

腮腺炎病毒 F 蛋白七肽重复序列的表达、纯化及特性分析

刘月永¹ 冯明光¹ 朱杰青² 姜立杰³ 田 波^{2*}

¹(浙江大学生命科学院微生物研究所, 杭州 310029)

²(中国科学院微生物研究所分子病毒室, 北京 100080)

³(北京农林科学院林果所, 北京 100093)

摘 要 副粘病毒 F 蛋白的两段七肽重复序列(HR1 和 HR2)在病毒侵染细胞的过程中相互作用形成热稳定的富含 α 螺旋的异源二聚体, 此结构的形成引起病毒囊膜与细胞膜的并置并最终导致膜融合的发生。腮腺炎病毒(Mumps virus, MuV)属于副粘病毒科 腮腺炎病毒属, 可能利用与其他副粘病毒相似的侵染机制。本研究对 MuV 融合蛋白的 HR 区进行了计算机程序预测, 并利用大肠杆菌 GST 融合表达系统对 MuV F 蛋白 HR1 和 HR2 两段多肽进行了表达和纯化, 通过 GST pull-down 实验证实 HR1 和 HR2 多肽在体外能够相互作用, 凝胶过滤层析证明 HR1、HR2 多肽能够形成多聚体, 说明 MuV F 蛋白的 HR 区的相互作用可能是其发挥融合功能的关键因素。

关键词 腮腺炎病毒(Mumps virus, MuV) F 蛋白, 七肽重复序列(HR), GST pull-down

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)03-0377-05

副粘病毒的囊膜上镶嵌着多种蛋白, 其中融合蛋白(F)和血凝素神经氨酸苷酶(HN)直接参与了病毒对宿主细胞的侵染^[1-3]。在 HN 蛋白吸附在宿主细胞表面含唾液酸的分子受体后, 引起 F 蛋白发生构象变化, 形成了前发夹结构的中间体并释放出融合肽(fusion peptide)插入宿主细胞膜中, 随后细胞膜和病毒囊膜被拉近并置, 最终导致膜融合的发生, 使病毒基因组注入宿主细胞内^[2,4]。目前膜融合过程中的具体细节还不清楚, F 蛋白的七肽重复序列(HR1, HR2)被认为扮演了重要的角色。对 HR 序列的点突变研究表明, HR2 上保守氨基酸的突变阻止了膜融合的发生, 而 HR1 上保守氨基酸的突变也影响了 F 蛋白的正确折叠并降低了膜融合活性^[5-7]。Lambert 等人鉴定了副粘病毒 HR2 多肽对膜融合的影响, 结果发现加入外源 HR2 多肽能够抑制膜融合的发生。此外 Joshi 等人的研究表明含有 HR1 区同源序列的多肽在多个系统中也能够产生融合抑制现象。于此相反, 有两个实验室的研究发现, HR1 和 HR2 多肽的混合物不能阻止融合事件的发生^[8-11]。这表明 HR1、HR2 相互作用形成复合体从而消除了单个多肽的融合抑制活性。新城疫病毒(Newcastle

disease virus, NDV)和呼吸道合胞病毒(Respiratory syncytial virus, RSV) F 蛋白晶体结构的解析进一步证明 HR1、HR2 区在融合过程中相互作用形成以 HR1 三聚体为核心, HR2 反向平行包被的高度 α 螺旋化的异源二聚体结构, 这个异源二聚体被认为是 F 蛋白融合后的最稳定的核心结构^[12,13]。

