

HIV-1 功能性膜蛋白基因 gp160 的快速筛选和鉴定

胡园园, 朱雷*, 赵春红, 郝金娟, 任莉, 邵一鸣, 洪坤学*

摘要:目的 应用假病毒感染实验快速筛选可用于 HIV-1 中和抗体测定的功能性膜蛋白基因。方法 从 HIV 感染样品中扩增全长膜蛋白基因 gp160, 通过系统进化树分析确定其基因亚型, 将 HIV-1 gp160 阳性克隆与 pSG3 Δ Env 质粒共转染 293T 细胞制备假病毒并对其感染能力进行分析, 筛选功能性膜蛋白基因。结果 克隆和鉴定了我国 HIV-1 流行毒株的 9 个功能性膜蛋白基因, 系统进化树分析表明其中包括 4 个 CRF07_BC、2 个 CRF01_AE 和 3 个 B 亚型毒株, 这些 gp160 膜蛋白基因所制备的假病毒具有良好的感染性。结论 不同亚型 HIV-1 功能性膜蛋白 gp160 克隆为选择 HIV-1 中和抗体测定毒株提供了有价值的实验材料。

关键词:假病毒; HIV-1; 中和抗体; gp160

中图分类号: R512.91 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2013)6-659-03

Rapid screening and characterization of functional HIV-1 gp160 envelope genes. HU Yuan-yuan, ZHU Lei, ZHAO Chun-hong, et al. (National Center for AIDS/STD Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, State Key Laboratory for Infectious Disease Control and Prevention, Beijing 102206, P. R. China)

Abstract: Objective To rapid screen and characterize functional HIV-1 envelope genes for HIV-1 neutralization test by pseudovirus infection. Methods HIV-1 gp160 genes were amplified from the blood samples of the infected subjects. HIV-1 clade was determined by sequencing and phylogenetic analysis. HIV-1 pseudoviruses were prepared by transfection of functional env gp160 clone with plasmid pSG3Env, and the pseudovirus infectivity was also characterized. Results Nine HIV-1 gp160 genes were successfully cloned from HIV-1 infected patients using the HIV-1 pseudovirus infection assay. Sequencing and phylogenetic analysis indicated there were 4 CRF_07BC, 2 CRF_01AE and 3 B viruses. Functional analysis demonstrated the pseudoviruses derived from these gp160 clones were infectious. Conclusion The present study has established an assay for rapid screening and characterization of functional gp160 clones of different HIV-1 subtypes, which will be useful in measurement of HIV-1 neutralizing antibody response.

Key words: Pseudovirus, HIV-1, Neutralizing antibody, gp160

中和抗体测定在评价 HIV-1 疫苗的保护性免疫应答^[1]和感染者的免疫功能状态^[2]等方面有着广泛的应用。传统的 HIV 中和抗体实验室测定使用 HIV-1 临床分离毒株在外周血单个核细胞上(PBMC)进行, 该方法能够测定所使用病毒的感染特征和中和特性, 但由于使用的病毒临床分离株和 PBMC 难于标化, 所得结果不便于不同实验间的相互比较。此外, 该方法往往需要在较高要求的实验条件下进行(生物安全 III 级), 这在一定程度上限制了它的应用。随着分子生物学和免疫测定新技术的发展, 目前越来越多的实验室开始采用编码 HIV-1 全长膜蛋白的基因制备的假病毒进行 HIV 中和抗体的测定^[3-4], 该方法使用表达功能性 HIV-1 gp160 膜蛋白的质粒与膜蛋白基因缺损的 pSG3 Δ Env 等质粒共转染 293T 细胞制备的假病毒颗粒感染表达 CD4 和 CCR5/CXCR4 的 TZM-bl 细胞系, 测定方法易于标化, 可在生物安全 II 级的实验室操作, 具有广泛的应用前景^[5-7]。HIV-1 假病毒中和抗

体测定需要使用功能性膜蛋白基因制备假病毒, 因此快速筛选 HIV-1 不同亚型毒株的功能性膜蛋白 gp160 克隆对选择具有特定抗原特征和中和特征的测定毒株具有重要作用。

1 材料与方法

1.1 试剂 QIAamp Viral RNA mini Kit, QIAquick Gel extraction Kit 购自德国 Qiagen 公司, OneStep RNA PCR Kit, TaKaRa Ex Taq 和 dNTP Mixture 购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 RNA 提取及 HIV-1 gp160 基因扩增 按 QIAamp Viral RNA mini Kit 说明书自血浆内提取总 RNA, 用 Invitrogen 公司的 SuperScriptII 合成 cDNA, 随后进行巢式 PCR 扩增 HIV-1 gp160 基因。B 亚型病毒感染样品以外引物 5'-TAGAGCCTTGAAGCATC-CAGGAAGTCAG-3' 和 5'-TAGCCCTTC-CAGTCCCCCTTTTCTTTTA-3' 进行第一轮 PCR 扩增, 以内引物 5'-CACCGATCAA GCTTTAG-

