

ELISA 法分析 HIV - 1 整合酶的生物学活性

冯微宏, 黄建松, 詹金彪

(浙江大学医学院 生物化学与分子生物学教研室, 浙江 杭州 310058)

[摘要] 目的 建立一种能够较好地分析 HIV - 1 整合酶的生物学活性以及大规模地筛选整合酶抑制剂的方法。方法 HIV - 1 整合酶经表达复性及纯化后, 采用一种基于 Biotin - Avidin EILSA (BA - ELISA) 的方法, 使用化学发光底物测定分析整合酶的生物学活性, 以及 I 型核糖体失活蛋白 luffin - a 对整合酶的抑制作用。结果 ①采用 BA - ELISA 法得到整合酶的比活性为 54.92 U/mg 蛋白; ②luffin - a 对整合酶的半数抑制浓度为 $(0.63 \pm 0.026) \mu\text{mol/L}$ 。结论 本实验所采用的基于 BA - ELISA 的方法能够较好地分析 HIV - 1 整合酶的生物活性, 适合于大规模体外 HIV - 1 整合酶抑制剂的筛选。

[关键词] 整合酶类/遗传学; 人类免疫缺陷 I 型病毒; 生物活性; 酶联免疫吸附测定

[中图分类号] R 512.91 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008 - 9292(2007)02 - 0179 - 06

Analysis on bioactivity of HIV - 1 integrase by ELISA method

FENG Wei - hong, HUANG Jian - song, ZHAN Jin - biao (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

[Abstract] **Objective :** To develop an ELISA - based method for analyzing biologic activities of HIV - 1 integrase and for high throughput screening of integrase inhibitors. **Methods :** After expression, renaturation and purification of integrase, the bioactivity of integrase and the inhibition of luffin - a were evaluated with an *in vitro* assay based on biotin - avidin EILSA and chemiluminescent substrates. **Results :** (1) The specific activity of the purified integrase was 54.92 units/mg of protein. (2) IC_{50} (concentration causing 50% inhibition of integrase) of luffin - a was $(0.63 \pm 0.026) \mu\text{mol/L}$. **Conclusion :** The non - radioactive assay can be used for analysis of bioactivities and high throughput screening of inhibitors of HIV - 1 integrase.

[Key words] Integrases/genet; Human immunodeficiency virus type 1; Bioactivity; Enzyme - linked immunosorbent assay

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2007, 36(2): 179 - 184.]

整合酶是人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV) pol 基因 3'端编码的蛋白质^[1], 其能催化 HIV 逆转录合成的双链 cDNA 整合至宿主 DNA 上, 在 HIV 复制中起着关键的作用。整合酶在宿主(人体)细胞内没

收稿日期: 2006 - 03 - 28 修回日期: 2006 - 06 - 15

基金项目 国家自然科学基金(30670424)资助项目。

作者简介 冯微宏(1975 -), 男, 硕士生。

通讯作者 詹金彪(1962 -), 男, 教授, 从事分子生物学研究 E - mail: jzhan2k@zju.edu.cn

关键的作用。整合酶在宿主(人体)细胞内没有蛋白类似物,因此整合酶是艾滋病药物设计的一个很好的靶点。基于以上原因,发展一种快速简便的大规模筛选整合酶抑制剂的实验方法是非常急需的。国外报道了很多体外检测整合酶 3'端酶切及整合活性以及筛选整合酶抑制剂的实验方法,其中绝大多数使用放射性标记的病毒 DNA 底物,通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,放射自显影来测定反应产物^[2-3],这种方法非常耗时间,繁琐,而且有一定的环保问题。为此,本研究利用包含整合酶基因的高效表达的重组质粒 PT7-7-His-TX-WT-IN,在 *E. coli* BL21(DE3) 表达带有 His(组氨酸)标签的整合酶,并进行目的蛋白的纯化和复性,参考以前的文献,用一种基于 BA-ELISA(Biotin-Avidin ELISA)的方法进行整合酶活性实验,旨在为今后大量筛选整合酶抑制剂提供一个较为简便的途径。

