

蓝藻抗病毒蛋白-N 基因的克隆、表达、纯化及活性鉴定

陈伟, 韩波, 钱垂文, 刘秋英, 熊盛

暨南大学生物医药研究开发基地 广东省生物工程药物重点实验室 基因工程药物国家工程研究中心, 广州 510630

摘要: 蓝藻抗病毒蛋白-N (Cyanovirin-N, CVN) 具有强效抗 HIV 及其他包膜病毒活性, 该蛋白序列特殊, 难以重组制备, 在大肠杆菌细胞质中形成包涵体。本研究根据大肠杆菌密码子偏好性对 CVN 原始核苷酸序列进行优化, 通过多次 PCR 合成 SUMO-CVN 的全长 DNA 序列, 构建 pET3c-SUMO-CVN 重组表达质粒, 重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3), 获得表达菌株。通过对诱导剂浓度和诱导时间的优化, 发现以 0.5 mmol/L IPTG 在 20°C 诱导 24 h 可获得最高表达, SDS-PAGE 结果显示, SUMO-CVN 为可溶性表达, 表达量占菌体总蛋白的 28%; 经特异性的 SUMO 蛋白酶对融合蛋白进行酶切及两步 Ni-NTA 凝胶亲和层析可以得到纯度较高的重组 CVN 蛋白。ELISA 结果表明, 重组蛋白 CVN 与 gp120 蛋白有较高的亲和力。体外抗病毒活性实验表明, 重组蛋白 CVN 在纳摩尔浓度具有很好的抗 HSV-1 和 HIV-1/III_B 活性; 这为开发基于 CVN 的新型、高效抗病毒药物打下了基础。

关键词: 蓝藻抗病毒蛋白-N, 表达, 纯化, HSV-1, HIV-1

Expression, purification and activity determination of cyanovirin-N

Wei Chen, Bo Han, Chuiwen Qian, Qiuying Liu, and Sheng Xiong

Biomedical Research and Development Center, Guangdong Provincial Key Laboratory of Bioengineering Medicine, National Engineering Research Center of Genetic Medicine, Jinan University, Guangzhou 510630, China

Abstract: Cyanovirin-N (CVN) is an 11 kDa anti-HIV protein originally isolated from extracts of a cyanobacterium, *Nostoc ellipsosporum*. The protein binds with high affinity to the viral envelope glycoprotein gp120 and irreversibly inactivates diverse HIV strains. A fusion gene consisting of *cvn*, *sumo* and *6xHis* tag was synthesized by PCR according to the codon bias of *Escherichia coli*. The fusion protein is expressed in the cytoplasm of *E. coli* in a soluble form and up to 28% of the total protein. The recombinant CVN was purified to homogeneity by 2 rounds of Ni-NTA affinity chromatography and one round of SUMO protease cleavage. Bioactivity assay demonstrated that SUMO-CVN and CVN bound to gp120 with nanomolar concentration. In addition, CVN showed potent anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activities in *in vitro* cellular assays. Therefore, the 6xHis SUMO fusion expression and purification system provides a better approach for large scale production of CVN for further microbicide development.

Keywords: cyanovirin-N, expression, purification, HSV-1, HIV-1

Received: November 21, 2009; **Accepted:** February 9, 2010

Supported by: Ministry of Science and Technology of China (No. 2008BA163B05), Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-07-0376), the 211 Project of Jinan University.

Corresponding author: Sheng Xiong. Tel: +86-20-85222476; E-mail: xiongsheng@jnu.edu.cn

国家科技支撑计划 (No. 2008BA163B05), 教育部新世纪优秀人才计划 (No. NCET-07-0376), 暨南大学 211 经费资助。

蓝藻抗病毒蛋白-N (CVN) 是一种从蓝藻 (又名蓝细菌 *Cyanobacteria Nostoc ettiposporum*) 中分离得到的一种水溶性糖蛋白, 其独特的抗病毒活性最初是在一项抗人类免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 天然药物筛选计划中发现的, 后来的研究表明其具有广泛的抗病毒作用^[1]。天然 CVN 相对分子质量为 11 kDa, 一级结构含有 101 个氨基酸残基, 无翻译后的修饰, 带有 2 个内部二硫键。CVN 能特异地、高亲和性地结合在人免疫缺陷病毒 HIV-1 的衣壳蛋白 gp120 上有效降低 HIV-1 病毒对细胞的感染, 这一特点使它可以不受病毒变异的干扰^[2]。此外, CVN 具有抗流感病毒、埃博拉病毒、疱疹病毒和丙型肝炎病毒的活性^[3-5]。CV-N 具有较高的稳定性, 即使在很苛刻的物理化学条件下, 如在未加缓冲液的情况下反复冻融, 甚至沸水浴 (15 min) 都不会影响其结构或生物活性, 只有当二硫键被打断、还原或者烷基化时, CV-N 的活性才完全丧失^[6]; 这使得 CVN 蛋白成为一种很有价值的抗病毒药物。

