

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

[12] 发明专利申请公开说明书

G01N 33/569 G01N 33/577

C12N 15/10 C12Q 1/68

[21] 申请号 00131603.6

[43] 公开日 2002 年 5 月 8 日

[11] 公开号 CN 1348102A

[22] 申请日 2000.10.11 [21] 申请号 00131603.6
 [71] 申请人 中国科学院昆明动物研究所
 地址 650223 云南省中国科学院昆明动物研究所
 [72] 发明人 贲昆龙 夏雪山 徐焕宾 冯汉平

[74] 专利代理机构 云南省高校专利事务所
 代理人 杨宏珍

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 一种质粒及其构建方法和在艾滋病毒载量测定上的应用

[57] 摘要

一种质粒及其构建方法和在艾滋病毒载量测定上的应用,属艾滋病防治领域。质粒为 pSPgag737/JM109 CGMCC NO.0486。构建方法是将 HIV-1 前病毒 DNA 进行 Sal I/sac I 双酶切,与被同样双酶切的 pSP64Poly (A) 质粒发生粘性末端连接,得到含有 HIV-1gag 基因片断的 pSPgag737 重组质粒,转化至 JM109 感受态细胞,经酶切/PCR 鉴定,得到阳性克隆子。体外转录阳性克隆子,获得病毒载量定量测定的 RNA 外参照,将 PCR 技术与 Kodak 电泳图谱分析系统相结合,建立了 HIV 感染者和艾滋病人血浆病毒载量的定量测定方法。本发明操作简单,价格便宜,特异性好,灵敏度高,可重复性好,作为艾滋病的科学研究与防治的工具。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种质粒，其特征在于该质粒为 pSPgag737/JM109 CGMCC NO.0486 。

2. pSPgag737/JM109 CGMCC NO.0486 的构建方法，其特征在于：将 8E5 细胞含有的单拷贝 HIV-1 前病毒 DNA 进行 Sal I /Sac I 双酶切，与被同样双酶切的 pSP64Poly(A) 质粒发生粘性末端连接，得到含有 HIV-1gag 基因片断的 pSPgag737 重组质粒，转化至 JM109 感受态细胞，经酶切/PCR 鉴定，得到阳性克隆子。体外转录阳性克隆子，获得病毒载量定量测定的 RNA 外参照。

3. pSPgag737/JM109 CGMCC NO.0486 在艾滋病毒载量测定上的应用，其特征在于：应用权利要求 1、2 的外参照，将聚合酶链反应技术与柯达电泳图谱分析系统相结合，建立了测定 HIV-1 感染者和艾滋病人血浆的病毒载量定量测定的方法。

一种质粒及其构建方法和在艾滋病毒载量测定上的应用

本发明涉及一种质粒及其构建方法和在艾滋病毒载量测定上的应用，属艾滋病防治领域。

艾滋病（AIDS）是由 I 型人类免疫缺陷病毒（HIV-1）引起的破坏机体免疫系统的致死疾病。自 1985 年我国发现首例艾滋病人以来，该病在全国迅速蔓延，现已进入高速增长期，艾滋病的防治已成为关系到国计民生的大事。艾滋病的临床治疗，及抗艾滋病新药和疫苗的发现与研究，需要一客观、可靠的指标来评判 HIV 感染者的病程和预后。已有的血清 p24 抗原水平检测、逆转录酶活性测定、病毒分离培养等方法也能在一定程度上反映患者体内病毒数量的变化，但以上方法干扰因素多，费时费力且灵敏度较低。大量研究表明，HIV-1 病毒载量的变化是 HIV-1 感染者病程和预后判断的最客观依据，已商品化的定量检测 HIV-1 的技术有：聚合酶链反应（PCR）（Amplicor HIV-1 Monitor test; Roche）、NASBA 和 b-DNA。Roche 公司的 Amplicor Monitor test（PCR）是 FDA 批准的唯一用于临床检测 HIV-1 的试剂盒。该检测试剂盒价格十分昂贵（每个样品的检测费用在 200 至 500 美元之间），技术要求高。现有的方法有的只能在极少数实验室开展，因此难以广泛应用于临床和科学研究。

