

美洲商陆抗病毒蛋白-Ⅱ基因的克隆和表达

Cloning and Expression of Pokeweed Antiviral Protein-Ⅱ Gene from the Summer Leaves of *Phytolacca americana*

黄建松,詹金彪*,邹媛,冯微宏

HUANG Jian-Song, ZHAN Jin-Biao*, ZOU Yuan and FENG Wei-Hong

浙江大学医学院生物化学与分子生物学教研室 杭州 310006

Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China

摘 要 根据报道的 cDNA 序列,用 RT-PCR 的方法从美洲商陆夏季的叶片中克隆美洲商陆抗病毒蛋白-Ⅱ(pokeweed antiviral protein Ⅱ, PAP-Ⅱ)基因。将 PAP-Ⅱ 基因克隆至表达载体 pET-28a(+)并在大肠杆菌中表达,SDS-PAGE 电泳分析结果表明,PAP-Ⅱ 蛋白在 BL21(DE3)菌中获得表达,表达产物以不溶性包涵体形式存在,经过溶解包涵体、复性和 BBST NTA 树脂柱亲和层析纯化,获得高纯度的 PAP-Ⅱ 蛋白。用非放射性基于 ELISA 方法检测经过复性纯化后 PAP-Ⅱ 蛋白和蓖麻毒素 A 链(RTA)在体外对 HIV-1 整合酶有较强的抑制活性,其 IC₅₀ 分别约为 303 μg/mL,220 μg/mL。用 MTT 法分析 PAP-Ⅱ 蛋白的生物学活性,复性纯化后蛋白对 HEP-G2 和 HeLa 细胞有细胞毒作用,IC₅₀ 分别为 93 μg/mL,102 μg/mL,说明了 PAP-Ⅱ 蛋白能抑制肿瘤细胞的生长。构建的 PAP-Ⅱ 表达系统所表达的蛋白经复性后具有生物学活性,为进一步研究 PAP-Ⅱ 的抗 HIV-1 机制和抗肿瘤作用奠定了基础。

关键词 核糖体失活蛋白,美洲商陆抗病毒蛋白-Ⅱ, HIV-1 整合酶,表达,细胞毒性

中图分类号 R996.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0592-06

Abstract The cDNA sequence encoding pokeweed antiviral protein-Ⅱ was cloned from the fresh summer leaves of *phytolacca americana* by RT-PCR. The recombinant PAP-Ⅱ was subcloned into the expression vector pET-28a(+) and expressed in *E. coli* BL21 after IPTG induction. SDS-PAGE analysis showed that the expressed PAP-Ⅱ existed in the form of inclusion bodies. The purified fusion protein was obtained after a series of steps including cell break, inclusion body solubilization, protein refolding and purification through BBST NTA resin column. The non-radioactive ELISA-based HIV-1 integrase assay showed that the recombinant pokeweed antiviral protein-Ⅱ and RTA were able to inhibit HIV-1 integrase to some extent (IC₅₀ = 303 μg/mL, 220 μg/mL respectively). MTT assay showed that cytotoxicity of pokeweed antiviral protein Ⅱ for HEP-G2 cells and HeLa cells was in a dose-dependent manner with IC₅₀ s of 93 μg/mL and 102 μg/mL, respectively. The results suggested that pokeweed antiviral protein-Ⅱ is a potent anti-tumor candidate. The finding of integrase inhibitory activity and the discovery of cytotoxicity provide more insights into the anti-HIV and the anti-tumor activities of PAP-Ⅱ.

Key words ribosome inactivating protein, pokeweed antiviral protein Ⅱ, cloning, gene expression, HIV-1 integrase, cytotoxicity

Received: January 4, 2006; Accepted: April 5, 2006.

This work was supported by a grant from The Natural Science Foundation of China (No. 30270294).

