

HCV 5'端非编码区 cDNA 的体外转录

李刚 姚集鲁[✓] 彭文伟 王斌[™] 陈青

(中山大学传染病学教研室, 广州 510630)

A **摘要** 采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)从广东省一例慢性丙型肝炎病人血清中获得丙型肝炎病毒(HCV) 5'端非编码区(5'NCR)302 bp的 cDNA 片段, 经补齐和提纯后插入 pUC19 质粒, 获得的重组体 pUN 进行序列测定。将 pUN 的目的基因亚克隆进体外转录载体 pSPORT I 多克隆位点的 EcoRI 和 Pst I 切点之间, 所得重组体 pSN 线性化后由 T₇RNA 多聚酶及 SP₆RNA 多聚酶引导体外转录反应, 产物经凝胶电泳及特异引物 RT-PCR, 证实 SP₆ 引导的是正义 RNA, T7 合成的是反义 RNA, 其大小分别为 429 bp 和 362 bp。并证实所得 RNA 为 HCV 5'NCR cDNA 转录而来。获得的 HCV 5'NCR cDNA 和 RNA 在常规逆转录和 PCR 步骤中用于设立有效的模板对照, 对消除假阴性及评估试剂有重要意义。同时, HCV 5'NCR 体外转录载体的构建可用于制备 RNA 探针和反义 RNA, 改进后还可作为定量 PCR 的竞争性模板。

关键词 丙型肝炎病毒, 分子克隆, DNA 序列测定, 体外转录

丙型肝炎病毒(HCV)是肠道外传播非甲非乙型肝炎的主要病原, 至少 50% 的 HCV 感染转为慢性, 约 20% 发展为肝硬化, 亦是肝细胞癌的重要原因之一。HCV 是单股正链 RNA 病毒, 基因组全长约 9.4 kb, 依次排列为 5'非编码区(5'NCR)、核心蛋白区、包膜蛋白区、非结构蛋白区、及 3'非编码区。各基因区的功能和变异程度有所不同, 5'NCR 是最保守区域, 对 HCV 复制和翻译起重要作用^[1]。目前, 在 HCV 完整病毒尚未找到、组织培养技术尚未建立的情况下, 由于 HCV 在血清中浓度极低, 应用 PCR 技术检测 HCV 核酸成为确定 HCV 感染的特异性诊断的重要手段之一, 但假阳性和假阴性结果局限其推广应用。鉴于 5'NCR 的保守性, 在设计用于诊断 HCV 感染的 PCR 引物时, 此区段是首选部位, 可使检测敏感性优于其它区域。为此, 我们对 HCV 5'NCR 进行了分子克隆、序列测定及体外 RNA 的合成, 获得的 cDNA 克隆和 RNA 可作为 PCR 和逆转录的阳性对照模板, 有利于消除假阴性及试剂有效性的评估。

材料和方法

1 血清标本

取自广东省阳春县 43 岁男性患者, 临床诊断为慢性丙型肝炎, 无输血史。

2 主要试剂

微粒吸附剂(主要成分为二氧化硅, SIGMA 公司), AMV 逆转录酶、RNasin(华美公司), 随机引物、低熔点琼脂糖、pUC19、pSPORT I (BRL 公司), dNTP、TaqDNA 聚合酶(复旦大学遗传所), Klenow 酶、agarase、Sma I、EcoRI、Pst I (BM 公司), Sequencing kit (AB 公司), T4 DNA 连接酶、JM109 菌株、RNase、rNTP、T7 RNA

本文于 1996 年 3 月 4 日收到, 5 月 8 日修回

- 广东省科委基金及 CMB 部分资助
- 中山大学免疫学教研室, 广州, 510089

多聚酶、SP6 RNA 多聚酶、RNA Marker、RQ DNase I (Promega 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:

NC1 + 5' CCCTGTGAGGAAGTACTGTCTT 3' (-299 至 -278)

NC2 - 5' CATGGTGCAAGGTCTACGAG 3' (-17 至 3)