1 材料和方法

1.1 材料 含 HIV-IN 的重组表达质粒 PT7-7-His-TX-WT-IN 由 Dr. S. Chow (School of Medicine, UCLA) 赠送。Luminol 购自生物晶美公司。Streptavidin-HRP 购自上海普飞生物公司。寡核苷酸链由生工合成,序列为 VU5BR (5'-Biotin-GTGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3') 和 VU5 (5'-ACTGCTAGAGATTTTCCACAC-3'), pBluescript SK(+) 质粒、*E. coli* BL21(DE3) 菌株,96 孔微量滴定板本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 整合酶的表达: 将 PT7-7-His-TX-WT-IN 质粒转化 *E. coli* BL21(DE3) 菌,涂板,37℃ 培养过夜,挑取 3 个单克隆接入 LB 培养基进行扩增,分别抽提质粒,用 *Bam*HI 及 *Nde*I 双酶切进行验证,取少量包含目的基因(约 900 bp)的单克隆扩增菌株,37℃ 过夜培养。过夜培养物 1:100 (v/v) 接种于 200 ml LB 培养基,37℃ 振荡培养至 OD₆₀₀ 值达到 0.8,加入 IPTG 至终浓度达 1 mmol/L,30℃ 诱导表达 5 h,6 000 × g,4℃ 离心 15 min 收集菌体。菌体沉淀重悬于缓冲液 A [20 mmol/L Tris-HCL (pH = 7.9), 0.5 mol/L NaCl, 10% 甘油, 2

mmol/L β-巯基乙醇] 中,其中另加 2 mmol/L PMSF, 0.2 mg/ml 溶菌酶, 0.1% Triton X-100, 重悬的菌液 4℃ 冰浴放置 30 min, 于冰浴中超声破碎细菌沉淀,加入 DNase I, 终浓度为 0.02 mg/ml, 冰浴放置 15 min, 20 000 × g, 4℃ 离心 15 min, 分别收集上清和沉淀。沉淀用缓冲液 A 加上 1% Triton X-100 及双蒸水各洗涤 3 次。

1.2.2 包含体的复性和纯化: 洗涤过的包含体用缓冲液 A 加 6 mol/L 盐酸胍溶解, 37℃ 放置 3~4 h 增溶。20 000 × g, 4℃ 离心 15 min, 取上清, 缓慢滴入 4℃ 预冷的缓冲液 A 500 ml 中, 冰浴中轻摇过夜复性, 复性液于 4℃, 20 000 × g 离心 15 min, 取上清液过预先已平衡过的 Ni-NTA 柱, 然后依次用含 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.2、1.0 mol/L 咪唑的缓冲液 A 进行连续梯度洗脱, SDS-PAGE 鉴定收集峰, 合并含表达产物的洗脱液。将收集的洗脱液对缓冲液 B [20 mmol/L Tris-HCL (pH = 7.9), 0.5 mol/L NaCl, 10% 甘油, 1 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT] 进行透析过夜后, 用蔗糖干粉浓缩 3 倍, 用 Bradford 法测定蛋白浓度, 置于 -70℃ 保存。

1.2.3 DNA 包被实验及二种 ELISA 底物的比较: 为测试 96 孔微量滴定板包被双链 DNA 的能力, 用合成的 21 聚寡核苷酸^[4] 溶解在不同 NaCl 浓度 (0.1 mol/L、0.5 mol/L、0.75 mol/L、1 mol/L、2 mol/L、3 mol/L、4 mol/L) 的缓冲液 C (20 mmol/L Tris-HCL (pH = 7.4), 2 mmol/L EDTA) 中, DNA 的终浓度为 2 μg/ml。将 DNA 溶液加入 96 孔板中, 每孔 100 μl, 37℃ 包被 2 h, 然后用 PBST (1 × PBS, 含 0.1% Tween-20) 洗板 3 次, 用 250 μl 1% BSA (1 × PBS 溶解) 37℃ 封闭 1 h, 再用 PBST 洗板 3 次, 加入 100 μl TMB 或 Luminol 后, 酶标仪读取数值。

