

应用聚合酶链反应突变和克隆 HIV-1 gag 基因片段

吉昌华 苏成芝 阎小君

(第四军医大学生物化学教研室, 西安 710032)

R373.9

提 要

作者设计并合成了一对突变引物PG01和PG02, 分别在两引物中设计了两个突变点, 使突变后基因含有EcoRI、BamHI和ATG及TAA序列, 以便于HIV-1 gag基因序列的定向克隆和表达。用PG01和PG02作引物, 采用PCR方法从HIV-1基因组DNA中扩增出一个长504bp的DNA片段, 用EcoRI和BamHI双酶切位点将此片段定向克隆入pUC19质粒。将克隆基因插入M13mp18进行DNA序列分析, 结果表明, 该基因序列及读框完全正确, 且在其5'末端突变出EcoRI位点和ATG起始码, 3'末端突变出TAA终止码和BamHI位点, 从而为该基因的表达研究奠定了基础。

关键词: 人免疫缺陷病毒 聚合酶链反应 克隆 突变 序列分析
限制性内切酶

免疫缺陷病毒

艾滋病是一种严重的传染病。目前仍无有效的治疗药物和预防疫苗。87年, Sarin等人提出, HIV-1gagP17蛋白是一种具有潜力的疫苗⁽¹⁻³⁾。他们合成了一段P17多肽HGP-30, 研究发现, 抗HGP-30的抗体能中和病毒感染。Gelderblom等人应用免疫金电镜技术, 通过HGP-30抗体显示HIV病毒表面被标记上抗体⁽⁴⁾。从而证实P17蛋白部分暴露于HIV表面。1988年, 英国政府已批准对HGP-30疫苗进行人体试验, 由Brian Gazzard博士领导这次对感染和非感染自愿者进行的试验⁽⁵⁾。由于HGP-30为化学合成多肽, 成本昂贵。本文拟对此多肽进行基因工程生产, 因其太小不利于表达, 故我们将包括HGP-30序列在内的一段gag基因克隆入表达质粒, 以期在大肠杆菌中表达。克隆基因长度约480bp, 包括大部分P17和小部分P24基因。其编码蛋白大小约20KD, 称为P20蛋白。

材 料 与 方 法

材 料

X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷); 5%溶于二甲基甲酰胺。IPTG (异丙基 β -D-硫代半乳糖苷); 100mmol/L水溶液, 华美生物工程公司。Sequenase DNA Sequencing kit; 美国USB公司。 α -³²PdATP; 美国进口。基因工程酶类: 华美生物工程公司。Taq DNA聚合酶:

本文于1991年8月13日收到, 12月20日修回。

结 果

一、P₂₀基因的体外扩增

本文设计了一对突变引物PG01和PG02, 其序列分别为GGGAAAGAATTCGGTTAATGCC(22nt)和GTGGGGTGGATCCTTATGAT(20nt)。正链引物PG01中有两个突变点, 用以产生一个EcoRI识别序列GAATTC和一个起始码ATG。在负链引物PG02中有两个突变碱基, 用以产生BamHI识别序列和TAA终止码。以pJG423为模板, 在Taq DNA聚合酶的介导下, 经30次PCR循环, 得到一个大小为504bp的DNA片段(图2)。

二、P₂₀基因的克隆

P₂₀基因扩增产物经EcoRI和BamHI双酶解后插入pUC19质粒, 转化JM103宿主菌, 得到重组质粒pCY52。酶切结果证实插入基因正确(图3)。

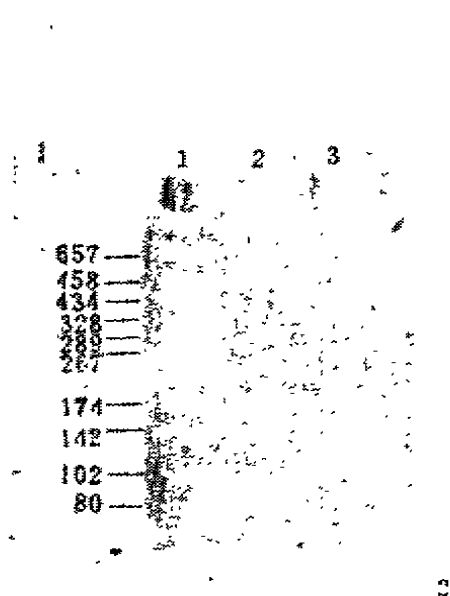


图2 HIV-1 gag p20 基因片段的体外扩增。

1. 小分子量DNA标准物;
2. 扩增的p20基因片段;
3. 扩增的 β -珠蛋白基因片段(作为对照)。

Fig.2 Amplification of HIV-1 gag P20 gene fragment by polymerase chain reaction.

