

## 牛免疫缺陷病毒基质蛋白和衣壳蛋白的可溶性表达\*

朱义鑫<sup>1</sup>, 张晓光<sup>2</sup>, 杨怡姝<sup>3</sup>, 刘畅<sup>1</sup>, 乔文涛<sup>1</sup>, 陈启民<sup>1</sup>, 耿运琪<sup>1\*\*</sup>

(1. 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 2. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 100052; 3. 北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100022)

### Expression of Matrix and Capsid Protein of Bovine Immunodeficiency Virus

ZHU Yi-xin<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-guang<sup>2</sup>, YANG Yi-shu<sup>3</sup>, LIU Chang<sup>1</sup>,  
QIAO Wen-tao<sup>1</sup>, CHEN Qi-min<sup>1</sup>, GENG Yun-qi<sup>1\*\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071 China; 2. National Institute for Viral Disease Control and Prevention, CDC, Beijing 100052 China; 3. College of Life Sciences and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing, 100022 China)

**Abstract:** The matrix and the capsid are main structural proteins of *Bovine immunodeficiency virus* (BIV) and play important roles in virus life cycle. In order to analyze these two proteins *in vitro*, we cloned these two genes into the prokaryotic expression vector pTXB and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) in a soluble form. After purification, the matrix without fusion peptide was obtained in milligram magnitude. The capsid was also expressed and purified in ten - milligram magnitude. We used the dissolvable BIV CA to immunized rabbit and got antiserum 53 d after first injection. Western blotting analysis showed that the antiserum could specifically recognize the native HIV CA protein. The protein could be used as the antigen to produce the antiserum and used in protein - protein interaction analysis.

**Key words:** BIV; Matrix; Capsid; pTXB system;

**摘要:** 基质蛋白和衣壳蛋白是 BIV 的主要结构蛋白, 在病毒感染及整个复制周期中起重要作用。本文采用 pTXB 系统在大肠杆菌中表达出融合状态的牛免疫缺陷病毒 BIV 基质蛋白 MA 及衣壳蛋白 CA, 经几丁质亲和、自剪切纯化后, 获得不含融合片段的纯化产物。每克湿菌体 MA 产量可达毫克级, CA 表达量达十毫克级。用原核表达获得的高纯度 CA 蛋白免疫大白兔获得的抗血清, 经 Western Blot 分析显示能够与病毒颗粒的 CA 蛋白发生特异反应, 证实表达产物具有良好的免疫原性和反应原性, 可用于制备相应抗体, 为研究 BIV 相应基因表达变化, 进行体外蛋白质相互作用试验提供工具。

**关键词:** 牛免疫缺陷病毒; 基质蛋白; 衣壳蛋白; pTXB 表达系统

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)01-0037-05

牛免疫缺陷病毒 (*Bovine immunodeficiency virus*, BIV) 与人免疫缺陷病毒 (*Human immunodeficiency virus*, HIV) 同属于反转录病毒科慢病毒属, 可引起牛的淋巴结病、淋巴细胞增多症、中枢神经系统损伤和进行性消瘦等病症, 使牛出现类艾滋病症状 (BAIDS)<sup>[1]</sup>。作为一种独特的非灵长类慢病毒, BIV 与 HIV 基因组高度同源, 其遗传、复制方式、与宿主细胞的相互关系、致病机理等与 HIV 极其类似<sup>[2]</sup>, 用其作为一种艾滋病研究模型, 用于探讨

慢病毒基因表达调控、慢病毒与其它病毒超感染后病毒间以及病毒与宿主细胞间的相互作用, 具有很高的安全性。

BIV 具有典型慢病毒基因组, 含有 *gag*、*pol*、*env* 三个结构基因及一些调节基因。其中, *gag* 基因编码相对分子质量为  $5.3 \times 10^3$  的 Gag 前体蛋白, 经蛋白酶切割后主要有三种裂解产物: 基质蛋白 (MA, p16MA)、衣壳蛋白 (CA, p26CA) 和核衣壳蛋白 (NC, p13NC), 是病毒的主要结构蛋白<sup>[3]</sup>。

收稿日期: 2004-07-01, 修回日期: 2004-08-14

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170038)

