

HIV-1 逆转录过程及应用 PCR 检测

姚文雪^{1,2}, 吴英良², 郭颖^{1*}

- (1. 中国医学科学院、中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050;
2. 沈阳药科大学 生命科学与生物制药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 作为逆转录病毒, 在进入宿主细胞以后其正链 RNA 基因组就在逆转录酶的作用下开始逆转录合成双链的 DNA。HIV-1 逆转录的过程大致包括以下几个步骤: 负链强力终止 DNA 的起始合成, 负链强力终止 DNA 的链转移, 正链 DNA 的合成起始, 正链强力终止 DNA 的链转移和最终完整双链 DNA 的合成。逆转录是 HIV-1 复制的重要环节, 现已成为抗 HIV-1 药物研究开发的重要靶标。聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 可用于检测 HIV-1 的逆转录过程, 设计引物扩增 HIV-1 基因组 R/U5 序列、U3 序列、U5/PBS 序列和 LTR 与 Gag 之间的序列, 根据 PCR 结果可相应判断出 HIV-1 的逆转录是否起始、是否进行了负链的链转移、正链的起始和双链 DNA 的完整合成。本文将主要介绍逆转录过程以及应用 PCR 的检测方法。

关键词: HIV-1; 逆转录; 聚合酶链反应

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2008)02-0118-05

Process of HIV-1 reverse transcription and its detection by using PCR

YAO Wen-xue^{1,2}, WU Ying-liang², GUO Ying^{1*}

- (1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;
2. School of Life Science and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Human immunodeficiency virus (HIV) is a retrovirus, belongs to Lentiviridae family. As long as viral genetic material entering into host cytoplasm, double-strand DNAs synthesis occurs which is catalyzed by reverse transcriptase (RT) with viral plus-strand RNA as template. This reverse transcription is a key link of HIV-1 life cycle and an important target for anti-HIV drug development. The process of reverse transcription can be divided into several steps: formation of minus-strand strong-stop DNA; the first translocation; initiation of plus-strand DNA synthesis; and, the second translocation and the completion of both strands. These steps can be detected individually by using polymerase chain reaction (PCR) according to the amplified products on the region of R/U5, U3, U5/PBS and the sequence between LTR and Gag. In this review, we summarize the principle for detecting stages of HIV-1 reverse transcription by using PCR.

Key words: HIV-1; reverse transcription; PCR

人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 属逆转录病毒科慢病毒属。其基因组为

双链正链 RNA, 含有 9 个基因编码区 (图 1), 其中 gag, pol 和 env 为逆转录病毒所共有, 其他 6 个为 HIV 所特有。9 个基因编码区通过不同的开放读码框编码 15 种蛋白, 其中包括 3 种主要的功能蛋白分别为蛋白酶、整合酶和逆转录酶。作为重要的功能酶, 逆转录酶催化逆转录过程, 将 HIV-1 基因组的单链 RNA 逆转录为双链 DNA。

收稿日期: 2007-07-27.

基金项目: 中国医学科学院药物研究所引进人才专项 (2006YJ01).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165176,
E-mail: yingguo6@imm.ac.cn

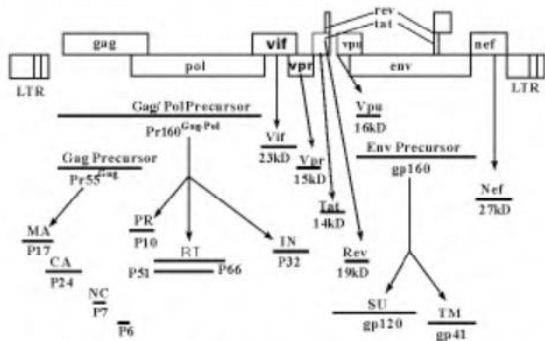


图1 HIV-1 基因编码区及编码的蛋白。HIV-1 基因组含有 9 个基因编码区, 包括 gag、pol、env、vif、vpr、vpu、rev、tat 及 nef; 通过不同的开放读码框可编码 15 种蛋白, 包括 MA、CA、NC、P6、PR、RT、IN、SU、TM、Vif、Vpr、Vpu、Rev、Tat 及 Nef

