

HCV 基因组 NS1 区的分子克隆及序列测定*

李刚 姚集鲁 彭文伟 吕凌 王斌**

(中山医科大学传染病学教研室, 广州 510630)

A

摘要 对广东省一名慢性丙型肝炎病人血清中的 HCV 基因组 NS1 区进行分子克隆及序列测定。采用微粒吸附法提取 HCV RNA, 随机引物逆转录后进行聚合酶链反应。所用引物位于 NS1 区, 扩增产物 780bp 在低熔点琼脂糖中电泳, 回收相应条带处凝胶, 与 pUC18 的连接反应直接在低熔点琼脂糖中完成。重组体转化 JM109, 挑取菌落增殖后提取的质粒采用 PCR 和酶切法鉴定阳性克隆。将其中 320bp 的片段亚克隆到 pUC18 和 pUC19, 随后采用双脱氧链末端终止法测其核苷酸序列, 与国内外多个株比较, 同源性介乎 68.86%—90.84%。

关键词 丙型肝炎病毒, 聚合酶链反应, 分子克隆, 核苷酸序列

基因组; 序列测定

HCV 是 1989 年经反向病毒学方法确证的肠道外传播非甲非乙型肝炎主要病原, 属于单股正链 RNA 病毒。其基因组全长约 9.4kb, 依次排列为 5' 末端非编码区。结构蛋白 C 区和 E 区, 非结构蛋白 NS₁-NS₅ 区及 3' 末端非编码区。各基因区的功能和变异程度不同, NS1 区变异较大。有学者认为此区变异可能涉及丙肝慢性化或癌变, 其编码蛋白可能刺激机体产生保护性抗体, 对疫苗研制有潜在应用价值(第四届国际肝病会议资料)。本文对广东地方株的 HCV NS1 区进行了 PCR 克隆及序列测定, 为基因表达和疫苗研制做好前期工作。

材料和方法

1 血清标本

取自广东省阳春县 43 岁男性患者, 抗 HCV 阳性, 临床诊断为慢性活动性丙型肝炎, 无输血史。

2 主要试剂

AMV 逆转录酶, RNasin, Taq DNA 聚合酶, pUC18, pUC19(华美公司), 随机引物, 低熔点琼脂糖, T4 DNA 连接酶(BRL 公司), Hind III, Pst I (BM 公司)。引物由中国科学院上海细胞生物学研究所合成, 序列及位置如下。

L G2, 5' GAGAAGCTTTATTGCTGGCACTAC 3' (1444—1467)(+)

L G3, 5' TTTCTGCAGCAATCCGTGGGGCA 3' (1763—1741)(-)

L G4, 5' TATCTGCAGCATCATCCACAAGCA 3' (2223—2200)(-)

3 PCR 产物的获取

采用微粒吸附法提取 HCV RNA^[1], 血清 100 μ l 加入微粒吸附剂 15 μ l, 裂解液 300 μ l(内含 SDS, Tris EDTA, Triton, 异硫氰酸胍), 室温放置 1h, 中间摇匀几次, 4000y/min 离心 30', 弃液相, 用 1ml 70%酒精洗一次, 弃酒精后吸干。加入随机引物 300ng, AMV 逆转录酶 10 单位, 0.25mmol/L dNTP 3 μ l, RNasin 40 单位, 10 \times Buffer 3 μ l,

本文于 1994 年 5 月 3 日收到, 9 月 26 日修回

* 广东省科委基金资助项目, 并得到美国中华医学基金会部分资助。

** 中山医科大学免疫学教研室

逆转录反应体积 30 μ l, 42 $^{\circ}$ C 1h, 中间摇匀几次。离心后吸出液相作 PCR 模板, PCR 总反应体积 50 μ l, 内含特异引物 LG2, LG4 各 100ng, 0.25mmol/L dNTP 5 μ l, 5 \times Buffer 10 μ l, Taq DNA 聚合酶 2 单位, 在 93 $^{\circ}$ C 30", 55 $^{\circ}$ C 30", 72 $^{\circ}$ C 1min 循环 32 次, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸反应 7min, 取 10 μ l, 电泳, 在紫外灯下观察结果。

