的 *Stu* I 和 *Sal* I 酶切回收产物, 与限制酶 *Stu* I 和 *Sal* I 消化后的 pCANTAB5S-LD3 载体连接并转化 *E.coli* Top10F⁺. 提取单克隆质粒, 限制酶酶切筛选重组克隆, 选择鉴定正确的 3 个单克隆进行序列测定, 测序正确的噬菌粒命名为 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC.

1.6 HIV CAP2NC 蛋白和 LD3-CAP2NC 融合蛋白表达载体的构建

以 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC 噬菌粒为模板, 以 C1bu-bam 和 C1Ld-6 为引物扩增 CAP2NC DNA 片段. Taq 酶 1 U, 50 μ l 反应体积, 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 40 s; 55 $^{\circ}$ C 40 s; 72 $^{\circ}$ C 90 s; 30 个循环. 试剂盒回收 PCR 产物用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切过夜, 与 *Bam*H I 和 *Sal* I 消化后的原核表达载体 pQE30 连接并转化 *E.coli* Top10F⁺. 限制酶酶切筛选重组克隆, 选择鉴定正确的 3 个单克隆进行序列测定, 测序正确的质粒命名为 pQE30-CAP2NC.

为鉴定 LD3 分子对 PR 切割 CAP2NC 蛋白的影响, 我们构建了 LD3-CAP2NC 融合蛋白的有表达载体. 以 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC 噬菌粒为模板, 以 LCu-bam, C1Ld-6 为引物扩增 LD3-CAP2NC DNA 片段, Taq 酶 1 U, 50 μ l 反应体积, 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 40 s; 55 $^{\circ}$ C 40 s; 72 $^{\circ}$ C 120 s; 30 个循环. PCR 产物用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切过夜, 试剂盒回收后与限制酶 *Bam*H I 与 *Sal* I 消化后的原核表达载体 pQE30 连接并转化 *E.coli* Top10F⁺. 提取单克隆质粒, 限制酶酶切筛选重组克隆, 选择鉴定正确的 3 个单克隆进行序列测定, 测序正确的质粒命名为 pQE30-LD3-CAP2NC.

1.7 HIV CAP2NC 蛋白和 LD3-CAP2NC 融合蛋白的表达与纯化

将 pQE30-CAP2NC 和 pQE30-LD3-CAP2NC 质粒分别转化 *E.coli* M15 中进行 IPTG 诱导表达. 取诱导后菌液 1 ml, 离心收集菌体, 加 20 μ l 2 倍 SDS 加样缓冲液, 振荡混匀后 100 $^{\circ}$ C 加热 7 min, 用 10% SDS-PAGE 鉴定表达结果. 挑选表达量较高的菌种进行目的蛋白的大量诱导表达和纯化: 将 pQE30-CAP2NC/ M15、pQE30-LD3-CAP2NC/ M15 的过夜培养物 50 ml 接种于 500 ml LB 培养基, 剧烈振摇 4 h, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 诱导 3.5 h, 离心收集细菌沉淀, 8 mol/L pH 8.0 尿素裂解过夜, 离心收集上清用于纯化, 纯化按 Qiagen 公司 Ni-NTA 使用说明书进行. 经 SDS-PAGE 确定纯化效果. Brade-ford 法 595 nm 下测定目的蛋白浓度^[15].

1.8 HIV CAP2NC 蛋白和 LD3-CAP2NC 融合蛋白的体外切割分析

将纯化后的 CAP2NC、LD3-CAP2NC 蛋白用 PBS 调至 5 g/L. 分别取 CAP2NC、LD3-CAP2NC 蛋白各 25 μ g 于 MES 缓冲液^[14] (0.2 mol/L NaCl, 0.1 mol/L MES, pH 6.7) 中, 加入不同浓度的 HIV SF2 PR (2 μ g, 0.2 μ g, 0.02 μ g, 0.002 μ g), 混匀后于 37 $^{\circ}$ C 孵育 16 h, 反应完成后, 每一反应体系加入 20 μ l 2 倍 SDS 加样缓冲液, 振荡混匀后 100 $^{\circ}$ C 加热 7 min, 用 10% 的 SDS-PAGE 鉴定切割效果.

1.9 展示 HIV CAP2NC 蛋白的重组噬菌体的制备

取 1 μ g pCANTAB5S-LD3-CAP2NC 和 1 μ g pCANTAB5S-LD3 重组噬菌粒转化 *E.coli* TG1, 活化培养 1 h 后加入 1 ml 4 $\times$ 10¹⁰ TU/ml 的 M13KO7 辅助噬菌体拯救, 37 $^{\circ}$ C, 250 r/min 振荡培养 1 h, 1 000 g 离心 10 min, 细菌沉淀用 10 ml 2 $\times$ YT (含氨苄青霉素 100 mg/L 和卡那霉素 50 μ g/L) 悬浮, 37 $^{\circ}$ C, 250 r/min 振荡培养过夜. 培养液上清加入 2 ml PEG/NaCl, 沉淀后悬浮于 10 ml 2 $\times$ YT 培养液中, 经 0.22 μ m 滤膜过滤, 分别获得 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC 和 pCANTAB5S-LD3 重组噬菌体. 取 1 μ l 重组噬菌体 10 倍系列稀释, 感染对数生长期的 *E.coli* TG1, 37 $^{\circ}$ C 培养 1 h 后涂 SOB (含氨苄青霉素 100 mg/L) 平板, 置 37 $^{\circ}$ C 培养过夜. 计数不同稀释度平皿上的菌落数, 生长菌落数的稀释倍数乘以 100 即为每毫升噬菌体的转化单位数 (transformation unit, TU).

