



## EIAV 强毒株和疫苗株 gp45 的纯化及结晶比较

王建新<sup>1</sup>, 王 敏<sup>1</sup>, 刘新奇<sup>2</sup>

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 南开大学生命科学学院, 天津 300071)

**摘要:** EIAV (equine infectious anemia virus) 疫苗是世界唯一成功的慢病毒疫苗. 通过对强毒株和疫苗株 EIAV 相关蛋白结构的比较研究, 可以促进对其致弱过程及免疫机制的了解. gp45 (glycoprotein 45) 是 EIAV 介导与宿主膜融合过程的关键蛋白. 以 EIAV 强毒株 LN40 和疫苗株 FDDV13 为研究对象, 对 gp45 核心结构域进行了克隆、表达, 并对纯化和晶体生长进行了比较, 为进一步的三维结构解析, 更好地理解 EIAV 减毒疫苗的免疫机制及相关疫苗设计奠定了基础.

**关键词:** EIAV; 强毒株; 疫苗株; gp45; 结晶

**中图分类号:** Q518.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-6510(2011)04-0010-04

## Purification and Crystallization Comparison between EIAV gp45 of Virulent Strain and Vaccine Strain

WANG Jian-xin<sup>1</sup>, WANG Min<sup>1</sup>, LIU Xin-qi<sup>2</sup>

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** EIAV (equine infectious anemia virus) vaccine is the only successful lentivirus vaccine in the world. By comparison studies of EIAV virulent strain and vaccine strain related protein structures, better realization of the attenuation process and immune mechanism can be achieved. The gp45 (glycoprotein 45) is a key protein in mediating membrane fusion between EIAV and host cell. Taking EIAV virulent strain LN40 and vaccine strain FDDV13 as research subjects, the core structure of virulent strain and vaccine strain gp45 was cloned, expressed, and purification and crystallization characters were compared, which laid the foundation for further resolution of the three dimensional structure, better understanding of immune mechanism of EIAV attenuated vaccine and related vaccine design.

**Keywords:** EIAV; virulent strain; vaccine strain; gp45; crystallization

EIAV (equine infectious anemia virus) 与 HIV (human immunodeficiency virus) 同为慢病毒, 两者在病毒形态、基因组结构、细胞嗜性、病毒复制的分子机制、病毒的生活周期、抗原漂移规律、免疫机制及病毒与宿主相互作用等方面都极为相似. 深入探索 EIAV 减毒疫苗相关的免疫保护机制, 将为 HIV 的新型疫苗的研究提供借鉴.

EIAV 的 gp45 (glycoprotein 45) 与 HIV-1 的 gp41 (glycoprotein 41) 跨膜蛋白在介导病毒与靶细胞之间的融膜过程中起关键作用. 位于 gp45 融合区和穿锚区

之间的氨基酸肽段的抗原性很强, 是跨膜蛋白的主要免疫区, 被称为核心结构域. 该区域在 EIAV 疫苗诱导马体的免疫应答以及 EIA 诊断中具有重要作用<sup>[1]</sup>. 通过对强毒株和疫苗株该区域的结构研究, 可以了解 EIAV 病毒致弱过程中 gp45 结构变异、进化的关系, 有助于更好地理解 EIAV 病毒的致病机制和 EIAV 疫苗的作用机理, 为其他慢病毒属疫苗尤其是 HIV 疫苗的合理设计提供结构依据. 目前尚无关于 EIAV gp45 晶体结构的报道. 本研究参考最早报道的 HIV gp41 核心结构域晶体<sup>[2]</sup>的截短设计, 对 EIAV 强毒株

收稿日期: 2011-02-18; 修回日期: 2011-03-11

基金项目: 国家 973 计划项目资助 (2010CB911800); “艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治” 专项 (2008ZX10001-010)

作者简介: 王建新 (1985—), 男, 河南人, 硕士研究生; 通信作者: 刘新奇, 教授, liu2008@naikai.edu.cn.

