

HIV-1 蛋白酶的表达、纯化及其抑制剂体外筛选方法的建立*

王云华^{1,3}, 王睿睿^{1,3}, 杨柳萌¹, 李健峰², 徐维明², 郑永唐^{1,**}

(1 中国科学院昆明动物研究所分子免疫药理学实验室, 云南昆明 650223; 2 中国医学科学院医学生物学研究所, 云南昆明 650231; 3 中国科学院研究生院, 北京 100039)

Expression and Purification of HIV-1 Protease and the Establishment of a Method for Protease Inhibitor Screening

WANG Yun-hua^{1,3}, WANG Rui-rui^{1,3}, YANG Liu-meng¹, Li Jian-feng²,
XU Wei-ming², ZHENG Yong-tang^{1,**}

(1. Laboratory of Immunopharmacology, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650223, China; 2. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming, Yunnan 650231, China; 3. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: HIV-protease coding sequence was amplified from HIV-1_{III_B} RNA by one-step RT-PCR. The PCR product was inserted into the pet28a expression vector with an additional ATG start codon before and TAA stop codon after the coding sequence. Positive clone was selected and transformed into *E. coli* BL21 DE3. Cells were cultured in LB medium and induced by IPTG. The recombinant protease was expressed in the form of inclusion body and was up to 40% of total bacterial protein. The inclusion body was washed by Triton X-100 before dissolved in 8M urea and then applied on sephacryl s-200 H.R column. The purity of the protease reached 90% after purification. Protease fraction was collected and diluted in refolding buffer and left at 4°C for 24 h. The diluent was concentrated by ultrafiltration. The activity of recombinant protease and the inhibiting effect of indinavir were analyzed by FRET with synthesized fluorescence-labeled peptide. The results above indicates that the method can be used to screen inhibitor of HIV-1 protease.

Key words: HIV-1; protease; expression; purification; inhibitors

摘要: 从 HIV-1_{III_B} 病毒 RNA 经 RT-PCR 得到 HIV-1 蛋白酶编码序列, 克隆到 pet28a 质粒中构建 HIV-1 蛋白酶表达载体。阳性克隆转染 *E. coli* BL21 DE3, 经 IPTG 诱导, 蛋白酶以包涵体的形式表达, 表达量占菌体总蛋白量的 40%。包涵体经 Triton X-100 洗涤后溶解于 8M 尿素, 溶解后的蛋白溶液经 sephacryl s-200 H.R 分子筛柱纯化后纯度达到 90% 以上, 收集蛋白酶峰稀释复性并通过超滤进行浓缩。经检测, 纯化的蛋白酶具有较高的活性。用荧光标记的蛋白酶底物检测不同浓度 indinavir 对蛋白酶活性的影响, 表明该方法可以用于蛋白酶抑制剂的筛选。

关键词: HIV-1; 蛋白酶; 表达; 纯化; 抑制剂;

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)02-0126-05

艾滋病在过去 20 多年里已经造成 2000 多万人死亡, 目前全世界 HIV 感染者已达 4000 万人。由

于 HAART (Highly active antiretroviral therapy) 的应用, 从 1998 年起, 美国 HIV 感染者的死亡率逐年

收稿日期: 2005-10-24, 修回日期: 2005-12-19

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划(2003AA219142); 国家“十五”科技攻关计划(2004BA719A14); 中国科学院知识创新工程(KSCX2-SW-216; KSCX1-SW-11); 云南省自然科学基金(2002C0066M); 云南省科技攻关计划(2004NG12)

作者简介: 王云华(1974-), 男, 云南人, 博士研究生, 主要从事抗 HIV 药物筛选研究。

** 通讯作者: 郑永唐(1962-), 男, 博士、研究员, 博士生导师。研究方向: 病毒免疫学和分子免疫药理学。
Corresponding author. Tel/Fax: 0871-5195684; E-mail: zhengyt@mail.kiz.ac.cn

