

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00365

## HIV-1 HXB2 株蛋白酶的原核表达、纯化及其 Gag 蛋白 CAP2NC 的切割活性分析

陈 铭<sup>1</sup>, 潘 欣<sup>1</sup>, 贾建安<sup>1</sup>, 何 俊<sup>1</sup>, 蒋少华<sup>1</sup>, 陈 璐<sup>2</sup>, 姚静娟<sup>3</sup>, 陈秋莉<sup>1</sup>, 曹 洁<sup>1</sup>, 潘 卫<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学基础部微生物学教研室, 上海 200433

2. 安徽医科大学病理学教研室, 合肥 230032

3. 第二军医大学长征医院感染科, 上海 200003

**[摘要]** **目的:**原核表达、纯化 HIV-1 型 HXB2 株蛋白酶(protease, PR), 用于对 HIV-1 Gag P2/NC 蛋白酶切割位点序列随机突变的噬菌体展示文库的切割筛选及构建新的蛋白酶抑制剂(protease inhibitor, PI)类药物体外筛选模型。**方法:**根据 HIV-1 HXB2 株 PR DNA 序列设计引物, 在 PR 序列上游添加自切割位点 MGTVSFNF 8 个氨基酸编码获得 PR107 DNA 编码序列, 将 PR107 DNA 克隆至原核表达载体 pET-32a, 序列测定后转化大肠杆菌 BL21 DE3 进行诱导表达。表达产物经用 Ni-NTA 亲和柱纯化, 经复性后, 进行靶蛋白 CAP2NC 切割试验, SDS-PAGE 检测切割结果。**结果:**成功合成了使用大肠杆菌偏好密码子的 HIV-1 PR107 的 DNA 编码序列, 序列测定显示其编码氨基酸序列与原始序列完全一致; 成功构建了 HIV-1 PR 原核表达质粒 pET32a-PR107, 转化大肠杆菌 BL21 DE3 经 IPTG 诱导后, 表达出相对分子质量为 30 000 的 HIV-1 PR 融合蛋白, 纯化的目的蛋白浓度为 2.54 mg/ml; 纯化蛋白经复性后具有对底物蛋白 CAP2NC 的切割活性, 该作用能被 PI 药物抑制。**结论:**成功构建大肠杆菌偏好密码子带自切割位点的 HIV-1 PR 原核表达载体 pET32a-PR107, 在大肠杆菌中表达, 经纯化复性获得了具有切割活性的 HIV-1 PR 融合蛋白。

**[关键词]** HIV; 蛋白酶; 基因表达; 切割

**[中图分类号]** Q 78 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)04-0365-06

### Prokaryotic expression and purification of protease of HIV-1 HXB2 subtype and analysis of cleaving substrate protein Gag CAP2NC peptide

CHEN Ming<sup>1</sup>, PAN Xin<sup>1</sup>, JIA Jian-an<sup>1</sup>, HE Jun<sup>2</sup>, JIANG Shao-hua<sup>1</sup>, CHEN Lu<sup>2</sup>, YAO Jing-juan<sup>3</sup>, CHEN Qiu-li<sup>1</sup>, CAO Jie<sup>1</sup>, PAN Wei<sup>1\*</sup>

1. Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Pathology and Physiology, Anhui Medical University, Hefei 230032

3. Department of Infectious Diseases, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200030

**[ABSTRACT]** **Objective:** To express, purify and identify the protease (PR) of HIV-1 HXB2 subtype in *E. coli*, so as to screen the HIV-1 Gag CAP2/NC protein phage displayed library with randomized P2/NC protease cleavage sites and establish a phage model for *in vitro* screening of PR inhibitors. **Methods:** The primers were designed according to the PR amino acid sequence of HIV-1 HXB2 subtype and the *E. coli* preferred codon, the additional 5'-nucleotide sequence encoding the eight peptide MGTVSFNF for autocleave sites was inserted into the upstream of PR sequence. Then the PR107 DNA sequence was cloned into pET-32a vector which was used as expression vector in *E. coli*. Expression of HIV PR was induced by IPTG in *E. coli* BL21-DE3 and the expressed PR protein was purified by the Ni-NTA affinity column. The purified PR protein was refolded by diluted with MES buffer and blended into substrate protein CAP2NC to test its cleaving activity and the result was identified by SDS-PAGE. **Results:** The HIV PR107 DNA fragment with *E. coli* preferred codon was synthesized and was successfully inserted into the expression vector pET-32a. HIV-1 PR was expressed in *E. coli* BL21 DE3 after the induction by IPTG with a relative molecular weight of 30 000. The purified PR protein has a concentration of 2.54 mg/ml, and after refolded it could cleave substrate protein