* Corresponding author. Tel: 86-571-87217154; E-mail: zhan2k@zju.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(No.30270294)

美洲商陆抗病毒蛋白 (pokeweed antiviral proteins, PAPs) 是在美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 的不同组织或不同生长阶段合成的一类具酶功能的核糖体失活蛋白 (ribosome-inactivating proteins, RIPs), 有多种类型, 即 PAP-I, PAP-II, PAP-S, PAP-R^[1], 分别分离自春天、夏天的叶片、种子、根。其中 PAP-I 和 PAP-II 的基本结构几乎没有同源性, 两种蛋白是美洲商陆在不同时期不同基因所表达的产物。美洲商陆抗病毒蛋白-Ⅱ (pokeweed antiviral protein II, PAP-II) 具有 RNA *N*-糖苷酶的活性, 能专一地使真核生物核糖体 28S rRNA 的第 4324 位^[2] 和原核生物核糖体 23S rRNA 的第 2600 位^[3] 切下一腺嘌呤, 使其难以与蛋白质合成的延伸因子 EF-2 结合, 从而阻碍了蛋白质的合成。有研究表明 PAP-II 对多种植物病毒有抑制作用^[4]、对人类免疫缺陷型病毒 (HIV-1) 的 RNA 有脱嘌呤作用^[5], 同时还用于制成免疫毒素而杀伤肿瘤细胞^[6], 因此 PAP-II 是一种广谱性抗病毒、抗肿瘤蛋白, 具有广阔的实用价值。目前在国内外已报道 PAP-I 的克隆表达^[7-9], 但迄今国内未见 PAP-II 的克隆、表达的报道。本实验室, 从新鲜的美洲商陆夏季的叶片中成功地克隆了 PAP-II 的基因序列, 构建了原核表达载体, 并在大肠杆菌 BL21 中成功地表达了 PAP-II, 为进一步研究 PAP-II 的抗病毒、抗肿瘤的作用机理提供了研究平台。

1 材料和方法

1.1 叶片、菌株、质粒载体和细胞

1.1.1 美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 植物夏季的新鲜叶片采自浙江杭州的宝石山。

1.1.2 大肠杆菌 BL21 (DE3), JM109 为本实验室保存。

1.1.3 质粒 pMD18-T simple vector、pET-28a (+) 表达载体分别购自 TaKaRa 公司、Novagen 公司。质粒 pBluescript SK 由本校动物预防医学研究所惠赠。

1.1.4 HEP-GX (肝癌细胞), HeLa (人宫颈癌细胞) 细胞株均由本校免疫研究所提供。

1.2 工具酶、寡核苷酸链及化学试剂

T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Nde*I、*Hind*III、*Sma*I 为 TaKaRa (大连) 有限公司产品; 蓖麻毒素 A 链 (RTA) 由本实验室的邹媛表达纯化, 纯度 95% 左右; 寡核苷酸链 VU5BR (5'-biotin-GTGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3')、寡核苷酸链 VU5 (5'-ACTGCTAGAGATTTTCCACAC-3') 由上海生工公

司合成; 蛋白纯化用 BBST NTA 树脂购自上海博彩公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 试剂盒

UNIQ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒、AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒、PCR 扩增试剂均为上海生工公司产品。DNA 切胶回收试剂盒购自杭州维特洁公司, 质粒小量抽提试剂盒购自 Omega 公司。

1.4 美洲商陆抗病毒蛋白-Ⅱ (PAP-II) 基因的克隆

1.4.1 引物设计 根据 GenBank 中的美洲商陆抗病毒蛋白-Ⅱ 编码序列 (X78628), 设计 2 条引物, 在正向引物的 5' 端引入 *Nde*I 酶切位点, 在互补链引物的 5' 端引入 *Hind*III 酶切位点 (下划线)。

正向引物: 5'-GCC ATA TGC TGA TGC TTA CAC CAC CA-3'

互补链引物: 5'-CCA AGC TTA CTC GAA TTC ACC AAG GTT ACT A-3'

引物由上海生工公司合成。

1.4.2 总 RNA 提取: 取新鲜的美洲商陆夏季的叶片, 用上海生工公司的 UNIQ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒, 按操作说明书提取叶片组织的总 RNA。

1.4.3 PAP-II 基因的扩增: 按照常规的方法进行 RT-PCR, 具体方法参见上海生工 AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒、PCR 扩增试剂说明书。

1.4.4 PCR 产物的克隆: 把 PCR 产物与 pMD18-T simple vector 连接, 转化 JM109 感受态细胞, 经蓝白斑筛选、酶切鉴定, 挑选 PAP-II 基因阳性克隆, 命名为 pMD-PAP-II。DNA 测序委托上海生工公司完成; 酶切反应、电泳、连接反应和大肠杆菌感受态的制备 (CaCl₂ 法) 及转化等操作均按分子克隆实验手册^[10] 介绍的方法进行。

