

HIV-1 整合酶的纯化及活性检测^{*}李 南 张健慧¹ 凌世淦¹(中国药科大学生物制药学院, 南京 210009; ¹军事医学科学院基础医学研究所分子病毒学实验室, 北京 100850)

摘 要 含整合酶基因的重组质粒 pET-p31 在 *E. coli* BL21(DE3) 中以包含体形式高效表达 HIV-1 整合酶(p31 蛋白)。初步纯化的包含体用 8 mol/L 尿素变性溶解, 经阳离子交换剂柱层析和分子筛柱层析纯化, 并通过梯度透析的复性过程去除尿素, 获得可溶性及高纯度 p31。测定证实, 复性后的 p31 蛋白呈现良好的 3' 加工、链转移及去整合活性。

关键词 人类免疫缺陷病毒; 整合酶; 包含体; 生物活性

整合酶(integrase, IN)是人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)pol 基因 3' 端编码的蛋白质, 由前期融合蛋白 Pr160_{gag-pol} 经病毒自身编码的蛋白酶作用形成的产物^[1]。IN 催化 HIV 反转录产生的双链 cDNA 整合至宿主 DNA 上, 在 HIV 复制过程中起关键作用。迄今人体内尚未发现 IN 的类似物, 因此 IN 为 AIDS 治疗的理想靶位^[2]。人们构建了多种在 *E. coli* 中表达 IN 基因编码产物 p31 的质粒, 而在蛋白纯化和如何确保其活性的手段上则各有不同。本文利用 IN 基因高效表达重组质粒 pET-p31^[3] 在 *E. coli* BL21 中表达 p31, 并进行了目的蛋白的纯化、复性及活性测定, 研究了包含体的某

些性质和纯化方法。

1 材料和方法

1.1 材料

含 HIV-IN 表达质粒 pET-p31 的 *E. coli* BL21(由军事医学科学院构建并保存); Sepharose Fast Flow (S-FF)、Sepharyl S-300、G-25 葡聚糖快速离心柱(G-25 Sephadex Quick Spin Column)为 Pharmacia 产品; T₄DNA 多核苷酸激酶(T₄ PNK)为 Promega 产品; 其余试剂均为分析纯。[γ -³²P]ATP 购自北京亚辉公司; 寡核苷酸链(由上海生工生物工程公司合成)序列分别为:

117(5'-GTGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3');
118(5'-ACTGCTAGAGATTTTCCACAC-3');
118s(5'-GTGTGGAAAATCTCTAGCA-3');
146(5'-GGACGCCA TAGCCCCGGCGGTCGCTTTC-3');
156(5'-GTGTGGAAAATCTCTAGCAGGGGCTATGGCGTCC-3');
157(5'-GAAAGCGACCGCGCC-3')。

1.2 方 法

1.2.1 p31 重组蛋白的表达和纯化 活化菌种按 1:10(v/v)接种于 150 ml LB 培养基(含 50 mg/L 氨苄青霉素和 170 mg/L 氯霉素)中, 于 30℃ 振荡培养至对数生长期。加入 IPTG 至浓度为 1 mmol/L, 30℃ 水浴继续振荡诱导 4 h, 离心收集菌体。菌体重悬于缓冲液 A (25 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L 巯基乙醇, pH 7.5)中, 冰浴中超声破碎, 离心收集沉淀。同法将

沉淀用缓冲液 A 洗涤三次。取样进行 SDS-PAGE^[4] 鉴定(图 1)。将洗涤后包含体用缓冲液 B(8 mol/L 尿素, 缓冲液 A)变性溶解, 离心去除沉淀。上清液经 S-Sepharose Fast Flow 阳离子交换柱层析, 依次用含 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.5 mol/L NaCl 溶液(用缓冲液 B 配制)进行连续梯度洗脱, SDS-PAGE 鉴定收集峰。合并含表达产物的洗脱液, 超滤后经 Sephacryl S-300 分子筛层析, 用不含 NaCl 的洗脱液洗脱, SDS-PAGE 鉴定

