第10卷 第4期 1995年12月

国 病 客 VIROLOGICA SINICA

Vol. 10 No. 4 1995 Dec.

用 PCR 技术克隆细小病毒 H-1部分非结构蛋白基因

黄青山黄 罗祖玉 建

(复旦大学生理学与生物物理学系,上海 200433)

(复旦大学遗传工程国家重点实验室,上海 200433)

Q939.406

应用PCR技术定向克隆了细小病毒H-1的非结构蛋白(NS)部分基因片段。自行设计并合成 了 PCR 引物 ΔP3和 ΔP4,在两个引物中分别引入两个突变碱基,便扩增后的 DNA 片段的两端含有 限制性核酸内切酶 Hind II 或 BarnHI 的酶切位点,经双酶切法把该 DNA 片段重组到 pUC118质粒 中。对插入片段的 DNA 序列测定和分析结果证实该片段为 H-1 NS-1基因序列。以此重组质粒为探 针,采用分子杂交的方法,分别测定了 H-1及 MVM DNA 在细胞内的复制水平。这一基因的克隆为 制备 H-1的质量监测、H-1及 MVM NS-1蛋白抑瘤作用机理及其在肿瘤细胞及正常组织中的转录 表达等研究奠定了基础。

自主性细小病毒 H-1,聚合酶链反应(PCR) 基因克隆,抑瘤作用

自主性细小痛毒 H-1(以下称 H-1)及 MVM 具有明确的抗肿瘤活性[1-5]。实验表明该病毒 的非结构蛋白 NS-1在其抗肿瘤活性方面起着非常重要的作用,它不仅参与和促进病毒 DNA 复制及病毒衣壳蛋白的合成,而且具有抑制多种异源启动子的作用[6·7]。其非结构蛋白 NS-1在 NS-2的协同作用下,对转化细胞还有直接毒性作用[8.9]。诚然,这类细小病毒的抗肿瘤活性的 机理尚不完全清楚,因此,对细小病毒非结构蛋白 NS-1的结构与功能的研究是近年来阐明其 抗肿瘤活性的重要组成部分。为进一步研究 NS-1基因在肿瘤细胞及组织中的转录表达情况, 本研究采用 PCR 技术,准确快速地将 H-1 NS-1基因的一个主要片段(892bp)分别克隆于 pUC118和 pUC119质粒中,并经序列测定和分析确认。以该重组质粒为探针,采用 Dispersed Cell Assay 方法, 测定了 H-1和 MVM(二者该段 DNA 序列同源性为88.1%)在培养细胞中的 复制水平,也得出预期结果。因此,该重组质粒可用作 Northern 和 Southern Blot 及组织细胞原 位杂交的探针,以研究 H-1及 MVM 在肿瘤细胞及组织中的分布及其 NS-1基因在肿瘤细胞及 组织中的复制及转录情况。

材料与方法

1 PCR 引物的设计

本实验所设计的 PCR 引物 Δ P3和 Δ P4,分别由引物 P3和 $P4^{[16]}$ "修改"而来。 Δ P3和 Δ P4均为20个碱基,并

本文于1995年1月19日收到,4月20日修回

^{*}本项目受河南省永城博科集团公司、国家自然科学基金委员会、复旦大学科学基金会以及国际抗癌联盟(UICC)等 资助

第10巻

含有两个与 H-1基因组 DNA 不配对的碱基(划线处为修改的碱基),即 ΔP3中突变入了一个 Bam HI 的识别序列:GGATCC,在 ΔP4中突变入了一个 Hind II 的识别序列:AAGCTT。两引物的序列如下(箭头示酶切位点):

1P3 TGATG GATCCACCAGGTGGA AP4 TGGTGTGCTCCAAGCTTCTA

2 南株、质粒及噬菌体

- 2.1 菌株
- 2.1.1 克隆和转化质粒 DNA 的受体菌为:

E. coli TG1:SupE hsdΔ 5thi Δ(lac proAB)

F'[traD36 proAB+ lacI lacZAM15]