1.2.4 整合酶活性实验: 首先将靶 DNA 包被在 96 孔板中, 然后加入生物素标记的供体 DNA 及整合酶。整合酶从生物素标记的 3'端切割掉 2 个核苷酸-GT, 接着将处理过的供体 DNA 整合接入包被的靶 DNA 中, 形成稳定的复合物, 使 96 孔板上包被的 DNA 携带生物素标记, 可以被链亲和素标记的辣根过氧化物酶所检测到^[5]。实验过程如图 1 所示。

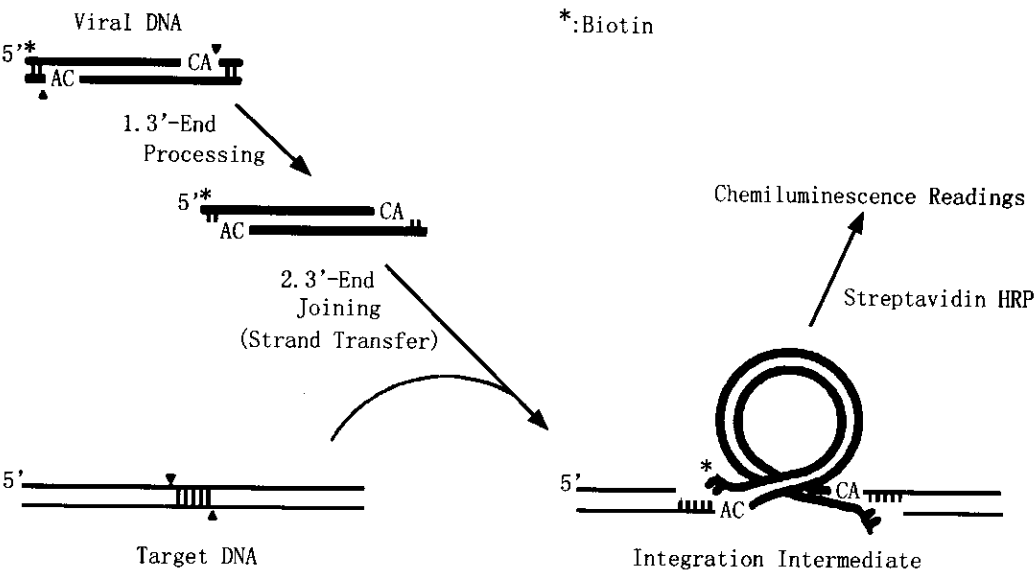


图 1 整合酶实验过程示意图

Fig. 1 Schematic illustration of the integrase assay procedure

1.2.5 整合酶反应条件及活性单位定义:活性实验按照文献^[6-7]中的方法进行,作少许修改。反应条件为:30 mmol/L Tris - HCl (pH 7.4)、15 mmol/L MnCl₂、100 μg/ml BSA、1% 甘油、10 mmol/L DTT、20 mmol/L NaCl,和 0.5 mmol/L CHAPS,反应温度为 37℃。我们把病毒 DNA 起始浓度为 50 pmol/L 时,每分钟催化合成 1 nmol 整合产物所需的整合酶量定义为整合酶的 1 个活性单位,整合酶的比活性单位定义为活力单位 U/mg 蛋白。

1.2.6 受体 DNA(宿主 DNA)的准备:将含有 pBluescript SK(+)质粒的 JM105 菌株接种入 5 ml LB 中,37℃ 扩增培养,提取 pBluescript SK(+)质粒,用 SmaI 单酶切使之线性化。回收的酶切产物 DNA 溶解在缓冲液[20 mmol/L Tris - HCL(pH 7.4),20 mmol/L EDTA,2 mol/L NaCl]中,DNA 终浓度为 2 μg/ml,加入 96 孔板中,每孔 100 μl,37℃ 包被 2 h。

1.2.7 供体 DNA(病毒 DNA)的准备:由生工合成的 2 条单链 21 聚体寡核苷酸溶解在缓冲液[10 mmol/L Tris - HCL(pH 7.4),1 mmol/L EDTA,0.1 mol/L NaCl]中,生物素标记链与未标记链以摩尔比 1: 2 混合,80℃ 加热 5 min,室温放置 30 min 退火形成双链。存于 -20℃。

