

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00262

· 论 著 ·

HCK SH3 结构域与 HIV-1 Nef 蛋白体外结合活性的检测

覃晓琳¹, 刘朝奇^{1*}, 任东明², 周永芹²

1. 三峡大学医学院分子生物学研究所, 宜昌 443002

2. 三峡大学医学院微生物学教研室, 宜昌 443002

[摘要] **目的** 构建重组原核表达质粒 pGEX-4T-1/SH3, 检测原核表达的 SH3 蛋白的生物学活性。**方法** 利用 PCR 方法扩增 HCK SH3 基因, 并将其克隆到原核表达载体 pGEX-4T-1 中, 构建原核表达质粒 pGEX-4T-1/SH3, 转化 *E. coli* DH5 α , 进行双酶切和测序鉴定。筛选阳性质粒, 转化至 *E. coli* BL21(DE3) 中进行表达, 对表达产物进行 SDS-PAGE 和蛋白质印迹检测, 同时纯化 SH3 蛋白。表达并纯化 HIV-1 Nef 蛋白, 利用 GST pull-down 方法检测 SH3 蛋白与 Nef 蛋白的结合活性。**结果** 成功获得重组质粒 pGEX-4T-1/SH3, 测序正确, 高效表达并纯化了 SH3 蛋白。GST pull-down 实验结果显示 SH3 与 HIV-1 Nef 蛋白具有良好的结合活性。**结论** 成功地克隆、表达和纯化了 GST-SH3 蛋白, SH3 与 Nef 蛋白具有体外特异性结合活性, 为进一步研究针对 Nef 与 SH3 结合的靶向药物的筛选提供了实验基础。

[关键词] HIV-1; Nef 基因产物; HCK 基因; src 同源域; 结合活性**[中图分类号]** R 392.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)03-0262-04

In vitro binding activity between HCK SH3 domain and HIV-1 Nef protein

QIN Xiao-lin¹, LIU Chao-qi^{1*}, REN Dong-ming², ZHOU Yong-qin²

1. Institute of Molecular Biology, Medical College, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

2. Department of Medical Microbiology, Medical College, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

[Abstract] **Objective** To construct prokaryotic expression plasmid pGEX-4T-1/SH3 and to examine the biological activity of the expressed SH3 protein. **Methods** HCK SH3 gene was amplified by PCR and was cloned into the vector pGEX-4T-1 to construct prokaryotic expression plasmid pGEX-4T-1/SH3. The recombinant plasmid was identified by double enzyme digestion and sequencing, the positive plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3), and the expressed product was identified by SDS-PAGE electrophoresis and Western blotting analysis. HCK SH3 and HIV-1 Nef proteins were purified and their binding activity was detected by GST pull-down assay. **Results** The recombinant plasmid pGEX-4T-1/SH3 was correctly constructed. SH3 protein was expressed and purified. GST pull-down assay showed that SH3 protein had a satisfactory binding activity to HIV-1 Nef protein. **Conclusion** We have successfully expressed and purified GST-SH3 protein. Nef protein and SH3 proteins have a specific binding activity, which paves a way for screening drugs targeting Nef and SH3.

[Key words] HIV-1; Nef gene products; HCK gene; src homology domains; binding activity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(3):262-265]

HCK 基因是蛋白酪氨酸激酶 Src 家族的重要成员, 结构独特而且高度保守, 不但有 Src 家族共有的 SH2 结构域和 SH3 结构域 (Src homology domain 3), 而且所编码蛋白 (p61-HCK 和 p59-HCK 两种剪切异构体) 均为跨膜蛋白, 在胞外信号刺激到胞内功能活动的信号转导过程中起关键作用^[1]。研究发现, Nef 可以结合并且活化 Src 家族酪氨酸激酶是 Nef 与 SH3 结合的结果, 其中与 HCK SH3 结构

域的结合力最强^[2-3]。本实验构建了 HCK 的 SH3 结构域蛋白的原核表达质粒, 并表达和纯化了 SH3 蛋白, 检测了原核表达的 HIV-1 Nef 蛋白与 SH3 (HCK) 蛋白的特异性结合活性, 为进一步研究针对 Nef 与 SH3 的靶向治疗药物的筛选奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料 人单核细胞株 THP-1、菌株

[收稿日期] 2010-08-23 **[接受日期]** 2011-02-16**[基金项目]** 三峡大学硕士学位论文培优基金 (2010PY064). Supported by a Grant for the Master Degree Thesis Excellent Training Foundation of Three Gorges University (2010PY064).**[作者简介]** 覃晓琳, 硕士生. E-mail: qinxiaolin200810@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0717-6397179, E-mail: chaoqil@yahoo.com