2.1.2 重组 pUC118及 pUC119噬菌粒的扩增并抽取单链噬菌粒的菌株为:

E. coli MV1184; araΔ (lac-proAB) rpsL thi(ψ 80 lacZ Δ M I5)

A(srl-recA)306; ;Tn10(tet')

F'[traD36 proAB+ lacF lacZ \(\Delta \) M15]

2.2 噬菌体

M13K07:補助噬菌体,用于重组 pUC118/pUC119单链 DNA 的提取。

2.3 质粒

pUC118/pUC119质粒:3.2kb,含有 Lac Z-a 基因,能分解 X-gal,但β-半乳糖苷酶基因插入失活;氨苄青霉素 (Amp)抗性;含有 IG 片段(内有 M13复制起始点),在辅助噬菌体 M13K 07感染时,能提取单链 DNA 用于测序。

3 酶类及试剂

3. L 酶类,限制性内切酶类及 T4 DNA 连接酶为 GIBCO-BRL 公司产品。FD DNA 聚合酶购自复旦大学遗传研究所。

3.2 试剂

T7 DNA Sequencing Kit 为 Pharmacia 公司产品。5×PCR Buffer: 125 mmol/L Tris-HC1(pH8. 2),7.5 mmol/L MgC1,0.5 mg/ml 明胶,125 mmol/L(NH₄),SO₄,25%甲酰胺。20%PEG:PEG 6000 5克,NaCl 3.625克,加双蒸水至25ml 过滤除菌。

4 DNA 样品的制备

各种 DNA 样品均溶于 TE 缓冲液中,4°C下保存备用,样品的质量及深度经琼脂糖(0.8%)凝胶电泳,以已知浓度 DNA Marker 作参考标准来定量。

- 4.1 质粒的提取纯化、酶切、连接及转化参照文献^[10]进行。
- 4.2.1 pUC118及 pUC119重组体单链 DNA 的制备

取经酶切鉴定的重组 pUC118(两个克隆)及 pUC119质粒0.1 μg,按常规方法分别转化 MV1184菌,取25 μ1 转化菌液均匀涂布平板、37℃倒置培养12小时。取新鲜单菌落接种于2 ml 2YT 培养基,并以1×10°pfu 辅助 噬菌体 M13K 07感染、37℃、振荡培养1.5小时、加卡那霉素至终浓度70 μg/μ1、37℃、振荡培养18小时。单链 DNA 提取纯化按文献[11]进行。

4.2.2 DNA 限制性酶切片段纯化

采用胶冻融法进行,首先经琼脂糖胶电泳分离各酶切片段,切出所需片段,装入0.5 ml Eppendorf 管内 (管底预先打一小孔,并加少许硅化玻璃纤维),一20℃冰冻两小时以上,以干净的1.5 ml Eppendorf 管为套管、12000 r/min 离心10分钟,滤过液加等体积氯仿/异戊醇抽提,加1/5体积的10 mol/L 醋酸铵,2倍体积的无水乙醇沉淀回收 DNA,TE 溶解,4℃储存备用。

4.3 PCR 操作

4.4 重组克隆选择

采用普通 LB 平板(Ap 浓度100 μg/ml),取25 μl 转化菌液,加10 μl X-gal(20 μg/μl,二甲基亚砜配制),3 μl IPTG(200 μg/μl),均匀涂布于 LB 平板,37℃倒置培养12小时,挑取白色菌落进行质粒扩增、提取、酶切及电泳鉴定。

5 DNA 序列测定及分析

5.1 序列测定

以 H-1基因组 DNA 为模板扩增的 PCR 产物,经 Hind II 和 BamH I 双酶切,重组于 pUC118质粒,选取两个阳性克隆,抽取单链 DNA 进行自动化序列测定,并把同一克隆的重组片段重组于 pUC119中,抽取单链 DNA 进行同位素测序。