下降。然而, 由于 HIV 易变异, 耐药性和药物毒副作用等问题日趋严重^[1,2], 促使人们不断寻找新的抗 HIV 药物。

合适的体内外药物筛选和研究方法是研究和开发新药中最关键和最基础的环节之一。在抗 HIV 药物研究中已经建立了多种体外药物筛选方法, 从天然来源或人工合成的化合物中筛选具有抗 HIV 活性的化合物^[3]。在目前的蛋白酶筛选方法中, 主要是在体外以模拟蛋白酶切割位点的合成多肽为底物, 在待测化合物存在或不存在时, 以 HPLC 分析多肽产物, 计算化合物对蛋白酶活性的抑制程度。该方法工作量大, 对于大通量的筛选来说具有一定的困难^[4]。

利用荧光共振能量传递(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)原理, 在合成的蛋白酶底物两端分别偶联荧光发光基团和淬灭基团, 可通过检测底物被切割后产生荧光的强度来检测蛋白酶切割反应的情况^[5,6]。本研究表达并纯化了 HIV-1 蛋白酶, 并用表达的蛋白酶建立了适合进行体外高通量筛选蛋白酶抑制剂的方法, 为以后的药物筛选工作及药物靶点确认打下了基础。该方法在国内还未见文献报道。

1 材料和方法

1.1 材料

pet28a 表达载体和 *E. coli*. DH5 α , BL-21DE3 宿主菌引自中国医学科学院医学生物学研究所。引物、限制性内切酶、LA-Taq 酶、连接试剂盒和 RT-PCR 试剂盒购自宝生物公司。Indinavir 购自 Merck 公司。HIV 蛋白酶底物 DABCYL- γ -Abu-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-EDANS 购自 AnaSpec 公司。ÄKTA explore 和 sephacryl S-200 H.R. 购自 Pharmacia 公司。Viva flow200 超滤系统购自 Vivascience AG 公司。荧光酶标仪 Fluoroskan Ascent FL 购自 Thermo Electron。其他生化试剂购自 Sigma 和华美公司。

1.2 蛋白酶编码片段的扩增及表达载体的构建

用常规方法提取 HIV-1_{IIIIB} 病毒 RNA, 用引物 5'-GCCCATGGCC T CAGGTCACCTTTGG-3' 和 5'-GTGGATCCTTAAAAATTTAAAAGTGCACC A-3' 进行一步 RT-PCR 扩增 HIV-1 蛋白酶编码片段。反应条件为: 50°C 30min, 95°C 5min, 94°C 1min, 52°C 1min, 72°C 1min, 30 个循环, 72°C 2min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物, 回收目的片段。回收的 PCR 产物及 pet28a 载体用 *Nco* I 和

*Bam*H I 酶切, 回收目的片段。将酶切后的片段与线性化载体进行连接后转化 *E. coli*. DH5 α 感受态细胞。挑取转化的克隆进行 PCR 鉴定, 阳性克隆进行 DNA 测序。

1.3 蛋白酶表达纯化

培养经测序正确的克隆菌株, 提取质粒, 转化大肠杆菌 BL-21 DE3, 挑取单克隆在 37°C 培养至 $OD_{600nm} \approx 0.4-0.6$, 加入 100 μ g/mL IPTG, 诱导 8h。

离心收集菌体, 以溶液 A (50 mmol/L PB, pH7.0, 50 mmol/L NaCl, 5 mmol/L DTT) 重悬菌体, 超声破菌。离心收集包涵体。溶液 B (50 mmol/L PB, pH7.0, 50 mmol/L NaCl, 5 mmol/L DTT, 1% Triton X-100) 重悬包涵体。重复超声 3 次。溶液 C (50 mmol/L PB, pH7.0, 50 mmol/L NaCl, 5 mmol/L DTT, 8 mol/L 尿素) 溶解包涵体, 室温搅拌 3 h。10000 r/min 离心 20 min, 取上清。

