

## 中国株 HIV-1 外膜蛋白真核表达载体的构建与表达

王福祥, 孙永涛\*\*, 王临旭, 王久平, 王平忠, 白雪帆; 黄长形

(第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心, 陕西西安 710038)

## Construction and Expression of HIV-1 Env Eukaryotic Expression Vector

WANG Fu-xiang, SUN Yong-tao\*\*, WANG Lin-xu, WANG Jiu-ping, WANG Ping-zhong,  
BAI Xue-fan, HUANG Chang-xing

(Center of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases of PLA. Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

**Abstract:** To construct the eukaryotic expression vector of HIV-1 gp120 gene and observe its expression *in vitro*, the recombinant expression vector pVAX1GP120 was constructed by inserting the gp120 gene into the eukaryotic expression vector pVAX1. The pVAX1GP120 was transfected into Vero cells by lipofectamine and the expressed product was detected by indirect immunofluorescence. Restriction enzymes digestion analysis and sequencing results revealed that the recombinant expression vector pVAX1GP120 has been constructed successfully. The indirect immunofluorescence result showed green fluorescence on the membrane of transfected cells. The constructed eukaryotic expression vector of HIV-1 gp120 can be expressed *in vitro*, which lay the foundation for the further study of HIV-1 DNA vaccine.

**Key words:** HIV-1; Envelope protein; Eukaryotic expression vector

**关键词:** HIV-1; 外膜蛋白; 真核表达载体

中图分类号: R373.9

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)01-0070-03

获得性免疫缺陷综合征 (Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 是由人类免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 引起的世界广泛流行、严重危害人类健康的疾病。尽管目前公认疗效较好的高效抗逆转录病毒治疗 (HAART) 在抗 HIV 感染中取得了一定效果, 但由于药物昂贵, 化疗药物的毒副作用和 HIV 耐药株的产生影响了艾滋病治疗, 限制了其在发展中国家使用。因此, 最终将需要一种有效的疫苗来控制 HIV 感染的流行及传播。近年来, 不少学者研究了多种类型 HIV 疫苗, 其中最引人关注的是 HIV-1 DNA 疫苗 (核酸疫苗)。

DNA 疫苗是用编码病原体有效免疫原的基因与细菌质粒构建的重组体直接免疫机体, 转染宿主

细胞, 使其表达保护性抗原, 从而诱导机体产生特异性免疫的疫苗。DNA 疫苗具有使用方便, 生产成本低, 在体内可持续表达, 免疫效果好, 维持时间长等优点。HIV-1 是引起全球艾滋病流行的病原, 目前研究 HIV-1 DNA 疫苗主要是表达 HIV-1 外膜蛋白的 GP120 或 GP160, 以及能表达于 T 细胞表面的 HIV-1 核心蛋白 (Gag) 及 Pol 的部分片段。HIV-1 *env* 基因编码 HIV 外膜蛋白前体 GP160, 可被宿主细胞蛋白酶裂解为外膜蛋白 (GP120) 和跨膜蛋白 (GP41)。GP120 能诱导机体产生中和抗体和 CTL 反应, 成为 HIV-1 DNA 疫苗研究的重点<sup>[1]</sup>。我们将 HIV-1 中国流行株编码 GP120 蛋白的基因插入到真核表达载体 pVAX1 中, 构建了真核表达载体 pVAX1GP120, 并在体外进行了初步表达和检测。

收稿日期: 2003-07-07, 修回日期: 2003-09-22

作者简介: 王福祥 (1971-), 男, 黑龙江省讷河市, 主治医师, 博士生, 主要从事 AIDS 基因疫苗研究。

E-mail: wangfuxiang999@sohu.com, Tel: (029)83377595

\*\* 通讯作者: 孙永涛 (1963-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为艾滋病的防治。