LN40 和疫苗株 FDDV13 核心结构域进行了原核表达和纯化, 并对其结晶行为进行了探索.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

原核表达载体 pET30-his、表达菌株 *E. coli* Rosetta (DE3) 及 EIAV gp140 质粒由本实验室保存; 感受态细胞 *E. coli* TOP10, 北京全式金生物技术有限公司; 限制性内切酶和 DNA 聚合酶, TaKaRa 公司; 质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒, 北京天根生化科技有限公司; 引物由北京华大基因公司合成; 其余试剂均为国产分析纯.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 构建 gp45 重组质粒

本实验以 EIAV gp140 质粒为模板, 采用 Overlap PCR 对 gp45 目的片段进行扩增, 去除中间的 DSL 区. 对扩增片段用 T4 聚合酶处理, 与载体 pET30-his 用 LIC 法进行连接. 重组质粒经限制性内切酶酶切和 DNA 测序验证.

#### 1.2.2 gp45 蛋白的诱导表达及纯化

重组的 pET30 gp45-his 质粒转到 *E. coli* Rosetta (DE3) 细菌中, 37 °C 摇菌至  $A_{600}$  为 0.6 ~ 0.8, 加入 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L, 并在 25 °C 下进行过夜诱

导表达. 收集菌体后用平衡液 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mol/L NaCl 重悬, 超声破碎, 18 000 r/min 离心 30 min 除去细胞碎片和不溶物. 将上清液与预先用平衡液平衡过的镍离子偶联琼脂糖介质 (Ni-NTA, Qiagen 公司) 混合, 再用漂洗液 (0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mol/L NaCl, 0.02 mol/L 咪唑) 充分除去杂蛋白, 然后用洗脱液 (0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L 咪唑) 洗脱目的蛋白. 将洗脱的目的蛋白经过 Hitrap Q (GE Healthcare 公司) 离子交换层析和 Superdex 200 (GE Healthcare 公司) 凝胶过滤层析进一步纯化.

#### 1.2.3 gp45 蛋白的结晶及结晶条件优化

将纯化后的 gp45 蛋白浓缩到 10 mg/mL, 采用坐滴气相扩散法, 以商品化的结晶条件试剂盒为池液, 在 20 °C 恒温条件下进行结晶条件筛选. 对初筛得到微晶的结晶条件进行拉梯度细分, 采用悬滴气相扩散法手工配制溶液, 对晶体进行优化.

## 2 结果与分析

### 2.1 强毒株和疫苗株 gp45 核心结构域保守性分析

强毒株与疫苗株 gp45 序列比对 (图 1) 结果显示, 强毒株 LN40 和疫苗株 FDDV13 核心结构域中有 4 个氨基酸的差异 (方框部分).

EIAV <sub>LN40</sub>	DSVQNHTF <b>EV</b> ENNTING <b>L</b> EL <b>V</b> EEQIHILYAMVLQTHADVQLLKEQQKIEETFNLI
EIAV <sub>FDDV13</sub>	DSVQNHTF <b>K</b> VENNTINS <b>M</b> EL <b>T</b> EEQIHILYAMVLQTHADVQLLKEQQKIEETFNLI
EIAV <sub>LN40</sub>	STQWDDWVDKMNENLNHDILTLLHTARNNLEQSMITFNTPDSIAQFGK
EIAV <sub>FDDV13</sub>	STQWDDWVDKMNENLNHDILTLLHTARNNLEQSMITFNTPDSIAQFGK

图 1 强毒株与疫苗株 gp45 序列比对

Fig.1 Sequence alignment of virulent strain and vaccine strain of gp45

### 2.2 gp45 蛋白的纯化

对于强毒株 gp45 蛋白, 先经过镍柱亲和层析, 然后将洗脱下来的目的蛋白浓缩后进行离子交换层析和凝胶过滤层析. 对于疫苗株 gp45 蛋白, 先经过镍柱亲和层析, 将洗脱下来的目的蛋白用 TEV 酶在 16 °C 处理过夜, 然后进行离子交换层析和凝胶过滤层析, 如图 2—图 5 所示. gp45 凝胶过滤层析纯化后 SDS-PAGE 分析见图 6.

图 3 和图 5 中主峰单一, 峰型对称, 表明 gp45 蛋白以均一的三聚体形式存在.