5.1.1 自动化测序

采用 abi 公司自动测序仪(Applied Biosystem Model 373A),按试剂盒说明书提供的操作程序进行、取重组 pUC118单链 DNA 50 ng 加入反应体系,共进行30个热循环,反应产物经乙醇沉淀、冷冻干燥,加入4 μ1 上样液(50 mmol/L EDTA 与去离子甲酰胺按1:5混合)94℃水浴2分钟,冷却后上样自动测序过夜。

5.1.2 Sanger 双脱氧链络止法测定

使用 Pharmacia 公司生产的 T7 Sequencing 试剂盒, 取重组 pUC119单链 DNA (1 μ g), 与2 μ l 通用引物 (Universal Primer)退火,引物与单链模板比率为20:1,使用的同位素为 α -32P-ATP,电泳系统为 Bio-Rad 公司的 SEQUI-GENTM,采用平板胶,聚丙烯酰胺凝胶浓度为6%,尿素浓度为46%,恒定功率为100瓦特,最适电泳 胶温度为55℃,具体操作均按 Kit 所附说明书进行。

5.2 序列分析

主要采用德国癌症研究中心(DKFZ)的 HUSAR 序列分析系统(Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources),以 Bestfit (Sequence, pair comparison)及 GAP(Optimal alignment of two sequences)软件进行配对比较;并以 EMBL 的 PC/GENE 软件中的 Alignment 作了核实。

6 分子杂交法测定 H-1及 MVM 在培养细胞中的复制

6.1 细胞株

NB-K 系 SV 40转化的新生儿肾细胞,以含10%的小牛血清的 MEM 培养。FR 3T 3为大鼠成纤维细胞。以含10%的小牛血清的 DMEM 培养。

6. 2 Dispersed Cell Assay^[5]

贴壁生长的 NB-K 和 PR3T3细胞,分别感染 H-1及 MVM (MOI=5)。于感染后2小时(2h p.i.)及30小时(30h p.i.)分别收集细胞,以未感染病毒的细胞作对照。分散吸附于硝酸纤维素膜(0.45 μm,Φ25 mm,Schleicher & Schuell)上。每片膜10°个细胞,变性法破细胞。膜片经预杂交、与32P 标记的 pUFD01杂交及洗膜等处理。用液体闪烁计数器测定放射强度(CPM 值),以 CPM 值表示样品中病毒 DNA 的相对含量。病毒DNA 复制水平用以下公式计算。

病毒复制水平=
$$\frac{\text{CPM}_{30\text{k.p.l.}} - \text{CPM}_{\text{uninstensed}}}{\text{CPM}_{2\text{k.p.l.}} - \text{CPM}_{\text{uninstensed}}}$$

6.3 探针标记

以本实验重组质粒 pUFD01(构建图见本文图5)为探针,采用随机引物标记法(Rad Prime DNA Labeling System, GIBCO BRL)制备³²P 标记探针。

第10巻

1 H-I NS-1 基因的体外 PCR 扩增

以 H-1 DNA 为模板,加入引物 $\Delta P3$ 和 $\Delta P4$ 各 $0.1\,\mu g$,经过30个 PCR 循环,扩增出大小为 908bp 的 DNA 片段(图1)。

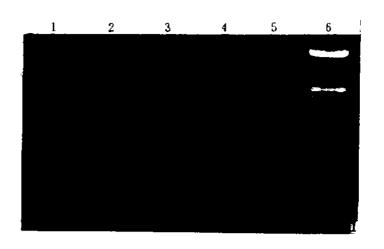


图1 PCR 扩增 H-1 NS 基因

Lane 1~3. 以引物 AP3和 AP4进行的 PCR 扩增产物 (908op),

Lane 4. 阴性对照, Lane 5. 阳性对照, 以引物 P3和 P4进行的 PCR 扩增产物

(908bp); Lane6. DNA Marker λ DNA Hind ■ /EcoR1

Fig. 1 Amplification of H-1 NS-1 gene by PCR

Lane 1-3, PCR products (ΔP3, ΔP4), Lane4, negative control Lane 5. PCR product (P3, P4)Lane₁ 6. λ DNA Hind ■ /EcoRI

