

408-413

11223 (7)

第7卷第4期
1992年12月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 7 No. 4
Dec. 1992通用引物 PCR 分离登革病毒 2 型
cDNA 及其插入方向鉴定陈火胜 郭辉玉 刘长秀 汤伟琪 石松¹邱重任 黄晓军 庄坚² ✓

(中山医科大学微生物学教研室, 广州 510039)

R373.53

提 要

逆转录后采用聚合酶链反应 (RT/PCR) 扩增登革病毒 2 型中国海南 98 株 (DEN₂ HN98) 部分包膜糖蛋白 (E) 基因, PCR 产物钝端插入 pUC18 质粒, 获得重组质粒 pDE II 305。用 pUC/M13 测序用通用引物, PCR 方法又从 pDE II 305 扩增分离 DEN₂ E cDNA 片段。通过一侧通用引物和另一侧 DEN₂ E 特异引物配对, 引导酶促 DNA 扩增反应, 鉴定了 pDE II 305 中 cDNA 片段的插入方向, 结果与序列分析一致。本文首次报道通用引物 PCR 方法的建立, 实验结果表明该技术可用于 pUC/M13 系统中插入片段的分离及其方向鉴定。

关键词: PCR 通用引物 登革病毒 cDNA

登革热病毒; 聚合酶链反应;

PCR 技术以其快速、敏感、简便及别异的优越性, 迅速渗透到生命科学包括分子病毒学的许多重要领域。PCR 技术本身也在不断改进完善之中, 各种新试剂、新仪器及新方法相继涌现^[1,2]。作者在采用 PCR 技术研究登革病毒的同时, 注意到 PCR 技术中必须要合成一对特异引物, 甚至数对别异引物, 这对于 PCR 技术的推广不利, 于是, 提出了以通用引物部分取代特异引物的设想。

本工作的基本设想是, pUC/M13 载体系统多克隆酶切位点旁侧序列是已知保守的, 其互补的脱氧寡核苷酸片段已有商品化的测序用通用引物 (正向、反向)。只要有 pUC/M13 重组体 (插入片段小于 3 kd), 就可以利用通用引物酶促扩增反应分离插入片段, 这样分离的片段带有插入点旁侧 pUC/M13 序列, 有利于克隆改建。反应本身

本文于 1992 年 2 月 13 日收到, 4 月 25 日修回

本文获广东省科委、国家教委和卫生部科研基金的资助, 在首届中日病毒学研讨会 (1992 年 5 月北京) 进行大会交流

1. 中山医科大学中心实验室
2. 汕头大学医学院微生物学教研室

广州市微生物学研究所梁业楷教授、广后军事医学研究所陈焕勇大夫参与了登革病毒培养、提纯、RNA 抽提等部分工作; 马来西亚大学 S. K. Lam 教授提供了资料信息帮助; 法国巴斯德研究所提供了登革病毒特异引物; PE 公司 PCR 专家给予了有益的建议和资料。

可直接制备探针,只要有一条特异引物就可以鉴定cDNA片段在pUC/M13中的插入方向。本实验以重组登革病毒cDNA质粒为模型,探讨设计思路的可行性及适合的方法条件,为进一步研制通用引物PCR核酸诊断试剂盒打下基础。

材 料 与 方 法

一、登革病毒2型海南98株的培养、提纯、RNA提取及鉴定:参考文献[3]。

二、DEN₂ HN98 RNA的逆转录及PCR:参考文献[4]。

三、pDE II 305质粒构建与酶切分析:PCR产物(含305 bp DEN₂ E cDNA)加热100℃ 5分钟,灭活Taq DNA多聚酶,加入终浓度为10μmol/L MgCl₂,加入1U Klenow酶(Boehringer)室温作用20分钟补平末端^[5],1.5%低融点琼脂糖凝胶电泳,回收305 bp片段。用限制酶SmallI线化pUC18质粒作载体,与305 bp DNA片段钝端连接后转化E.coli JM83菌株(Boehringer)。从LBA-Xgal平板上挑取白色菌落,抽提质粒DNA后用EcoRI及BamHI双切酶分析^[6]。在9个白色菌落中,发现5号和7号菌落中含重组质粒,将重组质粒暂命名为pDE II 305。