**[收稿日期]** 2007-10-27 **[接受日期]** 2008-01-22

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30472050); 上海市重点基础科研项目(05dz19317). Supported by National Natural Science Foundation of China(30472050), Key Project in Basic Research of Shanghai Municipal Government(05dz19317).

**[作者简介]** 陈 铭, 硕士生, 主治医师.

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25074371; E-mail: pwpwanwei@yahoo.com.cn

CAP2NC and this effect can be blocked by PI agent. **Conclusion:** PR107 DNA fragment with *E. coli* preferred codon of HIV-1 HXB2 subtype has been successfully synthesized and the PR protein has been successfully expressed, which can cleave substrate protein CAP2NC.

**[KEY WORDS]** HIV; protease; gene expression; cleave

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(4): 365-370]

人类免疫缺陷病毒(HIV)的感染引起的获得性免疫缺陷综合征(AIDS),现已成为世界范围内危害人类健康最严重的传染性疾病。HIV蛋白酶(PR)属于天冬氨酸酶类,包含99个氨基酸,活性形式为同源二聚体<sup>[1]</sup>。该酶将HIV中的Gag与Gag-pol融合蛋白切割成为结构蛋白与各种酶类<sup>[2]</sup>,促进病毒颗粒的成熟,为HIV复制所必需的酶,也是抗HIV药物的重要靶位点之一。蛋白酶抑制剂(PI)类药物是针对AIDS的高效抗逆转录病毒疗法(HAART)所选用的两类主要药物之一。然而,HIV PR对PI类药物的耐药突变已经严重阻碍了抗病毒治疗,PR的99个氨基酸中已发现有21个位点可产生与耐药相关的突变,其中最重要的突变位置为:30位、46位、48位、82位、84位和90位,这些突变可引起HIV PR对目前临床应用的6种PI药物发生耐受<sup>[3]</sup>,因此需要不断开发新的PI类药物用于治疗。合适的药物筛选方法是新药研制最重要的环节之一,但现有的HIV体外药物筛选方法不能直接用于针对耐药突变株病毒新药的筛选,本研究组正在构建针对耐药突变的HIV PR的PI类药物的噬菌体体外筛选模型<sup>[4]</sup>,以满足针对耐药突变HIV的PI类药物研发。获得具有切割活性的HIV PR是该工作的前提,前期我们曾进行过HIV PR表达和制备<sup>[5]</sup>,但所获PR切割活性不足。

本研究改用了新的表达载体并添加了PR自切割序列,获得了具有较好切割活性的HIV PR,现报道如下。

## 1 材料和方法

1.1 质粒及菌种 pMD18-T-PR99为本室构建的以pMD18-T为载体,目的基因为编码HIV-1型M组B亚型的代表株HXB2株PR序列(GenBank No: AF033819)的重组质粒;表达载体pET-32a及其大肠杆菌BL-21DE3购于Novagen公司;pQE30-CAP2NC质粒为本室构建的编码HIV-1型M组B亚型HXB2株Gag蛋白第133位到488位融合蛋白序列(GenBank No: AF033819)表达质粒<sup>[4]</sup>;大肠杆菌DH5 $\alpha$ 、M15为本室保存。

