

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)05-0412-04

## 趋化因子受体 CCR5 胞外段重组蛋白的克隆、表达、纯化及鉴定

吴孔田, 张英起, 颜真 (第四军医大学药理学系生物技术中心, 陕西 西安 710033)

## Cloning, expression, purification and identification of CCR5 extracellular domain recombinant protein

WU Kong-Tian, ZHANG Ying-Qi, YAN Zhen

Biotechnology Center, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

**【Abstract】** AIM: To construct a prokaryotic expression vector of CCR5 extracellular domain recombinant protein and to purify and identify it. **METHODS:** To obtain amino acid sequence of CCR5 extracellular domains, the four peptides of CCR5 (N-term, ECL1, ECL2 and ECL3) were combined using the soft linker and named rCCR5. RCCR5 gene was synthesized according to codon *E. coli* preferred. The gene was cloned into the vector pET-22b(+) and the aim protein was expressed in *E. coli*. The expression product was purified and then identified with Western-blot. **RESULTS:** We developed a purification process of rCCR5 from inclusion bodies. The procedure included washing and solubilization of inclusion body, purification by SephacrylS-300 and refolding by SephacrylS-100. The result of Western-blot showed the specific binding of CCR5 mAb with aim protein. **CONCLUSION:** Purified recombinant protein rCCR5 is obtained successfully, which can be used as a candidate antigen for CCR5 autovaccine to challenge HIV-1 infection.

**【Keywords】** CCR5; PADRE; inclusion bodies; refolding; autovaccine; HIV-1 infection

**【摘要】**目的: 构建趋化因子受体 5 (CCR5) 胞外段重组蛋白(命名为 rCCR5)原核表达载体, 并进行诱导表达。对表达产物进行纯化和鉴定。方法: 截取 CCR5 胞外结构 4 个片段 N-Term, ECL1, ECL2 和 ECL3 的氨基酸序列, 应用柔性 linker 分别串联, 模拟 CCR5 胞外结构, 依据大肠杆菌偏爱密码子人工合成基因。运用基因重组方法在大肠杆菌中进行表达, 表达产物经纯化、复性后进行 Western blot 鉴定。结果: 目的蛋白以包涵体形式存在, 经包涵体洗涤、变性溶解, SephacrylS-300 凝胶过滤层析及 SephacrylS-100 凝胶柱复性获得了纯化

的蛋白质, 目的蛋白能与 CCR5 mAb 特异性结合。结论: 获得了大量纯化的 rCCR5 重组蛋白, 可作为研制 CCR5 自体蛋白疫苗以阻断 HIV-1 感染的候选抗原蛋白。

**【关键词】** CCR5; 人工手动 HTL 表位; 包涵体; 复性; 自体疫苗; HIV-1 感染

**【中图分类号】** Q78 **【文献标识码】** A

## 0 引言

趋化因子受体 5 (CCR5) 是 HIV-1 感染初期病毒进入体内最重要的辅助受体<sup>[1]</sup>, 近几年来, 以 CCR5 为靶点的抗 HIV-1 策略倍受关注, 通过小分子拮抗剂、单克隆抗体及基因干涉等不同手段减弱或降低细胞表面 CCR5 的功能达到对抗 HIV-1 感染的目的<sup>[2-5]</sup>。其中以 CCR5 为靶向的自体疫苗开辟了艾滋病疫苗研究的新途径<sup>[6]</sup>。CCR5 自体疫苗通过诱导机体自身产生针对自身分子 CCR5 的抗体进而与细胞表面的 CCR5 结合, 降低细胞表面的 CCR5 的数量, 减少了 HIV-1 病毒感染的机会, 达到预防 HIV-1 感染的效果。我们构建人 CCR5 胞外段重组蛋白表达载体, 对获得的重组蛋白纯化、复性, 为构建 CCR5 自体蛋白疫苗提供实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 各种限制性内切酶、T4-DNA 连接酶 (TaKaRa 公司); DL2000 DNA marker (大连宝生物工程公司); 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒 (上海博亚生物技术有限公司); 蛋白 marker 羊抗鼠二抗 (华美公司); 小鼠抗人 CCR5 mAb (R&D 公司)。其他试剂均为国产分析纯。原核表达载体 pET-22b(+) 质粒为本室保存。宿主菌为大肠杆菌 BL-21。5L 发酵罐 (B. Braun 公司)。4℃ 高速离心机、冻干机 (Beckman 公司)。凝胶柱填料 SephacrylS-300, SephacrylS-100 及纯化设备 (Amersham Pharmacia Biotech 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 CCR5 胞外段基因的合成** 分析 Swiss-Pro 蛋白质数据库 CCR5 的结构, 截取 CCR5 胞外 4 个片段 N-Term, ECL1, ECL2, ECL3 的氨基酸序列, 分别为 N-Term: MDYQVSSPIYDINYYTSEPCQKINVKQLAAR (31); ECL1: YAAAQWDFGNTMCQ (14); ECL2:

收稿日期 2005-10-11; 接受日期 2005-12-07

基金项目 教育部“长江学者和创新团队发展计划”(IRT0459)

通讯作者 颜真, Tel: (029) 84773488 Email: yanzhen@fmmu.edu.cn

作者简介: 吴孔田, 硕士生(导师颜真, 张英起), Tel: (029)

84774774 Email: wkntian2001@yahoo.com.cn

RSQKEGLHYTCSSHPYSQYQFWKNFQTLK (30); ECL3 NTFQEFFGLNNCSSNRLDQAM(22). 应用柔性 linker(氨基酸序列为 GGGGS)分别串联,获得模拟 CCR5 胞外片段的氨基酸序列(命名为 rCCR5). 按照已公布的人 CCR5 的基因序列,于 5'端插入 *Nde* I 酶切位点,3'端引进终止密码子 TGA 并插入 *Sal* I 酶切位点,依据大肠杆菌偏爱的密码子,送交上海生工生物技术公司合成目的基因.

1.2.2 pET-22b(+)/rCCR5 表达载体的构建 将含有合成目的基因的质粒 pUC57 经 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切后,回收 360 bp 左右的小片段,同时用 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切 pET-22b(+),回收大片段. 建立连接体系,16℃ 连接过夜. 连接产物转化感受态 DH5 $\alpha$  细胞,提取质粒,经酶切鉴定和 DNA 测序正确后获得含有 rCCR5 基因原核表达载体,命名为 pET-22b(+)/rCCR5.

1.2.3 pET-22b(+)/rCCR5 原核载体的表达 pET-22b(+)/rCCR5 转化感受态 BL-21 细胞,挑取含重组表达质粒的大肠杆菌 BL-21 单菌落并接种于 5 mL 含 100 mg/L 氨苄青霉素(Amp)的新鲜 LB 培养液中,37℃ 摇床培养过夜,次日以 1:100 接种于含 100 mg/L Amp 的新鲜 LB 培养液中,37℃ 继续培养至细菌密度达到  $A_{600\text{nm}} = 0.4 \sim 0.6$ ,1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后收菌,小规模培养及诱导后离心收集菌体,SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达和存在形式.

1.2.4 工程菌的发酵 从活化的 LB 平板上挑选单菌落接种于含 LB 的试管中,37℃ 培养 10 h,转种至含 200 mL LB 的三角瓶中,37℃ 培养过夜. 次日将种子液接种于 5 L 发酵罐. 控制发酵温度 37℃,转速 250~450 r/min、通气量 3~5 L/min,pH 7.3. 培养至  $A_{600\text{nm}} = 8$  时,1 mmol/L IPTG 诱导,继续培养 4 h,终止发酵,收集菌体,称质量,-20℃ 冰箱保存备用. 取少量菌体处理后用 SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达.

1.2.5 目的蛋白包涵体的分离和洗涤 取 10 g 发酵菌体,按 1 g 湿菌质量对 7 mL 的比例,用裂解缓冲液 STE(50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,50 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA)重悬,-20℃ 过夜. 次日于室温水浴中融化,溶菌酶法裂菌,400 W 超声破菌,其中超声 5 s,间隔 10 s,共进行 100 次. 12 000 g 4℃ 离心 20 min,弃上清,沉淀用包涵体洗涤液 A(10 mL/L Triton X-100,1 mmol/L EDTA,10 g/L DOC,50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.5,100 mmol/L NaCl)重悬,12 000 g 4℃ 离心 20 min,弃上清. 再用包涵体洗涤液 B(50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.5,2.5 mol/L 尿素,100 mmol/L NaCl,5 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇,1 mmol/L

EDTA)重复洗涤 3 次,直至离心后的上清液澄清为止. 最后用包涵体洗涤液 C(50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.5,1 mmol/L EDTA)洗涤 1 次后离心,离心条件不变.