四、通用引物PCR

1. 三温循环反应:取1ng pDE II 305 DNA作模板,各50ng pUC/M13通用引物(Forward和Reverse, Promega),加入200μmol/L dNTPs, 1X PCR缓冲液,混匀92℃变性5分钟后,加1U Taq DNA多聚酶(上海复旦大学科技总公司产品),总体积50μl,加50μl液体石蜡,置FR-300型DNA扩增仪(上海复旦生物技术研究所产品),按92℃40秒,55℃40秒,70℃80秒,的条件循环25周期,取5μl加样于1.5%琼脂糖凝胶,EB染色,电泳观察。鉴定插入方向时,只用一侧通用引物(Forward或Reverse),加50ng DEN₂ E特异引物(Upstream或Downstream),特异引物序列见参考文献[4]。

2. 双温循环反应:总反应体积25μl,上述反应混合物体积减半,终浓度不变,分别采用FR-300型DNA扩增仪及两个水浴箱进行25个周期反应。反应条件为扩增仪92℃ 30秒,62℃ 60秒;水浴箱手控为92℃ 60秒62℃ 120秒,取3μl电泳分析。

五、序列测定:采用双脱氧末端终止法,使用pUC sequencing Kit(Boehringer)和α-³²P-dCTP(北京福瑞公司)克隆和测序具体方法将在另文中报道。

结 果

一、pDE II 305克隆的构建与酶切分补

DV₂ HN98部分E基因(305bp片段)的克隆构建见图1。重组克隆经限制酶EcoRI及BamHI双酶切后,电泳可见两个DNA片段,大片段(约2.7kb)为pUC18载体部分,小片段(约0.3kb)包括DV₂ E基因305bp cDNA和pUC18质粒中多克隆位点EcoRI至BamHI的序列(16bp)。线条图部分示意克隆物构建过程;照片图显示重组克隆中含有预定大小的插入片段, M为分子量标记,插入片段在404—309bp之间。

二、通用引物PCR

1. 通用引物序列及其在pUC/M13中的位置,见图2。从正向引物5'端至反向引物5'端序列长度为114bp,两条引物至SmallI(重组片段的插入酶点)的序列长度分别

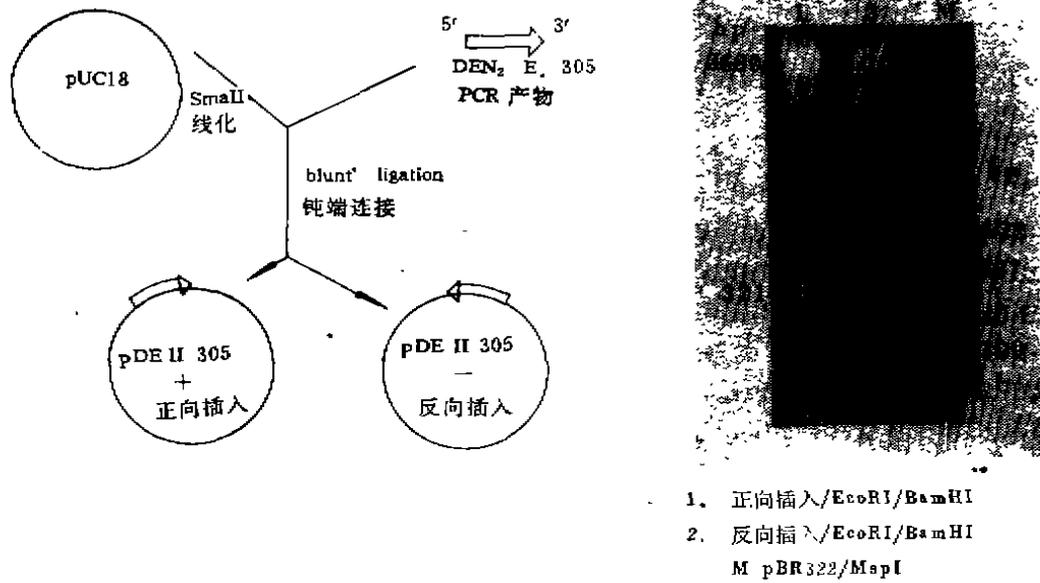


图 1 pDE II 305 质粒构建及 EcoRI/BamHI 酶切分析
 Fig. 1 Construction of pDE II 305 and its EcoRI/BamHI digested profile

为 39 和 75bp。R 为反向 (Reverse)，F 为正向 (Forward) 引物。

R₁ 5' TCACAGGAAACAGCTATGAC 3' 22mer
 F₁ 5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3' 24mer
 E B
 pUC/M13, R.....39bp.....SmaI.....75pb.....F
 Multiple Cloning Sites

图 2 通用引物的序列及在 pUC/M13 中限定的片段长度
 Fig. 2 The sequences of universal primers (R&F) and defined length in pUC/M13

