中国科学 C辑:生命科学 2009 年 第 39 卷 第 11 期: 1005 ~ 1012
www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

论 文

HIV-1 整合酶去整合活性高通量检测方法的建立

何红秋, 刘斌, 张小轶, 陈慰祖, 王存新*

北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100124

* 联系人, E-mail: cxwang@bjut.edu.cn

收稿日期: 2009-05-18; 接受日期: 2009-07-02

国家自然科学基金(批准号: 30670497)和北京市自然科学基金(批准号: 5072002)资助项目

摘要 HIV-1 整合酶催化病毒DNA与宿主细胞基因组整合, 是病毒复制所需的关键酶之一, 也是抗病毒药物研发的重要靶点. IN及其核心结构域均能在体外催化去整合反应. 本研究表达纯化了IN和IN-CCD蛋白, 建立了一种检测IN和IN-CCD去整合活性的微孔板式高通量方法. 设计了生物素和地高辛修饰的去整合DNA底物, 运用链亲和素标记的珠子捕获反应产物, 再通过酶标地高辛抗体及随后的酶联免疫吸附实验方法对地高辛定量以检测去整合. 结果显示, IN和IN-CCD催化的去整合反应信号(A_{405})分别达到 1.6 和 1.2, 而背景信号值低于 0.05; IN去整合反应更倾向于使用Mn^{2+}而不是Mg^{2+}作为金属辅助离子; 研究还发现, 已知的IN抑制剂baicalein是IN-CCD抑制剂. 以上结果表明, 本工作建立的检测方法能高通量、高灵敏度和高特异性地研究去整合反应, 并能够应用于以IN为靶点, 特别是以IN-CCD为靶点的HIV抑制剂的筛选.

关键词
HIV-1
整合酶
整合酶核心区
去整合
高通量检测方法

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)编码的整合酶(integrase, IN)介导病毒cDNA与宿主细胞基因组的整合, 是病毒复制所必需的关键酶之一[1]. 此外, IN还作为逆转录酶的辅助因子参与了逆转录过程[2,3]. 由于IN在病毒复制中起重要作用, 而正常人体细胞中又无其功能类似物[4,5], IN被认为是抗HIV药物研发的理想靶点[1,6].

IN在体内主要通过催化一个两步反应实现整合. 第一步是3′加工(3′-processing, 3P), IN从经逆转录形成的线性病毒DNA(供体DNA)的 3′末端切除GT二核苷, 暴露出CA末端; 第二步是链转移(strand transfer, ST), IN将 3′加工后的病毒DNA插入到宿主细胞基因组(靶DNA)中, 形成整合中间体, 随后在其他辅助因子协助下完成整合过程[6~8]. 在体外, IN还能够利用链转移反应形成的整合中间体为底物, 催化去整合反应(disintegration), 把形成的整合中间体还原重新生成供体DNA和靶DNA两部分. 去整合被认为是链转移反应的逆反应[9~11].

去整合在体内是否发挥一定的生理功能尚不明确[12]. 但是, 研究去整合反应对研究IN的催化机理具有重要意义. (1) 去整合对IN氨基酸残基和蛋白结构的要求没有 3P和ST反应严格[9], 一些丧失了 3P和ST反应活性的IN突变体仍能保留去整合活性[13~17], 因此, 研究去整合反应有助于确定IN的功能结构域和关键残基; (2) 去整合的底物是ST反应形成的中间体, 其同时包含供体DNA和靶DNA, 发生整合的碱基位点是提前确定且可控制的[10]. 因此可以应用去整合反应研究IN与DNA底物的相互作用; (3) IN包含 3 个结构域: N 端结构域(1~49 号残基), 核心结构域(central catalytic domain, IN-CCD)(50~212 号残基)和 C 端结构域(213~288 号残基). IN-CCD 包含了 IN 的活性中心. IN 使用一个共同的活性中心催化 3P, ST

引用格式: 何红秋, 刘斌, 张小轶, 等. HIV-1 整合酶去整合活性高通量检测方法的建立. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, 39: 1005—1012

和去整合[14]. 与 3P和ST反应需要完整的IN不同, IN-CCD具有独立催化去整合的功能[18,19]. 选择性抑制去整合活性的化合物可能是明确的IN-CCD抑制剂. 因此, 联合应用去整合和其他的体外筛选方法能有助于研究已知IN抑制剂的作用靶点. 此外, IN-CCD是IN中最关键的结构域[13,14,17,18], 使用IN-CCD为靶点筛选去整合反应的抑制剂能够提高IN抑制剂筛选和研发的准确性和成功率.

