

HIV-1 p24 蛋白在大肠杆菌中的高效可溶性表达、  
一步纯化及抗原性分析

R512.910.4

童贻刚, 杜勇<sup>√</sup>, 徐静, 李敬云, 鲁晏希, 鲍作义, 王海涛<sup>TQ464.7</sup>

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

**摘要:**合成引物扩增 HIV-1 p24 基因, 并将其克隆到 pQE-30 质粒中, 使其在大肠杆菌 *E. coli* M15 中以 IPTG 诱导高效表达, 经 SDS-PAGE 分析, 该表达产物约占菌体总蛋白 20%, 并且以可溶蛋白的形式存在于细菌裂解液上清之中。经镍离子柱亲和层析一步纯化, 洗脱产物中 p24 蛋白纯度达 95%。ELISA 分析表明, 该蛋白可与 HIV 感染者血清发生特异性免疫反应。以此蛋白交联 Sepharose 4B 亲和层析纯化 HIV 感染者血清中的抗体, 用所得抗体与 HIV 确认试剂反应, 发现该纯化抗体仅与确认试剂中的 p24 蛋白反应。上述结果表明在大肠杆菌中已经高效表达了可溶性 HIV-1 p24 蛋白, 该蛋白具有良好的抗原性。

**关键词:**人类免疫缺陷病毒 I 型(HIV-1); p24 蛋白; 基因表达; 大肠杆菌; 诊断试剂

**中图分类号:**R512.91 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5125(2000)02-0116-06

原核表达系统是生产蛋白抗原的一种最为经济的手段, 目前许多诊断试剂所用的抗原都是由大肠杆菌表达的。但是在高效表达的同时, 目的蛋白往往会形成包涵体, 这对蛋白的天然结构和抗原活性造成很大的破坏, 而使包涵体中的变性蛋白溶解和复性往往是一个非常费时且效率很低的过程, 经常会导致重组蛋白的大量损失。本文报道了在大肠杆菌中高效表达完整的可溶性 HIV-1 p24 蛋白, 并且经一步纯化即可得到纯品。这为大规模生产 HIV 诊断试剂用 p24 蛋白提供了可靠保障。

## 1 材料与方 法

**1.1 质粒与菌种** 含 HIV-1 全长基因组的质粒 pHIV 由本室保存, 该 HIV-1 基因组为 HIV-1 毒株 NYS 和 LAV 重组的前病毒基因组<sup>[1]</sup>。质粒 pQE30 及其受体菌 *E. coli* M15 购自 Qiagen 公司。

**1.2 血清和血浆来源** 所有血清和血浆均由全军艾滋病检测中心提供, 其艾滋病感染状况经过该中心的鉴定。这些血清和血浆均来自河北省固安县献血员。

**1.3 引物设计及 PCR 扩增** 根据 HIV-1 的序列, 用 OLIGO 4.0 软件辅助设计一对引物, 正向引物 prm12: GAGGATCCCCATAGTGCAGAACCTC。反向引物 prm13: CCGGTACCTTAGAAAACCTCTTGCTTTATG。PCR 反应参照《分子克隆》<sup>[2]</sup>进行, 反应总体积 50  $\mu$ L, 含 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris·Cl(室温下 pH8.0), 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mg/mL 牛血清白蛋白, 0.1% NP40, dNTP 各 200  $\mu$ mol/L, 引物各 1  $\mu$ mol/L, 模板质粒 pHIV 10 ng, Taq DNA 聚合酶 2 单位。94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后, 按如下方式进行 30 次循环: 94  $^{\circ}$ C 60 s, 58  $^{\circ}$ C 60