E. coli DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3)、带 6 \times His 标签的重组质粒 pET28a(+)/Nef、带谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 标签的质粒 pGEX-4T-1 由本研究所保存。*Eco*R I 和 *Xho* I 限制性核酸内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、*T₄* DNA 连接酶、dNTPs、RT-PCR 及 PCR 试剂盒由 Fermentas 公司提供, DNA 纯化试剂盒购自 Omega 公司。兔源 GST 多克隆抗体购自 eBioscience 公司, 鼠源 His 单克隆抗体、HRP 标记的羊抗鼠 IgG、HRP 标记的羊抗兔 IgG 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。其他化学试剂由 Sigma 等公司提供。Ni-NTA 树脂、Glutathione Sepharose 4B 和蛋白纯化仪 ÄKTAprime 购自 GE Healthcare Bioscience 公司。PCR 引物合成及 DNA 测序均由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.2 pGEX-4T-1/SH3 重组质粒的构建与鉴定 人 THP-1 细胞总 RNA 的提取及 cDNA 合成: 收集 THP-1 细胞, 采用 TRIzol 试剂盒提取 THP-1 细胞总 RNA。以 THP-1 细胞总 RNA 为模板, Oligo (dT) 为引物, 经反转录酶 M-MLV 催化将 mRNA 反转录为第 1 链 cDNA, 具体操作按试剂盒说明书进行。合成的 cDNA 即可用于 PCR 扩增或于 -20 $^{\circ}$ C 保存。RNA 的完整性以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, cDNA 的质量以扩增管家基因 β -actin 进行验证。

利用 PCR 方法获得 SH3 结构域序列: 根据 GenBank 中 HCK SH3 的基因序列设计引物, 5' 端分别引入 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切位点。上游引物 5'-GCG AAT TCG TGG TTG CCC TGT ATG ATT AC-3' (*Eco*R I), 下游引物 5'-CGC TCG AGT CAG TCA ACG CGG GCG ACA TAG-3' (*Xho* I)。

以上述 THP-1 细胞 cDNA 第 1 链为模板, 扩增人 HCK SH3 基因序列。PCR 反应体系体积为 50 μ l, 以 1 μ l 的第 1 链 cDNA 为模板, PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物用纯化试剂盒进行纯化。取扩增产物 5 μ l 进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像分析系统观察并记录结果。

用 *Eco*R I 和 *Xho* I 分别双酶切纯化的 PCR 产物 SH3 和 pGEX-4T-1 原核表达载体。将酶切产物再次纯化后, 用 *T₄* DNA 连接酶将两者于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 将连接产物转入 *E. coli* DH5 α 中, 挑取单克隆提取质粒进行酶切和测序鉴定。

1.3 SH3 蛋白的原核表达与纯化 将构建正确的重组质粒 pGEX-4T-1/SH3 转化至宿主菌 BL21 (DE3), 挑取单克隆于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。次日按 1:25 接种量分别接种于含氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 D_{600} 值 0.6~0.8 时, 加入终

浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导表达。离心收集菌体, 菌体用 PBS 洗涤 1 次, 用适量的 PBS 重悬沉淀, 超声波裂解, 10 000 $\times g$ 离心 10 min, 取少量上清和沉淀进行 SDS-PAGE, 结果提示大部分蛋白存在于上清中, 收集上清。选用 5 ml 柱床体积的 GSTrap FF 亲和层析柱和 ÄKTAprime 蛋白纯化仪, 先以 5 倍柱体积的平衡缓冲液 (PBS, pH 7.3) 过柱, 然后将细菌裂解上清液以 1 ml/min 的速度上样, 上样结束继续加入 8 倍柱体积的平衡缓冲液, 随后经 5 倍柱体积的洗脱缓冲液 (含 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 将融合蛋白洗脱下来并收集 GST-SH3 蛋白。按照同样的方法将质粒 pGEX-4T-1 转化宿主菌 BL21 (DE3), 制备纯化的 GST 蛋白。取少量纯化的蛋白进行 SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析鉴定。

1.4 Nef 蛋白的原核表达与纯化 将本研究所保存的重组质粒 pET28a(+)/Nef 转化至宿主菌 BL21 (DE3) 中, 挑取单克隆接种于含卡那霉素的 LB 培养液, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。次日按 1:25 接种量分别接种于含卡那霉素的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 D_{600} 值 0.6~0.8 时, 加终浓度为 1.0 mmol/L IPTG 诱导表达。低温离心 10 000 $\times g$, 10 min, 收集菌体, 菌体重悬于 Buffer A 中 (0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0), 在冰浴中以超声波破碎菌体, 离心洗涤包涵体, 8 mol/L 尿素变性增溶后经 Ni-NTA 树脂分离纯化目的蛋白。蛋白经梯度透析 (尿素浓度分别为 8、4、2、1、0.25、0.1 和 0 mol/L) 的方法复性。以 SDS-PAGE 对样品进行分析。

