

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 21720091152135

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

人类免疫缺陷病毒重组包膜蛋白 gp140 的表 达纯化及活性鉴定

**Expression, Purification and Activity Identification of
Human Immunodeficiency Virus Recombinant Envelope
Protein gp140**

刘彦宁

指导教师姓名: 葛胜祥 助理教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2012 年 5 月

论文答辩日期: 2012 年 6 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: 赵勤俭 教授

评 阅 人: 孙 慧 教授

郑英杰 副教授

2012 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()
课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室
的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课
题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

艾滋病（AIDS）自 1981 年被发现以来，便在世界范围内迅速蔓延，越来越多的人被人类免疫缺陷病毒（HIV）感染，人类健康和社会都受到了极大的危害。对 HIV 的有效控制、预防及治疗是人类迫切想要解决的问题。HIV 的包膜蛋白含有 HIV 最重要的抗原成分，同时也是其构成成分中最容易变异的组分，对于 HIV 诊断试剂、中和抗体和疫苗的研究都至关重要，长期以来一直是 HIV 的研究热点。然而 HIV 包膜蛋白的糖基化程度很高，且很难分泌表达，这些都不利于蛋白的获取，对其结构和功能的研究工作造成了阻碍。

本研究通过对 HIV 包膜糖蛋白 gp160 进行基因改造，获得了能够分泌表达且带有 His-tag 的稳定的可溶性 HIV 包膜糖蛋白 gp140。该蛋白去掉了 gp41 的跨膜结构域和胞内结构域，对 gp120 末端的蛋白酶水解位点进行定点突变，用哺乳动物细胞表达中常用的 tPA 信号肽代替 gp160 自身的信号肽，并在目的蛋白末端加入了纯化标签 His-tag，我们将其命名为 gp140b2-his。

由于 HIV 包膜蛋白 gp140 对糖基化修饰水平要求很高，一般的外源蛋白表达系统难以胜任。本研究选用哺乳动物细胞 HEK293-6E 成功地分泌表达出糖基化完全的 gp140b2-his，并对其瞬时表达条件进行优化，采用真核表达载体 pTT5，换用廉价的无血清培养基，以及使用改良的转染方法，使得 gp140b2-his 产量提高且杂蛋白含量少。

经过粗纯、镍离子金属螯合亲和层析以及阴离子作用层析纯化，获得了纯度高达 85% 以上且反应性较好的 gp140 蛋白，为后续对 HIV 包膜蛋白分子结构与功能的研究提供了一定的信息，且有利于 HIV 诊断试剂的提高及中和抗体和疫苗的研究。

关键词： gp140； HEK293-6E； 瞬时表达

Abstract

Since identified in 1981, AIDS is spreading all over the world. More people than ever are living with HIV, which causes serious damage to people's health and society. Effective methods on control, defence and therapy to HIV are what people want imminently. The most important epitopes of HIV are in HIV envelope glycoproteins, which mutate with high frequency. As a hot spot of HIV, HIV envelope glycoproteins are very significant to the study on HIV diagnostic reagent, antibody and vaccine. However, HIV envelope glycoproteins are highly glycosylated and difficult to secretion expression. Efforts to understand the molecular basis of HIV envelope glycoprotein function have been hampered by the inability to generate sufficient quantities of homogeneous material.

In this study, we have produced stable, soluble, secreted HIV envelope ectodomain protein gp140 with His-tag by gene reformation of gp160. The protein named gp140b2-his is a gp160 ectodomain lacking gp41 transmembrane and cytoplasmic segments. Site-directed mutations are introduced in gp140b2-his to eliminate the gp120 cleavage site. A tPA leader sequence, which replacing the leader sequence of gp160, and His-tag are also introduced to gp140b2-his.

As HIV envelope glycoprotein gp140 is heavily glycosylated, most recombinant expression systems can not express it well. We choose mammalian cells HEK293-6E as the expression cells, which have successfully produced heavily glycosylated protein gp140b2-his. After the optimization of HEK293-6E transient expression by making the construct of gp140b2-his in pTT5, using cheap medium and improved transfection method, the high-quality protein gp140b2-his is produced at a higher expression level.