1.2.8 整合酶活性实验:将包被好的 96 孔板用 PBST 洗 3 次,250 μl BSA 37℃ 封闭 1 h,再

用 PBST 洗板 3 次,每孔加反应混合物[30 mmol/L Tris - HCl (pH 7.4),15 mmol/L MnCl₂,100 μg/ml BSA,1% 甘油,10 mmol/L DTT,20 mmol/L NaCl,和 0.5 mmol/L CHAPS,另加不同量生物素标记的供体 DNA 及不同量的整合酶]150 μl。混合物在 37℃ 温育 1 h,PBST 洗板 3 次,每孔再加入 100 μl 链亲和素标记的辣根过氧化物酶(1 × PBS 1: 4 000 稀释)37℃ 温育 1 h,PBST 洗板 3 次,每孔加 100 μl Luminol,静置 10 min 后,荧光酶标仪测定化学发光强度。

1.2.9 整合酶抑制实验:基本步骤同 1.2.5,但在反应混合物中加入不同量的整合酶抑制剂 luffin - a,对照孔不加 luffin - a,反应结束后,荧光酶标仪测定化学发光强度。

1.3 统计学处理在 2 种 ELISA 底物的比较实验中,使用线性回归分析两者的相关关系,用 R²及相关性系数 t 检验表示相关的显著性。在整合酶活性实验中,整合酶浓度和产物浓度的关系用线性回归进行分析,用 R²及相关性系数 t 检验表示相关的显著性。在整合酶抑制实验中,使用 SPSS 软件的 Probit 程序计算其 IC₅₀ 值。

2 结果

2.1 整合酶的表达及纯化PT7 - 7 - His - IN

质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3) 菌后,挑单克隆培养后抽提质粒,用 *Bam*HI 及 *Nde*I 双酶切后,有一条 900 bp 的目的条带被切下,与重组质粒图谱(图 2)中的长度相符。经 IPTG 诱导后,与对照菌相比,PT7-7-His-IN 表达菌在约 33 Mr 左右有一明显的特异性表达带,与文献报道的整合酶分子量及蛋白质数据库查询结果相同;而且细胞内的整合酶绝大多数以包含体形式表达,30℃ 时的表达量明显大于 37℃ 时(结果未列出)。包含体经 3 次洗涤,可洗去部分杂蛋白,起到一定的纯化作用。用含 6 mol/L 盐酸胍的缓冲液 A 处理包含体,可使其变性溶解。变性溶解液采用稀释复性,稀释于 100 倍体积的缓冲液 A 中,过夜后,离心后上清进行镍柱层析纯化。用含不同浓度咪唑的缓冲液 A 洗脱,咪唑浓度为 0.2 mol/L 时可将目的蛋白完全洗脱。SDS-PAGE 分析,蛋白纯度较高,用蔗糖浓缩后,用 Bradford 法测定蛋白浓度为 445 mg/L。总的整合酶产量为 11.867 mg/L 培养物。蛋白表达及纯化结果见图 3。

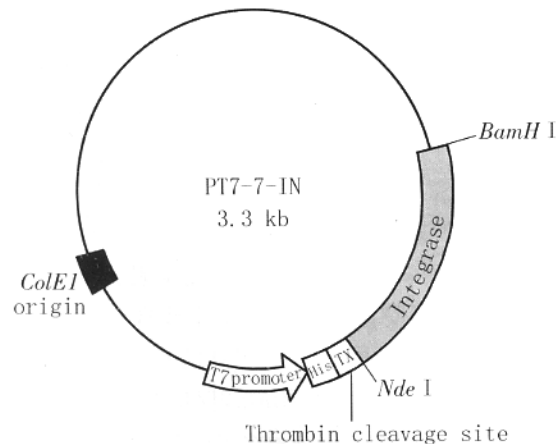


图 2 PT7-7-His-IN 质粒图谱
Fig. 2 Plasmid map of PT7-7-IN

2.2 DNA 包被实验及 2 种 ELISA 酶底物的比较 当 NaCl 的浓度增加时,DNA 的吸附量逐渐增加,但当 NaCl 的浓度达到或大于 1 mol/L 时,DNA 的吸附量达到饱和。使用化学发光底物 Luminol 和常规 ELISA 底物 TMB 进行对比,结果如表 1 所示,对化学发光强度和 OD₄₅₀ 值进行线性回归分析,两者有较强的线性相关