近年来, 发展的去整合反应活性检测方法主要包括 3 类: (1) 使用放射性同位素标记DNA底物的凝胶电泳和放射自显影方法[10,18]. 这种方法特异性和可信度高, 但是需要使用有毒害的放射性底物, 且难以实现高通量; (2) 使用生物素和地高辛标记DNA底物、亲和素包被微孔板并使用酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)对产物定量的固相微孔板法[20]. 这种方法简便且能够高通量, 但是对微孔板的包被和封闭耗时耗力, 此外, 微孔板封闭容易失效以致反应试剂非特异性吸附在微孔板中造成较高的背景信号; (3) 使用PCR扩增和Taqman探针检测的定量PCR法[21]. 该方法灵敏度高, 但是方法过程相对复杂且荧光信号受干扰较大不适合抑制剂筛选. 以上各种方法在去整合反应研究中得到了广泛的使用, 但都没有应用到IN抑制剂的筛选中. 此外, 目前尚未有直接利用IN-CCD为靶点进行抗 HIV 药物筛选的报道.

本研究表达纯化了野生型IN和IN-CCD蛋白, 建立了一种高通量的去整合活性检测ELISA方法. 实验表明, 该方法能够应用到IN和IN-CCD的活性检测中且具有快速、高特异性和高灵敏度等优点. 此外, 该方法还能用于去整合反应性质的研究和IN抑制剂的机理研究, 并具有应用到以IN特别是IN-CCD为靶点的HIV抑制剂筛选中的前景.

1 材料与方法

1.1 IN 和 IN-CCD 的表达纯化

以pNL-IN质粒[22]为PCR扩增模板, 该质粒含有F185K/C280S可溶性突变的*HIV NL4-3 IN*基因. 利用重叠PCR方法分别定点突变 185K和 280S为 185F和 280C, 得到野生型 IN 基因并克隆到表达载体 pET28b 质粒中构建 pWIN 重组质粒. 测序后正确构建的pWIN转化*Escherichia coli* BL21(DE3), 参照文献[22]方法用IPTG诱导表达. 离心收集菌体, 重悬于含 0.3 g/L溶菌酶的缓冲液A(20 mmol/L HEPES, pH 7.5, 0.5 mol/L NaCl, 2 mmol/L β-mercaptoethanol, 5 mmol/L imidazole)中, 于冰浴中超声破碎细菌. 离心收集沉淀, 用含 1% Triton X-100 的缓冲液 A 洗涤沉淀 1 次, 再用缓冲液 A 洗涤沉淀 3 次. 用含 8 mol/L 尿素的缓冲液 A 溶解沉淀, 室温下搅拌 2 h 对包涵体变性. 离心取上清, 缓慢滴入 4℃预冷的 1 L缓冲液A中, 冰浴中轻摇复性. 参照文献[22], 利用重组IN蛋白N-端的 6-histidine标签亲和层析从复性液中纯化IN. 收集含 IN 的洗脱液对缓冲液 B(20 mmol/L HEPES, pH 7.5, 0.5 mol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 10% glycerol)在 4℃下过夜透析, 分装后–80℃保存.

以pWIN为PCR模板, 扩增IN-CCD的编码序列, 克隆到表达载体pET28b质粒中构建pWIN-CCD重组质粒. 测序后正确构建的pWIN-CCD转化 *Escherichia coli* BL21(DE3), 参照前面所述表达纯化IN的方法步骤表达纯化 IN-CCD.

SDS-PAGE 分析 IN 和 IN-CCD 的表达纯化效果, 用 Bradford 法测定蛋白浓度.

1.2 IN 和 IN-CCD 的活性鉴定

参照文献[22]方法, 测定IN和IN-CCD的 3P和ST 活性, 并对方法进行如下修改: 使用含 CAGT-3′的平末端供体 DNA 代替以前方法中不含 GT-3′末端的 3P 切割后供体 DNA. IN 和 IN-CCD 去整合活性的测定参照文献[20]运用亲和素包被微孔板的ELISA方法.

1.3 IN 和 IN-CCD 去整合活性高通量 ELISA 方法

去整合实验在 96 孔板中进行, 反应体系为 50 μL. 将 3 条 DNA 链 Dis Ⅰ(5′-ACTGCTAGAGATTTTCCACGTGGAAAATCTCTAGCAGGCTGCAGGTCGAC-3′-digoxin), Dis Ⅱ(biotin-5′-TTTTCAGCAACGCAAGCTTG-3′) 和 Dis Ⅲ(5′-TCGACCTGCAGCCCAAGCTTGCGTTGCTG-3′)按照 1∶1.5∶2 的摩尔浓度比混匀, 95℃变性 3 min, 缓慢冷却至室温, 即为去整合反应底物 DNA. 反应体系成分为: 25 mmol/L PIPES, pH 7.0, 10 mmol/L β-mercaptoethanol, 5% glycerol,