NC3 + 5' TTCACGCAGAAAGCGTCTAG 3' (-279 至 -260)

NC4 - 5' AACACTACTCGGCTAGCAGT 3' (-156 至 -137)

NC3、NC4 为内引物,用于鉴定克隆和体外合成的 RNA。

3 PCR 产物的获取

方法参见文献[2],经 HCV 特异引物 NC1、NC2 扩增后获得 302 bp 的 cDNA 片段。

4 PCR 产物的分子克隆和亚克隆^[3]

PCR 产物经 Klenow 酶补齐后在 1% 低熔点琼脂糖中电泳,在紫外灯下切出相应条带处凝胶,置于 0.5 mL 小离心管内,溶化后加入琼脂酶(agarase)消化,无水乙醇沉淀,获得纯化的 PCR 产物。pUC19 质粒载体则用 Sma I 消化成平端切口。连接反应在总体积 20 μ L 中进行,内含 PCR 产物、pUC19 及 T4 DNA 连接酶 2 单位,在 20 $^{\circ}$ C 过夜连接,反应液转化 JM109 钙化菌,均匀涂布于 LB 平皿培养基,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取白色菌落增殖后碱裂解法小规模提取质粒,然后用酶切法和 PCR 法鉴定,所得重组体以 pUN 表示。用限制性内切酶 EcoR I 和 Pst I 消化重组体 pUN 及体外转录载体 pSPORT I,得到的目的基因及 pSPORT I 直接在低熔点琼脂糖中进行连接反应。转化、提取质粒、鉴定阳性克隆等方法同前述,所得重组体用 pSN 表示(图 1)。

5 序列测定

重组质粒 pUN 提纯后采用双脱氧链末端终止法^[4]进行测序反应,用 Taq DNA 聚合酶(测序级)及荧光标记的通用引物(ABI)引导,样品在 373A DNA 全自动测序仪(ABI)上以 6% 变性测序胶电泳,同时测定核苷酸序列。所得序列再人工核对和分析,证实为 HCV 5'NCR 的核苷酸序列,并与多个已知分离株作同源性分析,已知分离株序列来自 Genbank 或 EMBL 或已发表文章。分析时采用 DNASIS 等软件。

6 HCV 5' NCR cDNA 的体外转录^[3]

模板制备:(1)转录模板(pSN)线性化:在 T7 RNA 多聚酶启动子合成 RNA 时,用 EcoR I 酶切使 pSN 线性化;而在 SP6 RNA 多聚酶启动子时,用位其远端的 Pst I 酶切使 pSN 线性化,再经 Klenow 酶补齐,这样可防止产生在模板末端不正确起始的长 RNA 分子。具体方法如下:取 pSN 8 μ L,加入 EcoR I 1 μ L(或 Pst I 1 μ L),ddH₂O 9 μ L,缓冲液 2 μ L,37 $^{\circ}$ C 1 h 30min。(2)模板纯化:上述混合液(含模板)中加入蛋白酶 K 和 SDS 在 37 $^{\circ}$ C 消化 1 h,等体积酚、氯仿抽取 2 次,氯仿抽提 1 次,无水乙醇沉淀。纯化的线性化 pSN 溶于无核酸酶 H₂O 中备用。

转录反应:在 0.5 mL 微量离心管内,依次在室温下混合下列成分:无核酸酶 H₂O 7 μ L,5 \times 转录 buffer 4 μ L,100 mmol/L DTT(二硫苏糖醇)2 μ L,RNasin 1 μ L,rNTP(各 2.5 mmol/L)4 μ L,线性化 pSN 1 μ L,T7 RNA 多聚酶或 SP6 RNA 多聚酶 1 μ L,37 $^{\circ}$ C 1 h,或 40 $^{\circ}$ C 1 h(SP6 RNA 多聚酶)。