2. PCR 产物电泳观察：图 3 为 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳，EB 染色，紫外灯下观察结果。M₁ 为 pBR322/MspI 酶切片段 (可见片段分别为 622、527、404、309bp 见前文)，M₂ 为 pBR322/BstI 酶切片段 (1857, 1060, 929, 383bp)，都作分子量标准。图 3 中 A (第 3 行)、B、C (1, 3) 为一对通用引物引导扩增反应，可见约 400 bp 片段，与预期 (通用引物限定长度 114bp 加插入片段 305bp 共 419bp) 相符。A (2) 为正向通用引物配 DEN₂ E 上游特异引物，可见扩增片段稍小于一对通用引物所扩增的片段。根据正向引物至 SmaI 为 75bd，可推论扩增片段为 380bp (305 + 75)，与结果相符。A (1) 为反向通用引物配 DEN₂ E 下游特异引物，扩增片段为 344bp (305 + 39)，与实际结果一致。

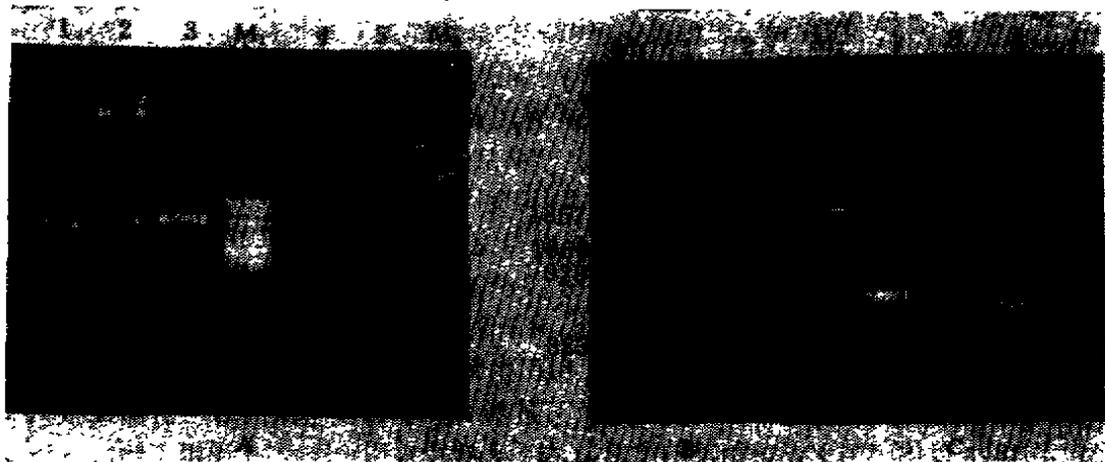


图3 通用引物PCR扩增pDE II 305 cDNA及鉴定其插入方向

A. 1/RD, 2/FU, 3/FR, 4/RU模板为pDE II 305, 5/FR模板为pUB18。

B. 双温循环, 25 μ l反应, 3 μ l点样, 仪器扩增(1), 水浴箱手控(2)。

C. 反向插入模板, 1/FR, 3, 无模板(3), 无引物(4), FR为测序引物,

UD为DEN₂E特异引物。

Fig. 3 The results of amplification of pDE II 305 cDNA and its orientation by universal primer directed PCR

Panel A, lane 1/RD, 2/FU, 3/FR, 4/RU, lane 5/FR and pUC18 in replace of pDE II 305.

Panel B, two temperature cycling by the amplifier (lane 1) and water bath (lane 2).

Panel C, lane 1/FR, lane 3/FR, 305 bp cDNA reversely inserted, lane 2/no template, 4/no primer.

F and R mean pUC/M13 sequencing primers forward and reverse respectively.

U and D mean DEN₂E specific primers upstream and downstream respectively.

M 1, pBR322/Msp I; M 2, pBR322/Bst I.

讨 论

本文报道用测序通用引物, 分离扩增pUC/M13系统中插入的特异cDNA片段。其基本原理是在序列测定和PCR反应中, DNA链的延伸都是按模板DNA序列为标准, 由引物引导合成新的互补DNA链。因此, 通用引物可用于pUC/M13重组克隆中cDNA片段的分离。由于通用引物位于pUC/M13多克隆位点(Multiple Cloning site)两侧, 两通用引物5'末端所包括的序列含114bp。因此, 所扩增片段较插入cDNA长114bp。本文以登革病毒2型部分E基因cDNA(305bp)的重组克隆pDE II 305为模板, 故所扩增产物为419bp。即扩增产物包括cDNA片段和插入酶点(SmaI)的旁侧序列。这样分离的片段有利于克隆改建, 如插入表达载体质粒时可利用扩增片段两侧的酶切点进行酶切、连接。只要cDNA小于3kb, 重组于pUC/M13系统中的其它cDNA, 也可以