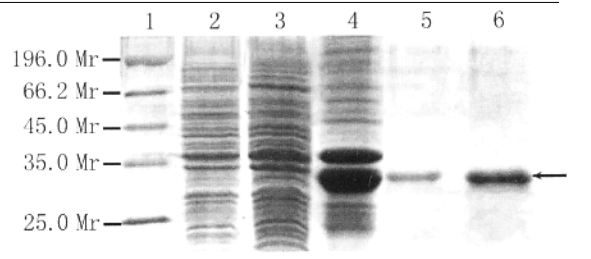


图 3 整合酶蛋白表达及纯化结果
Fig. 3 Expression and purification results of integrase

After induced with IPTG,the bacteria containing plasmid PT7-7-IN were collected and lysed. After sonication,the supernatant and pellets of lysates were run on 12% SDS-PAGE. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue for two hours. Lane 1 :molecular mass marker. Lane 2 :uninduced lysates of BL21 (DE3). Lane 3 :supernatants of sonication. Lane 4 :pellets of sonication. Lane 5 :purified and renatured integrase. Lane 6 :concentrated integrase. An arrow indicates the purified integrase

表 1 不同 NaCl 浓度对 DNA 吸附量的影响
Table 1 Effect of various NaCl concentra - tions on binding of duplex DNA onto micro-plate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

NaCl/ (mol · L ⁻¹)	化学发光单位 (Luminol)	OD ₄₅₀ (TMB)
0.1	255 ± 12	/
0.5	696 ± 50	0.098 ± 0.015
0.75	811 ± 70	0.191 ± 0.0179
1	1065 ± 45	0.259 ± 0.0158
2	1113 ± 38	0.270 ± 0.0128
3	1166 ± 65	0.275 ± 0.024
4	1198 ± 51	0.281 ± 0.026

Luminol :化学发光法 ;TMB :TMB 显色法 ($R^2 = 0.935, P < 0.05$, correlation coefficient *t* test)

性($R^2 = 0.935, P < 0.05$)。
2.3 整合酶活性实验
2.3.1 整合酶浓度和产物浓度的关系:当整合酶的量 为 17 ~ 67 pmol 时,回归分析显示化学发光强度与整合酶浓度呈线性相关 ($R^2 = 0.971, P < 0.01$),见图 4。因此,这种整合酶实验可以检测到低至 17 pmol 的整合酶。通过整合酶浓度和产物浓度的关系曲线,我们计算得

到所纯化的整合酶的比活性为 54.92 U/mg 蛋白。

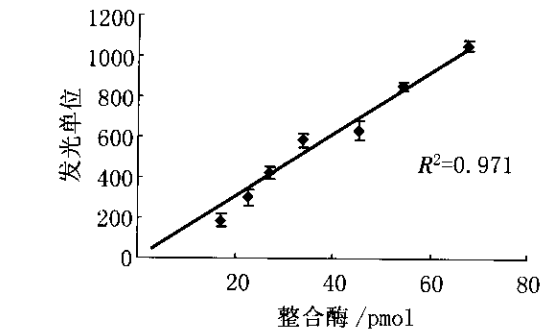


图 4 整合酶剂量依赖性曲线

Fig. 4 Luminescence intensity as a function of integrase amount

A enzyme dose - dependent curve was run using HIV - 1 integrase (17 ~ 67 pmol) and 50 pmol biotin - labeled donor DNA substrate. Incubation was done in 37℃ for 1 hour using the indicated amount of integrase ($\bar{x} \pm s$)

2.3.2 luffin - a 对整合酶的抑制作用分析

图 5 是 luffin - a 对整合酶的剂量效应曲线,通过统计软件 SPSS 分析,luffin - a 对整合酶的半数抑制浓度 IC_{50} 为 $(0.63 \pm 0.026) \mu\text{mol/L}$ 。