RNA 纯化:转录反应液中加入无核酸酶的 RQ DNase I 2 μ L,37 $^{\circ}$ C 15 min 以去除模板 DNA,然后酚、氯仿抽提,无水乙醇、乙酸铵沉淀,重溶于 10 μ L 无核酸酶水中。

RNA 鉴定:(1)取少许 RNA 作逆转录(HCV 特异外引物引导)及 PCR(内引物),PCR 方法参见文献[2]。(2)在含有甲醛的 1.4% 琼脂糖凝胶中进行 RNA 电泳 1 h,EB 染色 25 min,紫外灯下观察结果。

结 果

1 重组体 pSN 的鉴定

将插入 pUC19 的 HCV 5'NCR 目的基因亚克隆进体外转录载体 pSPORT I,重组质粒经 EcoR I 单酶切后与空载体 pSPORT I 比较,电泳时迁移较慢,EcoR I 及 Pst I 双酶切后电泳,

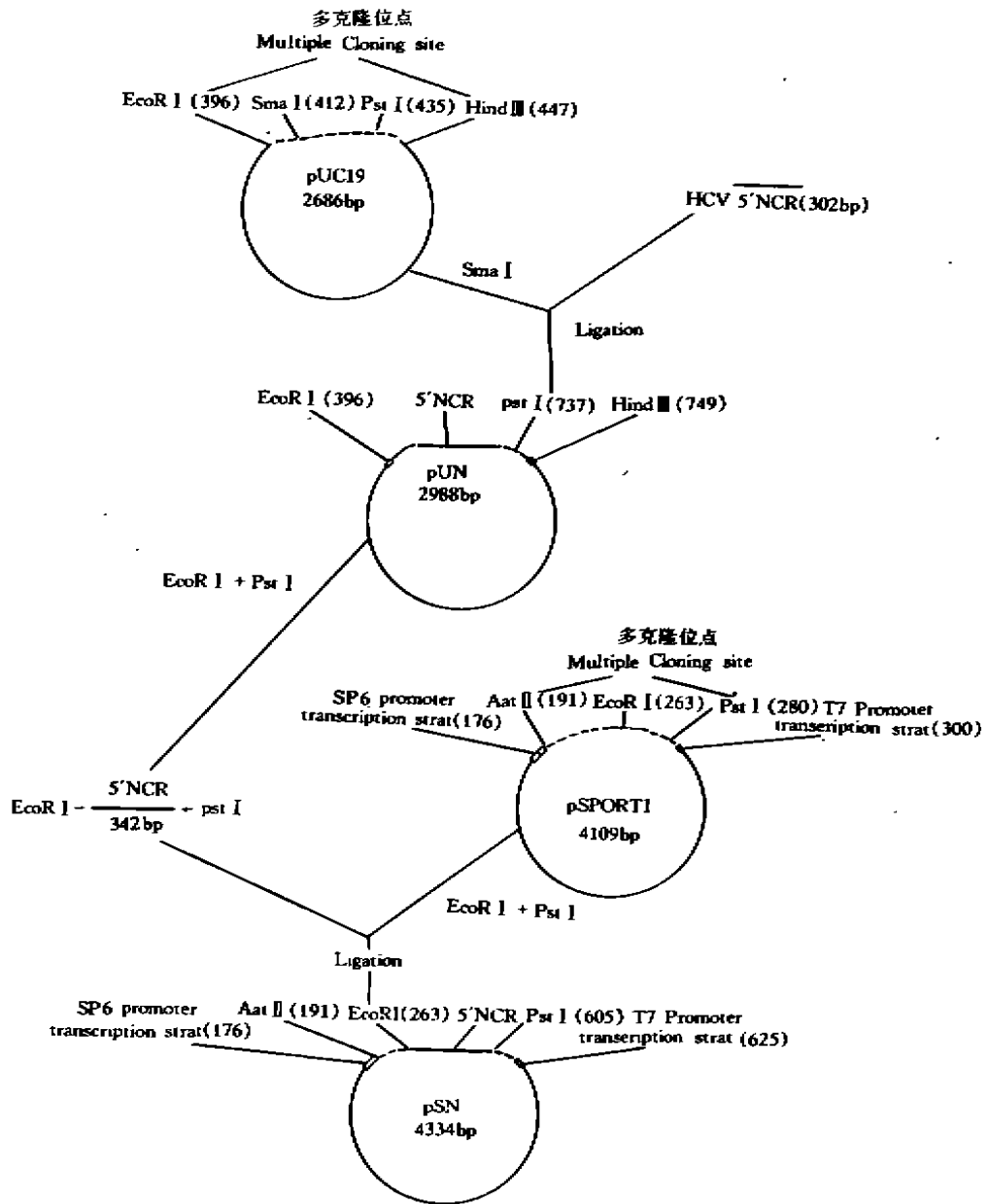


图 1 重组体 pSN 构建模式图

Fig.1 Construction schedule of the recombinant pSN

见切出一条带,比插入片段 302 bp 稍大(302 bp + EcoR I, Pst I 切点间的 40 bp)。另外,以重组质粒为模板,用 HCV 特异外引物 NC1、NC2 扩增,获得 302 bp 的产物(图 2)。

5'NCR 特异引物扩增构建的 cDNA 克隆时出现结果很好的 PCR 产物,同时用体外转录的 RNA 作模板进行逆转录和 PCR,亦得到很好的阳性结果,证实我们克隆的 cDNA 和体外合成的 RNA 完全可作为阳性对照模板。

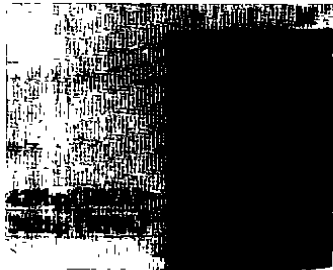


图3 体外合成 RNA 的电泳鉴定

M:123bp DNA ladder

- 1:正义 RNA
- 2:反义 RNA

Fig 3 *In vitro* synthesized RNAs identified by electrophoresis

M:123bp DNA ladder

1. sense RNA
