

# HIV-1 CN54 Pol P51 抗原高效表达、纯化、复性及在抗体检测中的应用

侯爵<sup>1,2</sup>, 孙静<sup>2</sup>, 徐智勇<sup>2</sup>, 范文玲<sup>2</sup>, 张怡轩<sup>1</sup>, 刘勇<sup>2</sup>, 郝彦玲<sup>2</sup>

1 沈阳药科大学 生命科学与生物制药学院, 沈阳 110016

2 中国疾病预防控制中心 性病艾滋病预防控制中心 传染病防治国家重点实验室, 北京 100050

**摘要:** 为获得可溶性高纯度 HIV-1 中国株 CN54 Pol P51 抗原, 将携带 CN54 pol p51 基因的重组质粒 pTHioHisA51 转化大肠杆菌 BL21 codonplus-RIL, 用 IPTG 进行诱导表达。用 Chelating Sepharose FF-Ni 亲和层析柱及 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析柱纯化目的蛋白, 采用透析复性法得到可溶性抗原, Western blotting 检测目的蛋白。用纯化的 P51 抗原蛋白标记辣根过氧化物酶及包被酶标板进行双抗原夹心法 ELISA 检测。结果显示 P51 以包涵体的形式表达, 表达量占菌体总蛋白的 50%, 经两步层析和透析复性, 目的蛋白纯度大于 95%。Western blotting 和双抗原夹心法 ELISA 检测均显示了良好的灵敏度和特异性。本研究可以为 HIV-1 疫苗研究和开发检测试剂提供支持。

**关键词:** HIV-1 CN54, 逆转录酶 P51, 纯化, 复性, 抗体检测

## Expression, purification and renaturation of Pol P51 antigen of HIV-1 strain CN54 and its application in antibody detection

Jue Hou<sup>1,2</sup>, Jing Sun<sup>2</sup>, Zhiyong Xu<sup>2</sup>, Wenling Fan<sup>2</sup>, Yixuan Zhang<sup>1</sup>, Yong Liu<sup>2</sup>, and Yanling Hao<sup>2</sup>

1 College of Life Science and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2 State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Center for AIDS/STD Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China

**Abstract:** To obtain the pure and soluble P51 antigen of HIV-1 strain CN54, we transformed the *Escherichia coli* strain BL21 codonplus-RIL with recombinant plasmid pTHioHisA51 which carries a gene encoding the Polymerase (Pol) P51 antigen of HIV-1 CN54 formerly, and induced protein expression by IPTG. We purified the recombinant protein with Chelating Sepharose FF-Ni and DEAE-Sepharose FF column chromatography, then renatured the recombinant protein by dialyzation. Purified protein was identified by Western blotting. We labeled and coated antigen P51 in a dual-antigen sandwich system, and tested it with serum samples from HIV-infected individuals. The results showed that P51 was expressed as inclusion body, and represented about 50% of total cellular protein. After purification and renaturation, the purity of P51 was up to 95%. Western blotting and sandwich ELISA demonstrated that recombinant P51 had good anti-HIV antibody specificity and sensitivity. The results suggested that recombinant HIV-1 P51 can be prepared as diagnostic reagent, and provides valuable support for HIV-1 detection and vaccine research.

**Keywords:** HIV-1 CN54, reverse transcriptase P51, purification, renaturation, antibody detection

**Received:** September 29, 2009; **Accepted:** December 25, 2009

**Supported by:** Special Project of the "Eleventh Five-year Plan" (Nos. 2008ZX1001-1010, 2009ZX10004-713).

**Corresponding author:** Yanling Hao. Tel: +86-10-67887758; Fax: +86-10-67887758; E-mail: hyluer@yahoo.com.cn

国家十一五科技重大专项 (Nos. 2008ZX1001-1010, 2009ZX10004-713) 资助。

HIV 逆转录酶 (RT) 是 *pol* 基因编码的一个异源二聚体蛋白, 由 P66 和 P51 两个亚单位组成, 分子量约为 117 kDa。逆转录酶在 HIV 生活史中具有逆转录酶、RNA 酶 H 和整合酶活性, 发挥着十分重要的作用。已有研究发现 P66 和 P51 作为抗原与 HIV-1 阳性血清具有很高的结合活性, P51 抗原在进行 ELISA 和 Western blotting 测定时, 阳性检出率与 HIV-1 Gp41 相当, 比 HIV-1 Gag 高<sup>[1-2]</sup>。P51 是检测 HIV-1 抗体检测试剂中最常用的抗原, 无论在初筛试剂还是确认试剂都要求有 P51 抗原的存在。

