

154-157

6049(8)

第8卷第2期
1993年6月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 8 No. 2
Jun. 1993

用 PCR 突变技术克隆艾滋病病毒蛋白酶基因

闰小君 苏成芝 吉昌华

(第四军医大学生化教研室, 西安 710032)

提 要

R373.9

作者设计并合成了一对用于PCR技术的突变引物HIV-1 Pr1和HIV-1 Pr2, 分别在两引物中设计了两个突变点, 使突变后基因含有EcoRI、Hind III和TAA序列, 便于HIV-1 Pr基因的定向克隆和表达。用HIV-1 Pr1和HIV-1 Pr2作引物, 采用PCR方法从HIV-1基因组DNA中扩增出了一个360bp长的DNA片段, 用EcoRI和Hind III双酶切法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, 该基因序列的读框完全正确, 从而为HIV-1 Pr基因的表达及抑制剂的研究奠定了基础。

关键词: 人免疫缺陷病毒 聚合酶链反应 基因克隆 基因突变

~~免疫缺陷病毒~~

艾滋病

获得性免疫缺陷综合症 (Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 是由人类免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 引起的⁽¹⁾, 该病毒在复制时, 其mRNA先翻译出3种多聚蛋白质即Pr55gag-pol, Pr160gag和gp160, 其中前两种多聚蛋白质在HIV基因编码的特异蛋白酶 (Protease, Pr) 的作用下, 分解生成HIV成熟所必须的4种核心蛋白质和4种酶^(2,3), 如果HIV Pr缺失, 含量减少或突变后失活, HIV则不能正常包装和成熟, 并且没有感染能力^(4,5)。所以研究HIV Pr的结构、活性以及其特异抑制物已成为HIV分子生物学研究领域中的又一热点, 是人们征服艾滋病的又一关键环节。由于HIV Pr完整基因难以得到, 加之天然的HIV基因上没有合适的酶切位点可加以利用, 故本文拟用PCR突变技术体外扩增并修饰HIV-1 Pr基因。

材 料 和 方 法

一、材料

1. 质粒和菌种pUC19质粒: 2686bp, 含有一个54bp的多克隆位点接头, β -半乳糖苷酶基因插入失活, 氨苄青霉素 (Amp) 抗性, M13mp18噬菌体DNA: 7250bp, 含有一个54bp的多克隆位点接头, β -半乳糖苷酶基因插入失活。JM103细菌: Δ (lac pro), thi, strA, supE, endA, sbcB, hsdR-, F (tra D36, PrDAB, JacJ 8, Z Δ M15)。

2. 仪器 PCR自动反应仪: 西安骊山微电子有限公司-第四军医大学的产品。DNA序列分析仪: 美国LKB公司的产品。

本文于1992年11月9日收到修1993年1月5日修回。

3. 试剂 X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷): 5%溶于二甲基酰胺, IPTG (异丙基 β -D-硫代半乳糖苷): 100mmol/L水溶液, 华美生物工程公司生产。Sequenase DNA Sequencing kit: 美国UBS公司产。 α -32P-dATP: 美国进口。基因工程酶类: 华美生物工程公司产品。Taq DNA聚合酶: 复旦大学产品。

二、方法

1. 寡核苷酸引物的合成和纯化 采用亚磷酸胺法在ABI Applied Biosystem公司DNA合成仪381A型上合成。人工合成引物采用聚丙烯酰胺凝胶变性电泳进行纯化。

2. PCR反应 扩增模板为含HIV-1 gag及大部分pol基因的pJG423质粒DNA^[6], 使用引物HIV-1 Pr1和HIV-1 Pr各25pmol, PCR循环条件为: 72℃, 60S, 92℃, 30S, 55℃, 30S, 共进行30—35个循环, 最后在72℃延伸5min。

3. 质粒提取纯化, 酶切, 连接及转化参照文献^[7]。

4. DNA序列分析 采用美国UBS公司Sequenase DNA序列分析试剂盒所提供的全部试剂, 用Sanger双脱氧法, 按UBS公司所提供的操作程序进行。

结 果

一、HIV-1 Pr基因的体外扩增

本文所设计的PCR引物, HIV-1 Pr1和HIV-1 Pr2分别为22聚和24聚, 其中正链引物HIV-1 Pr1中含有7个碱基与模板DNA不相配, 并突变入一个EcoRI的识别序列: GAATTC, 以便扩增片段的克隆和表达。在负链引物HIV-1 Pr2中也存在有两个特殊位点, 即一个HindⅢ的识别序列AGCTT和一个终止码TTA。以PJG423质粒为模板, 经过30个PCR循环, 得到一个大小为360bp的DNA片段(图版IV 1)。