0.1 g/L BSA, 360 nmol/L IN(或IN-CCD)以及 50 nmol/L底物DNA. 37℃预孵育 30 min, 加入终浓度为 7.5 mmol/L $MnCl_2$, 37℃孵育 1 h进行反应. 加入 52 μL结合缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 2 mol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 0.1% Tween 20)终止反应, 加入 2 μL链亲和素珠子(M-280 streptavidin magnetic beads, SA-MBs, Dynal Biotech), 震荡混匀后 25℃孵育 15 min. PBST洗板 2 次以除去未结合的DNA产物. 洗板程序为: 加入PBST, 震荡混匀, 将微孔板于珠子收集器上(MPC-96B concentrator, Dynal Biotech)静置 90 s, 弃液体. 加入 100 μL碱变性液(30 mmol/L NaOH, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA), 37℃孵育 5 min, 重复操作 2 次以变性捕获的DNA产物. PBST 洗板 3 次, 加入 100 μL以PBS 1∶5000 稀释的碱性磷酸酶标记的地高辛抗体(monoclonal antidigoxin alkaline phosphatase conjugate antibody, AP-antidigoxin-Ab), 震荡混匀, 37 ℃孵育 30 min. PBST洗板 3 次, 转移珠子至新的微孔板中, 弃液体后加入 100 μL 显色底物(0.1 mol/L Na_2CO_3, pH 9.5, 6.7 mmol/L P-Nitrophenyl Phosphate, 2 mmol/L $MgCl_2$)避光显色 20min, 加入 20 μL 2 mol/L NaOH终止显色后酶标仪测定 405 nm 处吸光值.

2 结果

2.1 IN 和 IN-CCD 的表达、纯化和活性鉴定

F185K和C280S可溶性突变后IN相对于野生型IN虽然活性差别不大, 但在药物筛选方面有较显著的区别[23], 因此, 构建了野生型IN和IN-CCD重组质粒, 在大肠杆菌中进行表达. 15% SDS-PAGE对蛋白表达纯化结果的分析显示, 野生型IN和IN-CCD重组质粒实现了高效表达, 与不含重组质粒的 BL21 (DE3)细菌相比, 转化了 pWIN 和 pWIN-CCD 质粒的细菌分别在 33 和 21 kD 处有明显条带, 分别与目的蛋白 IN 和 IN-CCD 分子量相当. IN 和 IN-CCD 重组蛋白均主要以包涵体形式表达. 对包涵体变性、复性并利用亲和层析纯化后, 目的蛋白纯度均在 90%以上(图 1(A)).

对纯化后的 IN 和 IN-CCD 蛋白分别进行了活性分析. 在 ST 活性检测中使用了含 CAGT-3′平末端的供体 DNA, 反应首先要切出 GT 二核苷再进行 ST 反应, 因此, 反应实际测定的是 3P 加 ST 的功能活性. 以A_{405}值大小表示结果信号, 不加蛋白的阴性对照组低于 0.05, 而 IN 催化的反应组高于 1.3. IN-CCD 无催化 3P 和 ST 反应活性, 其结果与阴性对照组相当(图 1(B)). 这与文献 [18,19] 中 3P和ST反应需要IN而IN-CCD 无独立催化这两步反应的功能一致. IN 和 IN-CCD 的去整合反应组信号分别在 0.9 和 0.65 左右, 无蛋白阴性对照组则约为 0.09(图 1(C)). 以上结果表明纯化的 IN 和 IN-CCD 重组蛋白均具有正常的功能活性.

2.2 去整合高通量 ELISA 方法的灵敏度和特异性

为了实现对 IN 和 IN-CCD 去整合反应活性的高通量检测, 建立了一种基于微孔板形式的 ELISA 检测方法. 设计的去整合底物由 3 条寡核苷酸链退火形成. 去整合反应将 5′生物素标记链与 3′地高辛标记链共价连接起来, 形成 5′生物素和 3′地高辛双标记的双链 DNA 产物. 亲和素珠子通过生物素与链亲和素的特异性相互作用捕获反应产物, 碱变性液再把 DNA 产物变性为单链, 同时变性未反应的底物 DNA. 再利用 AP-antidigoxin-Ab 及随后的 ELISA 对 DNA 产物链的 3′地高辛定量以检测去整合反应(图 2).