1.10 展示 HIV CAP2NC 蛋白的重组噬菌体体外蛋白酶切割模型的构建

用 2×YT 培养液将 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC 和 pCANTAB5S-LD3 重组噬菌体均调整至 1.0×10^{12} TU/ml 后, 分别取噬菌体 100 μ l, 加入包被有人 IgG 抗体的反应孔中, 37℃ 孵育 3 h 后洗涤 10 次. 每孔加入不同稀释度的 HIV SF2 PR 至终浓度分别为 10 mg/L, 5 mg/L, 2.5 mg/L, 1.25 mg/L. 37℃ 孵育 4 h 后洗涤 10 次. 加入抗 M13 噬菌体酶标抗体, 37℃ 孵育 45 min 后加入 TMB 显色, 测 A_{450} 值, 每种 PR 浓度各作 3 复孔, 取平均值计算切割率. 切割率 = (未加 PR A_{450} 均数 - (加入 PR 后 A_{450} 均数 - 对照 A_{450} 均数)) / (未加 PR A_{450} 均数 - 对照 A_{450} 均数).

1.11 Indinavir 对 HIV SF2 PR 切割展示 HIV CAP2NC 蛋白的重组噬菌体的作用

为验证上述实验中噬菌体数量减少是否为 HIV SF2 PR 的特异性作用, 我们利用 PI 类药物 Indinavir 对上述切割进行了鉴定. 将 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC 和 pCANTAB5S-LD3 重组噬菌体用 2×YT 培养液均调整至 1.0×10^{12} TU/ml 后, 分别取噬菌体 100 μ l, 加入包被有人 IgG 抗体的反应孔中, 37℃ 孵育 3 h 后洗涤 10 次. 每孔加入不同稀释度的 HIV SF2 PR 至终浓度分别为 10 mg/L, 0 mg/L, 分成 2 组, 一组中加入 Indinavir 至 3 mg/L, 另一组不加 Indinavir, 37℃ 孵育 3 h 后洗涤 10 次. 每孔加入不同稀释度的 HIV SF2 PR, 37℃ 孵育 4 h 后洗涤 10 次. 加入抗 M13 噬菌体酶标抗体, 37℃ 孵育 45 min 后加入 TMB 显色, 测 A_{450} 值同, 每种 PR 浓度各作 3 复孔, 取平均值计算切割率.

2 结 果

2.1 HIV CAP2NC DNA 的 PCR 合成

以 pMD18-T-CAP2 质粒为模板, 用 C1Bu-stu 和 C1Bd-12 为引物扩增出长度为 761 bp 的 CAP2 DNA 片段; 以 pMD18-T-NC 质粒为模板, 用 C1Lu-1a 和 C1Ld-6 为引物扩增出长度为 197 bp 的 NC DNA 片段, 2 个扩增产物大小与理论值一致 (图 1). 将 CAP2 与 NC 扩增产物混合, 用 C1Bu-stu 和 C1Ld-6 为引物扩增出长度为 900 bp 的 CAP2NC 片段, 大小与理论值一致 (图 1).

2.2 展示 HIV LD3-CAP2NC DNA 的噬菌粒构建及序列测定

将 HIV CAP2NC DNA 的 *Stu* I 和 *Sal* I 酶切产

物定向克隆至 pCANTAB5S-LD3 载体 *Stu* I 和 *Sal* I 位点. 提取单克隆质粒, 双酶切鉴定, 在 900 bp 有一与理论值相符的条带 (图 1-8,9). 挑取 3 个酶切鉴定正确的克隆用 pCANTAB5-S6 引物进行测序, 测序结果用 DNASTAR 软件与 HIV-1 HXB2 株序列进行同源性比较, 结果表明, 大小为 900 bp 的 CAP2NC DNA 序列所编码氨基酸序列中, 除第 231, 232 位分别突变为 G, G 外, 其余与 HIV-1 HXB2 株氨基酸序列完全一致 (图 2), 重组噬菌粒命名为 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC. HIV CAP2NC 片段中存在 2 个 PR 靶位点 CA/P2 和 P2/NC, 本研究选择 P2/NC 序列作为 PR 切割对象, 为了避免 CA/P2 位点的影响, 我们对 CA/P2 位点进行了改造, 将第 231 位 L 突变为 G, 232 位 A 突变为 G, 突变后的 CA/P2 位点将不会被 HIV PR 特异性切割.