腮腺炎病毒(Mumps virus, MuV)属于副粘病毒科 腮腺炎病毒属, 是一种具有囊膜的单链、负极性的 RNA 病毒, 它能够导致小儿的腮腺炎和成人的脑膜炎病症^[14]。大量研究结果表明副粘病毒科的很多成员, NDV、RSV、仙台病毒、麻疹病毒、猴病毒 5 型都是通过膜融合的方式完成病毒的入侵, HR1、HR2 在这一过程中相互作用促使融合事件的发生, MuV 也可能采用类似的侵染机制。本文利用程序预测确定了 MuV F 蛋白 HR1 和 HR2 区的氨基酸序列, 参照文献[15]的方法用 PCR 人工构建了通过 linker (SGGRGG)连接的 HR1 和 HR2 的单链基因 HR1-HR2 并以此为模板扩增出 HR1、HR2 基因。利用 GST 融合表达系统进行了表达并对产物进行了纯化及特性分析。

收稿日期 2003-10-29, 修回日期 2004-02-10。

基金项目: 国家“973”计划资金资助(No. G1999075602)。

* 通讯作者。 Tel: 86-10-62554247; E-mail: tienpo@sun.im.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

GST 融合表达载体 pGEX-6p-1(目的蛋白融合到 GST 的 C 端,并有 PreScission™ 蛋白酶裂解位点)由牛津大学高福博士惠赠;大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)本室保存。GST 融合的鼻病毒 3C 蛋白酶(以下简称 GST-3C,与 PreScission™ 蛋白酶识别相同的氨基酸序列)由 K. Hudson 和 J. Heath 博士惠赠。

1.2 表达载体的构建

利用 LearnCoil-VMF 程序预测确定 MuV F 蛋白

```
(1)GATGGATCCGCTGTTTCTCTGGTTCAGGCTCAGACTAACGCTCGTCTATTGCTGCTAT
(2)ACTTCGAAAACAGCAGCGTTAGTAGCCTGGATGGAGTTTTTCATAGCAGCAATAGCACGA
(3)CCGTGCTGTTTTTCGAAGTTAAAGAAGGTACTCAGCGTCTGGCTATCGTGTTCAGGCT
(4)TTCAGCTGAGTGTTCATGATGCTGTGATGTGGTCTGGATAGCCTGAACAGCGATAGC
(5)CATGAACACTCAGCTGAACAACATGTCTTCCGGTGGTCTGGTGGTATCGACATCT
(6)GTCTGTCAGGGAAGCGTTAACTTTGGACAGTTCAGTGGAGATGTCGATACCACCAC
(7)AACGCTTCCCTGCAGAACGCTGTAAAGTACATCAAGGAATCCAACCACCAACTGCAAT
(8)GGCCTCGAGTCAGATACGACCGATTTTGGAGTTAACGTTAACGGATTCAGTGTGGTGGTGG
```

同时设计下列用于扩增出 HR1、HR2 基因的引物:

HR1 下游引物:

5'GCAGTCGACTCGAGTCAAGACATGTGCTCAG 3'

HR2 上游引物:

5' GATGGATCCATCGACATCTCCACT 3'

1.3 蛋白的表达和纯化

将 DNA 测序正确的重组质粒 pGEX-HR1、pGEX-HR2 分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,从平板上挑取单菌落接入含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 2 \times YT(胰蛋白胨 16g,酵母提取物 10g,氯化钠 5g,水 1000mL)培养基活化,将适量活化液接入 2 \times YT 培养基进行大规模培养,在 37 $^{\circ}$ C 条件下培养至 OD₆₀₀ 值 0.6~1.0 时加入 0.1mmol/L 的 IPTG,28 $^{\circ}$ C 诱导 4h 后收集菌体。菌体用适量 PBS 缓冲液(140 mmol/L NaCl,2.7 mmol/L KCl,10 mmol/L Na₂HPO₄,1.8 mmol/L KH₂PO₄,pH 7.3)重悬,在冰浴条件下超声破碎后加 TritonX-100 至终浓度为 1%,混匀冰浴 30min,12000r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 20min,取上清电泳鉴定。收集离心后的上清在 4 $^{\circ}$ C 恒温下流经平衡过的 Glutathione-Sepharose 4B 亲和层析柱,融合蛋白用还原型谷胱甘肽洗脱缓冲液(10mmol/L reduced glutathione,50mmol/L Tris-HCl pH 8.0)洗脱,取少量洗脱液备用,剩余洗脱液用超滤浓缩法更换成酶切缓冲体系(50mmol/L Tris-HCl,pH 7.0;150 mmol/L NaCl;1mmol/L DTT;1 mmol/L EDTA,pH 8.0)加入过量 GST-3C 蛋白酶 5 $^{\circ}$ C 酶切 16h;酶切产物再换成 PBS 缓冲液,再用 Glutathione-Sepharose 4B 亲和层析柱除