收稿日期: 1999-01-07, 修回日期: 1999-07-19

作者简介: 童贻刚(1966年-), 男, 汉族, 湖北武汉人, 助理研究员, 在读博士生, 研究方向免疫学。

s, 72 °C 90 s, 最后在 72 °C 延伸 5 min。

**1.4 HIV-1 p24 基因的克隆** 将上述 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用低熔点胶进行纯化<sup>[2]</sup>, 然后以 BamH I/Kpn I 双酶切, 与以 BamH I/Kpn I 双酶切的载体 pQE30 连接, 转化 *E. coli* M15。快速筛选阳性克隆的方法如下: 预先制备 PCR 反应液(配方同上, 含缓冲液, dNTP, prm12, prm13, Taq 酶, 但不含模板 DNA), 分装成小管, 每管 25  $\mu$ L。在转化平皿背面给待筛选的克隆标记号码, 以吸头挑取菌落冲洗到 PCR 反应管中, 按照上述的 PCR 方法进行 PCR 反应。

**1.5 HIV-1 p24 基因在大肠杆菌中的表达** 取阳性克隆接种于 6 mL LB 培养基(含 50  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素和 35  $\mu$ g/mL 卡那霉素)中, 37 °C 过夜培养, 然后以 1:100 稀释于 200 mL LB 培养基(含 50  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素和 35  $\mu$ g/mL 卡那霉素)中, 于 37 °C 振荡培养 5 h, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 继续于 37 °C 振荡培养 5 h, 离心收集细菌。

**1.6 重组 p24 蛋白的分离纯化** 用 PBS(pH 8.0)悬浮离心收集的细菌, 加入溶菌酶至终浓度 0.1 mg/mL, 室温放置 20 min, 超声破碎, 10 000 g 离心 10 min(4 °C), 分别收集上清和沉淀。参照 Qiagen 公司说明书, 利用自该公司购买的镍离子亲和层析柱(Ni-NTA)进行亲和层析。

**1.7 SDS-PAGE 以及 ELISA 分析** SDS-PAGE 参照(分子克隆)<sup>[2]</sup>进行。ELISA 分析方法如下: 将纯化的 p24 蛋白稀释到 2  $\mu$ g/mL, 包被酶联板, 每孔 100  $\mu$ L, 4 °C 过夜, 以 2% 牛血清白蛋白封闭, 4 °C 过夜, 加入不同稀释度的血清, 37 °C 孵育 2 h, 再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG, 37 °C 孵育 2 h 后, 以 TMP 显色。

**1.8 重组 p24 蛋白的特异性分析** 取 500 mL 经诱导表达 p24 蛋白的菌液, 离心收集细菌, 超声破碎后, 再离心收集上清, 以镍离子亲和层析柱(Ni-NTA)纯化 p24 蛋白, 然后以此蛋白交联 Sepharose 4B(CNBr-activated Sepharose 4B Lab Pack, Pharmacia Biotech), 操作参见产品说明。以此交联填料 1 克装柱, 纯化 250 mL HIV 感染者血浆中的抗体。用洗脱下来的抗体与 HIV 确认试剂 HIV BLOT 2.2(GeneLabso Diagnostics, western blot assay)反应, 以未经纯化的同一 HIV 感染者血清作为对照。操作参见产品说明书。

## 2 结果

### 2.1 HIV-1 p24 基因的克隆

用 HIV-1 p24 引物 prm12 和 prm13 从质粒 pHIV 上扩增 HIV-1 p24 基因序列, 电泳检测表明: 该扩增产物仅含一条带, 长约 0.7 kb。用低熔点琼脂糖法回收, 以 BamH I/Kpn I 双酶切, 与双酶切的载体 pQE30 连接, 转化 *E. coli* M15 菌株, 随机挑选 11 个克隆, 以 prm12 和 prm13 进行快速 PCR 筛选, 结果 7 个克隆为阳性。进一步提取其中 1 号和 5 号质粒(分别命名为 pQE24.1 和 pQE24.5)进行酶切鉴定, 结果表明这两个质粒中 BamH I/Kpn I 之间有插入片段, 其大小与 HIV-1 p24 PCR 片段的大小相当。根据 p24 基因的序列及载体 pQE30 的序列, 可推测重组蛋白的氨基酸序列。图 1 比较了该重组蛋白与 Gupta 等人<sup>[3]</sup>用 pQE30 表达的不可溶 p24 蛋白之间的序列差异。