HIV-1 CN54 是我国科学家从云南分离的 HIV-1 B'/C 重组毒株 (CRF07-BC), 代表了我国很多地区的优势流行株, 也是国内众多课题组研制的 HIV-1 疫苗所针对的靶毒株。因此, 制备高纯度的 CN54 毒株 P51 抗原对于我国 HIV-1 疫苗的免疫原性研究及临床样本的检测具有非常重要的意义。本研究利用大肠杆菌表达系统对 P51 全长蛋白进行高效表达, 对尿素溶解后的包涵体蛋白进行复性, 摸索出简便、快捷的纯化工艺, 并对 P51 在双抗原夹心 ELISA 检测中的使用条件进行了探讨。纯化后的 CN54 P51 重组蛋白为针对 HIV-1 中国流行株的疫苗和诊断试剂研究提供了关键材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒及菌株

表达 HIV-1 中国株 CN54 P51 抗原全长基因的质粒 pTHioHisA51 由本课题组构建<sup>[3]</sup>, 抗原蛋白 N 端采用非融合表达策略, C 端引入 6 个组氨酸作为纯化标签。大肠杆菌菌株 BL21 codonplus-RIL 购自 Stratagene 公司。

#### 1.1.2 试剂和培养基

iBlot® Dry Blotting System Western blotting 电转系统购自 Invitrogen 公司。Vivaflow50 膜包购自 Sartorius 公司。

异丙基-B-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 为 Merck 公司产品。酵母提取物和蛋白胨均为 Oxoid 公司产品。低分子量蛋白标准为天根公司产品。预染蛋白标准

品为 Fermentas 公司产品。ELISA 试剂盒为金豪公司为本室研发的 HIV 临床检测试剂盒。检测血清来自本室临床样本。层析填料是 GE Healthcare 公司产品。BCA 试剂盒为 PIERCE 公司产品。常用化学试剂为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 目的蛋白的表达及细胞破碎

将质粒 pTHioHisA51 转化大肠杆菌 BL21 codonplus 感受态细胞, 单菌落接种于 5 mL 含氨苄青霉素(Amp)的 LB 培养基中, 过夜培养后接种于 500 mL 含 Amp 的 LB 培养基进行摇瓶培养, 37°C 振荡培养 3 h 后加入 0.01% (V/V) IPTG, 诱导表达 15 h 后取样, SDS-PAGE 分析表达量。4000×g 离心 10 min 收集菌体, 高压匀浆破碎后 13 000×g 离心 10 min, SDS-PAGE 分析目的蛋白表达量及在上清和沉淀中的分布。

#### 1.2.2 包涵体的溶解

将 37°C 下诱导表达的菌体高压匀浆破碎, 分别用洗涤缓冲液(pH 7.0, 20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100)洗涤 2 遍。以 pH 10.0 的 8 mol/L 尿素的溶解液悬起, 吹打均匀, 室温放置 30 min, 13 000×g 离心 15 min, SDS-PAGE 分析目的蛋白的溶解情况。

#### 1.2.3 层析纯化

金属离子螯合层析: 将包涵体用上样缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 10.0, 50 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑, 8 mol/L 尿素) 溶解后, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 上样于 Chelating Sepharose FF-Ni 螯合柱, 用上样缓冲液洗涤 4 个柱体积, 再以 20% 的洗脱缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 10.0, 1 mol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, 8 mol/L 尿素) 洗脱, 收集主峰, 之后以 100% 洗脱缓冲液洗脱。