(protein-id="NP-054711.1")HR1 和 HR2 区的位置和长度。首先根据文献提供的方法人工构建 HR1-HR2,然后设计特异引物以 HR1-HR2 为模板扩增出 HR1、HR2 基因。PCR 产物用凝胶回收试剂盒回收,经 BamH I/Xho I 双酶切,与用 BamH I/Xho I 酶切过的 pGEX-6p-1 在 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,转化 DH5 α 菌株,用 PCR 或双酶切法鉴定阳性克隆,所得阳性克隆最后经 DNA 测序确证。重组质粒分别命名为 pGEX-HR1、pGEX-HR2。

根据程序预测 HR 区序列设计了以下引物合成 HR1-HR2 基因,引物序列如下(5' \rightarrow 3'):

去酶切下的 GST 和 GST-3C,收集穿过液得到 HR1 和 HR2 蛋白,将穿过液浓缩换液至适当浓度,取样电泳鉴定。

1.4 GST Pull-down 实验

GST-HR2 融合蛋白洗脱液超滤浓缩换成 PBS 缓冲体系并浓缩至 100 μ L,加入过量 HR1 蛋白,在冰浴条件下放置 30min,然后加入 100 μ L Glutathione-Sepharose 4B 填料,冰浴 30min,500g,4 $^{\circ}$ C 离心 5min,弃上清。用 10 倍柱床体积的 PBS 洗涤 3 次,500g,4 $^{\circ}$ C 离心 5min,弃上清。加入 50 μ L 还原型谷胱甘肽洗脱缓冲液,冰浴 30min,500g,4 $^{\circ}$ C 离心 5min,取上清电泳鉴定。

1.5 凝胶过滤层析

将亲和层析纯化的 HR1 和 HR2 多肽混合,冰浴 30min 后利用 Akta explorer 操作系统进行凝胶过滤层析(Superdex™ G75,Pharmacia),缓冲体系为 20mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,100mmol/L NaCl。收集目的蛋白峰。

1.6 质谱分析

用截流分子量为 10kD 的超滤浓缩管将凝胶过滤层析后的蛋白样品浓缩换液(20mmol/L Tris-HCl,pH 8.0)至适当浓度,进行 MALDI-TOF 质谱分析(Bruker Daltonics Biflex III)。

2 结果

2.1 HR1 和 HR2 序列的亚克隆

利用 PCR 的方法先扩增得到 HR1-HR2 基因,再

以 HR1-HR2 为模板扩增得到 HR1、HR2 基因 ,序列长度分别为 383bp、186bp 和 117bp(图 1 2)。 分别将 3 个基因片段克隆到 pGEX-6p-1 表达载体(4.9kb) 上 ,经过酶切和 PCR 鉴定确定所插入的基因大小正确。 DNA 序列测定证明所得克隆与预测序列完全相符。