CVN 蛋白分子量较小, 且分子中有 2 个二硫键, 使得该蛋白在大肠杆菌中表达困难^[7]。早在 CVN 发现之初, CVN 的重组表达研究就已经开始, 目前已在 大肠杆菌、酵母菌和植物细胞中表达成功, 但这些重组表达方法存在表达产量低、易形成包涵体且复性困难、易形成无活性的二聚体形式、融合表达出现氨基酸缺失、纯化方法复杂等缺点^[7-10]。

小分子泛素样修饰蛋白 (Small ubiquitin-like modifier, SUMO) 和泛素具有类似生物学功能, 广泛存在于真核细胞中, 发挥着调节蛋白质之间的相互作用 (SUMO 化和去 SUMO 化), 调节蛋白在核质间的运输, 帮助蛋白质在细胞内正确的定位, 调节蛋白质的转录活性以及抗泛素化等作用^[11]。SUMO 蛋白融合表达系统是一种有效地表达小分子量蛋白的表达方法, 具有抗蛋白酶解、增加重组蛋白表达量、促进蛋白正确折叠、能准确无误地切除融合标签、纯化工艺简单等优点^[12-14]。本研究利用 PCR 人工合成 CVN 的 DNA 系列, 通过分子伴侣 SUMO 融合 CVN 基因表达, 希望能通过 SUMO 的助折叠功能实现 CVN 的可溶性表达。同时还研究了重组蛋白

CVN 与 gp120 蛋白的亲合力以及体外抗病毒活性, 为进一步研究并得到一种高效的抗病毒药物奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒及细胞系

宿主菌大肠杆菌 BL21(DE3)、质粒 pET3c 由本室保存。质粒 pET3c-SUMO 由暨南大学医药生物技术研究开发中心黄亚东博士惠赠。单纯疱疹病毒 1 (HSV-1)F 株购自武汉大学病毒研究所。Vero 细胞、MT-4 细胞、HIV-1/IIIB 病毒购自美国典型菌种保藏中心 (ATCC)。

1.1.2 主要试剂

Taq 酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Nde* I、*Bam*HI 购自宝生物 (大连) 有限公司。IPTG、蛋白 Marker、引物由上海生工生物工程有限公司合成。Ni Sepharose TM 6 Fast Flow 购自 Amersham 公司。MTT、WST 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 合成 SUMO-CVN 全序列

如图 1 所示, 通过引物重叠延伸的方法合成 SUMO-CVN 的全长基因, 首先通过多次 PCR 合成 CVN 基因, 分别以 (F1-CVN、R1-CVN) 为引物对合成 A1、以 (F2-CVN、R2-CVN) 为引物对合成 A2、以 (F3-CVN、R3-CVN) 为引物对合成 A3、以 (F4-CVN、R4-CVN) 为引物对合成 A4、以 (F4-CVN、R5-CVN) 为引物对合成 A5, A5 含有 CVN 的全长 DNA 系列。以 pET3c-SUMO 为模板, F-sumo、R-sumo 为引物对, 合成的片段记为 B, B 含有 SUMO 全长 DNA 序列。利用 B 序列末端与 A5 序列前端的 20 bp 重叠互补序列, 以 B 和 A5 为模板, (F1-SUMO, R5-CVN) 为上下游引物对进行 PCR 反应, 反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收 DNA 片段, 得到 SUMO-CVN 全长 DNA 序列。

1.2.2 表达质粒的构建及序列分析

将质粒 pET3c 和 SUMO-CVN 全长序列分别用 *Nde* I 与 *Bam*HI 进行双酶切, 酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 回收酶切产物, 用 T4 DNA 连接酶