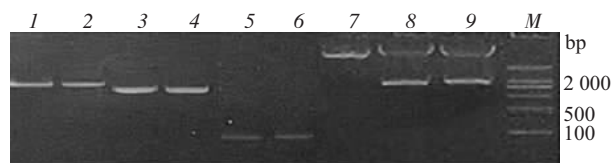


Fig. 1 PCR amplification of HIV CAP2NC DNA, CAP2 DNA and NC DNA

M: DL 2000 marker; 1, 2: PCR products of CAP2NC DNA; 3, 4: PCR products of CAP2 DNA; 5, 6: PCR products of NC DNA; 7: pCANTAB5S-LD3-CAP2NC phagemid; 8, 9: pCANTAB5S-LD3-CAP2NC phagemid digested with *Stu* I and *Sal* I.

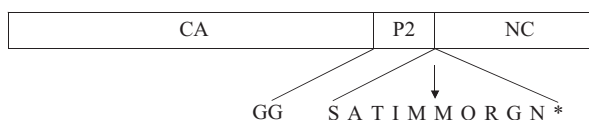


Fig. 2 Schematic representation of the HIV-1 CAP2NC DNA synthesized by overlapping PCR

GG: This two amino acid are mutated from leucine and alanine for requirement. * SATIMMQRG N: Target amino acid sequence of HIV PR. The cleavage site locates between M and Q.

2.3 HIV CAP2NC 蛋白和 LD3-CAP2NC 融合蛋白表达载体的构建

为了鉴定 HIV PR 是否能在体外切割 CAP2NC 和 LD3-CAP2NC 蛋白, 我们构建了这 2 种蛋白质的原核表达载体. PCR 扩增 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC 噬菌粒上的 CAP2NC DNA, 并在上游引入 *Bam* H I, 定向克隆至原核表达载体 pQE30 的 *Bam* H I 和 *Sal* I 位点, 经 *Bam* H I 和 *Sal* I 双酶切

鉴定, 结果在 900 bp 有一与理论值相符的条带(图片未显示). 挑取 3 个酶切鉴定正确的克隆用 C1Bu-stu 引物进行测序, 测序结果与 HIV-1 HXB2 株序列用 DNASTAR 软件进行同源性比较, 结果表明, 大小为 900 bp 的 CAP2NC DNA 序列所编码氨基酸序列中, 除第 231, 232 位分别突变为 G, G 外, 其余序列与 HIV-1 HXB2 株氨基酸序列完全一致, 重组质粒命名为 pQE30-CAP2NC.

PCR 扩增 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC 噬菌粒上的 LD3-CAP2NC 融合蛋白 DNA, 并引入 *Bam* H I, 定向克隆至原核表达载体 pQE30, 经 *Bam* H I 与 *Sal* I 双酶切鉴定, 结果在 1 557 bp 有一与理论值相符的条带(图片未显示). 测序表明成功构建了带有 LD3 标记的 CAP2NC 蛋白的表达载体 pQE30-LD3-CAP2NC.

2.4 HIV CAP2NC 蛋白和 LD3-CAP2NC 融合蛋白的表达与纯化

将 pQE30-CAP2NC 和 pQE30-LD3-CAP2NC 质粒分别转化 *E.coli* M15 后, 挑取单克隆转化菌进行 IPTG 诱导表达, 10% SDS-PAGE 鉴定表明: 在 pQE30-CAP2NC/M15 诱导表达的条带中出现一条相对分子质量约为 36 000 的条带, 与 HIV CAP2NC 的理论值相符; 在 pQE30-LD3-CAP2NC/M15 诱导表达的条带中出现一条分子质量约为 60 ku 的条带, 与 LD3-CAP2NC 融合蛋白的理论值相符. 灰度扫描分析表明: 目的蛋白 CAP2NC、LD3-CAP2NC 占总蛋白量的 10% 以上(图 3). 用 Ni-NTA 亲和介质纯化目的蛋白, 经 10% SDS-PAGE 鉴定, 纯化后显示分子质量分别为 36 ku 与 60 ku 的单一条带(图 3), 经 Smartview 软

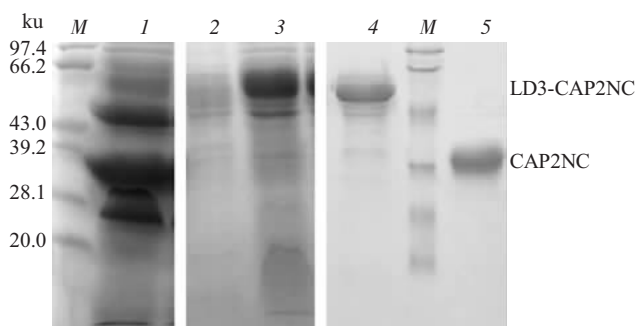


Fig. 3 SDS-PAGE analyse of HIV CAP2NC and LD3-CAP2NC protein expressed in *E.coli*

M: Protein marker; 1: Total protein of pQE30-CAP2NC/M15 induced cells; 2: Total protein of pQE30/M15 induced cells; 3: Total protein of pQE30-LD3-CAP2NC/M15 induced cells; 4: Purified LD3-CAP2NC protein; 5: Purified CAP2NC protein.