1.2.6 表达产物变性条件下的纯化 经洗涤的包涵体以 100 g/L 溶于缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.5,5 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇,1 mmol/L EDTA,8 mol/L 尿素)中,4℃ 搅拌过夜,12 000 g 4℃ 离心 30 min,收集上清,即为目的蛋白粗提液. SephacrylS-300 凝胶柱为 1.6 cm  $\times$  80 cm,以工作液(8 mol/L 尿素,50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.5,1 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl)充分平衡后,目的蛋白粗提液 2 mL 上柱,以工作液洗脱,流速 1 mL/min,分步收集并测定蛋白质含量,以 SDS-PAGE 确定目的蛋白所在位置,收集纯度较高的洗脱组分.

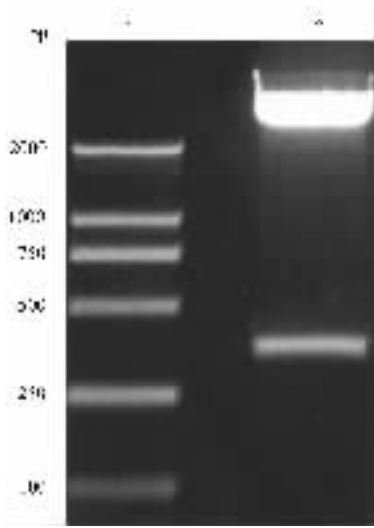
1.2.7 表达产物的复性 以工作液(50 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl,pH 8.5)充分平衡后,取 SephacrylS-100 凝胶(1.6 cm  $\times$  60 cm)过滤目的蛋白样品,用 SephacrylS-300 凝胶柱工作液调整蛋白样品浓度为 20 g/L,用蛋白复性液(50 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl,1.25 mmol/L GSH,0.25 mmol/L GSSG,pH 8.5)洗脱,流速 0.5 mL/min,分部收集,测定蛋白质含量,SDS-PAGE 确定目的蛋白所在位置,收集纯度较高的洗脱组分,目的蛋白洗脱峰直接对水透析,4℃ 24 h,其中换液 3 次. 透析后样品于 4℃ 12 000 g/min 离心 30 min,冻干上清,收集样品. HPLC 检测蛋白纯度.

1.2.8 表达产物 Western blot 鉴定 目的蛋白经 SDS-PAGE 转移至硝酸纤维素膜,以 10 g/L BSA 室温封闭过夜后,用小鼠抗人 CCR5 mAb(1:1000 稀释)孵育膜,室温 3 h,TBST 洗膜 3  $\times$  10 min,再以 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体(1:1000 稀释)孵育膜,室温 3 h;TBST 洗膜 3 次,用 DAB 显色液显色 5~10 min,观察结果.

## 2 结果

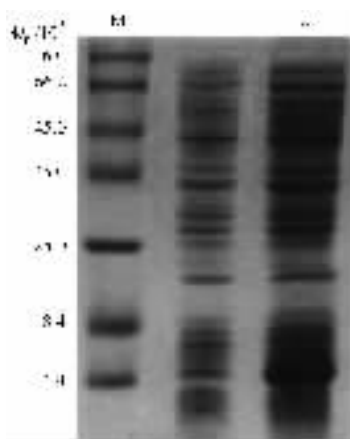
2.1 重组表达质粒的鉴定 重组表达质粒 pET-22b(+)/rCCR5 经限制性内切酶 *Nde* I 和 *Sal* I 酶切鉴定,得到的片段与预期大小相一致. 质粒测序结果与理论设计完全一致(图 1).

2.2 目的蛋白的表达 在 14 ku 处有明显的新生条带,和目的蛋白质预测的分子质量一致(图 2),说明在大肠杆菌中这种重组蛋白质的表达成功. 薄层扫描显示目的蛋白表达量为 30%.



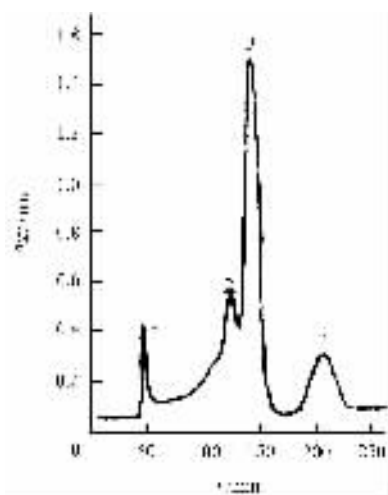
1 DNA marker ; 2 pET-22b(+) + rCCR5 质粒 *Nde* I + *Sal* I 双酶切.