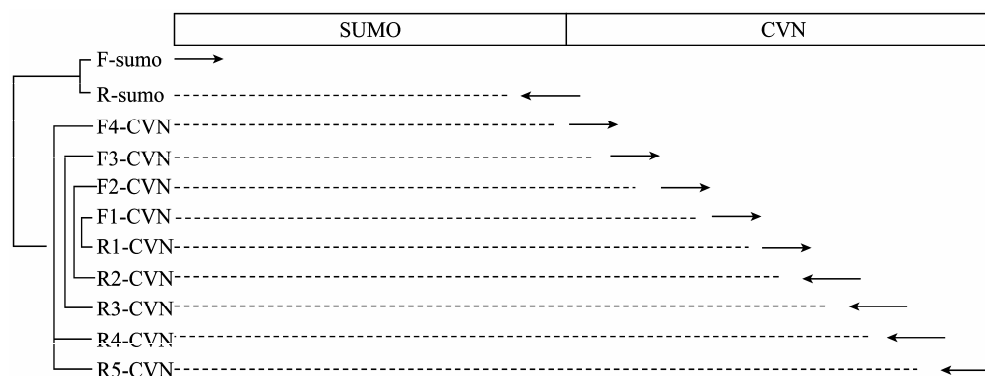


图1 CVN系列的人工合成策略

Fig. 1 PCR strategy for artificial synthesis of DNA containing CVN open reading frame.

把这两个酶切产物连接起来，构建成重组质粒 pET3c-SUMO-CVN。重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，PCR 及 *Nde* I 与 *Bam*HI 双酶切初步鉴定正确的质粒送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.2.3 表达菌株的筛选及诱导表达

测序正确的质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞，用含氨苄的平板筛选出阳性转化子，挑取单克隆到含氨苄的 LB 培养基中，37 $^{\circ}$ C 培养 12 h。然后按 1% 比例接种到含氨苄的新鲜 LB 培养基试管中，37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养至 $OD_{600}=0.6\sim 1.0$ 。加 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L，在 20 $^{\circ}$ C 下诱导 20 h，离心收集菌体，进行 12% 的 SDS-PAGE 分析，选择目的蛋白高表达的单克隆进行菌株保存。

1.2.4 SUMO-CVN 融合蛋白摇瓶发酵及纯化

选取高表达菌株接种到 1 L 含氨苄 (100 mg/L) 的 LB 培养基中，按 1.2.3 节中的条件，诱导 20 h 后，4 $^{\circ}$ C、6000 \times g 离心 10 min 收集菌体，-80 $^{\circ}$ C 冻融 1 次，然后将菌体沉淀以 1:10 比例重新悬浮于结合缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑)，超声破碎，4 $^{\circ}$ C、25 000 \times g 离心 30 min 收集上清和沉淀，12% 的 SDS-PAGE 对 SUMO-CVN 表达蛋白的可溶性进行分析。

1.2.5 CVN 蛋白纯化及鉴定

用结合缓冲液平衡 Ni-NTA 树脂，上完样后用洗脱缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mol/L NaCl, 40 mmol/L 咪唑) 进行洗脱，最后用洗脱缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mol/L NaCl, 200 mmol/L 咪唑) 进行目的蛋白 SUMO-CVN 的洗

脱。融合蛋白 SUMO-CVN 经 Sephadex G-25 分子筛脱咪唑，蛋白调整浓度至 1 mg/mL，加入 1 U SUMO 蛋白酶/mg 融合蛋白，在酶切缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 2% Igepal, 1.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L DTT) 中 30 $^{\circ}$ C 酶切 1 h。因 SUMO、SUMO 蛋白酶均含有 6 \times His 标签，酶切后的样品再经 Ni-NTA 亲和层析除去 SUMO、未酶切的 SUMO-CVN 和 SUMO 蛋白酶后得到目的蛋白 CVN。

1.2.6 CVN 精确分子量的测定

重组蛋白 CVN 脱盐后送暨南大学生命与健康工程研究院，用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 测定其分子量。

1.2.7 gp120 蛋白结合实验

用 ELISA 方法分析 SUMO-CVN 和 CVN 与 gp120 蛋白的结合能力，gp120 蛋白用包被缓冲液 (0.05 mol/L Na $_2$ CO $_3$, 0.05 mol/L NaHCO $_3$, pH 9.6) 溶解，96 孔板酶标板中每孔加入 100 μ L gp120 蛋白溶液，4 $^{\circ}$ C 包被过夜。用 PBST (0.1% Tween20 的 PBS) 洗板 3 次，再每孔加入 100 μ L 含 15% 牛血清的 PBST 于 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。PBST 洗板 3 次之后，每孔加入 100 μ L 的 10 倍系列稀释的待检测的蛋白样品，样品浓度从 10 $^{-6}$ μ g/mL 至 100 μ g/mL，每个浓度做 3 个复孔；同时 BSA 作为阴性对照，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。PBST 洗板 3 次之后，每孔加入 100 μ L CVN 的多克隆抗体 (1:4000 稀释)，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。PBST 洗板 3 次之后，每孔加入 100 μ L 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 Ig 的单克隆抗体，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。PBST 洗板 3 次之后 TMB 显色，2 mol/L H $_2$ SO $_4$ 终止显色，450 nm 测定