为了优化ELISA检测方法, 改变了DNA底物和IN的不同浓度, 发现 50 nmol/L去整合底物和 360 nmol/L IN是最佳反应条件组合. 在以上条件下, Mn^{2+}为金属辅助离子时IN去整合反应组信号高于 1.6 A_{405}, 而无IN、无DNA底物或无金属辅助离子的各种阴性对照组信号值均低于 0.05(图 3). 以上结果表明, 本方法是一种依赖金属辅助离子的特异性反应. 为进一步考察方法的灵敏度和特异性, 根据文献[24,25]的定义和公式计算了信噪比(signal-to-noise ratio, S/N)、信号背景比(signal-to-background ratio, S/B)及Z′因子等评价检测方法的参数. 在Mn^{2+}为金属辅助离子条件下, IN去整合反应体系的S/N、S/B和Z′因子分别高达 166, 41 和 0.90.

进一步测试了 IN-CCD 在去整合 ELISA 方法体系中的反应效率. 保持其他反应条件不变,使用 IN-CCD 代替反应体系中的 IN. 与 IN 去整合反应相似, Mn^{2+}为金属辅助离子时IN-CCD去整合反应组信号高于 1.2A_{405}, 而各种阴性对照组信号值均低于 0.05(图 3). 相应的S/N, S/B和Z′因子则分别为 126, 31 和 0.82. 以上结果表明在同样反应条件下IN去整

合反应活性高于IN-CCD, 与文献[26]报道结果一致.

相对于使用亲和素包被微孔板的固相 ELISA 方法获取的结果(图 1(C)), 使用珠子捕获 DNA 产物 ELISA 方法得到的 IN 和 IN-CCD 去整合反应信号值是其两倍高, 背景信号值却显著降低(图 3). 以上这些结果表明, 本方法能够用于检测 IN 和 IN-CCD 去整合活性且具有高灵敏度和高特异性.

2.3 去整合反应中金属辅助离子的选择偏好性

IN在体内和体外发挥功能都需要二价金属阳离子的参与. Mg^{2+}被认为是IN在体内生理条件下的金属辅助离子, 但体外实验发现, IN以Mg^{2+}为辅助离子时 3P和ST活性很低甚至没有活性, 因此体外实验通常使用Mn^{2+}为辅助离子[22,27,28]. 本研究考察了Mg^{2+}和Mn^{2+}对去整合活性的影响. IN在Mg^{2+}和Mn^{2+}为辅助离子条件下都有较好的去整合活性, 但Mn^{2+}为辅助离子时反应活性是Mg^{2+}为辅助离子时的 4 倍左右; IN-CCD只能以Mn^{2+}为去整合辅助离子, 其去整合活性在Mg^{2+}为辅助离子时基本完全丧失(图 3). 以上结果与使用放射性同位素标记DNA底物的放射自显影方法测定结果一致[26]. 因此, 本研究使用Mn^{2+}为金