离子交换层析: 使用 Vivaflow50 膜包将亲和层析收集目的峰缓冲液更换成离子交换上样缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 10.0, 8 mol/L 尿素) 并上样于 DEAE Sepharose Fast Flow 柱, 用上样缓冲液洗涤柱子, 之后用洗脱缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 10.0, 8 mol/L 尿素, 1 mol/L NaCl) 阶段洗脱, 收集各峰, SDS-PAGE 分析后合并高纯度样品。

### 1.2.4 蛋白的复性

将得到的纯品蛋白加入 N-十二烷基肌氨酸钠, 置于 4℃ 透析 24 h, 之后逐步降低变性剂浓度直至完全没有变性剂, 蛋白溶液呈现清亮透明, 无沉淀无浑浊, 即完成了复性。

### 1.2.5 Western blotting 检测 P51 蛋白

取纯化后的 P51 蛋白进行 SDS-PAGE 检测, 使用 iBlot® Dry Blotting System 系统将蛋白电转至 PVDF 膜 (Millipore); 用 5% 脱脂奶粉封闭液 (4% BSA, 10 mmol/L Tris-HCl, 15 mmol/L NaCl, 0.1% Tween20) 封闭 2 h, 以 HIV-1 质控阳性血清作为一抗, 辣根过氧化物酶标记的兔抗人 IgG 抗体作为二抗, 分别于室温下作用 2 h; 显色剂 (0.3% NiCl<sub>2</sub>, 0.01 mol/L Tris-HCl, 3'-3'-二氨基联苯胺, 双氧水) 显色 10 min, 终止反应。

### 1.2.6 P51 抗原标记辣根过氧化物酶

采用过碘酸钠法将 P51 抗原标记辣根过氧化物酶 (HRP)。抗原和酶的质量比为 1~1.2 : 1, HRP 和抗原混合后置 4℃ 过夜, 然后以 0.02 mol/L PBST (pH 7.4) 4℃ 透析, 其他参见常规标记方法<sup>[3]</sup>。

### 1.2.7 双抗原夹心法 ELISA 检测质控血清样本

取临床样本中已知 HIV-1 阳性血清及阴性血清作为实验样本。阳性血清从 1 : 50 倍比稀释至 1 : 6400, 阴性样本只做 1 : 50 稀释; 双抗原夹心法的二抗 (HRP 标记的 P51 抗原) 做 1 : 2000、1 : 4000、1 : 8000 三个稀释度, 间接法的二抗 (HRP 标记的 IgG) 做 1 : 10 000、1 : 20 000、1 : 40 000 三个稀释度。每个样本在梯度稀释下均有不同二抗稀释度与之相对应。其余操作按照常规 ELISA 实验进行。

## 2 实验结果

### 2.1 P51 抗原的原核表达

本实验考察了不同诱导温度 (37℃、25℃) 时间 (2 h、4 h、6 h、8 h) 及诱导剂用量 (0.1%、0.01% (V/V) IPTG) 对目的蛋白表达的影响, 综合各种因素选择 37℃、0.01% (V/V) IPTG 的诱导条件, 在大肠杆菌 BL21 codonplus 中表达目的蛋白 P51, 经 SDS-PAGE 电泳检测, 发现抗原蛋白得到了大量表达 (图 1)。

### 2.2 尿素溶解包涵体结果

通过设置梯度 pH (7.0、8.0、9.0、10.0) 及尿素浓

度 (2、4、6、8 mol/L) 洗涤包涵体实验可知, 在 pH 10.0 时 8 mol/L 尿素的溶解效果最佳, 但仍不能完全溶解, 结果见图 2。

### 2.3 层析结果

#### 2.3.1 金属离子螯合层析结果

综合 SDS-PAGE 电泳结果可知, 螯合色谱特异性较好, 填料对非特异性蛋白吸附量较低, 大量杂蛋白在穿透峰中, 进而一步洗脱即可使 P51 抗原纯度达到 85% 以上 (图 3、4)。

#### 2.3.2 离子交换层析结果

结合 SDS-PAGE 电泳结果可知, P51 在较低盐浓度时即可完全洗脱, 提高盐浓度, 将有少量杂蛋白伴随洗脱, 因此梯度洗脱可获得较高纯度 P51 蛋白 (图 5、6)。