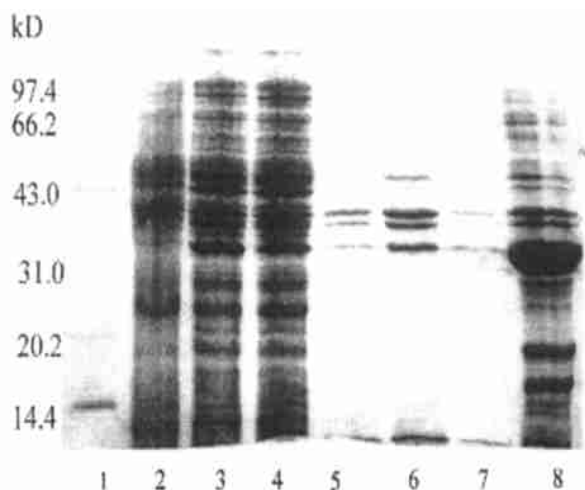


Fig 1. SDS-PAGE analysis of the expressed p31 protein in *E. coli* induced by IPTG. 1. Protein marker; 2. Induced total lysates of BL21(pET-31/control vector); 3. Induced total lysates of BL21(pET-p31); 4. Supernatant of lysed *E. coli* after centrifugation; 5, 6, 7. Supernatant of the first, second, third procedure in inclusion bodies washing respectively; 8. Inclusion bodies of BL21(pET-p31)

各收集峰。

1.2.2 p31 重组蛋白的复性和浓缩 纯化样品用含尿素依次为 8、6、4、2、1 及 0.5 mol/L 浓度的缓冲液各透析 3 h, 该缓冲液(pH 7.5)成分为 0.5 mol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L β -巯基乙醇, 20 mmol/L HEPES 和 0.1% PEG 3000。最后用保存液(1 mol/L NaCl, 10 mmol/L DTT, 20 mmol/L HEPES, 0.1 mmol/L EDTA, 0.1% PEG 3000, 10% 甘油)透析过夜后, 蔗糖干粉浓缩 10 倍。保存液再次透析过夜, 测定蛋白含量后, 于 -70°C 放存。

1.2.3 产物 p31 蛋白的活性测定 活性测定按文献^[3]方法进行, 但采用不同的寡核苷酸链底物 117、118、118s、146、156 和 157, 其中 118、118s 和 157 以 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 标记。118 与 117 形成的双链退火产物用于 $3'$ 加工活性检测, 118s 与 117 形成的双链退火产物用于链转移活性检测, 157、117、146 和 156 形成的 Y 形退火产物用于去整合活性检测。37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 h 后, 加等体积甲酰胺-溴酚蓝样品处理液, 煮沸 5 min 后骤冷, 19% PAGE(含 7 mol/L 尿素)鉴定产物, -70°C 下放射自显影。

1.2.4 蛋白质含量测定 按文献^[6]方法进行。

2 结 果

2.1 p31 蛋白的表达与纯化

经 IPTG 诱导后, 与对照菌相比, pET-p31 表达菌在 32 kD 左右有一明显的特异表达带(图 1), 与文献报道的 IN 电泳行为和分子量相符。且细胞内 p31 以包含体形式存在, 提取时经 3 次洗涤可除去部分杂蛋白, 起到一定纯化作用。用含 8 mol/L 尿素的缓冲液处理包含体, 可使其变性溶解, 以便进一步纯化 p31 蛋白。

进行 S-FF 阳离子交换柱层析, 用不同浓度的 NaCl 溶液梯度洗脱, 0.1 mol/L 至 0.15 mol/L NaCl 溶液即可将 p31 蛋白洗出(图 2), 但仍有较多杂质。为进一步提高纯度, 将样品再经 S-300 凝胶柱层析, SDS-PAGE 结果表明纯度较高(图 3)。浓缩后紫外测定显示蛋白浓度为 1.0 g/L。

