

HIV-1 Gag p17-p24 在痘苗病毒中的表达及性质研究

李体远^{2* * *} 金宁一^{1*} 王宏伟¹ 郭志儒¹ 方厚华¹ 安汝国² 殷 震¹

(解放军农牧大学研究所病毒室 长春 130062) (白求恩医科大学 长春 130021)

摘 要 研究了重组痘苗病毒表达的 HIV-1 核心蛋白(Gag)p17-p24 蛋白的一些生物学及免疫学特点。间接免疫荧光、Dot ELISA 及 Western blot 结果表明,构建的两株重组病毒分别表达了 HIV-1 Gag p24 及 p17-p24 融合蛋白。电镜观察证实,Gag p24 及 p17-24 重组蛋白均可形成病毒样粒子。重组病毒可诱导小鼠产生抗 HIV-1 Gag p24 抗体。重组病毒感染 BHK21 细胞后,可见由于细胞凋亡而致的染色体 DNA 断裂“梯子”电泳图。

关键词 HIV-1,Gag,痘苗病毒

中图分类号 Q342 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0065-04

人们已投入大量人力、物力研制用于预防以及(或者)治疗 HIV-1 感染的疫苗^[1~4],但迄今尚未有理想的结果。核心蛋白(Gag)为 HIV-1 的主要结构蛋白之一,可以诱导机体产生抗 HIV-1 的中和抗体和细胞毒作用^[5,6],且能自我装配成病毒样粒子(VLP),从细胞膜释放,使得 Gag 蛋白成为制备巨分子颗粒化抗原的良好载体。痘苗病毒载体表达的重组蛋白更接近天然构型,且能诱导机体产生极强的细胞免疫和体液免疫,因而在重组活疫苗研究中应用最广。以往的实验多侧重于对完整的 Gag 蛋白或与其它外源基因共表达形成的杂合蛋白的免疫学研究。本实验重点考察了痘苗病毒的 HIV-1 p24 及 p17-24 蛋白的生物学及免疫学特性,以期对未来的 HIV-1 疫苗研制提供有关数据。

1 材料和方法

1.1 质粒、细胞和病毒

痘苗病毒表达载体 p16H1FP 及 p16HbF,可使表达的蛋白在 N-端或 C-端融合 His·Tag,并表达荧光蛋白,由作者构建。BHK21、RK13、Cos-7、Wish 细胞由本室保存。天坛株痘苗病毒由本室保存。细胞和病毒用含有 10% 小牛血清的 MEM(或 DMEM)培养增殖。

1.2 重组质粒的构建

利用 PCR 从 pQE 质粒中扩出 N-端融合 His·

Tag 多克隆位点基因序列,插入痘苗病毒表达载体 p16(由金宁一博士构建),并在其多克隆位点下游装入自身带有巨细胞病毒(CMV)启动子的突变型荧光蛋白(FP)基因,构建成 N-端融合 His·Tag 并带有荧光蛋白报告基因的分离型痘苗病毒表达载体。再从 pET-28 中切出 C-端融合 His·Tag 及多克隆位点序列,并与 CMV-FP 基因一同装入 p16,构建成 C-端融合 His·Tag 的分离型痘苗病毒表达载体。将 HIV-1 gag 基因分别插入上述载体,并筛选出重组病毒。

1.3 重组病毒的构建及筛选

按文献[7]的方法,利用脂质体转染法进行体内同源重组,鸡红细胞吸附实验筛选并纯化重组病毒。

1.4 免疫印迹(Western blot,WB)

感染重组病毒的细胞裂解样品经 SDS-PAGE 分离后,将其电转移至硝酸纤维素膜上,封闭后,分别与 HIV-1 Gag p24 单抗、碱性磷酸酶标记的抗鼠 IgG 反应和显色。

1.5 重组痘苗病毒的早、晚期表达

重组痘苗病毒以 10MOI 分别接种于 1.2×10^6 BHK21 细胞中,同时以天坛株痘苗病毒为对照,加或不加阿糖胞苷(AraC,40 μ g/mL),培养 20h 后进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测,比较重组痘苗病毒在感染早期和晚期的表达。AraC 是 DNA 复制的阻遏剂,可阻断病毒 DNA 的复制,从而抑制病