作者简介: 朱义鑫 (1978-), 男, 湖北荆州籍, 研究方向为微生物学。

\*\* 通讯作者. Corresponding author. Tel: 022-23501783, E-mail: gengyq@nankai.edu.cn

Gag 前体蛋白及其切割后产物主要作用于病毒出芽过程的起始,与病毒基因组 RNA 结合,完成病毒颗粒的组装成熟,在病毒感染及整个复制周期中发挥重要作用。

为研究 BIV 超感染状态下病毒与病毒以及病毒与宿主细胞蛋白间相互作用,需要获得大量、高纯度且保持天然活性的目标蛋白;而研究 BIV 基因表达调控,检测其基因的表达,必须获得相应的高滴度特异性抗体,而获得足够量的保持天然免疫原性的高纯度抗原蛋白是制备抗体的前提。因此,曾有多个试验室在不同的表达系统中表达 BIV 衣壳蛋白 CA,但均只获得不可溶的融合蛋白,其活性和天然构象均有不同程度的损伤,且最终也未得到不含融合成分的衣壳蛋白 CA<sup>[4~6]</sup>。

本文采用一种新的 pTXB 原核蛋白表达系统,在大肠杆菌中首次表达出基质蛋白 MA,经几丁质亲和纯化、自剪切后,获得不含融合片段的纯化产物,每克湿菌 MA 产量可达毫克级。采用同一系统,获得可溶状态高表达量 BIV CA 蛋白,并且建立了一套简捷高效的分离、纯化、自剪切方法,获得了十毫克级不含任何融合片段的 CA 蛋白。将表达纯化的 CA 蛋白免疫大白兔获得抗血清,进行 Western Blot 分析,结果表明抗血清可与天然的 BIV CA 蛋白发生很好的免疫反应,证实本文表达的 CA 蛋白具有天然 CA 蛋白的抗原表位,保持了良好的免疫原性,获得的抗血清可用于免疫检测,为进一步研究 BIV 蛋白表达的时空变化,确定蛋白间相互作用,探讨病毒基因调控机制及病毒与细胞相互作用奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

BIV 感染性克隆 pBIV127、BIV R29 病毒毒株以及胎牛肺细胞 (FBL)、DH5 和 BL21 (DE3) 菌株为本室保存;PCR 引物由上海生工公司合成;限制性内切酶和 pMD18-T 载体购自 Takara 公司;pTXB 表达质粒和蛋白纯化柱购自 New England 公司;实验用大白兔由中国预防医学科学院病毒研究所动物房提供;弗氏完全和不完全佐剂购自 Sigma 公司。

### 1.2 PCR

引物:根据 BIV 序列设计引物扩增 BIV MA 基因、BIV CA 基因的编码区。上下游引物中分别引入 *Nde*I 和 *Eco*RI 限制性内切酶位点。序列如下:  
P<sub>1</sub>: 5'-GTCCA T A T G A A G A G A A G G G A G-3', P<sub>2</sub>:

5'-CTT G A A -T T C G C C T T C C T T A T C-3' 扩增 BIV 709-1 071bp BIV MA 基因片段;P<sub>3</sub>: 5'-CAACA T A T G C C A G C T A T C A C T A C T C-3', P<sub>4</sub>: 5'-CC C G A A -T T C T T T C A T A G C T G C-3' 扩增 BIV 1153-1830bp BIV CA 基因片段。

PCR 反应:BIV 感染性克隆 pBIV127 为模板。PCR 反应条件:94 3min;94 30sec,55 30sec,72 30sec,15 个循环;72 5min。

PCR 产物克隆和鉴定参照文献<sup>[7]</sup>进行。酶切正确的重组子送上海博亚生物技术公司测序。

### 1.3 目的基因的表达与纯化

参照 New England 公司基因融合系统及蛋白纯化手册进行。用 pTXB-MA, pTXB-CA 表达质粒转化 BL21 感受态细胞中,挑选单克隆,接种到含有氨苄青霉素和氯霉素的双抗 2YT 中,37 震荡培养过夜。之后以 1% 体积转接过夜培养物,37 培养约 3~5h,至 OD<sub>600nm</sub> 达 0.4~0.6,用终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG 25 诱导 4~6h,收集菌体。湿菌称重。取出少量菌体裂解,进行 SDS-PAGE 电泳检测融合蛋白的表达情况。

用固化几丁质的亲和层析柱纯化目的蛋白:每克湿菌以 10mL 4 裂解缓冲液重悬。超声波破碎菌体,12000r/min,4 离心 15min。SDS-PAGE 检测上清与沉淀中融合蛋白量。