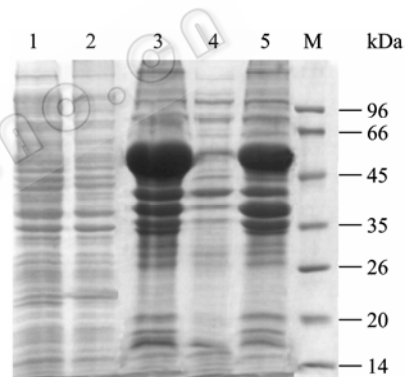


图 1 P51 在大肠杆菌 BL21 codonplus 中的表达

Fig. 1 P51 antigen expressed in *E. coli* BL21 codonplus. M: protein marker; 1: *E. coli* BL21 codonplus strain without plasmid; 2: *E. coli* BL21 codonplus/pTHioHisA51 without IPTG induction; 3: *E. coli* BL21 codonplus/pTHioHisA51 induced with IPTG; 4: supernatant of lysed cells (*E. coli* BL21 codonplus/pTHioHisA51 induced with IPTG); 5: precipitate of lysed cells (*E. coli* BL21 codonplus/pTHioHisA51 induced with IPTG).

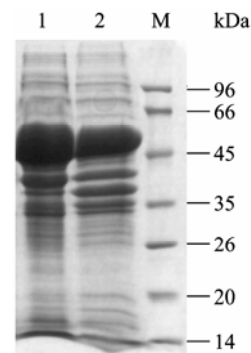


图 2 P51 包涵体在尿素中的溶解

Fig. 2 Dissolution of inclusion bodies with 8 mol/L urea at pH 10.0. M: protein marker; 1: the supernatant after 8 mol/L urea dissolution; 2: the precipitation after 8 mol/L urea dissolution.

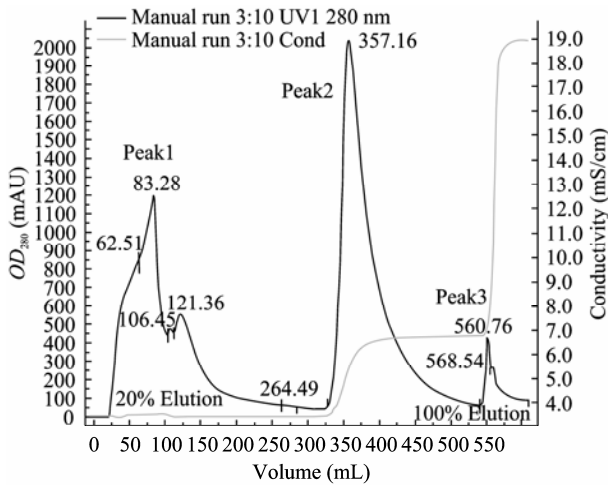


图3 Ni螯合柱层析图谱

Fig. 3 Ni-Chelating chromatography. Peak 1: flow through fraction; Peak 2: elution with 20% elution buffer; Peak 3: elution with 100% elution buffer.

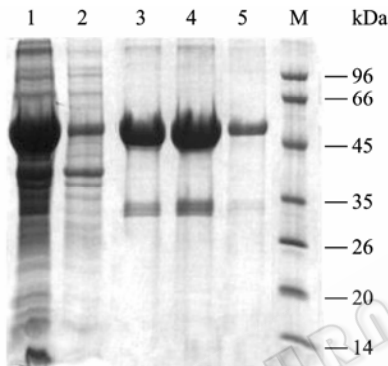


图4 经Ni亲和层析样品的SDS-PAGE分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the samples from Ni-chelating chromatography. M: protein marker; 1: sample before chromatography; 2: sample from Peak 1 (flow through fraction); 3,4: samples from Peak 2 (eluted with 20% elution buffer); 5: sample from Peak 3 (eluted with 100% elution buffer).