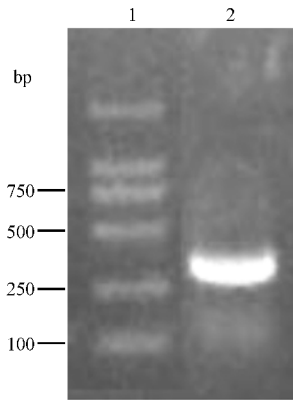


图 1 HR1-HR2 基因的 PCR 扩增图

Fig.1 PCR product of 2-Helix gene

1 : DNA molecular weight marker ; 2 : HR1-HR2 gene

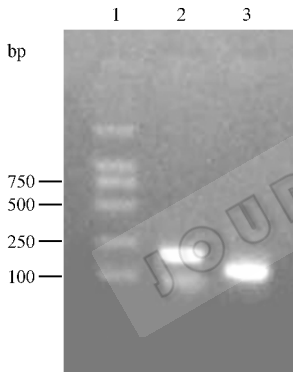


图 2 HR1 和 HR2 基因的 PCR 扩增图

Fig.2 PCR products of HR1 and HR2 genes

1 : DNA weight molecular marker ; 2 : HR1 gene ; 3 : HR2 gene

2.2 GST-HR1 ,GST-HR2 融合蛋白的表达及纯化

将 DNA 测序正确的重组质粒 pGEX-HR1 ,pGEX-HR2 分别转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中表达 ,超声破碎离心取上清 ,SDS-PAGE 鉴定。载体自身表达的 GST 蛋白分子量为 26kD ,HR1、HR2 多肽预测分子量为 7.0kD 和 4.7kD ,HR1、HR2 融合蛋白分子量大约为 33kD 和 30.7kD。 SDS-PAGE 结果显示所得融合蛋白与估计的大小相符(图 3)。融合蛋白经 GST-3C 酶切后 ,利用 GST 亲和层析纯化 ,收集穿过液 ,浓缩后由 SDS-PAGE 分析 ,结果显示所得的 HR1、HR2 蛋白分子量位置正确(图 4)。

2.3 HR1 和 HR2 相互作用分析

将 GST-HR2 和 HR1 蛋白混合 ,待作用一段时间后用 PBS 洗去未结合的蛋白 ,再用还原型谷胱甘肽

洗脱缓冲液洗脱吸附在填料上的蛋白 ,离心取上清 SDS-PAGE 鉴定。电泳结果(图 5)表明 GST-HR2 结合了 HR1 多肽 ,而对照 GST 则与 HR1 不结合 ,意味着 HR1 和 HR2 蛋白间存在相互作用。

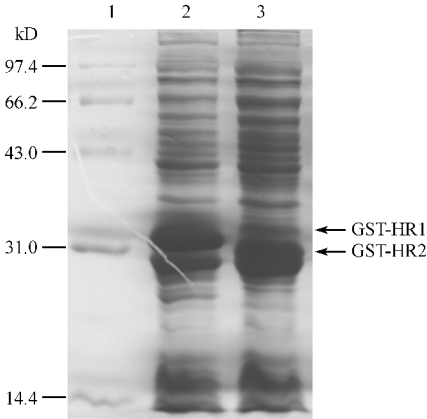


图 3 GST 融合蛋白的 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色图

Fig.3 SDS-PAGE analysis of fusion protein expression at 37℃ of 2-Helix , HR1 , HR2

1 : protein molecular weight marker ; 2 : supernatants of GST-HR1 ; 3 : supernatants of GST-HR2

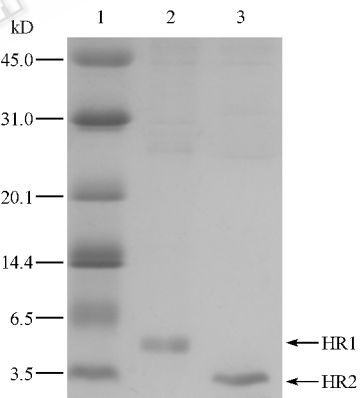


图 4 HR1 和 HR2 多肽的 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色图

Fig.4 SDS-PAGE analysis of purified HR1 and HR2 peptides

1 : protein molecular weight marker ; 2 : purified HR1 peptides ; 3 : purified HR2 peptides