1 逆转录酶

HIV-1 逆转录酶是病毒复制过程中的重要酶, 催化逆转录过程, 是艾滋病治疗的重要靶点。编码逆转录酶的基因是 pol, 其先翻译成 Gag-Pol 前体蛋白 (Pr160 Gag-Pol), 后者再自身催化生成逆转录酶^[1]。

HIV-1 逆转录酶是由 p66 和 p51 亚基组成的异源二聚体。p66 为功能亚基, 有 DNA 聚合酶活性和 RNase H 活性^[2-4], 两活性区域分别位于 p66 的 N 端和 C 端。X 射线衍射晶体分析法已确定了 HIV-1 逆转录酶的结构 (图 2)。DNA 聚合酶区域的结构形似人的右手, 包括有“手指”、“手掌”、“拇指”和“连接”区^[5,6]。“手指”、“手掌”和“拇指”三个亚区形成一很深的模板结合沟, 在逆转录时结合 RNA 模板。DNA 聚合酶的活性位点位于“手掌”区。

HIV-1 逆转录酶是多功能酶, 有三种酶活性: (1) 以 RNA 为模板的 DNA 聚合酶活性 (催化合成负链 DNA); (2) 核糖核酸酶 H (RNase H) 活性 (水解引物 tRNA 和 DNA:RNA 双链体中的基因组 RNA); (3) 以 DNA 为模板的 DNA 聚合酶活性 (催化合成正链 DNA)^[7]。

2 逆转录过程

HIV-1 病毒表面蛋白 gp120 可特异性结合细胞表面受体 CD4^[8], 该结合可拉近病毒与宿主细胞的空间距离, 使细胞表面共受体 CCR5 或 CXCR4 进一步与病毒的 gp120 结合^[9], 随后病毒表面跨膜蛋白 gp41 的构象发生改变, 病毒与细胞膜相融合^[10]。病毒的遗传物质以非 pH 依赖形式释放到宿主细胞的胞浆后, 就形成逆转录复合物开始进行逆转录^[11]。逆转录过程是由胞质中高浓度的脱氧核糖核酸所引

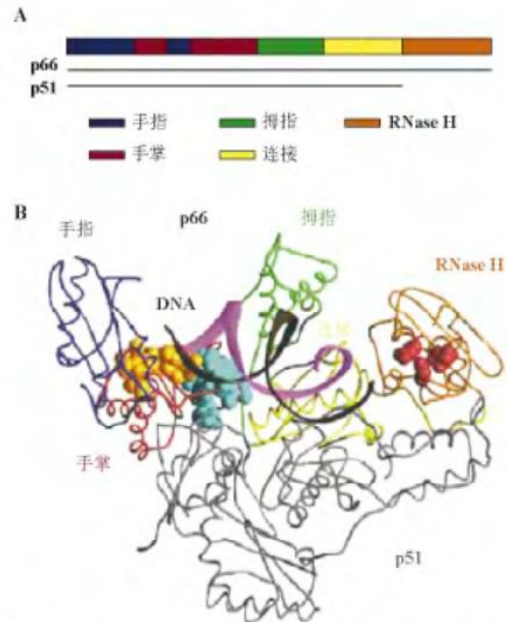


图2 HIV-1 逆转录酶 p66/p51 异源二聚体的线性结构示意图 (A) 和带状结构图 (B)