2 H-I NS-1部分基因的定向克隆

如图2所示,纯化 H-1 NS-1蛋白基因 PCR 扩增产物(908 bp)和 pUC118质粒 DNA 分别用 BamHI 及 Hind Ⅲ双酶切后,T₄DNA ligase 连接。

3 重组 pUC118的筛选与鉴定

连接液加10个单位限制性内切酶PstI(去除载体的自连),37℃保温30分钟,转化TG1受体菌(100 mmol/L CaCl₂处理,4℃放置16小时)。在X-gal 平板上得到大量白色菌落(图3),随意挑取5个白色菌落进行筛选,发现5个克隆的分子量均大于载体 pUC118(图4)。经扩增、提取及酶切鉴定,发现均含有重组 DNA 片段(892 bp)(图5),将此重组质粒命名为 pUFD-1~5。酶切提取 pUFD-1的重组片段(892 bp),重组于 pUC119质粒中。

4 H-1 NS-1基因片段的序列测定与分析

提取来自两个克隆的重组 pUC118(pUFD1,2)单链 DNA 分别进行自动测序。结果可读取 569 个碱基(两组结果相同,图略),用 PC/GENE 软件与 H-1 NS-1蛋白基因 DNA 序列作 Alignment分析,两者同源性为567 bp(99.6%)(误差为引物中"修改"的两个碱基造成)。重组 pUC119单链进行双脱氧链终止法测序,结果可读取346个碱基(图6),与 H-1 NS-1蛋白基因 DNA 的 Identity 为343bp(99.1%),在引物内除两个"修改"碱基外,还有一碱基发生突变(箭头所示)。对上述三条序列进行了 Multiple Alignment 分析(图略),三段序列重叠(overlap)24个核苷酸,说明已完全测定了插入基因的序列。

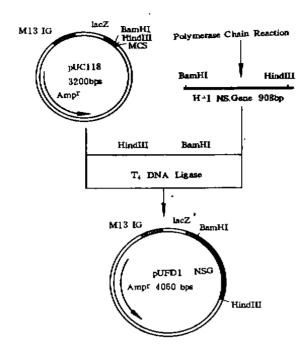


图2 pUFD01 **质粒的构建示图**MCS: 多克隆位点
NSG: H-1 NS-1基因片段
Fig. 2 The construction schedule of the plasmid pUFD01
MCS: Multiple cloning sites
NSG: H-1 NS-1 partial gene



图3 重组 pUC118转化 受体菌、TG1、X-gal 平板选择、94个白色菌落、 4个蓝色菌素

Fig. 3 Transfection of recombinant pUC118 Receptor cell.TG1;X-gal LB plate;94White clones;4 4 Blue clones

5 重组质粒 pUFD01的应用

以重组质粒 pUFD01为探针,采用 Dispersed Cell Assay 方法测定了 H-1及 MVM DNA 在细胞中的复制。结果见表1及表2,H-1在感染 SV40转化的 λ 胚肾细胞 NB-K 后30小时,其 DNA 扩增了53倍,间 MVM DNA 在正常的 FR3T3细胞中扩增还不到2倍。

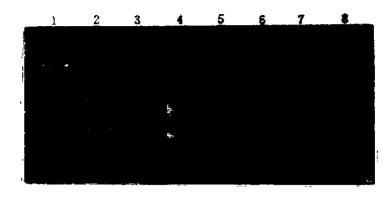


图4 重组 pUC118质粒的筛选 1,8;DNA marker \(\lambda\)/Hind \(\big|_12,3,5,6,7. 重组 pUC118;4: 栽体 pUC118 Fig. 4 The selection of recombinant plasmid pUC118 1,8;DNA marker \(\lambda\)/Hind \(\big|_1\),Lane 2,3,5,6,7. recombinant pUC118 Lane 4;vector pUC118

