维普资讯 http://www.cqvip.com

53-60

第8卷第1期
1993年3月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol.8 No.1
Mar.1993

肾综合征出血热病毒基因部份酶切片段的亚克隆

夏东翔[1] 汪美先 王晶翼[2] 徐志凯

(9)

（第四军医大学分子病毒学研究室，西安 710032）

R373.32

提 要

在用微机对肾综合征出血热病毒76/118株（即汉坦病毒）S与M基因片段进行系统分析的基础上，分别利用质粒pXZ62和pUC18亚克隆了S与M基因中的部份酶切片段，以便为亚克隆基因探针的应用和基因改造与多途径表达奠定基础。同时亦进一步证实了XylE基因-邻苯二酚2，3-双加氧酶(CatO2ase)这一显色标记系统在基因工程中的实用价值。

关键词： 肾综合征 出血热病毒 基因 克隆 XylE 酶切片断

目前，肾综合征出血热病毒（HFRSV）的研究已深入至基因水平，基因工程技术的应用日趋广泛。国外学者在系统分析了病毒核酸和蛋白的基础上，完成了汉坦病毒S与M基因cDNA克隆和序列分析，在真核细胞进行了基因表达，并将基因克隆或其表达产物投入进一步分析与应用[1-5]。而国内这方面的工作起步较晚，杭长寿等在痘苗病毒中表达汉坦病毒M片段基因之后[6]，又完成了家鼠型病毒R22株M基因片段的cDNA克隆[7]，除此之外罕有报道。因此在许多国内毒株的核酸尚未提纯和建立cDNA克隆的情况下，利用已知序列的76/118株的基因克隆作进一步分析和研究仍有积极意义，以期为今后的工作奠定基础。同时，我们构建的含显色标记基因xylE的质粒pXZ62亦需通过广泛应用检验其实用价值。

材料与方法

1. **菌种和质粒** E.coli JM103菌株由我校生化教研室提供，含S片段的重组质粒pHS1[1]与含M片段的重组质粒pM56[2]皆由美国陆军传染病研究所Schmaljhon博士寄赠。JM103(pXZ62)[8]与JM103（pUC18）系自己转化筛选。

2. **DNA操作技术参见文献[9]**

3. **XylE基因产物CatO2ase的粗提** 将有关菌株活化过夜转种于50ml M9或LB培养基中，于37℃振荡透气培养，按所需诱导条件培养后离心收集菌体，用10mmol/L ph7.5Tri-HCl洗涤一次，重悬于含溶菌酶1mg/ml的TEG（50mmol/LTris-HCl pH7.5，10mmol/L EDTA，50mmol/L

本文于1992年5月15日收到，7月28日修回。

1) 现工作单位：军事医学科学院生物工程研究所，北京 100850。

2) 海军总医院分子生物学研究室，北京 100037。

维普资讯 http://www.cqvip.com

葡萄糖）溶液中，置冰浴30min，冻融一次后超声破碎（100μA 1min×5次间隔30sec），加苯甲基磺酰氟（PMSF）至1mmol/L，$MgCl_2$至50mmol/L，DNAase I 至5μg/ml，37℃30min，离心4℃170,000r/m 20min，弃沉淀，取0.5ml上清加10ml冷丙酮洗涤一次，弃上清，将沉淀真空干燥，复溶于pH7.4 PBS-T缓冲液中待测。