1.2 试剂 限制性内切酶BamH I、Hind III及T<sub>4</sub>连接酶、Taq酶均购自TaKaRa公司;重叠延伸PCR

使用的Taq DNA聚合酶购自Promega公司;质粒纯化试剂盒及琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自上海捷瑞公司;用于切割鉴定的无活性的PR<sup>[-]</sup>蛋白<sup>[5]</sup>为本室保存;其他生化试剂购于上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.3 引物 引物Pa-107 5'-CGC GGA TCC ATG GGT ACC GTT TCT TTC AAC TTC CCG CAG GTT ACC CTG TGG CAG-3',在PR上游添加了BamH I酶切位点及PR自切割位点MGTVSFNF 8个氨基酸编码序列和3个保护碱基;引物Pu-stop 5'-GAA AGC TTT TAG AAG TTC AGG GTG CAA CCG ATC TGG GTC AGC AG -3',在PR末端添加终止密码TAA及Hind III酶切位点和2个保护碱基,由上海英骏生物技术公司合成。

1.4 HIV-1 PR107原核表达载体的构建 以pMD18-T-PR99质粒为模板,Pa-107、Pu-stop为上、下游引物,各0.25 mmol/L, Taq酶1 U,总体积50  $\mu$ l,扩增PR DNA蛋白编码片段,反应条件为:94 $^{\circ}$ C变性5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,30个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min。1.5%琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行鉴定。PCR产物回收后使用限制酶BamH I与Hind III双酶切,酶切产物纯化后与限制酶BamH I与Hind III酶切后的原核表达载体pET32a连接并转化*E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞。选取单克隆菌落抽提质粒,用BamH I与Hind III进行双酶切鉴定,挑取2个酶切鉴定正确克隆使用T7通用引物送上海英骏生物技术公司进行DNA测序,测序结果用DNASTAR软件进行比较分析。

1.5 HIV-1 PR表达、纯化及复性 取鉴定正确的pET32a-PR重组质粒转化感受态*E. coli* BL21 DE3,挑取单克隆在37 $^{\circ}$ C培养至 $D_{600}=0.5\sim 0.7$ ,加入IPTG至终浓度为1 mmol/L,诱导3.5 h。离心收集细菌沉淀,以洗涤液(137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 4.3 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mmol/L DTT)洗涤沉淀,超声破菌后以溶解液(137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 4.3 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mol/L 尿素)溶解包涵体,离心收集上清用于纯化,纯化按QIAGEN公司Ni-NTA使用说明书进行。Bradford法595 nm下测定目的蛋白浓度<sup>[6]</sup>。将纯化后

的 PR 加入 DTT 至 50 mmol/L, 4℃ 过夜后以复性缓冲液(20 mmol/L MES, 2 mmol/L DTT, 10% 甘油, pH 5.5)稀释 50 倍, 置 4℃ 复性 24 h, 并将复性产物离心后测量上清 PR 浓度。

#### 1.6 HIV-1 PR 底物 CAP2NC 蛋白表达及纯化

取 pQE30-CAP2NC 重组质粒转化感受态 *E. coli* M15, 挑取单克隆在 37℃ 培养至  $D_{600}=0.5\sim 0.7$ , 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 诱导 3.5 h。离心收集细菌沉淀, 经洗涤后裂解细胞并以 8 mol/L 尿素溶解包涵体, 离心后将上清液通过 Ni-NTA 柱纯化 CAP2NC 蛋白, 纯化后的目的蛋白以 PBS 缓冲液透析除去变性剂尿素并测定蛋白浓度。

#### 1.7 HIV-1 PR 对底物 CAP2NC 切割活性分析

将上述纯化好的 PR 靶蛋白 CAP2NC 蛋白用 PBS 调至 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 取 50  $\mu\text{g}$  于 Eppendorf 管, 分别加入 PR 1  $\mu\text{g}$ (20  $\mu\text{l}$  稀释复性后的蛋白酶, 此管 CAP2NC 终浓度为 1.6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , PR 终浓度为 0.03  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 5  $\mu\text{g}$ (100  $\mu\text{l}$  稀释复性后的蛋白酶, 此管 CAP2NC 终浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , PR 终浓度为 0.05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 混匀后置于 4℃ 12 h, 反应完成后, 反应体系加入 8  $\mu\text{l}$  5× SDS 加样缓冲液, 振荡混匀后 100℃ 加热 7 min, 用 15% 的 SDS-PAGE 鉴定切割效果。

