

· 生物技术与方法 ·

HIV-1 CAP2NC 蛋白的表达及体外自组装

白诗梦¹, 张芝晴², 乔佳明², 沈鸿霖¹, 黄芳¹, 高双全², 李少勇², 李少伟^{1,2},
夏宁邵^{1,2}, 顾颖^{1,2}

1 厦门大学 生命科学学院 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 福建 厦门 361102

2 厦门大学 公共卫生学院 分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室, 福建 厦门 361102

白诗梦, 张芝晴, 乔佳明, 等. HIV-1 CAP2NC 蛋白的表达及体外自组装. 生物工程学报, 2018, 34(4): 586–593.

Bai SM, Zhang ZQ, Qiao JM, et al. Expression and self-assembly of HIV-1 CAP2NC protein. Chin J Biotech, 2018, 34(4): 586–593.

摘要: 构建并表达 HIV-1 CAP2NC 蛋白, 探索其体外自组装条件。通过 PCR 技术扩增 HIV-1 (NL4-3 毒株) CAP2NC 基因片段, 并将其连接到原核表达载体 pTO-T7, 获得重组质粒 pTO-T7-CAP2NC, 然后转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株, 经疏水层析纯化后获得重组蛋白 CAP2NC。SDS-PAGE 结果表明, 重组蛋白 CAP2NC 可在大肠杆菌可溶高效表达, 经纯化后纯度约为 95%。ELISA 检测表明重组蛋白 CAP2NC 可被 HIV-1 衣壳蛋白特异性单克隆抗体识别, 具有较好反应活性。重组蛋白透析后在非原性 SDS-PAGE 中呈现为多种聚体形式。分子筛排阻层析分析 CAP2NC 蛋白透析后可进行组装, 负染电镜进一步观察显示 CAP2NC 蛋白在 RNA 存在条件下, 可形成空管状颗粒, 其形态结构与 HIV-1 病毒衣壳体外自组装形成的类似。上述结果表明 HIV-1 CAP2NC 蛋白具有体外自组装的性质, 为进一步在体外研究非成熟病毒样颗粒结构奠定基础。

关键词: HIV-1, CAP2NC 蛋白, 自组装

Expression and self-assembly of HIV-1 CAP2NC protein

Shimeng Bai¹, Zhiqing Zhang², Jiaming Qiao², Honglin Shen¹, Fang Huang¹,
Shuangquan Gao², Shaoyong Li², Shaowei Li^{1,2}, Ningshao Xia^{1,2}, and Ying Gu^{1,2}

1 National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Disease, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China

2 State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China

Abstract: We constructed the CAP2NC prokaryotic expression vector of HIV-1 NL4-3 strain and obtained relatively pure CAP2NC protein by optimizing its purification conditions to explore its *in vitro* self-assembly conditions. Primers were designed according to the CAP2NC DNA sequence of HIV-1 NL4-3 strain. The target gene was amplified by PCR and cloned into prokaryotic expression vector pTO-T7. Then the recombinant strain was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3).

Received: September 26, 2017; **Accepted:** January 15, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 81671645, 81371818).

Corresponding author: Ying Gu. Tel: +86-592-2187880; E-mail: guying@xmu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 81671645, 81371818) 资助。

IPTG induced protein expression, then the protein was purified by hydrophobic chromatography. SDS-PAGE and Western blotting were performed to analyze the target protein, and the biological activity of the antigen was identified through ELISA. The self-assembly of CAP2NC protein was analyzed by transmission electron microscopy and gel filtration chromatography. The protein had good reaction with the specific antibodies of p24 and formed different structures in various conditions. When 10% yeast RNA was added to the protein complex, the recombinant protein only formed into a tubular structure, which was similar to the self-assembled structure of the HIV-1 virus capsid. The results showed that the HIV-1 CAP2NC protein had *in vitro* self-assembly activity, and the RNA affected the structure of CAP2NC protein assembly. The protein can be used as a simple and effective molecular model to study its structure, and then it can provide a reference for the study of HIV immature virus particles.