收稿日期:1998-10-08,修回日期:1999-06-24。

基金项目:国家自然科学基金(39770661)和国家杰出青年基金(39825119)项目。

* 联系人。

* * 现在深圳市人民医院中心实验室工作。

毒感染晚期蛋白表达,即晚期启动子控制下的蛋白合成。

1.6 重组痘苗病毒在不同细胞中的表达

重组痘苗病毒以 10MOI 分别接种于 1.2×10^6 BHK21、RK13、Wish 细胞中,20h 收获感染细胞,进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测。

1.7 Gag p24、p17-24 病毒样粒子的形成

重组病毒以 10MOI 感染 BHK21 细胞,24h 后收集感染细胞,用 2.5% 戊二醛固定 2h,1% 锇酸固定 1h,常规方法脱水、包埋和切片,以枸橼酸铅和醋酸铀双染色。JEM-100EX 透射电镜下观察并拍照。

1.8 动物免疫实验

昆明系小鼠,体重 12~14g,随机分为 4 组,每组 10 只。分别足垫皮下多点注射重组痘苗病毒为实验组。同一部分注射 1×10^7 pfu 天坛株痘苗病毒为阴性对照。注射生理盐水作为空白对照。免疫后 6 周采血,分离血清,取纯化后的大肠杆菌表达的 Gag p24 蛋白为抗原测定抗 HIV-1 Gag p24 抗体。

1.9 重组病毒对 DNA 的损伤

重组病毒感染 BHK21 细胞,24h 后提取细胞染色体 DNA,进行琼脂糖电泳。

2 结 果

2.1 Gag p24 和 p17-24 在重组痘苗病毒中的表达

重组质粒与天坛株痘苗病毒进行体内重组后,筛选、纯化重组痘苗病毒。v16HbF/p17-24 表达融合前体蛋白的分子量为 41kD,可被蛋白酶切割成分子量分别为 17,24kD 两个蛋白。Gagp24 融合载体部分基因前体蛋白的分子量约为 30kD。将重组病毒接种 BHK21 细胞,20h 时以抗 p24 单克隆抗体进行 Western blot(图 1)。结果在 24kD 处出现特异条带,说明表达的融合蛋白在 20h 时均已被蛋白酶切割。

2.2 Gag p24 和 p17-24 重组痘苗病毒的早、晚期表达

重组病毒感染 BHK21 细胞后,Western blot 结果表明,在 Arac 存在下目的蛋白的表达量稍有下降,原因可能是本实验使用的痘苗病毒载体中串联的 p7.5 突变型早期启动子强于 ATI 启动子,由 ATI 启动的晚期蛋白表达量相对较少。(图 2)

2.3 Gag p24 和 p17-24 重组痘苗病毒在不同细胞系中的表达

重组病毒感染 BHK21、RK13 及 wish 细胞。于不同时间观察,光镜下可见不同细胞的病变速率不

同,其中 RK13、BHK21 相近,wish 则较慢。Western blot 表明,在所用的三种细胞中,两株重组痘苗病毒的表达量差异不明显。

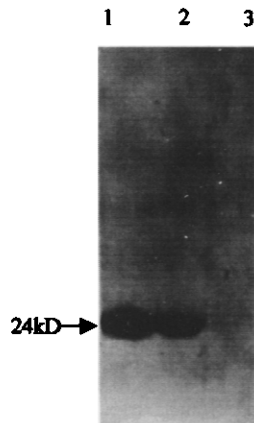


图 1 重组痘苗病毒的 Western blot 分析

Fig.1 Western blot analysis of the recombinant vaccinia virus

1. Recombinant virus v16H1FP/p24
2. Recombinant virus v16HbF/p17-24
3. Tiantan vaccinia virus(TVV)

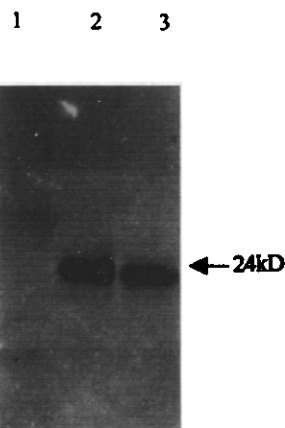


图 2 重组痘苗病毒 v16H1FP/p24 的早晚期表达

Fig.2 Early and late expression of the recombinant vaccinia virus v16H1FP/p24

1. Tiantan vaccinia virus(TVV)
2. Recombinant virus v16H1FP/p24
3. Recombinant virus v16HbF/p17-24 + AraC

2.4 重组病毒表达 p24、p17-24 蛋白的自我装配

重组痘苗病毒感染 BHK21 细胞后,电镜下可见表达的 p24, p17-24 蛋白均可形成反转录病毒样不成熟的病毒样粒子(图 3)。病毒样粒子直径约 100~120nm,粒子的中央为电子透射区,周围电子密度较大。细胞膜外的病毒样粒子的外层可见来源于宿主细胞的脂质双层质膜,细胞浆内的病毒样粒