#### 1.8 PR 抑制剂对 PR 切割作用的影响

取 PI 类药物 Indinavir 以蒸馏水溶解, 获得浓度为 0.02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的 Indinavir 溶液。将 CAP2NC 蛋白 50  $\mu\text{g}$  分别与 2.5  $\mu\text{g}$ 、0.5  $\mu\text{g}$ 、0.1  $\mu\text{g}$  Indinavir 混合, 再加入 PR 5  $\mu\text{g}$ (100  $\mu\text{l}$  稀释复性后的蛋白酶); 对照分别为不加入 PI 类药物的 PR 与 CAP2NC 混合物, PR 复性缓冲液稀释的 CAP2NC 蛋白。此外, 我们还使用了我们以前所表达的已证实无切割活性的 PR<sup>[-]</sup>作为另一对照。将上述各样品均加入 PR 复性缓冲液至总体积 250  $\mu\text{l}$ (此时反应体系内 CAP2NC 浓度为 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , PR 为 0.02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Indinavir 分别为 0.01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.002  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.000 4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 置 4℃ 反应 12 h, 再加入 5× SDS 加样缓冲液, 100℃ 加热 7 min 后进行 15% SDS-PAGE 鉴定。

## 2 结 果

#### 2.1 HIV-1 PR107 原核表达载体的构建与鉴定

以 pMD18-T-PR99 为模板, 扩增 PR DNA 蛋白编码片段获得了大小为 330 bp 与理论值一致的条带(图 1), 将 HIV-1 PR DNA 克隆于原核表达载体 pET32a, 经 *Bam*H I 与 *Hind* III 双酶切鉴定阳性质粒, 结果在 330 bp 有一与理论值相符的条带(图 2)。DNA 测序结果经用 DNASTAR 软件进行对比, 序

列也和理论结果完全一致。

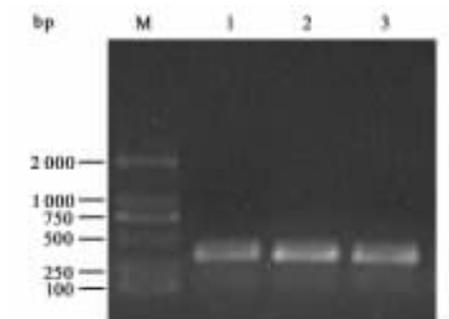


图 1 PCR 体外合成 HIV-1 PR DNA 序列

Fig 1 HIV-1 PR DNA sequence synthesized *in vitro* by overlapping PCR

M; DL2000 marker; 1, 2, 3; PCR product of HIV-1 PR DNA sequence (330 bp)

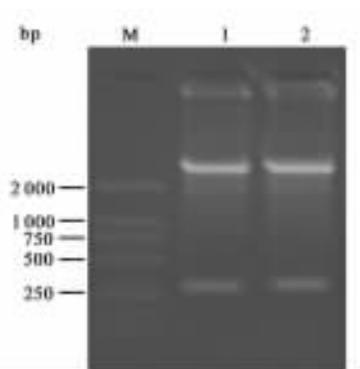


图 2 pET32a-PR 限制酶酶切分析

Fig 2 Restriction analysis of pET32a-PR

M; DL2000 marker; 1, 2; pET32a-PR digested with *Bam*H I/ *Hind* III

#### 2.2 HIV-1 PR 的表达、纯化及复性

将 pET-32a-PR 重组质粒转化 *E. coli* BL-21DE3, 进行 IPTG 诱导表达, 15% SDS-PAGE 凝胶电泳显示, 在 pET32a-PR 诱导表达的条带中出现两种情况(图 3), 一种为只有一条相对分子质量大小 30 000 的条带(图 3 第 1, 3 泳道); 另一种为出现相对分子质量大小 30 000、20 000、10 000 3 条条带(图 3 第 2 泳道)。图中相对分子质量大小 30 000 条带与我们构建的 PR 融合蛋白理论大小相同; 第二种情况中相对分子质量 20 000 的条带符合 pET32a 质粒编码氨基酸及自切割位点 8 个氨基酸的融合蛋白大小, 相对分子质量 10 000 的条带与 PR 蛋白大小一致, 因此我们认为相对分子质量 20 000 与 10 000 的条带分别为相对分子质量 30 000 的融合 PR 蛋白自切割而来的载体编码蛋白序列和游离 PR 蛋白序列。为简化操作, 我们选择未自切割的相对分子质量 30 000 的融合 PR 进行纯化。凝胶扫描表明, 目的蛋白占菌体总蛋白 20% 以上。以上的融合 PR 包涵体经尿素

