

HIV-1基因限制性显示片段的克隆与序列分析

限制性显示PCR(Restriction digest-polymerase chain reaction, RD-PCR)技术是为克服差异显示PCR(Differential display-PCR, DD-PCR)的假阳性而建立的一种新的差异显示技术, 不仅成功地应用于基因的差异表达分析, 而且已用于制备DNA芯片的探针[1][2][3]。我们在应用该技术制备HIV-1基因短片段的实验中发现, RD-PCR反应扩增出一些非预期片段。由于制备的基因片段是用作DNA芯片的探针, 所以有必要对这些片段进行克隆和序列分析。本文采用分组克隆(即纯化各组PCR产物后直接与T载体连接)结合单片段克隆的方法, 对RD-PCR扩增的片段进行亚克隆, 并用自动测序仪分析了克隆片段的序列。

1 材料与方法

1.1 材料

HIV-1 B、F亚型质粒HIV1U26942、FIN9363由美国Jean K Carr博士(The Henry M. Jackson for the Advancement of Military Medicine, Maryland)惠赠。大肠杆菌JM109购自大连宝生物公司。

胰蛋白酶、酵母提取物购自Oxoid(England); 氯化钠、琼脂及质粒小量制备试剂盒、UNIQ-5柱式DNA胶回收试剂盒、PCR产物纯化试剂盒、测序引物S0100、S0101购自上海生工生物工程有限公司; Taq酶、dNTP及其他PCR相关的试剂、pMD 18-T载体及5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-gal)、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)、DNA相对分子质量标准DL2000购自大连宝生物工程有限公司; PCR通用引物(5'-GTT TGG CTG GTG TGG ATC-3')由本室合成。

1.2 方法

1.2.1 HIV DNA的RD-PCR反应 以限制性内切酶从质粒上切下HIV DNA, 经电泳回收后再以Sau 3A I酶切, 得到许多大小为0.1~1 kb的限制性酶切片段。然后在片段两端接上接头, 根据酶切位点、接头的序列设计通用引物U。在该通用引物的3'端分别延伸一个碱基, 得到选择性引物MA、MT、MC、MG。通过引物间的两两组合, 将PCR反应分成10个亚组: AA、AT、AC、AG、TT、TC、TG、CC、CG、GG。

1.2.2 PCR产物的纯化与克隆 纯化上述各组PCR产物(详见试剂盒操作说明)后, 取纯化产物1 μ l(约0.05~0.3 pmol)、pMD18-T载体1 μ l、5 μ l Solution I、3 μ l ddH₂O, 加入微量管中混匀, 16 $^{\circ}$ C反应1 h。将上述10 μ l连接液转化新鲜制备的大肠杆菌JM109感受态细胞, 取150~300 μ l转化液涂板(LB平板中含X-gal、IPTG及60 μ g/ml氨苄青霉素)。上述操作参见文献[4]。铺好板后置于培养箱中37 $^{\circ}$ C培养12 h以上。

1.2.3 克隆鉴定 从平板上随机挑取白色菌落, 接种至加有500 μ l LB液体培养基(含氨苄青霉素)的1.5 ml Eppendorf管中, 置于摇床振荡培养(200~300 r/min)3 h后, 取20 μ l于100 $^{\circ}$ C沸水浴10 min, 作为PCR鉴定的模板。剩余菌液继续培养。