1.5 表达载体的构建及鉴定

*Nde*I 和 *Hind*III 双酶切质粒 pMD-PAP-II, DNA 切胶回收试剂盒回收纯化目的片段 PAP-II, 估计其含量。*Nde*I 和 *Hind*III 双酶切表达载体质粒 pET-28a (+), DNA 切胶回收试剂盒回收纯化目的片段, 估计其含量。用 T4 DNA 连接酶定向连接 PAP-II 基因和表达载体 pET-28a (+), 得到重组质粒 pET-PAP-II。将 pET-PAP-II 转化 BL21 (DE3) 感受态细胞。在含有 100 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板培养基上铺板, 37°C 培养过夜后, 挑取单菌落接种到含有 100 μg/mL Kan 的 3 mL LB 液体培养基中 37°C 摇床培养过夜。用质粒小量抽提试剂盒抽提质粒, *Nde*I 和 *Hind*III 双酶切质粒, 质粒 PCR 鉴定, 琼脂糖电泳检测其片段大小, 以确定是否为阳性重组菌。pET-

PAP-Ⅱ表达质粒的构建见图1。

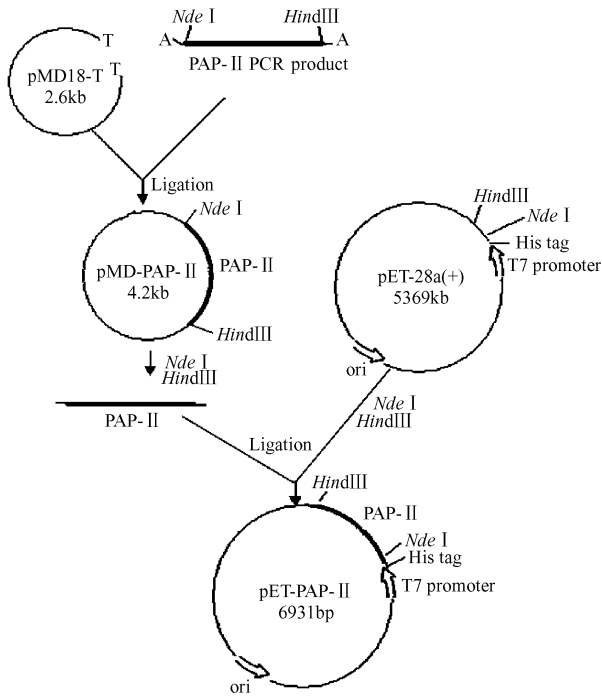


图1 pTE-PAP-Ⅱ重组质粒构建示意图

Fig.1 Construction of recombinant pTE-PAP-Ⅱ

1.6 PAP-Ⅱ融合蛋白的表达

1.6.1 PAP-Ⅱ基因的诱导表达 将含有正确表达载体 pET-PAP-Ⅱ的转化菌 BL21(DE3) 37℃培养过夜,按 1:100 稀释到含 100 μg/mL Kan 的 LB 培养基中,于 37℃摇床中以 250r/min 剧烈振摇,至菌液的 OD_{600} 值约为 0.7~0.9 加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1mmol/L,继续振摇 4~6h,收集菌液。用适量 PBS 悬浮细菌,再加入 5×上样缓冲液,100℃煮沸裂解 5min 4℃,12 000g 离心 3min,取上清进行 SDS-PAGE 电泳。

1.6.2 重组蛋白的纯化 诱导表达后收集的菌体用适量 PBS 重悬,超声破碎细胞,离心得包涵体,用洗涤液(2% Triton X-100, 0.1mol/L NaCl, 20mmol/L Tris pH 8.0)及双蒸水反复洗涤,包含体溶解于含 0.1mol/L Tris-Cl pH 8.0, 0.1mol/L NaCl, 8mol/L 尿素中,采用梯度透析(尿素浓度从 8mol/L, 4mol/L, 2mol/L, 1mol/L, 0.5mol/L, 0.25mol/L, 0.1mol/L, 0)的方法进行蛋白质复性。复性液 12 000r/min, 4℃离心 15min,收集上清。预先用结合缓冲液(20mmol/L Tris-HCl pH7.9, 500mmol/L NaCl, 10% 甘油)平衡的 BBST NTA 树脂柱,复性蛋白溶液对结合缓冲液透析后上样;10 倍 NTA 体积上样结合缓冲液洗涤;5 倍 NTA 体积的含 50mmol/L 咪唑的结合缓冲液洗涤;5 倍 NTA 体积的含 300mmol/L 咪唑的结合缓冲液洗