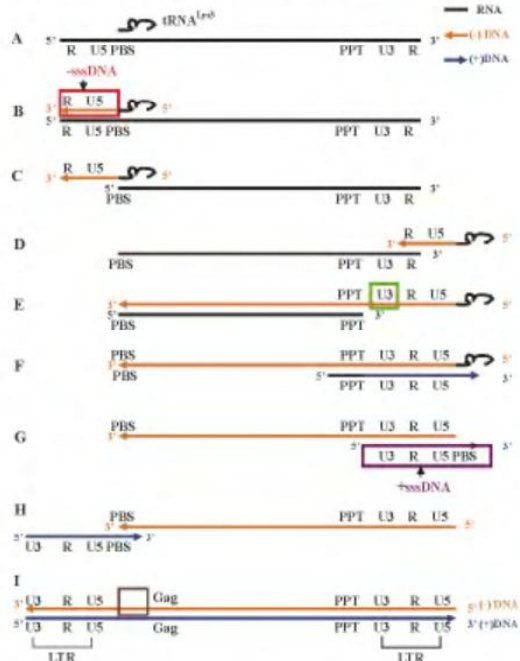


图3 HIV-1 逆转录过程。A: 引物 tRNA^{Lys} 与基因组 RNA 结合; B: -sssDNA 以基因组 RNA 为模板开始合成; C: 合成 -sssDNA 形成的 DNA:RNA 双链体中的 RNA 被 RNase H 降解去除; D: -sssDNA 的第一次链转移; E: 负链 DNA 沿模板 RNA 5' 端方向继续合成; F: 正链 DNA 起始合成; G: PPT 序列被 RNase H 降解去除; H: 正链 DNA 第二次链转移; I: 合成完整的 DNA 双链

起的^[12], 整个逆转录过程通常需要 8~12 h。逆转录的过程复杂且高度有序, 需要多种因子如反式激活因子(Tat)、病毒感染性因子(Vif)等的参与^[13-15]。通过纯化病毒颗粒的体外实验证明 HIV-1 逆转录过程有以下几个主要步骤(图 3)。

2.1 负链强力终止 DNA 的合成 HIV-1 基因组 RNA 逆转录的起始以 tRNA^{Lys3} 作为引物^[16,17], tRNA^{Lys3} 与 RNA 5' 端一互补序列引物结合位点 (primer binding site, PBS) 结合后, 负链 DNA 才能以 RNA 为模板开始合成(图 3A)。合成沿 RNA 的 5' 端方向, 依次合成 U5 和 R 序列(图 3B), 合成到基因组 RNA 5' 末端结束, 合成的该 DNA 中间产物为负链强力终止 DNA (minus-strand strong-stop DNA, -sssDNA)(图 3B, 红框)。因为 tRNA^{Lys3} 的结合位点 PBS 距离 RNA 5' 末端很近, 所以 -sssDNA 长度比较短, 约 180 个碱基。-sssDNA 合成后引物 tRNA^{Lys3} 仍连接在其 5' 端^[18,19]。因此, 在检测逆转录初始阶段的进程时, 应检测 R/U5 序列, 即检测负链强力终止 DNA 是否合成^[20,21]。

2.2 第一次链转移 所谓第一次链转移是 -sssDNA 从基因组 RNA 的 5' 端转移结合到 3' 端的过程, Li 等^[22] 证明人类宿主蛋白 APOBEC3G 可抑制该链转移过程。第一次链转移只能发生在 DNA:RNA 双链体中的 RNA 被 RNase H 降解去除后(图 3C)^[23], 无 RNase H 活性的突变体 HIV-1 不能发生链转移, 因此不具有感染性^[24]。在 -sssDNA 结合部位的 RNA 被水解后, -sssDNA 以 RNA 的 3' 端为模板继续延伸合成负链 DNA^[25], 合成的第一段序列为 U3 (图 3D)。因此, 在检测逆转录过程的第一次链转移时应检测 U3 序列^[26-28]。链转移具有任意性, 即 -sssDNA 可转移结合到任一 RNA 模板上^[29]。

2.3 长负链 DNA 的合成 通过 -sssDNA 的第一次链转移形成了合成负链 DNA 的引物-模板结构, 逆转录酶继续沿模板 RNA 5' 端方向催化合成负链 DNA, 合成终止在 PBS 序列附近。模板 RNA 在负链 DNA 合成后即被 RNase H 降解(图 3E)。

2.4 正链 DNA 合成的起始 基因组 RNA 3' 端附近有一富含嘌呤的短序列 PPT (polypurine tract, PPT), 在负链延伸合成时不会被 RNase H 降解, 保持与负链 DNA 的结合, 成为正链 DNA 起始合成的引物(图 3F)^[30]。PPT 在正链 DNA 起始合成后就被 RNase H 降解。正链的合成方向沿负链的 5' 端, 依次合成 U3、R、U5 和 PBS 连续序列(图 3G), 该过程第一次合成了 U5/PBS 连续序列, 因此在检测逆

转录过程正链合成的起始时, 应检测 U5/PBS 连续序列^[27]。该过程合成的中间产物 DNA 为正链强力终止 DNA (plus-strand strong-stop DNA, +sssDNA) (图 3G, 紫框)。在 +sssDNA 合成后, 负链 5' 末端的引物 tRNA^{Lys3} 就被 RNase H 水解去除。