溶解, Ni-NTA 亲和介质纯化后, 15% SDS-PAGE 电泳, 凝胶扫描表明蛋白纯度达到 85% 以上 (图 4)。用 Brade-ford 工作液在 595 nm 下测纯化后蛋白浓度, 浓度达 2.54 mg/ml。我们使用了稀释的方法来复性 PR, 复性产物离心后上清液中 PR 浓度达到了 0.05 mg/ml, 此时 90% 以上的 PR 以可溶形式存在, 复性效率超过 90%。

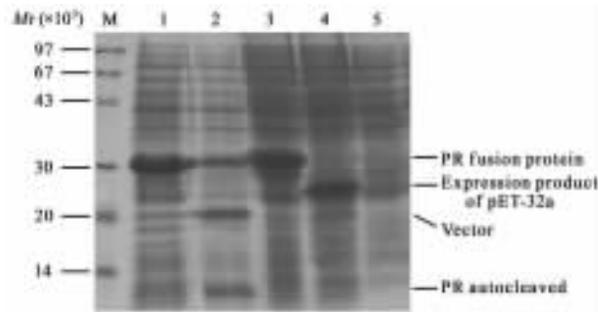


图 3 大肠杆菌中诱导表达 HIV-1 PR 的 SDS-PAGE 分析

**Fig 3 SDS-PAGE analysis of HIV-1 PR expressed in *E. coli***  
 M: LMW protein molecular weight standard; 1, 3: Expressed product of recombinant *E. coli* BL21DE3 containing HIV-1 PR was not auto-cleaved; 2: Expressed product of recombinant *E. coli* BL21DE3 containing HIV-1 PR was autocleaved; 4: Recombinant *E. coli* BL21DE3 of pET32a with no insertion of PR expressed product; 5: Negative control

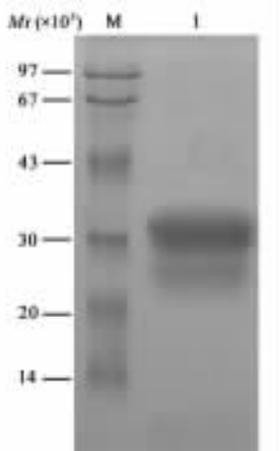


图 4 纯化 HIV-1 PR 的 SDS-PAGE 分析

**Fig 4 SDS-PAGE analysis of purified HIV-1 PR**

M: LMW protein molecular weight standard; 1: Purified HIV-1 PR

**2.3 HIV-1 PR 对底物 CAP2NC 蛋白切割活性分析** 为了验证我们所表达的 HIV-1 PR 的切割活性, 我们将 CAP2NC 蛋白 50 μg 与不同剂量复性后的 PR 混合, 置 4℃ 反应 24 h 后, 15% 的 SDS-PAGE 电泳显示 (图 5) 相对分子质量大小为 34 000 的 CAP2NC 蛋白均被蛋白酶切割成相对分子质量约为

26 000 的 CAP2 及 8 000 的 NC 的两条片段, 切割较为完全且与理论大小相符。

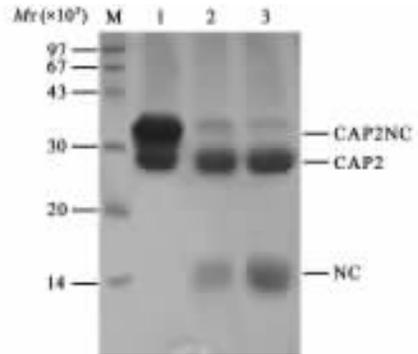


图 5 HIV-1 PR 切割底物蛋白 HIV-1 CAP2NC

**Fig 5 HIV-1 PR cleaving target protein HIV-1 CAP2NC**

M: LMW protein molecular weight standard; 1: Purified and refolded HIV-1 CAP2NC protein; 2: HIV-1 CAP2NC protein 50 μg + HIV-1 PR 5 μg; 3: HIV-1 CAP2NC protein 50 μg + HIV-1 PR 1 μg