### 2.2 HIV-1 p24 基因的表达及重组蛋白的可溶性分析

取上述克隆 QE24.1 和 QE24.5, 以 1:100 接种到 3 mL 含双抗的 LB 培养基中, 37 °C 培养 4 h, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 继续培养 4 h, 离心后弃上清, 加入 100  $\mu$ L 蛋白载样液, 100 °C 水浴 3 min, 取 20  $\mu$ L 进行 SDS-PAGE 电泳, 结果表明: 与含空载体 pQE30 的细菌相比, 重组子 QE24.1 和 QE24.5 有一条较强的特异表达带, 其分子量约为 24 kDa, 薄层扫描分析表明: 该蛋白含量占菌体总蛋白的 20.4% (图 2)。取克隆 QE24.1 进行放大培养, 收集细菌, 超声破碎, 离心分离上清和沉淀, 分别进行 SDS-PAGE 分析, 结果表明: 重组蛋白主要存在于上清中, 沉淀中几乎看不见 p24 蛋白带(图 2), 说明该重组蛋白主要以可溶的形式存在。由于表

达载体 pQE30 不带信号肽, 因此重组蛋白应存在于胞浆中。

```

A   1  MRGSHHHHHGSPIVQNLQGGQMVHQ1AI2SPRTL3NAWV4KVVEEKAFSPEVIP
B   1  MRGSHHHHHGSACELGTQGGQMVHQ1AI2SPRTL3NARV4KVVEEKAFSPEVIP
          *#*****                               *

A  51  MFSALSEGATPQDLN1TMLNTVGGHQAAMQ2MLKETINEEAAEW3DR4LHPVHA
B  51  MFSALSEGATPQDLN1TMLNTVGGHQAAMQ2MLKETINEEAAEW3DR4VHPVHA
          *

A 101  GPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEIQIG1W2M3THNPP4IPVGEIYKR5W6IILGL
B 101  GPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEIQIG1W2M3TN4NPPIVGEIYKR5W6IILGL

A 151  NKIVRMYSPTSILD1IRQGPKEPFRDYVDRFYK2TLRAEQASQEVK3NW4MTET
B 151  NKIVRMYSPTSILD1IRQGPKEPFRDYVDRFYK2TLRAEQASQEVK3NW4MTET

A 201  LLVQNANPDCKTILKALGPGATLEEM1TACQVGGPGHKARV2L
B 201  LLVQNANPDCKTILKALGPGATLEEM1TASLIS2-----
          #                               #*****
    
```

图 1 可溶性和包涵体 HIV-I p24 蛋白的氨基酸序列比较

A, 本文表达的可溶性 p24 蛋白的氨基酸序列; B, Gupta 等人表达的包涵体 p24 蛋白的氨基酸序列<sup>[3]</sup>; \* 表示两序列不同; # 表示半胱氨酸所在位置; 人工序列以下画线表示。

Fig. 1 Sequence comparison between soluble and insoluble p24 protein synthesized in *E. coli*

A, Sequence of the soluble p24 protein in this paper; B, Sequence of the insoluble p24 protein reported by Gupta<sup>[3]</sup>. \* indicates the amino acid difference. # indicates the Cys residue. The artificial regions are underlined.

