

学校编码: 10384
学号: 21620071151997

分类号____密级____
UDC____

HIV-1 包膜蛋白在昆虫细胞中的表达、纯化及其活性分析

夏德镇

指导教师 张军 教授

厦门大学

厦门大学

硕士学位论文

HIV-1 包膜蛋白在昆虫细胞中的表达、纯化及其活性分析

Expression, Purification and Analysis of HIV-1 Envelope Glycoprotein gp160 in Insect Cells

夏德镇

指导教师姓名: 张 军 教授
专业名称: 细胞生物学
论文提交日期: 2010 年 06 月
论文答辩时间: 2010 年 07 月
学位授予日期: 2010 年

答辩委员会主席: 史维国

评 阅 人: 朱关福

2010 年 06 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

HIV 的全球传播和不断变异,对公共卫生形成极大危害。在目前尚无疫苗用于预防 HIV 感染的情况下,及时正确的诊断 HIV 感染是减少 HIV 传播和控制 AIDS 扩散的主要途径之一,因此 HIV 检测试剂是 HIV 防治的重要利器。目前 HIV 筛查试验所用的 ELISA 试剂已发展到第四代,这为控制 HIV 的传播作出了重大贡献。而基于 HIV 不同抗原组分的分离以及浓缩和纯化,能够检测针对不同抗原成分的抗体的确认试验,特异性更高。世界各国对 HIV 确认试验结果的判定标准不完全相同,但是一般都要求出现至少一条 env 带。但目前在抗体确认试剂中,由于大多采用的是来自细胞培养纯化的病毒抗原,因带有宿主细胞的成分而导致非特性反应,因而高纯度和活性的重组 HIV 包膜蛋白的获得,是开发 HIV 感染确认试剂的关键。目前国外主要是利用 CHO 系统进行 HIV 包膜蛋白的生产,但因表达量极低,且纯化困难,市面销售的 HIV 包膜蛋白数量不多且价格昂贵。

HIV 感染者体内产生的抗体主要针对包膜糖蛋白前体及其后期加工产物——表面膜蛋白(gp120)和跨膜蛋白(gp41),这两种抗原是 HIV 抗体诊断试剂和 HIV 感染确诊试剂的重要组成成分。本论文研究利用昆虫细胞-杆状病毒表达系统,表达了在亚洲流行的 HIV-1 B 亚型 pNL4-3 病毒株的 gp160,意在为 HIV 抗体诊断试剂的开发和 HIV 中和抗体的研究提供抗原。

本研究首先构建了含 HIV-1 gp160 基因的重组杆状病毒,在小量表达中检测到目的蛋白的表达,之后利用大规模生物反应器进行 gp160 的表达。在纯化过程中,我们发现 gp160 主要以非溶解状态存在于细胞裂解沉淀中,利用表面活性剂 Triton-100 将部分 gp160 溶解之后,通过凝集素亲和色谱和阴离子交换色谱,获得了纯度和活性较高的 gp160,在与 HIV 血清检测盘中血清反应中显示了良好的反应性和特异性,能够用于 HIV 抗体诊断试剂的开发和其他研究。同时,我们构建了含多种 HIV 亚型包膜蛋白基因的重组杆状病毒,进行初步的表达和检测分析,我们发现,不同亚型的 HIV 包膜蛋白的反应性有较大差异。此外,为了探索膜蛋白在昆虫细胞中的分泌表达,我们构建了多个含有多种分泌信号肽的杆状病毒转移载体,虽然在利用这些载体进行 gp160 的表达实验中没有取得成功,

但是这些载体将为杆状病毒-昆虫细胞表达系统的蛋白表达，特别是膜蛋白的表达提供多种选择。

目前国内鲜有利用昆虫细胞进行 gp160 的表达研究报道，我们利用这一系统成功的实现了 gp160 的表达，并纯化获得了较高纯度的目的蛋白，在 HIV 诊断试剂开发试验中显示了良好的应用前景，也为 HIV 包膜蛋白的其他研究提供了原料基础。