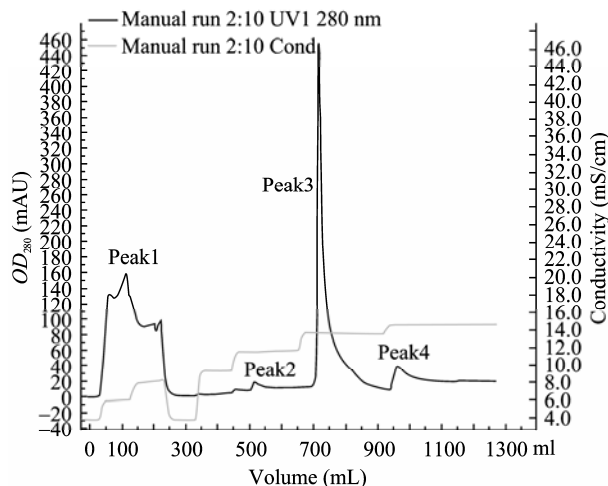


图5 DEAE离子交换层析图谱

Fig. 5 DEAE IE chromatogram. Peak 1: flow through fraction; Peak 2: the first elution fraction; Peak 3: the second elution fraction; Peak 4: the third elution fraction.

2.4 Western blotting 检测结果

Western blotting 结果表明, 纯化的蛋白可与 HIV 阳性血清发生结合, 大小准确, 条带清晰、单一, 显示了极好的特异性。见图 7。

2.5 ELISA 结果

如图 8 所示, 间接法的 cutoff 值在二抗各稀释度下依次为 0.9、0.4、0.2, 而同样的阴性样本夹心法 cutoff 值均为 0.01 左右 (数据未标明), 体现出夹心法具有较高特异性; 阳性样本在稀释度为 1 : 6400 时也能够较好的判阳, 未出现漏检和假阳性情况, 表现出较好的灵敏度。

3 讨论

P51 蛋白在 HIV-1 中较为保守, 在 HIV-1 各亚

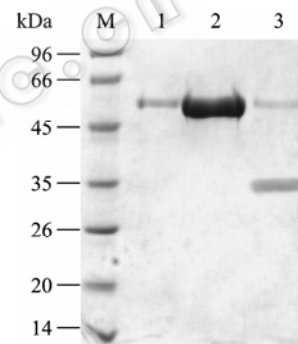


图6 离子交换层析样品的SDS-PAGE分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of samples from the DEAE-IE chromatography. M: protein marker; 1: sample from the first elution fraction; 2: sample from the second elution fraction; 3: sample from the third elution fraction.

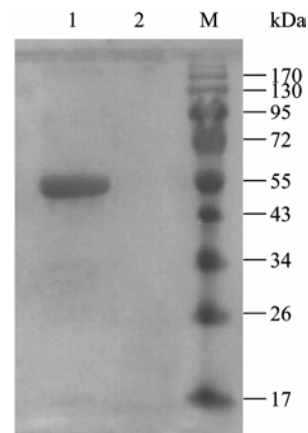


图7 Western blotting 检测纯化的 P51 蛋白

Fig. 7 Western blotting analysis of the purified P51. M: prestained protein marker; 1: recombinant P51 after purification; 2: cell lysate of *E. coli* transformed with pThioHisA plasmid vector and induced with IPTG.

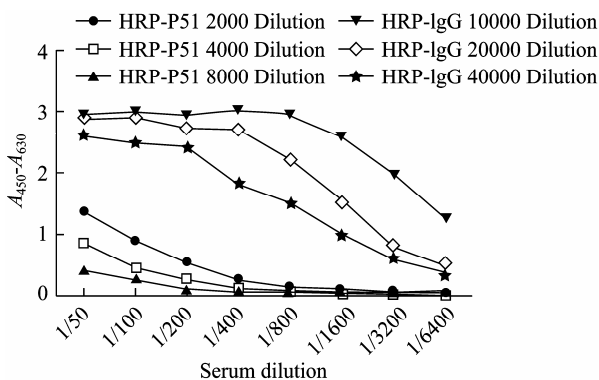


图8 P51的ELISA检测

Fig. 8 ELISA assay of P51. The OD values of positive sample  $\geq 2.1$  folds the OD values of negative sample means.