Keywords: HIV-1, CAP2NC protein, self-assembly property

人类免疫缺陷病毒 I 型 (HIV-1) *gag* 基因所编码的 55 kDa 蛋白是该病毒主要的结构蛋白。所有逆转录病毒的 Gag 蛋白包含 N 末端的膜结合 MA (基质蛋白) 区域、CA (衣壳蛋白) 以及临近 Gag 蛋白 C 末端的 RNA 结合的核壳体 (NC) 区域^[1]。而衣壳蛋白 (CA) 在 HIV 病毒的组装和成熟过程中起着至关重要的作用^[2]。

一个具有感染性的 HIV 病毒粒子的组装是分为两个阶段进行的^[3]。首先 Gag 蛋白在质膜表面发生寡聚化, 随后与膜分离释放出一个非成熟形式的非感染性的颗粒。在组装的第二个阶段, 蛋白酶被激活后, 水解 Gag 前体蛋白为各个成熟的结构蛋白。酶切导致病毒颗粒内部发生结构重排, 从而使病毒粒子从非成熟形式重组为成熟的具有感染性的颗粒。其中蛋白酶水解导致的病毒颗粒的成熟是抗逆转录病毒药物的一个重要靶点^[4]。因此非成熟病毒颗粒的形成是 HIV-1 组装的一个关键阶段。

目前, 人们对 HIV 病毒的整体结构有了清晰的认识, 并且随着结构生物学与生物信息学的迅猛发展, 近年来对成熟的 HIV-1 病毒颗粒的结构蛋白进行了大量高分辨的结构解析, 但对非成熟病毒颗粒结构了解较少。病毒颗粒的组装和感染性粒子的形成是一个十分复杂的过程, 弄清这一过程, 有助于抗病毒药物及疫苗的研制^[4-6], 可以为人类提供一个研究预防和治疗 HIV 感染的新途径。相关研究借助纯化后重组的部分 Gag 蛋白

——CAP2NC 蛋白模拟非成熟病毒颗粒体外自组装系统^[7-9], 用来探索逆转录病毒生活周期中发生的形态变化^[10]。

本研究利用大肠杆菌表达系统得到大量可溶的 CAP2NC 蛋白, 并对表达的 CAP2NC 蛋白反应活性、体外组装特性等进行分析, 探索其体外自组装条件, 为进一步解析该蛋白结构并深入研究非成熟病毒样颗粒提供了原料。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株及质粒

E. coli BL21 (DE3) 菌株由本实验室保存; NL4-3 质粒及克隆表达载体 pTO-T7 质粒为本实验室保存^[11]; 单抗 A10F9、13E11、12G4 均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

DNA marker 为 TaKaRa 公司产品; 质粒抽提试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒为 TIANGEN 公司产品; 苯甲基磺酰氟 PMSF 蛋白酶抑制剂为上海碧云天公司产品; Super Signal Western 化学发光底物为 PIERCE 公司产品; 限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品; MES 购自 SIGMA-ALDRICH; 辣根过氧化物酶标记的二抗由本实验室生产; Phenyl agarose Fast Flow 疏水层析介质填料购自美国 GE healthcare 公司。

1.2 方法

1.2.1 原核表达载体的构建

根据 HIV-1 NL4-3 CAP2NC 基因序列设计一对特异性引物,上游引物: 5'-TAACTTAAGAAGG AGATATACATATGCCTATAGTGCAGAACCTCC AG-3'和下游引物: 5'-GTGGTGGCTCGAGGCGG CCGCAAGCTTATTAGCCTGTCTCTCAGTACAA T-3' (下划线为 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切位点), 由生物工程 (上海) 股份有限公司合成。以 NL4-3 质粒为模板, 用合成引物进行 PCR 扩增。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 并按照 DNA 凝胶电泳回收试剂盒说明书操作, 切胶回收目的基因片段。用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切 pTO-T7 载体, 酶切产物经回收并纯化后用本实验构建的 Gibsen 装配液进行载体与目的片段的连接, 构建 pTO-T7-CAP2NC 表达载体, 并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取单个阳性克隆, PCR 扩增鉴定重组质粒, 并由本实验室内部进行测序验证其正确性。

1.2.2 CAP2NC 蛋白理化性质分析

利用瑞士生物信息学研究所的蛋白分析专家系统 (Expert Protein Analysis System, ExPASy) 提供的生物信息学工具 ProtParam, 分析预测蛋白质的氨基酸残基性质、分子量、亲水性强弱及理论等电点。

