



340-244

R510 1104

HIV-1 gp41 基因的高效表达及表达产物的纯化*

闭 兰 雷小军¹ 陈 伟 严家新 余模松 朱家鸿

(卫生部武汉生物制品研究所基因工程室, 武汉 430060)

摘 要 为了获得高效表达的人类免疫缺陷病毒(HIV-1) gp41 蛋白, 从而为 HIV-1 基因工程诊断抗原的国产化打下基础, 用 PCR 的方法从 HIV-1 全基因序列中扩增出编码 gp41 N 端的 690 bp 片段。经酶切后, 克隆到 pET28a 载体中, 再将重组质粒转化到表达宿主菌 BL21(DE3) 中, 经 IPTG 诱导, 高效表达出 gp41 蛋白。间接 ELISA、Western-blot、SDS-PAGE 电泳证实, 该表达产物具有良好的抗原性和特异性, 且表达量约占总菌体蛋白的 45%。重组蛋白经金属整合纯化, 纯度达 99%。

关键词 人免疫缺陷病毒 I, gp41 基因, pET 载体, 大肠杆菌 BL21(DE3), 高效表达

当前, 艾滋病病人及其病毒 HIV-1 型携带者的数目逐渐增多, 急需一种优质廉价的诊断试剂盒来预防和监测。而人类免疫缺陷病毒 I 型包膜糖蛋白(HIV-1 env)gp41 的免疫原性比病毒核心蛋白强。应用放射免疫沉淀测定法(RIPA)发现, env 基因编码的 gp41 免疫原性强, 几乎 97%~100% 艾滋病病人的血清均可测得相应抗体^[1], 且无交叉反应及相对少的变异, 因而抗 gp41 抗体是 HIV-1 感染最重要的标志^[2]。我们将编码 HIV-1gp41 蛋白的目的基因克隆到 pET28a 原核高效表达载体中, 然后将重组质粒 pET/41 转化表达宿主菌 BL21(DE3) 经诱导高效表达出 HIV-1 gp41 蛋白, 为研制生产 HIV 诊断试剂盒奠定了良好的基础。

材料与amp;方法

1 质粒与菌种

质粒 pNL4-3 由美国 Thomas Jefferson University 的 Fu Chenfang 教授惠赠。该质粒含有 HIV-1 NYS/BRU(LAV-1) 株全基因。pET28a 为本室保存, 是 T7 启动子控制下的融合表达载体, 其 5' 端含编码 6 个连续的组氨酸的基因。大肠杆菌 BL(21)DE3(基因型为 N205, recA(λimm434)(Its2, red Dam Sam(λ))) 为本室保存。

2 主要试剂

gp41 McAb 由解放军农牧大学金宁一教授惠赠。

3 引物设计与 PCR

3.1 引物设计 根据 HIV-1 NYS/BRU(LAV-1) 株序列, 并参照文献设计^[2], 然后用计算机软件 OLIGO 进行评估, 由美国 CyberSyn 公司合成。

引物序列 I: 5'GGGACGAATTCACGGTACAGGCCAGACAAT3'

收稿日期: 1998-04-21, 修回日期: 1998-06-15

* 卫生部资助课题

引物序列 II : 5'GTAGGTCGACGGTGGTAGCTGAAGAGGC3'

3.2 PCR 反应 取模板 pNL4-3 1 μ g; 引物 I、II (10 pmol/L) 100 ng; 10 \times PCR buffer 10 μ L; 10 mmol/L dNTP mixture 2 μ L; 50 mmol/L MgCl₂ 3 μ L; Taq DNA 多聚酶 1 μ L; ddH₂O 79 μ L; 总体积 100 μ L。

扩增循环参数: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s; 55 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 90 s; 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