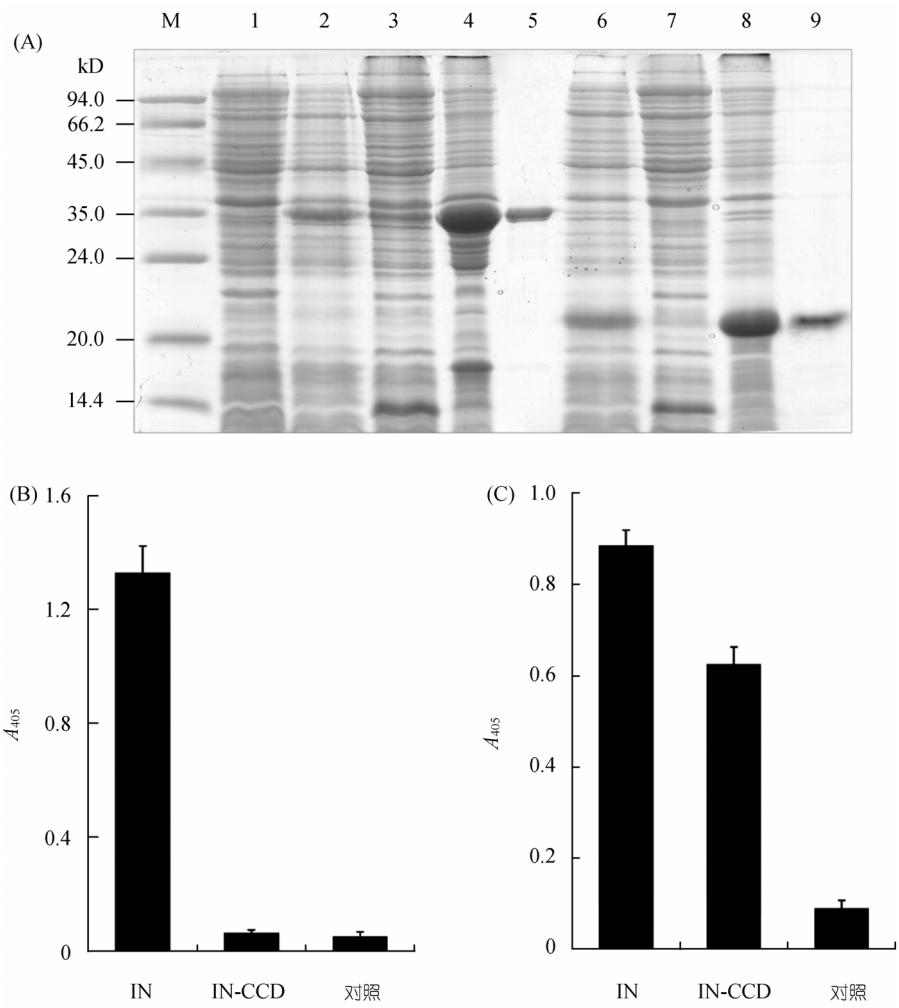


图 1 蛋白表达、纯化和功能鉴定

(A) 蛋白表达纯化的 15% SDS-PAGE 分析, 考马斯亮蓝染色. M: 蛋白质分子量标准; 泳道 1: 诱导后的 BL21 空细菌对照; 泳道 2: 诱导后的 pWIN/BL21; 泳道 3: pWIN/BL21 细胞破碎液上清; 泳道 4: pWIN/BL21 细胞破碎液沉淀; 泳道 5: 纯化后 IN; 泳道 6: 诱导后的 pWIN-CCD/BL21; 泳道 7: pWIN-CCD/BL21 细胞破碎液上清; 泳道 8: pWIN-CCD/BL21 细胞破碎液沉淀; 泳道 9: 纯化后 IN-CCD; (B) IN 和 IN-CCD 的 3P 和 ST 功能鉴定; (C) IN 和 IN-CCD 去整合功能鉴定

属辅助离子.

本实验使用了 NaCl 滴定法以进一步研究金属辅助离子在去整合反应中的选择偏好性. NaCl 滴定法曾被应用到IN的 3P反应, 并得出金属辅助离子具有较强的稳定IN-DNA复合物的作用[20]. 利用本研究提出的ELISA方法, 考察了分别以Mg^{2+}和Mn^{2+}为辅助离子时, 去整合活性对 NaCl 浓度的响应情况. 结果显示, IN 去整合活性在两种不同的金属离子存在时对NaCl浓度梯度响应具有显著区别. 无论是其反应活性的最佳NaCl浓度还是对高浓度NaCl的耐受性都不同. 当以Mn^{2+}为辅助离子时, IN在NaCl浓度为 80 mmol/L时去整合活性最高, 当NaCl浓度高达 150 mmol/L时, IN仍能维持 50%以上的去整合活性; 当以Mg^{2+}为辅助离子时, IN在NaCl浓度为 50 mmol/L时去整合活性最高, 当NaCl浓度为 110 mmol/L时, IN基本丧失了去整合活性(图 4).

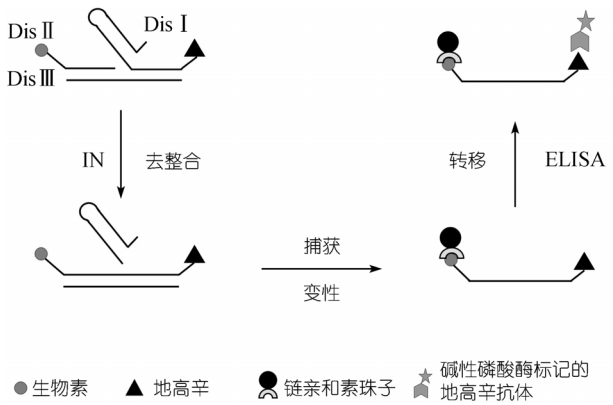


图 2 去整合反应高通量 ELISA 方法示意图

去整合反应共价连接 5′生物素标记链与 3′地高辛标记链, 形成 5′生物素-3′地高辛双标记的 DNA 产物; 链亲和素珠子捕获产物并对其碱变性形成单链; 加入碱性磷酸酶标记的地高辛抗体, 利用 ELISA 定量地高辛以检测反应