1.2.3 CAP2NC 蛋白的纯化与鉴定

将测序正确的表达质粒转化 BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑单克隆接种于 LB 培养液, 37 °C 振荡培养过夜, 按 1% 接种到相同的 LB 培养液中, 37 °C 振荡培养至 OD_{600} 约为 0.9 时, 加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG, 37 °C 振荡培养, 诱导 4 h 后, 7 000 \times g 离心 10 min 收集菌体。菌体沉淀重悬于破菌缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mol/L NaCl, 10 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 10% (V/V) 甘油, pH 8.0), 在冰浴下超声破菌。破菌液 4 °C、25 000 \times g 离心 20 min, 收

集上清部分。

离心后的上清加 0.5% (V/V) 饱和硫酸铵后进样至以 5 倍柱体积的 A 液 (50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mol/L NaCl, 10 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 10% (V/V) 饱和硫酸铵, pH 8.0) 平衡的 Phenyl-Sepharose FF 疏水层析柱, 2 mL/min 流速上样, 用 B 液 (20 mmol/L Mes (pH 6.0), 20 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF) 进行阶段洗脱, 分段收集目的峰。进行 SDS-PAGE 和蛋白质印迹鉴定 (一抗为 A10F9^[12])。

1.2.4 CAP2NC 蛋白与抗 p24 抗体结合反应活性的检测

以纯化的 CAP2NC 蛋白包被 96 孔 ELISA 板, 100 ng/孔, 以 1 \times CB (pH 9.6 的碳酸盐缓冲液) 作为稀释液, 4 °C 过夜。以 5% 的脱脂牛奶 37 °C 封闭 2 h, 180 μ L/孔。抗 p24 mAb 用样品稀释液 (含蔗糖, 酪蛋白, 小牛血清等) 稀释到 100 ng/mL, 按照 2 倍比从高到底进行梯度稀释, 共 12 个梯度, 100 μ L/孔, 37 °C 反应 1 h, 以 TBST 洗 5 遍, 加入 1:5 000 稀释的羊抗鼠二抗 GAM-HRP。37 °C 反应 30 min 后, TBST 洗 5 遍, 甩干后以 1:1 加入 TMB 底物显色液 A 液和 B 液, 100 μ L/孔, 37 °C 反应 10 min。加终止液 (2 mol/L H₂SO₄) 终止反应, 50 μ L/孔, 测定波长为 450–630 nm 的吸光值。

1.2.5 CAP2NC 蛋白体外组装特性分析

为监测目的蛋白的组装特性, 首先通过颗粒分析实验, 将纯化后的不同浓度的目的蛋白透析到 50 mmol/L TB 8.0 + 0.1 mol/L NaCl 缓冲液中, 并且在透析之前于样品中加入一定浓度 (W/W) 的 Yeast-RNA, 于室温下透析 16 h 后, 将样品进行高速离心 (13 000 \times g, 30 min)。将组装的颗粒样品与未组装的分离, 分别取上清和沉淀进行非还原性和还原性 SDS-PAGE, 考染后观察蛋白体外自组装情况^[13]。

1.2.6 凝胶过滤层析分析

根据透析后的蛋白样品非还原 SDS-PAGE 结果, 选取可以自组装的蛋白样品进行分子筛排阻层析分析: 利用 TSK-Gel PW5000 (8 mm × 300 mm) 层析柱, 以 0.5 mL/min 的流速将待测样品通过层析介质, 并记录样品中各组分的吸收峰情况。

1.2.7 透射电子显微镜观察

将 0.1 mg/mL 透析后的蛋白样品吸附于镀炭的铜网上 10 min, 用滤纸从边缘小心吸去样品残液, 再将样品用 2% 磷酸酸溶液 (pH 7.0) 负染 15 min, 再次吸去残液, 在白炽灯下照射待其完全干燥。使用 Tecnai G2 Spirit 透射电镜 (美国 FEI 公司) 进行观察。

2 结果

2.1 重组表达载体的构建

将经 PCR 扩增纯化回收后的目的片段连接 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切后的 pTO-T7 载体, 构建 CAP2NC 重组质粒 pTO-T7-CAP2NC, 将测序正确的表达质粒用于后续纯化实验。