吸光值。

1.2.8 重组 CVN 蛋白抗疱疹病毒活性测定

单层 Vero 细胞中,加入不同稀释度的蛋白样品,5% CO₂ 培养 48 h,每孔加入 5 mg/mL MTT 10 μL,5% CO₂ 继续培养 4 h,弃上清液,每孔加入 200 μL DMSO,室温避光放置 30 min,振荡培养板 10 min 左右,酶标读数仪比色(波长 570 nm,参比波长 630 nm),测定吸光度并计算样品的半数毒性浓度(50% cytotoxic concentration, CC₅₀)。

单层 Vero 细胞中,加入不同稀释度的蛋白样品和 100 TCID₅₀ 的 HSV-1 病毒液各 50 μL,同时设正常细胞对照及病毒对照组,CPE 法观察药物对细胞的活性。

1.2.9 WST-1 法测定重组 CVN 蛋白抗 HIV-1 活性

在 P3 生物安全柜中,重组 CVN 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液稀释至 50 μg/mL (4.53 μmol/L)、10 μg/mL (0.91 μmol/L)、2 μg/mL (180 nmol/L) 和 0.4 μg/mL (36 nmol/L),共 4 个浓度梯度;收集培养至对数生长期的 MT-4 细胞,计数细胞总数和活细胞数,用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液调整细胞浓度至 1×10⁵ cell/mL;取 100 μL 细胞悬液至 96 孔板中,加入 100 TCID₅₀ 的 HIV-1/IIIB 病毒 (50 μL/孔),再加入预先稀释好的不同浓度 CVN 样品 (50 μL/孔),每个样品平行设置 4 个复孔,同时设空白对照、细胞对照、病毒对照和阳性对照 (AZT, 63 nmol/L) 各 4 个复孔;37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 96 h 后,加入 10 μL/孔 WST-1 (5 mmol/L) 溶液,37℃ 孵育 4 h,450 nm 测定吸光值。毒性测定与抑制率测定方法相同,但各培养板孔中只加细胞和待测样品,不加病毒。计算公式:抑制率 (IR) = (A_s - A_v) / (A_c - A_v); A_s: 样品吸光值均值; A_v: 病毒对照组吸光值均值; A_c: 细胞对照组吸光值均值。

2 结果

2.1 SUMO-CVN 的 DNA 序列的合成及表达载体的构建

利用 PCR 方法,分别合成 DNA 片段 A1 (97 bp)、A2 (173 bp)、A3 (241 bp)、A4 (298 bp)、A5 (360 bp) 和 B (345 bp)。A5 含有 CVN 的 DNA 全序列, B 含

SUMO 的 DNA 全序列,利用 A5 和 B 之间 20 bp 的重叠互补序列合成 SUMO-CVN 的全长 DNA 序列 (642 bp),其大小与预期一致 (图 2)。所构建的含表达质粒 pET-3c-SUMO-CVN 的 DH5α 经菌落 PCR 鉴定 (图 3),送阳性克隆去测序,结果表明,其序列与预期一致。

2.2 SUMO-CVN 表达蛋白的摇瓶发酵及可溶性分析

将诱导前、诱导后、菌体裂解后的沉淀和菌体裂解后的上清等样品进行 SDS-PAGE。结果表明, BL21(DE3)/pET-SUMO-L-CVN 阳性克隆菌株经诱导后会表达大小约为 28 kDa 的融合蛋白,未诱导对照无明显表达,表达量占菌体总蛋白的 28%,且融合蛋白多数位于上清中,是可溶性表达 (图 4)。

2.3 CVN 蛋白的纯化及鉴定

取上清进行 Ni-NTA 树脂亲和纯化,纯化后的目的蛋白经 Sephadex G-25 分子筛脱咪唑后进行 SUMO 蛋白酶酶切,除去 SUMO 融合蛋白。酶切产物的 SDS-PAGE 电泳分析表明,30℃,1 h 条件下 80% 的融合蛋白可以被酶切开。酶切产物再次用 Ni-NTA



图 2 PCR 合成 SUMO-CVN 的 DNA 系列

Fig. 2 PCR artificial synthesis the whole target DNA sequence of SUMO-CVN. M: DNA marker; 1: A1; 2: A2; 3: A3; 4: A4; 5: A5; 6: B; 7: SUMO-CVN.