4 PCR 产物的分子克隆及亚克隆^[3]

用内切酶 Hind III 及 Pst I 消化 pUC18 和经酚、氯仿抽提的 PCR 产物, 然后在低熔点琼脂糖中电泳, 切下相应条带处的凝胶。连接反应直接在低熔点琼脂糖中进行, 总体积 100 μ l, 内含 PCR 产物, pUC18, 5 \times 连接 Buffer, T4DNA 连接酶 2 μ l, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。加入 80 μ l JM109 钙化菌, 钙化菌制备及转化过程按文献 2 的方法。转化菌在 LBA 平皿中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取多个菌落在液体培养基中增殖, 碱变性法提取质粒。然后用 PCR、半巢式 PCR 及单、双酶切法鉴定阳性克隆。以重组质粒 pUL780 为模板, 经引物 LG2, LG3 半巢式扩增获得一长 320bp 片段, 用上述同样方法克隆到 pUC18 及 pUC19 质粒中。

5 DNA 序列测定

重组的亚克隆 pUC18 及 pUC19 模板采用双脱氧链末端终止法, 以 373A DNA 全自动测序仪 (Applied Biosystems 公司) 测定核苷酸序列, 测序时采用 Taq DNA 聚合酶及荧光标记的通用引物, 同一片段经正反两方向多次重复测定。

结 果

1 阳性克隆 pUL780 的鉴定

HCV NS1 区的 780bp 片段插入 pUC18 的多克隆位点 Hind III 和 Pst I 之间, 重组质粒 pUL780 经 Pst I 单酶切后与空载体 pUC18 比较电泳时泳动较慢。EcoR I 及 Hind III 双酶切后电泳, 切出一条带, 比插入片段 780bp 稍大 (780bp + EcoR I、Pst I 切点间的 40bp) 另外, 以重组质粒为模板, 用特异引物 LG2, LG3, LG4 作 PCR 及半巢式 PCR 扩增, 获得 780bp 和 320bp 的产物 (见图 1)。

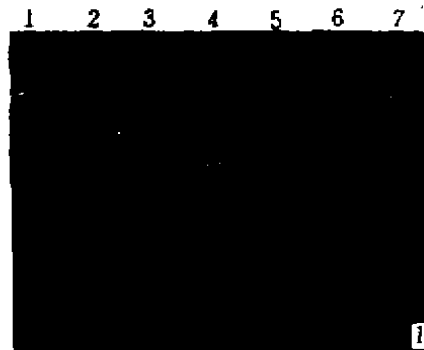


图 1 PCR 和酶切鉴定重组质粒 pUL780

- 1: DNA 分子量标准 (pBR322/Hinf I);
- 2: pUL780 经 LG2, LG3 扩增的产物;
- 3: pUL780 经 LG2, LG4 扩增的产物;
- 4: pUL780 经 EcoR I, Hind III 消化;
- 5: pUL780 经 Pst I 消化;
- 6: pUC18 经 Pst I 消化;
- 7: DNA 分子量标准 (ADNA/Hind III)。

Fig. 1 Recombinant plasmid pUL780 identified by PCR and restriction endonucleases

1. DNA molecular weight marker (pBR322/Hinf I).
2. PCR products of pUL 780 amplified with primer LG₂ and LG₃.
3. PCR products of pUL 780 amplified with primer LG₂ and LG₄.
4. pUL 780 digested with EcoR I and Hind III.
5. pUL 780 digested with Pst I.
6. pUC 18 digested with Pst I.
7. DNA molecular weight marker (ADNA/Hind III).

2 HCV 广东株 NS1 区部分片段的核苷酸序列及与其他分离株的比较 结果见图 2。

1444 cagaagctttattgctggcactacGCACCCCGGCCGTGGGTATCGTACCCGGTGGTGGGTGTCGGTCCAGTGTATT

HCV-HB —G—T—AAA—C—T—G—
 HCV-T —————T—————C—T—G—
 HCV-1 C—C—AAAA—T—T—G—AA—A—T—T—G—A—
 HCV-J —G—T—A—G—G—T—C—T—
 HCV-BK C—T—CA—AA—TACC—T—G—C—C—
 HC-J6 C—AA—A—A—T—G—A—CT—AGC—CT—T—C—C—
 HC-J8 C—C—GA—T—G—C—G—TAG—AC—T—A—G—C—