在PCR反应管中加入10 μ l Premix Taq(TaKaRa Ex Taq 1.25 U; 2 \times dNTP, 各0.4 mmol/L; 2 \times Ex Taq 缓冲液; Mg²⁺ 4 mmol/L), 1 μ l煮沸的菌液, 1 μ l通用引物(10 μ mol/L), 加水至20 μ l, 轻轻混匀。置于Perkin-Elmer 9 600型 PCR仪上, 95 $^{\circ}$ C变性2 min, (95 $^{\circ}$ C, 30 s, 66 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 1 min) \times 30循环, 72 $^{\circ}$ C延伸5 min。以2%琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.2.4 克隆片段的扩增与DNA测序 在10 ml离心管中加入3 ml LB液体培养基(含氨苄青霉素), 加入100 μ l阳性克隆菌液, 置于摇床中扩大培养, 提取质粒后作为模板, 以T载体上测序引物S0100、S0101扩增克隆片段。50 μ l PCR反应体系含25 μ l Premix Taq, 1 μ l质粒模板, S0100、S0101(3.2 μ mol/L)各4 μ l。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min、(94 $^{\circ}$ C、30 s, 50 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min) \times 35循环、72 $^{\circ}$ C 8 min。再纯化PCR产物, 以本室ABI PRISM 310自动测序仪及测序引物S0100直接对PCR产物进行序列测定(600 bp以上的片段则分别以S0100、S0101对双链进行测序)。

2 结果

2.1 RD-PCR图谱

10组RD-PCR反应产物各取2 μ l, 进行2%琼脂糖凝胶电泳, 可见清晰的RD-PCR图谱(图1)。以B亚型TT组、F亚型AT组为例, B亚型的TT组(图1B第6道)中自上至下有五条带, 以TT1~5表示, 与预期大致相符; F亚型的AT组(图1 F第3道)中有9条带, 以AT1~9表示。其中AT1~3、AT5、AT8为非预期片段。AT5与AA组中一条带相似; AT8则与TT组中片段相近。