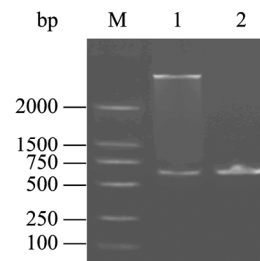


图 3 重组 PET-SUMO-L-CVN 质粒限制酶和 PCR 分析
Fig. 3 Restriction and PCR analysis of recombinant plasmid pET-SUMO-CVN. M: DNA marker; 1: pET-SUMO-L-CVN/*Nde* I+*Bam* H I; 2: PCR product of random clone.

亲和层析柱进行纯化得到目的蛋白 CVN, SDS-PAGE 电泳分析 (图 5) 表明纯化的 CVN 蛋白纯度较高。基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 测定重组蛋白的分子量, CVN 分子量测定结果为 11 019.87 Da (图 6), 与天然 CVN 蛋白理论分子量 11 013.16 Da 相差 5 Da, 在合理误差范围内。

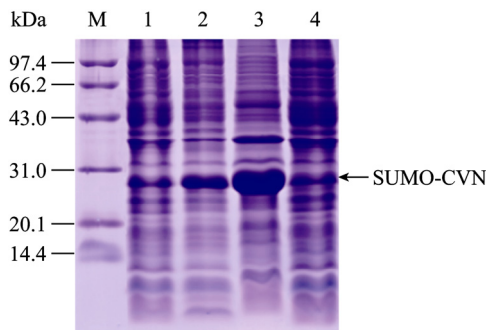


图 4 SUMO-CVN 的可溶性分析

Fig. 4 Solubility analysis of SUMO-CVN. M: protein marker. 1: uninduced sample; 2: protein of BL21 (DE3)/pET-3c-SUMO-CVN after induced with IPTG; 3: induced recombinant BL21 supernatant; 4: induced recombinant BL21 precipitation.

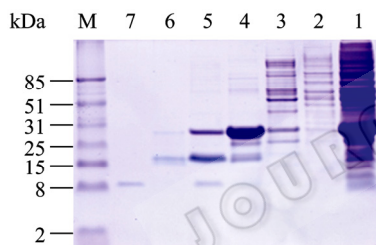


图 5 SDS-PAGE 分析重组蛋白 CVN 的纯化

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the purified CVN. M: protein marker; 1: the supernatant of cells; 2: the fractions of penetration; 3: the eluted fractions with 40 mmol/L imidazole; 4: the eluted fractions with 200 mmol/L imidazole; 5: the eluted fractions of G-25 chromatography; 6: SUMO protease cleaved mixture; 7: the eluted fractions of the second Ni-NTA chromatography.

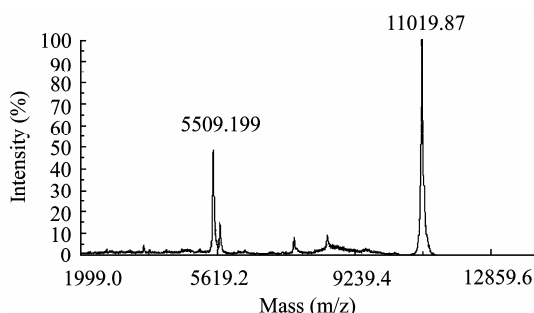


图 6 MATOL-TOF MS 测定重组蛋白 CVN 的分子量

Fig. 6 Molecular weight of rCVN determined by matrix-assisted laser desorption ionization coupled to a time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

2.4 重组蛋白抗 HSV 活性分析

图 7 是一次典型实验后细胞在相差显微镜下的形态, 可见病毒对细胞所致的细胞病变效应, 以及药物对细胞的保护效应。结果表明, 重组 CVN 具有良好的抗 HSV-1 活性, 摩尔浓度更低的条件下, CVN 表现出与阳性对照药物 ACV 基本接近的抗病毒活性。未酶切过的 SUMO-CVN 同样具有抗单纯疱疹病毒 1 型活性, 但其活性要低于 CVN 蛋白, 推测可能是由于多余的肽段影响了 CVN 蛋白的活性位点。毒性测定结果表明, SUMO-CVN 和 CVN 对 Vero 细胞的毒性明显低于 ACV (表 2)。