件密度扫描分析纯化后的 CAP2NC 条带、LD3-CAP2NC 条带, 分别占纯化后总蛋白的 90%、80%. 用 Brade-ford 工作液在 595 nm 下测纯化后蛋白质浓度, CAP2NC 蛋白, LD3-CAP2NC 融合蛋白的浓度分别达 5.33 g/L、3.25 g/L.

2.5 HIV CAP2NC 蛋白和 LD3-CAP2NC 融合蛋白的体外切割分析

为了了解所用的 PR 对靶序列是否具有较好的切割作用, 我们在体外对靶序列及其 LD3 融合蛋白进行了切割分析. 分别取 CAP2NC、LD3-CAP2NC 蛋白, 加入不同浓度的 HIV SF2 PR 进行反应. SDS-PAGE 显示, 2 μ g、0.2 μ g、0.02 μ g 蛋白酶可以将 CAP2NC 蛋白切割成 2 条肽段, 大小与 CAP2 和 NC 蛋白的分子质量一致(图 4), 表明 HIV SF2 PR 可以很好地切割 CAP2NC 蛋白; 相同条件下, 仅 2 μ g 蛋白酶可以将 LD3-CAP2NC 蛋白切割成 2 条肽段, 大小与 LD3-CAP2 和 NC 蛋白的分子质量一致(图 4), 表明, 融合了 LD3 分子后, CAP2NC 蛋白对 PR 切割的敏感性降低, 但仍可被 HIV SF2 PR 特异性切割. 单独的 LD3 蛋白未见任何切割作用(图 4).

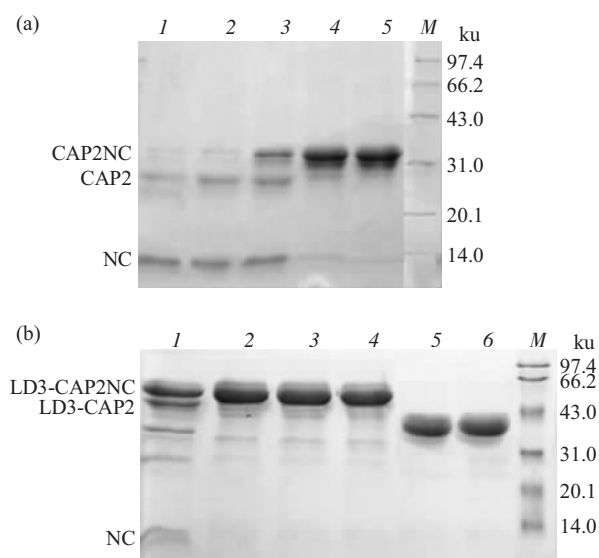


Fig. 4 Cleavage analyses of HIV CAP2NC (a) and LD3-CAP2NC (b) with different dose of HIV SF2 PR

(a) M: Protein marker; 1: PR 2 μ g+CAP2NC 25 μ g; 2: PR 0.2 μ g+CAP2NC 25 μ g; 3: PR 0.02 μ g+CAP2NC 25 μ g; 4: PR 0.002 μ g +CAP2NC 25 μ g; 5: CAP2NC 25 μ g. (b) M: Protein marker; 1: PR 2 μ g + LD3-CAP2NC 25 μ g; 2: PR 0.2 μ g + LD3-CAP2NC 25 μ g; 3: PR 0.02 μ g +LD3-CAP2NC 25 μ g; 4: LD3- CAP2NC 25 μ g; 5: PR 2 μ g + LD3; 6: LD3*. *The molecular mass of fused LD₃ protein achieves to 36 ku, as fused with Trx Tag, S Tag, His Tag and as so, after expressed and purified from pET32a(+)/BL21 expression system.

2.6 展示 HIV CAP2NC 蛋白的重组噬菌体体外蛋白酶切割模型的构建

为了分析 HIV PR 能否切割展示于噬菌体表面的 CAP2NC 靶序列, 我们制备了 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC 噬菌体、阴性对照的 pCANTAB5S-LD3 重组噬菌体及空白对照 pCANTAB5S 噬菌体. 所制备的 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC 和 pCANTAB5S-LD3 重组噬菌体滴度分别为 3.2×10^{12} TU/ml、 5.6×10^{12} TU/ml, pCANTAB5S 噬菌体滴度为 7.6×10^{12} TU/ml, 可见重组噬菌体的滴度与对照噬菌体基本在同一水平.

将 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC 和 pCANTAB5S-LD3 重组噬菌体固定于板上后与不同浓度的 HIV SF2 PR 反应, 加入抗 M13 噬菌体

酶标抗体, 测 A_{450} 值. 如表 2、图 5 所示, pCANTAB5S-LD3-CAP2NC 可以很好地被 HIV SF2 PR 切割, 在 PR 浓度分别为 10 mg/L、5 mg/L、2.5 mg/L 时, HIV SF2 PR 切割噬菌体 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC 的切割率分别为 80%、53%、24%, 且与 HIV SF2 PR 浓度呈相关关系 ($0.05 > P > 0.02$), 表现出较好的特异性作用.