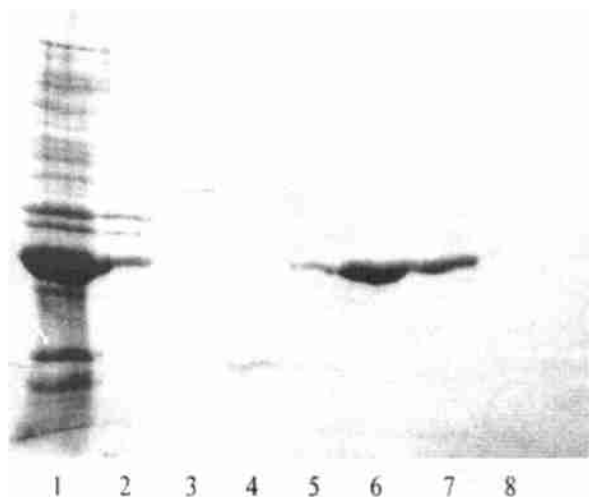


Fig 2. SDS-PAGE analysis of p31 purified by ion exchange chromatography. 1. Inclusion Bodies of BL21(pET-p31); 2, 3. Fractions of flow through; 4. Fractions eluted by 0.05 mol/L NaCl; 5, 6. Fractions eluted by 0.10 mol/L NaCl; 7. Fractions eluted by 0.2 mol/L NaCl; 8. Fractions eluted by 0.5 mol/L NaCl

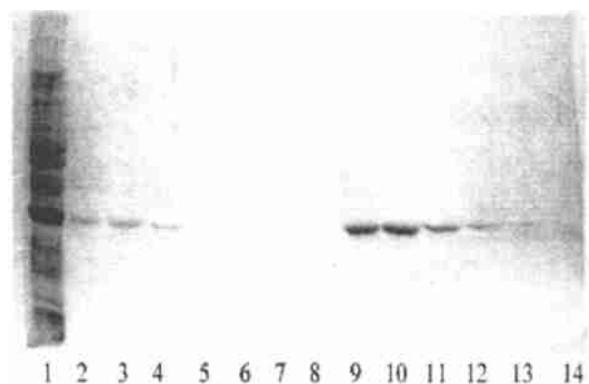


Fig 3. SDS-PAGE analysis of p31 eluted from gel chromatography. 1. Proteins before loading on gel column; 2 ~ 14. The 28th, 30th, 32nd...52nd tube of active peak

2.2 p31 重组蛋白的活性检测

显影结果表明(图4), pH 7.0、37℃、15 mmol/L Mn^{2+} 条件下反应 1 h, p31 蛋白 3'加工、链转移及去整合活性均较高。但可能由于反应体系中 H_2O 、甘油等亲核试剂进行的核酸外切作

用,或 p31 非特异性核酸外切酶活性及污染的 DNase 等原因,电泳结果除底物、产物区带外还存在其它裂解产物区带。图4中 SUB 及 PRO 分别表示 Substrate 和 Product。