**2.4 PR 抑制剂对 PR 切割作用的影响** 为了分析 PI 药物对我们所表达的 PR 切割作用的影响, 我们选择了 Indinavir 进行抑制试验。将浓度为 50 μg CAP2NC 蛋白与不同剂量的 Indinavir 混合, 随后加入复性后的蛋白酶, 结果显示 (图 6) 所有加入 Indinavir 的样品均未出现 PR 对 CAP2NC 的切割现象 (图 6 第 1、2、3 泳道), 证实了 Indinavir 对 PR 切割作用的抑制, 也证明 PR 对 CAP2NC 的切割的特异性。在 CAP2NC 与 PR 混合的反应体系中相对分子质量 34 000 的 CAP2NC 蛋白被 PR 切割为 26 000 的片段 (图 6 第 4 泳道); 其他的反应体系中的相对分子质量 34 000 CAP2NC 蛋白仍然存在, 已证实无切割活性的 PR<sup>[-]</sup> 仍未能显示对 CAP2NC 的切割作用。

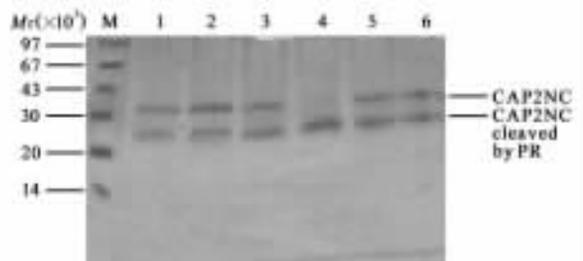


图 6 Indinavir 对 PR 切割活性的抑制作用

**Fig 6 Cleavage reaction of HIV-1 PR inhibited by Indinavir**

M: LMW protein molecular weight standard; 1: CAP2NC 50 μg + Indinavir 2.5 μg + PR 5 μg; 2: CAP2NC 50 μg + Indinavir 0.5 μg + PR 5 μg; 3: CAP2NC 50 μg + Indinavir 0.1 μg + PR 5 μg; 4: CAP2NC 50 μg + PR 5 μg; 5: 50 μg CAP2NC diluted with MES buffer; 6: CAP2NC 50 μg + PR<sup>[-]</sup>

### 3 讨 论

本研究利用重叠延伸 PCR 的方法成功的合成了含自切割位点 HIV-1 HXB2 株 PR DNA,测序表明与 HIV HXB2 株的氨基酸序列完全一致,将 PR DNA 插入原核表达载体 pET-32a 后转化大肠杆菌 BL21 DE3, IPTG 诱导产物纯化复性后,获得了较好切割活性的蛋白酶。我们曾使用多种方式在大肠杆菌中诱导表达 HIV-1 PR<sup>[5]</sup>,但均对目的蛋白 CAP2NC 的切割活性不足,分析其原因,我们认为所使用的 pQE30 载体在 PR 上游的 6×His 标记及 PR 下游所编码的数个氨基酸可能对 PR 的活性产生了影响。文献表明 PR 上游的 pol 序列影响 PR 的活化,并需要通过自切割产生原始的 N 末端对 PR 形成有活性的二聚体至关重要<sup>[7-8]</sup>,因此,我们在 PR DNA 序列上游添加了 PR 自切割位点 MGTVSFNF 8 个氨基酸编码序列并在 PR 末端添加终止密码子分别用以消除载体编码蛋白在 PR 上、下游的影响,用以恢复 PR 活性。为高效表达 HIV-1 PR,我们使用大肠杆菌偏好密码子对自然的 HIV-1 PR 编码序列进行改造,同时选用了新的表达载体 pET32a 进行表达。重组菌经 IPTG 诱导显示,HIV-1 PR 表达蛋白达到宿主菌总蛋白 20% 以上,有部分克隆在表达中已产生了明显的自切割现象,相对分子质量 30 000 PR 融合蛋白自切割成为大小约 20 000 和 10 000 的两个片段。在蛋白诱导过程中部分蛋白出现自切割,另一部分非自切割的现象的原因我们估计与菌体受 IPTG 诱导后产生蛋白的速度有关,速度过快则新生蛋白直接形成包涵体,丧失生物活性;反之则可能产生自切割现象。自切割现象证实了 PR 在菌体诱导过程中的活性,为了简化操作提高纯化效率,我们选择了未自切割的融合 PR 进一步纯化。pET32a 载体所表达的目的蛋白带有 6×His 标记,经 Ni-NTA 纯化得到 SDS-PAGE 的电泳条带清晰的单一条带相对分子质量 30 000 的目的蛋白。纯化后蛋白经测定浓度为 2.54 mg/ml,满足进一步复性工作的需要。