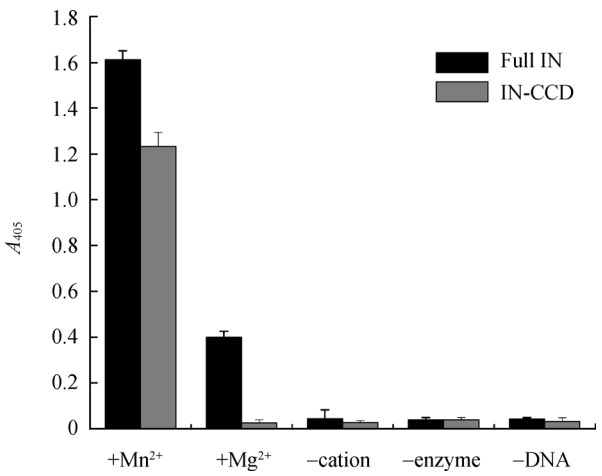


图 3 ELISA 方法在最佳反应条件下各实验组信号值

图表下方反应成分下标注(–)表示该反应成分在反应中被剔除; (+)表示反应中使用这种二价金属离子为辅助离子, 其他反应成分相同

2.4 去整合高通量 ELISA 方法测定抑制剂对 IN 和 IN-CCD 活性的抑制

IN抑制剂baicalein能够在体外抑制IN 3P和ST活性, 同时能够在细胞水平抑制病毒复制[22,28]. 将以DMSO稀释至不同浓度的baicalein与IN加入反应体系中, 37℃预孵育 15 min, 随后加入Mn^{2+}和去整合DNA底物, 37℃孵育 1 h. 利用珠子捕获反应产物结合 ELISA 方法测定结果信号. 设置无样品的 DMSO溶剂对照和无 IN 对照, 计算 IN 在不同浓度 baicalein存在下的相对活性. 结果显示, IN 去整合活性随着baicalein浓度增加而降低. 通过非线性拟合计算baicalein对IN去整合抑制的半数抑制浓度(IC_{50})值为2.66 μmol/L(图 5(A)). 类似地, 测定了baicalein对IN-CCD去整合的抑制效果, 计算得到其IC_{50}值为2.86 μmol/L(图 5(B)).

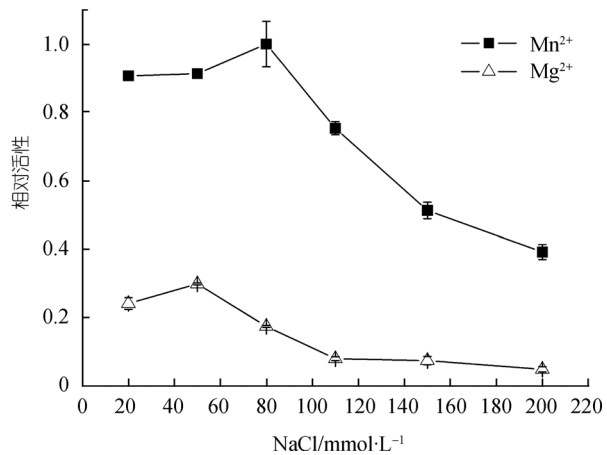


图 4 不同浓度 NaCl 对 IN 去整合活性影响

分别以Mn^{2+}和Mg^{2+}为去整合反应的金属辅助离子, IN, DNA底物和不同浓度NaCl预孵育, 再加入金属离子开始反应并计算去整合反应相对活性

3 讨论

本研究建立了一种检测 IN 体外去整合活性的高通量 ELISA 方法. 与已有的检测方法相比, 本文的方法具有一些显著的优点: (1) 本方法使用生物素、地高辛及相应的珠子和 ELISA 检测体系, 反应和检测等操作均在 96 孔板中进行, 还可以应用更高通量的各种微孔板中, 保证了方法无需有污染的放射性底物, 实现了高通量; (2) 在反应完全结束后再加入珠子捕获去整合产物, 反应成分可以在任意反应时间加入并和其他成分预孵育, 相比较于传统微孔板法需要先包被底物 DNA 在微孔板中, 本方法能够灵活的研究反应成分之间的相互作用, 有助于研究 IN 抑制剂的作用机理; (3) 与微孔板包被链亲和素的固相 ELISA 方法相比, 无论捕获反应产物还是结合抗体时, 本方法中链亲和素珠子始终悬浮在液体中, 链亲和素和生物素以及地高辛与其抗体相互接触更容易更充分, 因此方法的信号得到显著提高, 灵敏度提升; (4) 在加入显色底物前将珠子转移到新的微孔板中, 能够有效消除反应过程中微孔板非特异性吸附的反应试剂, 显著降低了背景信号提高了方法灵敏度. 此外, 通过转移珠子避免了微孔板封闭等耗时耗力的操作.

与 3P和ST反应中结果[22,27,28]相似, IN在去整合反应中仍然偏好于使用Mn^{2+}, Mg^{2+}为辅助离子时IN活性较低而 IN-CCD 甚至没有活性. 本研究使用了NaCl滴定法研究IN去整合中的金属离子选择偏好性. 结果显示, Mn^{2+}依赖的去整合活性能够承受更高的盐浓度. 这与IN 3P和ST反应的NaCl滴定结果一致[20,29]. 高盐浓度能够破坏蛋白与DNA的相互作用, 因此, 本研究中IN去整合对Mn^{2+}的偏好性可能与文献[20]提出的Mn^{2+}比Mg^{2+}更能稳定IN-DNA复合物有关.