4. 辅助微机分析 利用IBM PC XT 286型计算机在复旦大学遗传所计算机室进行。

结 果

1. 有关基因序列的部份微机分析结果（根据文献[1,2]进行）

HFRSV76/118株S片段cDNA中已知核蛋白编码基因全长1290碱基，编码429个氨基酸。用目前世界上已研制出的128种限制性内切酶及其识别序列对该编码基因进行检索，共检索到170个酶切位点，分别可被65种限制酶切割，其中有26个单酶切点，包括常用的PvuⅡ、AccⅠ、HindⅢ、PstⅠ、SphⅠ、SalⅠ等。按通用密码翻译，只有第一套翻译方式能进行到底。未见可以利用的翻译偶联（即TGATG，ATG要与第一套阅读框相符）。M片段基因全长3616个碱基，共有366个酶切位点，可被74种酶切割，其中常用的酶切位点有AccⅠ、ClaⅠ、EcoRV、HindⅡ、HindⅢ、HpaⅠ、HpaⅡ、PvuⅡ、TaqⅠ等，从基因3′端始只有按第二套读框才能顺利翻译下去，第一个ATG出现于41-43碱基，终止码TAG出现于第3446-48碱基。G1和G2为同一开放阅读框架编码，G1蛋白由95-1880位碱基编码，G2蛋白由1985-3445碱基编码，两者之间的基因产物在自然表达过程中被加工剪除。在G2起始位点前有一短的疏水序列、第1913-1918位的类SD序列和1934-1936位的ATG（与G2读框相符），两者间隔16bp（图1），可在研究基因表达时加以改造利用。

```
TCAAAATTTTACACCAGGATGTTACCGGACACTAAATTTATTTAGATACAAAAGCAGGTG     1920
S  K  F  Y  T  R  M  L  P  D  T  K  F  I  *  I  Q  K  Q  V
 Q  N  F  T  P  G  C  Y  R  T  L  N  L  F  R  Y  K  S  R  C
  K  I  L  H  Q  D  V  T  G  H  *  I  Y  L  D  T  K  A  G  A

CTACATCTTTACAATGTGGATATTTCTTCTTGTCTTAGAATCCATACTGTGGGCTGCAAG     1980
L  H  L  Y  N  V  D  I  S  S  C  L  R  I  H  T  V  G  C  K
 Y  I  F  T  M  W  I  F  L  L  V  L  E  S  I  L  W  A  A  S
  T  S  L  Q  C  G  Y  F  F  L  S  *  N  P  Y  C  G  L  Q  V
     G2-→
TGCATCAGAGACACCATTAACTCCTGTCTGGAATGACAATGCCCATGGGGTAGGTTCTGT     2040
C  I  R  D  T  I  N  S  C  L  E  *  Q  C  P  W  G  R  F  C
 A  S  E  T  P  L  T  P  V  W  N  D  N  A  H  G  V  G  S  V
  H  Q  R  H  H  *  L  L  S  G  M  T  M  P  M  G  *  V  L  F
```

图1.M片段cDNA第1881-2040bp处的核苷酸序列及相应的三套翻译方式

Fig. 1. Nucleotide sequence of 1881-2040bp of M fragment cDNA and corresponding amino acid sequence of three sets of reading frames. The sequence resembling SD sequence is underliued.

2. S基因中BamHⅠ-HindⅢ双酶切片段的亚克隆

由于S片段cDNA重组于pBR322质粒中，整个质粒上共有三个BamHⅠ切点和两个HindⅢ切点，酶切后产生了五个片段，在弄清基因方向后，回收631bp的片段（核蛋白编码基因第102bp的BamHⅠ到733bp的HindⅢ）克隆入载体质粒pUC18中，构成质粒

维普资讯 http://www.cqvip.com

pXDH1，利用在含IPTG和X-gal平皿上挑选白色菌落初筛阳性重组子，同时回收473bp的片段（编码基因第733bp的HindⅢ到1206bp的BamHⅠ）克隆入pXZ62中，构成质粒pXDH2（图2），由于未破坏xylE基因及表达调控区域而无法利用喷射0.2mol/L邻苯