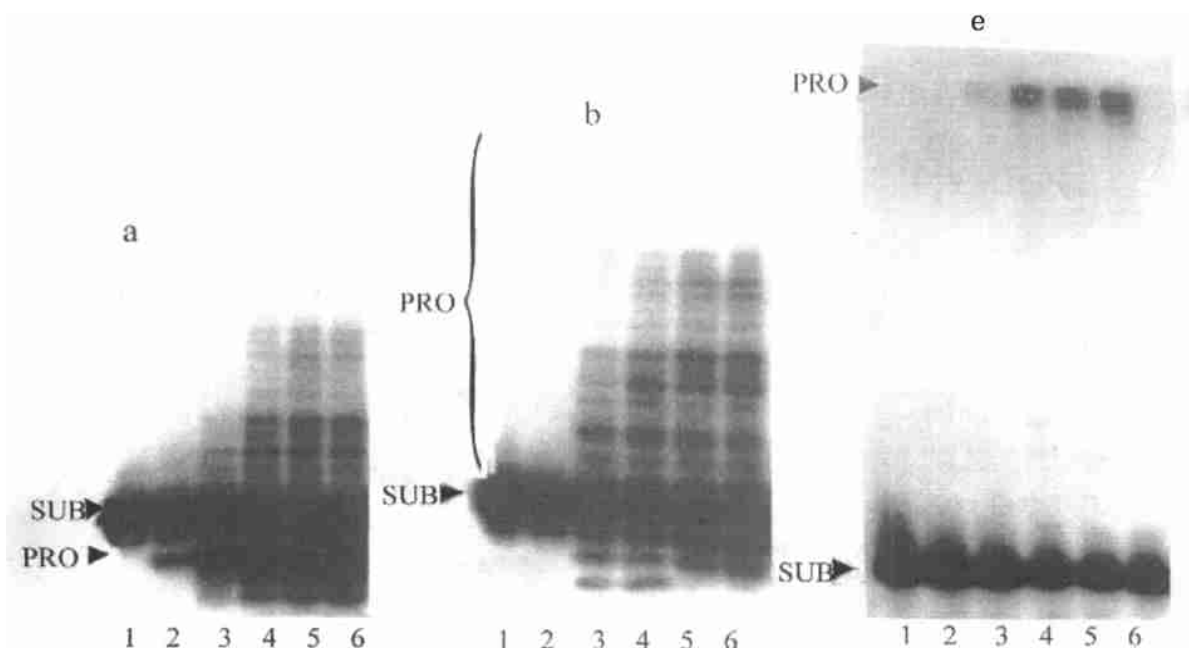


Fig 4. Results of activities assay performed with recombinant p31 protein

a. 3'-processing; b. Chain transfer; c. Disintegration; 1. 15 mmol/L Mn^{2+} without p31; 2. p31 without any ion; 3. 1 mmol/L Mn^{2+} ; 4. 5 mmol/L Mn^{2+} ; 5. 10 mmol/L Mn^{2+} ; 6. 15 mmol/L Mn^{2+}

3 讨论

目前流行的“鸡尾酒”疗法采用针对 HIV 多个靶位的配伍用药,有一定疗效,但新靶位和新途径的发现为艾滋病的治疗奠定了理论基础。整合酶作为病毒有效复制与维持感染状态的关键之一,其抑制剂的应用也将是治疗 AIDS 的有效途径。因此,获得纯度高,活性强的 IN 对研究其分子微观结构和开发其抑制剂有重要的意义。

利用 *E. coli* 高效表达菌株表达 p31 蛋白,产物主要以包含体形式存在。后者密度较大、性质稳定,经洗涤和差速离心分离可去除杂蛋白,防止细菌蛋白酶的破坏,缺点是变性蛋白的复性过程复杂而低效。高浓度变性剂可以破坏蛋白质的空间结构使包含体溶解,但同时又影响蛋白质形成正确的空间结构,去除变性剂又可使离散肽链重新形成错误折叠。因此,本实验采用梯度透析的方法,使透析外液中变性剂浓度逐渐降低,通过控

制变性剂去除的速度为肽链重新折叠形成活性构象提供了时间和空间。结果证实,梯度透析后的样品尽管有部分仍未溶解,但大部分 p31 恢复了可溶状态。活性检测结果表明 p31 蛋白具有良好的 3'加工、链转移及去整合活性,证明梯度透析法处理包含体行之有效。而要获得工艺简单、成本较低,高纯度、高活性的 p31,需进一步对其分泌表达和分子伴侣表达方式进行研究。

参考文献

- 1 Sherman PA, Fyfe JA. Human immunodeficiency virus integration protein expressed in *Escherich coli* possesses selective DNA cleaving activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**(13): 5119
- 2 Bizub-Bender D, Kulkosky J, Skalka AM. Monoclonal antibodies against HIV type 1 integrase: clues to molecular structure. *AIDS Res Hum Retroviru*, 1994, **10**(9): 1105
- 3 韩保光, 孟莉, 马贤凯等. HIV-1 整合酶蛋白(p31)的表达、纯化及其在血清学诊断中的应用. *细胞与分子免疫学杂志*, 1999, **15**(1): 17

4 萨姆布鲁克主编, 金冬雁等译. 分子克隆实验指南. 北京: 中国科学出版社, 1992. 880~887

5 Chow SA. *In vitro* assays for activities of retroviral integrase. Method: A Companion to Methods in Enzymology. 1997, 12(4): 306

6 张龙翔, 张庭芳, 李令媛主编. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1997. 140~141

Purification and Assays for Activities of HIV-1 Integrase

LI Nan, ZHANG Jian-Hui¹, LING Shi-Gan¹
School of Biopharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ¹Laboratory of Molecular Virology, Institute of Basic Medicine, Academy of Military Medicine Sciences, Beijing 100850