1. DNA molecular weight marker;
2. Amplified P20 gene fragment;
3. β -globin gene fragment amplified as a control.

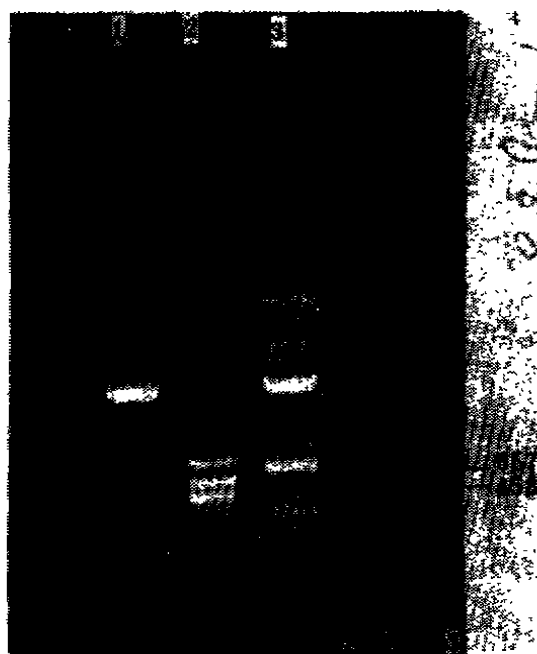


图3 pCY52 质粒的酶切鉴定

1. 用HindIII消化PCY52质粒DNA切下一个0.25kb大小的DNA片段;
2. DNA标准物;
3. 用EcoRI和BamHI双酶切PCY52切下插入片段。