1.5 GST pull-down 方法检测 SH3 与 Nef 的结合活性 取适量的 Glutathione Sepharose 4B, 用 PBS 洗涤 3 次, 平均分成 3 管, 标记为 1 $^{\#}$ 、2 $^{\#}$ 、3 $^{\#}$ 。在 2 $^{\#}$ 和 3 $^{\#}$ 管中加入 10 μ l 纯化的 GST-SH3 (0.25 mg/ml) 蛋白, 在 1 $^{\#}$ 管中混入 10 μ l 纯化的 GST (0.25 mg/ml) 蛋白作为对照, 混匀, 室温作用 1 h 后, 用 PBS 洗涤、沉淀 3 次后, 离心弃上清。在 3 个管中分别混入 10 μ l 纯化的 Nef (0.25 mg/ml) 蛋白, 室温缓慢摇动 1 h, 用 PBS 洗涤、沉淀 3 次后, 离心弃上清, 加入 1 \times SDS-PAGE 加样缓冲液, 煮沸 5 min, 取上清按常规方法进行 12% SDS-PAGE; 同时, 以上样单独的纯化 Nef 蛋白作为阳性对照。转膜, 以 5g/L 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入 His 抗体 (1:3 000), 室温作用 1 h, TBST 洗膜 3 次后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:5 000), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次后 ECL 显色。用 Stripping 缓冲液于 50 $^{\circ}$ C 处理上述 PVDF 膜 30 min, TBST 洗涤 3 次, 再以 5 g/L 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, 加入 1:2 000

稀释的兔源 GST 多克隆抗体,室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次后加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1 : 3 000), 37℃ 孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次后 ECL 显色。

2 结果

2.1 重组质粒 pGEX-4T-1/SH3 的鉴定 以 PCR 方法获得 SH3 片段, 所得 PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 可见一大小为 168 bp 的特异性条带 (图 1)。将此 SH3 片段连接到 pGEX-4T-1 载体中, 经过酶切、连接和转化, 获得 pGEX-4T-1/SH3 的重组质粒, 利用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定, 获得的插入片段大小与预期结果一致, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示。DNA 测序结果显示 SH3 编码区序列完整且读码框正确, 表明原核表达质粒 pGEX-4T-1/SH3 构建正确。

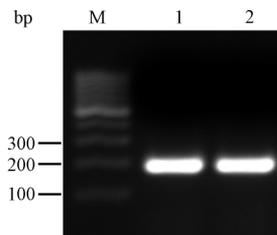


图 1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig 1 Analysis of PCR products by agarose gel electrophoresis
M: 100 bp DNA maker; 1, 2: SH3 PCR product

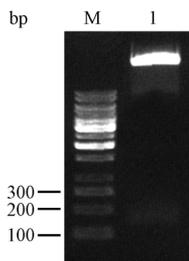


图 2 重组质粒 pGEX-4T-1/SH3 的酶切鉴定
Fig 2 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid pGEX-4T-1/SH3

M: 100 bp DNA maker; 1: pGEX-4T-1/SH3 digested by *EcoR*I and *Xho*I

2.2 SH3 蛋白的原核表达与纯化鉴定 用 1.0 mmol/L IPTG 对转化 pGEX-4T-1 和 pGEX-4T-1/SH3 质粒的细菌进行诱导表达, SDS-PAGE 显示 GST 蛋白与 GST-SH3 蛋白均有表达。大量诱导目的蛋白表达, 过柱纯化得到的 SH3 蛋白经 SDS-PAGE 检测 (图 3)。电泳分离的蛋白转移到 PVDF 膜与 GST 多克隆抗体结合后, 蛋白质印迹分析显示在相对分子质量约 32 000 和 26 000 处可检测到 SH3 蛋白和 GST 蛋白的显色带 (图 4), 表明成功获得了纯化的 SH3 蛋白。