脱,1.0mL/管部分收集;12% SDS-PAGE 分析,收集含纯化蛋白的各管,于 PBS 中透析去除 NaCl 和咪唑;-70℃冻存,并用 Bradford 法测量蛋白质含量^[11]。

1.7 PAP-Ⅱ对大肠杆菌生长的影响

将含有正确表达载体 pET-PAP-Ⅱ的转化菌 BL21(DE3) 37℃培养过夜,按 1:100 稀释到含 100 μg/mL Kan 的 LB 培养基中,3.5h 后加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L 37℃摇床中以 250r/min 剧烈振摇,每半小时测一次菌液的 OD_{600} 值。

1.8 非放射性基于 ELISA 方法检测 PAP-Ⅱ对 HIV-1 整合酶活性

非放射性基于 ELISA 方法按照文献中的方法进行^[11],作少许修改。

1.8.1 受体 DNA(病毒 DNA)的准备 将质粒 pBluescript SK(+),用 *Sma* I 单酶切使之线性化。切胶回收的 DNA 溶解在缓冲液(20mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 20mmol/L EDTA, 2mol/L NaCl)中,DNA 终浓度为 10μg/mL,加入 96 孔板中,每孔 100μL,即每孔 DNA 包被量为 1μg 4℃包被过夜。

1.8.2 生物素标记的供体 DNA(宿主 DNA)的准备 由生工合成的二条寡核苷酸链 VU5BR、VU5 分别溶解在缓冲液(10mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1mmol/L EDTA, 0.1mol/L NaCl)中,等摩尔混合,80℃加热 5min,室温放置 30min 退火形成双链。存于 -20℃。

1.8.3 PAP-Ⅱ对整合酶的抑制作用 将包被过夜的 96 孔板用双蒸水洗 3 次,250μL BSA 37℃封闭 1h,再用双蒸水洗板 3 次,每孔加缓冲液(10mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 10mmol/L MnCl₂, 100μg/mL BSA, 10mmol/L DTT, 20mmol/L NaCl, 0.05% Nonidet) 150μL,另加生物素标记的供体 DNA 5pmol,整合酶 50pmol,每孔加入纯化后的重组 PAP-Ⅱ样品或 RTA 样品至终浓度为 1200、600、300、150、75μg/mL 混合物在 37℃温育 1h,双蒸水洗板 3 次,每孔再加入 100μL 亲和素标记的辣根过氧化物酶(1×PBS 1:4000 稀释)37℃温育 1h,双蒸水洗板 3 次,每孔加 100μL TMB 静置 10min 后,加 50μL 2mol/L H₂SO₄ 终止反应。用酶标仪检测,波长为 450 nm,计算抑制率。

1.9 重组蛋白 PAP-Ⅱ的细胞毒性分析

采用 MTT 法测定。HEP-G2 和 HeLa 细胞在含有 10% 灭活小牛血清的 RPMI 1640 (pH 7.0~7.2) 培养基中 37℃,5% CO₂ 条件下培养。常规传代后取对数生长期细胞,用培养液调整至浓度为 5.0×10^5 Cn

个/mL。在 96 孔板中按 $200\mu\text{L}$ /孔加此细胞液,继续孵育 24h 然后,每孔加入纯化后的重组美洲商陆抗病毒蛋白-Ⅱ 样品至终浓度为 0.04、0.4、4、40、 $400\mu\text{g}/\text{mL}$,每个浓度 5 个复孔,对照孔中只加细胞液。继续培养 24~48h 后,按 $15\mu\text{L}$ /孔加入 $5\text{mg}/\text{mL}$ MTT,继续培养 4~6h 后吸尽培养液,再按 $200\mu\text{L}$ /孔加入二甲基亚砜,待完全溶解后用酶标仪测定各孔的 A_{490} 值。计算致死率,公式为:致死率=(对照组 A 值-实验组 A 值)/对照组 A 值。

2 实验结果

2.1 PAP-Ⅱ 基因片段的扩增

从新鲜的美洲商陆夏季的叶片中抽提的总 RNA。以提取的总 RNA 为模板进行 RT-PCR,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,获得一条大小为 900 bp 左右的片段,与预期大小相符。结果见 Fig. 2A。