Protein gp140b2-his yields after purification by heat, Ni²⁺ affinity chromatography and ion exchange chromatography has reached the purity of more than 85% and reacted with HIV positive serum well, offering some useful information for the understand of the molecular structure and function of HIV envelope

glycoproteins, and is advantageous to the study on HIV diagnostic reagent, antibody and vaccine .

Key words: gp140; HEK293-6E; transient gene expression

厦门大学博硕士学位论文摘要库

缩略词

缩写	英文全称	中文名称
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome	获得性免疫缺陷综合征
bp	base pair	碱基对
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
cAb	Chimeric antibody	嵌合抗体
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
CHO-S	Chinese hamster ovary suspension cells	中国仓鼠卵巢癌细胞(悬浮)
CMV	Cytomegalovirus	巨细胞病毒
CTL	Cytolytic T lymphocyte	细胞毒性 T 淋巴细胞
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲亚砜
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay	酶联免疫吸附试验
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FDA	Food and drug administration	美国食品药品监督管理局
GAH	Goat anti human	山羊抗人
GFP	Green fluorescence protein	绿色荧光蛋白
HA	hemagglutinin	血凝素
HEK293	Human embryo kidney cells 293	293 人胚肾细胞
HIV	Human immunodeficiency virus	人类免疫缺陷病毒
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
H & T	Hypoxanthine & Thymidine	次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷
Ig	Immunoglobulin	免疫球蛋白
kD	kilo Daltons	千道尔顿
LTR	Long terminal repeat	长末端重复序列
MHC	major histocompatibility complex	组织相容性复合体
MPER	membrane proximal external region	近膜胞外区
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA

缩略词

MW	Molecular Weight	分子量
nt	Nucleotide	核苷
Ori	Origin	复制起始位点
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PEI	Polyethylenimine	聚乙烯亚胺
PH	Hydrogen ion concentration	氢离子浓度指数
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
SFM	Serum Free Medium	无血清培养基
SIV	Simian immunodeficiency virus	猿免疫缺陷病毒
TGE	Transient Gene Expression	瞬时基因表达
tPA	Tissue Plasminogen Activator	组织型纤溶酶原激活剂
VCD	Viable cell density	活细胞密度
VLP	Virus-like particle	病毒样颗粒
WB	Western blotting	免疫印迹实验
WHO	World health organization	世界卫生组织

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	II
缩略词.....	IV
第一章 前言	1
1 人类免疫缺陷病毒	1
1.1 HIV概况	1
1.2 HIV的分子生物学特性	3
1.3 HIV的生活周期	6
2 HIV包膜糖蛋白	9
2.1 gp120.....	9
2.2 gp41.....	11
2.3 gp140.....	12
3 HIV感染的检测	13
3.1 HIV感染的检测方法	13
3.2 HIV抗体的检测	14
4 HIV疫苗的研究进展	17
5 HIV包膜蛋白的表达系统	19
5.1 大肠杆菌表达系统.....	20
5.2 酵母表达系统.....	21
5.3 昆虫杆状病毒表达系统.....	21

5.4 植物表达系统.....	22
5.5 哺乳动物细胞表达系统.....	22
6 本研究的目的意义	26
第二章 材料与方法	28
1 材料	28
1.1 主要仪器.....	28
1.2 主要试剂与材料.....	29
1.3 常用溶液及培养基配置.....	31
2 方法	33
2.1 分子克隆常规操作.....	33
2.2 细胞实验常规操作.....	37
2.3 蛋白活性检测与纯化方法.....	38
第三章 结果与分析	42
1 gp140 的构建、表达及初步活性鉴定	42
1.1 gp140 的克隆构建及改造.....	42
1.2 gp140 的瞬时表达.....	44
1.3 蛋白gp140b2 的初步活性鉴定.....	46
2 gp140b2 表达水平的提高	49
2.1 gp140b2 真核表达载体的更换及His-tag的添加.....	49
2.2 HEK293-6E细胞瞬时表达的优化.....	52
3 gp140b2-his的纯化及活性鉴定.....	56
3.1 gp140b2-his的纯化.....	56