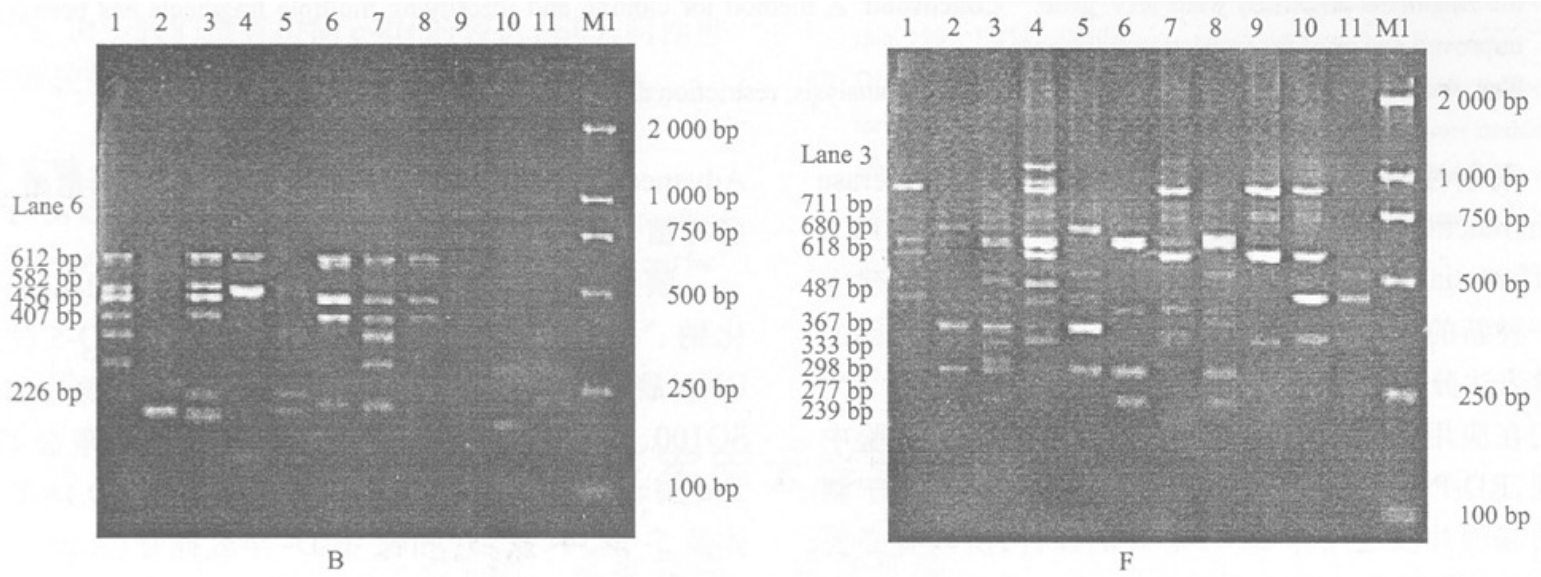


图1 B、F亚型HIV-1基因的RD-PCR图谱

Fig.1 RD-PCR pattern of genetic subtype B and F of HIV-1

Lane 1~11: PCR subgroups of UU, AA, AT, AC, AG, TT, TC, TG, CC, CG and GG; M1: DNA marker DL2000

2.2 克隆鉴定

在涂有TT组转化液的平板上，随机挑选24个白色菌斑，PCR扩增后，以2%琼脂糖凝胶电泳，得到了TT组的各种片段(图 2 B)：克隆片段13、14、15与TT1相似；20、21与TT2对应；16、18等对应TT3；11、12等对应TT4；10对应TT5。F亚型AT组平板上挑取了27个白色克隆(图 2 F)，得到了其中6个片段，以16、15、22、13、17、25分别对应AT4~AT9。

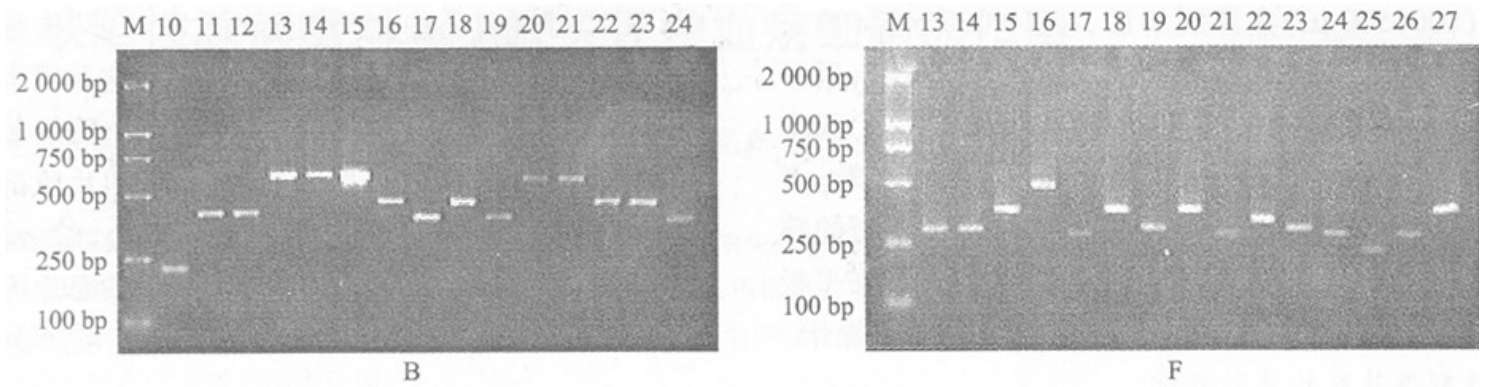


图2 克隆片段的2%琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.2 Electrophoretic analysis on 2% agarose gel of the cloned fragments amplified by PCR

B and F: Cloned fragments of B or F subtype; M: DNA marker DL2000

2.3 克隆片段的扩增与序列分析

选取B亚型TT组的克隆15、21、16、12、10及F亚型AT组的16、15、22、13、17、25进行PCR扩增，然后直接对PCR产物进行序列测定。将测定的序列与GeneBank数据库进行比较，表明克隆片段均属于HIV基因。其中，B亚型TT组的克隆片段15、21、16、12与Sau 3A I酶切及RD-PCR反应预期结果一致；片段10(nt 8229~nt 8419)则是21(nt 7867~nt 8419)中的一段(图3)；F亚型AT组中22、13、25与预期相符，而片段15(对应AT5)属于AA组产物；片段17(对应AT8)属于TT组；片段16则是片段13与邻近一个174 bp的片段连在一起形成的“复合”片段。