基金项目:“十二五”重大传染病防治研究项目(No.2012ZX10001-008);国家自然科学基金课题(No.81261120379)

作者单位:中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206

作者简介:胡园园(1982~), 女, 硕士研究生, 主要从事感染免疫方面的研究

***通讯作者:** E-mail: hongkx@chinaaids.cn; zhu37209@yahoo.com

GCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG-3'和5'-AGCTG-GATCCGTCTCGAGATACTGCTCCACCC-3'进行第二轮PCR扩增。BC亚型病毒感染样品以外引物5'-TAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAG-3'和5'-TTGCTACTTGTGATTGCTCCATGT-3'进行第一轮PCR扩增,以内引物5'-GATCAAGCTTTAG-GCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG-3'和5'-AGCTG-GATCCGTCTCGAGATACTGCTCCACCC-3'进行第二轮PCR扩增。AE亚型病毒感染样品以外引物5'-TAGAGCCCTGGAATCATCCGGAAG-3'和5'-TTACTACTTGTACTGCTCCATGT-3'进行第一轮PCR扩增,以内引物5'-CACCGATCAAGCTTTAG-GCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG-3'和5'-AGCTG-GATCCGTCTTGAGATACTGCTCCTACTC-3'进行第二轮PCR扩增。第一轮PCR反应的体积为20 μ l,包括2 μ l的cDNA,25 pmol的外引物,5U的TaKaRa Ex Taq;扩增条件为98 $^{\circ}$ C 15s,68 $^{\circ}$ C 4min,共30个循环;72 $^{\circ}$ C 10min。第二轮PCR反应的体积为50 μ l,包括2 μ l的第一轮PCR反应产物,25 pmol的内引物,5U的TaKaRa Ex Taq;扩增条件同第一轮。

1.3 PCR产物纯化、克隆构建和鉴定 按照QIA-quick Gel extraction Kit说明书回收纯化目的DNA,参照Invitrogen pcDNA3.1/v5-His-TOPO载体Kit说明书,将目的DNA插入到该载体中。将连接产物转化感受态TOP10,37 $^{\circ}$ C过夜培养,取阳性克隆摇菌提取质粒,XhoI和BamHI双酶切鉴定插入片段的大小。

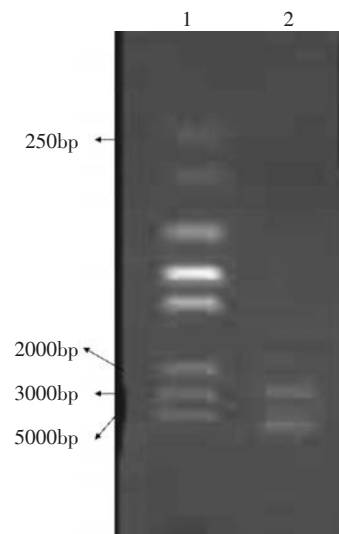
1.4 序列测定及系统进化树分析 以载体引物T7(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')和BGH reverse(5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3')为起始测序引物,用末端终止循环测序法进行序列测定。所获得序列与HIV Database提供的HIV-1分型参考株序列使用Gene Cutter进行比对,用MEGA 5.03软件构建Neighbor-Joining(NJ)进化树。

1.5 假病毒的制备及功能鉴定 用PolyFect转染试剂将10 μ g含HIV膜蛋白表达质粒pcDNA3.1/v5-His-TOPO与20 μ g膜蛋白缺失的HIV骨架质粒pSG3 Δ Env共转染293T细胞,48h后,收集培养上清,用0.45 μ m的滤器过滤后1ml/管分装,-80 $^{\circ}$ C保存。将收获的假病毒以TZM-bl细胞进行滴定,培养48h后使用Bright-Glo发光试剂(美国Promega公司产品)进行感染性测定。

2 结果

2.1 HIV-1 gp160基因克隆及酶切鉴定 从HIV-1感染者血浆提取病毒RNA,经逆转录合成cDNA及PCR扩增获得gp160目的基因片段,连接至pcD-

NA3.1/v5-His-TOPO载体,取转化克隆摇菌提取质粒,XhoI和BamHI双酶切鉴定插入片段的大小,所得gp160基因片段长约为2.6Kb,与预期大小一致(图1)。