用溶液 C 平衡 sephacryl s-200 H.R, 溶解的包涵体上清上柱, 溶液 C 洗脱, 收集蛋白峰。凝胶扫描分析检测蛋白纯度。

取纯化的目的蛋白溶液 40mL, 快速稀释 100 倍至 4L 溶液 D (50 mmol/L PB, pH7.0, 50 mmol/L NaCl, 5 mmol/L DTT, 10% 甘油) 中, 快速搅拌。置 4°C 复性 24 h。在冰水浴中超滤浓缩复性蛋白溶液至 20 mL, 12000 r/min 离心 20min 除去沉淀。上清加甘油至 50%, 分装保存于 -80°C。考马斯亮蓝染色-分光光度法检测蛋白含量。

1.4 蛋白活性检测及药物筛选方法的建立

1.4.1 酶反应条件优化: 为选择酶反应的最佳 pH 值并考察盐离子对反应的影响, 以 50 mmol/L HEPES, 125 mmol/L 乙酸钾, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 0.5 mg/mL BSA 为基础溶液。A 组: 分别将 pH 值调至 7.0, 6.5, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0; B 组: 在 A 组缓冲液中各加入 NaCl 至终浓度 1 mol/L。在黑色 96 孔板上建立 100 μ L 反应体系, 蛋白酶浓度 4.75 ng/ μ L, 底物浓度为 2 μ mol/L。酶与底物混匀后, 反应 60min, 在荧光酶标仪上读取荧光强度, 检测在各个缓冲液条件下的酶反应情况, 以 Anaspec 公司提供的缓冲液作为参照。

1.4.2 EDANS (5-[(2-aminoethyl)amino]naphthalene-1-sulfonic acid) 标准曲线的绘制: 在黑色 96 孔板上用反应缓冲液将 EDANS 稀释至 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6, 0 nmol/L, 每孔 100 μ L, 在荧光检测仪上用 355/485 滤光片检测标准品的荧光强度, 绘制标准曲线。

1.4.3 蛋白酶活性测定: 在黑色 96 孔板以优化的缓冲溶液建立 100 μ L 反应体系, 蛋白酶浓度 4.75 ng/ μ L, 底物浓度为 2 μ mol/L, 作三个复孔。酶与底物混匀后立即在荧光酶标仪上读取荧光强度, 间隔 20s, 读取 6 次。根据反应曲线计算酶的活性。

1.4.4 Indinavir 对蛋白酶的抑制活性测定: 为测试该方法用于药物筛选的可行性, 我们用 indinavir 作为阳性对照样品进行了检测。在酶溶液中加入待测样品, 待测样品依次做 5 倍等比稀释至终浓度 10 μ mol/L, 2 μ mol/L, 400 nmol/L, 80 nmol/L, 16 nmol/L, 3.2 nmol/L, 0.64 nmol/L, 0.128 nmol/L, 每个浓度做三个复孔, 轻轻混匀, 25 $^{\circ}$ C 温育 15min, 加入 50 μ L 底物工作液, 反应 60min, 读取荧光值, 计算各个浓度的抑制率及 indinavir 的 EC₅₀ 值。

2 结果

2.1 表达载体构建

RT-PCR 产物经酶切胶回收后连接到 pet28a 载体上构建了 pet28a-PR 表达质粒, 转化大肠杆菌后挑取单克隆进行 PCR 鉴定。DNA 测序表明序列与预期一致。

2.2 HIV-1 蛋白酶的表达和纯化

测序正确的表达质粒转化大肠杆菌 BL-21 DE3, 经 IPTG 诱导后得到较好的表达, 经凝胶扫描分析表明, 目的蛋白占菌体总蛋白的 40%, 目的蛋白主要以包涵体的形式表达, 经过 Triton X-100 三次洗涤后, 得到了纯度较高的包涵体。包涵体经尿素溶解后, 以 sephacryl s-200 H.R 纯化, 产物经 SDS-PAGE 电泳, 凝胶扫描分析表明其纯度达 90.5%, 结果见图 1。

纯化产物经稀释复性后超滤浓缩。经考马斯亮蓝染色-分光光度法检测蛋白含量为 158 μ g/mL (图 2)。

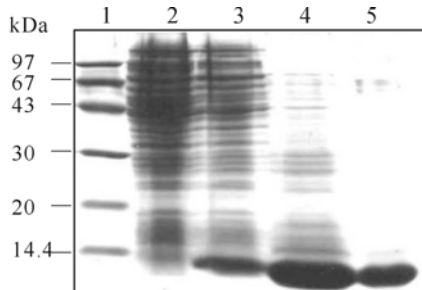


图 1 HIV-1 蛋白酶的表达及纯化

Fig. 1 expression and purification of HIV-1 protease

1, LMW protein molecular weight standard; 2, lysate of pet28a-PR/BL-21DE3 cell before induction; 3, lysate of cell induced by IPTG for 8 h; 4, inclusion body protein washed by Triton X-100; 5, HIV-1 protease purified by sephacryl s-200 H.R.