加入 HIV SF2 PR 后, 结合于板上的 pCANTAB5S-LD3 数量也有减少, 但在 10 mg/L PR 时最多仅减少了约 61%, 小于 HIV SF2 PR 切割 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC 的相应切割率, 并且减少程度与 HIV SF2 PR 浓度无相关关系, 说明二者没有表现出特异性的作用.

Table 2 Cleavage analyses of phage displaying CAP2NC or LD3 with different dose of HIV SF2 PR

	Concentration of HIV SF2 PR				
	None	10 mg/L	5 mg/L	2.5 mg/L	1.25 mg/L
pCANTAB5S-LD3-CAP2NC	0.164	0.043	0.081	0.138	0.180
	0.163	0.040	0.079	0.112	0.186
	0.175	0.050	0.095	0.137	0.185
pCANTAB5S-LD3	0.287	0.140	0.219	0.086	0.138
	0.339	0.122	0.213	0.076	0.112
	0.303	0.126	0.175	0.084	0.137
pCANTAB5S	0.013	0.017	0.014	0.012	0.012
Control	0.012	0.011	0.009	0.009	0.010

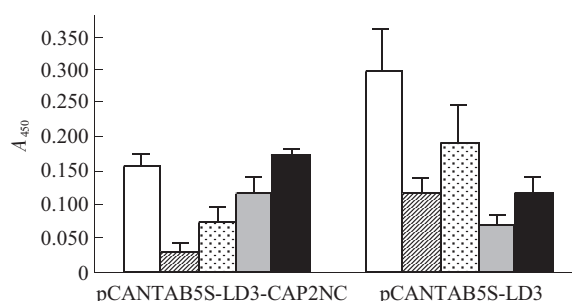


Fig. 5 Cleavage analyses of phages displaying CAP2NC or LD3 with different dose of HIV SF2 PR

□: None; ▨: 10 mg/L; ▤: 5 mg/L; ▧: 2.5 mg/L; ■: 1.25 mg/L.

2.7 Indinavir 对 HIV SF2 PR 切割展示 HIV CAP2NC 蛋白重组噬菌体的抑制作用

将 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC 和 pCANTAB5S-LD3 重组噬菌体固定于板上后与不同浓度的 HIV SF2 PR 反应, 分成 2 组, 一组中加入 PI 类药物 Indinavir (IDV) 至 3 mg/L, 另一组不加 Indinavir, 反应结束后在样品孔中加入抗 M13 噬菌体酶标抗体, 测 A_{450} 值. 如表 3、图 6 所示, 同时加入 HIV SF2 PR 与 Indinavir 组, 结合于板上的 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC 数量明显高于仅加入

Table 3 Effect of IDV on cleavage of phage displaying CAP2NC or LD3 with HIV SF2 PR

	Concentration of HIV SF2 PR and IDV			
	None	PR 10 mg/L+IDV 0 mg/L	PR 0 mg/L+IDV 3 mg/L	PR 10mg/L+IDV 3mg/L
pCANTAB5S-LD3-CAP2NC	0.210	0.064	0.212	0.253
	0.217	0.072	0.235	0.258
	0.203	0.066	0.190	0.203
pCANTAB5S-LD3	0.371	0.251	0.368	0.367
	0.320	0.274	0.343	0.353
	0.360	0.255	0.337	0.373
pCANTAB5S	0.021	0.024	0.028	0.029
Control	0.023	0.024	0.028	0.029

HIV SF2 PR 组, 且与对照组结合于板上噬菌体数量相当, 说明 PI 特性抑制 PR 对 CAP2NC 的特异切割. Indinavir 同样抑制 PR 对 LD3 的非特异切割 (表 3, 图 6).

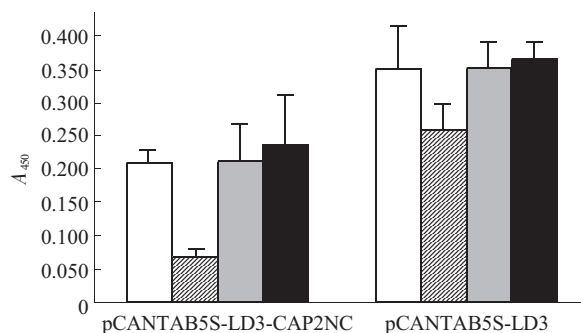


Fig. 6 Inhibition effect of IDV on cleavage of phage displaying CAP2NC or LD3 with HIV SF2 PR

□: None; ▨: PR 10 mg/L; ▤: IDV 3 mg/L; ■: PR 10 mg/L+IDV 3 mg/L.