本发明的目的在于克服现有技术之不足，提供一种操作简单，价格便宜，特异性好，灵敏度高，同时有较好的可重复性的质粒及其构建方法和在艾滋病毒载量测定上的应用。

本发明是这样实现的：质粒为 pSPgag737/JM109 CGMCC NO.0486 。

pSPgag737/JM109 CGMCC NO.0486 的构建方法，是将 8E5 细胞含有的单拷贝 HIV-1 前病毒 DNA 进行 Sal I/Sac I 双酶切，与被同样双酶切的购自 Promega 公司的 pSP64Poly(A)质粒发生粘性末端连接，得到含有 HIV-1gag 基因片断的 pSPgag737 重组质粒，转化至 JM109 感受态细胞，经酶切/PCR 鉴定，得到阳性克隆子。体外转录阳性克隆子，获得病毒载量定量测定的 RNA 外参照。

pSPgag737/JM109 CGMCC NO.0486 在艾滋病毒载量测定上的应用：应用权利要求 1、2 的外参照，将聚合酶链反应技术与柯达电泳图谱分析系统相结合，建立测定 HIV-1 感染者和艾滋病人血浆的病毒载量定量测定的方法。

附图 1 为 pSPgag737 质粒的构建。

附图 2 为带酶切位点的 GAG1/GAG2 为引物的聚合酶链反应 (PCR) 扩增结果

附图 2 中 1: 扩增产物 (8E5 细胞 DNA 为模板); 2: DL2000 分子量标准。

附图 3 为重组质粒的酶切电泳分析图谱。

附图 3 中 1: λ DNA/EcoRI+Hind III 分子质量标准; 2: 重组质粒; 3: 重组质粒经 EcoRI 酶切; 4: 重组质粒经 BamHI 酶切。

附图 4 是重组质粒为模板的 PCR 扩增结果。

附图 4 中 1: DL2000 分子量标准; 2: 引物 sk38/sk39 的 PCR 扩增产物(115bp); 3: 引物 sk145/sk431 的 PCR 扩增产物(142bp); 4: 引物 GAG1/GAG2 的 PCR 扩增产物(721bp)。

附图 5 为病毒载量测定 PCR 扩增结果。

附图 5 中 1: pGEM-7zf/HeaIII 分子质量标准; 2: 阳性对照; 3: 阴性对照; 4~9: 十倍稀释的外参照 6 个梯度 ($1-10^5$); 10: 病人 A 的含 HIV-1 样品; 11: 病人 B 的含 HIV-1 RNA 样品; 12: 健康人血浆样品。

附图 6 为外参照工作曲线。

附图 6 中其线性系数为 0.96, 其回归方程为 $Y(\text{Mass})=25.46X (\text{Log Input copies})+18.13$

以下结合附图对本发明的技术方案作进一步详述:

该质粒为 pSPgag737 CGMCC NO.0486。该质粒鉴定为 pSPgag737 的理由是它的基因组内插入了 HIV-1gag 基因片断。其分类性质为含有 SP6 RNA 聚合酶启动子和 (dA:dT)₃₀ 的质粒。作为判断基准的有关文献是 GenBank/EMBL Accession Number: X65328。

1. pSPgag737 质粒的构建

用分别引入 Sal I 和 Sac I 酶切位点的引物 GAG1(上游, 5' GCAACCCTCTTAT TGTGTG3, 1043-1060)/GAG2(下游, 5' CCAACAAGGTTTCTGTCATC3', 1763-1744) 扩增 8E5 细胞前病毒 DNA, 经 Sal I 和 Sac I 双酶切后, 酶切片段通过低熔点琼脂糖回收纯化, 与经过同样双酶切的购自 Promega 公司的质粒 pSP64Poly(A) 发生粘端连接, 从而构建成重组的新质粒 pSMgag737(如图 1)。

2. 制备宿主大肠杆菌 JM109 的感受态细胞, 完成 pSPgag737 质粒对感受态细胞的转化反应, 利用氨卞抗性和蓝白斑双筛选获得阳性重组子。提取质粒, 因重组质粒保留了原 EcoR I 酶切位点, 而消除了 BamH I 酶切位点, 可酶切鉴定。GAG1/GAG2

引物的扩增产物包含 SK38(上游, 5' ATTAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT3', 1551-1578)/ SK39(下游, 5' TTTGGTCCTTGTCTTATGTCCAGAATGC3', 1665-1638), SK145 (上游, 5' AGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT3', 1366-1395) / SK431 (上游, 5' GCTATGTCAGTTCCTTGGTTCTC3', 1507-1481) 两对通用引物的扩增靶序列, 将酶切鉴定后的质粒 DNA 作为模板, 分别用 sk145/sk431 和 sk38/sk39 进一步作 PCR 扩增鉴定。