1523 GCITCACCCEAAGCCCTGTTGTGGTGGGACGACCGATCGCTCCGGTGTCCCTACGTATACGTGGGGGAGAATGAGAC

—T—C—C—T—T—C—A—GC—
 —C—C—T—T—C—GC—
 —T—C—C—G—A—A—CA—G—G—C—CG—C—C—C—GC—T—A—T—
 —T—G—T—T—C—CT—GC—
 —C—C—T—T—GA—C—
 —T—C—A—A—A—T—A—TA—T—A—CG—C—T—C—
 —T—T—C—C—C—T—CAAGCAG—C—A—C—C—C—C—A—A—C—

1602 AGACGTGCTGCTTCTCAACAACACGGGCCCGCAAGGCAACTGGTTCGGCTGTACATGGATGAATGGCACTGGGTTT

—C—T—
 G—A—C—T—A—A—
 G—CT—CG—C—T—T—CA—A—TG—T—T—C—CTCA—A—
 —A—T—G—T—T—G—C—G—CA—
 T—G—C—A—C—
 —T—CT—C—AT—G—G—T—A—A—G—GTCA—C—G—CTC—C—A—
 C—T—CT—C—G—A—T—G—AA—A—C—G—AGCT—C—C—C—G—

1681 ACCAATACATGGGGGGCCCCCTGTAAACATTGGGGGGTTCCGGCAACAACACCTTGACCTGccccacggattgctgcagaaa

—G—G—G—T—G—C—G—T—T—
 —G—G—G—C—GG—GT—
 —AGTG—A—CG—T—T—GT—C—A—GCG—C—CA—
 —G—G—T—G—C—C—G—GT—
 —G—T—G—G—C—G—C—
 —G—T—C—CA—A—CCG—A—CTGA—TT—TGC—G—TTG—
 —T—G—T—CA—A—T—CCG—A—AAAGA—TA—G—T—ATTG—

图2 HCV 广东株 NS1 区 cDNA 序列与河北株、台湾株(中国),HCV-1(美国原型株),HCV-J,HCV-BK,HC-J6,HC-J8(日本) 序列的比较

Fig. 2 Comparison of cDNA sequences of the HCV-GD NS1 genomic region with that of HCV-HB,HCV-T,(China) HCV-1(American prototype isolate),HCV-J,HCV-BK,HC-J6,HC-J8(Japan)

表 1 丙型肝炎病毒广东株与其他中国株之间 NS1 区的变异情况

Tab 1 Divergence in the NS1 genomic region of Guangdong strain and the reported Chinese strains

核苷酸/氨基酸变异率 % nt-/aa-difference (%) [*]	河北株 HCV-HB	台湾株 HCV-T
丙型肝炎病毒广东株 HCV-GD	10.26/6.59	9.16/7.69

* nt, nucleotides; aa, amino acids

讨 论

HCV 在血清中浓度极低, 在人血液中的感染滴度为 10^3 CID₅₀/ml (黑猩猩半数感染量)。HCV RNA 在抽提过程中易被 RNA 酶破坏。为获取尽可能多的 HCV RNA 及 cDNA, 我们运用微粒吸附血清中的核酸, 并直接在吸附剂上用随机引物逆转录。实验证明, 此法简便、快速、成本低, 在获取 HCV RNA 及长片段 cDNA 中较常规酚、氯仿抽提法更优越。

我们从一份来自广东省阳春县无输血史的丙型肝炎病人血清中扩增并克隆 NS1 区 780bp 的片段, 对其中约 300bp 核苷酸序列进行测定。结果显示广东株该区段核苷酸序列与河北株、台湾株、美国原型株、日本 HCV-J, HCV-BK, HC-J6, HC-J8 株相应片段的同源性分别为 89.74%、90.84%、71.43%、86.81%、87.91%、70.33%、68.86%。提示该区段属高变区, 可将各毒株加以区别, 同时亦表明我国各毒株间的变异较小, 但广东株与美国及日本某些分离株间变异较大。