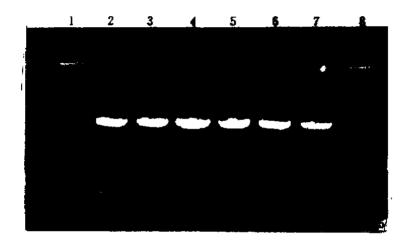


图5 重组 pUC118质粒的酶切鉴定 Fig. 5 Determination of the recombinant plasmid pUC118 Lane 2. DNA Hind II; Lane 2. pUFD01; Lane 3. pUFD02; Lane 4. pUC118; Lane 5. pUFD03; Lane 6. pUFD04; Lane 7. pUFD05 Lane 8. 2 DNA Hind II/EcoR1;

表J H-I DNA 在 NB-K 细胞中的复制

Tab. 1 H-1 DNA amphification in NB-K cell

25582. 64	1103209.12
1 8535. 22	857193.75
1 46 05. 37	803066. 25
19574. 39	921156. 37
± 3392.88	± 113114.65
	53. 17
	19574. 39

表2 MVM DNA 在 FR3T3细胞中的复制

Tab. 2 MVM DNA amplification in RF3T3

···	未感染细胞 Unifected cell	態染后2小时 2 h p.i.	感染后30小时 30 μ p. i.
	923. 33	88554. 53	192438. 69
CPM	1023. 41	87955. 6 5	160974. 27
	1045. 46	91445. 45	170732. 08
	997. 40	89318. 54	174715. 01
x±s	± 46.02	\pm 1319. 56	± 11388.60
A 扩增倍数 A amplification rate			1. 97



图6 克隆 H-1 NS-1基因的序列测定 Fig. 6 Sequence of H-1 NS-1 partial gene ("→"indicating the mutant base)

讨 论

自主性细小病毒 H-1及 MVM 的非结构蛋白(NS)是这类病毒抗肿瘤作用的重要组成部分[1,2,6]。为进一步研究其 NS 基因在肿瘤细胞及荷瘤动物模型移植瘤及各正常组织中的复制及转录表达情况,本文采用 PCR 技术成功地克隆了 H-1 NS-1基因的主要片段。以重组质粒

pUFD01为探针,采用 Dispersed Cell Assay 方法,测定了 H-1和 MVM 在培养细胞中的复制情况,结果显示.细小病毒 DNA 在转化细胞中大量复制(53)倍,而在正常细胞中则复制很少(1.97倍)。因此,该片段可用作研究 H-1及 MVM NS-1基因在细胞中复制及转录表达情况的探针。对该片段的正确表达和 NS-1抗体制备尚有待进一步研究。

PCR 技术自1985年建立^[12]以来,已广泛应用于分子生物学研究中。它不仅可使目的基因 (DNA)片段准确、快速地扩增,而且可通过对引物的巧妙"修改"或在5′端加一段序列,使 PCR 扩增产物两端带有限制性内切酶识别序列,从而便于对目的基因进行克隆与改造^[13,14]。本实验在两个引物中分别设计了不同的限制性内切酶识别序列,所以在短时间内即可将目的基因 (H-1 NS-1基因)定向克隆入载体,克隆成功率高,并未遇到文献^[14]中所述的困难。

Taq DNA 聚合酶缺乏 $3'\rightarrow 5'$ 外切酶活性,因此,使用该酶进行 PCR 扩增的 DNA,碱基错配率较高[15]。本文选用的 FD DNA 聚合酶,在 PCR 反应时,降低 dNTP(20 μ mol/L)、 Mg^{2+} (1.5 μ mol/L)及引物(各0、1 μ g)的浓度,以提高 DNA 复制的精确性和特异性。通过对 PCR 技术 克隆的892 bp DNA 片段的序列测定及分析证实,该片段与 H-1 NS-1基因核苷酸序列的同源性达887 bp(99.4%),其中包括引物中修改的四个突变碱基所造成的误差,另一突变碱基发生引物内,则可能是引物合成错误。所以,如果实验条件掌握得好,应用 FD DNA 聚合酶进行较长目的基因的克隆,其 DNA 的保真度(Fidelity)可以得到保证。