(1) GAG1/GAG2 扩增获得的克隆片断的 PCR 电泳结果表明: 用 GAG1/GAG2 扩增 HIV-1 gag 保守序列产生特异条带 (图 2), 条带大小与预期结果一致

(2) pSPgag737 质粒酶切鉴定及 PCR 扩增鉴定 分别用 EcoRI 和 BamHI 酶切质粒 DNA 后, EcoRI 能将质粒酶切成线状, 而 BamHI 因重组后酶切位点消失而无法切割, 线性质粒大小也在 4268bp 和 3530bp 条带之间, 与预期的设计完全一致(图 3)。以克隆质粒为模板, 分别以 sk38/sk39、sk145/sk431 及 GAG1/GAG2 为引物进行 PCR 扩增, 均产生特异扩增产物(图 4)。进一步说明质粒克隆成功, 并含特异克隆片断。

3. 制备 HIV-1 病毒载量定量测定的外参照 pSPgag737 质粒用 EcoRI 在克隆片断的下游将质粒酶切成线性, 用线性质粒作为模板进行体外转录, 具体方法参照宝生物公司 SP6 RNA 聚合酶转录试剂盒说明书进行, RNA 转录产物用紫外分光光度计定量, 十倍系列稀释至 1 拷贝/ml, 获得 HIV-1 病毒载量定量测定的外参照。

4. HIV-1 病毒 RNA 的提取 血清学检测为阳性的艾滋病人静脉采血, EDTA 抗凝, 离心后获血浆。取血浆 200 μ l, 以异硫氰酸胍一步法提取 HIV-1RNA, 异丁醇/醋酸钠沉淀后, 以 50 μ l RNase free 水溶解。

5. HIV-1 病毒载量(Viral load)的测定 分别取十倍系列稀释的外参照 RNA(1~10⁵ 拷贝/ μ l)和样品 RNA 作为模板, 用 sk145/sk431 为引物, 依购自宝生物公司的 BcaBEST™ RNA PCR Kit 说明书进行扩增, 扩增产物在 12%聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳, 以 pGEM-7zf/HaeIII 为 Marker, EB 染色后用 Kodak 凝胶图谱分析系统进行定量测定。根据不同拷贝数的外参照, 其扩增产物电泳条带的光强度(Intensity)或含量(Mass)不同, 在 Excell 中作出 Mass-Input copies 工作曲线。据样品扩增产物电泳条带含量(Mass), 在工作曲线中查出被测样品核酸的初始拷贝数, 进而计算出单位体积血浆中的病毒载量。

如上述 PCR 扩增结果 (图 5) 所显示: 外参照 Mass 随 Log (Input copies) 的增大而递增。利用 Excel 作出的的工作曲线有好的线性关系($r=0.96$), 其回归方程为

$Y(\text{Mass})=25.46X(\text{Log}(\text{Input copies}))+18.13$, 据此回归方程计算出病人的病毒载量分别为 $4.55 \times 10^5 \text{Copies/ml}$ 血浆和 $7.55 \times 10^4 \text{Copies/ml}$ 血浆, 健康人未测出 HIV-1 病毒。

本发明的结果表明, 当以重组 pSPgag737 转录的 RNA 作为测定病毒载量的外参照时, RNA 参照包含有 sk38/sk39 和 sk145/sk431 引物扩增的靶序列。它的检测灵敏度高, 一个反应管内初始拷贝数低至 10 拷贝/ μl 甚至 1 拷贝/ μl 的 RNA 时都能很好地扩增, 扩增效果和特异性都好。

在建立定量 PCR 方法的过程中, 比较了两对引物的扩增结果, 证明用 sk145/sk431 引物扩增效果比 sk38/sk39 好, 工作范围更大, 扩增特异性更好(数据为列出)。目前商品化的试剂 Amplicor Monitor test 和 Nucisens 的检测范围分别是: 50—50,000 拷贝/ml、 $40-10^6$ 拷贝/ml, QUANTIPLEX 的检测下限为 500 拷贝/ml。本研究建立的定量 PCR 方法检测范围是: $10-10^9$ 拷贝/ml (DNA 样品); $5-10^6$ 拷贝/ml (RNA 样品)。如果采用高速离心浓缩样品内的病毒核酸, 检测下限将能进一步提高。经对 10 个未知样品的三次重复测定, 方法本身造成的变异系数低于 35%。