2.2 重组表达载体的构建与鉴定

将目的片段和克隆载体 pMD18-T 的连接产物转化 JM109, 37°C 培养过夜后挑取单个菌落,提取质粒后用 *Nde*I 和 *Hind*III 双酶切消化,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果见 Fig. 2 B。DNA 测序结果进一步证实插入的目的基因片段与 GenBank 发表序列完全一致。

2.3 重组表达载体的鉴定

重组表达质粒 pET-PAP-Ⅱ 经 *Nde*I 和 *Hind*III 双酶切鉴定,可得到两条大小分别为 5.9kb 和 900bp 左右的片段,结果见 Fig. 2 C,符合预期结果。

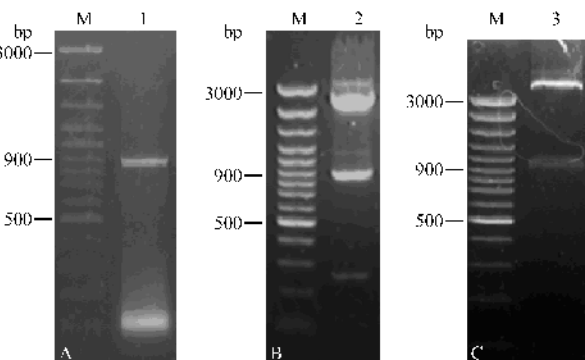


图 2 PAP-Ⅱ 基因片段的 RT-PCR 扩增产物、重组质粒的酶切结果的电泳分析

Fig. 2 RT-PCR and identification of recombinant plasmid M :DNA marker ; 1 :RT-PCR product of PAP-Ⅱ gene ; 2 :pMD-PAP-Ⅱ / *Nde*I + *Hind*III ; 3 :pET-PAP-Ⅱ / *Nde*I + *Hind*III .

2.4 PAP-Ⅱ 的表达

含 pET-PAP-Ⅱ 的 BL21 经 $1.0\text{mmol}/\text{L}$ IPTG 37°C 诱导表达 4~5h。菌液及菌体超声破菌后沉淀和上

清 12% SDS-PAGE 电泳,经诱导菌液泳道及超声沉淀泳道均可见一分子量约为 35 kD 的目的条带,而未诱导菌液与超声上清无相应条带。这说明 PAP-Ⅱ 以包含体形式正确表达见 Fig. 3。包涵体经 SDS-PAGE 电泳,凝胶分析系统分析,该蛋白占包涵体总蛋白的 16.5%,表达量大约为每升培养物 5mg 蛋白质。

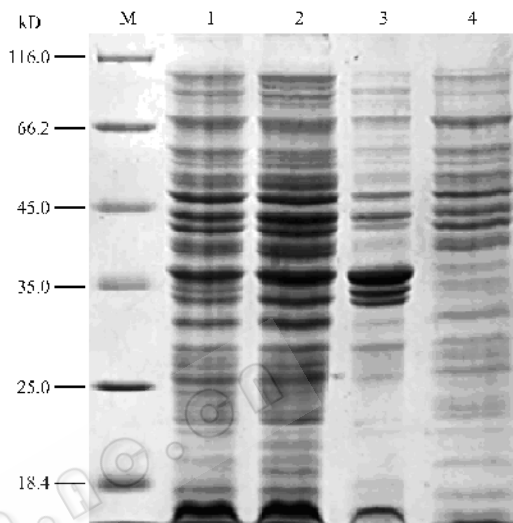


图 3 PAP-Ⅱ 蛋白诱导表达结果

Fig. 3 12% SDS-PAGE analysis of the expression of pokeweed antiviral protein-Ⅱ in *E. coli*

M : Protein molecular standard marker ; 1 : *E. coli* BL21(DE3) pET-PAP-Ⅱ induced with IPTG ; 2 : *E. coli* BL21(DE3) pET-PAP-Ⅱ before IPTG induction ; 3 : pellet of BL21(DE3) pET-PAP-Ⅱ bacterial lysate ; 4 : supernatant of BL21(DE3) pET-PAP-Ⅱ bacterial lysate .