2.2 CAP2NC 蛋白的纯化与鉴定

利用 ProtParam 工具预测表明 CAP2NC 蛋白理论等电点 (pI 值) 9.09, 亲水性平均系数 (GRAVY) 为 -0.507。根据该蛋白的总亲水性系数得出该蛋白亲水性较弱, 初步推测可以使用疏水层析进行纯化。并且纯化缓冲液的 pH 值需低于理论 pI 值, 初步将其定在 6.0–8.0, 然后根据不同试剂的缓冲能力选择相应的缓冲液。

菌体沉淀经缓冲液重悬并超声裂解后, 裂解上清通过苯基疏水柱纯化得到了重组的 CAP2NC 蛋白, 经 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定。由图 1A 可见, 在 33 kDa 左右处有一条与理论值相符的目的条带。超声上清经 Phenyl-HP 疏水层析阶段洗脱后, 获得不同浓度的洗脱峰, 经 10%

SDS-PAGE 分析可看出, 泳道 2 穿透液中只有少量目的蛋白未挂柱, 目的蛋白和与之大小相近的杂蛋白都得到有效分离, 且杂蛋白较少, 经软件扫描蛋白纯度达到 95% 以上。Western blotting 结果表明 (图 1B), 最终纯化产物为 CAP2NC 蛋白, 并且与抗 p24 单抗有较好的反应性。

2.3 CAP2NC 蛋白与抗 p24 抗体结合反应活性的检测

纯化后的 CAP2NC 蛋白与抗 p24 的 3 种单抗 A10F9、13E11、12G4 进一步通过酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测其反应活性, 结果如图 2 所示。可以看到 75% B 洗脱时收集的目的蛋白与不同抗体有较好反应活性, 这与 Western blotting (图 1B) 结果一致, 进一步说明通过疏水柱层析纯化后的目的蛋白具有活性。

2.4 CAP2NC 蛋白体外组装特性分析

用颗粒分析实验检测 CAP2NC 蛋白的体外自组装特性, 纯化后的不同洗脱成分的 CAP2NC 蛋白经 3 倍浓缩后透析到 50 mmol/L TB 8.0 + 0.1 mol/L

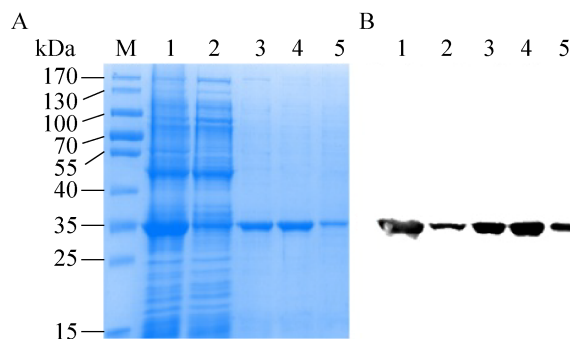


图 1 CAP2NC 蛋白的分离纯化及鉴定

Fig. 1 Purification and identification of CAP2NC. (A) Purification through phenyl-HP column. M: protein marker; 1: broken bacterial supernatant total protein; 2: over phenyl-HP agarose column flowthrough post; 3: 75% B elution fraction; 4: 100% B elution component; 5: ultrapure water elution component. (B) Western blotting identification of the purified CAP2NC; 1–5: each band is corresponding to the figure A.

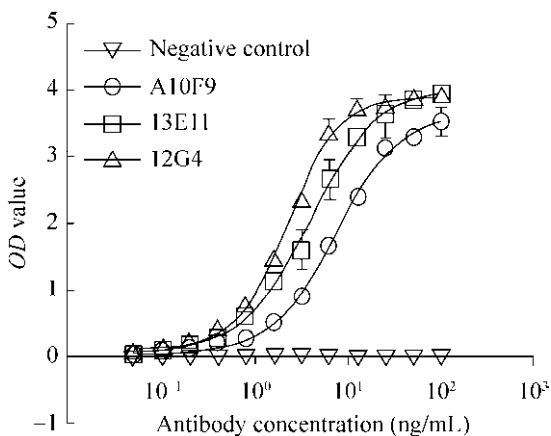


图2 CAP2NC 反应活性检测

Fig. 2 Identification the reactivity of CAP2NC.