关键词：人免疫缺陷病毒（HIV），包膜蛋白（env），杆状病毒表达系统

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Global dissemination of the HIV and its rapid evolution are great challenges to public health. To control the dissemination and infection of the HIV, we can increase our efforts to diagnose the HIV infection immediately. An effective HIV diagnostic reagent will markedly decrease the risk of spreading HIV. The ELISA reagents for HIV screening are now developing to the fourth-generation. These reagents have made a big contribution in the prevention of HIV. The HIV confirmatory assay reagents are based on separated antigenic components of HIV can react with particular antibodies in serum and have a higher specificity. Although there are different standards for HIV confirmatory assay, the env protein is the essential antigenic component for each. Consequently, an env protein with high purity and activity is the most important antigenic component for the reagents. However, due to the difficulties of expression and purification, the env is hard to obtain.

Most antibodies in HIV sufferers are target to envelope glycoproteins (gp160, gp120, gp41). Envelope glycoproteins are important components of diagnosis kits for detecting HIV antibodies and RIBA. We expressed the envelope glycoprotein of pNL4-3 (HIV-1, B subtype) by baculovirus expression vector system, and it was confirmed to be a good candidate antigen for the development of diagnosis kits for detecting HIV antibodies, as well as a good candidate for the research of neutralizing antibodies.

In this study, we used a bioreactor to culture insect cells and produce gp160. The protein is purified by Lentil Lectin Sepharose 4B and DEAE. Purified gp160 showing high activity and specificity when tested with a panel of human sera, can then be used in immunodetection assay, as a vaccine candidate, and for other relative research of HIV. Also, we expressed gp160 of different subtypes of HIV in insect cell to find their diversities in expression level and immunogenicity. Finally, in order to secrete the proteins expressed in insect cells, especially those for membrane proteins, we constructed seven recombinant donor plasmids containing seven kinds of secreting

Abstract

signal peptides. These will constantly advance the membrane proteins expression in insect cells.

There are seldom civil reports about gp160 expression. We collected high purity and activity gp160 via BEVS. They demonstrate great application potential in the development of HIV confirmatory assay reagents and other research regarding the HIV env protein.

Key words: HIV; envelope glycoproteins; Baculovirus expression vector system

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

摘 要	I
Abstract	III
ABBREVIATION (缩略词)	IX
第一章 前言	1
一 昆虫细胞杆状病毒表达载体系统	1
1 杆状病毒的分子生物学	1
2 昆虫细胞-杆状病毒表达载体系统	7
3 杆状病毒表达系统应用	13
二 人类免疫缺陷病毒及其包膜蛋白研究进展	17
1 HIV 流行及分类	17
2 HIV 的分子生物学特征	19
2 HIV 感染的检测	22
4 HIV 包膜糖蛋白的研究进展	27
5 HIV 的疫苗研究	33
6 本研究思路、目的、意义	33
第二章 材料与amp;方法	35
一 材料	35
1 主要仪器	35
2 主要试剂和材料	36
3 常用溶液及培养基配制	37
二 方法	41
1 基因克隆的构建	41
2 昆虫细胞培养和重组杆状病毒的生产	44
3 凝集素亲和层析	45
4 离子交换层析	45
5 蛋白活性检测	45

目录

6 计算机辅助设计与分析	46
第三章 结果与分析	47
1 重组杆状病毒 BV-gp160、BV-gp140、BV-gp120 的构建与生产.....	47
2 不同细胞株表达 gp160 比较	51
3 不同亚型 gp160 的表达.....	52
4 gp160 在昆虫细胞中分泌表达探索.....	53
5 重组蛋白在悬浮 Sf-21 细胞中的小量表达实验.....	55
6 利用生物反应器进行目的蛋白的表达.....	57
7 gp160 的纯化.....	57
8 gp160 的活性分析.....	61
第四章 讨论.....	63
1 HIV 包膜蛋白在昆虫细胞中的表达	63
2 昆虫细胞分泌表达探索	63
3 昆虫细胞大规模发酵培养	64
4 gp160 的纯化.....	64
5 gp160 活性分析	65
小结与展望.....	66
参 考 文 献	67
致 谢	67