2.5 包含体的复性及蛋白纯化

包涵体用洗涤液及双蒸水反复洗涤,复性,SDS-PAGE 显示,纯化结果见 Fig. 4,其纯度大于 90%。并用 Bradford 法测量蛋白含量,蛋白经过纯化后的浓度为 $0.045\mu\text{g}/\text{mL}$,蛋白的回收率在 0.9% 左右。

2.6 PAP-Ⅱ 对大肠杆菌的生长的抑制作用

用 IPTG 诱导表达 PAP-Ⅱ 时,大肠杆菌的生长明显的受到了抑制,见 Fig. 5。

2.7 美洲商陆抗病毒蛋白-Ⅱ 对 HIV-1 整合酶的抑制作用

用非放射性基于 ELISA 方法检测 PAP-Ⅱ 蛋白与蓖麻毒素 A 链(RTA)对 HIV-1 整合酶活性,发现 PAP-Ⅱ、RTA 在体外都对 HIV-1 整合酶有一定的抑制作用,用 Reed-Muench 法计算 IC_{50} ,PAP-Ⅱ 和 RTA 抑制 HIV-1 整合酶的 IC_{50} 分别为 $303\mu\text{g}/\text{mL}$, $220\mu\text{g}/\text{mL}$,见 Fig. 6。

2.8 美洲商陆抗病毒蛋白-Ⅱ 的细胞毒性鉴定

不同浓度 PAP-Ⅱ 对 HEP-2 和 HeLa 细胞的抑

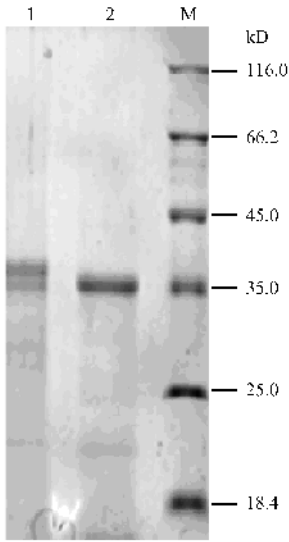


图4 PAP-II 蛋白复性和纯化结果

Fig.4 Renatured and purified PAP-II

M : protein molecular standard marker ; 1 :renatured PAP-II ; 2 :purified renatured PAP-II .

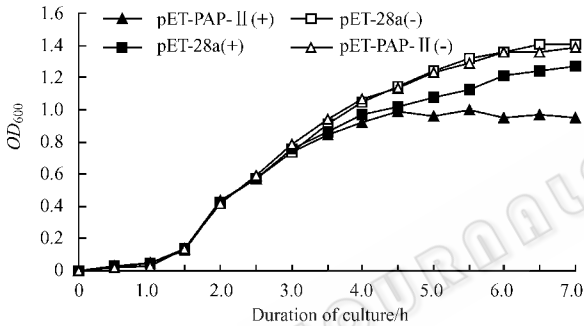


图5 PAP-II 对大肠杆菌 BL21 的生长抑制作用

Fig.5 Expression of recombinant pokeweed antiviral protein II in *E. coli*

Time-course of bacterial growth of *E. coli* strain BL21 in LB medium and IPTG was added to the medium to a final concentration of 1mmol/L when bacteria were growth for 3.5h. Triangle symbols indicate bacteria transformed with pET28-PAP-II while square symbols indicate bacteria transformed with pET-28a (+). Open symbols indicate the bacterial growth of non induction by IPTG while closed symbols indicate the bacterial growth of *E. coli* after induction by IPTG.

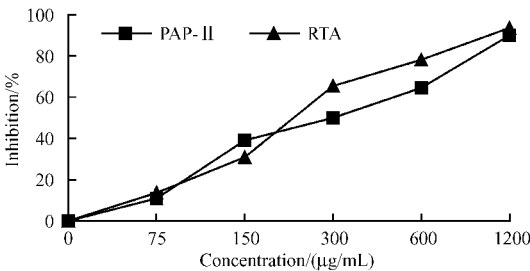


图6 PAP-II 对 HIV-1 整合酶的抑制作用

Fig.6 Concentration-response curves for inhibition of HIV-1 integrase by pokeweed antiviral protein-II and RTA

制活性(每个稀释浓度作5个重复实验,结果取其平均值),由结果可以看出,PAP-II对HEP-G2和Hela细胞的抑制活性,用Reed-Muench法计算 IC_{50} ,分别为 $93\mu\text{g/mL}$, $102\mu\text{g/mL}$,见Fig.7。