NaCl 缓冲液, 并且在透析之前于样品中加入 10% (W/W) 的 Yeast-RNA (本实验还尝试了 1%、5% 的质量百分比, 方法相同), 室温下透析 16 h, 样品经高速离心后, 取上清和沉淀进行 10% 非还原性 SDS-PAGE 分析。如图 3A 所示, 大部分蛋白透析后经离心后均在沉淀中, 并且在沉淀中 (泳道 1、3、5) 可看到二聚体、五聚体以及多聚体, 而上清中只有少量单体蛋白 (泳道 2、4、6), 说明 CAP2NC 蛋白在体外可以自组装。取 75% B 洗脱的目的蛋白透析后的样品, 分别进行 10% 的还原性和非还原性 SDS-PAGE 分析, 在蛋白形成聚体过程中, 分子间作用力或二硫键均会起到比较重要的作用, 而从图 3B 可看出, 无论是否经过还原处理, CAP2NC 蛋白透析后均有多聚体形成, 这进一步表明该蛋白的体外自组装不是源于二硫键的作用, 推测在特定的缓冲液中 CAP2NC 蛋白形成聚体主要是因 RNA 的加入来驱动不同蛋白分子间的相互作用导致的。

2.5 CAP2NC 蛋白自组装后凝胶过滤层析分析

以 75% B 洗脱纯化的 CAP2NC 蛋白在 50 mmol/L TB 8.0 + 0.1 mol/L NaCl 缓冲液中透析, 12 000 × g 高速离心 10 min 后, 取上清通过

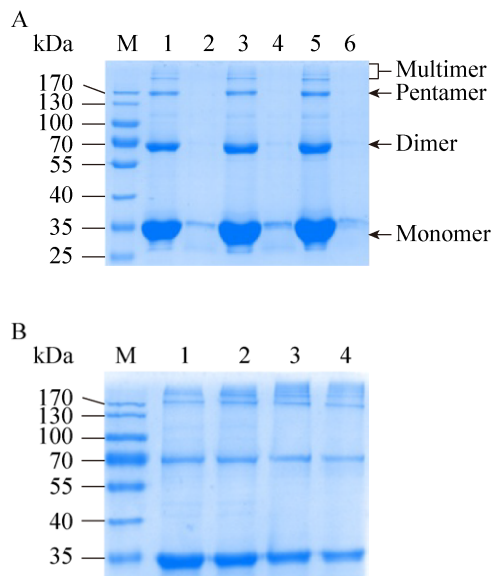


图3 SDS-PAGE 检测 CAP2NC 蛋白体外自组装特性

Fig. 3 Monitoring the self-assembly properties of the CAP2NC proteins *in vitro*. (A) Employing pelleting assays to investigate the assembly properties. M: protein marker; After dialysis, 75% B elution fraction was centrifuged to separate the pellet (1) and supernatant (2) fractions, both components were subjected to non-reducing SDS-PAGE gels; 3: the pellet of 100% B elution component; 4: the supernatant of 100% B elution component; 5: the pellet of ultrapure water elution constituent; 6: the supernatant of ultrapure water elution constituent. (B) Identification of the assembly properties of 75% B elution component. M: protein marker; 1,2: reducing; 3,4: non-reducing.

凝胶层析柱 (G5000) 分析蛋白透析后组装情况, 结果如图 4 所示。图 4A 为凝胶过滤层析蛋白标准品 G5000 分子筛图谱。根据不同大小的蛋白标准品 (美国 GE healthcare 公司) 峰保留时间推测 CAP2NC 蛋白透析后各组分中聚体及颗粒形成情况。其中 440 kDa 蛋白标准品峰保留时间为 17.3 min, 75 kDa 蛋白标准品峰保留时间为 21.5 min, 30 kDa 蛋白标准品峰保留时间为 22.9 min。图 4B 为透析前加入 1% 或 5% Yeast-RNA 的样品出峰图谱, 大部分样品峰保留时间在 14.8 min, 小部分为 11.5 min。由于 CAP2NC 蛋白单体大小