型中同源性在85%以上,与HIV-2之间也有60%的同源性。因此其用做检测试剂,假阳性率及漏检率均较低,能够真实地反映感染者血清学状况。在HIV-1感染者中,P51的检出率仅次于HIV膜蛋白,为90%以上,随着疾病的进展,其检出率稍有下降,但波动不大<sup>[4-5]</sup>。

本研究室曾成功表达纯化该蛋白,采用的策略为包涵体复性后采用DEAE精纯,得到较纯蛋白<sup>[6]</sup>,但由于收率较低,且样品中仍含有变性剂,因而本实验改用金属离子螯合层析配合离子交换色谱技术,获得了单一条带的高纯度蛋白,并成功复性。

重组p51抗原易于形成包涵体,需要通过变性、复性手段,使重组蛋白折叠成天然构象状态<sup>[7]</sup>。包涵体蛋白的复性效率往往较低,复性成本较高,有的蛋白甚至不易成功地复性。研究证明,采用低pH( $\leq 2.6$ )和高温( $85^{\circ}\text{C}$ )<sup>[8]</sup>或用高pH( $\geq 12$ )结合低浓度的变性剂<sup>[9]</sup>有利于包涵体复性。

溶解包涵体时,pH值和尿素浓度对其都有较大影响<sup>[10-11]</sup>,结果表明在高尿素浓度(6 mol/L及8 mol/L)下,较高pH有利于包涵体的溶解。而且,适当提高pH可以保持包涵体中存在的具有天然状态二级结构的蛋白,有利于后续的复性过程<sup>[12-13]</sup>,因此选择pH 10.0、8 mol/L尿素作为包涵体溶解的条件。

目的蛋白的复性过程中,添加N-十二烷基肌氨酸钠可起到2种作用:1)当N-十二烷基肌氨酸钠浓度较高时可作为变性剂,保持包涵体处于溶解状态;2)当N-十二烷基肌氨酸钠浓度较低时起到保护作用,可帮助蛋白折叠复性。采用较高的复性pH,

有利于防止自由硫醇的质子化作用对形成正确二硫键的不利影响。过高或过低的pH都会降低复性效率,最适宜的复性pH值一般是9.0左右。同时在复性缓冲液中添加高浓度Tris及甘油,有利于提高蛋白折叠效率<sup>[12-13]</sup>。

较之间接法ELISA,双抗原夹心法可以同时检测血液中的IgG和IgM,有利于提高检出灵敏度并缩短“窗口期”。同时,酶标抗原与被包被抗原所捕获的抗体之间的结合具有高度特异性,不受非特异性抗体的干扰,因而双抗原夹心法的特异性更好<sup>[14-15]</sup>。从实验结果可以看出,采用间接法其本底值随二抗用量增多而加大,意味着有较多的非特异性结合,而夹心法由于其特异性优势,本底值极低,能很好地排除非特异性干扰,因此在保证特异性及灵敏度的前提下,可以加大抗原包被量得以更加灵敏的检测样本。由于P51在大肠杆菌中表达极易形成包涵体,而双抗原夹心法做酶标记时要求抗原最好以可溶形式存在,因而其复性成功与否成为能否开发成功双抗原夹心法P51抗体检测试剂的关键。近年来逆转录酶抗原表位不断发现和阐明,为研究HIV疫苗提供了新思路,由于逆转录酶自身保守性,以逆转录酶作为抗原的病毒疫苗和核酸疫苗将对病毒的变异有更大的适应性<sup>[16-17]</sup>,因此本研究为HIV抗体检测及疫苗研究提供了关键试剂。

## REFERENCES

- [1] Tasara T, Amacker M, Hubscher U, *et al.* Intramolecular chimeras of the p51 subunit between HIV-1 and FIV reverse transcriptases suggest a stabilizing function for the P66 subunit in the heterodimeric enzyme. *Biochemistry*, 1999, **38**: 1633-1642.
- [2] Cabodevilla JF, Odriozola L, Santiago E, *et al.* Factors affecting the dimerization of the P66 form of HIV-1 reverse transcriptase. *Eur J Biochem*, 2001, **268**(5): 1163-1172.
- [3] Huang CX. *Medical Virology Basis and Experimental Techniques*. Beijing: Science Press, 1990: 211. 黄祯祥. *医学病毒学基础及实验技术*. 北京: 科学出版社, 1990: 211.
- [4] Yang CX, Fu JH, Bi ZQ, *et al.* Detection of immunological and serological indicator of HIV-1 infected