1:DNA Marker; 2:质粒XhoI和BamHI双酶切产物。

1: DNA Marker; 2: XhoI and BamHI digestion products

图1 HIV-1 gp160质粒酶切鉴定琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of HIV-1 gp160 plasmid restriction endonuclease digestion

2.2 HIV-1 gp160基因序列分析 将本研究克隆获得的9条HIV-1全长gp160基因序列和Los Alamos HIV数据库中HIV-1分型参考毒株序列进行系统进化树分析,结果显示新克隆毒株分别为我国HIV-1主要流行毒株B、CRF01_AE和CRF07_BC亚型,包括3个B亚型毒株(B25、B26、B27),2个01_AE亚型毒株(AE149、AE249)及4个07_BC亚型毒株(CH070、CH038、CH114、CH064)(图2)。

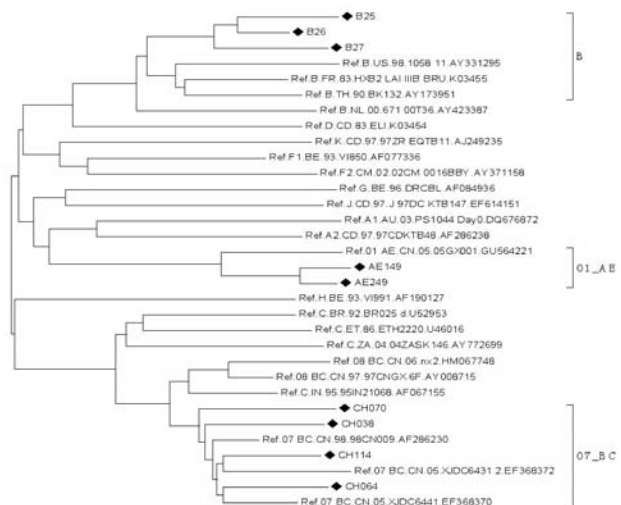


图2 HIV-1 gp160基因Neighbor-Joining(NJ)进化树分析

Figure 2 Phylogenetic analysis of HIV-1 gp160 genes by Neighbor-Joining(NJ) method

2.3 假病毒的制备及感染性测定 将含HIV-1功能

性膜蛋白基因 gp160 的表达质粒 pcDNA3.1/v5-His-TOPO 与膜蛋白基因缺失的 HIV 骨架质粒 pSG3 Δ Env 共转染 293T 细胞收获的假病毒以 TZM-bl 细胞进行滴定,结果表明所获得的假病毒具有良好的感染性,报告基因的相对发光单位(RLU)与假病毒的半数组织培养感染剂量(TCID₅₀)成正比(图3)。

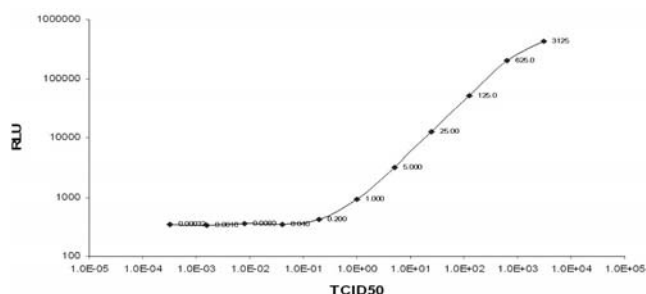


图3 功能性 HIV-1 gp160 克隆制备的假病毒滴定

Figure 3 Titration of HIV-1 pseudoviruses of functional gp160 clones

3 讨论

Env 蛋白在 HIV-1 病毒感染靶细胞方面具有重要作用^[8],是 HIV-1 中和抗体作用的主要靶位^[9-11]。Env 蛋白在 HIV-1 病毒感染进入靶细胞中的作用和其作为中和抗体作用的主要靶位的性质是其制备 HIV-1 假病毒颗粒进行中和抗体测定的基础。本研究克隆鉴定了我国 HIV-1 流行毒株的 9 个功能性 Env 蛋白基因,系统进化树分析表明包括 4 个 CRF07_BC、2 个 CRF01_AE 和 3 个 B 亚型毒株,这些 Env 蛋白基因所制备的假病毒具有良好的感染性。该方法简便易行,可以根据流行情况分离 HIV 流行株的膜蛋白基因,建立含不同基因亚型的假病毒库,为发展 HIV 抗体疫苗提供有效的筛选平台^[6-7]。