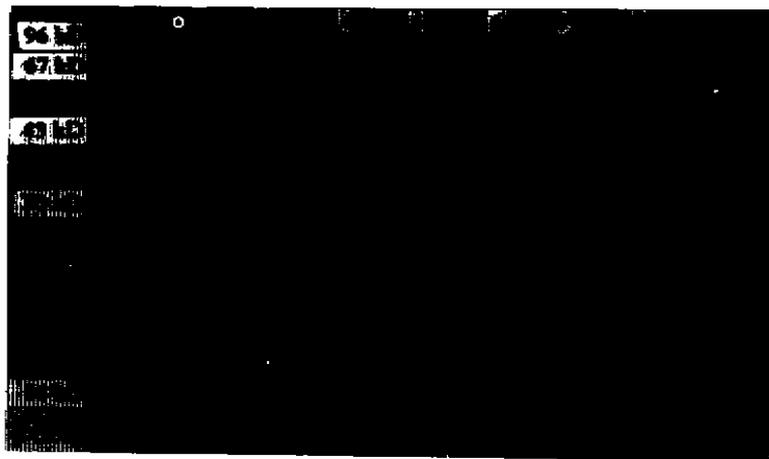


图 2 重组 HIV-I p24 蛋白的 SDS-PAGE 分析结果

1, 蛋白质分子量标准; 2~3, 含空载体 pQE30 的受体菌全细胞; 4~5, 在 IPTG 诱导前后工程菌全细胞(4, 诱导前; 5, 诱导后); 6~7, 经 IPTG 诱导的工程菌细胞提取物(6, 上清; 7, 沉淀); 8, 工程菌裂解液上清经一步纯化所得到的 HIV-I p24 蛋白。

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant p24 protein

1. Protein molecular marker; 2~3, *E. coli* whole cell harboring empty plasmid pQE30; 4~5, *E. coli* whole cell harboring pQE24.1 (4, before induction; 5, after induction with IPTG); 6~7, Cell extract of *E. coli* harboring pQE24.1 (6, supernatant, 7, precipitate); 8. The recombinant p24 protein purified by affinity chromatography.

### 2.3 重组 HIV-1 p24 蛋白的分离纯化

根据上述结果,我们采取了可溶性蛋白的纯化策略,用 Ni-NTA 亲和层析柱对重组蛋白进行了分离纯化,分步收集洗脱成分,每管 2.5 mL,然后对各管进行 SDS-PAGE 分析,结果显示,仅前 3 管含有蛋白成分,重组蛋白绝大部分分布在第 2 管,且其纯度超过 95%。

### 2.4 重组 p24 蛋白的抗原活性分析

将该蛋白稀释到 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  包被酶联板,以 1:80 稀释的 HIV 感染者血清及正常人血清与其反应,加酶标二抗及底物显色,结果表明:7 份正常人血清无一与其反应,5 份 HIV 感染者血清中有 4 份发生特异性免疫反应。以艾滋病人混合血清与其反应,当血清稀释度达到 1:3200 时,仍然表现出较强的反应。

### 2.5 重组 p24 蛋白的特异性

用纯化的 p24 蛋白交联 CNBr 活化的 Sepharose 4B,亲和层析纯化 HIV 感染者血浆中的抗体,再以此抗体与 HIV 确认试剂 HIV BLOT 2.2 (Genelabs<sup>®</sup> Diagnostics) 进行 Western blot 分析,结果表明:纯化抗体只能与 HIV-1 p24 蛋白反应,而未经纯化的同一血清可与 HIV-1 的多种蛋白发生反应(图 3),说明所表达和纯化的蛋白确实是 HIV-1 p24 蛋白,能够特异性地结合 HIV 感染者血清中的抗-p24 抗体。

## 3 讨论

原核表达系统的一个主要缺点就是产物容易形成包涵体。包涵体的形成机制至今尚不完全清楚。一般认为:包涵体的产生主要是由于表达产物的不正确折叠所致,细菌中高效合成的目的蛋白不能及时折叠,造成折叠中间物的聚集,从而形成包涵体。影响包涵体形成的因素主要有:细胞内伴侣蛋白(chaperone)和折叠酶(foldase)的活性、细菌培养温度、目的蛋白的表达量、细胞内环境的 pH 值,此外还有一个重要因素,那就是蛋白质的一级结构即氨基酸序列。蛋白质中某些氨基酸(尤其是半胱氨酸)的改变可能会显著改变蛋白质的整体构象,从而使其容易受细胞内折叠机制的影响而顺利进行折叠。Strandberg<sup>[13]</sup>和 Wetzel 等<sup>[14]</sup>研究表明,重组蛋白中少数氨基酸的改变可以大大改变表达产物的可溶性,而 Rinas 等人<sup>[15]</sup>的研究显示,蛋白序列中某个半胱氨酸的改变即可改变整个蛋白分子的可溶性。