IN 是抗 HIV 药物研发的重要靶点, 但是至今只有 raltegravir(一种针对 IN 的抗 HIV 药物)上市使用. IN-CCD 具有独立催化去整合功能. 因此, 本研究建立去整合检测方法的主要目的是应用其筛选 IN 抑制剂, 特别是 IN-CCD 抑制剂. 应用 IN 抑制剂 baicalein 测试该方法对抑制剂筛选的有效性, 其IC_{50}值与其对ST反应抑制效果相当[22,28]. 以上结果验证了去整合和ST反应使用同一个催化中心[14], 同时表明baicalein可能通过抑制 IN-CCD 而抑制 IN 活性. 本研究进一步使用了 IN-CCD 蛋白来测试 baicalein 的抑制效果, 发现baicalein对IN-CCD抑制的IC_{50}值与其对IN抑制的值相似. 这一结果证实了baicalein是IN-CCD抑制剂. 以上结果也证实了本方法能够应用于已知IN抑制剂作用机理的研究. 此外, 对IN ST活性的抑制是体内抑制病毒复制的关键步骤[30,31], 去整合是ST的逆反应且和ST使用同一活性中心, 体外筛选的去整合反应抑制剂则有可能像ST抑制剂一样在体内有效. 本研究的ELISA方法具有高通量筛选IN抑制剂

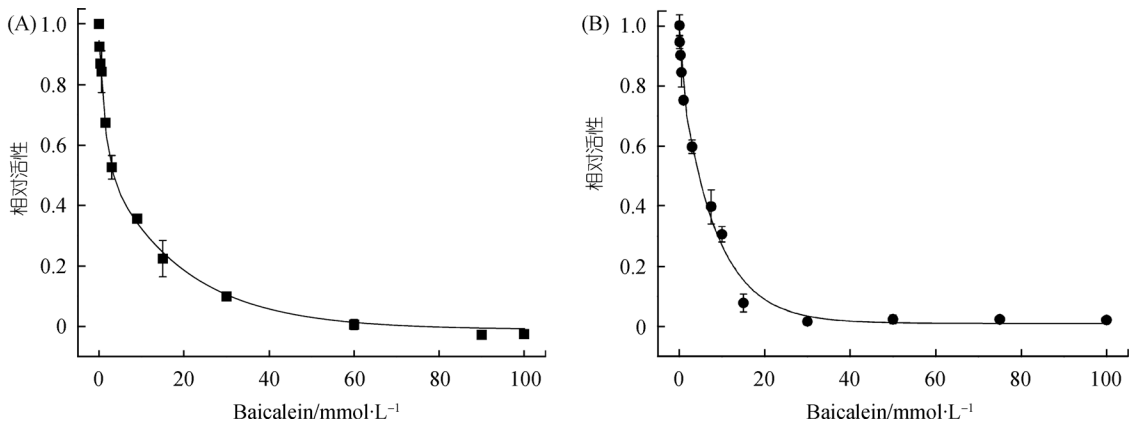


图 5 Baicalein 对 IN(A)和 IN-CCD(B)去整合活性的抑制

DMSO 稀释后不同浓度的样品加入到反应体系中, 反应体系中 DMSO 终浓度为 10%. 设置不加样品的 DMSO 对照和不加 IN(或 IN-CCD)的对照

的潜力.

总之, 本研究建立的方法能够准确、特异性的检测 HIV IN 和 IN-CCD 去整合活性; 能够有效的应用到 IN 抑制剂, 特别是 IN-CCD 抑制剂的筛选中; 此外, 本方法还能与 IN 活性检测的其他方法联合应用以研究 IN 抑制剂的作用机理.

参考文献

1 Engelman A, Mizuuchi K, Craigie R. HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. Cell, 1991, 67: 1211—1221[DOI]

2 Hehl E A, Joshi P, Kalpana G V, et al. Interaction between human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and integrase proteins. J Virol, 2004, 78: 5056—5067[DOI]

3 Zhu K, Dobard C, Chow S A. Requirement for integrase during reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and the effect of cysteine mutations of integrase on its interactions with reverse transcriptase. J Virol, 2004, 78: 5045—5055[DOI]

4 Asante-Appiah E, Skalka A M. HIV-1 integrase: structural organization, conformational changes, and catalysis. Adv Virus Res, 1999, 52: 351—369[DOI]

5 Brown P O. Integration. In: Coffin J C, Hughes S H, Varmus H E, eds. Retroviruses. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1999. 161—203

6 Pluymers W, De Clercq E, Debyser Z. HIV-1 integration as a target for antiretroviral therapy: a review. Curr Drug Targets Infect Disord, 2001, 1: 133—149[DOI]