根据检测结果,将上清以 1mL/min 的速度通过预先经裂解缓冲液平衡过的几丁质亲和层析柱。然后以 3~5 倍柱体积的裂解缓冲液洗柱,直至没有蛋白洗脱下来为止。收集少许洗脱液,检测融合蛋白的吸附情况。

以还原性的酶切缓冲液(含 30mmol/L DTT)置换柱内原有的缓冲液。酶切缓冲液的还原条件激活 Intein 的蛋白酶活性,发生自剪切,收集剪切后目标蛋白。分光光度法测定浓度。

### 1.4 动物免疫

免疫方法:背部皮下多点注射。挑选 5~6 周龄健康的新西兰大耳白,经检测未被常见的病毒感染。按 100μg 蛋白/只免疫 3 次,首次注射 4 周后第一次加强注射,之后 2 周第二次加强注射,蛋白与佐剂体积比为 1:1,第一次使用完全佐剂,之后使用不完全佐剂。第二次加强注射后第 10 天耳缘静脉取血测定效价。

### 1.5 蛋白电泳与 Western-Blot 分析

蛋白经 15%SDS-PAGE 电泳,考马斯亮兰染色观察。或转硝酸纤维素膜进行 Western-blot 分析,一抗采用免疫兔血清,1:100 稀释,二抗用辣根过

氧化物酶 HRP 标记的羊抗兔 IgG,1 1000 稀释, DAB 显色。

## 2 结果

### 2.1 pTXB-MA, pTXB-CA 原核表达质粒的构建

PCR 扩增获得 MA CA 基因片段,回收后分别连入 pMD18-T 载体,转化 DH5<sup>+</sup>,转化子经酶切鉴定正确后测序。测序结果证实其插入序列为 MA、CA 基因片段且没有突变。

用 *Nde*I、*Eco*RI 双酶切获得 MA、CA 基因片段,回收,连如经同样酶切处理的 pTXB 表达质粒,转化 DH5<sup>+</sup>,转化子经酶切鉴定正确后测序。测序结果证实 MA、CA 基因片段已正确插入 pTXB 融合蛋白读码框,没有突变,得到 pTXB-MA 和 pTXB-CA 表达质粒。

### 2.2 BIV MA 及 CA 的表达与纯化

2.2.1 BIV MA 及 CA 的表达:将 pTXB-MA、pTXB-CA 分别转化 *E. coli* BL21 (DE3),IPTG 诱导,表达结果见图 1,以 pTXB 转化及不含任何质粒的 BL21 (DE3) 为对照。SDS-PAGE 电泳显示,pTXB-MA 及 pTXB-CA 转化菌经过诱导均产生特异表达带,其大小与预期 42kDa (MA16kDa, Intein-CBD 残基 26kDa,泳道 6) 和 52kDa (CA26kDa, Intein-CBD 残基 26kDa,泳道 8) 相符。空载体转化均经诱导后表达 29.6kDa 的 Intein-CBD 蛋白(泳道 4)。凝胶扫描仪分析得知融合蛋白 MA-Intein-CBD 约占细菌总蛋白的 15%,融合蛋白 CA-Intein-CBD 表达量约占细菌总蛋白的 25%。

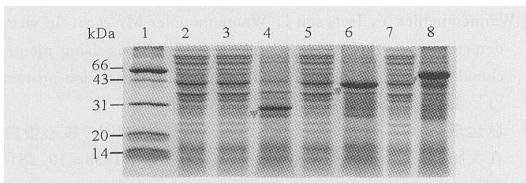


图 1 pTXB-MA 在 BL21 (DE3) 中表达产物的 SDS-PAGE 分析  
Fig.1 SDS-PAGE analysis of pTXB-MA expression in BL21 (DE3) 1, Protein marker; 2, Total protein from *E. coli* BL21 (DE3); 3/4, Total protein from BL21 (DE3) (pTXB) un-induced and induced; 5/6, Total protein from BL21 (DE3) (pTXB-MA) un-induced and induced; 7/8 Total protein from BL21 (DE3) (pTXB-CA) un-induced and induced. Arrows indicated the protein bands induced.