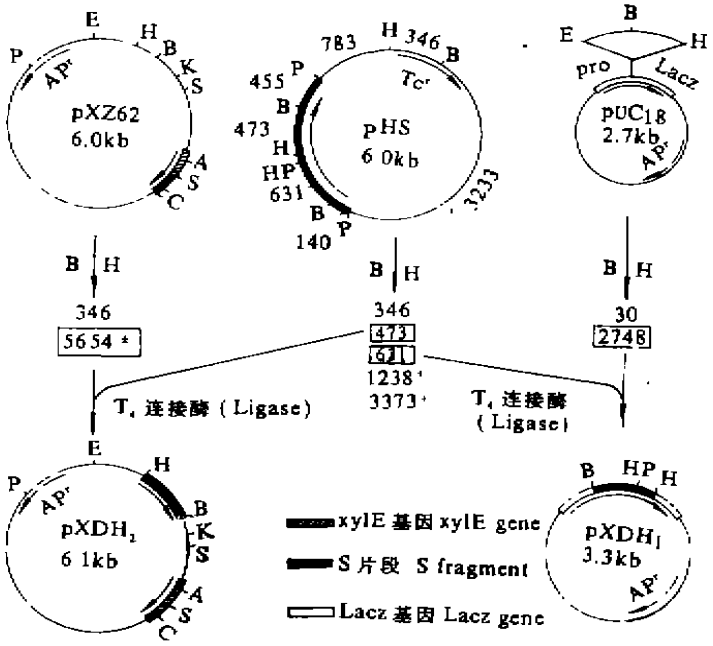

图2．S基因片段中BamHI-HindⅢ双酶切片段的亚克隆

Fig.2. Subcloning of two BamHI-HindⅢ cleaved fragments of S gene

A: AvaⅠ; B: BamHⅠ; C: ClaⅠ; E: EcoRⅠ H: HiudⅢ

Hp: HpaⅠ; P: PstⅠ; Pr: Promoter.

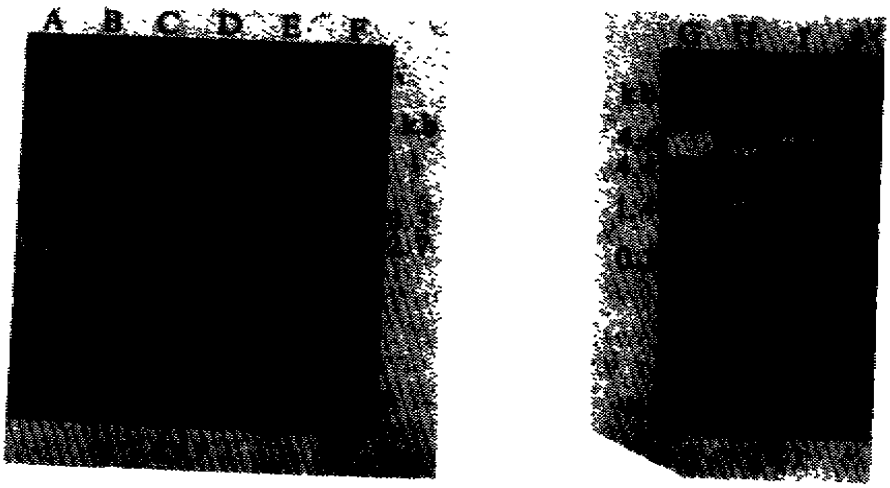

图3，pXDH1和pXDH2的酶切电泳分析

Fig. 3. Electrophoreais analysis of pXDH1 and pXDH2

（1）pXDH1 A: uncleaved; D: HpaⅠ; E: HindⅢ pUC 18; B: uncleaved; C: BamHⅠ; F HpaⅠ

（2）pXZ62 G: uncleaved H: PstⅠ　　pXDH2 I: uncleaved J: PstⅠ

维普资讯 http://www.cqvip.com

二酚溶液初筛，只得利用原位杂交法筛选阳性重组子。两种初筛出的阳性重组子均经快速抽提质粒后，用打点杂交和酶切电泳分析（图 3 ）进一步确定。

3. M片段中HpaⅡ-PatⅠ酶切片段（含G2基因）的亚克隆

M片段cDNA因以两端的PstⅠ位点克隆于pBR322中，故先用PstⅠ酶切回收3.6kb的M片段，再按图 4 进行克隆，对含质粒 pXDH3的重组子，挑选Ap^sTc^r的菌落，而对pXDH4