子则没有囊膜,病毒样粒子中央没有慢病毒特有的核心结构。但实验中发现,单独的 Gag p24 形成的 VLP 的数量较少。

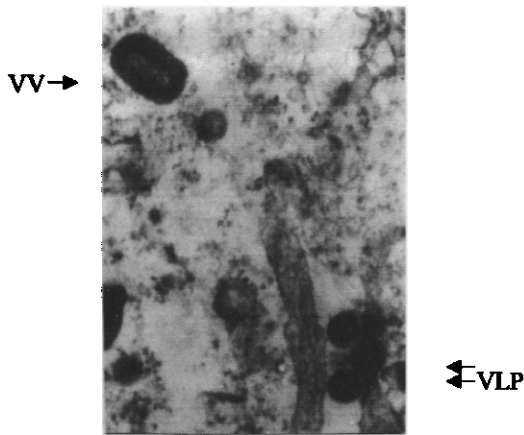


图3 重组痘苗病毒表达蛋白自我装配成病毒样粒子

Fig.3 Virus-like particles(VLP) assembled by the expressed recombinant proteins

→Vaccinia virus(VV) ⇐Virus-like particles(VLP)

2.5 Gag p24、17-24 重组痘苗病毒的抗原性

ELISA 测定结果表明,重组痘苗病毒接种后 6 周时小鼠血清中 HIV-1 Gag p24 抗体的效价达 1:200(表 1)。

表 1 重组病毒诱导小鼠血清中抗 HIV-1 Gag p24 抗体检测

Table 1 Detection of the Gag p24 antibodies in mice serum

	N	OD ₄₉₀ (X ± SD)		
		1:100	1:200	1:400
v16HIFP/p24	8	0.234 ± 0.053	0.124 ± 0.043	0.08 ± 0.038
v16HbF/p17-24	8	0.251 ± 0.110	0.136 ± 0.078	0.09 ± 0.041
TVV	6	0.025 ± 0.005	0.020 ± 0.006	0.01 ± 0.008
Positive*	3	0.521 ± 0.031	0.346 ± 0.015	0.28 ± 0.007
Negative	6	0.002 ± 0.001	0.001 ± 0.000	0.00 ± 0.000

* : Anti-p24 McAb

2.6 重组痘苗病毒对 BHK21、Wish 细胞 DNA 的损伤作用

重组病毒感染 BHK21 细胞 20h 后,琼脂糖电泳可见染色体断裂形成的 DNA“梯子”电泳图(图 4)。

3 讨论

免疫酶试验和 Western blot 检验结果表明,本实验构建的两株重组病毒分别表达了 HIV-1 p24, HIV-1 p17-24 蛋白,但表达量不高。虽然重组病毒在不同细胞中显示出不同的病变速度,但 Western

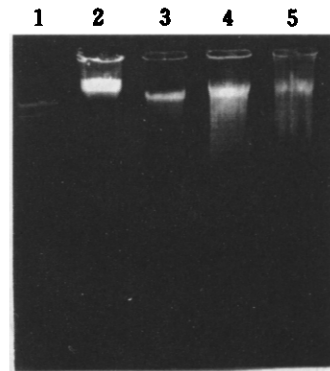


图 4 重组痘苗病毒对 BHK21 细胞 DNA 的损伤

Fig.4 DNA damage of BHK21 cells caused by recombinant virus

1. ADNA(EcoRI/HindIII); 2. 0.5MOI; 3. 1.0MOI; 4. 5.0MOI; 5. 10.0MOI

blot 结果显示其表达量差异不明显。已进行的早、晚期表达实验结果类似。造成上述结果的原因,推测有可能是载体的荧光蛋白报告基因组的影响,或者融合 His·Tag 的影响,也有可能因未使用真核基因自身的 ATG (v16HIRP/p24) 所致。此外,Western blot 仅定性反映目的蛋白的存在,在表达水平较低时,其结果也有可能反映不出原有的差异。实验中还发现, p17 抗体与 p24 抗体对目的蛋白显示出不同的敏感性,说明抗体效价及识别特异性方面的差异也有可能对结果产生一定影响。