Fig.3 Identification of pCY52 by endonuclease digestions

1. PCY52 digested with HindIII;
2. DNA marker;
3. PCY52 digested with EcoRI and BamHI.

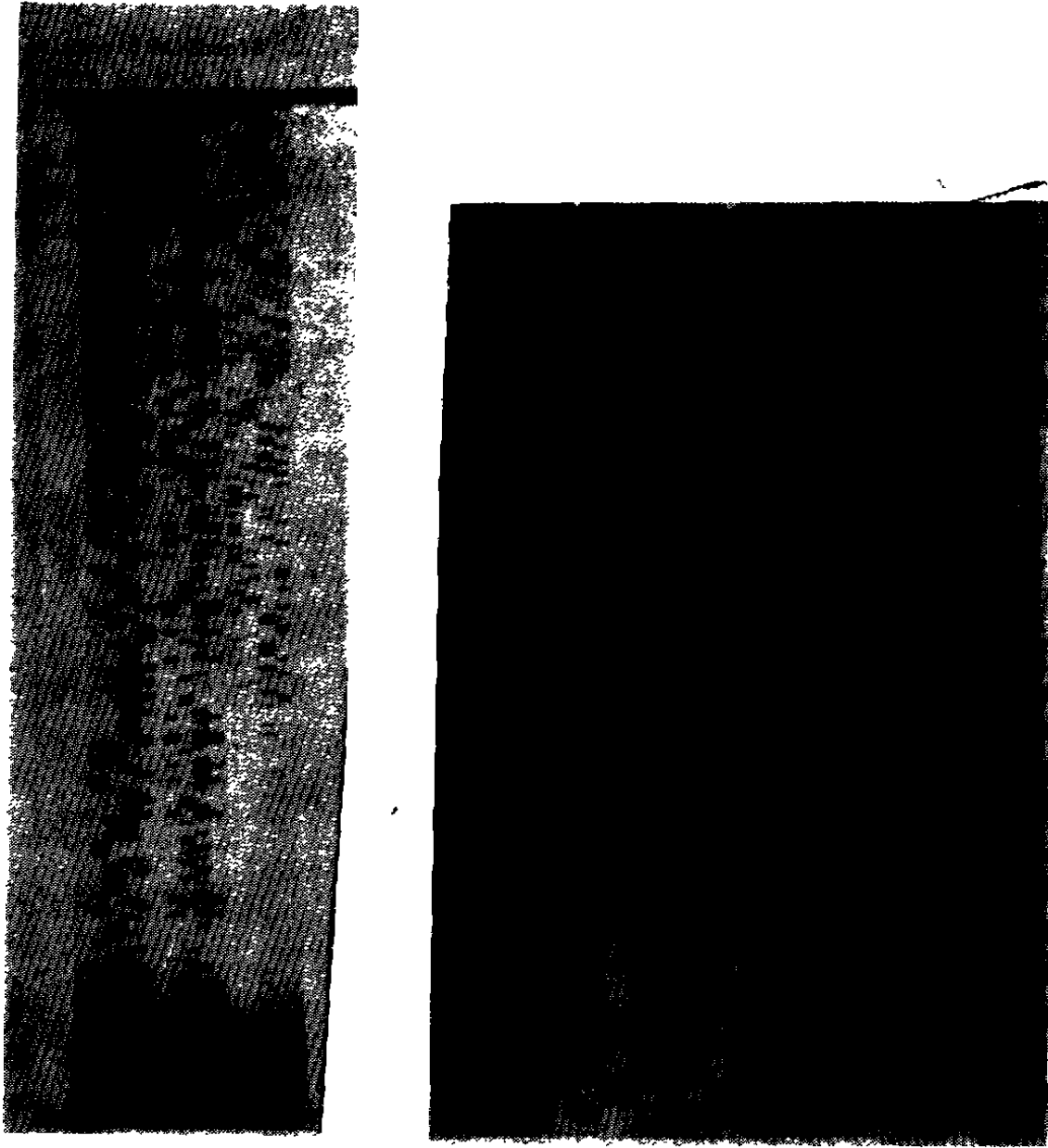


图 4 P20基因的序列分析结果

1. P20基因的序列分析图; 2. PG01序列; 3. PG02和多克隆位点序列。

Fig.4 Sequence analysis of P20 gene

1. Results of the sequence analysis of P20 gene;

2. The PG01 sequence

3. The PG02 and multicloning site sequence.

三、P20基因插入M13mp18

从pCY52中用EcoRI和BamHI切下P20基因片段, 插入M13mp18得到重组菌体MBmp18PG0.5。用HindIII消化M13mp18PG0.5, 切下P20基因的后半部, 回收大片段, 自身环化。得到含前半P20基因的重组噬菌M13mp18PG0.25。

四、P20基因序列分析

用M13mp18PG0.5和M13mp18PG0.25两个重组噬菌单链DNA进行序列分析, 结果显示, 用上述两个重组M13克隆, 读完了P20蛋白编码基因, 共471bp。并测定出5'和3'部分引物序列和多克隆接头序列(图4)。序列分析结果表明, 所克隆P20基因序列完全正确, 其两侧引物序列突变完全成功(图5)。

```

      5'           EcoR I           3'
PG01 GGGAAAGAAATTCGGTTAATGCC
                                     ATGCCAGGGGGAAAGAAAAAA
                                       ProGlyGlyLysLysLys
                                           60
TATAAGTAAAAACATAGTAGGGCAAGCAGGCAGCTAGAA
TyrLysLeuLysHisIleValTrpAlaSerArgGluLeuGlu
                                           100
CGATTCCGCACTCAATCCTGCCCTGTTAGAAAAGATCAGAA
ArgPheAlaValAsnProGlyLeuLeuGluThrSerGlu
Pst I
GGCTGCAGACAAATATTGGGACAGCTACAGCCATCCCTTCAC
GlyCysArgGlnIleLeuGlyGlnLeuGlnProSerLeuGln
                                           150
ACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATAATATACAGTAGCA
ThrGlySerGluGlnLeuArgSerLeuTyrAsnThrValAla
                                           200
ACCCCTCTATTGTGTACATCAAAGCATAGATGTAAAAGACACC
ThrLeuTyrCysValHisGlnArgIleAspValLysAspThr
HGP-30
Hind III           250
AACCAAGCTTTAGAAAAGATAGAGGAAGAGCAAAAACAAAAGT
LysGlnAlaLeuGlnLysIleGlnGlnAsuLysSer
Pst I           300
AACAAAAAGGCACACCAAGGAGCAGCTGCAGCTGGACACCA
LysLysLysAlaGlnGlnAlaAlaAlaAlaAlaGlyThrGly
                                           350
AACAGCGGGAGGTGAGCCAAAATTAGGCTATAGTGCAGAAC
AsnSerSerGlnValSerGlnAsnTyrProIleValGlnAsn
→P20
CTACAGGGGCAAAATGGTACATGCCCATATCACCTAAACT
LeuGlnGlyGlnMetValHisGlnAlaIleSeroArgThr
                                           400
TTAAATGATCGGTTAAAAGTAGTAGAAGAAAAGGCTTTCAGC
LeuAsnAlaTrpValLysValValGlnGlnLysAlaPheSer
                                           450
CCAGAAGTAATACCGATGTTTTTCAGCATTATCATAA
ProGluValIleProMetPheSerAlaLeuSer
3' BamH I 5'
TACTTTCCTAGGTGGGCTG PG02