表 2 MTT 法测定样品抗 HSV-1 活性结果

Table 2 Cytotoxicity to vero cells of native rCVN

Sample	Cytotoxicity (CC ₅₀ , nmol/L)
ACV	2.93±0.023
SUMO-CVN	624.71±9.07
CVN	98.91±5.17

2.5 CVN 与 gp120 蛋白的亲合力

ELISA 实验分析重组蛋白与 gp120 蛋白的结合力, 结果表明, 无论是融合蛋白还是 CVN 与 gp120 蛋白都有较高的亲和力, 并且呈现出一定的浓度依赖性 (图 8)。

2.6 重组蛋白 CVN 抗 HIV 活性结果

病毒对 MT-4 细胞所致的病变效应, 以及 CVN 对 MT-4 细胞的保护效应如图 9 所示。WST-1 实验表明, CVN 具有明显抑制 HIV-1/IIIB 的活性, 在浓度为 10 μg/mL (0.91 μmol/L) 时, 抑制率为 73%, 细胞密度为无病毒细胞对照组的 95%, 与阳性药物 AZT 的抑制率和毒性相当 (74% 和 101%), 为高效低毒抗病毒物质。

3 讨论

CV-N 能特异地、高亲和性地结合在人免疫缺陷病毒 HIV-I 的衣壳蛋白 gp120 上从而发挥抗病毒活性, 这一特点使它可以不受病毒变异的干扰, 同时它还具有抗病毒谱广、性质稳定等特点, 这使得 CV-N 蛋白成为一种很有价值的抗病毒药物。但因为该蛋白分子量较小, 且分子中有 2 个二硫键, 此外, 其与目前已知的蛋白的系列相似性不超过 20%, 使得该蛋白在大肠杆菌中表达困难^[15]。Boyd 等人工合

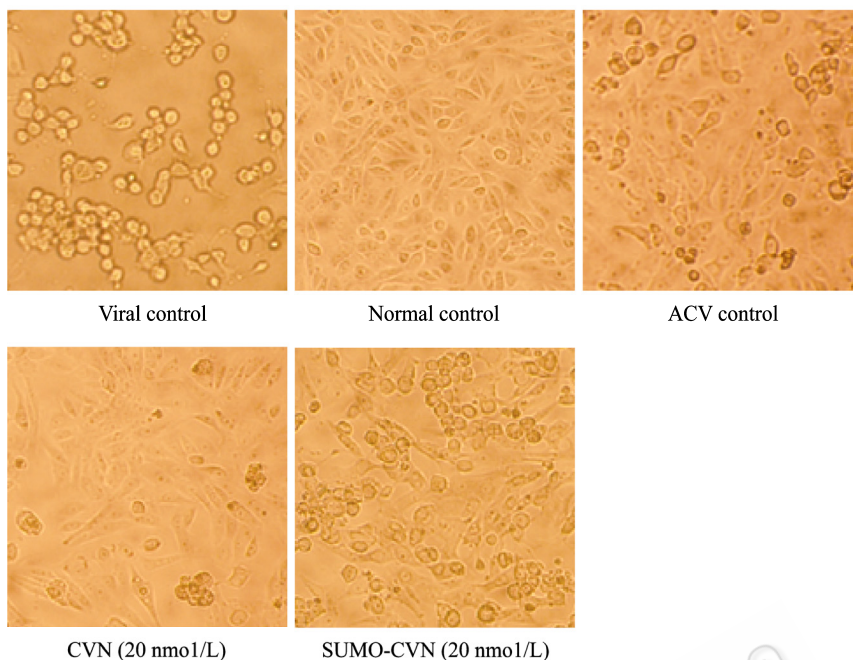


图 7 重组蛋白抗 HSV-1 的细胞病变观察结果

Fig. 7 Cytopathic effect of vero cells.

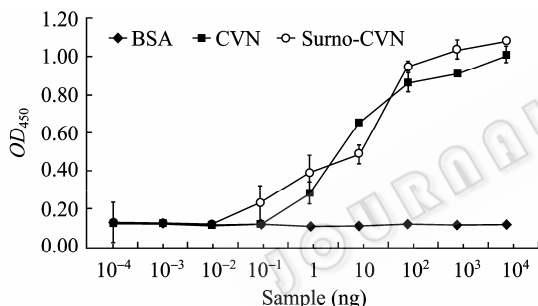


图 8 ELISA 分析重组蛋白与 gp120 的亲合力

Fig. 8 Recombinant protien binding to gp120 by ELISA.