理论值为 33 kDa, 推测该蛋白透析后形成了不同大小的颗粒或者聚体, 分子量大于 440 kDa。而图 4C 为透析前加入 10% Yeast-RNA 的样品出峰图谱, 较多样品峰保留时间在 11.7 min, 少量为 21.3 min 和 22.6 min, 推测较多的样品在加入 10% RNA 透析后形成了颗粒, 只有较少部分蛋白以二聚体或单体形式存在。

2.6 CAP2NC 蛋白自组装后电镜观察

取凝胶过滤层析鉴定后的样品进行负染, 通过电镜进一步观察颗粒形态。结果如图 5A 显示, 经染色后, 若透析之前样品中加入 1% 或者 5% 的 Yeast-RNA, 电镜下既可看到与野生型 CA 体外自组装后形成的形态相似的空心管状的颗粒^[14], 又可观察到空心的颗粒样或者圆形薄片状结构; 若透析前样品中加入 10% RNA, 观察到大部分 CAP2NC 蛋白组装为空心管状颗粒, 长短大小不一 (图 5B)。推测透析前样品中由于 RNA 的加入, 在很大程度上驱动了 CAP2NC 蛋白的多聚化, 并且在形成颗粒的过程中有各种各样的结构, 并且空心的颗粒样或者圆形薄片状结构或许是组装过程中的一种中间形态。

3 讨论

HIV 的高变异性使其对药物的耐受性日趋严重, 抗艾滋药物本身也具有较强的毒副作用, 那么寻找新的药物作用靶点成为了抗 HIV 感染研究的核心^[15]。而 HIV 病毒生活周期的每一个阶段都可以作为抗逆转录病毒药物研发的一个重要靶点^[4-6]。目前有报道利用 X 线断层成像技术及电镜技术精确揭示了未成熟 HIV 的 CA-SP1 的 3D 信息, 并从结构水平上检测一种新型药物抑制 HIV 病毒的成熟过程, 为深入揭示 HIV 对药物产生耐药性的机制及后期开发改造靶向 HIV 的新型药物提供研究线索和思路^[16]。未成熟的病毒颗粒作为 HIV 组装过程中的一个关键产物, 对于揭示介导非成熟