4 质粒的提取、纯化、酶切、连接、转化

具体方法均按文献[3]。

5 重组蛋白表达及纯化

将重组菌接种于含卡那霉素的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 摇菌过夜。次日, 将该活化的菌液以 1:100 的比例, 接种于新鲜的同样含卡那霉素的 LB 培养液中, 置摇床 37 $^{\circ}$ C 继续培养。当 A₆₀₀ 达 0.5~2 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续培养约 5 h, 收集菌体留样作 SDS-PAGE 电泳, 超声破碎离心, 将沉淀用 PBS 溶液洗涤 2~3 次, 离心收集沉淀。将沉淀溶于含 8 mol/L 尿素的 PBS 中, 上 Chelating Sepharose Fast Flow 层析柱, 经 pH7-3 的 PBS (含 6 mol/L 尿素) 阶段性梯度洗脱, 在 pH3 时得一洗脱峰。收集此峰, 经 PEG20000 浓缩后进行 SDS-PAGE 电泳。

6 表达产物的鉴定

6.1 间接 ELISA 将 gp41 表达产物, 按 1:5 比例连续稀释包被酶标板后, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 用 PBST 溶液洗 3 遍, 然后用 1% 牛血清白蛋白溶液封闭, 37 $^{\circ}$ C 1 h, PBST 液洗 3 遍, 加入一抗 100 μ L (为 1:500 稀释的 HIV-1 gp41 单克隆抗体), 37 $^{\circ}$ C 1 h, PBST 洗 3 遍后, 加二抗 (为 1:300 稀释的酶标羊抗鼠抗体), 37 $^{\circ}$ C 1 h, 洗 6 遍, 加底物显色, 加硫酸终止并测定 A₄₉₀ 值。

6.2 Western-blot^[3] 将纯化的 gp41 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后转 NC 膜, 并以含空载体菌及未诱导的菌体裂解液作抗原对照, 以 gp41 McAb 作抗体进行免疫染色。

结 果

1 重组质粒的构建与鉴定

PCR 扩增出的产物经电泳后, 可见一条约 690 bp 的带, 与预计的大小相符 (见图 2)。用 EcoR I 及 Sal I 酶将 PCR 产物酶切后, 按照正确的读码框架, 插入到 pET28a 中 (其克隆策略见图 1)。重组质粒经 EcoR I 及 Sal I 酶切后得到 690 bp 和 5.2 kb 两条片段, 与预期结果相符 (图 2)。

2 重组蛋白的表达及鉴定

表达产物存在于包涵体中, SDS-PAGE 显示重组菌在 28 kD 处有一浓染带, 而空载体 pET28a 所转化的菌体中则不含此带 (见图 3)。光密度扫描显示, 重组蛋白的量约占总菌体蛋白的 45%。间接 ELISA 表明重组蛋白与 gp41 单抗呈强阳性反应, 而 pET28a 空载与之无反应 (见表 1)。纯化后的产物经 SDS-PAGE 电泳后, 在 28 kD 处显示一条带, 纯度达 99%。Western-blot 显示纯化后的 gp41 蛋白与 gp41 单抗在 28 kD 处有一反应带 (见图 4)。

讨 论

gp41 是 HIV-1 上的跨膜糖蛋白, 它不仅在 HIV-1 的感染过程中起作用, 而且在血清学诊断中起着关键作用。我们曾经试图在原核中表达 gp160 大片段, 但表达量低, 且表达产物易降解, 而将基因片段截短, 并运用 pET 表达载体后, 表达量明显提高, 而且表达产物稳定。文献报道 gp41 582-620 氨基酸残基的抗原性最强^[4]。我们用 PCR 的方法从 HIV-1 全基因扩增出

包括编码该片段的基因片段(690 bp)。这样,从理论上讲就可以保证其在免疫应答中的强反应,间接 ELISA 证明了这一点,当抗原稀释达 1 250 倍时,它与 gp41 McAb 反应的 A 值仍有 1.152,说明重组蛋白具有良好的抗原性及特异性。另外,目的蛋白 N 端含有 6 个连续的组氨酸残基(His 6),这样表达产物经金属离子(Ni²⁺)配体亲和层析一步纯化,能达到高纯度(98% 以上),且操作快捷简便,具有很强的实用性。综上所述,这种 gp41 的重组与表达方法具有广阔研究与应用前景。

