

## HIV 整合酶在大肠杆菌中的表达纯化及其应用\*

刘连兴<sup>1,2,3</sup>, 郝彦玲<sup>2</sup>, 袁国亮<sup>4</sup>, 许斌<sup>4</sup>, 陈佩<sup>2</sup>,  
傅晶晶<sup>2</sup>, 刘勇<sup>2\*\*</sup>, 邵一鸣<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 中国科学院武汉病毒研究所, 湖北武汉 430071; 2. 中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心, 北京 100050; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 4. 浙江澳亚生物工程研究院有限公司, 浙江杭州 310018)

### Expression and purification of HIV Integrase in *E. coli* and Application in HIV Diagnosis

LIU Lian-xing<sup>1,2,3</sup>, HAO Yan-ling<sup>2</sup>, YUAN Guo-liang<sup>4</sup>, XU Bin<sup>4</sup>, CHEN Pei<sup>2</sup>,  
FU Jing-jing<sup>2</sup>, LIU Yong<sup>2\*\*</sup>, SHAO YI-ming<sup>1,2\*\*</sup>

(1. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. National Center for AIDS/STD Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China; 3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Hangzhou Ausia Bi-tech. Co., Ltd, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** HIV-1 integrase P31 of RL42 strain, a B subtype isolate, was expressed in *E. coli* using pThioHisB vector (Invitrogen). The recombinant protein represented about 30% of total cellular proteins and was purified by inclusion body washing and Ion Exchange Chromatography (IEX). The purity of P31 protein reached more than 95%. Purified P31 antigen displayed fairly good sensitivity and specificity when prepared into immunoblot strips and tested with HIV reference sera. This work established a foundation for the development of HIV detection kits.

**Key words:** HIV-1; Integrase; P31; Purification

**摘要:** 采用 pThioHisB 系统表达 HIV-1 整合酶 P31 蛋白, 目的蛋白的表达量达到菌体蛋白的 30% 左右。通过包涵体洗涤和离子交换层析, 蛋白纯度高于 95%。用纯化后的 P31 抗原制备成条带免疫试纸条, 检测 HIV 参考品血清时表现了很好的灵敏度和特异性。本研究为进一步开发 HIV-1 血清学诊断试剂盒奠定了基础。

**关键词:** HIV-1; 整合酶; P31; 纯化

中图分类号: R511

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)05-0413-04

艾滋病是由人免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)感染所引起的一种严重的传染性疾病, 快速准确的HIV血清学诊断对于预防控制艾滋病具有非常重要的意义<sup>[1,2]</sup>。免疫印迹试验因其良好的特异性, 至今仍然被认为是筛查确证HIV

感染的金标准。我国目前HIV抗体确认试验使用的试剂主要是第一代免疫印迹试剂盒, 用全病毒裂解物作为抗原, 存在条带位置不固定, 对操作人员经验要求高, 无法实现自动化检测等问题, 此外该类试剂盒生产工艺复杂, 生产规模小、成本高, 因此

收稿日期: 2006-02-16, 修改日期: 2006-04-03

\* 基金项目: 卫生部艾滋病防治应用性研究项目 (WA2002-02-01)

作者简介: 刘连兴 (1980-), 山东省籍, 博士研究生, 研究方向为微生物学。

\*\* 通讯作者. Corresponding author. Tel: 010-63166184, 67871166-1050, 13031069461; E-mail, yshao@bnn.cn, liuyongsd@21cn.com

开发基于基因工程抗原的新一代免疫印迹试剂成为发展趋势。

整合酶(Integrase, IN) 是 HIV *pol* 基因 3'端编码的蛋白质, 由 160kDa 前体多蛋白经病毒蛋白酶加工形成<sup>[3]</sup>, 其功能是将逆转录病毒的 cDNA 整合到宿主细胞的基因组中<sup>[4]</sup>。在艾滋病感染者的血清中, 针对整合酶 P31 的抗体有很高的检出率, 仅次于穿膜蛋白 GP41 的抗体<sup>[5]</sup>。因此, P31 抗原是新一代 HIV 确认试剂的重要原料之一。

本文将整合酶基因在大肠杆菌中高效表达并摸索了一条简单高效的纯化工艺路线。在此基础上把 P31 抗原制备成条带免疫印迹试纸条, 随机抽取了多份 HIV 阳性及阴性血清样品对 P31 抗原的检测灵敏度和特异性进行考察。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

质粒 pPOL 含有 HIV-1 B' 亚型流行株 RL42 的 *pol* 基因全长序列, 由本室构建。大肠杆菌表达载体 pThioHisB 购自 Invitrogen 公司, 大肠杆菌菌株 BL21-CodonPlus 购自 Stratagene 公司。