到目前为止已有不少文献报道用大肠杆菌表达 p24 蛋白<sup>[3-12]</sup>,有人用间接的办法表达 Gag-Pol 融合蛋白,利用其中 Pol 基因编码的蛋白酶的活性对融合蛋白进行翻译后加工,结果也得到了可溶性的 p24 蛋白<sup>[4,10]</sup>,但是尚没有人直接高效表达可溶性 p24 蛋白。Gupta 等<sup>[3]</sup>用与我们几乎完全相同的办法表达了 HIV-1 p24 蛋白,其所用载体也是 pQE30,但是他们表达的产物形成了包涵体。图 1 比较了 Gupta 等表达的蛋白与我们表达的蛋白的氨基酸序列。他们所用的 p24 基因片段比我们用的略短,而人工序列却比我们的长,二者在序列上也有一些差异(同源率为 95%,半胱氨酸的位置不同)。本研究所表达的 p24 蛋白的可溶性很可能与羧基端的半胱氨酸 Cys230 有密切的关系,Cys230 很可能与 Cys210 形成链内二硫键,产生一个



图3 重组 HIV-1 p24 蛋白的特异性分析

以重组 HIV-1 p24 蛋白交联 Sepharose 4B, 亲和层析纯化 HIV 感染者血清中的抗体, 用所得抗体与 HIV 确认试剂 HIV BLOT2.2 (Genelabs<sup>®</sup> Diagnostics, Western blot assay) 反应。Lane 26: 亲和层析纯化抗体。Lane 21: 未经纯化的同一血清。

Fig. 3 Specificity analysis of recombinant HIV-1 p24 protein

Lane 26. Antibodies of HIV infected plasma purified by affinity chromatography with recombinant HIV-1 p24 protein linked Sepharose 4B; Lane 21. The same serum without purification.

小的环形结构。Gupta 等去掉了 p24 蛋白羧基端的 Cys230, 却在氨基端人为地引入了一个 Cys14, 它可能与 Cys210 形成二硫键, 产生一个大的环形结构, 使蛋白更加紧凑, 这可能是其所表达的蛋白不溶的主要原因。

本研究采用目前比较先进的原核表达系统, 使 HIV-1 p24 蛋白不仅能够高效可溶性表达, 而且由于该蛋白的 N 末端含有 6 个组氨酸, 可以与金属 Ni 离子形成螯合物, 从而可以用亲和层析的办法一步进行纯化。经一步纯化的 p24 蛋白纯度达 95% 以上, 直接用于包被酶联板, 无需使用细菌蛋白对一抗和二抗进行封闭, 即可得到很低的背景, 这对于 HIV 诊断试剂非常合适。虽然所表达的 p24 蛋白 N 末端 11 个氨基酸不属于 p24 蛋白, 但是由于其长度短, 抗原性弱, 不足以导致非特异性反应, 因此它将不会影响诊断试剂的特异性。结果显示, 该 p24 蛋白能特异地识别 HIV 感染者血浆中的抗-p24 抗体, 而且可以和多数 HIV 感染者的血清发生反应, 但不与正常人血清反应。在试验的 5 份 HIV 感染者血清中, 有一份不与该蛋白反应, 可能是由于该血清中不存在或仅存在极低浓度的抗-p24 抗体。

#### 参 考 文 献

- [1] Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, *et al.* Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone [J]. *J Virol*, 1986, 59(2):284~291
- [2] Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. *Molecular Cloning [M]*, A laboratory Manual. 2nd ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