3.2 纯化后gp140b2-his的活性鉴定.....	60
第四章 讨论	63
1 gp140 的构建	63
1.1 gp140 的改造.....	63
1.2 其它亚型gp140 的表达.....	64
2 gp140 的表达系统及其优化	64
3 gp140 的纯化	66
第五章 小结与展望	69
参考文献	70
致谢.....	77

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Abbreviations	IV
Chapter 1 Introduction	1
1 HIV	1
1.1 The survey of HIV	1
1.2 The biological properties of HIV	3
1.3 The life cycle of HIV	6
2 HIV envelope glycoprotein	9
2.1 gp120.....	9
2.2 gp41.....	11
2.3 gp140.....	12
3 The detection of HIV	13
3.1 Detection methods of HIV	13
3.2 The detection of HIV antibody	14
4 The research of HIV vaccine	17
5 The expression system of HIV envelope protein	19
5.1 The <i>E.coli</i> expression system.....	20
5.2 The Yeast expression system.....	21
5.3 Baculovirus-insect cell expression system.....	21

5.4 Plant expression system	22
5.5 Mammalian cell expression system	22
6 The purpose and meaning of this research.....	26
Chapter 2 Materials and Methods	28
1 Materials	28
1.1 Instrument	28
1.2 Reagent and materials.....	29
1.3 Solvents and medium.....	31
2 Methods.....	33
2.1 Molecular cloning	33
2.2 Cell experiment.....	37
2.3 Protein identification and purification	38
Chapter 3 Results and Analysis	42
1 Construction, expression and preliminary identification of gp140.....	42
1.1 Construction and reformation of gp140.....	42
1.2 Transient expression of gp140	44
1.3 Preliminary identification of gp140b2	46
2 Improvement of the expression level of gp140b2.....	49
2.1 The replacement of the vector and introduction of His-tag in gp140b2	49
2.2 The optimization of transient expression in HEK293-6E cells.....	52
3 Purification and identification of gp140b2-his.....	56
3.1 Purification of gp140b2-his	56

3.2 Identification of purified gp140b2-his	60
Chapter 4 Discussion	63
1 Construction of gp140.....	63
1.1 Reformation of gp140	63
1.2 Expression of gp140 of other HIV subtypes	64
2 Improvement of the expression system of gp140	64
3 Purification of gp140.....	66
Chapter 5 Brief summary and prospect	69
References	70
Acknowledgement	77

第一章 前言

1 人类免疫缺陷病毒

1.1 HIV 概况

人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus,HIV),属于逆转录病毒科(Retroviridae)、慢病毒属(Lentivirus)^[1],HIV的感染会导致一种严重威胁人类生命健康的慢性传染病,即艾滋病,全称获得性免疫缺陷综合征(Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS)。首例 AIDS 是在 1981 年由美国疾病控制中心确定发现的^[2],其显著特征为感染者全身免疫系统被严重损害,且终生携带 HIV 病毒。AIDS 自发现以来,便迅速在世界范围内蔓延,成为有史以来最具破坏性的传染病之一,目前仍然缺乏有效的治愈方式。

1.1.1 HIV 的分类

根据血清学反应和病毒核酸序列的测定,HIV-1 和 HIV-2 为 HIV 主要的两个型,两者核苷酸序列的同源性只有 45%^[3],而 HIV-2 与 SIV 的同源性却较高(图 1.1),SIV 即猿免疫缺陷病毒(Simian Immunodeficiency Virus),也属于逆转录病毒科慢病毒属,能在恒河猴中引起与 AIDS 类似的病症。HIV-1 在全球范围内流行,感染力较强,是 AIDS 的主要病原体,因而也是目前研究的重点对象;而 HIV-2 只在少数几个西非国家流行,且致病能力较弱^[4]。根据 1999 年 9 月发表的《HIV-1 的命名建议》,HIV-1 可分为组(group)、亚型(subtype)、亚亚型(sub-subtype)和流行重组型(circulating recombinant form, CRF)四个分类单位。按照编码包膜蛋白的 env 基因和编码壳蛋白的 gag 基因序列的同源性,HIV-1 可进一步分为 3 个组,M 组(main,主要组)、O 组(outline,外围组)及 N 组(non-M-non-O group)^[5]。组间基因离散率为 30-50%,其中 M 组的病毒对人类生命健康造成的威胁最大,且在全世界范围内广泛流行。按照 env 区的序列,M 组又可分为 A~D、F~H、J、K 9 种亚型(subtypes)^[6],以及 CRF01-CRF16 共 16 种流行重组型(CRFs)^[7],M 组亚型间的基因离散率为 20-30%。