7 Craigie R. HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics. J Biol Chem, 2001, 276: 213—216

8 Chiu T K, Davies D R. Structure and function of HIV-1 integrase. Curr Top Med Chem, 2004, 4: 965—977[DOI]

9 Chow S A, Vincent K A, Ellison V, et al. Reversal of integration and DNA splicing mediated by integrase of human immunodeficiency virus. Science, 1992, 255: 723—726[DOI]

10 Chow S A, Brown P O. Substrate features important for recognition and catalysis by human immunodeficiency virus type 1 integrase identified by using novel DNA substrates. J Virol, 1994, 68: 3896—3907

11 Lee S P, Kim H G, Censullo M L, et al. Characterization of Mg^{2+}-dependent 3'-processing activity for human immunodeficiency virus type 1 integrase *in vitro*: real-time kinetic studies using fluorescence resonance energy transfer. Biochemistry, 1995, 34: 10205—10214[DOI]

12 Chow S A. *In vitro* assays for activities of retroviral integrase. Methods, 1997, 12: 306—317[DOI]

13 Bushman F D, Engelman A, Palmer I, et al. Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 3428—3432[DOI]

14 Engelman A, Craigie R. Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type I integrase function in *vitro*. J Virol, 1992, 66: 6363—6369

15 Leavitt A D, Shiue L, Varmus H E. Site-directed mutagenesis of HIV-1 integrase demonstrates differential effects on integrase functions *in vitro*. J Biol Chem, 1993, 268: 2113—2119

16 van Gent D C, Oude Groeneger A A M, Plasterk R H A. Mutational analysis of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 2. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 9598—9602[DOI]

17 Vink C, Oude Groeneger A A M, Plasterk R H A. Identification of the catalytic and DNA-binding region of the human immunodeficiency virus type 1 integrase protein. Nucleic Acids Res, 1993, 21: 1419—1425[DOI]

18 Jenkins T M, Hickman A B, Dyda F, et al. Catalytical domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase: identification of a soluble mutant by systematic replacement of hydrophobic residues. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 6057—6061[DOI]

19 Jenkins T M, Engelman A, Ghirlando R, et al. A soluble active mutant of HIV-1 integrase: involvement of both the core and carboxyl domain in multimerization. J Biol Chem, 1996, 271: 7712—7718[DOI]

20 Gao K, Wong S, Bushman F. Metal binding by the $D,DX_{35}E$ motif of human immunodeficiency virus type 1 integrase: selective rescue of Cys substitutions by Mn^{2+} *in vitro*. J Virol, 2004, 78: 6715—6722[DOI]

21 Diamond T L, Bushman F D. Role of metal ions in catalysis by HIV integrase analyzed using a quantitative PCR disintegration assay. Nucleic Acids Res, 2006, 34: 6116—6125[DOI]

22 He H Q, Ma X H, Liu B, et al. A novel high-throughput format assay for HIV-1 integrase strand transfer reaction using magnetic beads. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29: 397—404[DOI]

23 Marchand C, Johnson A A, Karki R G, et al. Metal-dependent inhibition of HIV-1 integrase by beta-diketo acids and resistance of the soluble double-mutant (F185K/C280S). Mol Pharmacol, 2003, 64: 600—609[DOI]

24 Inglese J, Johnson R L, Simeonov A, et al. High-throughput screening assays for the identification of chemical probes. Nat Chem Biol, 2007, 3: 466—479[DOI]

25 Zhang J H, Chung T D, Oldenburg K R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. J Biomol Screen, 1999, 4: 67—73[DOI]

26 Hickman A B, Palmer I, Engelman A, et al. Biological and enzymatic properties of the catalytic domain of HIV-1 integrase. J Biol Chem, 1994, 269: 29279—29287

27 Debyser Z, Cherepanov P, Pluymers W, et al. Assays for the evaluation of HIV-1 integrase inhibitors. Methods Mol Biol, 2001, 160: 139—155

28 Tramontano E, Onidi L, Esposito F, et al. The use of a new *in vitro* reaction substrate reproducing both U3 and U5 regions of the HIV-1 3′-ends increases the correlation between the *in vitro* and *in vivo* effects of the HIV-1 integrase inhibitors. Biochem Phar, 2004, 67: 1751—1761[DOI]

29 Engelman A, Craigie R. Efficient magnesium-dependent human immunodeficiency virus type 1 integrase activity. J Virol, 1995, 69: 5908—5911

30 Farnet C M, Wang B, Lipford J R, et al. Differential inhibition of HIV-1 preintegration complexes and purified integrase by small molecules. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 9742—9747[DOI]

31 Hazuda D J, Felock P J, Witmer M, et al. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. Science, 2000, 287: 646—650[DOI]