采用含 HIV 外膜蛋白的假病毒建立的中和测定技术具有许多优点:制备假病毒所用时间远少于从患者血 PBMC 中分离病毒时间,HIV 外膜蛋白的克隆稳定,以假病毒为基础的中和实验增加了实验结果的重复性和可靠性^[3]。本研究所采用的构建假病毒的方法中,由于需要 HIV 膜蛋白表达质粒与膜蛋白缺失的 HIV 骨架质粒共转染才能产生子代假病毒颗粒,其进一步感染细胞仅具有单轮感染能力,这样不仅安全,而且增加了实验的可重复性。TZM-bl 细胞对多数 HIV 病毒和 SIV 以及 SHIV 有高度敏感性,包括 HIV-1 原始分离株和假病毒。过去的 PBMC-ELISA 抗原捕获中和实验需进行烦琐的细胞冲洗以除去病毒抗原和血清抗 p24 抗体,要几轮病毒复制(通常 7 天),最后通过间接计量 p24 抗原分泌量的变化来计算样品的中和能力或毒株的中和敏感性,该方法费时,需要正常人 PBMC^[12],相比,假病毒 TZM-bl 细胞中和实验是一种操作简便、重复性好的实验方法。

本研究所使用的功能性 HIV-1 gp160 膜蛋白基因的克隆和鉴定方法,可快速筛选用于制备 HIV-1 假病毒颗粒的功能性 HIV-1 gp160 克隆,所克隆鉴定的我国 HIV-1 流行毒株的功能性膜蛋白 gp160 基因为选择具有特定抗原特征和中和特征的毒株进行 HIV-1 中和抗体测定提供了有价值的实验材料。

参考文献:

- [1] Montefiori DC, Karnasuta C, Huang Y, et al. Magnitude and breadth of the neutralizing antibody response in the RV144 and Vax003 HIV-1 vaccine efficacy trials[J]. J Infect Dis. 2012; 206(3): 431-41.
- [2] Doria-Rose NA, Klein RM, Daniels MG, et al. Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables[J]. J. Virol. 2010, 84(3): 1631-6.
- [3] Mascola JR, Souza PD, Montefiori DC, et al. Recommendations for the design and use of standard virus panels to assess neutralizing antibody responses elicited by candidate human immunodeficiency virus type 1 vaccines[J]. J. Virol. 2005, 79:10103-10107.
- [4] Nie J, Wang W, Wen Z, et al. Optimization and proficiency testing of a pseudovirus-based assay for detection of HIV-1 neutralizing antibody in China[J]. J. Virol. Methods. 2012, 185(2):267-75.
- [5] Hu XT, Hong KX, Zhao CH, et al. Neutralization pattern of HIV-1 subtype B' and CRF07_BC virus chronically infected individuals[J]. China Trop Med. 2011, 11(4):391-394. (In Chinese)
(胡新韬, 洪坤学, 赵春红, 等. HIV-1 B' 亚型及 CRF07_BC 重组毒株感染者中和反应特征分析[J]. 中国热带医学, 2011, 11(4): 391-394.)
- [6] Todd CA, Greene KM, Yu X, et al. Development and implementation of an international proficiency testing program for a neutralizing antibody assay for HIV-1 in TZM-bl cells[J]. J. Immunol. Methods. 2012, 375 (1-2):57-67.
- [7] Wang YC, Nie JH, Wu XL, et al. Establishment and application of pseudovirus detection platform[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2013, 33 (1): 40-46. (In Chinese)
(王佑春, 聂建辉, 吴雪伶, 等. 假病毒检测平台的建立以及应用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2013, 33(1): 40-46.)
- [8] Buchbinder A. The envelope of HIV-1 as a key component to infectivity [J]. Prog. AIDS Pathol. 1990, 2: 1-11.
- [9] Zolla-Pazner S. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies[J]. Nat. Rev. Immunol. 2004, 4(3):199-210.
- [10] Hu XT, Hong KX, Shao YM. Advance in identification and analysis of epitope specificities of broadly neutralizing anti-HIV-1 sera[J]. China TYrop Med. 2011, 11(5): 636-639. (In Chinese)
(胡新韬, 洪坤学, 邵一鸣. 抗 HIV 广谱中和血清表位特异性研究进展[J]. 中国热带医学, 2011, 11(5): 636-639.)
- [11] Kwong PD, Mascola JR. Human antibodies that neutralize HIV-1: identification, structures, and B cell ontogenies[J]. Immunity. 2012, 37(3):412-25.
- [12] Polonis VR, Brown BK, Rosa Borges A, et al. Recent advances in the characterization of HIV-1 neutralization assays for standardized evaluation of the antibody response to infection and vaccination[J]. Virol. 2008, 375(2): 315-20.