TT21
↓

7861 TGGGAC**GATC** TGCGGAGCCT GTGCCTCTTC AGCTACCACC GCTTGAGAGA CTTACTCTTG
7921 ATTGTAACGA GGATTGTGGA ACTTCTGGGA CGCAGGGGGT GGAAGCCCT CAAATATTGG
7981 TGGAACTCTCC TACAGTATTG GAGTCAGGAA CTAAAGAATA GTGCTGTAA CTTGCTCAAT
8041 GCCACAGCCA TAGCACTAGC TGAGGGGACA GATAGGGTTA TAGAAGTATT ACAAGCAGCT
8101 TATAGAGCTA TTCGCCACAT ACCTAGAAGA ATAAGACAGG GCTTGGAAG GATTTTGCTA
8161 TAAGATGGGT GGCAAGTGGT CAAAAAGTAG TGTGATTGGA TGGCCTGCTG TAAGGGAAAG

TT10
↓

8221 AATGAGACGA GCTGAGCCAG CAGCAGATGG GGTGGGAGCA GATCTCGAG ACCTAGAAAA
8281 ACATGGAGCA ATCACAAGTA GCAATACAGC AGCTAACAAAT GCTGCTGTG CCTGGCTAGA
8341 AGCACAAAGAG CAGGAAGAGG TGGGTTTCC AGTCACACCT CAGGTACCTT TAAGACCAAT
8401 GACTTACAAG GCAGCTGTAG **ATCTTAGCCA** CTTTTTAAAA GAAAAGGGGG GACTGGAAG

TT21
↑

图3 HIV 1U26942的部分序列
Fig.3 Part of the nucleotide sequences of HIV 1U26942

3 讨论

3.1 限制性显示片段的克隆与鉴定

RD-PCR是一种快捷的无性克隆方法，但由于实验中可能出现一些非预期片段，因此有必要对它们进行序列分析。而RD-PCR体系应用的通用引物或分组引物没有或只有一个碱基的差别，所以不能直接对扩增产物进行测序，需要先进行克隆。本研究采用A/T克隆的方法，考虑到各组片段较多，进行分组克隆即纯化各组PCR产物后与T载体连接。分组克隆的优点是：①操作较简便。如B亚型扩增的片段集中在AT、AC、TT、TC等组，只需重复4~10次产物纯化、连接、转化、铺板等操作；②每组平板上只需挑取为数不多的菌落(具体视该组片段的多少而定)，经一次PCR鉴定后，基本可得到含所需片段的克隆(如B亚型TT组)。缺点是克隆鉴定的工作量相对较大；而且鉴定了许多克隆后，有些片段仍不能得到(如F亚型AT组)。分析其原因，可能是因为RD-PCR反应的各组产物中存在大小不一的多种片段，这些片段与T载体连接时存在竞争问题；而且连接上的重组子导入细菌后，在细菌中的扩增也会受到细菌自身因素的影响，结果某些克隆得以大量扩增，某些克隆则没有被扩增。对于没有扩增出来的片段，再从琼脂糖凝胶上切下相应条带进行二次PCR，纯化后单独与T载体连接转化来获得。正是通过这种分组克隆结合单个片段克隆的策略，我们获得了含所需片段的克隆。

在实验中我们发现，PCR产物不经纯化，直接与T载体连接，克隆的效率影响不大；从琼脂糖凝胶上切下的凝胶不需回收，加入少许无菌水后95℃水浴5~10 min，然后取少量(1~2 μl)作模板即可进行二次PCR，这可使克隆步骤进一步得以简化。此外，由于各组产物中存在大小相近的片段，所以在选择阳性克隆时，可以各组RD-PCR产物作参照，尽可能延长电泳时间，以分辨扩增片段大小的细微差别，然后有意识地选择2~3个相应大小的克隆进行测序鉴定，这样就不会遗漏一些片段。