Corresponding author. Tel: 029-83377652, E-mail: yongtaos@hotmail.com

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

菌株 JM109、Vero 细胞、真核表达载体 pVAX1(美国 FDA 批准可用于人体的一种核酸疫苗表达载体)为本室保存。含有中国人 HIV-1 流行株编码 GP120 蛋白基因的质粒 pKSGP120 为解放军军需大学金宁一教授惠赠。限制性内切酶 *EcoR* I、*Pst* I, T4DNA 连接酶均购自于 TaKaRa 公司。胎牛血清购自 Gibco 公司, lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司, FITC 标记的羊抗人 IgG 抗体购自武汉博士德公司。

### 1.2 真核表达载体 (pVAX1GP120) 的构建

限制性内切酶 *EcoR* I、*Pst* I 双酶切质粒 pKSGP120, 将其中的编码 GP120 蛋白基因重组到同样酶切处理的真核表达载体 pVAX1, 得到含有编码 gp120 蛋白基因的 HIV DNA 疫苗真核表达载体 pVAX1GP120(具体操作步骤见分子克隆实验指南)<sup>[2]</sup>。

### 1.3 重组质粒 (pVAX1GP120) 的酶切及测序鉴定

使用限制性内切酶 *EcoR* I、*Pst* I 双酶切重组质粒 pVAX1GP120 进行鉴定。并将酶切鉴定正确的重组质粒送至上海生工生物工程公司进行测序。

### 1.4 pVAX1GP120 中 gp120 蛋白编码基因的同源性搜索

通过 Internet 用 Blast 程序搜索 GenBank 中 pVAX1GP120 中 GP120 蛋白编码基因的同源性序列。计算公式为: 核苷酸同源性的百分率: 被比较的片段相同的碱基数/相比较的小片段的碱基数 × 100%。

### 1.5 质粒的细胞转染

采用脂质体转染技术操作步骤是: (1) 在含有玻片的 24 孔培养板中, 接种传代的 Vero 细胞, 当细胞量达到 90%~95%底面积时, 于转染前用无血清和抗生素的 DMEM 洗 2 遍, 每孔加入 1mL DMEM。(2) 配制细胞转染液 A (纯化的重组质粒 5μL 加入 50μL 无血清和抗生素的 DMEM 中), B ( lipofectamine 3μL 加入 50μL 无血清和抗生素的 DMEM 中。5min 内将 A 和 B 混匀, 室温作用 20min)。(3) 将 108μL 的质粒-lipofectamine 混合物加入每孔含细胞的 DMEM 中混匀。(4) 细胞于 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 孵育培养 6h, 吸弃转染液, 加入含有 10% FCS 的 1640 液 1mL, 继续孵育 48h 后检测。同时设空质粒对照组。

### 1.6 表达产物间接免疫荧光法鉴定

将 24 孔板中的玻片取出, 置冷丙酮固定 15min

后, 依次与艾滋病患者血清和 FITC 标记的羊抗人 IgG 抗体反应, 用荧光显微镜观察并拍照。

## 2 结果与讨论

### 2.1 HIV-1 DNA 疫苗真核表达载体的构建及鉴定

将质粒 pKSGP120 上的 *gp120* 基因用 *EcoR* I、*Pst* I 双酶切后定向插入到真核表达载体 pVAX1 中, 构建了重组表达质粒 pVAX1GP120。HIV-1 DNA 疫苗真核表达载体酶切鉴定图谱见图 1。重组表达质粒 pVAX1GP120 用 *EcoR* I、*Pst* I 双酶切后, 可切出 1500bp 左右的目的基因带, 表明质粒构建正确。