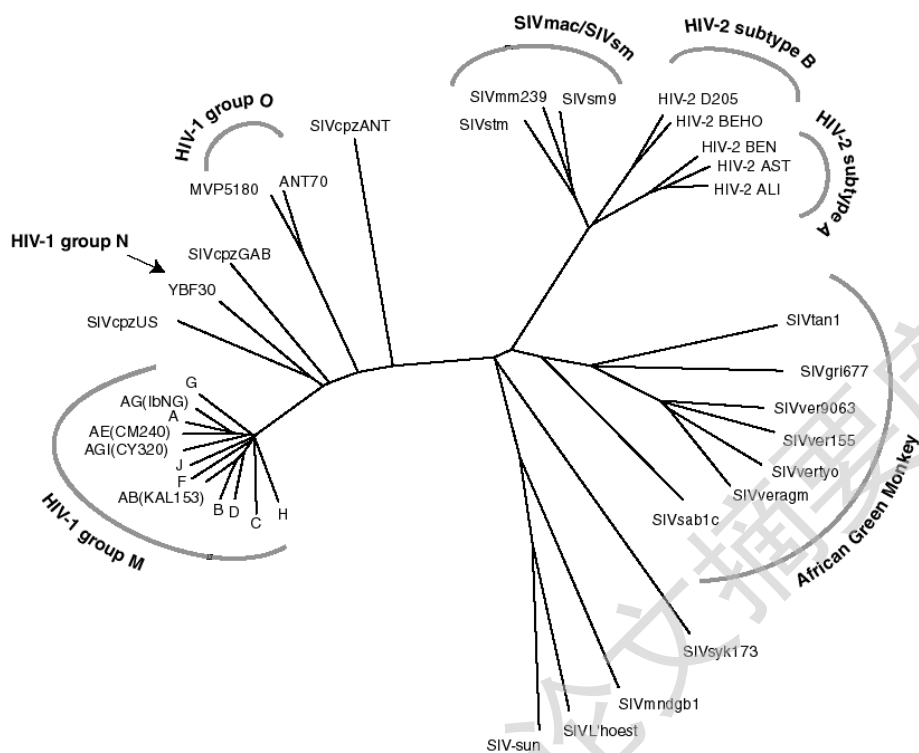


图 1.1 灵长类动物慢病毒进化树

Fig.1.1 Phylogenetic tree of the primate lentiviruses

图片来源: HIV sequence database

1.1.2 HIV 的流行

HIV 一般是以病毒颗粒或携带病毒的细胞的形式存在于感染者的体液中,主要通过性接触、母婴途径及公用注射器静脉注射等方式^[8]在全球范围内广泛传播(图 1.2)。目前全球 AIDS 流行最为严重的地区是撒哈拉南部非洲,约有 67% 的 HIV 感染者生活在这一地区。最近联合国艾滋病规划署发布的《2011 年世界艾滋病日报告》显示,从 1990 年至 2010 年, HIV 感染者人数持续增长(图 1.3),截至 2010 年底,全球约有 3400 万 HIV 感染者,该年新增 HIV 感染者 270 万人,有 180 万人因 AIDS 而死亡, HIV 在成年人中的流行率在 0.8% 左右,其中中国的 HIV 流行率在全球处于较低水平,但我国 HIV 感染者的绝对人数已经近 80 万人,居亚洲第二位,仅次于印度。

AIDS 在全球范围内的迅速蔓延,给人类生活和社会经济都带来了巨大的灾难,大量针对 AIDS 的研究工作都在全面开展中,但由于 HIV 的感染机制复杂、膜蛋白结构复杂且高度糖基化以及其自身的高度变异性,目前还没有找到有效防御和根治 HIV 感染的办法,结合历来有效控制传染病的经验,研制 HIV 诊断试

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库