

EB病毒胸苷激酶基因的扩增

陈尚武** 陈瑞君¹ 黄迪*** 朱振宇 马润泉 R373.9

(中山医科大学生化教研室, 广州 510089)

*** (中山医科大学肿瘤研究所, 广州 510060)

关键词 Epstein-Barr 病毒, 胸苷激酶, 基因, 聚合酶链反应

EB病毒, 扩增

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国华南及东南亚等地常见的恶性肿瘤, 早期诊断是防治的关键措施之一。大量证据表明 EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)与 NPC 密切相关^[1]。EBV 编码一个病毒特异的胸苷激酶(thymidine kinase, TK)^[2]。研究发现, 绝大多数 NPC 病人血清中具有 EBV TK 特异的抗体^[3], 提示研究 EBV TK 对于 NPC 的早期诊断、阐明其在 NPC 发生发展中的作用具有重要意义。本研究根据 EBV DNA 全序列资料^[4], 自己设计一对 PCR 引物, 用 PCR 方法扩增出完整的 EBV TK 基因, 为 EBV TK 基因的检测及研究 EBV TK 与 NPC 的关系奠定了基础。

B95-8 细胞由中山医科大学肿瘤所生化室提供。FDDK-1 DNA 扩增试剂盒(dNTP、Taq DNA polymerase, 5× buffer)为上海复华实业股份有限公司生物技术开发中心产品。限制性内切酶 NcoI, DNA 分子量标准 pBR322/BstNI 为北京医科大学友谊科技开发公司产品。异硫氰酸胍(GuSCN)为进口分装; 硅藻为 Sigma 产品。

EBV TK 基因 BXLF 1 长 1824 bp, 在其上下游各设计一个引物, 使 PCR 扩增产物包含完整的 EBV TK 结构基因。为便于随后可能进行 PCR 产物重组克隆研究的需要, 通过改变 1~2 个碱基(用小写字母表示), 在两引物的 5' 端分别引入限制性内切酶 EcoRI 和 PstI 识别序列。

引物 1 5'-GTGGaATtCATGGCTGGATTTC-3'

EcoR I

引物 2 5'-CAACTGCAgCCTAGTCCCGATT-3'

Pst I

取 900 μL GuSCN 裂解液加 40 μL B95-8 细胞悬液和 40 μL 硅藻悬液, 翻转混匀, 静置 10 min, 离心去上清, 沉淀用 GuSCN 洗液洗两次, 70% 乙醇洗一次, 风干, 加 TE 溶出硅藻吸附之 DNA 为模板^[5]。在 100 μL 的 PCR 反应体系中各含 50 pmol/L 的引物 1 和引物 2。循环程序: 93 ℃, 60 S; 62 ℃, 60 S; 72 ℃, 120 S; 25 个循环。加 Taq 前模板 93 ℃ 预变性 10 min, 最后一个循环延伸 5 min。根据计算机分析的 EBV TK 基因内限制酶切点, 取 10 μL PCR 产物, 加 20 u NcoI, 37 ℃ 保温 2 h。0.8% 琼脂糖凝胶电泳显示, PCR 产物条带均一清晰, 与分子量标准 pBR322/BstNI 中的 1 857 bp 带基本平齐, 同时, PCR 产物可被 NcoI 完全酶切成两个 DNA 片段, 与推算的分子大小相符(见图)。

本研究采用 PCR 技术成功地扩增出包含完整 EBV TK 基因的 1843bp DNA 片段, PCR 两

本文于 1995 年 11 月 16 日收到, 1996 年 3 月 18 日修回

* 国家教委博士点基金资助

** 陈尚武, 现在中山大学昆虫所, 广州 510275

引物分别包含 EBV TK 基因的起始密码子和终止密码子,并改变引物中 1~2 个碱基的组成,分别引入 EcoRI 和 PstI 识别位点,为随后的基因诊断及克隆表达工作奠定了基础。

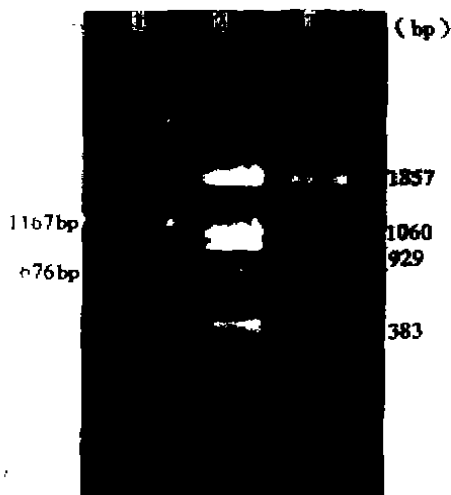


图 NcoI 酶切 PCR 产物电泳图

- 1 PCR 产物 NcoI 酶切(1167 bp 和 676 bp)
- 2 分子量标志: pBR322/BstNI
- 3 PCR 产物(1843 bp)

Fig. Electrophoresis map of PCR products cleaved with Nco I
lane 1. PCR products cleaved with Nco I(1167 bp and 676 bp)
lane 2. Marker: pBR322/BstNI
lane 3. PCR product(1843 bp)

参 考 文 献

- 1 李振权,潘启超,陈剑经主编.鼻咽癌临床与实验研究.广州:广东科技出版社,1983,12
- 2 Littler E, Zeuthen J, McBride AA, *et al.* Identification of an Epstein-Barr virus-coded thymidine kinase. *The EMBO Journal*, 1986;5(8):1959
- 3 Littler E, Baylis SA, Zeng Y, *et al.* Diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by means of recombinant Epstein-Barr virus proteins. *Lancet*, 1991, 337:8743
- 4 Bear R, Bankier AT, Biggin MD, *et al.* DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 1984, 310:207
- 5 Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiology*, 1990, 28(3):495

Amplification of the Intact Gene Coding Epstein-Barr Virus-Specific thymidine Kinase

Chen Shangwu Chen Ruijun Huang Di* *et al*

(Department of Biochemistry, Sun Yet-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089)
*(Cancer Research Institute, Sun Yet-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060)

Based on Epstein-Barr virus (EBV) DNA (B95-8) genome sequence data and the structure of BXLFl open reading frame coding for EBV thymidine kinase(TK), a pair of PCR primers was designed and synthesized. Template DNA was extracted rapidly from B95-8 cells harboring EBV by using guanidinium isothiocyanate (GuSCN) and silica course (CS). A 1843bp DNA fragment containing intact EBV TK gene was amplified by polymerase chain reaction. The PCR product was verified by cleaving with NcoI.

Key words Epstein-Barr virus, Thymidine kinase, Gene, Polymerase chain reaction