3 讨 论

随着临床 PI 的使用, 出现愈来愈多的耐药突变. HIV PR 通过突变来逃脱 PI 类药物的作用, 如 30 位 Asp 突变为 Asn 可引起对 Nelfinavir 耐受, 48 位 Gly 突变与 90 位 Leu 突变可以导致 Saquinavir 耐受; 用 Indinavir 治疗的病人产生了对 Saquinavir 和 Amprenavir 的交叉耐药性^[16]. HIV 不仅 PR 发生突变, PR 的靶序列也随之发生适应性突变以补偿 PR 突变所造成的病毒复制率的下降, P2/NC 位点是适应性突变发生最多的位点^[17].

目前应用于 HIV PI 体外筛选的方法主要有 2 种, 一种是竞争法^[6], 通过测定待筛药物对信号分子标记的现有 PI 竞争抑制作用来筛选, 但无法筛选针对突变的 PR 的 PI 候选物. 另一方法是底物法, 通过测定对 PR 酶解标记荧光淬灭分子的短肽靶序列底物的抑制作用进行筛选^[7,8], 该法的缺陷是, 底物序列仅为 PR 靶位点序列本身的数个氨基酸, 未能考虑到靶位点侧翼序列以及整个靶蛋白构象对 PR 切割的影响, 另外, 如要针对突变的 PR 进行筛选, 必须重新建立新的底物分子.

本研究组一直从事噬菌体展示靶蛋白文库的构建和筛选工作, 积累了一定的工作经验和研究基础^[10,18], 在这一基础上, 我们试图建立能适用于针对 PR 突变进行筛选的 HIV PI 噬菌体体外筛选模型. 首先构建展示 HIV PR 靶位点 P2/NC 序列随机

突变的噬菌体文库^[9], 拟用 IgG 分子将其固定于酶标板上, 通过应用包括突变 PR 在内的各种 HIV PR 对该文库进行切割筛选, 获得各自敏感的噬菌体, 最终用于构建针对各种不同 PR 的噬菌体体外 PI 类药物筛选模型.

由于国内外尚无类似这样的噬菌体药物筛选模型建立的报道, 因此, 该策略的可行性至关重要, 虽然 HIV PR 能切割噬菌体随机肽库, 并获得敏感噬菌体^[14], 但对展示在噬菌体表面的分子质量较大, 并包含较完整侧翼序列的靶序列是否仍能有效切割? 对融合有固相化标记的并固定在酶标板上的噬菌体仍能否有效切割? 其切割效率是否足以大到能用 ELISA 测定明显地反应出来? 这种切割效应是否稳定, 并具有特异性? 本研究的结果较为清楚地回答了这些问题.

首先, 我们选择 p2/NC 靶位点序列展示于噬菌体表面. 因为在 HIV PR 的数十个靶位点中, p2/NC 与 TF (转位蛋白)/PR 之间的是最快的靶位点^[16,19], 同时, 每个靶位点都可以发生不同程度的适应性突变, 其中 p2/NC 处的突变率高达 52%^[17], 是突变率最高的位点. 将 P2/NC 序列展示于噬菌体表面, 相对较易被 PR 切割, 而利用该位点构建 PR 靶位点随机突变文库时, 也更有可能得到 PR 敏感的随机突变体.

尽管 HIV PR 对其靶蛋白的切割研究已有广泛报道, 但不清楚我们所选择的切割模型在我们的实验系统中其切割效应究竟如何. 本研究首先应用 HIV SF2 PR 在体外切割原核表达的 CAP2NC 蛋白, 并用 SDS-PAGE 的方法直接观测切割效果, 如图 4 所示, HIV SF2 PR 可以很好地切割 CAP2NC 蛋白, 在 0.2 μ g 时将 CAP2NC 蛋白完全切割, 对融合有重组 LD3 分子的 LD3-CAP2NC 蛋白也有明显的切割, PR 在 2 μ g 时, LD3-CAP2NC 蛋白可被部分切割开来, 然而, LD3 分子并未表现出被切割的迹象. 因此尽管融合了 LD3 分子后, CAP2NC 蛋白对 PR 切割的敏感性虽然降低, 仍然可以被 HIV SF2 PR 特异性切割, 说明对靶位点的选择和 PR 的切割是完全成立的.

在展示 HIV CAP2NC 蛋白的噬菌体构建中, 我们选用了 pCANTAB5S-LD3 噬菌体载体, 该载体带有 LD3 分子作为固相化标记^[10~13]. LD3 分子具有与 IgG 高亲和性的特性, 便于噬菌体的固定, 同时该类分子为本室自行构建的新的进化分子, 其性状已经非常清楚, 技术成熟, 便于使用. 所制

备的噬菌体 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC 和 pCANTAB5S-LD3 重组噬菌体的滴度与 pCANTAB5S 噬菌体相同, 都达到 10^{12} TU/ml 以上, 说明展示大分子质量的 LD3-CAP2NC 没有对噬菌体的滴度形成影响, 而在噬菌体切割模型的建立中, 每孔仅需投入 1×10^{11} TU 的噬菌体, 因此, 上述噬菌体滴度无需进一步浓缩, 可直接稀释应用, 完全可满足大规模筛选的要求。