图1 重组质粒 pET-22b(+) + rCCR5 酶切鉴定



M : marker ; 1 pET-22b(+) + rCCR5 诱导前 ; 2 pET-22b(+) + rCCR5 诱导后.

图2 目的蛋白在大肠杆菌 BL-21 中的高效表达

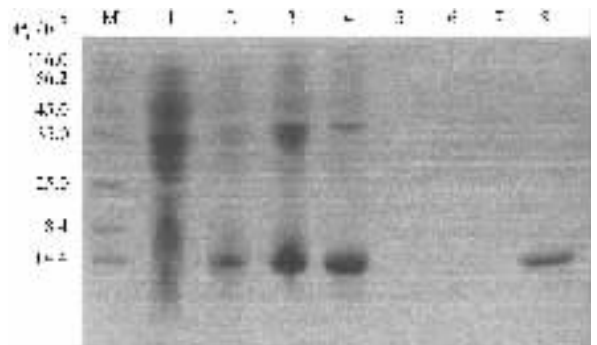


1 2 杂蛋白 ; 3 : 目的蛋白.

图3 SephacrylS-300 凝胶过滤洗脱图谱

### 2.3 工程菌的发酵及目的蛋白的纯化 经工程菌发

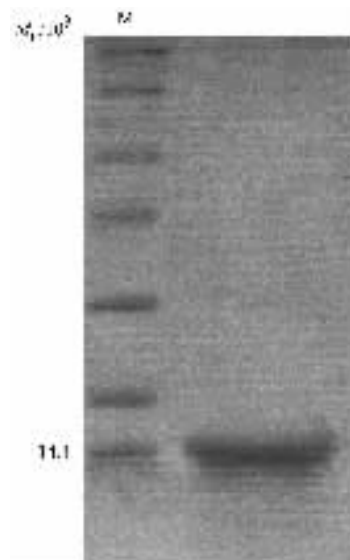
酵 , 收菌量约为 40 g/L. 图 3 中最高峰为 SephacrylS-300 凝胶过滤目的蛋白质所在峰. 经考马斯亮蓝染色后, 凝胶上除目的蛋白质带外不存在其他条带, 薄层扫描显示目的蛋白质纯度达 90% 以上. 图 4 为 SDS-PAGE 分析结果.



M : marker 1 : pET-22b(+) + rCCR5 诱导前 2 pET-22b(+) + rCCR5 诱导后 3 细菌裂解沉淀 4 凝胶柱上样前样品 5 峰 1 ; 6 峰 2 ; 7 峰 4 ; 8 峰 3 (目的蛋白).

图4 SephacrylS-300 凝胶过滤后洗脱峰 SDS-PAGE 结果分析

### 2.4 目的蛋白的复性 目的蛋白样品经 SephacrylS-100 凝胶柱复性后, SDS-PAGE 分析结果如图 5.



M : marker 1 复性后的目的蛋白.