二、HIV-1 Pr基因克隆入pUC19

HIV-1 Pr基因经用PCR技术突变并扩增后与纯化的pUC19质粒DNA用EcoRI和HindⅢ双酶切, 14~16℃连接12hr, 转化JM103宿主菌, 得到大量的白色菌落, 随意挑取5个白色菌落进行筛选, 发现有3个克隆的质粒DNA比载体pUC19泳动慢, 提取较大的质粒进行酶切鉴定, 结果有二个克隆能切下一个大小与插入片段一致的DNA片段(360bp)(图版IV 2), 初步证实该重组质粒中插入了HIV Pr基因, 将此重组质粒命名为pUPR-1和pUPR-2。

三、HIV-1 Pr基因亚克隆入M13mp18

从pUPR-1中用EcoRI和HindⅢ双酶切下HIV-1 Pr基因, 与用相同内切酶处理过的M13mp18连接后转化JM103, 得到四个重组的M13mp18(图版IV 3)。

四、HIV-1 Pr基因序列分析

提取重组M13mp18单链DNA进行DNA序列测定结果显示, 经用不同时间上样的凝胶电泳可以测出HIV-1 Pr基因全长的297bp, 而且还测出了5'和3'端部分引物序列和多克隆接头序列(图版IV 4)。从而证实pUPR1中确实插入有PCR扩增的HIV-1 Pr基因。

讨 论

以往需要通过艰苦而复杂的劳动才能获取一种蛋白质或酶的完整基因进行克隆和表达。对以融合 mRNA 表达的 HIV-1 Pr, 要以分离和反转录 mRNA 的方法来获取其基因几乎不可能, 必须通过基因定位突变技术, 但该技术比较繁琐复杂, 耗时又长, 且效率不高, 所以, 迄今国外所报道克隆和表达 HIV-1 Pr 的基因均属化学合成, 但化学合成法所获得的基因, 一般情况下很难获得高效表达, 表达产物的活性也不高, 这就限制了 HIV-1 Pr 的来源^[1]。

PCR 方法从建立起, 其众多的优点就一直为人们所称道, 它不但可以准确、灵敏和快速地将目的基因放大, 更重要的是它还可以以人们的意志来改造基因。我们在获取 HIV-1 Pr 基因时, 就利用 PCR 技术具有突变和改造基因这一特性, 赋予特异引物 5' 端以限制性内切酶序列和终止序列, 现 2~3 天内就能将目的基因突变并克隆入当适的载体, 克隆成功率高, 利用 PCR 法鉴定克隆也较常规酶法容易。

Taq DNA 聚合酶介导的 DNA 合成的错配率较高, 所以用 PCR 技术克隆的 HIV-1 Pr 基因全长为 360bp, 测序结果表明序列完全正确, 未发生错配。这是由于我们增加了起始模板的投入量, 并减少了延伸时间, 从而提高了扩增的特异性。

参 考 文 献

- [1] Gallo RC et al., 1984, *Science*, 224: 500.
- [2] Leis J et al., 1988, *J. Virol*, 62: 1808.
- [3] Yoshinaka Y et al., 1985, *J. Virol*, 55: 870.
- [4] Robert L et al., 1990, *PNAS*, 87: 6336.
- [5] Kaphar A and Swenstrom R., 1991, *PNAS*, 88: 4528.
- [6] 吉昌华等, 1992, 第四军医大学学报, 13(4): 284.
- [7] Maniatis T et al., 1989, *Molecular cloning: A Laboratory manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- [8] Sergio D. et al., 1990, *J Biol Chem*. 265: 13890.

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

Yan Xiaojun Su Chengzhi Ji Changhua

(Department of Biochemistry, The Fourth Military Medical

University, Xi'an 710032)

In the present work, the primers HIV-1 Pr1 and HIV-1 Pr2 were synthesized in which the EcoRI and Hind III recognition sites as well as the termination codons were designed for convenience of subsequent cloning and expression. Micrograms of target gene sequence was produced by 30 rounds of amplification with pJG423 as a template. The amplified gene was digested with both EcoRI and Hind III and ligated to pUC19 predigested with the same restriction endonucleases. The recombinant plasmid pUPR1 and pUPR2 were identified and the cloned HIV-1 Pr gene was reinserted into phage M13 mp18 for sequence analysis. It was revealed that the sequence of the cloned HIV-1 Pr gene was indentified to its template, and the site mutations at both the 5' and 3' ends were also successful.

Key words: Human immunodeficiency virus Gene cloning
Polymerase chain reaction Gene mutagenesis