2.2.2 BIV MA 的纯化:用几丁质的亲和层析柱纯化 BIV MA,结果见图 2。第 4、第 5 泳道显示融合蛋白的溶解情况。溶解部分占融合蛋白的总量的 95% 以上,几乎完全被几丁质亲和(泳道 6)。目标蛋白经过一步纯化,纯度可达 80% (泳道 7)。回收后目标蛋白浓度约为 0.2mg/mL,最后得率约 20%。

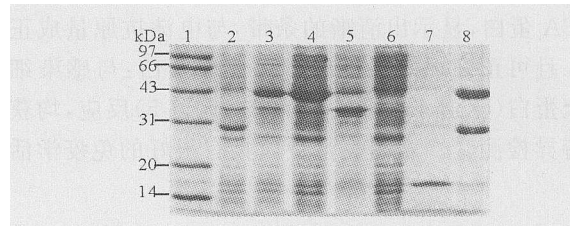


图 2 BIV MA 纯化产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of BIV MA purification 1, Protein marker; 2, Total protein from BL21 (DE3) (pTXB) induced; 3, Total protein from BL21 (DE3) (pTXB-MA) induced; 4, Supernatant of BL21 (DE3) (pTXB-MA) induced; 5, Pellet of BL21 (DE3) (pTXB-MA) induced; 6, Flowthrough of supernatant; 7, MA protein; 8, Elution by stripping buffer.

2.2.3 BIV CA 的纯化:用相同方法纯化 BIV CA,结果见图 3。第 4、5 泳道显示溶解部分占融合蛋白的总量的 80% 左右,与几丁质亲和力极强(泳道 6)。目标蛋白经过一步纯化,纯度即达 90% 以上。回收到的目标蛋白浓度约为 1.2mg/mL,每克湿菌体产量为 12mg。根据每克湿菌约相当于 200mg 干重蛋白计算,目标蛋白的最后得率高达 50%。

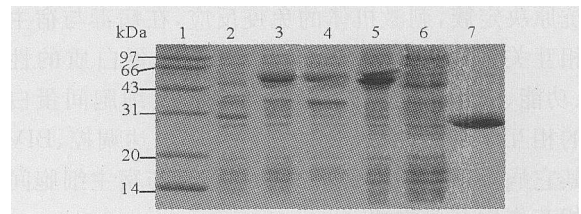


图 3 BIV CA 纯化过程的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE Analysis of BIV CA Purification 1, Protein marker; 2, Total protein from BL21 (DE3) (pTXB) induced; 3, Total protein from BL21 (DE3) (pTXB-CA) induced; 4, Pellet of BL21 (DE3) (pTXB-CA) induced; 5, Supernatant of BL21 (DE3) (pTXB-CA) induced; 6, Flowthrough of supernatant; 7, CA protein.

### 2.3 BIV CA 具有免疫学活性

采用纯化的 CA 蛋白免疫大白兔获得抗血清,分别与不同量的原核表达 CA 蛋白和天然 BIV CA 蛋白进行免疫反应,Western-Blot 分析结果见图 4。

Western-Blot 结果显示,兔抗血清可识别 ng 级

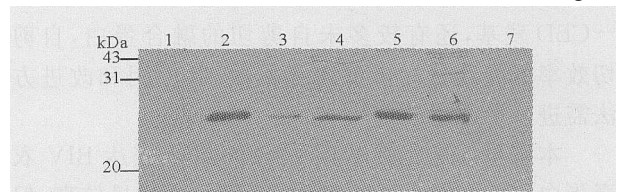


图 4 BIV CA 蛋白免疫原性分析

Fig.4 Analysis of BIV CA immunogenic activity Western Blot analysis with rabbit antiserum generated by BIV CA expressed. 1, BL21 (DE3) as negative control; 2/3, 40ng and 4ng of purified CA as positive control; 4, Lysis of FBL cell infected by BIV R29; 5, Pellet by supercentrifuge of BIV R29 supernatant; 6, Lysis of dead FBL cell killed by BIV R29; 7, Lysis of Normal FBL cell as negative control.

的 CA 蛋白,显示出清晰的条带,与电泳抗原量成正比。且可正确识别天然的 BIV CA 蛋白:与感染细胞全蛋白(泳道 4、6)和病毒颗粒(泳道 5)反应,均获得特异检测带。表明表达蛋白具有很好的免疫学活性。

### 3 讨 论

慢病毒感染生物体后,存在漫长的潜伏期,其间病毒与宿主相互作用,调控彼此的基因表达。同时,慢病毒感染常伴随多种病毒的超感染,尤其是疱疹病毒及其它反转录病毒的交叉感染,这种超感染是影响慢病毒发病的重要因素。BIV 的基质蛋白 MA 和衣壳蛋白 CA 是病毒的主要结构蛋白,具有多种生物学功能。MA 在病毒的组装中起重要作用,并参与病毒的感染过程和病毒 cDNA 的整合过程;CA 是高疏水性的磷酸化蛋白,通过分子间的相互结合,形成病毒颗粒的核心,在从感染到成熟的整个复制周期中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。此外,CA 具有较多的抗原决定簇,刺激机体的免疫反应,在病毒与宿主的相互关系中起重要作用。研究这些蛋白质的性质、功能、表达调控,其与超感染病毒及细胞间蛋白质的相互作用,对阐明 BIV 自身基因表达调控、BIV 与其它病毒超感染后病毒间以及病毒与宿主细胞间的相互作用至关重要。