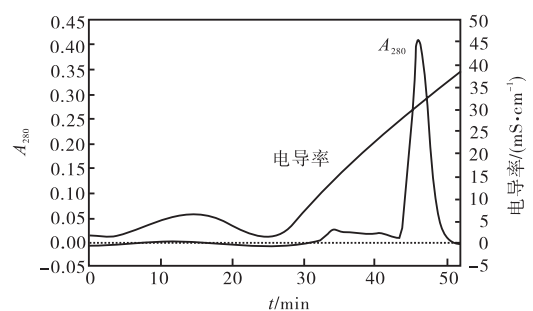


图 2 gp45-his<sup>+</sup> 离子交换层析图谱

Fig.2 Ion exchange chromatography of gp45-his<sup>+</sup>

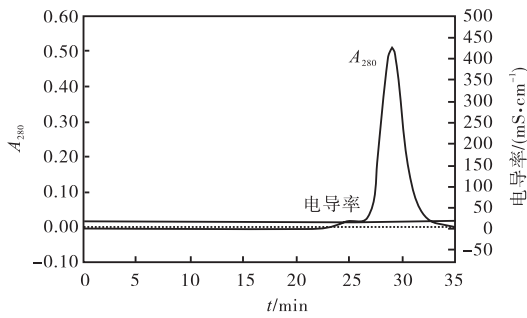


图3 gp45-his<sup>+</sup>凝胶过滤层析图谱

Fig.3 Gel filtration chromatography of gp45-his<sup>+</sup>

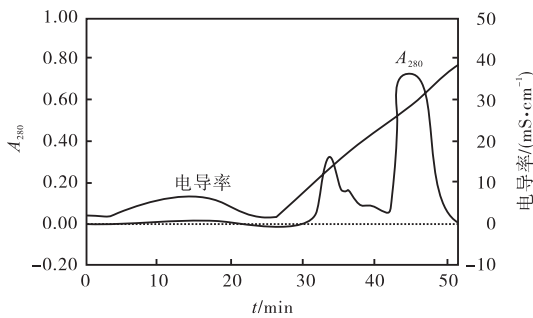


图4 gp45-his<sup>-</sup>离子交换层析图谱

Fig.4 Ion exchange chromatography of gp45-his<sup>-</sup>

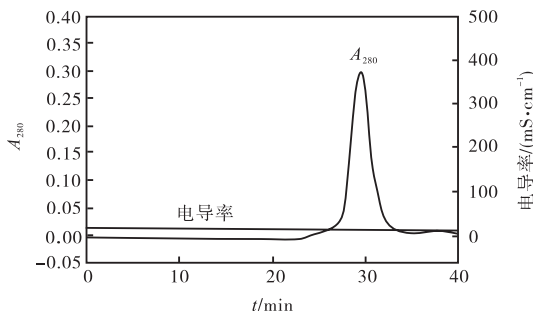
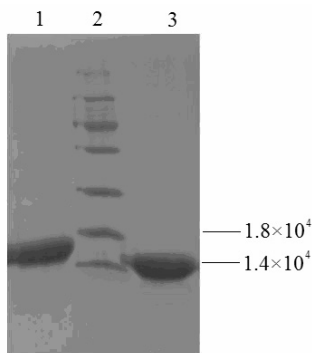


图5 gp45-his<sup>-</sup>凝胶过滤层析图谱

Fig.5 Gel filtration chromatography of gp45-his<sup>-</sup>



1. gp45-his<sup>+</sup>; 2. 标准品; 3. gp45-his<sup>-</sup>

图6 gp45凝胶过滤层析纯化后 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of gp45 after gel filtration chromatography

图6中,左泳道为强毒株 gp45 带 his 标签样品,右泳道为强毒株 gp45 切 his 标签样品. 两条带均在  $1.4 \times 10^4$  上下,与预期相对分子质量相符,且条带单一,纯度较好,达到晶体筛选要求.