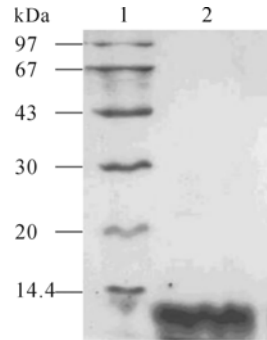


图 2 纯化并复性后的 HIV-1 蛋白酶

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of purified and refolded HIV-1 protease

1, LMW protein molecular weight standard; 2, HIV-1 protease recovered from refolded diluent.

2.3 酶反应缓冲液优化

为优化蛋白酶酶切反应条件, 我们比较了不同 pH 值以及添加/不添加盐离子对酶切反应的影响。结果见图 3。pH 值和盐离子对酶的活性均有很大的影响。本研究中, 在 pH5.0 缓冲液中含有 1 mol/L NaCl 时蛋白酶具有最佳活性。

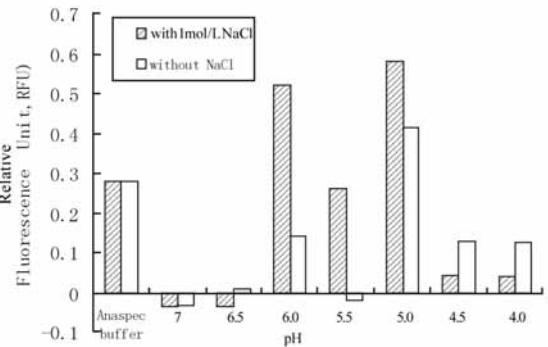


图 3 酶反应缓冲液优化

Fig. 3 Optimization of reaction buffer

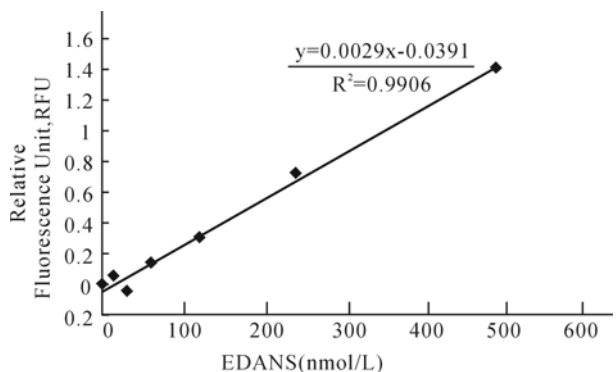


图 4 EDANS 标准曲线

Fig. 4 Standard curve of EDANS

2.4 蛋白酶活性测定

以荧光物质 EDANS 等比稀释绘制标准曲线 (图 4)。根据蛋白酶-底物反应的荧光强度变化速率, 从标准曲线计算出蛋白酶的活性, 以单位质量

蛋白酶裂解底物的速率表示,其活性为 $42.82 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}\cdot\text{mg})$ (图 5)。

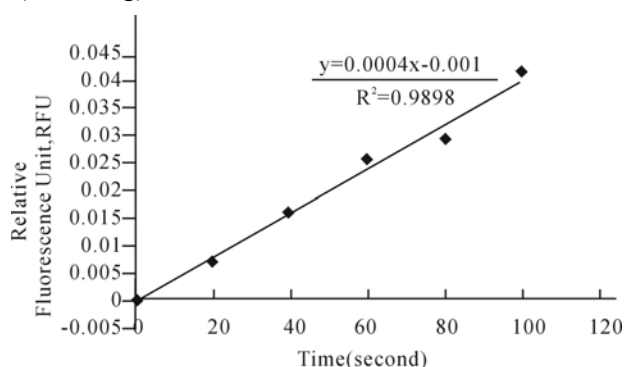


图 5 HIV-1 蛋白酶活性分析

Fig. 5 Analysis of recombinant HIV-1 protease activity

2.5 Indinavir 对蛋白酶的抑制活性测定

在蛋白酶反应体系中添加不同浓度的抑制剂 indinavir,检测其对蛋白酶活性的抑制率,并计算得到该体系中 indinavir 的 EC_{50} 值为 9.45 nmol/L 。