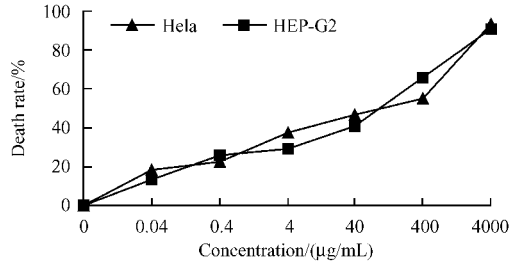


图7 PAP-II 对 Hela 和 HEP-G2 的杀伤作用

Fig.7 Cytotoxicity of PAP-II protein on HEP-G2 cells and Hela cells

3 讨论

RIPs 是一类专一修饰核糖体大亚基 28S/23S rRNA 而使核糖体失活的生物毒素,按其结构的不同可分为 I 型和 II 型两种类型。I 型 RIP 由一条多肽链组成,目前已在多种植物中鉴定纯化出 I 型 RIP,如丝瓜籽核糖体失活蛋白(luffin)、天花粉毒蛋白(TCS)、苦瓜 MAP30 蛋白等等。II 型 RIP 由 A 链和 B 链组成,如蓖麻毒素(ricin)、相思子毒素(abrin)、欧寄生毒素(viscumin)等。核糖体失活蛋白的强大杀伤作用被用于肿瘤的治疗,用抗体携带核糖体失活蛋白靶向杀伤肿瘤细胞的所谓免疫毒素的设想已经得到了实现,目前国际上已有多个实验室正在从事抗多种肿瘤和 AIDS 病的免疫毒素的研究。最早学者认为 RIP 的 HIV-1 活性与其抑制蛋白质的合成有关^[12],后来 Francis^[13]等对 PAP-I、PAP-II、PAP-III 三种美洲商陆的研究表明,这三种美洲商陆抗病毒蛋白都能抑制人外周血单核细胞内的 HIV-1 病毒的复制, IC_{50} 分别是 15nmol/L 、 25nmol/L 、 16nmol/L ,并发现它们对 HIV-1 的 RNA 有脱嘌呤作用。Wang^[14]等人研究发现美洲商陆病毒蛋白通过与蛋白质翻译起始因子 4G 和异 4G 相结合,使病毒 RNA 脱嘌呤。另外有研究发现核糖体失活蛋白 MAP30 和 GAP31、saporin、luffin 在体外对 HIV-1 整合酶有抑制作用^[15-16]。

本研究根据 Poyet 等报道^[19]的 PAP-II 的 cDNA 序列,设计合成了 PCR 引物,以 RT-PCR 的方法从夏季美洲商陆新鲜叶片中扩增出 PAP-II 的基因编码序列,并克隆了其原核表达载体 pET-PAP-II,以此转化大肠杆菌 BL21(DE3)表达 PAP-II 在大肠杆菌中

的表达,显著的抑制大肠杆菌的生长,故在细菌的 OD 值在 0.7~0.9 时,加入 IPTG 诱导下表达目的蛋白,目的蛋白以包涵体的形式表达。我们试图通过改变 IPTG 的浓度、低温延长诱导时间、改变表达质粒载体(用 pKK223.3 质粒)更改宿主菌等方法使目的蛋白以可溶性的形式表达,但都未能成功。最后我们用大肠杆菌原核表达体系以包涵体的形式表达出了 PAP-Ⅱ,并通过复性获得了有活性的表达产物,复性的产物对 HIV-1 整合酶有较强的抑制作用,对 HEP-G2 和 HeLa 有细胞毒作用。

复性的表达产物对 HIV-1 整合酶在体外有较强的抑制作用,其 IC_{50} 约为 $303\mu\text{g}/\text{mL}$,提示了 PAP-Ⅱ 可以通过抑制病毒的整合酶途径发挥抗病毒的作用,同时我们做了 RTA 对整合酶的抑制作用的实验,发现 RTA 也有抑制 HIV-1 整合酶的作用。结合 Lee-Huang^[15]等发现核糖体失活蛋白 MAP30 和 GAP31 在体外对 HIV-1 整合酶有抑制作用,Au^[16]等研究了多种 RIP,发现 saporin、luffin 对 HIV-1 整合酶有强烈的抑制作用,提示我们核糖体失活蛋白可以通过抑制病毒的整合酶而抑制病毒的复制,但其作用机理有待进一步的研究。由于 HIV-1 病毒整合进入人类基因组的过程是 HIV 感染的重要步骤,RIP 可能对 AIDS 病的控制和治疗具有重要的临床应用价值。