本研究利用 HIV SF2 PR 切割展示于噬菌体表面的蛋白酶靶位点 P2/NC 序列, 取得了较为显著的效果 (图 5), 加入 HIV SF2 PR 后, 结合于板上的 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC 数量明显减少, 在 10 mg/L PR 时减少约 80%, 且切割率与 PR 浓度呈相关关系, 表现出较好的特异性作用, 用 HRP 抗噬菌体抗体 ELISA 检测切割效果的 A 值下降非常显著, 肉眼就能很明显地分辨出颜色的变化。不仅如此, HAART 中常用的 PI 类药物 Indinavir 对 HIV SF2 PR 切割展示于噬菌体表面的 CAP2NC 有良好的抑制作用 (图 6), 表明, 该模型已可满足对 PI 类药物候选物进行体外大规模筛选的基本条件。另外, 该切割反应具有很好的稳定性, 我们先后在 1 年内对该噬菌体切割实验进行了几十次的重复, 每次都取得相同的切割效果 (结果未示)。

令我们意想不到的是, HIV SF2 PR 对 pCANTAB5S-LD3 也表现出切割效应, 在 10 mg/L PR 时最多能减少了约 61%, 且该效应也可被 Indinavir 所抑制。与对 pCANTAB5S-LD3-CAP2NC 的切割不同, 其切割效应与 PR 浓度无明显的量效关系 (图 5), 推测该切割效应为非特异性作用。然而, 在体外 LD3 分子并未表现出被 HIV SF2 PR 切割的迹象 (图 4)。噬菌体上产生非特异切割的原因可能是: a. 噬菌体上存在着其他影响 HIV SF2 PR 切割的因素, 展示于噬菌体表面 LD3 分子构象可能受到噬菌体自身蛋白质的影响, 从而容易被切割; b. 在噬菌体切割体系中, HIV SF2 PR 的相对浓度要比体外切割时的浓度高出许多, 这也是产生非特异性切割的原因之一; 此外, 可能有其他影响因素如 pH、离子因素等也可能对 HIV SF2 PR 活性造成影响, 产生了非特异性切割。

本研究使用了完整的 PR 靶蛋白 CAP2NC 展示于噬菌体表面并用于 HIV SF2 PR 的切割, 因此能够较好地模拟 PR 切割底物的真实情况; 该方法简便易行, 并可针对不同的 PR 设计不同的靶位点, 具有很好的扩展性; 同时该模型基于噬菌体展

示技术与 ELISA 方法, 重复性好, 并具有较高的敏感性, 适于进行高通量的 PI 类药物筛选。

本研究首次将 HIV 蛋白酶的靶蛋白 CAP2NC 展示于噬菌体表面, 并用 HIV SF2 PR 切割, 成功构建基于噬菌体展示 HIV PR 靶蛋白的噬菌体 PR 切割模型, 证实了体外应用噬菌体展示技术筛选 PI 类药物的可行性, 为构建展示 HIV PR 靶位点序列的噬菌体体外 PI 类药物筛选模型打下了基础, 也为研究 HIV PR 耐药变异与其靶序列适应性变异的相互关系提供一种新的研究平台。

致谢 感谢美国 Scripps 研究所的 John Elder 教授惠赠 HIV SF2 株蛋白酶及对本研究提出的宝贵建议, 感谢美国 Scripps 研究所 Ying-Chuan Lin 博士在纯化并表达 HIV SF2 株蛋白酶中的辛勤工作。感谢美国 Aaron Diamond 艾滋病研究中心的黄耀新博士对本研究提出的宝贵建议。

参 考 文 献

- 1 Debouck C. The HIV-1 protease as a therapeutic target for AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1992, **8** (2): 153~164
- 2 Flexner C. HIV-protease inhibitors. *N Engl J Med*, 1998, **338** (18): 1281~1292
- 3 Mahalingam B, Boross P, Wang Y F, *et al.* Combining mutations in HIV-1 protease to understand mechanisms of resistance. *Proteins*, 2002, **48** (1): 107~116
- 4 Johnson V A, Brun-Vezinet F, Clotet B, *et al.* Update of the drug resistance mutations in HIV-1: 2004. *Top HIV Med*, 2004, **12** (4): 119~124
- 5 Zhang Y M, H Imamichi, T Imamichi, *et al.* Drug resistance during Indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and in its Gag substrate cleavage sites. *J Virol*, 1997, **71** (9): 6662~6670
- 6 Jones P S. Strategies for antiviral drug discovery. *Antivir Chem Chemother*, 1998, **9** (4): 283~302
- 7 Hamalainen M D, Markgren P O, Schaal W, *et al.* Characterization of a set of HIV-1 protease inhibitors using binding kinetics data from a biosensor-based screen. *J Biomol Screen*, 2000, **5** (5): 353~360
- 8 Tomaszek T A Jr, Magaard V W, Bryan H G, *et al.* Chromophoric peptide substrates for the spectrophotometric assay of HIV-1 protease. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, **168** (1): 274~280
- 9 周波, 贾建安, 温宗梅, 等. HIV Gag 蛋白 P2/NC 蛋白酶切割位点序列的随机化及噬菌体展示. *第二军医大学学报*, 2005, **26** (11): 1243~1247
- 10 徐容, 沈毅珺, 潘卫, 等. 噬菌体展示 protein A 和 protein L 的单独结构域组合文库及亲和筛选. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32** (6): 535~543