实验证明 Gag 前体蛋白 pr55^{gag} 及 p17-p24^{gag} 与其它外源基因共表达形成的嵌合蛋白均具有自我装配能力,可以形成病毒样粒子(VLP)并从细胞膜出芽释放。抗原颗粒化后,空间结构得到恢复,免疫原性增强。因此,大多数学者认为,以 Gag 蛋白为基础,将 HIV 的其它中和性抗原决定簇基因与 gag 基因嵌合表达产生颗粒化抗原将是发展艾滋病疫苗的良好途径。Gheysen^[8] 等认为, Gag 前体蛋白的 N-端为病毒装配所必须,否则将影响病毒粒子的装配。本实验中发现,缺失大部分 gag p17 基因的 Gag p24 蛋白仍具有一定的自我装配能力,可以形成 VLP,只是形成的 VLP 的数量较少。p17-24^{gag} 则完全具有自我装配能力。Weber^[9] 等发现, p17 133 个氨基酸(占 p17 的 25%)和 p24 177 个氨基酸(占 p24 的 79%)形成的 p24-VLP 同样可诱导产生高滴度的抗 p24 抗体及 T 辅助细胞反应,说明去掉 HIV-1 Gag p6、p9,将不会影响蛋白的包装能力和 Gag 蛋白的免疫原性,这与本实验的结果基本相同。

细胞凋亡生化方面的典型特征则是 DNA 断裂

成寡核小体大小的片段,在 DNA 电泳上可见到典型的“梯子”(DNA Ladder)形状。本实验中,将不同数量的重组病毒感染 BHK21 细胞后,病变细胞染

色体 DNA 形成典型的断裂 DNA“梯子”。说明重组病毒可能诱导宿主细胞发生了凋亡。详细的研究正在进行。

参 考 文 献

- [1] Dolin R. *J Infect Dis* ,1995 ,**172** :1175~1183
- [2] Hilleman M R. *Vaccine* ,1995 ,**13** (8) :1733~1739
- [3] Meeting report. *Vaccine* ,1996 ,**14** (17/18) :1712~1717
- [4] Fast P E ,Walker M C. *AIDS* ,1993 ,**7** (suppl 1) :s147~59
- [5] Nixon D F ,Townsend A R M ,Elvin J G *et al.* *Nature* ,1998 ,**336** :484~487
- [6] Tohnson R P ,Trocha A ,Yang L *et al.* *J Immunology* ,1991 ,**147** :1512~1521
- [7] 金宁一 ,志田寿利 . *病毒学报* ,1994 ,**10** (4) :5~13
- [8] Gheysen D ,Jacobs E ,Foresta F D *et al.* *Cell* ,1989 ,**59** (8) :103~112
- [9] Weber J ,Popov R C ,Callow D *et al.* *Vaccine* ,1995 ,**13** :831~834

Expression and Characterization of HIV-1 Gag p17-p24 Protein

LI Ti-yuan² JIN Ning-yi¹ WANG Hong-wei¹ GUO Zhi-ru¹ FANG Hou-hua¹ AN Ru-guo² YIN Zhen¹

¹(Changchun University of Agriculture and Animal Sciences ,Changchun 130062)

²(Norman Bethune University of Medical Sciences ,Changchun 130021)

Abstract The biological and immunological characteristics of HIV-1 core protein p17-24 expressed by recombinant vaccinia viruses were studied. The results of indirect immunofluorescence assay(I-IFA) ,Western blot and dot ELISA showed that the two recombinants could express the p24 gag and p17-24 gag fusion proteins in infected cell lines respectively. The electromicroscope observation revealed that the expressed proteins could also assemble into virus-like particles. The recombinant vaccinia viruses can also stimulate mice for the formation of anti HIV-1 Gag p24 antibody. When infected with the recombinant viruses ,the chromosome DNA ladder caused by the apoptosis of the BHK cell was observed.

Key words HIV-1 ,Gag ,vaccinia virus