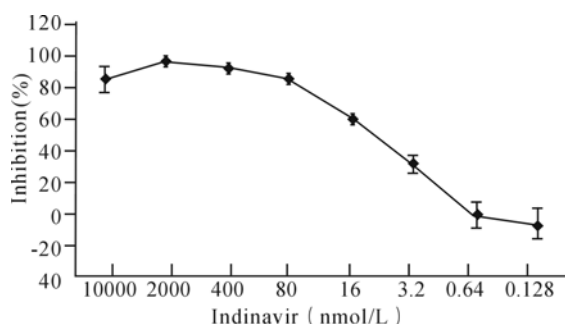


图 6 Indinavir 抑制 HIV-1 蛋白酶活性

Fig. 6 Inhibition of indinavir on HIV-1 protease activity

3 讨论

HIV 蛋白酶在 HIV 生命周期中发挥极其重要的作用,是抗 HIV 药物的重要靶点。由于耐药病毒株的出现,因此需要不断寻找新的药物。合适的体内外药物筛选和研究方法是研究和开发新药中最关键的环节之一。提高筛选质量,增加筛选的可靠性和预见性,减少筛选结果的假阴性和假阳性,创制出有代表性的各种药物筛选和研究方法,是新药研究和开发的基础。本研究中表达、纯化了 HIV-1_{III}B 蛋白酶,并建立了分子水平的 HIV 蛋白酶抑制剂体外筛选方法。在已有的报道中,有少数报道了蛋白酶在大肠杆菌以可溶蛋白的形式表达^[7],更多的是以包涵体的形式表达^[6,8,9,10]。以包涵体形式表达外源蛋白,降低了外源蛋白对宿主的毒性,有利于提高蛋白表达水平,本研究中的蛋白酶表达量占菌体蛋白总量的 40%以上,达到了较高的表达水平。蛋

白纯化过程中,已有的报道一般是使用酸沉淀及硫酸铵沉淀除去大部分杂蛋白后再使用疏水柱或阴离子及阳离子交换柱层析纯化,最后再使用多步透析的方法进行蛋白复性。本研究中使用了一步分子筛纯化,然后进行稀释复性、超滤浓缩,方法更为简便,得到的目的蛋白纯度大于 90%。由于稀释复性为蛋白提供了更多的自由折叠的空间,有利于蛋白的正确折叠及形成二聚体,复性效果优于透析复性,最后通过高速离心尽量除去未正确复性的蛋白,得到的具有较高活性的目的蛋白。本研究中蛋白酶的活性达 $42.82 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}\cdot\text{mg})$,高于同类文献中的报道^[8,9]。本研究对酶反应条件进行了优化,结果表明 pH 值和盐离子对酶活性均有较大的影响,在 pH5.0-6.0 的含 1 mol/L NaCl 缓冲液中,蛋白酶可以保持较好的酶活性(图 3)。该结果与 Leuthardt 等人的报道一致^[8]。