致谢 本文经复旦大学病毒研究室苏德明教授多次修改,在此表示感谢。

参考文献

- 1 Luo ZY, Su zz. Guo LP, et al. The inhibitory effect of parvovirus H-1 on cultured human cancer cells or transformed cells. Certutti PA eds. Anticaremogenesis and radiation Protection Plenum Press, New york, 1988, 451-455
- C. Rommelaere J. Comelis J.J. Antineoplastic Activity of Parvoviruses, J. Virol Methods., 1991; 33, 233-251
- 3 Rommeliere J. Tattersall P. Oncosuppression by Patvoviruses In; P Tijssen(ed), Handbook of Parvoviruses Vol. 11 CRC Press, 1Nc. Boca Raton. Florida: 1990; 41-57
- 4 Dupressoir T. Vanacker JM. Cornelis JJ. et al. Inhibition by parvovirus H-1 of the formation of tumors in nude mice and colores in vitro by transformated human mammary epithelial cells. Cancer Res. 19889, 49, 3203—3208
- 5 Yan SJ. Ma cw. Chen XH set al. Inhibitory effect of parvovirus H-1 on the formation of colomes of human hepatoma cell hire in vitro and its number in nude mice. Cell Research 1994;4;47
- 6 Curmotte SF Tattersall P. The NS-1 polypeptide of minute virus of tniceis covalently attached to the 5' termini of duplesx replicative-form DNA and progeny single strands. J Virol. 1988; 62;851
- 7 Rhode SL-Richard SM. Characterization of the trans-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promot er. J Virol, 1987,61,2807
- 8 Barndenburger A. Legende D. Avalosse B. et al. NS-1 and NS-2 proteins may act synergistically in the eyropathogenicity of parvovirus MVMp. Virology, 1990, 174, 576-584
- 9 Caillet-Fauquet P. Perros M. Brandenburger A set al. Programmmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. EMBO J. 1990;9;2989—2993
- 10 Leonard G Davis, Mark D Dibner, James F. Battey. Basic Methods in Molecular Budgy. Elsevier Science Publishing Co., 1986
- 11 Sambrook J. Fritsh EF Manians T. Molecular Clonging. a Laboratory Manual. New Yourk, Cold Spring Harbor, 1989
- 12 Shaiki R K. Scharf S. Faloona F. et al. Enzymatic amplification of #-globin genomic sequeces and restriction site analysis

331

- for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 1985, 230, 1350-1354
- 13 James B. Lorens, Rapid and rehable cloning of PCR Products, PCR Methods and Apheations. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991;140-141
- 14 Kaufmen D L G A Evens G A. Restriction cleavage at the termini of PCR products. Biotechniques, 1990; 9: 304-306
- 15 Tindali, K. R. and Kunkel, T. A. Fidelity of DNA synthesis by the thermus aquaticus DNA Polymerase. Biochemistry, 1988;27:6008-6013
- 16 黄青山,马承武,郭兰祥,等. 应用 PCR.技术检测细病毒 H-1 DNA 在人肝癌与裸亂正常组织中复制的差异. 病毒学 报,1995,11,84~87

Cloning of Parvovirus H-1 NS Partial Gene by PCR

Huang Qingshan Huang Jian Luo Zuyu (Department of Physiology & Biophysics, Fudan University . Shanghar 200433) Wang Shun de Liu Wei ping (State Key Laboratory of Genetic Engineering . Fudan University, Shanghar 200433)

Two modified primers, $\Delta P3$ and $\Delta P4$, were designed and, for each of them, two mutated bases were included. After PCR amplification, the DNA fragment contains a restriction endonuclease recognition site. BamHI or Hind II at its ends. Cloning of the parvovirus H-1 NS-1 partial gene was conducted by double digestion of the amplified DNA fragement with endonucleases and its presence in the inserted fragement was confirmed by DNA sequence analysis. The technique described here provides the basis for the quality control of H-1 propagation, and for the studies of uncosuppressive action of H-1 NS-1 protein and of transcription and expression of NS-1 gene in cancer cells and normal tissues.

Key words Autonomous parvoviruses H-1 and MVM Polymerase chain reaction. Gene cloning, Oncosuppression