```

图5 P20基因序列

PCR引物PG01和PG02及限制酶切点均列出, 虚线所围为HGP-30序列。

Fig.5 Sequence of P20 gene fragment

The PCR primers PG01 and PG02 and the restriction enzyme sites were shown, HGP-30 sequence was indicated in broken line box.

讨 论

DNA克隆是基因工程和基因分子生物学的重要内容。DNA克隆需要有合适的限制酶切点。但是,通常在欲克隆基因的两端没有合适的限制酶切点。在这种情况下,就必须采用定点突变技术在适当的位置上创造一个内切酶位点。若该基因要表达,则还要突变出起始和终止码序列。以前常规采用单链突变技术来进行体外定位突变。该方法繁琐复杂,且耗时较长。本文采用PCR方法进行体外突变,只要在两引物中设计一定的限制酶切点和起始、终止码,应用PCR方法就能在1~2天内将目的基因克隆入适当的载体。克隆成功率高,筛选容易^[7]。

文献报道多在引物的5'端加上限制酶识别序列及起始、终止码。PCR引物的长度一般为20~30bp^[8],如再加上限制酶切点及起始或终止码序列,则其长度达到30~40bp。本文所设计的两个突变引物PG01和PG02,利用其合适的序列,经改变一个碱基就制造出一个限制酶位点或起始、终止码。从而大大缩短了引物的长度(各缩短11个碱基)。

对PCR产物直接进行克隆,需考虑Taq聚合酶的错配率问题。在PCR产物的反复合成过程中,可能会出现碱基的错误掺入。最早用于PCR的DNA聚合酶是Klenow片段^[9],其错配率约为 8×10^{-4} bp,Taq DNA聚合酶的错配率略高于Klenow大片段,大约为 10^{-4} bp。Krawczak研究发现,只要起始模板的数量足够大,一般可以忽视PCR过程中发生的复制错误^[10]。本文应用PCR突变方法克隆了P20基因,其长度为504bp。结果所挑选阳性克隆的P20基因的DNA序列完全正确,未发生错配。这可能是因为投入的模板DNA量足够大的缘故。

参 考 文 献

- [1] Sarin PS, et al., 1986, *Science*, 232:1135-7.
- [2] Naylor PH, et al., 1987, *PNAS*, 84:2951.
- [3] Boucher CAB, et al., 1990; *J. Clin. Lab. Anal.*, 4:43.
- [4] Sama PS, et al., 1988; *J. Natl. Cancer Inst.*, 80:193.
- [5] Newmark P., 1986, *Nature*, 332:770.
- [6] 吉昌华等, 1989, 第四军医大学学报, 10(6):427.
- [7] Scharf SJ, et al., 1986, *Science*, 233:1075-8.
- [8] Saiki RK, et al., 1988, *Science*, 239:487-91.
- [9] Saiki RK, et al., 1985, *Science*, 230:1350-4.
- [10] Krawczak M, et al., 1989, *Nucleic Acids Res.*, 17:2197.

Mutagenesis and Cloning of HIV-1 gag Gene Fragment by Polymerase Chain Reaction

Ji Chang-hua Su Cheng-zhi Yan Xiao-jun

(Department of Biochemistry, The Forth Military Medical University,
Xi'an 710032)

In the present paper, the primers PG01 and PG02 were synthesized in which the EcoRI and BamHI recognition sites as well as the initiation and termination codons were designed for convenience of subsequent cloning and expression. Micrograms of target gene sequence was produced by 30 rounds of amplification with pJG 423 as a template. The amplified gene fragment was digested with both EcoRI and BamHI and ligated to pUC19 predigested with the same restriction endonucleases. The recombinant plasmid pCY52 was identified and the cloned P20 gene was inserted into phage M13mp18 for sequence analysis. It was revealed that the sequence of the cloned P20 gene (471bp) was identical to its template. And the site mutations at both the 5' and 3' ends were also successful.

Key words: Human immunodeficiency virus Polymerase chain reaction Cloning Sequence analysis Mutagenesis Restriction enzyme