采用本方法进行扩增分离, 它较常规质粒 DNA 提取、酶切、片段回收, 更省时简便。

在分子克隆中, 往往要明确重组克隆中 cDNA 的插入方向。一般可采用酶切和序列分析方法, 鉴定重组体的插入方向。但对于钝端插入的小片段 DNA, 往往没有适合做插入方向分析的酶切点, 而序列分析的试剂、设备费用昂贵, 技术较复杂。pDE II 305 中 cDNA 就是钝端插入 pUC18 的, 用常规酶切方法分补其 cDNA 的插入方向。我们采用一侧通用引物配另一侧特异引物进行 PCR 反应, 分析扩增产物的大小鉴定了 cDNA 插入方向。图 3 实验结果表明, pDE II 305 7 号克隆中 DEN₂ E cDNA 的插入方向是: E 基因 5' 端上游有 pUC18 EcoR 酶切点, 下游紧邻 BamHI 酶切点。5 号克隆中 cDNA 的插入方向相反。因为所用 DEN₂ E 上游特异引物和正向通用引物可扩增 7 号克隆中 cDNA 片段。PCR 产物为 380bp (正向通用引物至插入酶点 SmaI 序列共 75bp, 插入 305bp)。用下游特异引物配反向通用引物可扩增 344bp 片段 (反向通用引物至插入酶点包含 39bp 载体序列)。用相反的配对方法 (上游特异引物配反向通用引物, 或下游特异引物配正向通用引物) 都不能扩增插入片段。根据通用引物的序列及其在 pUC/M13 中的位置 (图 2) 分析表明 7 号克隆中 cDNA 插入为正向, 5 号克隆为反向。实验结果进一步由序列分析所证实。登革病毒 2 型部分 E 基因的克隆及序列测定将在另文中报道。测序还发现 DEN₂ 中国分离株与国外毒株间存在碱基变异, 与原型 NGC 株比较, 在测序片段 (305nt) 中有 7 个碱基突变, 同源率为 97.7%^[9]。

从 PCR 技术的原理可知, 通用引物 PCR 方法的建立, 不仅可用于 pUC/M13 重组克隆中 cDNA 片段的扩增分离, 插入方向的鉴定及克隆改建, 还可以用于直接制备标记的探针。本实验室在通用引物 PCR 反应中, 加入地高辛素-11-dUTP (Digoxigenin-11-dUTP), 制成 Dig-标记的登革病毒 2 型 cDNA 探针, 发现其标记率较常规法更高, 制备方法更简便。目前正在研制直接检测标本中特异核酸的杂交通用引物 PCR 诊断试剂盒。

参 考 文 献

- [1] 陈火胜, 郭辉王, 1991, 大自然探索, 10(4): 26—36。
- [2] Innis MA et al., 1990, PCR protocols, AP press p1—482.
- [3] 陈火胜, 1991, 博士学位论文, 中山医科大学。
- [4] Cuo Huiyu and Chen Huoseng, 1991, Virus Information Exchange Newsletter 8: 115—116.
- [5] 华美生物工程公司编译, 1990, PCR 技术操作手册。
- [6] Maniatis T et al, 1982, Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- [7] Saiki RK et al, 1988, Science, 239: 487—491.
- [8] Deubel V et al, 1991, Virology, 180: 442—447.
- [9] Irie K et al, 1989, Gene, 75: 197—211.

Amplification and Orientation of Dengue 2 Virus Partial E Gene Insert in pUC18 by Universal Primer Directed PCR

Chen Huo-sheng, Guo Hui-yu, Liu Chong-xu et al

(Department of Microbiology, Sun Yatsen

University of Medical Sciences, Guangzhou 510089)

A portion of dengue 2 virus strain Haina 98 (DEN2 HN98) envelope (E1-305 nt) gene has been isolated by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). The plasmid pDE II 305 was constructed by blunt ligation of the PCR products of 305 bp fragment with *Sma*I digested pUC18. The DEN2 E305 insert were isolated and amplified from pDE II 305 by universal primer directed PCR. The pUC/M13 sequencing primers (forward and reverse, Promega) and DEN2 E specific primers (forward and reverse, Promega) and DEN2 E specific primers were used in order to isolate and orientate the cDNA insert in pUC18. The results were confirmed by sequencing analysis.

Seven nucleotides mutation were found among the partial E gene sequenced between DEN2 HN98 and strain New Guinea C (NGC).

Key words: PCR Universal Primer Dengue Virus cDNA

* This work was supported by Science and Technology Foundation of Guangdong Province, the National Educational Committee and the Ministry of Health, P.R. China