先前所获 PR 切割活性不足的另一个重要原因可能是未找到合适的蛋白复性方法。此次在 PR 复性过程中,我们就常用的透析和稀释两种方法进行了多次尝试,最终结果显示透析复性效率不高,在透析过程中蛋白聚集产生了大量沉淀,而且离心后的

上清液在后来的切割试验中证实没有活性;稀释是比透析更好的 PR 复性方法,原因可能为稀释复性为蛋白提供了更好的折叠空间,有利于蛋白正确折叠成为有切割活性的二聚体,整个稀释过程中未见蛋白沉淀现象发生。复性缓冲液的选择上,我们反复尝试了多种缓冲液配方,最终选择的 MES 缓冲液 (20 mmol/L MES, 2 mmol/L DTT, 10% 甘油, pH 5.5) 证实效果较好,复性后的蛋白酶具有最好的切割活性;复性缓冲液中加入低浓度 DTT 也很必要,用以防止 PR 融合蛋白中分子内或分子间中错误二硫键的形成,并阻止蛋白氧化。复性后的 PR 在后续切割靶蛋白 CAP2NC 试验中显示了较好的切割活性,将靶蛋白 CAP2NC 切割的较为完全。

人类免疫缺陷病毒 Gag 基因所编码的结构蛋白是该病毒含量最丰富的蛋白,对于 HIV 颗粒的组装及释放至关重要<sup>[9-10]</sup>。Gag 基因全长表达产物 P55 经蛋白酶切割后成为基质蛋白 (P17, matrix, MA)、衣壳蛋白 (P24, capsid, CA)、P2 (连接蛋白)、核衣壳蛋白 (P7, nucleocapsid, NC) 等<sup>[2,11]</sup>。P55 蛋白共有 5 个 HIV 蛋白酶的切割靶位点,其中 P2/NC 位点是切割速度最快的位点,也是突变高发位点。为验证所表达的 HIV-1 HXB2 株 PR 的体外切割活性,我们原核表达了包含 CA/P2、P2/NC 两个 PR 酶切位点的 PR 靶蛋白 CAP2NC,得到相对分子质量大小 34 000 蛋白片段。为消除 CA/P2 位点影响,我们在 CA/P2 位点引入突变,突变后的 CA/P2 位点不再被 PR 特异切割。相对分子质量 34 000 的 CAP2NC 蛋白经 PR 切割后通过 SDS-PAGE 证实产生了 26 000、8 000 的两个较小的蛋白片段,与 CAP2、NC 蛋白片段理论大小一致。需要说明的是 CAP2NC 蛋白在纯化后仍然有较为明显的杂蛋白,杂蛋白的产生可能与纯化工艺或 CAP2NC 蛋白非特异降解有关,但并不妨碍对 PR 切割活性的分析。我们另外使用了抑制药物 Indinavir 用以研究对 PR 活性的影响,结果证实 Indinavir 能明显的抑制 PR 对靶蛋白 CAP2NC 片段的切割。

HIV 蛋白酶是抗 HIV 药物的重要靶点之一,但由于 HIV PR 耐药突变的不断产生,有效的 HAART 疗法要求针对不同 HIV PR 应使用不同 PI,所以建立高效敏感特异的 HIV 蛋白酶抑制剂筛选方法对加快抗 HIV 药物速度,提高筛选效率有着重要意义。目前常用筛选方法是应用荧光共振能量