限制性内切酶和其它工具酶为宝生物工程(大连)有限公司产品。引物合成及基因测序由上海博亚公司完成。凝胶填料 DEAE Sepharose FF、低分子量蛋白 Marker 均为安玛西亚公司产品。

HIV-1 阳性血清由本室保存, 参考血清购自中国药品生物制品检定所。辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 为北京中山公司产品。

### 1.2 表达质粒的构建

以质粒 pPOL 为模板, 以引物 P1 和引物 P2 扩增编码整合酶 P31 的基因。扩增产物经 *Bam*H I 和 *Nde* I 酶切后回收, 与经过相同酶切的载体 pThioHisB 连接。连接产物转化大肠杆菌 BL21-CodonPlus, 挑取阳性克隆, 酶切鉴定后测序验证。引物 P1: 5'-GGAATTCCATATGTTTCTAGATGGAATAGATAAAGCTC-3' (下划线表示 *Nde*I 酶切位点) 引物 P2: 5'-CGGGATCCATTACTAATCTTCATCCTGTCTACCTGC-3' (下划线表示 *Bam*H I 酶切位点)

### 1.3 重组蛋白的诱导表达和鉴定

用鉴定正确的重组质粒 pTH-P31 转化大肠杆菌菌株 BL21-CodonPlus, 挑取单菌落接种于含 50 $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养过

夜。按 1:20 接种到新鲜培养基中, 30 $^{\circ}$ C 培养到  $OD_{600}$  约 0.6 时加 IPTG 至终浓度 1mmol/L, 诱导约 10h 后取样。SDS-PAGE 检测目的蛋白表达情况, 设未诱导的重组克隆作为阴性对照。对表达产物做免疫印迹 (Western Blot) 验证<sup>[6]</sup>, 一抗 (HIV-1 阳性血清) 按 1:500 稀释, 二抗 (辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG) 按 1:2000 稀释。

### 1.4 包涵体的洗涤、溶解和目的蛋白的硫酸铵沉淀

离心收集诱导后的菌体, 悬于破碎缓冲液中高压匀浆破碎。离心后沉淀用洗涤缓冲液洗涤两遍。洗涤好的包涵体用溶解液均匀悬起, 4 $^{\circ}$ C 放置 1h。离心后取上清依次加不同浓度的硫酸铵。选取较纯的沉淀组分用结合缓冲液溶解。SDS-PAGE 检测每一步目的蛋白在上清和沉淀中的分布情况。

### 1.5 目的蛋白的层析纯化

根据对目的蛋白的等电点分析, 选用 DEAE Sepharose Fast Flow 填料。装柱于 XK16/20 层析柱中, 柱高为 10cm。3 倍体积的平衡缓冲液平衡, 流速为 1mL/min。把处理好的蛋白样品上样, 平衡缓冲液平衡至基线走平, 其后用洗脱缓冲液线性梯度洗脱。收集各穿透峰和洗脱峰, SDS-PAGE 检测, 确定目的蛋白的分离情况。

### 1.6 纯化的重组 P31 蛋白抗原在 HIV 抗体检测中的应用

纯化的重组蛋白利用狭缝电转印技术 (专利申请号 200410089432.0) 制备成抗原条带, 即条带免疫印迹试纸条, 用参考品血清检测 (依次按 1:4, 1:40, 1:160, 1:640 稀释)。然后再随即抽取 7 份 HIV-1 阳性临床血清标本和 1 份 HIV-1 阴性临床血清标本进行检测。

## 2 结果

### 2.1 表达质粒的构建

经过扩增得到 P31 基因片段, 长 864 bp。扩增产物双酶切定向克隆入载体 pThiohisB 构建成重组质粒 pTH-P31, 转化 *E. coli* BL21-CodonPlus, 得到表达 P31 蛋白的工程菌株。重组质粒经酶切鉴定, 与预期相符。测序结果表明插入的目的基因序列和读码框正确 (见图 1)。