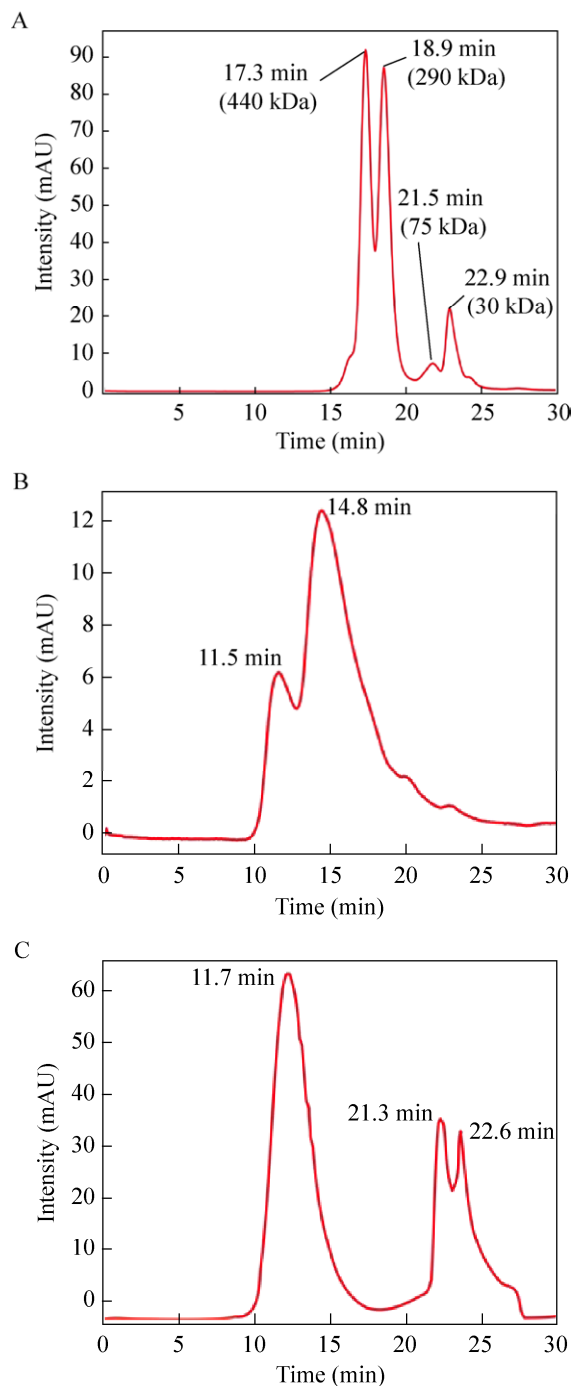


图 4 CAP2NC 蛋白组装后高效液相色谱仪分析
Fig. 4 Analysis of self-assembly CAP2NC by HPSEC. (A) G5000 molecular sieve map of 440 kDa protein standard. (B) CAP2NC sample G5000 molecular sieve map with addition of 1% or 5% yeast-RNA prior to dialysis. (C) CAP2NC sample G5000 molecular sieve map with addition of 10% yeast-RNA before dialysis.

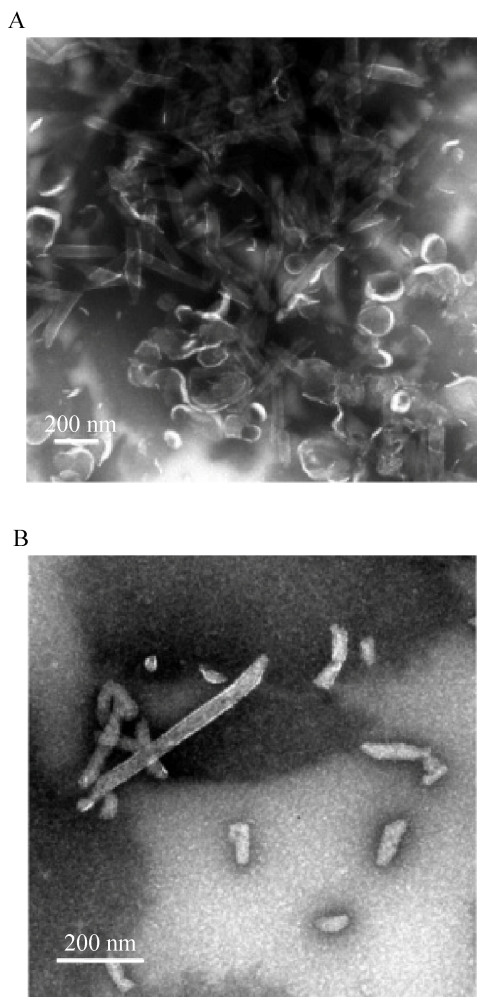


图5 CAP2NC 蛋白自组装为颗粒后电镜观察

Fig. 5 Observation of the morphology of self-assembly CAP2NC by transmission electron microscopy. (A) The morphology of self-assembly CAP2NC with addition of 1% or 5% yeast-RNA prior to dialysis. (B) The morphology of self-assembly CAP2NC with addition of 10% yeast-RNA before dialysis.

病毒组装的蛋白质界面和结构变化是很重要的。而这种变化需要进一步运用结构生物学方法比较研究。CAP2NC 蛋白作为 Gag 蛋白的一部分,本身能够装配为非成熟的管状结构。本研究对该蛋白纯化优化后鉴定了其具有体外自组装的性质。

在分析 CAP2NC 蛋白体外组装条件的过程中,本研究通过建立该蛋白体外组装体系,首先

通过颗粒分析实验鉴定了该蛋白可自组装。接下来通过分子筛分析发现样品中加入 1% 或 5% RNA,在 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、100 mmol/L NaCl 溶液条件下,根据峰保留时间分析一部分蛋白形成颗粒,有较多多聚体存在。进一步通过电镜验证,既可观察到不同长度的管状颗粒,也可观察到空心的颗粒样或片状结构;而样品中加入 10% RNA,相同的缓冲条件下推测大部分蛋白形成颗粒,只有少部分蛋白为二聚体或单体形式存在,电镜下观察时只有管状结构形成,并且室温下放置一段时间后,仍有颗粒存在。出现这种差异的原因可能是 RNA 与蛋白的结合存在一个饱和度^[2,17-18]。推测 CAP2NC 蛋白体外组装加入 RNA 后,RNA 作为支架,通过与 NC 的相互作用,诱导蛋白构象发生变化(类似于核糖核蛋白链),从而促进非成熟颗粒的组装,空心圆柱形管状结构的形成。该推论还需进一步结构生物学方面的验证。本研究通过分析 CAP2NC 蛋白理化性质并确定以 10% RNA 加入量为标准进行后续相关实验,进一步增加病毒衣壳体外的稳定性,为接下来对该蛋白的空间结构研究奠定基础,同时也为 HIV 非成熟病毒颗粒结构的相关研究提供了参考。