2.5 第二次链转移和双链 DNA 的合成 引物 tRNA^{Lys3} 被降解后, +sssDNA 因为 PBS 序列与负链 3' 末端 PBS 的互补性而发生第二次链转移(图 3H)^[31]。第二次链转移后, DNA 的负链和正链继续延伸合成完整的 DNA 双链(图 3I)。完整的 HIV-1 DNA 双链在两末端都有 630 个核苷酸长度的长末端重复序列(long terminal repeat, LTR), 在病毒整合过程中可介导 DNA 双链插入到宿主细胞的染色体 DNA 中。负链 3' 末端的 LTR/Gag 连续序列是双链 DNA 最后合成的序列, 因此在检测逆转录过程完整的 DNA 双链时, 应检测 LTR/Gag 序列^[32]。

3 应用 PCR 对逆转录过程进行检测

现已上市的治疗艾滋病的药物中, 有多种以逆转录过程为靶标的逆转录酶抑制剂, 并且尚有多种针对此靶标的在研候选药物。因此, 逆转录过程的检测对于将来该类药物的机制研究和抗 HIV 新药的研发都具有重要的意义。

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 具有高度的敏感性和特异性, 可以在体外迅速、大量地扩增特定的核苷酸序列, 可用于检测 HIV-1 逆转录的进程。检测方法如下: (1) 负链 DNA 5' 末端的 R、U5 序列是 HIV-1 逆转录起始合成的第一段 DNA 序列, 因此可通过特异性扩增 R/U5 序列上的片段来检测逆转录的起始, 其可扩增片段长度最大约为 170 bp(图 3B, 红框)。同时该方法还可以检测包括未完成的逆转录产物在内的全部 HIV-1 DNA^[20]; (2) U3 序列是负链强力终止 DNA 第一次链转移结合到基因组 RNA 3' 端后合成的第一段序列, 因此负链强力终止 DNA 的第一次链转移可通过特异性扩增 U3 序列上的片段来检测, 其可扩增长度最大约为 453 bp(图 3E, 绿框)^[26,27]; (3) 正链 DNA 的起始第一次合成了 U3/R/U5/PBS 连续序列, 因此检测正链 DNA 合成的起始时, 应检测含有 U3/R/U5 和 PBS 之间序列的扩增片段, 其可扩增长度最大约为 652 bp(图 3G, 紫框)^[27]; (4) 负链 DNA 3' 末端的 LTR 序列是在正链强力终止 DNA 第二次链转移后, 以正链 DNA 为模板合成的。负链 DNA 的继续合成形成了 LTR/Gag 连续序列, LTR/Gag 连续序列也是完整的双链 DNA 最后合成的序列, 故在负链

表 1 检测 HIV-1 逆转录过程的引物

检测序列	引物	
R/U5	Forward primer	5'-GGCTAACTAGGGAACCGACTG-3'
	Backward primer	5'-CTGCTAGAGATTTTCGCACTGAG-3'
U3	Forward primer	5'-CCTATGAGCCTGCATGGATGGAGGACGGGAG-3'
	Backward primer	5'-GAGGGACGGCACTCCCACTG-3'
U3/R/U5-PBS	Forward primer	5'-GGCTAACTAGGGAACCGACTGC-3'
	Backward primer	5'-CCCTGTTGGGGCCCACTG-3'
LTR-Gag	Forward primer	5'-CGGTCTGTTGTGACTCTGCT-3'
	Backward primer	5'-CACTCCTGCCTCGACATCT-3'

3'端上的 LTR 序列和 Gag 序列分别选择上下游引物使扩增片段含有 LTR 与 Gag 之间的序列(图 3I, 棕框)就可检测双链 DNA 的合成^[32]。