2.4 HR1 和 HR2 的凝胶过滤层析

HR1 和 HR2 多肽凝胶过滤层析图谱显示 ,HR1 和 HR2 多肽混合物的 A_{280} 吸收峰在洗脱体积 162.5mL 处达到最高值(图 6) ,其峰位居于分子量 52kD(140mL)和 14.3kD(20mL)的蛋白洗脱峰位之间 ,表明 HR1 和 HR2 多肽混合物是以多聚体的形式存在的。从而再次证明 HR1 和 HR2 多肽之间存在相互作用。

2.5 HR1 和 HR2 的质谱分析

MALDI-TOF 质谱分析(图 7)表明 HR1 的分子量为 7.045kD ,HR2 分子量为 4.765kD ,与预测的分子

量大小相符,且杂峰强度较小,表达产物纯度较高。

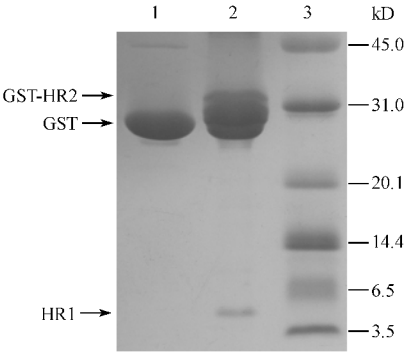


图 5 HR1 和 HR2 结合的 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色图
Fig.5 SDS-PAGE analysis of HR1 and HR2 interaction *in vitro*
1 : negative control ; 2 : GST-HR2 binding HR1 ;
3 : protein molecular weight marker

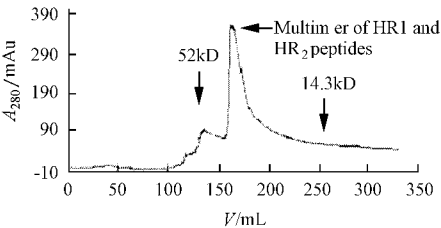


图 6 HR1 和 HR2 的凝胶过滤层析
Fig.6 profile of gel filtration of HR1and HR2 peptides
HR1 and HR2 peptides run on Superdex G75 gel filtration.
The peptides was eluted about 162.5mL between eluted
volumes corresponding to 52kD and 14.3kD protein standards

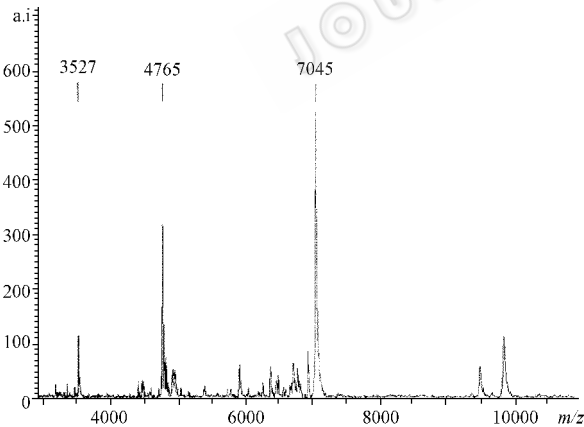


图 7 MALDI-TOF 质谱分析结果
Fig.7 Mass spectroscopy analysis of HR1 and HR2

3 讨论

副粘病毒科的许多成员能够引起人及动物的传染病,严重侵害了人类的健康,并给畜牧养殖业带来了巨大的损失^[16]。由 NDV 感染引起的新城疫已经成为我国养鸡业威胁最大的一种传染病;而给儿童健康造成重大伤害的 RSV,我们至今没有找到很好