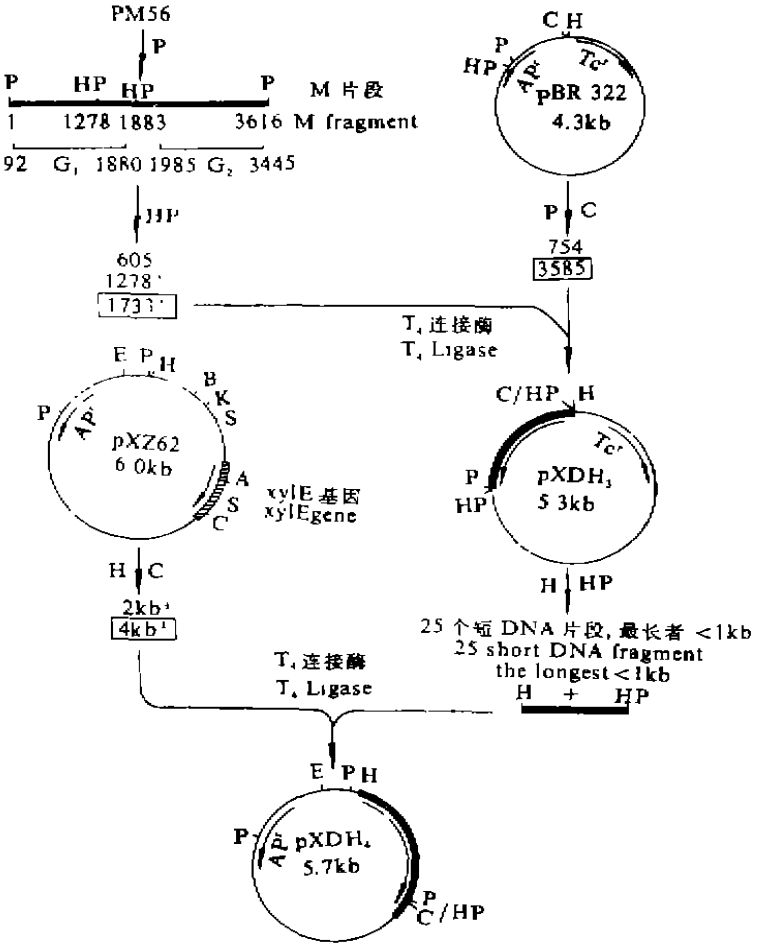

图 4 ， 含G2基因酶切片段的亚克隆过程

Fig. 4. Subcloning of endonucleased fragment containing G2 gene

A: AvaⅠ B: BamHⅠ; C: ClaⅠ; E: EcoRⅠ

H: HindⅢ; Hp: HpaⅠ; K: KpnⅡ; P: PstⅠ

则用 0.2mol/L 邻苯二酚喷射转化菌落，挑选不显黄色的菌落（图 5 ），经快速抽提质粒、打点杂交和酶切电泳分析（图 6 ）确定阳性重组子。

4. 细菌培养与诱导条件的选择

在重组质粒pXDH2中，因xylE基因及相应的表达调控区仍然完整，且克隆入的 473

维普资讯 http://www.cqvip.com

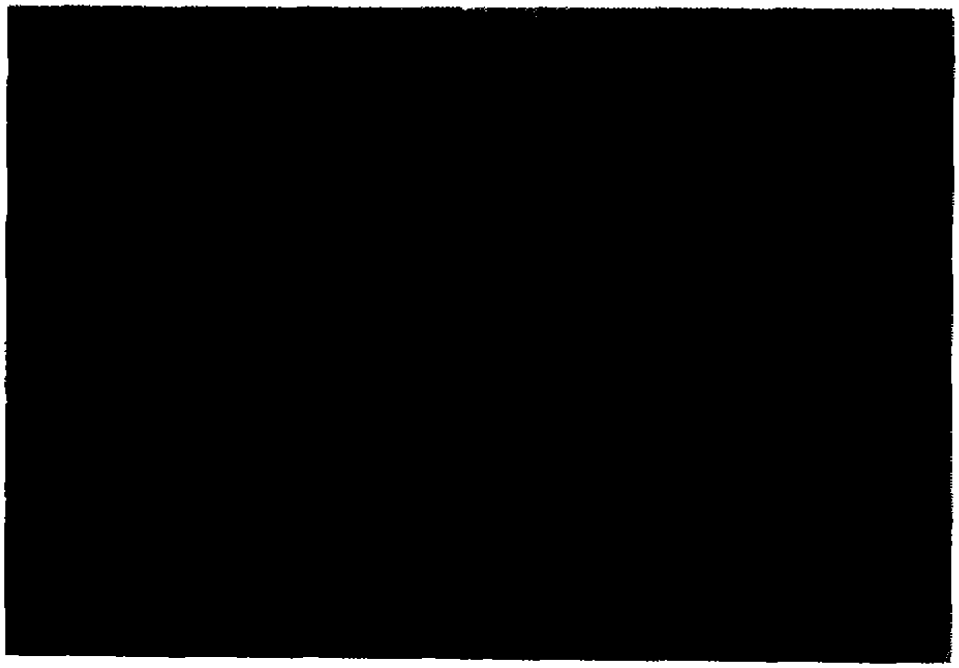

图 5， 不同菌落对邻苯二酚的显色反应

Fig. 5. Chromogenic reaction of different bacterial colonies

A: JM103(pXDH2), yellow;