HIV 蛋白酶是抗 HIV 药物的最重要靶点之一。建立分子水平的 HIV 蛋白酶抑制剂高通量筛选方法将加快抗 HIV 药物筛选速度,提高筛选效率。我们利用荧光标记的合成多肽作为 HIV-1 蛋白酶的底物,蛋白酶对底物进行切割后,底物将发出荧光,荧光的强度与被切割的底物的量成正比。根据待测化合物存在或不存在时的荧光强度变化,可以计算抑制剂对蛋白酶活性的抑制程度,从而完成对蛋白酶抑制剂的初步筛选。该方法在国内尚无类似的报道。本研究中利用表达的蛋白酶检测 indinavir 对蛋白酶的抑制活性,得出了不同浓度 indinavir 对蛋白酶活性的抑制率并可计算 EC_{50} 值(图 6)。表明我们可以将该方法用于筛选具有 HIV-1 蛋白酶抑制活性的化合物。利用该方法可以在短时间内完成对大量样品的筛选工作,我们实验室已应用该模型筛选和研究抗 HIV 化合物并取得了一定的进展。该模型也可以用于已知有抗 HIV 活性的物质,以检验其作用位靶点是否是蛋白酶。

References

- [1] Daar E S, Richman D D. Confronting the emergence of drug-resistant HIV type 1: impact of antiretroviral therapy on individual and population resistance [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2005, 21(5): 343-57.
- [2] Clavel F, Hance A J. HIV drug resistance [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350 (10): 1023-1035.
- [3] Zheng Y T (郑永唐). In vitro screening and assays for anti-HIV agents [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2002, 11 (8): 596-600.
- [4] Tomasselli A G, Henrikson R L. Targeting the HIV protease in AIDS therapy: a current clinical perspective [J]. *Biochem Biophys*

- Acta, 2000, 1477:189 - 214.
- [5] Matayoshi E D, Wang G T, Krafft G A, et al. Novel fluorogenic substrate for assaying retroviral protease by resonance energy transfer [J]. Science, 1990, 247 (4945) : 954-958.
- [6] Hickman D, Vasavanonda S, Nequist G, et al. Estimation of Serum-Free 50-Percent Inhibitory Concentrations for Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitors Lopinavir and Ritonavir [J]. Antimicrob. Agents Chemother, 2004, 48 (8) : 2911-2917.
- [7] Yan X J, Su C Z, Ji C H (阎小君, 苏成芝, 吉昌华) et al. High level expression of HIV-1 Pr in *Escherichia Coli* [J]. Chin J Microbiol Immunol (中华微生物学和免疫学杂志), 1994, 14 (2) : 89-92.
- [8] Leuthardt A, Roesel J L. Cloning, expression and purification of a recombinant poly-histidine-linked HIV-1 protease [J]. FEBS Lett, 1993, 326 (1-3) : 275-280.
- [9] Vickrey J F, Logsdon B C, Proteasa G, et al. HIV-1 protease variants from 100-fold drug resistant clinical isolates: expression, purification, and crystallization [J]. Protein Expr Purif, 2003, 28: 165-172.
- [10] Wan M, Loh B N. Expression and purification of active form of HIV-1 protease from *E.coli* [J]. Biochem Mol Biol Int, 1995, 35(4) : 899-912

续第 115 页

10	第九届世界微生物防治及无脊椎动物病理学研讨会	华中农业大学农业微生物学国家重点实验室、中国微生物学会农业微生物学专业委员会	8 月	400	湖北武汉	喻子牛 027-87283455
11	海洋微生物学研讨会暨中国微生物学会海洋微生物学专业委员会成立大会	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会	8 月	150	辽宁大连	焦炳华 021-65493936
12	第 15 次全国干扰素及细胞因子学术会议	中国微生物学会干扰素专业委员会	8 月	100	贵州贵阳	焦炳华 021-65493936
13	第五届全国感染与免疫及生物制品学术研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	9 月	120	海南海口	洛淑萍 0431-7821515
14	中国微生物学会第九次全国会员代表大会暨学术年会	中国微生物学会	10 月	350	湖北武汉	王旭 010-62554677
15	第七届中国病毒学术年会	中国微生物学会病毒学专业委员会	10 月	300	待定	张晓燕 010-87789398
16	二十一世纪第三届全国人兽共患病学术研讨会	中国微生物学会人兽共患病病原学专业委员会	待定	100	福建福州	万康林 010-61739438
17	中国微生物学会分子微生物学及生物工程专业委员会 2006 年学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学及生物工程专业委员会	待定	100	上海	朱春宝 021-62479808
18	第九届中、日、韩酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	10-11 月	150	日本	黎高翔 010-62643074