的预防措施。因此研究预防和治疗此类病毒引起的人及动物的传染病成为紧要且有意义的事情。

大量的研究结果证明,具囊膜的副粘病毒可能采取相似的侵染机制——由 F 蛋白介导的膜融合^[17,18]。F 蛋白的 HR 区则成为近年来研究的热点。通过 F 蛋白突变和含有 HR 区序列多肽的结构和功能研究,HR1 和 HR2 的核心作用已经被证实。但是在融合之前和融合中间体存在时 HR1 和 HR2 的结构形态并经历了怎样的构象变化还不清楚。对 HR2 的突变研究显示,突变之后对 F 蛋白的细胞内转运和表面表达没有明显的影响,表明 HR2 对 F 蛋白融合前结构的形成没有直接作用。而对 HR1 氨基端(氨基酸 130-170)α 点的突变却干扰了起始编码的 F 蛋白的正确折叠^[19]。Morrison 等人的研究表明,HR2 还能够与 HN 蛋白结合,突变掉 HN 蛋白中参与结合的几个氨基酸后,这种结合作用就消失了^[20]。目前对融合中间体的结构还只是推测。MuV 与红细胞和 CV-1 细胞的融合现象早已被证实,而且膜融合的发生需要 F 和 HN 蛋白的共表达,但有关 HR 结构域是否有着相互作用及其融合后形成怎样的结构未见报道。

本研究采用 GST pull-down 法证实了 MuV 融合蛋白七肽重复序列在体外能够结合,凝胶过滤层析表明 HR1 与 HR2 能够形成多聚体,预示在 MuV 的侵染过程中,HR1 和 HR2 可能相互作用形成类似其它副粘病毒的三聚体核心结构;同时外源含有 HR 区同源多肽的加入可能与病毒本身的 HR 序列竞争结合而阻止膜融合的发生。这不仅进一步证实了由 F 蛋白介导的膜融合侵染机制的可能性,而且为抑制或清除病毒的药物设计提供了很好的思路。实验中发现,HR1 蛋白由于其富含疏水性氨基酸而易于吸附在亲和层析柱上,这与 NDV HR1 多肽的性质是一致的^[21]。需要提高还原型谷胱甘肽洗脱缓冲液中盐的浓度并适当延长洗脱时间才能得到比较高的得率。本文在大肠杆菌中表达了 HR1 和 HR2 多肽,利用质谱和 GST pull-down 等实验手段进行了分析研究,鉴定了 HR1 和 HR2 的确切分子量,证实 HR1 和 HR2 间的相互作用,为下一步 F 蛋白核心结构分析和包括融合抑制在内的功能研究打下了良好的基础。

REFERENCES(参考文献)