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
ABBREVIATION	IX
Preface	1
1 The insect cell-baculovirus expression vector system	1
1 Biological characteristic of baculovirus	1
2 The baculovirus expression vector system	7
3 The application of baculovirus expression vector system	13
2 Progress of HIV and its env protein	17
1 The classification and prevalence of HIV	17
2 Biological characteristic of HIV	22
3 The diagnosis of HIV infection	27
4 Progress of HIV env proteins	27
5 The development of HIV vaccine	33
6 The thinking, purposes and meanings of this dissertation	33
Materials and methods	35
1 Materials	35
2 Methods	41
Results and analysis	47
1 Production of BV-gp160、BV-gp140、BV-gp120	47
2 gp160 expressed in diferent cell lines	51
3 diferent subtypes gp160 expressed in Sf21	52
4 gp160 expressed in Sf21 with secreting signal peptides	53
5 gp160 expressed in suspension cultured Sf21	55
6 gp160 expressed in bioractor	57
7 Purification of gp160	57

Contents

8 Activity analysis of gp160	61
Discussion	63
Brief summary and prospect	66
Reference	67
Acknowledgement.....	67

厦门大学博硕士学位论文摘要库

缩略词

缩略词

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
°C	degree celsius	摄氏度
μg	microgram	微克
aa	amino acid	氨基酸
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> MNPV	苜蓿银纹夜蛾多衣壳型核型多角体病毒
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome	获得性免疫缺陷综合症
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
Ap	Alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
Bac-to-Bac	Bacterium to Baculovirus	大肠杆菌-昆虫细胞穿梭载体系统
Bacmid	Baculovirus plasmid	杆状病毒质粒
BEVS	Baculovirus expression vector system	杆状病毒表达载体系统
BmSNPV	<i>Bombyx mori</i> SNPV	家蚕单衣壳型核形多角体病毒
BV	Budded virus	出芽型病毒
bp	base pair	碱基对
BSA	bovine serum albumin	牛血清蛋白
CD4	cluster of differentiation 4	
CpGV	<i>Cydia pomonella</i> granulovirus	苹果小蠹蛾颗粒体病毒
CO ₂	carbon dioxide	二氧化碳
Da	Dalton	道尔顿
DNA	Deoxyribonucleic Acid	脱氧核糖核酸
DO	Dissolved Oxygen	溶解氧
Env	Envelope protein	包膜蛋白
Glu	glucose	葡萄糖
g	gravity	重力速度
h	hour	小时
HIV	Human immunodeficiency virus	人免疫缺陷病毒
hr	homologous region	同源区域

缩略词

h.P.I.	hour post infection	感染后小时
Kan	Kanamycin	卡那霉素
kb	kilo base pair	千碱基对
kD	kilo Daltons	千道尔顿
L	Litre	升
lacZ		β -半乳糖苷酶
M	Mol/L	摩尔/升
min	minute	分钟
mL	millilitre	毫升
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
MW	Molecular Weight	分子量
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
rpm	revolutions per minute	每分钟转速
RT	reverse transcriptase	反转录酶
s	second	秒
SIV	Simian immunodeficiency virus	猴免疫缺陷病毒
SU	surface glycoprotein	表面膜蛋白
TM	transmembrane glycoprotein	跨膜蛋白
UNAIDS	the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS	联合国艾滋病规划署
WB	Western Blotting	蛋白印迹实验
WHO	World Health Organisation	世界卫生组织

第一章 前言

1 昆虫细胞杆状病毒表达载体系统

1.1 杆状病毒的分子生物学

1.1.1 杆状病毒及其分类

杆状病毒(Baculoviruses)因其所有成员的病毒体呈杆状而得名,是一类在自然界中仅感染节肢动物的病毒。目前已记述的杆状病毒除少数从蛛形纲和甲壳纲分离外,绝大多数都来源于昆虫纲,迄今已报道有 600 种以上的昆虫被杆状病毒所感染,包括鳞翅目,膜翅目,双翅目,鞘翅目与毛翅目等 7 个目^[1]。