### 2.3 gp45的晶体生长与优化

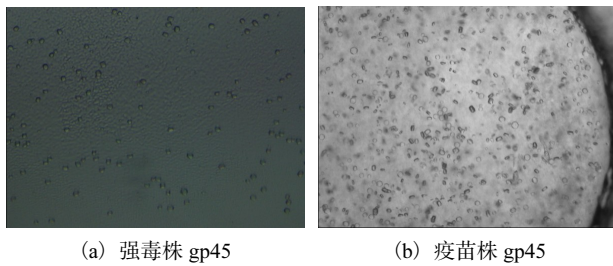
经坐滴法筛选,强毒株 gp45 在多种条件(表 1)下均能长出微晶(图 7(a)). 在此系列结晶条件基础上进行优化,最终在条件 0.2 mol/L 氯化镁, 0.1 mol/L BisTris pH 5.5, 25% PEG3350 中挑出晶体进行 X 射线衍射及数据收集,衍射分辨率达到 0.28 nm(图 8).

对于疫苗株 gp45,在条件 0.2 mol/L 氯化钙, 0.1 mol/L 醋酸钠 pH 4.6, 20%异丙醇中同样获得了微晶(图 7(b)). 目前还未得到适于数据收集的晶体.

表 1 强毒株 gp45初筛结晶条件

Tab.1 Virulent strain gp45 crystallization conditions of preliminary screen

条件		配方
JCSG-plus Screen1	1 <sup>#</sup>	0.2 mol/L 硫酸锂, 0.1 mol/L 醋酸钠 pH 4.5, 50% PEG400
JCSG-plus Screen2	4 <sup>#</sup>	0.2 mol/L 硫酸锂, 0.1 mol/L Tris pH 8.5, 1.26 mol/L 硫酸铵
	38 <sup>#</sup>	1.0 mol/L 硫酸铵, 0.1 mol/L BisTris pH 5.5, 1% PEG3350
	43 <sup>#</sup>	0.2 mol/L 硫酸铵, 0.1 mol/L BisTris pH 5.5, 25% PEG3350
	45 <sup>#</sup>	0.2 mol/L 硫酸锂, 0.1 mol/L BisTris pH 5.5, 25% PEG3350
	47 <sup>#</sup>	0.2 mol/L 氯化镁, 0.1 mol/L BisTris pH 5.5, 25% PEG 3350
Structure Screen 1	7 <sup>#</sup>	0.2 mol/L 醋酸镁, 0.1 mol/L 柠檬酸钠 pH 5.6, 30% PEG4000
	11 <sup>#</sup>	0.2 mol/L 氯化钙, 0.1 mol/L 醋酸钠 pH 4.6, 20% 异丙醇
	14 <sup>#</sup>	0.2 mol/L 硫酸铵, 0.1 mol/L 磷酸钠 pH 6.5, 30% PEG8000
	15 <sup>#</sup>	0.2 mol/L 醋酸镁, 0.1 mol/L 磷酸钠 pH 6.5, 20% PEG8000
	20 <sup>#</sup>	0.2 mol/L 醋酸钙, 0.1 mol/L 磷酸钠 pH 6.5, 18% PEG8000
	42 <sup>#</sup>	0.2 mol/L 硫酸铵, 30% PEG8000
Structure Screen 2	14 <sup>#</sup>	0.1 mol/L 氯化钠, 0.1 mol/L 羟乙基哌嗪乙磺酸钠 pH 7.5, 1.6 mol/L 硫酸铵
	23 <sup>#</sup>	1.6 mol/L 硫酸铵, 0.1 mol/L MES pH 6.5, 10% 1,4-二氧六环
	26 <sup>#</sup>	0.2 mol/L 硫酸铵, 0.1 mol/L MES pH 6.5, 30% PEG5000MME
	30 <sup>#</sup>	0.5 mol/L 硫酸铵, 0.1 mol/L 柠檬酸钠 pH 5.6, 1 mol/L 硫酸锂



(a) 强毒株 gp45 (b) 疫苗株 gp45

图 7 gp45 晶体显微照片

Fig.7 Crystal photomicrograph of gp45

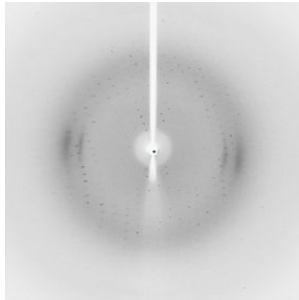


图 8 强毒株 gp45 蛋白晶体衍射图

Fig.8 Diffraction map of virulent gp45 crystal

### 3 讨论

EIAV 疫苗株 FDDV 和另外一个疫苗株 DLV 在 Env 区的 10 个一致性突变位点中,有 9 个定位在 gp90 区,一个在 gp45 区<sup>[3]</sup>. 强毒株和疫苗株 gp45 核心结构域氨基酸序列只相差 4 个氨基酸(图 1). 表明 gp45 区在进化上是比较保守的,这也许能成为 EIAV 良好的靶位点,开发针对性的疫苗和中和性抗体.