- Xu R, Shen Y J, Pan W, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2005, **32** (6): 535~543
- 11 潘卫, 戚中田. 随机多肽噬菌体展示载体 pCANTAB5X 的构建. 第二军医大学学报, 1999, **20** (10): 723~725
- Pan W, Qi Z T. Acad J Sec Mil Med Univ, 1999, **20** (10): 723~725
- 12 沈毅珺, 潘卫, 刘彦君, 等. 新型噬菌体展示载体 pCANTAB5L 的构建. 第二军医大学学报, 2003, **24** (3): 298~302
- Shen Y J, Pan W, Liu Y J, *et al.* Acad J Sec Mil Med Univ, 2003, **24** (3): 298~302
- 13 徐容, 潘卫, 邓松华, 等. 新型噬菌体展示载体 pCANTAB5S 的构建. 安徽医科大学学报, 2004, **39** (2): 83~86
- Xu R, Pan W, Deng S H, *et al.* Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2004, **39** (2): 83~86
- 14 Beck Z Q, Hervio L, Dawson P E, *et al.* Identification of efficiently cleaved substrates for HIV-1 protease using a phage display library and use in inhibitor development. Virology, 2000, **274** (2): 391~401
- 15 Kruger N J, Walker J M, ed. The Protein Protocol Handbook. New Jersey: Hucan Press Inc, 1966. 15~20
- 16 Condra J H, Schleif W A, Blahy O M, *et al.* *In vivo* emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. Nature, 1995, **374** (6522): 569~571
- 17 Cote H C, Brumme Z L, Harrigan P R. Human immunodeficiency virus type 1 protease cleavage site mutations associated with protease inhibitor cross-resistance selected by indinavir, zidovudine, and/or saquinavir. J Virol, 2001, **75** (2): 589~594
- 18 沈毅珺, 潘卫, 刘彦君, 等. 噬菌体展示重组人淋巴毒素突变体库及受体亲和筛选. 生物化学与生物物理进展, 2005, **32** (1): 75~80
- Shen Y J, Pan W, Liu Y J, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2005, **32** (1): 75~80
- 19 Boden D, Markowitz M. Resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. Antimicrob Agents Chemother, 1998, **42** (11): 2775~2783

Establishment of HIV Protease Cleavage Model of Phage Displaying Gag CAP2NC Peptide*

JIA Jian-An^{1)**}, ZHOU Bo^{2)**}, JIANG Shao-Hua¹⁾, CHEN Qiu-Li¹⁾, ZHAO Ping¹⁾, PAN Xin¹⁾, WEN Zong-Mei²⁾, DENG Song-Hua²⁾, LU Hong-Zhou³⁾, PAN Wei^{1)***}

¹⁾Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

²⁾Department of Pathology and Physiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

³⁾Shanghai Public Health Center, Shanghai 201508, China)

Abstract The emergence of drug-resistant protease (PR) has seriously affected the anti AIDS therapy. Using mutated PR to screen phage library displaying randomized HIV PR target sites, phages susceptible to mutated PR can be obtained, and used in drug screening of protease inhibitor (PI) against to drug-resistant HIV PR. In order to validate the feasibility of this suppose, a designed LD3-CAP2NC peptide composing of HIV CAP2NC with P2/NC target site and LD3 peptide locating in the NH₂ terminus of the CAP2NC which could immobilise the phage to the plate through binding to human IgG was displayed on the surface of phage. This phage was fixed on plate, and suffered to the cleaving by HIV SF2 PR. The uncleaved phage leaving on the plate was measured using HRP/Anti-M13 conjugate, which reflects the cleavage efficiency. The results showed the phage can be cleaved effectively in a dose-dependent manner to PR concentration, with the most cleavage effect reached to more than 80%. Comparing with the control, the ELISA value of the cleaved phage decreased obviously. Furthermore, this cleavage was specifically inhibited by HIV protease inhibitor drug Indinavir. The data proved that a novel HIV protease cleavage model of the phage displaying Gag CAP2NC was firstly successfully established, which can not only be used as a new research platform to investigate the relationship between PR drug-resistant mutation and PR target sequence adapted mutation, but also lay a foundation to establish the new phage screening model for PIs especially against to drug-resistant PR.

Key words HIV, protease, protease inhibitor, drug screening, phage display

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30472050) and The Key Science and Technology R&D Programme of Shanghai China (05DZ19317).

**The authors contributed equally.

***Corresponding author. Tel: 86-21-25074371, E-mail: pwpnwei@yahoo.com.cn

Received: September 18, 2006 Accepted: November 2, 2006