Abstract A recombinant plasmid pET-p31 containing an IN gene segment has been introduced into *E. coli* BL21 (DE3) to express high-level p31 in the form of inclusive bodies(IB). The wash-purified p31 was dissolved in 8 mol/L urea and a simple purification method was developed by which could be obtained soluble and high purified p31 based on ion exchange chromatography, gel filtration and subsequent restrict renaturation. Denatured and purified p31 was dialysed slowly against the buffer in which the urea concentration reduced gradually to remove the denaturation agent at last. Most of the p31 molecules could be recovered and become soluble during the process. The product showed significant activities of 3'-processing, chain transfer and disintegration.

Key words HIV-1; Integrase; Inclusion bodies; Biological activities

【文摘 013】 山紫菀类药材的性状与显微鉴别(IV)
张 勉, 徐珞珊, 王 峰涛, 赵显国, 徐国钧. 中草药, 1999, 30(12): 939
继前 3 报, 继续对 11 种山紫菀类药材即舟叶橐吾 *Ligularia cymbulifera* (W. W. Smith) Hnad.-Mazz.、浅苞橐吾 *L. cyathiceps* Hand.-Mass.、苍山橐吾 *L. tsangchanensis* (Franch.) Hand.-Mass.、异叶橐吾 *L. heterophylla* Rupr.、帕米尔橐吾 *L. alpigena* Pojark.、侧茎橐吾 *L. pleurocaulis* (Franch.) Hand.-Mass.、黄帚橐吾 *L. virgaurea* (Maxim) Mattf.、毛茎橐吾 *L. eriocaulis* M. Zhang et L. S. Xu.、大头橐吾 *L. japonica* (Thunb) Less.、藏橐吾 *L. rumicifolai* (Drumm.) S. W. Liu. 天山橐吾 *L. narynensis* (C. Winkl.) O. et B. Fedtsch. 的生药性状和显微鉴别特征进行报道。

【文摘 014】 毛细管气相色谱法测定复方利福平片中异烟肼中吡嗪酰胺的含量 张 亮, 杭太俊, 毕宝英. 中国现代应用药学杂志, 1999, 16(6): 41
目的: 建立复方利福平片中异烟肼和吡嗪酰胺的含量测定方法。方法: 毛细管气相色谱法, 以乙酰苯胺为内标, 色谱柱为弹性石英毛细管柱 25 m×0.32 mm×0.52 μm(DB-1); 柱温 170℃; 气化室温度 250℃; 检测器温度

250℃; 载气为高纯氮。结果: 异烟肼和吡嗪酰胺的线性范围分别是 0.4262.13 mg/ml 和 1.236.13 mg/ml; 平均回收率分别为 99.81% 和 99.63%。结论: 方法简便、快速、准确, 可作为该制剂的检测方法。
【文摘 015】 蝙蝠葛苏林碱抑制 NMDA 引起的细胞游离钙升高而减少神经毒性 王 震, 刘国卿, 朱兴族, 封新影, 李刚锋, 叶小英. 中国药学杂志, 1999, 34(11): 739

目的: 研究蝙蝠葛苏林碱(daurisoline, DAU)拮抗 N-甲基-D-精氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)引起的神经毒性作用, 并对其作用机制进行了分析。方法: NMDA 损伤原代培养的海马神经细胞; 培养细胞内游离钙浓度的测定; 大鼠动脉条内⁸⁶Rb⁺外流率的测定。结果: DAU 能对 NMDA 损伤的原代培养的海马神经细胞有明显的保护作用, 能剂量依赖性地抑制损伤后培养细胞中 LDH 的释放; DAU 还能剂量依赖性地抑制 KCl, Bay, K8644, NMDA, 去甲肾上腺素(NE)以及咖啡因(cafeine)刺激的细胞内游离钙浓度的上升, 但并不影响静息的或由钾通道开放剂吡哪地尔(pinacidil, PIN)刺激的大鼠动脉条内⁸⁶Rb⁺的外流率。结论: DAU 通过阻断 NMDA 引起的细胞钙升高而拮抗神经毒性。