B: JM103(pXDH4), white + JM103(pXZ62), yellow

图 6， G2基因克隆过程的酶切电泳分析

Fig. 6. Electrophoresis analysis during G2 gene cloning

(1) pM56 A: HindⅢ; B: PstⅠ; C: uncleaved

(2) pXZ62 D: λDNA EcoRⅠ+HindⅢ; E: uncleaved;

F: HindⅢ; G: HindⅢ+ClaⅠ

(3) pXDH3 H: HindⅢ+HpaⅡ

(4) pXZ62 I: uncleaved; K: BamHⅠ; M: PstⅠ

pXDH4 J: uncleaved; L: BamHⅠ; N: PstⅠ

维普资讯 http://www.cqvip.com

bp片段本身亦系结构基因，无阻止转录与翻译的结构，故xylE 基因仍能表达。利用pXDH2中 xylE基因表达后的显色效应可选择最佳表达条件。从图7可见，IPTG 浓度从10μmol/L增至1000μmol/L，虽增加了100倍，然表达产物CatO2ase的比活性增加不到50mu/mg，说明用10μmol/L IPTG 诱导表达即够，用此浓度诱导时，表达量可增加 10 余倍。诱导时相与表达量高低也有关系（图 8），诱导两小时显然不够，表达高峰出现于诱导第 6 小时，

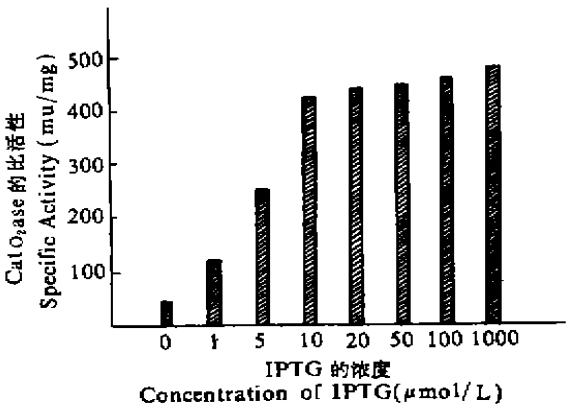

图7. IPTG诱导浓度的选择

Fig 7. Selection of IPTG induction concentation

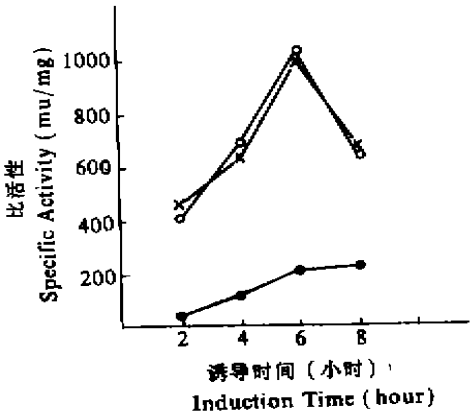

图8. IPTG诱导时间的比较

Fig. 8. Comparison of IPTC induction time

○ with 10μ mol/L IPT G ×with 20μmol/L IPTG

· without IPTG induction

这可能与细菌的生长状态有关，因这时细菌生长正处于对数期末，所以在进行诱导表达时选择合适的诱导条件至关重要。当然，有的表达产物极易被内源酶降解，在这种情况下要考虑适当缩短诱导时间。用JM103(pXZ62）所做的结果与 JM103(PXDH2）大致相符。表明 473bp 片段被克隆 后并未引起載体质粒中与 xylE 基因表达相关基因结构的实质性变化。

讨 论

根据文献已知汉坦病毒 RNA 基因 3′末端序列与其他代表毒株大致相同[10]，且与5′末端序列互补。本文对S 和M 基因片段进行分段亚克隆，在缩短了目的基因片段的同时也去除了3′末端序列，这样就提高了克隆基因作为基因探针的特异性。在此基础上可利用合适的酶切位点进行更小基因片段的亚克隆，以将这些长短、序列不一的基因探针配合用于病毒的基因分型或分子流行病学调查。就M基因片段的编码产物而言，由于G2蛋白比 G1 蛋白血凝和中和位点多，变异性相对较小，从已知序列推得的糖基化位点较少[11]，两端有可利用的限制性酶切位点（HpaⅡ和PstⅠ），较易从重组质粒中切下完整的 G2 结构基因及其前面的疏水序列和可资利用的类 SD 序列及起始码ATG 等优点，因此先亚克隆 G2 基因，以便接着进行基因改造和表达的研究。以上两方面的工作将另文报道。此