HIV-1 逆转录的进程可由 PCR 的结果来判断,使用的引物见表 1。在应用 PCR 检测静息和受激状态人类 T 淋巴细胞中 HIV 的逆转录过程时,发现 R/U5 序列、U3 序列与 U3/R/U5 和 PBS 之间序列上所扩增的片段量几乎相同,而在静息细胞中扩增 LTR 和 Gag 之间的片段量却明显少于受激细胞,说明在静息细胞和受激细胞中 HIV 相同程度起始了逆转录,且均完成了第一次链转移和正链的起始,但在静息细胞中逆转录合成完整 DNA 双链的量却明显少于受激细胞,即静息细胞中 HIV 双链 DNA 的合成受到了抑制,这也部分解释了 HIV-1 可以长期存留于宿主体内而病毒并不大量繁殖的原因^[27]。应用经典的 PCR 方法可以检测跟踪逆转录的进程,但还不能区分负链和正链的合成,Thomas 等^[33]建立了一种特异链扩增测定方法,将单链锁式探针与实时 PCR 结合应用就可定量特异地检测出 HIV-1 逆转录过程中负链和正链各自的合成情况,更精确的监测逆转录。

笔者认为,逆转录酶作为艾滋病治疗药物的重要靶标,系统研究其结构、功能与催化进程的关系可有助于新型逆转录酶抑制剂的设计和评价。在目前分子生物学技术已非常成熟的条件下,可较容易地对逆转录酶上的某一个或几个氨基酸进行定点突变,通过比较变异逆转录酶与野生型逆转录酶的酶活性差异,可以明确所引入定点突变的氨基酸残基对酶的催化效率的影响,而进一步确定催化进程的差异又可明确造成酶活性差别的原因。以此为基础,结合已有的底物(RNA)-逆转录酶-产物(DNA)的蛋白结晶数据分析,可更好地理解 and 预测底物-酶-产物结合和解离的动态催化过程。而对空间动态过程的深入了解,又可有助于细化逆转录酶抑制剂的设计。

另外,除在实验室通过人为引入定点突变,研究某一个或几个氨基酸残基对催化进程的影响外,临床还出现有多种对现有逆转录酶抑制剂耐药的病毒。应用同样的 PCR 示踪技术,可比较各种核苷类及非核苷类 HIV-1 耐药病毒的逆转录效率和进程的差异,通过对患者体内耐药 HIV-1 种类的确定,可有针对性地指导个体临床用药的种类、时间和效率,以达到最佳治疗效果,而使副作用降至最低。

目前临床针对逆转录酶的核苷类抑制剂共有 8 个,非核苷类抑制剂有 3 个。虽然它们的靶点均为抑制逆转录酶的活性,但其作用环节并不完全相同。系统研究已有的逆转录酶药物的具体催化环节,可作为指导临床联合用药的理论依据。将作用于酶催化进程不同环节的抑制剂联合使用,可更有效地阻断 HIV-1 的复制。

综上所述,了解、细化和监控 HIV-1 逆转录酶的催化进程对于指导临床用药及抗 HIV-1 药物的研发均具有重要的意义。

References

- [1] Mulky A, Kappes JC. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase subunit structure/function in the context of infectious virions and human target cells [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49:3762 - 3769.
- [2] Le Grice SF, Naas T, Wohlgensinger B, et al. Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase [J]. *EMBO J*, 1991, 10:3905 - 3911.
- [3] Hostomsky Z, Hostomska Z, Fu TB, et al. Reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1: functionality of subunits of the heterodimer in DNA synthesis [J]. *J Virol*, 1992, 66:3179 - 3182.
- [4] Wapling J, Moore KL, Sonza S, et al. Mutations that abrogate human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase dimerization affect maturation of the reverse transcriptase heterodimer [J]. *J Virol*, 2005, 79: 10247 - 10257.