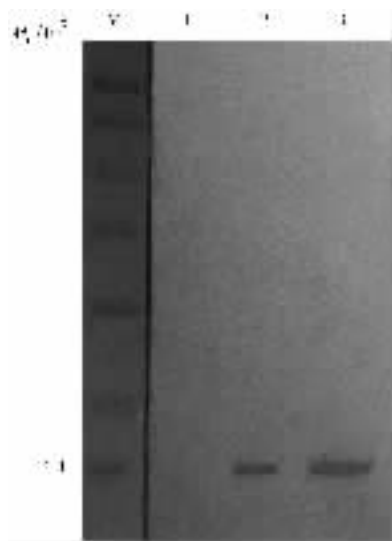
图5 复性后 rCCR5 的 SDS-PAGE 分析

2.5 Western blot 鉴定 诱导表达的菌体和纯化的蛋白在 14 ku 处出现一明显条带, 相对分子质量与理论计算值相符合, 而对照菌体未出现显色带(图 6), 表明该表达产物能与 CCR5 mAb 特异性结合.

## 3 讨论

AIDS 主要由 HIV-1 病毒感染并在体内快速繁殖, 导致宿主白细胞的大量破坏所致. 传统的以 HIV

病毒为靶向的疫苗设计由于其高变异性致使治疗以及预防 AIDS 均未取得很好的效果. 鉴于 CCR5 特定突变基因型具有抗 HIV 感染的能力,其功能的减弱和缺失对机体并没有太大的影响,多种影响 CCR5 表达或干扰 CCR5 功能活动的药物,如应用 CCR5 小分子拮抗剂、CCR5 抗体、siRNA、反义 RNA、核酸酶等,均可在一定程度上通过降低细胞表面 CCR5 数量进而降低 HIV 进入白细胞的速率. 因此 CCR5 可作为一种可利用的新的靶点来进行 HIV 疫苗设计和药物开发<sup>[5]</sup>.



M : marker 1 : pET-22b( + )rCCR5 诱导前 2 : pET-22b( + )rCCR5 诱导后 3 纯化后的目的蛋白.

图6 目的蛋白 rCCR5 的 Western blot 鉴定

我们在设计 CCR5 自体蛋白分子的过程中,考虑到 CCR5 作为七次跨膜受体,在与 HIV 结合发挥辅助受体功能的过程中,胞外 4 个片段均发挥相应的作用. 应用计算机对 CCR5 抗原表位进行预测,发现抗原表位主要位于 N-Term 和 ECL2,也是 CCR5 发挥辅助受体功能的两个主要片段,但为使自体疫苗诱导的抗血清更好地阻断 HIV 与 CCR5 受体的结合,我们截取 CCR5 胞外 4 个片段用 Linker 连接,模拟 CCR5 受体膜外结构用作自身抗原分子. 实验中,目的蛋白是以包涵体形式存在,包涵体的纯化和复性一直是蛋白质纯化中的一个普遍性难题,由于 CCR5 是一个跨膜

分子,因此对重组目的蛋白的纯化和复性相对比较困难,在尝试了几种蛋白质纯化和复性方法的基础上,总结了 rCCR5 的蛋白质纯化方案,即在确定目的蛋白质以包涵体形式存在的基础上,首先筛选高表达的菌种,其次优化表达条件和发酵工艺. 采用溶菌酶和超声双重裂菌,对包涵体充分洗涤后,应用适当的变性剂浓度溶解包涵体,选用合适的凝胶孔径,应用凝胶柱层析成功地对蛋白质进行了纯化和复性. 此方法可以借鉴到分子质量相近的蛋白质的纯化和复性. 应用凝胶柱进行重组蛋白的纯化和复性,方法简单实用,且经济费用较低,为大规模生产重组蛋白奠定了基础. 在自体疫苗的构建过程中,常常引入一些蛋白载体或特定多肽借以提高抗原分子的免疫原性,来突破机体的免疫限制,诱导出特异的高滴度抗体. 结合文献和以往构建疫苗抗原试验的结果,我们拟在今后的实验中应用不同的蛋白载体耦联 rCCR5 免疫动物,以提高重组 CCR5 抗原分子的免疫原性.

#### 【参考文献】

- [1] Atchison REJ, Gosling FS. Multiple extracellular elements of CCR5 and HIV-1 entry: Dissociation from response to chemokines [ J ]. Science, 1996 274 1924 - 1926.
- [2] Agrawal L, VanHorn AZ, Edward A, et al. Specific inhibition of HIV-1 coreceptor activity by synthetic peptides corresponding to the predicted extracellular loops of CCR5 [ J ]. Blood, 2004, 103 : 1211 - 1217.
- [3] Wolkowicz R, Gina CJ. A random peptide library fused to CCR5 for selection of mimetopes expressed on the mammalian cell surface via retroviral vectors [ J ]. J Biol Chem, 2005, 280( 15 ) : 15195 - 15201.
- [4] Qin XF, Chen IS, Baltimore D. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5 [ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100 183 - 188.
- [5] 李文刚, 邵沂, 陈红. CCR5, CXCR4 双靶区反义 RNA 重组腺病毒载体的构建 [ J ]. 第四军医大学学报, 2004, 25( 7 ) : 631 - 634.
- [6] Chackerian B, Briglio L, Paul SA, et al. Induction of autoantibodies to CCR5 in macaques and subsequent effects upon challenge with an R5-Tropic Simian/human immunodeficiency virus [ J ]. J Virol, 2004, 78( 8 ) : 4037 - 4047.