使用 MTT 法证实了 PAP-Ⅱ 蛋白在体外对 HEP-G2 和 HeLa 肿瘤细胞的作用, IC_{50} 分别为 $93\mu\text{g}/\text{mL}$, $102\mu\text{g}/\text{mL}$ 表明 PAP-Ⅱ 能抑制 HEP-G2 和 HeLa 细胞的增殖,可以进一步制成免疫毒素而定向的杀死肿瘤细胞。

I 型 RIP 由于能使原核生物核糖体 23S rRNA 的第 2600 位^[3]切下一腺嘌呤,对宿主菌有毒性,表达较为困难^[17]。虽然我们成功地用大肠杆菌表达了 PAP-Ⅱ,并获得了有活性的表达产物。然而,本实验在表达条件和复性条件等方面仍需做进一步优化。同时,我们准备与临床病毒实验室合作共同研究其抗 HIV-1 活性的机理。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Bolognesi A, Barbieri L, Abbondanza A *et al.* Purification and properties of new ribosome-inactivating proteins with RNA N-glycosidase activity. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **1087**: 293 - 302
- [2] Endo Y, Tsurugi K. The RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. The characteristics of the enzymatic activity of ricin A-chain with ribosomes and with rRNA. *J Biol Chem*, 1988, **263**: 8735 - 8739
- [3] Hartley MR, Legname G, Osborn R *et al.* Single-chain ribosome inactivating proteins from plants depurinate Escherichia coli 23S ribosomal RNA. *FEBS Lett*, 1991, **290**(1-2): 65 - 68
- [4] Picard D, Kao CC, Hudak KA. Pokeweed antiviral protein inhibits bromo mosaic virus replication in plant cells. *J Biol Chem*, 2005, **280**: 20069 - 20075
- [5] Uckun FM, Rajamohan F, Pendergrass S *et al.* Structure-based design and engineering of a nontoxic recombinant pokeweed antiviral protein with potent anti-human immunodeficiency virus activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, **47**: 1052 - 1061
- [6] Qi L, Nett TM, Allen MC *et al.* GnRH-PAP hormonotoxin targets cytotoxicity to prostate cancer cell lines. *Urol Res*, 2003, **31**: 374 - 377
- [7] Rajamohan F, Doumbia SO, Engstrom CR *et al.* Expression of biologically active recombinant pokeweed antiviral protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2000, **18**: 193 - 201
- [8] Rajamohan F, Engstrom CR, Denton TJ *et al.* High-level expression and purification of biologically active recombinant pokeweed antiviral protein. *Protein Expr Purif*, 1999, **16**: 359 - 368
- [9] Zhao Y(赵玉), Wang XH(王锡锋), Zhou GH(周广和) *et al.* Expression of two deleted mutant of pokeweed antiviral protein genes in *Escherichia coli* and their antiviral activity. *Acta Phytotaxolgia Sinica*(植物病理学报), 2005, **35**: 270 - 273.
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [11] Chang YC, Ching TT, Syu WJ. Assaying the activity of HIV-1 integrase with DNA-coated plates. *J Virol Methods*, 1996, **59**: 135 - 140
- [12] Wang JH, Nie HL, Tam SC *et al.* Anti-HIV-1 property of trichosanthin correlates with its ribosome inactivating activity. *FEBS Lett*, 2002, **531**: 295 - 298
- [13] Rajamohan F, Venkatachalam TK, Irvin JD *et al.* Pokeweed antiviral protein isoforms PAP-I, PAP-Ⅱ, and PAP-Ⅲ depurinate RNA of human immunodeficiency virus (HIV)-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **260**: 453 - 458
- [14] Wang M, Hudak KA. A novel interaction of pokeweed antiviral protein with translation initiation factors 4G and iso4G: a potential indirect mechanism to access viral RNAs. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**: 1174 - 1181
- [15] Lee-Huang S, Huang PL, Huang PL *et al.* Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti-HIV plant proteins MAP30 and GAP31. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 8818 - 8822
- [16] Au TK, Collins RA, Lam TL *et al.* The plant ribosome inactivating proteins luffin and saporin are potent inhibitors of HIV-1 integrase. *FEBS Lett*, 2000, **471**: 169 - 172
- [17] Vepachedu R, Park SW, Sharma N *et al.* Bacterial expression and enzymatic activity analysis of ME1, a ribosome-inactivating protein