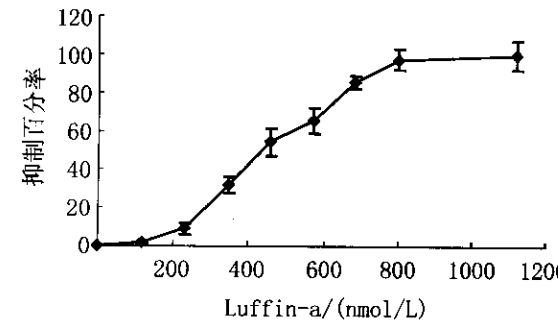


图 5 luffin - a 对 integrase 的抑制率曲线

Fig. 5 Dose - response curve for inhibitions of HIV - 1 integrase by luffin - a

3 讨论

HIV - 1 整合酶是介导病毒 DNA 整合进入宿主 DNA 的关键酶。这一整合反应对于病毒

感染宿主细胞及在宿主细胞内的复制是必不可少的。现在普遍是用放射性方法来测定整合酶活性及筛选整合酶抑制剂,但这种方法比较繁琐,且有一定危险性。在本试验中,我们参考了以前的文献^[6],采用一种简便的,非放射性的方法来测定整合酶的活性。这种方法类似于 BA - ELISA,用生物素 - 链亲和素体系来检测残留在酶标板孔内的 DNA。实验证明,微量滴定板可以包被双链 DNA,DNA 产生最大吸附量的饱和浓度大约是 $2 \mu\text{g/ml}$,且吸附量与 DNA 溶液中的 NaCl 浓度有相关性,当 NaCl 达到某一浓度 (1 mol/L) 后,吸附量达到平台期,不再增加。另外,硫酸铵存在时也能显著增加 DNA 的吸附。微量滴定板吸附 DNA 的原理在于它和 DNA 的疏水性相互作用,因此 Na^+ 、 NH_4^{++} 等阳离子的存在可能是增强了两者的疏水相互作用^[10]。Speel 等^[11]曾证实,生物素 - 链亲和素 (亲和素) 体系在检测 DNA 原位杂交时具有高度敏感的特点。在本试验中,我们作了一般 ELISA 底物 TMB 和化学发光底物 luminol 的比较,结果显示这 2 种方法有较强线性相关性,而且化学发光法比 TMB 显色法具有更高的敏感度和线性检测范围^[12],因此,我们决定用发光底物作整合酶活性实验。当然,在作整合酶抑制剂筛选的定性实验时,也可使用 TMB 代替 Luminol 作为底物。从整合酶剂量依赖性曲线分析,该种 ELISA 法可以检测到低至 17 pmol 的整合酶,这比用放射性方法所能检测到的下限 70 ng (约 30 pmol) 更低^[13],因此也更灵敏。整合酶抑制实验所得的 luffin - a 的半数抑制浓度 IC_{50} 与文献报道的 $0.53 \mu\text{mol/L}$ 相近^[14],该文献中采用了相似的 ELISA 方法,只是用了碱性磷酸酶及荧光底物系统,这说明本研究采用的化学发光底物系统和荧光底物系统有着相近的敏感性。

本实验中定义了整合酶的国际单位,这为今后衡量整合酶以及整合酶抑制剂的生物活性提供了标准。因为该 ELISA 试验中包含了整合酶反应的 2 个步骤 3' 酶切以及病毒 DNA 整合,所以 luffin - a 究竟抑制整合反应的哪一步抑或是对二个步骤都有抑制作用还无法确定。此外,值得注意的是,目前还没有实验证据表明在活体细胞内 luffin - a 具有抑制 HIV - 1 的作用,这有待于以后实验中进一步解决。

总之,该整合酶活性实验步骤简化,操作方便,能够较好地分析 HIV-1 整合酶的生物活性,适合于大规模体外 HIV-1 整合酶抑制剂的筛选。

References :