- [3] Gupta SK, Sengupta J, Bisht R, *et al.* Human immunodeficiency virus type-1 p24 sequence from an Indian strain: expression in *Escherichia coli* and implications in diagnostics [J]. *Gene*, 1997, 190(1):27~30
- [4] Hausdorff G, Gewiss A, Wray V, *et al.* A recombinant human immunodeficiency virus type-1 capsid protein (rp24): its expression, purification and physico-chemical characterization [J]. *J Virol Methods*, 1994, 50(1):1~9
- [5] Tanaka N, Saitoh A, Nakata A, *et al.* A simple method for overproduction and purification of p24 Gag protein of human immunodeficiency virus type 1. *Microbiol Immunol*, 1992, 36(8):823~831
- [6] Ulrich R, Borisova GP, Gren E, *et al.* Immunogenicity of recombinant core particles of hepatitis B virus containing epitopes of human immunodeficiency virus 1 core antigen [J]. *Arch Virol*, 1992, 126(1~4):321~328
- [7] Kovac J. Recombinant proteins derived from immunodominant regions of the gag and env genes of HIV and their potential for use in serologic diagnosis [J]. *Acta Virol*, 1991, 35(4):383~390
- [8] Tsunetsugu-Yokota Y, Tatsumi M, Robert V, *et al.* Expression of an immunogenic region of HIV by a filamentous bacteriophage vector [J]. *Gene*, 1991, 99(2):261~265
- [9] 韩保光, 孟莉, 马贤凯, 等. 人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV)核心蛋白(p24)在大肠杆菌中的表达、纯化及鉴定[J]. 病毒学报, 1997, 13(2):110~118
- [10] 韩保光, 孟莉, 马贤凯, 等. HIV 型 gag 前体蛋白片段在大肠杆菌中的表达、纯化及鉴定[J]. 军事医学科学院院刊, 1997, 21(2):84~88
- [11] 祁自柏, 谷金莲, Bercoff RP. HIV gag 和 env 基因片段的构建及表达[J]. 中国生物制品学杂志, 1995, 8(2):49~52
- [12] 郭军庆, 金宁一, 毛春生, 等. 在大肠杆菌中高效表达人 I 型免疫缺陷病毒 p24 蛋白[J]. 中国人畜共患病杂志, 1998, 14(6):11~15
- [13] Strandberg L, Enfors SO. Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57:1669~1674
- [14] Wetzel R, Perry LJ, Veilleux C. Mutations in human interferon gamma affecting inclusion body formation identified by a general immunochemical screen [J]. *Biotechnology (NY)*, 1991, 9:731~737
- [15] Rinas U, Tsai LB, Lyons D, *et al.* Cysteine to serine substitutions in basic fibroblast growth factor: effect on inclusion body formation and proteolytic susceptibility during *in vitro* refolding [J]. *Biotechnology (NY)*, 1992, 10(4):435~440

## High Level Soluble Expressiion, One-Step Purification and Characterization of HIV-1 p24 Protein

TONG Yi-gang, DU Yong, XU Jing, *et al*

(*Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China*)

**Abstract:** The HIV-1 p24 gene (gag gene) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into an *E. coli* expression vehicle pQE30 between BamH I and Kpn I sites. After induction with IPTG, the transformed *E. coli* strain M15 expressed the HIV-1 p24 gene efficiently. The recombinant p24 protein was expressed as a soluble protein, composing 20% of the total protein. After onestep purification with Ni-NTA<sup>+</sup> affinity chromatography, the protein was purified to almost homogeneity. When applied to ELISA, the p24 protein exhibited good specific reactivity with sera of HIV-infected individuals. The antibodies against recombinant p24 protein from HIV infected plasma were purified and confirmed with HIV Western blot kit that the purified antibodies can only react with HIV-1 p24 antigen. It suggests that the recombinant HIV-1 p24 protein is suitable for assembling the HIV diagnostic kits.

**Key words:** Human immunodeficiency virus type-1; p24 protein; Gene expression; *E. coli*