在分类学上,根据国际病毒分类委员会(ICTV)第 6 次报告,杆状病毒科(Baculovirinae)分为核形多角体病毒属(Nucleopolyhedrovirus, NPV)和颗粒体病毒属(Granulovirus, GV)。这两者的差异主要在于 NPV 的特征是外围蛋白质晶体结构呈多角体样形状,称为多角体(polyhedra),GV 的特征是可形成圆形或近似圆形的外围蛋白质晶体结构,称为颗粒体(ganules),颗粒体内部一般只包裹 1-2 个成熟的杆状病毒粒子,多角体内部则可包裹多个杆状病毒粒子。GV 的代表种为苹果小蠹蛾颗粒体病毒(CpGV),NPV 的代表种为苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)。

历史上,核形多角体病毒根据多角体内包裹的成熟杆状病毒粒子内所含有的核衣壳数量的不同,又可分为多衣壳型核形多角体病毒(MNPV)和单衣壳型核形多角体病毒(SNPV),前者的代表种为苜蓿银纹夜蛾多衣壳型核型多角体病毒(AcMNPV),后者的代表种为家蚕(*Bombyx mori*)单衣壳型核形多角体病毒(BmSNPV)。当前分子进化研究将 NPV 划分为组 I 和组 II 两个种群,组 I NPV 包括 AcMNPV、BmNPV、黄杉毒蛾核多角体病毒(OpMNPV)等;组 II NPV 包括棉铃虫核多角体病毒(*Helioverpa armigeras*NPV, HaSNPV)、舞毒蛾核多角体病毒(LmantriadisparMNPV, LdMNPV)、甜菜夜蛾核多角体病毒(*Spodoptera exigua*MNPV, SeMNPV)等。外膜蛋白组成的差异是区分 NPV 两大种群的重要标志^[2]。

1.1.2 杆状病毒的宿主范围及生活史

杆状病毒在自然界中的宿主限于虾、蛾、蝴蝶等无脊椎动物，主要是昆虫。杆状病毒是无脊椎动物一种重要的致病原，长期以来杆状病毒广泛应用于针对有害昆虫如棉铃虫、甜菜夜蛾、粉纹夜蛾等的生物杀虫剂的研究^[3,4]。

不同种类的杆状病毒有不同的宿主范围，决定杆状病毒宿主范围的因素来自于多个方面，包括复制调控相关因子的种属或组织特异性、宿主昆虫对病毒感染的抵抗能力等^[5,6]。研究中常用的 AcMNPV 和 BmSNPV 基因组具有很高的同源性，但二者却有不同宿主范围。目前，在杆状病毒基因组上已鉴定出几个与宿主范围决定相关的基因，如 HRF-1 (Host range factor-1)、HCF-1 (Host cell specific factor-1)、p143、p35 等，改变或转移这些基因可能使杆状病毒的宿主范围发生改变^[7-13]。

杆状病毒的复制是一个复杂的过程，其显著特点是存在两个独特的时期，又称双向生活循环 (biphasic life cycle)，产生两种表型的病毒。在感染的早期，杆状病毒核衣壳在细胞核内装配，通过细胞质膜出芽获得囊膜，这种病毒粒子称为细胞释放型病毒 (cell-released virus, CRV) 或者出芽型病毒 (budded virus, BV)，在昆虫体内借继发感染使病毒从一个细胞扩展到其他许多组织细胞。在感染的后期，BV 的释放量急剧减少，核内的核衣壳被封入核内新装配的囊膜内，并被包埋进多角体蛋白的结晶基质，逐渐形成多角体。多角体内的病毒粒子称为多角体衍生病毒粒子 (polyhedron-derived virus, PDV) 或者包埋型病毒 (occluded virus, OV)。当昆虫宿主死亡或者细胞解体时，多角体释放到周围环境中，多角体在体外很稳定，但是一旦被昆虫食入，在昆虫中肠高 pH 环境中迅速溶解，释放出包埋在内的病毒粒子，这些病毒能感染中肠上皮细胞，进而引发虫体的感染^[14]。这两类病毒对不同的组织具有不同的感染能力，ODV 在中肠中感染中肠上皮细胞的效率是 BV 的 2500 倍，而 BV 感染体外培养的细胞的效率是 ODV 的 1700 倍^[15]。杆状病毒的生活史见图 1。

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.

廈門大學博碩