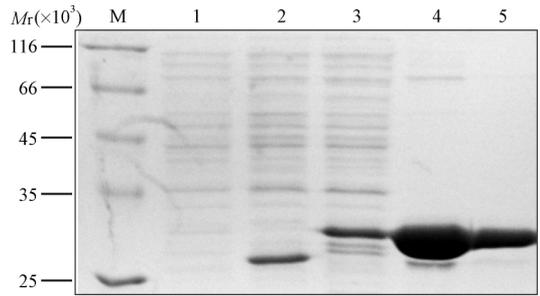


图 3 SDS-PAGE 分析重组蛋白的原核表达及纯化

Fig 3 Expression and purification of SH3 recombinant protein by SDS-PAGE

M: Marker; 1: *E. coli* BL21/pGEX-4T-1/SH3, before IPTG induction; 2: *E. coli* BL21/pGEX-4T-1, induced by 1.0 mmol/L IPTG; 3: *E. coli* BL21/pGEX-4T-1/SH3, induced by 1.0 mmol/L IPTG; 4, 5: Purified SH3 protein

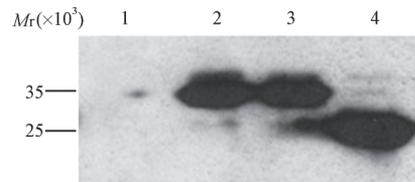


图 4 蛋白质印迹分析检测 SH3 和 GST 蛋白的原核表达及纯化

Fig 4 Western blotting analysis of purified recombinant protein SH3 and GST

1: *E. coli* BL21/pGEX-4T-1/SH3, before IPTG induction; 2: Purified SH3 protein; 3: *E. coli* BL21/pGEX-4T-1/SH3, induced by 1.0 mmol/L IPTG; 4: Purified GST protein

2.3 Nef 蛋白的原核表达与纯化 用 1.0 mmol/L IPTG 对转化 pET28a(+)/Nef 质粒的细菌进行诱导表达, SDS-PAGE 显示诱导后的细菌中有一新生的重组 Nef 蛋白带, 表观分子量与预期结果相符。大量诱导目的蛋白表达, 通过 Ni-NTA 树脂纯化得到纯化的 Nef 蛋白, 经 SDS-PAGE 鉴定, 相对分子质量约为 34 000 (图 5)。

2.4 GST pull-down 检测 Nef/SH3 的结合活性 GST 蛋白能与 Glutathione Sepharose 4B beads 特异性结合, 形成 GST-beads 和 GST-SH3-beads, 加入纯化的带有 His 标签的 Nef 蛋白, 通过离心的方式可以使 GST-beads 沉淀。如果 Nef/SH3 具有结合特性, 可使 Nef 蛋白也滞留于 GST-SH3-beads 沉淀中。以 His 单抗为一抗, 经蛋白质印迹分析在 2# 和 3# 管可检测到一条相对分子质量约 34 000 的 Nef 蛋白阳性带, 而 1# 的 GST 不能与 SH3 结合, 因而呈现阴性结果, Loading 孔为直接上样的纯化 Nef 蛋白作为阳性对照 (图 6A)。由于 Glutathione

Sepharose 4B 可以与 GST-SH3 和 GST 结合,因此上述 PVDF 膜经 Stripping 缓冲液处理后,再以 GST 抗体为一抗,经蛋白质印迹分析检测可以看到 GST (26 000) 和 GST-SH3 (32 000) 蛋白条带(图 6B)。结果证实原核表达的 HCK SH3 结构域蛋白能与 Nef 蛋白特异性结合。

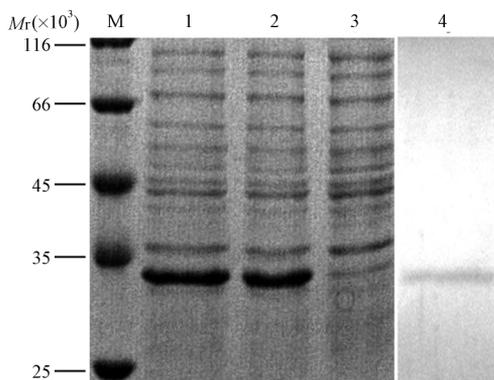


图 5 SDS-PAGE 分析 Nef 蛋白的原核表达

Fig 5 Analysis of Nef protein expression by SDS-PAGE

M: Marker; 1, 2: *E. coli* BL21/pET28a(+)/Nef with IPTG (1.0 mmol/L) induction; 3: *E. coli* BL21/pET28a(+)/Nef, before IPTG induction; 4: Purified Nef protein