强毒株和疫苗株 gp45 在离子交换层析和凝胶过滤层析中行为相似(图 2—图 5),但在结晶行为上有明显差异. 晶体初筛结果表明:强毒株 gp45 在切除和不切除 his 标签时均能长出晶体,而且不切除标签时晶体质量更好;疫苗株 gp45 只有在切除 his 标签的情况下才能长出晶体,并且结晶条件也与强毒株有较大差异. 这些结果表明, his 标签很有可能促进了强毒株 gp45 的结晶而阻碍了疫苗株 gp45 的结晶. 强毒株和疫苗株 gp45 晶体外形都是六方的,提示这两种蛋白很有可能具有相同的空间群.

强毒株 gp45 晶体衍射分辨率达到了 0.28 nm,但由于数据质量问题,无法解析出其准确的三维空间结构,其晶体还需进一步优化. 疫苗株 gp45 晶体由于个体较小无法进行数据收集,其优化工作仍将继续.

HIV 侵入人体后,宿主的免疫反应主要是针对 HIV 的表面糖蛋白 Env 产生的. 所以近年来国际上针对 Env 编码的两个糖蛋白 gp120 和 gp41 展开了大

量的研究工作,并在结构研究方面取得了许多重要的进展<sup>[4-13]</sup>,解析出了一系列的关于 gp120 和 gp41 的晶体结构. 但是,缺乏动物模型和对 HIV 感染的保护性免疫机制知之甚少一直是 HIV 疫苗研究的最大障碍<sup>[5]</sup>. EIAV 减毒疫苗是迄今为止在世界上唯一大规模应用的慢病毒疫苗,但是该疫苗的免疫保护机制尚未完全阐明<sup>[6]</sup>. 目前以 EIAV 减毒疫苗为基础的新型 HIV 疫苗的抗原改造研究正在进行中,通过对中国 EIAV 减毒疫苗的减弱机制以及保护性免疫的深入研究,将会对包括 HIV 在内的其他慢病毒疫苗研究提供更多的科学借鉴.

我国艾滋病疫情严重,研制安全有效的艾滋病疫苗刻不容缓. 我国在 HIV 方面的研究滞后于国际先进水平,但是我国拥有世界上唯一成功的慢病毒疫苗. 以此疫苗为基础进行免疫机制研究,可以较好地指导 HIV 疫苗的设计开发工作. 目前,对于 EIAV Env 相关蛋白的结构信息一无所知,通过对 EIAV 强毒株和疫苗株蛋白结构方面更深入的研究,可以紧紧抓住慢病毒疫苗这一优势,更好地理解 EIAV 病毒进化的策略及疫苗的免疫保护机制,更能以此为基础,为更合理的设计 EIAV 以及 HIV 疫苗和相关药物提供强有力的参考.

### 参考文献:

- [1] 王盈,魏丽丽,相文华,等. EIAV 与 HIV 分子生物学相关性研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2004,24(5): 5-9.
- [2] Chan D C, Fass D, Berger J M, et al. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein[J]. Cell, 1997, 89: 263-273.
- [3] 阳凯,张晓燕. EIAV 减毒疫苗减毒机制及免疫研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2008,24(12): 1216-1218.
- [4] Tan K, Liu J, Wang J H, et al. Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(23): 12303-12308.
- [5] Weissenhorn W, Dessen A, Harrison S C, et al. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41[J]. Nature, 1997, 387(6631): 426-430.
- [6] Horne W S, Johnson L M, Ketas T J, et al. Structural and biological mimicry of protein surface recognition by alpha/beta-peptide foldamers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(35): 14751-14756.

(下转第 25 页)