- individuals. *Chin J Public Health*, 2008, **24**(6): 695–696.
- 杨彩霞, 傅继华, 毕振强, 等. HIV-1 感染者免疫学及血清学指标检测. *中国公共卫生*, 2008, **24**(6): 695–696.
- [5] DeVico AL, Veronese FD, Lee SL, *et al.* High prevalence of serum antibodies to reverse transcriptase in HIV-1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retrovir*, 1988, **4**(1): 17–22.
- [6] Qu XW, Yang ZQ, Shao YM, *et al.* Overexpression and purification in *E. coli* of P66 and P51 protein of HIV-1 strain CN54. Huazhong Agricultural University, 2004.
- 瞿小旺, 杨再清, 邵一鸣, 等. 中国株 CN54 HIV-1 Pol P66/P51 在大肠杆菌中的表达与纯化. 华中农业大学, 2004.
- [7] Vallejo LF, Rinas U. Strategy for the recovery of active protein through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb Cell Fact*, 2004, **3**: 11.
- [8] Gavit P, Better M. Production of antifungal recombinant peptides in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2000, **79**(2): 127–136.
- [9] Patra AK, Mukhopadhyay R, Muhhija R, *et al.* Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2000, **18**(2): 182–192.
- [10] Fu JJ, Sun J, Chen P, *et al.* Optimization of induction and purification of HIV-1 Gag protein in *Escherichia coli* expression system. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(7): 1306–1311.
- 傅晶晶, 孙静, 陈佩, 等. HIV-1 Gag 蛋白在大肠杆菌表达系统中诱导和纯化条件的优化. *生物工程学报*, 2008, **24**(7): 1306–1311.
- [11] Sun J, Liu Y, Hao YL, *et al.* Optimization of purification condition for inclusion body of recombinant HIV-1 transmembrane protein Gp41. *Chin J Biologicals*, 2009, **22**(4): 395–398.
- 孙静, 刘勇, 郝彦玲, 等. 重组 HIV-1 跨膜蛋白 Gp41 包涵体纯化条件的优化. *中国生物制品学杂志*, 2009, **22**(4): 395–398.
- [12] Khan RH, Rao KB, Eshwari AN, *et al.* Solubilization of recombinant bovine growth hormone with retention of native like secondary structure and its refolding from the inclusion bodies of *E. coli*. *Biotechnol Prog*, 1998, **14**: 722–728.
- [13] Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng*, 2005, **99**(4): 303–310.
- [14] He HX, Mao PY, Hou J, *et al.* Establishment of a double-antigen sandwich ELISA for detecting total antibodies to human immunodeficiency virus type 1/2. *Chin J Exp Clin Virol*, 2002, **16**(3): 288–291.
- 何红霞, 貌盼勇, 侯俊, 等. 双抗原夹心法检测抗 HIV1/2 总抗体方法的建立和评价. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2002, **16**(3): 288–291.
- [15] Zhao LH, Shen JC, Kong W, *et al.* Studies on antigenicity of human immunodeficiency virus type-1(HIV-1) external glycoprotein as well as its expression in *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2007, **23**(3): 457–461.
- 赵丽辉, 沈家骢, 孔维, 等. HIV-1 膜蛋白在甲醇型酵母中的表达和抗原性的研究. *生物工程学报*, 2007, **23**(3): 457–461.
- [16] Hehl EA, Kalpana GV, Prasad VR, *et al.* Interaction between human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase and integrase protein. *J Virol*, 2004, **50**: 5056–5067.
- [17] Sevilya Z, Loya S, Duvshani A, *et al.* Mutagenesis of Cysteine 280 of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type-1: the effects on the ribonuclease H activity. *J Mol Biol*, 2003, **327**: 19–30.