REFERENCES

- [1] Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist IW. The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol*, 2008, 18(2): 203-217.
- [2] Lingappa JR, Reed JC, Tanaka M, et al. How HIV-1 Gag assembles in cells: putting together pieces of the puzzle. *Virus Res*, 2014, 193: 89-107.
- [3] Sundquist WI, Kräusslich HG. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(7): a006924.
- [4] Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(4): a007161.
- [5] Spearman P. HIV-1 Gag as an antiviral target: development of assembly and maturation inhibitors. *Curr Top Med Chem*, 2016, 16(10): 1154-1166.

- [6] Waheed AA, Freed EO. HIV type 1 Gag as a target for antiviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2012, 28(1): 54–75.
- [7] Klikova M, Rhee SS, Hunter E, et al. Efficient *in vivo* and *in vitro* assembly of retroviral capsids from Gag precursor proteins expressed in bacteria. *J Virol*, 1995, 69(2): 1093–1098.
- [8] Zuber G, McDermott J, Karanjia S, et al. Assembly of retrovirus capsid-nucleocapsid proteins in the presence of membranes or RNA. *J Virol*, 2000, 74(16): 7431–7441.
- [9] Hadravová R, de Marco A, Ulbrich P, et al. *In vitro* assembly of virus-like particles of a gammaretrovirus, the murine leukemia virus XMRV. *J Virol*, 2012, 86(3): 1297–1306.
- [10] López CS, Eccles JD, Still A, et al. Determinants of the HIV-1 core assembly pathway. *Virology*, 2011, 417(1): 137–146.
- [11] Luo WX, Zhang J, Yang HJ, et al. Construction and application of an *Escherichia coli* high effective expression vector with an enhancer. *Chin J Biotech*, 2000, 16(5): 578–581 (in Chinese).
罗文新, 张军, 杨海杰, 等. 一种带增强子的原核高效表达载体的构建及初步应用. *生物工程学报*, 2000, 16(5): 578–581.
- [12] Gu Y, Cao F, Wang L, et al. Structure of a novel shoulder-to-shoulder p24 dimer in complex with the broad-spectrum antibody A10F9 and its implication in capsid assembly. *PLoS ONE*, 2013, 8(4): e61314.
- [13] Huseby D, Barklis RL, Alfadhli A, et al. Assembly of human immunodeficiency virus precursor gag proteins. *J Biol Chem*, 2005, 280(18): 17664–17670.
- [14] Ganser-Pornillos BK, Cheng AC, Yeager M. Structure of full-length HIV-1 CA: a model for the mature capsid lattice. *Cell*, 2007, 131(1): 70–79.
- [15] Liu Y, Su J, Yang CL, et al. Novel drug targets for anti-HIV-1 therapy. *Int J Pharm Res*, 2008, 35(1): 4–8 (in Chinese).
刘瑶, 苏靖, 杨春玲, 等. 抗艾滋病药物研究的新靶点. *国际药学研究杂志*, 2008, 35(1): 4–8.
- [16] Schur FKM, Obr M, Hagen WJH, et al. An atomic model of HIV-1 capsid-SP1 reveals structures regulating assembly and maturation. *Science*, 2016, 353(6298): 506–508.
- [17] Briggs JAG, Simon MN, Gross I, et al. The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11(7): 672–675.
- [18] Parker SD, Wall JS, Hunter E. Analysis of mason-pfizer monkey virus gag particles by scanning transmission electron microscopy. *J Virol*, 2001, 75(19): 9543–9548.

(本文责编 郝丽芳)