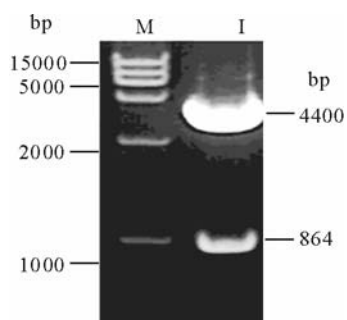


图1 重组质粒pTH-P31的酶切鉴定

Fig.1 Restriction map of recombinant plasmid pTH-P31

M, DNA Marker DL15000; 1, pTH-P31 digest with *BamH* I + *Nde* I

## 2.2 重组蛋白的诱导表达和鉴定

将获得的工程菌株进行诱导表达, SDS-PAGE 检测发现一条分子量约为32kDa的蛋白带, 与预期

的一致(图2)。其表达量约为菌体总蛋白的30%, 经Western-blot验证, 表达蛋白与HIV-1阳性血清发生较强的特异性反应(图3)。

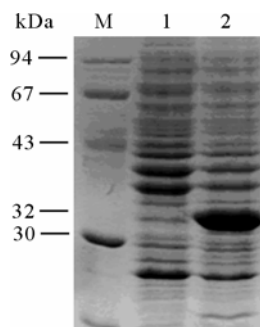


图2 P31抗原蛋白在大肠杆菌中的表达

Fig.2 Expression of P31 antigen protein in *E. coli*

M, Protein molecular weight marker; 1, Uninduced pTH-P31 transformant; 2, pTH-P31 transformant induced with IPTG

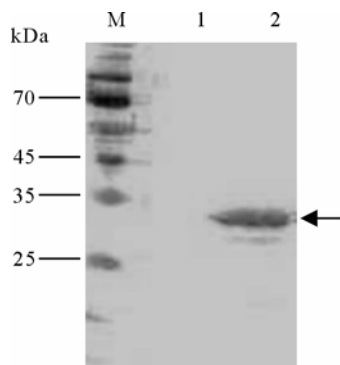


图3 P31抗原蛋白的Western blot检测

Fig.3 Western blot analysis of P31 antigen protein

M, Prestained protein molecular weight marker; 1, Negative control, 2, pTH-P31 transformant induced with IPTG

## 2.3 包涵体的洗涤、溶解和目的蛋白的硫酸铵沉淀

菌体破碎后, SDS-PAGE电泳检测上清和沉淀中的目的蛋白。结果表明绝大部分目的蛋白以包涵体的形式存在。包涵体洗涤和硫酸铵沉淀能去除大部分杂蛋白(图4)。

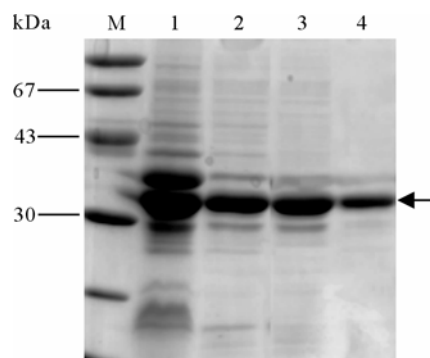


图4 包涵体洗涤和硫酸铵沉淀结果

Fig.4 Results of inclusion body washing and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitationM, Protein marker; 1, P31 antigen protein inclusion body; 2, Pellet of 5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 3, Pellet of 10%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 4, Pellet of 15%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

## 2.4 目的蛋白的层析纯化

样品经过DEAE-Sepharose FF离子层析纯化。SDS-PAGE对穿透峰和洗脱峰分析表明, 目的蛋白在最先出现的洗脱峰中, 纯度超过了95%。结果如图5所示。

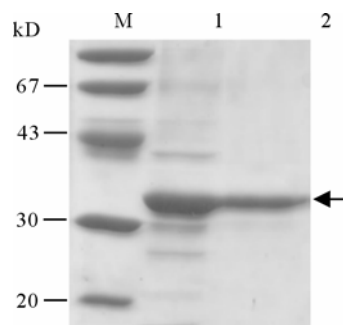


图5 P31蛋白离子交换层析纯化结果

Fig.5 Results of ion-exchange chromatography purification of P31 protein

M, Protein molecular weight marker, 1, Pellet of 10%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 2, Purified P31 protein.