维普资讯 http://www.cqvip.com

外，在我室已有多株抗HFRSV单克隆抗体的基础上[12]，如能进行多种亚克隆基因的表达，将有助于这些单抗靶抗原基因定位的研究。

利用含xylE基因的载体pXZ62分别克隆了M片段中的G2片段（约1.7kb）与S片段中的473bp片段，前者的克隆因破坏了xylE基因，可利用xylE基因的插入灭活初筛阳性重组子，而后者的克隆未影响xylE基因的表达，故不能利用xylE基因的灭活来筛选阳性重组子，但却可利用同一质粒上xylE基因的表达产物CatO2ase活性的高低来选择最佳表达条件，同时亦有作为一种基因探针非放射性表记物的可能。由此可见，由于xylE-CatO2ase显色系统的诸种优点，对其在基因工程中的应用可视具体情况而灵活多样。pXZ62中用于基因表达的启动子是Ptrc，它需在遗传型为LacIq的宿主菌中以IPTG诱导。对于Plac、Ptac、Ptrc、这些需要用IPTG诱导的启动子，有关诱导物剂量及诱导时间的报道各异，常见的是用100μmol/L-1mmol/L诱导培养两小时。本文利用CatO2ase表达量作为检测指标，观察得细菌在生长至OD600约为0.7-1.0时，用10μmol/L IPTG诱导6小时即可，这不仅可大大节省价格昂贵的IPTG的用量且说明诱导的时间对提高表达产量亦很重要。若将xylE基因引入其它类型的原核或真核截体，可同此应用，为目的基因的克隆表达提供种种便利，显示出该显色基因标记系统的良好应用前景。

参 考 文 献

〔1〕 Schmaljohn CS et al., 1986, *Virology*, 155：633.

〔2〕 Schmaljohn CS et al., 1987, *Virology* 157：31.

〔3〕 Schmaljhon CS et al., 1988, *J. Gen. Virol.*, 69：777.

〔4〕 Pensiero MN et al., 1988, *J. Virol.*, 62：696.

〔5〕 Schmaljhon CS et al., 1990, *J. Virol.*, 64：3162.

〔6〕 莫红梅等，1991，中华实验与临床病毒学杂志，5：185。

〔7〕 石立成等，1991，病毒学报，7：295。

〔8〕 夏东翔等，1992，遗传学报，19：177。

〔9〕 Sambrook J et al., 1989, Molecular Coloning, A Laboratory Manual (2nd ed.), Cold Spring harbor Laboratory Press, New york, USA

〔10〕 Schmaljohn CS et al., 1985, *Science* 227：1041.

〔11〕 Arikawa J et al., 1989, *J. Gen. Virol.*, 70：615.

〔12〕 徐志凯等，1990，单克隆抗体通讯，6(4)：58。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Subcloning of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Virus (HFRSV) Gene Fragments

Xia Dongxiang Wang Meixan Wang Jinyi Xu Zhikai

(*The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032*)

Based on the systematic analysis of HFRSV strain 76/118 (Hantaan virus) M and S gene with personal computer, the endonucleased fragments of tha two gene cDNA were subcloned for smaller gene probes and expression studies afterwards. The fragment containing G2 gene and the Hind Ⅲ-BamH Ⅰ 437bp fragment of S gene were cloned into pX62, the positive recombinants of the former were selected by inactivation of XylE gene, a chromogenic selective marker, while the latter did not inactivate XylE gene expression, in this case, however, some expression conditions were investigated by detecting XylE gene product, catechol 2, 3-dioxygenase (CatO2ase). It was again shown that XylE-CatO$_2$ase chromogenic marker system was convenient and useful in genetic engineering researches.

Key words: HFRSV Gene clone XylE

1) Present address: Molecular Genetics Center; P.O.Box 130(8) Beijing 100850.

2) Navy General Hospital of PLA, Beijing 100037.