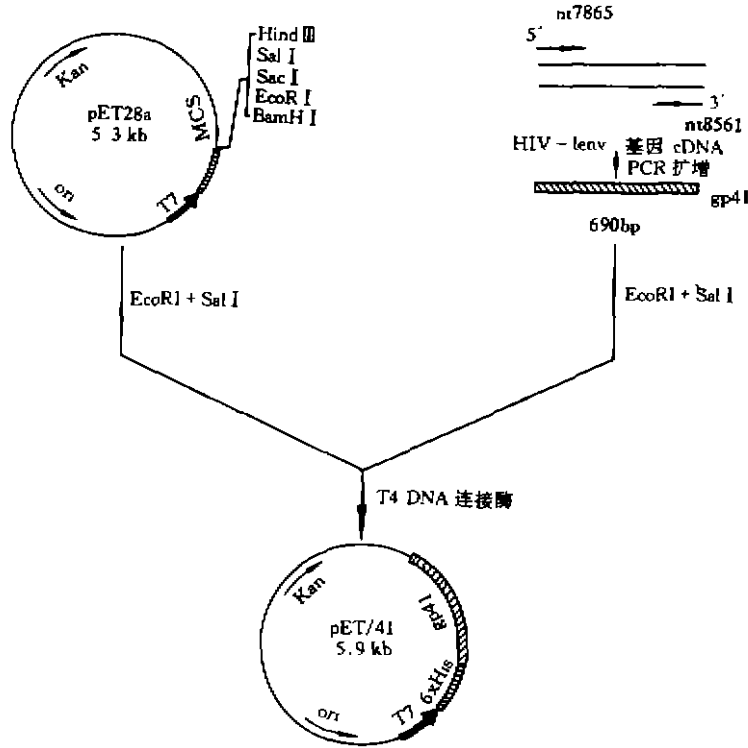


图 1 表达 HIV-1 gp41 基因的 pET/41 质粒构建图

Fig. 1 Construction of plasmid pET/41 expressing the gp 41 gene of HIV-1

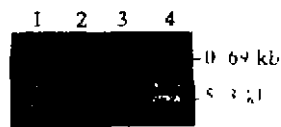


图 2 重组质粒的酶切鉴定

1: pNL4-3 PCR 扩增片段; 2: pET/EcoR I + Sal I ;
3: pET/41/EcoR I + Sal I ; 4: DNA marker λDNA/Hind III
Fig.2 Restriction map of recombinant plasmid
1: PCR amplification fragment from PNL4-3;
2: pET/EcoR I + Sal I ; 3: pET/41/EcoR I + Sal I ;
4: DNA marker λDNA/Hind III .

表 1 HIV-1 gp 41 McAb 间接 ELISA 结果

Table 1 The result of indirect ELISA of HIV-1 gp 41 McAb

gp41 抗原稀释度 Dilution of gp41	pET/41	pET28a
1:10	2.020*	0.117
1:50	1.884	0.118
1:250	1.383	0.117
1:1250	1.152	0.117

* A₄₉₀ value, the rest are the same.

Blank mean 0.117;STD.DEV 0.001.

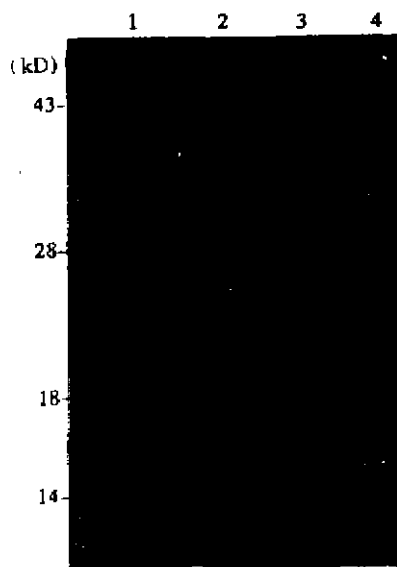


图3 pET/41 转化菌菌体蛋白的 SDS-PAGE
1. 标准分子量蛋白质; 2. pET 转化 BL21(DE3) 菌;
3. pET/41 转化 BL21(DE3) 菌; 4. 纯化后的 gp 41 蛋白
Fig. 3 SDS-PAGE of the expressed product
of pET/41 in *E. coli*