## 2.5 纯化的重组P31蛋白抗原在HIV抗体检测中的

应用

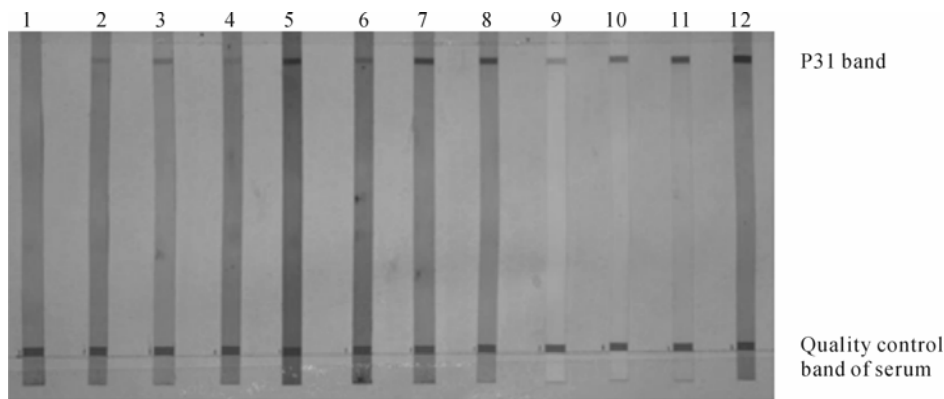


图6 条带免疫印迹检测结果

Fig.6 Strip immunoblot assay with recombinant P31 protein

1, Negative serum samples; 2-8, Positive serum samples; 9, 1: 640 diluted positive serum Sample; 10, 1: 160 diluted positive serum Sample; 11, 1: 40 diluted positive serum Sample; 12, 1: 4 diluted positive serum Sample.

用重组蛋白制备条带免疫印迹试纸条，利用HIV阳性和阴性血清检测。结果显示，HIV-1阳性血清稀释640倍仍能形成清晰的反应条带；对随机取样的7份HIV阳性临床血清样本无漏现象，与HIV阴性血清无交叉反应（如图6）

### 3 讨论

检测HIV特异性抗体的存在是目前判定HIV感染的主要方法。基于免疫印迹原理的HIV抗体确认试剂是判定HIV感染的最终标准。因而，研制具有更高灵敏度和特异性的HIV抗体确认试剂是艾滋病防治工作的需要。使用基因工程抗原代替传统的全病毒裂解抗原是HIV抗体确认试剂的发展趋势。鉴于抗P31抗体的检出率在临床血清学检测中仅次于抗gp41抗体的检出率<sup>[5]</sup>，而且P31抗原与HIV-2型感染者血清存在交叉反应<sup>[7,8]</sup>，研制高质量的P31抗原蛋白对发展新一代HIV抗体确认试剂具有重要意义。

国际各组织制订的HIV抗体免疫印迹试验的阳性判定标准虽不尽相同；但美国FDA、WHO、泛美卫生组织均认为P31应作为一条重要的阳性判定条带。我们选择在中国广泛流行的HIV-1 B'亚型毒株RL42，利用大肠杆菌BL21-CodonPlus对P31抗原蛋白进行表达。为获得高表达的工程菌株，我们比较了具有不同特点的三个原核表达载体（PET43.1、PBV220和pThioHisB），其中用pThioHisB构建的pTH-P31质粒表达量最高。HIV抗原P31以包涵体形式在宿主菌中表达的。经多次探索，我们优化了包涵体处理方法，使大部分杂蛋白在层析步骤前被去除。处理后的样品经过一次离子层析，重组蛋白纯度可达到95%以上。纯化后的目的蛋白在检测不同稀释度的参考品血清和随即抽取的8份临床血清样

品时表现出很高的灵敏性和特异性。

本研究结果可用于研制新一代国产HIV抗体确认试剂盒。

### References

- [1] Xing Y Y (邢玉兰). Development in Diagnosis of AIDS pathogeny [J]. Chin J Lab Med (中华检验医学杂志), 2001, 24: 188-189.
- [2] Ma Y N (马玉楠). Recent Advances of Detections for AIDS and Their Situation in China [J]. Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志), 2001, 17: 154-158.
- [3] Sherman P A, Fyfe J A. Human immunodeficiency virus integration protein expressed in Escherichia coli possesses selective DNA cleaving activity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87: 5119-5123.
- [4] Goff S P. Genetics of retroviral integration [J]. Annu Rev Genet, 1992, 26: 527-544.
- [5] Truett M A, Chein D Y, Calarco T L, *et al.* Recombinant immunoblot assay for detection of antibodies to HIV. In: HIV detection by genetic engineering methods [M]. New York: Dekker, 1989. 41-47.
- [6] Sambrook J, Russell D W, *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Appendix 8.
- [7] Steimer K S, Higgins K W, Powers M A, *et al.* Recombinant polypeptide from the endonuclease region of the acquired immune deficiency syndrome retrovirus polymerase (pol) gene detects serum antibodies in most infected individuals [J]. J Virol, 1986, 58: 9-16.
- [8] Bjorling E, Goran U, Stalhandske P, *et al.* Identification of a Uniquely Immunodominant, Cross-Reacting Site in the Human Immunodeficiency Virus Endonuclease Protein [J]. J Virol, 1991, 65: 4543-4546.