蛋白质研究的重要手段之一是利用抗体进行分析,在目前实验条件下,免疫动物获得高质量的抗血清,利用多克隆抗体进行实验最为可行,因此需要进行目的蛋白的高效表达。而获得高质量的目标蛋白,也是进行体外蛋白结合试验等分析蛋白质相互作用实验的必备前提。

本文首次在大肠杆菌中可溶性表达了 BIV MA 蛋白,但产率较低,42kDa、26kDa 处两条细带推测是未被完全剪切的融合蛋白和洗脱下来的 Intein - CBD 残基。最后从柱上强行洗脱的蛋白除了 Intein - CBD 残基,还有较多未自剪切的融合蛋白,自剪切效率低导致目标蛋白得率偏低,其原因和改进方法需进一步探讨。

本室早期工作曾利用 pATH 系统表达 BIV 衣壳蛋白 p26 与部分 p16 的融合蛋白,表达量较高,但可溶性低<sup>[5]</sup>,难于纯化。Dominique B 等人也曾对 BIV CA 进行表达<sup>[6]</sup>。本文采用 pTXB 系统对 CA 进行可溶性表达和纯化,在产量、纯度等方面明显优

于 Dominique B 等人的结果,且不带有标签融合肽。

pTXB 表达系统具有纯化简单,产物纯度高的特点,融合部分可增加蛋白的可溶性。且该系统表达的蛋白始终处于比较温和的理化环境中,有利于保持其本来的空间结构。本文 Western Blot 结果(图 4)显示,除 BIV CA (p26)之外,抗血清还检测到 BIV gag 的前体 pGag52 (泳道 4、5、6),此外,感染 BIV 的细胞蛋白还有其它几条反应带(泳道 4、6),推测是含有 CA 的一系列部分剪切体,表明利用该系统表达的 CA 蛋白具有很好的免疫学活性。我们尚未发表的实验结果也表明,pTXB 系统表达的 HIV gp41 蛋白在筛选小分子化合物药物方面也有其独特之处,也表明该系统表达的蛋白能较好地模拟天然蛋白的空间构象。从纯度、表达量及可溶性多角度综合分析,该系统获得纯化的蛋白还可以用于核磁共振以及生长晶体,进行 X-射线衍射分析,作为结构生物学的研究材料。同时也可作为蛋白质相互作用研究以及作为筛选小分子和多肽的工具,在药物研究方面也具有价值。

### 参考文献

- [1] Campbell R S, Robinson W F. The comparative pathology of the lentiviruses[J]. *J Comp Path*, 1998, 119:335-395.
- [2] Gonda M A, Braun M J, Carter S G, *et al*. Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to human immunodeficiency virus[J]. *Nature*, 1987, 330:338-391.
- [3] Battles J K, Hu M Y, Rasmussen L, *et al*. Immunological characterization of the gag gene products of Bovine Immunodeficiency Virus[J]. *J Virol*, 1992, 66: 6 868-6 877.
- [4] Wannemuehler Y, Isaacson J, Wannemuehler M, *et al*. In vitro detection of bovine immunodeficiency - like virus using monoclonal antibodies generated to a recombinant gag fusion protein [J]. *J Virol Methods*, 1993, 44:117-128.
- [5] 耿运琪,杨丽珠,纪永刚,等. 牛免疫缺陷病毒(BIV)核心蛋白在大肠杆菌中的表达和鉴定[J]. *病毒学报*, 1998, 19:281-283.
- [6] Dominique B, Francois M, Valerie C, *et al*. Overexpression and Purification of an Immunologically Reactive His - BIV Capsid Fusion Protein[J]. *Protein Expr Purif*, 1999, 15: 258-264.
- [7] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [8] von Schwedler U K, Stemmler T L, Klishko V Y, *et al*. Proteolytic refolding of the HIV-1 capsid protein amino - terminus facilitates viral core assembly[J]. *EMBO J*, 1998, 17:1 555-1 568.