[1] Wild TF, Malvoisin E, Buckland R. Measles virus : both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J Gen Virol*, 1991, 72(2) :439 - 442
[2] Lamb RA. Paramyxovirus fusion : a hypothesis for changes. *Virology* 1993, 197 : 1-14
© 中国科学出版社生物物理研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [3] Tanabayashi K, Takeuchi K, Okazaki K *et al.* Expression of mumps virus glycoproteins in mammal/Lalian cells from cloned cDNAs : both F and HN proteins are required for cell fusion. *Virology*, 1992, **187** : 801 – 804
- [4] Hernandez LD, Hoffman LR, Wolfsberg TG *et al.* Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1996, **12** : 627 – 661
- [5] Buckland R, Malvoisin E, Beauverger P *et al.* A leucine zipper structure present in the measles virus fusion protein is not required for its tetramerization but is essential for fusion. *J Gen Virol*, 1992, **73** (7) : 1703 – 1707
- [6] Reitter JN, Sergel T, Morrison TG. Mutational analysis of the leucine zipper motif in the Newcastle disease virus fusion protein. *J Virol*, 1995, **69** : 5995 – 6004
- [7] Sergel GT, McQuain C, Morrison T. Mutations in the fusion peptide and heptad repeat regions of the Newcastle disease virus fusion protein block fusion. *J Virol*, 1994, **68** : 7654 – 7658
- [8] Lambert DM, Barney S, Lambert AL *et al.* Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93** : 2186 – 2191
- [9] Wild TF, Buckland R. Inhibition of measles virus infection and fusion with peptides corresponding to the leucine zipper region of the fusion protein. *J Gen Virol*, 1997, **78** (1) : 107 – 111
- [10] Young JK, Hicks RP, Wright GE *et al.* Analysis of a peptide inhibitor of paramyxovirus (NDV) fusion using biological assays, NMR, and molecular modeling. *Virology*, 1997, **238** : 291 – 304
- [11] Young JK, Li D, Abramowitz MC, Morrison TG. Interaction of peptides with sequences from the Newcastle disease virus fusion protein heptad repeat regions. *J Virol*, 1999, **73** : 5945 – 5956
- [12] Chen L, Gorman JJ, McKimmol-L BJ *et al.* The structure of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus suggests a novel paradigm for the molecular mechanism of membrane fusion. *Structure(Camb)*, 2001, **9** : 255 – 266
- [13] Zhao X, Singh M, Malashkevich VN *et al.* Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** : 14172 – 14177
- [14] Simone DC, Baldeschwieler JD. Membrane fusion of mumps virus with ghost erythrocytes and CV-1 cells. *Virology*, 1992, **191** : 338 – 345
- [15] Zhu JQ(朱杰青), Tien K(田波), Gao K(高福) *et al.* Biochemical and biophysical analysis of heptad repeat regions from the fusion protein of Menangle virus, a newly emergent paramyxovirus. *Arch Virol*, 2003, **148** : 1301 – 1316
- [16] Yu M(于明), Wang EX(王恩秀), Liu YF(刘有放) *et al.* Six-helix bundle assembly and characterization of heptad repeat regions from the F protein of Newcastle disease virus. *J Gen Virol*, 2002, **83** : 623 – 629
- [17] Morrison TG. Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **161**(4) : 73 – 84
- [18] Peisajovich SG, Shai Y. New insights into the mechanism of virus-induced membrane fusion. *Trends Biochem Sci*, 2002, **27** : 183 – 190
- [19] Sergel T, McGinnes L, Morrison T. Role of a conserved sequence in the maturation and function of the NDV HN glycoprotein. *Virus Res*, 1993, **30** : 281 – 294
- [20] Gravel KA, Morrison TG. Interacting domains of the HN and F proteins of newcastle disease virus. *J Virol*, 2003, **77** : 11040 – 11049
- [21] Zhu JQ(朱杰青), Li PY(李朋运), Gao K(高福) *et al.* Design and analysis of post-fusion 6-helix bundle of heptad repeat regions from Newcastle disease virus F protein. *Protein Eng*, 2003, **16** : 373 – 379

Expression and Purification of Heptad Repeat Region of the Mumps Virus F Protein and Analysis of Characteristics

LIU Yue-Yong¹ FENG Ming-Guang¹ ZHU Jie-Qing² JIANG Li-Jie³ Tien Po^{2*}

¹(Institute of Microbiology, College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

²(Department of Molecular Virology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

³(Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract Two Heptad repeat motifs (HR1 and HR2) from paramyxoviruses F protein could form thermostable heterodimers containing high α -helix while virus infected host cell. Following that the viral membrane and the host cell membrane were juxtaposed, which leads to membrane fusion. Mumps virus (MuV) is a member of the genus *Rubulavirus* in the family of *Paramyxoviridae*. MuV could use similar infection mechanism as well as other paramyxoviruses. In this study the HR1 and HR2 regions of MuV F protein were predicted by a computer program and expressed in *E. coli* with the GST fusion expression system. The GST fusion or GST-removed proteins were purified with Gluthathion Sepharose 4B Column. GST pull-down experiment suggested the interaction of HR1 and HR2 peptides, and analysis of gel filtration showed two peptides could form multimer, which indicates that the HR regions of MuV F protein may play an important role in virus fusion.

Key words Mumps virus (MuV), F protein, HR1, HR2, GST pull-down

Received : 10-29-2003

This work was supported by grants from National 973 Project (No. G1999075602).

* Corresponding author. Tel : 86-10-62554247 ; E-mail : tienpo@sun.im.ac.cn

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>