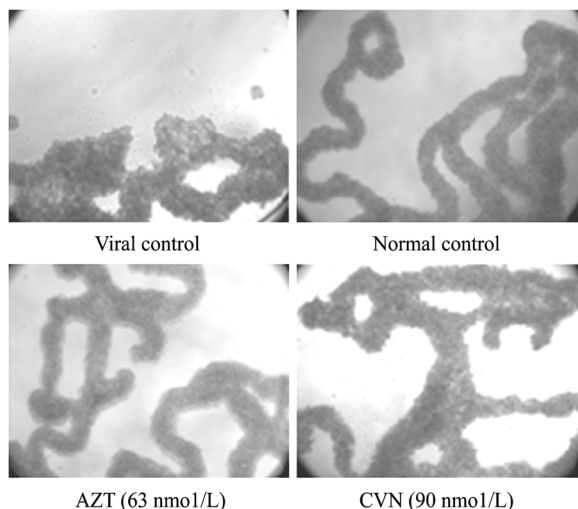


图 9 重组蛋白抗 HIV-1/IIIB 的细胞病变观察结果

Fig. 9 Cytopathic effect of MT-4 cells.

成了 CV-N 序列, 经 PCR 扩增后克隆于 pFLAG 质粒上, 构成分泌型表达载体, 并在 *E. coli* 中诱导表达成功; 但该表达产物是一系列完整蛋白、缺失 N 端前 2 个残基的蛋白和含有 ompA 信号肽序列的蛋白的混合物, 纯化极为困难, 且活性较低^[1]。Mori 等用 pelB 信号肽序列替换 ompA, 并在 pET26b(+) 载体中表达成功, ESIMS 分析和 N 端的序列测定证明与天然 CV-N 的结构相同, 并且具有抗 HIV 活性, 但该表达重组蛋白的方法产量较低, 每升高密度培养产物最高只能纯化得到 10 mg 目的蛋白, 无法满足大规模生产的需要^[16]。此外, 吕锐等^[17]和刘玉生等^[18]都在大肠杆菌中成功表达了 CVN 蛋白, 但都是以包涵体形式表达的, 纯化过程复杂。本实验室先前构建了 pET3c-CVN 的表达载体转化到 BL21 中, 经过诱导之后, 发现 CVN 蛋白没有表达。因此, 希望通过 SUMO 分子伴侣与 CVN 基因融合, 以促进 CVN 的表达。本实验将 CVN 与 SUMO 融合后, 表达量明显提高; 并且主要是以可溶的形式表达的, 纯化后的 CVN 蛋白的纯度较高, 克服了其他表达方法产量低、易形成包涵体、纯化困难等缺点, 为今后开展产业化生产奠定了基础。

体外抗病毒活性实验中, 融合蛋白 SUMO-CVN 和 CVN 蛋白均具有良好的抗 HSV-1 活性, 但是

SUMO-CVN 抗 HSV-1 活性要弱于 CVN, 推测可能由于多余的肽段影响了 CVN 蛋白抗 HSV-1 的活性位点。重组蛋白 CVN 与 gp120 蛋白有较高的亲和力, 从理论上说明了 CVN 具有抑制 HIV 病毒感染的活性。另外, WST-1 实验也证明, 重组蛋白 CVN 也具有明显的抑制 HIV-1/IIIB 活性, 为高效低毒抗病毒物质。