- [1] PETTIT S C, EVERITT L E, CHOUDHURY S, et al. Initial cleavage of the human immunodeficiency virus type 1 gagpol precursor by its activated protease occurs by an intramolecular mechanism [J]. *J Virol*, 2004, 78(8) : 8 477 - 8 485.
- [2] BUSHMAN F D, CRAIGIE R. Activities of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Integration Protein In vitro : Specific Cleavage and Integration of HIV DNA [J]. *PNAS*, 1991, 88(3) : 1 339 - 1 343.
- [3] ENGELMAN A, MIZUUCHI K, CRAIGIE R. HIV-1 DNA integration : mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer [J]. *Cell*, 1991, 67(6) : 1 211 - 1 221.
- [4] CRAIGIE R, MIZUUCHI K, BUSHMAN F D, et al. A rapid in vitro assay for HIV DNA integration [J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(10) : 2 729 - 2 734.
- [5] CHOW S A. In vitro assay for activities of retroviral integrase. *Methods*, 1997, 12 : 306 - 317.
- [6] CHANG Y C, CHING T T, SYU W J. Assaying the activity of HIV-1 integrase with DNA-coated plates [J]. *J Virol Methods*, 1996, 59(1-2) : 135 - 140.
- [7] PEMBERTON IAIN K, BUCKLE MALCOLM, BUCHENRI. The metal ion-induced cooperative binding of HIV-1 integrase to DNA exhibits a marked

preference for Mn(II) rather than Mg(II) [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(3) : 498 - 1 506.

- [8] NOVAK R, RAGLAND W L. Competitive DNA hybridization in microtitre plates for chicken anaemia virus [J]. *Mol Cell Probes*, 2001, 15(1) : 1 - 11.
- [9] XU Xiao-rong, ZHAN Jin-biao, XIA Zheng (徐小蓉, 詹金彪, 夏 铮). Cloning and expression of luffin - a gene from the seeds of *Luffa cylindrica* [J]. *Journal of Zhejiang University : Medical Sciences* (浙江大学学报 : 医学版), 2005, 34(3) : 207 - 211. (in Chinese)
- [10] INOUE S, HONDO R. Microplate hybridization of amplified viral DNA segment [J]. *J Clin Microbiol*, 1990, 28(6) : 1 469 - 1 472.
- [11] SPEEL E J, SCHUTTE B, RAMAEKERS F C, et al. The effect of avidin-biotin interactions in detection systems for in situ hybridization [J]. *J Histochem Cytochem*, 1992, 40(1) : 135 - 141.
- [12] IWATA R, HAYASHI T, NAKAO Y, et al. Direct determination of plasma endothelin-1 by chemiluminescence enzyme immunoassay [J]. *Clin Chem*, 1996, 42(8) : 155 - 1 158.
- [13] RANK K B, FAN N, SHARMA S K. A rapid and quantitative assay for inhibition of 3' cleavage activity of HIV-1 integrase [J]. *Antiviral Res*, 1997, 36(1) : 27 - 33.
- [14] AU T K, COLLINS R A, LAM T L, et al. The plant ribosome inactivating proteins luffin and saporin are potent inhibitors of HIV integrase [J]. *FEBS Lett*, 2000, 471(2-3) : 169 - 172.

[责任编辑 黄晓花]

香港六高校与我校签订 10 项校际合作协议

由校长杨卫院士率领的浙江大学代表团,于 2007 年 1 月 15 ~ 18 日,分别访问了香港大学、香港中文大学、香港科技大学、香港理工大学、香港城市大学以及香港浸会大学,并与六校签订和续签了 10 项校际合作协议。

这 10 项合作协议包括:“浙江大学-香港大学学术合作协议”;“香港中文大学-浙江大学学术交流协议”;“浙江大学-香港科技大学学术交流协议”;“浙江大学-香港中文大学天然药物与生物毒素联合研究中心协议书”;“浙江大学-香港理工大学国际创新产品设计中心合作协议”;“Memorandum of Understanding on Joint Center for Advanced Photonics Research of The Chinese University of Hong Kong and Zhejiang University”,以及多项学生交流协议。此外,我校还将与香港大学在软件科学、医学,与香港中文大学在生物生殖学、儒商学和非形式教育,与香港科技大学在合作培养博士后,与香港城市大学在中国研究等方面开展合作。