克隆的鉴定通常采用限制性酶切分析法或PCR快速鉴定法。本研究中由于需要鉴定的克隆较多，故选用后者。我们在菌落扩大培养3 h以上后，取少部分菌液煮沸裂解后直接作PCR的模板，并不会影响PCR反应。不过也可采取下述方法：①取部分扩大培养的菌液(100~500 μl)煮沸裂解后，以10 000 r/min离心1~5 min，取适量上清作模板；②不先培养菌落，用牙签挑取白色菌落的一部分，在加有少量(20 μl)灭菌水的微量管中洗涤，并在平板和微量管上标记序号。煮沸鉴定后，根据序号，再从平板上挑取阳性克隆的剩余菌斑进行扩大培养。这种方法更简便，但需要在平板上作标记，当挑取的克隆较多或克隆较小时不易操作。

3.2 限制性片段的序列分析

综合序列分析的结果，可将RD-PCR反应中出现的非预期片段大致分为以下三类：(1)与预期片段相同的片段：如F亚型的片段15、18等。这些非预期片段与其他组中的预期片段相同，如B亚型的AT、TC、TG中有3条片段与TT组相同(这些组中都有一个共同的分组引物MT)；又如F亚型的AT与AA组、AT与TT组均有一条相同片段(也分别有一个相同的引物)。这表明，RD-PCR分组反应中，两个分组引物组合扩增的产物中可包括分组引物自身组合扩增的产物，如加入引物MA、MT的PCR反应(即AT组)包括AA、TT、AT三种组合，因而导致相同片段的产生。(2)比预期短的片段：如B亚型的TT组片段10等。这可能是因为Sau3A I酶切时间过长，导致限制酶在该片段中间切开(如将GAGC等识别为GATC)，而得到一些比预期短的片段。(3)比预期长的片段：如F亚型AT组的片段16等。这是因为Sau 3A I酶切不完全或者在连接过程中两个酶切片段又重新连接在一起所致。尽管如此，扩增的片段都属于HIV基因，且大多数片段与预期分析吻合。综上所述，RD-PCR技术是一种有效的分离、扩增基因片段的方法，为DNA芯片[5][6]探针的制备开辟了一条新途径。

参考文献：

- [1] 马文丽, 郑文岭, James FB, 等. 限制性显示(RD-PCR): 一种新的差异显示技术[A]. 见: 孙志贤主编. 全军生物化学与分子生物学研究进展[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 113.
- [2] 郑文岭, 马文丽, Cater VW. 肿瘤细胞多聚腺苷酸聚合酶(PAP)的差异表达显示[A]. 见: 叶鑫生, 沈倍奋主编. 细胞调控探索[M]. 北京: 军事医学出版社, 1998. 73-92.

[3] 马文丽, 郑文岭, 崔东, 等. 利用瓷片材料制备DNA微集芯片[J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(3): 285-9.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 55-6.

[5] Stewart DJ. Making and using DNA microarrays: a short course at Cold Spring Harbor Laboratory[J]. Genome Res, 2000, 10(1): 1-3.

[6] Clewley JP. DNA microarrays[J]. Commun Dis Public Health, 2000, 3(1): 71-2.

参考文献:

[1] 马文丽, 郑文岭, James FB, 等. 限制性显示(RD-PCR): 一种新的差异显示技术[A]. 见: 孙志贤主编. 全军生物化学与分子生物学研究进展[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 113.

[2] 郑文岭, 马文丽. Cater VW. 肿瘤细胞多聚腺苷酸聚合酶(PAP)的差异表达显示[A]. 见: 叶鑫生, 沈倍奋主编. 细胞调控探索[M]. 北京: 军事医学出版社, 1998. 73-92.

[3] 马文丽, 郑文岭, 崔东, 等. 利用瓷片材料制备DNA微集芯片[J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(3): 285-9.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 55-6.

[5] Stewart DJ. Making and using DNA microarrays: a short course at Cold Spring Harbor Laboratory[J]. Genome Res, 2000, 10(1): 1-3.

[6] Clewley JP. DNA microarrays[J]. Commun Dis Public Health, 2000, 3(1): 71-2.

[回结果列表](#)