致谢: 感谢日本长崎大学药学部感染分子药学研究室郭朝万博士、北里海雄准教授协助进行 HIV-1/IIIB 活性测定。

REFERENCES

- [1] Boyd MR, Gustafson KR, McMahon JB, *et al.* Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, **41**: 1521-1530.
- [2] Yang F, Bewley CA, Louis JM, *et al.* Crystal structure of cyanovirin-N, a potent HIV-inactivating protein, shows unexpected domain swapping. *J Mol Biol*, 1999, **288**(3): 403-412.
- [3] Helle F, Wychowski C, Vu-Dac N, *et al.* Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans. *J Biol Chem*, 2006, **281**(35): 25177-25183.
- [4] Smee DF, Wandersee MK, Checketts MB, *et al.* Influenza A (H1N1) virus resistance to cyanovirin-N arises naturally during adaptation to mice and by passage in cell culture in the presence of the inhibitor. *Antivir Chem Chemother*, 2007, **18**(6): 317-327.
- [5] Barrientos LG, Gronenborn AM. The highly specific carbohydrate-binding protein cyanovirin-N: structure, anti-HIV/Ebola activity and possibilities for therapy. *Mini Rev Med Chem*, 2005, **5**(1): 21-31.
- [6] Barrientos LG, Louis JM, Ratner DM, *et al.* Solution structure of a circular-permuted variant of the potent HIV-inactivating protein cyanovirin-N: structural basis for protein stability and oligosaccharide interaction. *J Mol Biol*, 2003, **325**(1): 211-223.
- [7] Sexton A, Drake PM, Mahmood N, *et al.* Transgenic plant production of cyanovirin-N, an HIV microbicide. *FASEB J*, 2006, **20**: 356-358.
- [8] Mori T, Gustafson KR, Pannell LK, *et al.* Recombinant production of cyanovirin-N, a potent human immunodeficiency virus-inactivating protein derived from a cultured cyanobacterium. *Protein Express Purif*, 1998, **12** (2): 151-158.
- [9] Mori T, Barrientos LG, Han Z, *et al.* Functional homologs of cyanovirin-N amenable to mass production in prokaryotic and eukaryotic hosts. *Protein Express Purif*, 2002, **26**(1): 42-49.
- [10] Colleluori DM, Tien D, Kang F, *et al.* Expression, purification, and characterization of recombinant cyanovirin-N for vaginal anti-HIV microbicide development. *Protein Express Purif*, 2005, **39**(2): 229-236.
- [11] Zhou F, Xue Y, Lu H, *et al.* A genome-wide analysis of sumoylation-related biological processes and functions in human nucleus. *FEBS Lett*, 2005, **579**(16): 3369-3375.
- [12] Xiao YC, Qin YX, Xie JS. Fusion protein on Sumo molecular chaperone and antifungal peptide Drs help to soluble expression. *Chin Biotech*, 2007, **27**(12): 22-25.
肖业臣, 秦玉侠, 解佳森, 等. Sumo 分子伴侣与富含二硫键的抗真菌肽 Drs 基因的融合有助于其可溶性表达. *中国生物工程杂志*, 2007, **27**(12): 22-25.
- [13] Assadi-Porter FM, Patry S, Markley JL. Efficient and rapid protein expression and purification of small high disulfide containing sweet protein. brazzein in *E. coli*. *Protein Express Purif*, 2008, **58**(2): 263-268.
- [14] Huang YD, Su Y, Ding CC, *et al.* The expression, purification and its activity of Gst-Sumo-Mt in *E. coli*. *Chin Biotech*, 2007, **27**(12): 11-16.
黄亚东, 苏焜, 丁长才, 等. 融和蛋白 Gst-Sumo-Mt 在大肠杆菌中的表达、纯化及其活性研究. *中国生物工程杂志*, 2007, **27**(12): 11-16.
- [15] Gustafson KR, Sowder RC, Henderson LE, *et al.* Isolation, primary sequence determination, and disulfide bond structure of cyanovirin-N, an anti-HIV (human immunodeficiency virus) protein from the cyanobacterium nostocel-lipsosporum. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **238**(1): 223-228.
- [16] Mori T, Gustafson KR, Pannell LK, *et al.* Recombinant production of cyanovirin-N, a potent human immunodeficiency virus inactivating protein derived from a cultured Cyanobacterium. *Protein Express Purif*, 1998, **12**(2): 151-158.
- [17] Lü R, Yu H, Liu ZT, *et al.* Prokaryotic expression of Cyanovirin-N gene and the purification and renaturation of its re-combinant protein. *J Med Postgrad*, 2007, **20**(11): 1139-1142.
吕锐, 于红, 刘宗涛, 等. 蓝藻抗病毒蛋白 N 基因的原核表达及重组蛋白的纯化和复性. *医学研究生学报*, 2007, **20**(11): 1139-1142.
- [18] Liu YS, Li C, Jin NY, *et al.* Construction and prokaryotic expression of a new antiviral protein. *Immunol J*, **23**(4): 395-398.
刘玉生, 李昌, 金宁一, 等. 新型抗病毒蛋白 CVN 的构建及原核表达. *免疫学杂志*, 2007, **23**(4): 395-398.