样品号	第一次测定	第二次测定	第二次测定	变异系数 (CV%)
S1	3.92×10^5	4.33×10^5	4.81×10^5	10.23
S2	0.98×10^5	0.76×10^5	1.28×10^5	25.9
S3	0.92×10^5	0.51×10^5	0.64×10^5	30.36
S4	0.07×10^5	0.04×10^5	0.05×10^5	28.71
S5	2.42×10^5	1.74×10^5	1.62×10^5	22.39
S6	1.14×10^5	0.96×10^5	0.78×10^5	18.75
S7	1.26×10^5	0.89×10^5	1.10×10^5	17.13
S8	3.25×10^5	2.87×10^5	2.54×10^5	12.31
S9	5.38×10^5	4.76×10^5	5.15×10^5	6.15
S10	0.61×10^5	0.87×10^5	0.50×10^5	28.79

采用本发明的技术方案, 检测一个样品的试剂成本约 50 元人民币, 除 PCR 仪之外, 一套 Kodak 电泳图谱分析系统和电脑约需 3~4 万元左右, 一般临床和研究机构都可以购买得起, 操作比较简易。

本发明与现有技术相比, 具有操作简单, 价格便宜, 特异性好, 灵敏度高, 同时有较好的可重复性, 将为艾滋病的防治和科学研究提供有力工具。

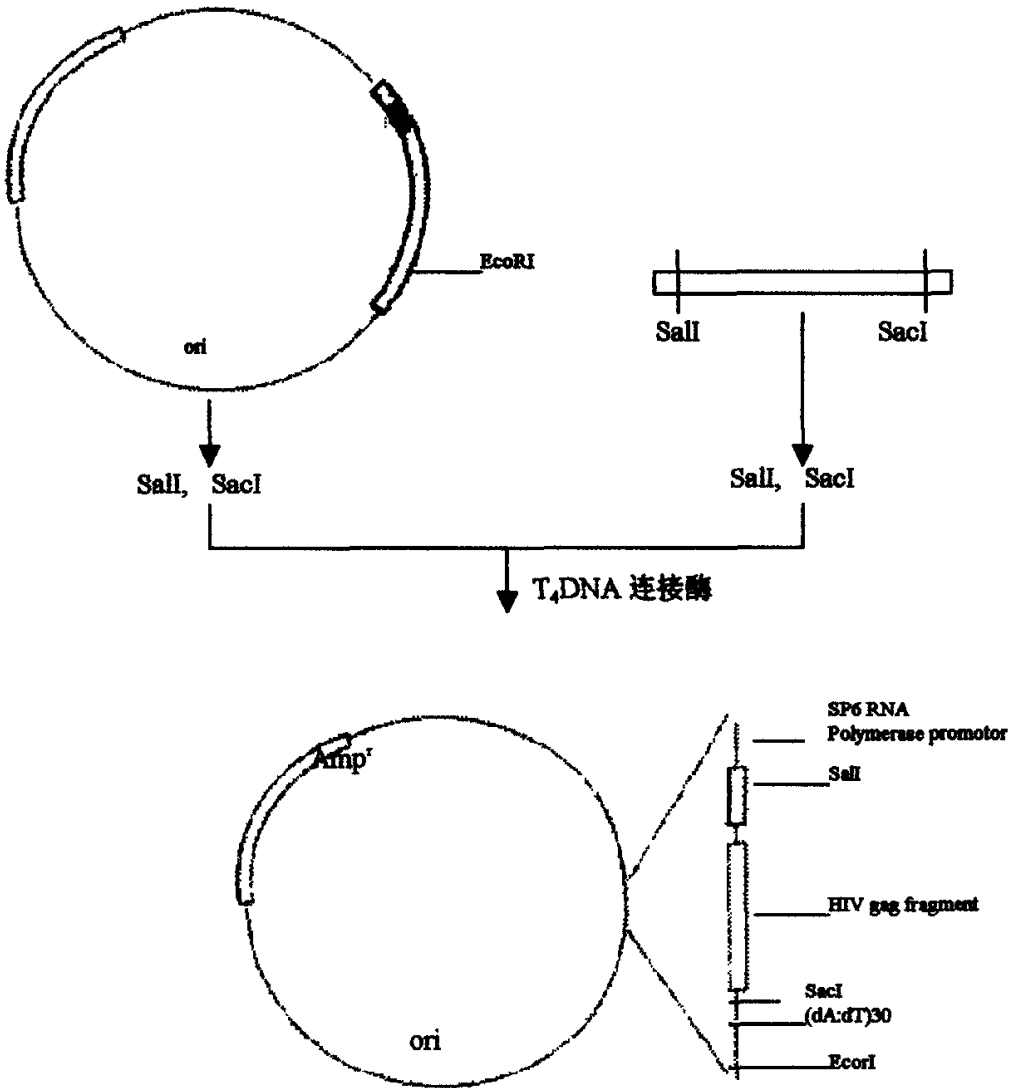


图 1

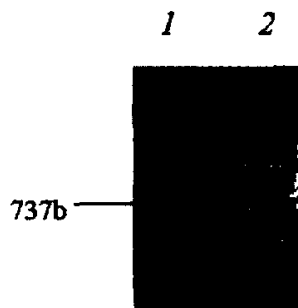


图 2

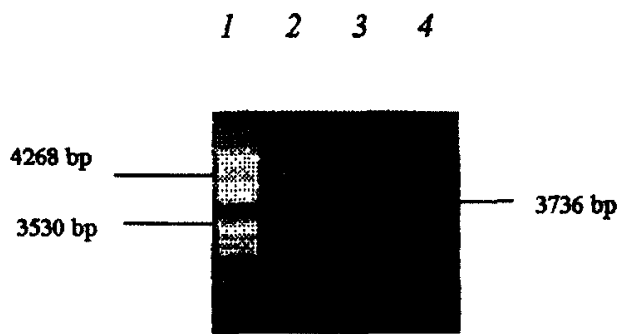


图 3

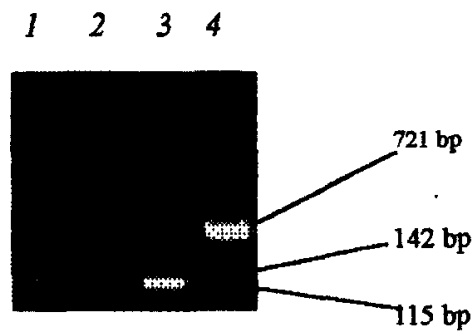


图 4

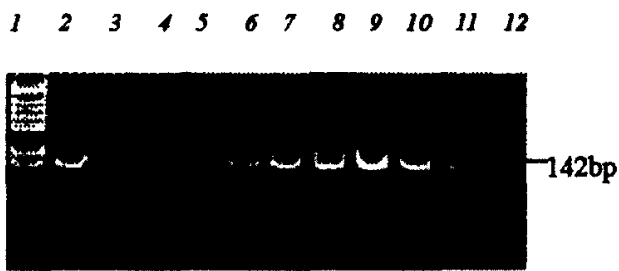


图 5