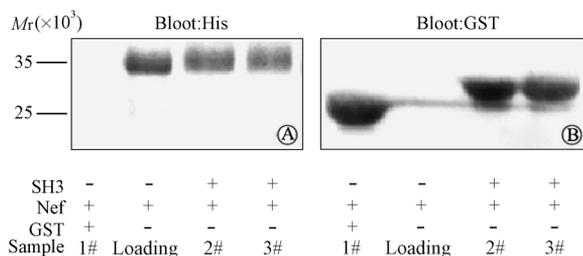


图 6 蛋白质印迹分析检测 SH3/Nef 的结合

Fig 6 Detection of binding of SH3 with Nef by Western blotting analysis

A: With His monoclonal antibody; B: With GST polyclonal antibody

3 讨论

HIV-1 Nef 是无酶活性但具有结合多种宿主细胞蛋白的适配体(adaptor),其能调节细胞的生物学活性,促进病毒的复制及导致病毒的免疫逃逸等,在 HIV 的致病中具有重要的作用^[4]。HIV 感染的临床资料显示,在 HIV 感染长期不发病(LTNP)/病程进展缓慢(SP)的患者,Nef 基因产生突变或者缺失而失去活化 HCK 的活性,使 AIDS 不发生或者病程延缓^[5]。有研究显示在嗜 M 型的 HIV 感染的巨噬细胞中,HIV-1 Nef 可以结合并活化 Src 家族酪氨酸激酶(包括 HCK),调节信号转导通路,改变细胞膜蛋白的转运,从而增加病毒复制效率^[3]。降低 HCK 的表达或者 C/EBP 小分子同型物的表达增加都可

以降低病毒的复制和病毒的易感性^[6]。红霉素的衍生物 EM201 和 EM703 可以降低 HCK 的表达,抑制 p38MAPK 的活性。这些衍生物还可以通过抑制 MAPK 活性而阻止 CD4⁺T 细胞和 MΦ 的相互作用而抑制病毒的复制^[7]。

本实验成功构建了重组原核质粒 pGEX-4T-1/SH3,高效表达并纯化了带有 GST 标签的 SH3 蛋白。GST pull-down 结果显示,原核表达的 SH3 与 HIV-1 Nef 蛋白在体外具有特异性结合活性,应用蛋白相互作用的技术平台,为研究针对 Nef 与 SH3 结合的靶向药物的筛选平台提供了实验基础^[6,8-9]。

[参考文献]

- [1] Shi Y, Dong B, Miliotis H, Liu J, Alberts A S, Zhang J, et al. Src kinase Hck association with the WASp and mDia1 cytoskeletal regulators promotes chemoattractant-induced Hck membrane targeting and activation in neutrophils[J]. *Biochem Cell Biol*, 2009, 87: 207-216.
- [2] Vérollet C, Zhang Y M, Le Cabec V, Mazzolini J, Charrière G, Labrousse A, et al. HIV-1 Nef triggers macrophage fusion in a p61Hck- and protease-dependent manner[J]. *J Immunol*, 2010, 184: 7030-7039.
- [3] Tribble R P, Emert-Sedlak L, Smithgall T E. HIV-1 Nef selectively activates Src family kinases Hck, Lyn, and c-Src through direct SH3 domain interaction[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 27029-27038.
- [4] Olivieri K C, Agopian K A, Mukerji J, Gabuzda D. Evidence for adaptive evolution at the divergence between lymphoid and brain HIV-1 nef genes[J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2010, 26: 495-500.
- [5] Tribble R P, Emert-Sedlak L, Wales T E, Ayyavoo V, Engen J R, Smithgall T E. Allosteric loss-of-function mutations in HIV-1 Nef from a long-term non-progressor[J]. *J Mol Biol*, 2007, 374: 121-129.
- [6] Stangler T, Tran T, Hoffmann S, Schmidt H, Jonas E, Willbold D. Competitive displacement of full-length HIV-1 Nef from the Hck SH3 domain by a high-affinity artificial peptide[J]. *Biol Chem*, 2007, 388: 611-615.
- [7] Komuro I, Sunazuka T, Akagawa K S, Yokota Y, Iwamoto A, Omura S. Erythromycin derivatives inhibit HIV-1 replication in macrophages through modulation of MAPK activity to induce small isoforms of C/EBPβ[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 12509-12514.
- [8] Emert-Sedlak L, Kodama T, Lerner E C, Dai W, Foster C, Day B W, et al. Chemical library screens targeting an HIV-1 accessory factor/host cell kinase complex identify novel antiretroviral compounds[J]. *ACS Chem Biol*, 2009, 4: 939-947.
- [9] Betzi S, Restouin A, Opi S, Arold S T, Parrot I, Guerlesquin F, et al. Protein protein interaction inhibition (2P2I) combining high throughput and virtual screening: application to the HIV-1 Nef protein[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 19256-19261.