1. standard protein marker;
2. BL21(DE3) transfected with pET;
3. *E. coli* BL21 (DE3) transfected with pET/41;
4. purified protein of gp 41.

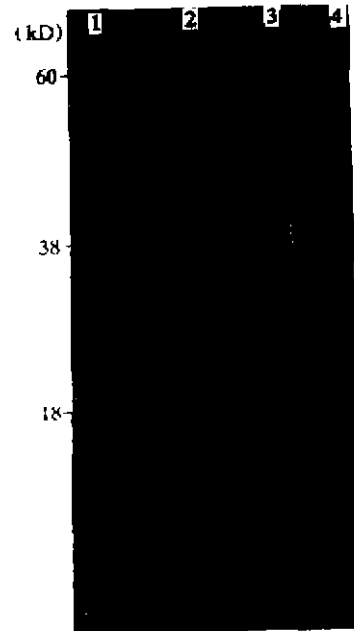


图4 pET/41 表达重组蛋白的 Western-blot 分析
1. 标准分子量蛋白质; 2. 纯化后的 gp 41 蛋白;
3. pET 转化 BL21(DE3) 菌; 4. pET/41 转化 BL21
(DE3) 菌(未经 IPTG 诱导)

- Fig. 4 Western-blot analysis of
recombinant protein expressed by pET/41
1. Standard protein marker; 2. gp 41 protein (purified);
 3. *E. coli* BL21 (DE3) transfected with pET;
 4. BL21 (DE3) transfected with pET/41 (uninduced
with IPTG).

参 考 文 献

- 1 闻玉梅, 田慕贞, 何丽芳等. 医学分子病毒学. 上海: 上海医科大学出版社, 1995. 201 - 202
- 2 John W. Gnarn, JR, Jay A Nelson *et al.* Fine mapping of an immunodominant domain in the transmembrane glycoprotein of Human Immunodeficiency Virus. *J Virol*, 1987, 61: 2639 - 2641
- 3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* Molecular cloning. second edition, USA: cold spring harbor laboratory Press, 1989.
- 4 Wan-hobson S, Naomi Yamashita, Katsuhiko Kitamura *et al.* Constitutive expression and production in T-cell line infected with HIV-1. *Cell*, 1985, 40(3): 9 - 17.

High-Level Expression of HIV- I gp41 Gene and Purification of Its Product

Bi Lan Lei Xiaojun Chen Wei Yan Jiabin Yu Mosong Zhu Jiahong

(*Department of Gene Engineering, Wuhan Institute of Biological Products,
Ministry of Public Health, Wuhan 430060*)

Abstract In order to get high-level expression of HIV-1 gp41 gene, a fragment (690 bp) encoding N-terminal of gp41 from all sequence of HIV-1 was amplified by PCR. After digesting by restriction enzyme EcoRI/Sal I, the fragment was cloned into pET28a plasmid which was digested by the same restriction enzyme, then recombinant plasmid was transformed into the *E. coli* BL21 (DE3). After inducing by IPTG, the bacteria produced the protein. Then the protein was purified through chelating Sepharose. Using indirect ELISA, SDS-PAGE and Western-blot test, it was found that the protein had good antigenicity, good specificity and high purification (99%), and its yield was about 45% of the total bacteria protein.

Key words HIV-1 gp41 gene, pET vector, *E. coli* BL21(DE3), High-level expression