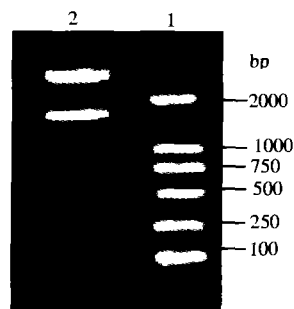


图 1 重组质粒 pVAX1GP120 的鉴定

Fig.1 Analysis of pVAX1GP120

1. DL 2000 marker; 2. pVAX1GP120 digested with *EcoR* I /*Pst* I

### 2.2 真核表达载体 (pVAX1GP120) 测序及同源性搜索结果

利用 Blast 程序, 搜索 NCBI GenBank 中与重组质粒 (pVAX1GP120) GP120 蛋白编码基因同源的序列。结果表明该段基因的序列与 pKSGP120 中的 GP 120 蛋白编码序列完全一致, 与 HIV-1 ARV-2/SF2 毒株 (HIVSF2CG) GP 120 蛋白编码序列高度同源, 仅有 2 个碱基有差异。

### 2.3 表达产物间接免疫荧光鉴定

重组质粒用 lipofectamine 2000 转染 Vero 细胞后, 于荧光显微镜下观察, 结果见彩版 I 图 2。由图 2 可见转染重组质粒 pVAX1GP120 的细胞边缘有明显的绿色荧光 (彩版 I 图 2A), 而空质粒转染细胞未见荧光物质 (彩版 I 图 2B)。因此, 构建的真核表达载体可以在体外进行表达。

## 3 讨论

Wang 等于 1993 年首次报道了 HIV-1 DNA 疫苗的研究, 使用 HIV-1gp160env-rev 表达载体免疫小鼠, 获得了保护性的细胞和体液免疫应答<sup>[3]</sup>。MacGregor 等首次报道了 HIV-1DNA 疫苗在人类的 I 期临床试验, 观察了 HIV-1env-revDNA 疫苗在 15

例无症状 HIV 感染者中的安全性和宿主免疫应答,提示 HIV-1DNA 疫苗是安全的,并且可以增强这些 HIV 感染者的 CTL 反应和升高抗 GP120 抗体滴度<sup>[4]</sup>。这些研究奠定了用 DNA 疫苗来预防 HIV-1 感染的可行性。

近年来,联合 DNA 疫苗初次免疫,重组蛋白疫苗加强策略集中于 HIV-1 外膜蛋白。这种免疫策略可以诱导细胞和体液免疫应答。国外有人使用编码 HIV env 的 DNA 疫苗初次免疫,以重组蛋白加强,可以增强 T 细胞增殖性应答并升高中和性抗体滴度<sup>[5]</sup>,而且,GP120 DNA 初次免疫,重组蛋白加强可以增强 CTL 反应,这些策略可以有效地防止 HIV-1 或者 SHIV 攻击恒河猴。

我们将 HIV-1 的 GP120 蛋白全基因插入到真核表达载体 pVAX1 中,从而构建了 HIV-1 真核表达载体 pVAX1GP120,通过酶切及测序鉴定正确。并在体外通过脂质体介导,将重组质粒转染 Vero 细胞,通过间接免疫荧光进行表达产物检测,结果表明转染重组质粒的细胞表面有绿色荧光。因此,

构建的真核表达载体可以在体外进行表达,为下一步进行 HIV-1 DNA 疫苗的动物实验奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] Poignard P, Saphire E O, Parren P W, *et al.* gp120: Biologic aspects of structural features[J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 253-274.
- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T(translated by Jin dongyan, Li mengfeng *et al.*). *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed[M]. BeiJing, Science Book Concern, 1992: 16-68.
- [3] Wang B, Ugen E K, V Strikantan, *et al.* Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(9): 4156-4160.
- [4] MacGregor R R, Boyer J D, Ugen K E, *et al.* First human trial of a DNA-Based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response[J]. *J Infect Dis*, 1998, 178(1): 92-100.
- [5] Richmond J F, Lu S, Santoro J C, *et al.* Studies of the neutralizing activity and avidity of anti-human immunodeficiency virus type 1 Env antibody elicited by DNA priming and protein boosting[J]. *J Virol*, 1998, 72(11): 9092-9100.