- [5] Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, et al. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor [J]. *Science*, 1992, 256: 1783 - 1790.
- [6] Mulky A, Sarafianos SG, Arnold E, et al. Subunit-specific analysis of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase *in vivo* [J]. *J Virol*, 2004, 78: 7089 - 7096.
- [7] Tözser J. Stages of HIV replication and targets for therapeutic intervention [J]. *Curr Top Med Chem*, 2003, 3: 1447 - 1457.
- [8] Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, et al. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain [J]. *Cell*, 1986, 47: 333 - 348.
- [9] Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease [J]. *Annu Rev Immunol*, 1999, 17: 657 - 700.
- [10] Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition [J]. *Cell*, 1998, 93: 681 - 684.
- [11] Warrilow D, Harrich D. HIV-1 replication from after cell entry to the nuclear periphery [J]. *Curr HIV Res*, 2007, 5: 293 - 299.
- [12] Lehmann-Che J, Saïb A. Early stages of HIV replication: how to hijack cellular functions for a successful infection [J]. *AIDS Rev*, 2004, 6: 199 - 207.
- [13] Apolloni A, Meredith LW, Suhrbier A, et al. The HIV-1 Tat protein stimulates reverse transcription *in vitro* [J]. *Curr HIV Res*, 2007, 5: 473 - 483.
- [14] Bai RJ, Liu XY. Transactivation of HIV-1 transcription and inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 289 - 295.
- [15] Henriët S, Sinck L, Bec G, et al. Vif is a RNA chaperone that could temporally regulate RNA dimerization and the early steps of HIV-1 reverse transcription [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: 5141 - 5153.
- [16] Jiang M, Mak J, Ladha A, et al. Identification of tRNAs incorporated into wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1 [J]. *J Virol*, 1993, 67: 3246 - 3253.
- [17] McCulley A, Morrow CD. Nucleotides within the anticodon stem are important for optimal use of tRNA (Lys, 3) as the primer for HIV-1 reverse transcription [J]. *Virology*, 2007, 364: 169 - 177.
- [18] Pullen KA, Ishimoto LK, Champoux JJ. Incomplete removal of the RNA primer for minus-strand DNA synthesis by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase [J]. *J Virol*, 1992, 66: 367 - 373.
- [19] Smith JS, Roth MJ. Specificity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H in removal of the minus-strand primer, tRNA (Lys3) [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267: 15071 - 15079.
- [20] Braaten D, Franke EK, Luban J. Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription [J]. *J Virol*, 1996, 70: 3551 - 3560.
- [21] Fassati A, Goff SP. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1 [J]. *J Virol*, 2001, 75: 3626 - 3635.
- [22] Li XY, Guo F, Zhang L, et al. APOBEC3G inhibits DNA strand transfer during HIV-1 reverse transcription [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 32065 - 32074.
- [23] Purohit V, Balakrishnan M, Kim B, et al. Evidence that HIV-1 reverse transcriptase employs the DNA 3' end-directed primary/secondary RNase H cleavage mechanism during synthesis and strand transfer [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 40534 - 40543.
- [24] Tisdale M, Schulze T, Larder BA, et al. Mutations within the RNase H domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase abolish virus infectivity [J]. *J Gen Virol*, 1991, 72: 59 - 66.
- [25] Swanstrom R, Varmus HE, Bishop JM. The terminal redundancy of the retrovirus genome facilitates chain elongation by reverse transcriptase [J]. *J Biol Chem*, 1981, 256: 1115 - 1121.
- [26] Houzet L, Morichaud Z, Mouqel M. Fully-spliced HIV-1 RNAs are reverse transcribed with similar efficiencies as the genomic RNA in virions and cells, but more efficiently in AZT-treated cells [J]. *Retrovirology*, 2007, 4: 30.
- [27] Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, et al. HIV-entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure [J]. *Cell*, 1990, 61: 213 - 222.
- [28] Warrilow D, Stenzel D, Harrich D. Isolated HIV-1 core is active for reverse transcription [J]. *Retrovirology*, 2007, 4: 77.
- [29] Yu H, Jetzt AE, Ron Y, et al. The nature of human immunodeficiency virus type 1 strand transfers [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 28384 - 28391.
- [30] Rausch JW, Le Grice SF. "Binding, bending and bonding": polypurine tract-primed initiation of plus-strand DNA synthesis in human immunodeficiency virus [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36: 1752 - 1766.
- [31] Smith CM, Smith JS, Roth MJ. RNase H requirements for the second strand transfer reaction of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription [J]. *J Virol*, 1999, 73: 6573 - 6581.
- [32] Suzuki Y, Misawa N, Sato C, et al. Quantitative analysis of human immunodeficiency virus type 1 DNA dynamics by real-time PCR: integration efficiency in stimulated and unstimulated peripheral blood mononuclear cells [J]. *Virus Genes*, 2003, 27: 177 - 188.
- [33] Thomas DC, Voronin YA, Nikolenko GN, et al. Determination of the *ex vivo* rates of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription by using novel strand-specific amplification analysis [J]. *J Virol*, 2007, 81: 4798 - 4807.