HCV 核酸存在广泛的异质性, 不同国家、不同地区的 HCV 株核酸序列有差异。核酸变异可能与疾病严重性、引起丙肝慢性化及导致肝细胞癌的频率等具有某种相关性。我国已完整克隆的河北株、台湾株, 部分克隆的上海株、北京株相互间核酸序列亦有较大差异, 尤其在 E 区和 NS1 区。国内对 HCV 的 C 区和 NS3 区研究较多^[3-5], 但对 NS1 区的研究甚少。将所测 NS1 区序列与已报告的河北株和台湾株相应序列比较后发现, 核苷酸变异率在 9.16—10.26%, 氨基酸变异率在 6.59—7.69%。根据 HCV 的基因分型标准, 核酸序列变异不超过 20% 的 HCV 株属于同一基因型, 国内已分离的多个株均属 I 组 II 型, 但在同一型内 NS1 区相对于其他区域仍属高变异区。NS1 区变异被认为是 HCV 逃避机体免疫攻击, 使病毒在体内持续存在的原因。Okada SI 等实验证实, 此区变异程度与 HCV 对干扰素治疗反应性密切相关, 变异小则反应较好, 变异大则疗效差^[6]。Inoue Y 等认为 NS1 区编码的蛋白质是在 HCV 复制期间产生的, 检测该区相应抗体可反映 HCV 在人体内复制的情况^[7]。HCV NS1 区编码 gp70 (一种糖蛋白), 成熟的 gp70 在 HCV 感染中起了重要的作用, 此蛋白相当于黄病毒属的非结构包膜糖蛋白或瘟病毒的包膜糖蛋白, 能诱导机体产生中和抗体, 对病毒感染产生保护性的免疫反应^[8-9], 在疫苗研制中可能有参考意义。

致谢 测序工作得到中国预防医学科学院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室陈南海博士的帮助, 特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Yamada O, Matsumoto T, Nakashima M, *et al*. A new method for extracting DNA or RNA for polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 1990, 27: 203—209
- 2 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, *et al*. *Molecular Cloning A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 3 杨永平, 刘崇柏, 金冬雁, 等. 中国人 HCV 基因组 NS3 区 C33-C 抗原基因 cDNA 克隆和在大肠杆菌中表达, *中国科学 (B 辑)*, 1993, 23(7): 730—739
- 4 戚中田, 潘卫, 杜平. 中国人丙型肝炎病毒核心基因 cDNA 的克隆与序列分析, *第二军医大学学报*, 1992, 13(4): 301—306
- 5 王宇, 陶其敏. 中国人丙型肝炎病毒结构基因 cDNA 分子克隆及序列分析. *病毒学报*, 1992, 8(4): 315—319
- 6 Okada S- I, Akahane Y, Suzuki H, *et al*. The degree of variability in the amino-terminal region of the E2/NS1 protein of hepatitis C virus correlates with responsiveness to interferon therapy in viremic patients. *Hepatology*, 1992, 16(3): 619—629
- 7 Inoue Y, Suzuki R, Matsuura Y, *et al*. Expression of the amino-terminal half of the NS1 region of the hepatitis C virus genome and detection of an antibody to the expressed protein in patients with liver diseases. *Journal of General Virology*, 1992, 73: 2151—2154
- 8 Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, *et al*. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by *in vitro* processing analysis. *PNAS*, 1991, 88: 5547—5551
- 9 Houghton M, Weiner A, Han J, *et al*. Molecular biology of the hepatitis C viruses, implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology*, 1991, 14(2): 381—388

Molecular Cloning and Sequence of the HCV NS1 Genomic Region

Li Gang Yao Jilu Peng Wenwei *et al*.*(Department of Infectious Diseases, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510630)*

The NS1 genomic region of the hepatitis C virus (HCV), derived from the serum of a patient with chronic NANB hepatitis in Guangdong province, was cloned and sequenced. HCV RNA extracted by the powder-adsorption procedure was converted to cDNA by reverse transcription with random primer. Polymerase chain reaction was performed with the primers which span the NS1 region. The amplified products were separated by electrophoresis on a low melting-point agarose gel and a portion of gel, corresponding to the expected size, was cut out. The PCR product was ligated to pUC18 vector in low melting-point agarose gel. After transfecting JM109 strain, the recombinants were screened and identified by PCR and digestion with restriction endonucleases. One fragment of 320bp, amplified from a recombinant plasmid, was cloned into pUC18 and pUC19, and their nucleotide sequences were determined by the dideoxy chain termination method. A comparison of the sequence with several isolates reported previously showed homologies of 68.86% to 90.84%.

Key words Hepatitis C virus(HCV), Polymerase chain reaction(PCR), Molecular cloning, Nucleotide sequence