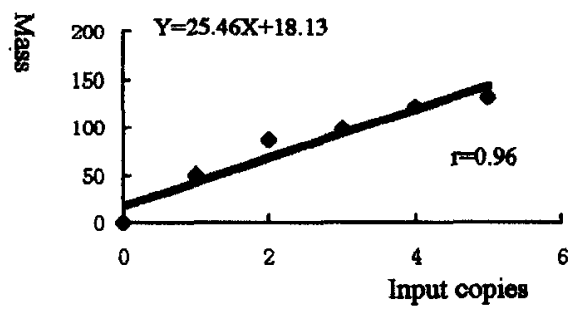


图 6

专利名称(译)	一种质粒及其构建方法和在艾滋病病毒载量测定上的应用		
公开(公告)号	CN1348102A	公开(公告)日	2002-05-08
申请号	CN00131603.6	申请日	2000-10-11
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院昆明动物研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院昆明动物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院昆明动物研究所		
[标]发明人	贲昆龙 夏雪山 徐焕宾 冯汉平		
发明人	贲昆龙 夏雪山 徐焕宾 冯汉平		
IPC分类号	C12N15/10 C12N15/63 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/577		
代理人(译)	杨宏珍		
其他公开文献	CN1123640C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种质粒及其构建方法和在艾滋病病毒载量测定上的应用,属艾滋病防治领域。质粒为pSPgag737/JM109CGMCC NO.0486。构建方法是将HIV - 1前病毒DNA进行Sal I/SacI双酶切,与被同样双酶切的pSP64Poly(A)质粒发生粘性末端连接,得到含有HIV - 1gag基因片断的pSPgag737重组质粒,转化至JM109感受态细胞,经酶切/PCR鉴定,得到阳性克隆子。体外转录阳性克隆子,获得病毒载量定量测定的RNA外参照,将PCR技术与Kodak电泳图谱分析系统相结合,建立了HIV感染者和艾滋病病人血浆病毒载量的定量测定方法。本发明操作简单,价格便宜,特异性好,灵敏度高,可重复性好,作为艾滋病的科学研究与防治的工具。