传递(fluorescence resonance energy transfer, FRET)原理,在合成的蛋白酶底物两端偶联荧光发光基团和淬灭基团,通过检测底物被切割后产生的荧光强度来反映蛋白酶切割效果或 PI 抑制效率<sup>[12-13]</sup>。此方法对不同蛋白酶必须预先设计对应底物,不能有效应对 HIV 的高突变率,导致筛选效率不高。我们的研究计划将切割速度最快的也是突变高发位点 P2/NC 位点进行随机化并展示于噬菌体表面并固相化于酶标板上,通过不同蛋白酶体外切割噬菌体展示蛋白以获得对特定蛋白酶敏感噬菌体,进一步用于抑制剂的筛选工作。目前我们已经完成了噬菌体非随机化展示蛋白酶 CAP2NC 切割模型的工作,初步证实了体外应用噬菌体展示技术筛选 PI 类药物的可行性<sup>[4]</sup>。

本研究成功原核表达了 HIV-1 HXB2 株蛋白酶,并经体外切割靶蛋白 CAP2NC 试验证实具有较好的切割活性,且切割反应能被 PR 抑制药物 Indinavir 所抑制,可应用于对 HIV-1 Gag P2/NC 蛋白酶切割位点序列随机突变的噬菌体展示文库进行切割筛选,为构建新的蛋白酶抑制剂类药物体外筛选模型打下了基础。

#### [参考文献]

- [1] Navia M A, Fitzgerald P M, McKeever B M, Leu C T, Heimbach J C, Herber W K, et al. Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1[J]. *Nature*, 1989, 337: 615-620.
- [2] Pettit S C, Michael S F, Swanstrom R. The specificity of the HIV-1 protease[J]. *Perspect Drug Discov Des*, 1993, 1: 69-83.
- [3] Johnson V A, Brun-Vézinet F, Clotet B, Conway B, D'Aquila R T, Demeter L M, et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: special contribution—drug resistance mutations in HIV[J]. *Top HIV Med*, 2004, 12: 119-124.
- [4] 贾建安,周波,蒋少华,陈秋莉,赵平,潘卫,等. HIV Gag CAP2NC 噬菌体蛋白酶切割模型的构建[J]. *生物化学与生物物理学进展*, 2007, 34: 317-325.
- [5] 贾建安,周波,蒋少华,陈秋莉,王锦红,潘卫,等. HIV-1 HXB2 株蛋白酶在大肠杆菌中的表达、纯化及鉴定[J]. *中国生物制品学杂志*, 2006, 19: 109-112.
- [6] Kruger N J. The Bradford method for protein quantitation[M]// Walker J M. *The protein protocol handbook*. New Jersey: Humcan Press Inc, 1966: 15-20.
- [7] Gabriele Z, Carol C. Domains upstream of the protease (PR) in human immunodeficiency virus type 1 Gag-Pol influence PR autoprocessing[J]. *J Virol*, 1995, 69: 3878-3884.
- [8] Min W, Masahiro T, Boon-Nee L, Imanaka T. Autoprocessing: an essential step for the activation of HIV-1 protease[J]. *Biochem J*, 1996, 316: 569-573.
- [9] Saad J S, Miller J, Tai J, Kim A, Ghanam R H, Summers M F. Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 11364-11373.
- [10] Perlman M, Resh M D. Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag[J]. *Traffic*, 2006, 7: 731-745.
- [11] De Oliveira T, Engelbrecht S. Variability at human immunodeficiency virus type 1 subtype C protease cleavage sites: an indication of viral fitness[J]? *J Virol*, 2003, 77: 9422-9430.
- [12] Tomaszek T A Jr, Magaard V W, Bryan H G, Moore M L, Meek T D. Chromophoric peptide substrate for the spectrophotometric assay of HIV-1 protease[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 168: 274-280.
- [13] Hämäläinen M D, Markgren P O, Schaal W, Karlén A, Classon B, Vrang L, et al. Characterization of a set of HIV-1 protease inhibitors using binding kinetics data from a biosensor-based screen[J]. *J Biomol Screen*, 2000, 5: 353-360.

[本文编辑] 曹静

## 欢迎订阅

《第二军医大学学报》

ISSN 0258-879X  
CN 31-1001/R

JOURNAL OF MEDICAL COLLEGES OF PLA ISSN 1000-1948  
CN 31-1002/R

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-373

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-725