- 2: anti - sense RNA.

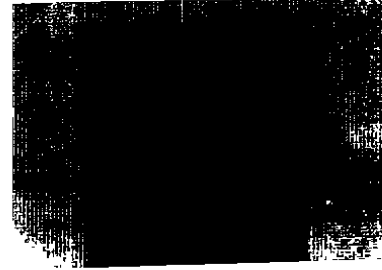


图4 RT-PCR 鉴定体外合成的 RNA

M:123bp DNA ladder

- 1: pSN 经 SP6 转录后 NC2 逆转录, NC3、NC4 扩增
- 2: pSN 经 T7 转录后 NC1 逆转录, NC3、NC4 扩增
- 3: 体外合成的 RNA 直接进行 NC3、NC4 扩增

Fig 4 *In vitro* synthesized RNAs

identified by RT-PCR \ = M: 123bp

DNA ladder

- 1: PCR products amplified with primer NC3 and NC4 after RNA synthesized by SP6 RNA polymerase was reversely transcribed with primer NC2.
- 2: PCR products amplified with primer NC3 and NC4 after RNA synthesized by T7 RNA polymerase was reversely transcribed with primer NC1
- 3: *in vitro* synthesized RNA amplified directly by primer NC3 and NC4.

本研究构建的 HCV 5'NCR 转录载体 pSN, 在其多克隆位点的两侧分别有 SP6 和 T7 RNA 在多聚酶转录启动序列, 可体外合成正义链或反义链 RNA。所获得的反义链 RNA 在丙型肝炎的抗病毒研究中可能有重要价值。在 RNA 多聚酶引导下, 加入同位素标记的三磷酸核糖核苷酸就可合成高比活性的放射性正义链或反义链 RNA 探针, 在组织细胞的原位杂交和原位 PCR 中用于检测 HCV 正链或负链 RNA。另外, pSN 经改进后如插入或缺失突变能作为定量 PCR 的竞争性模板尚在研究之中。

参 考 文 献

- 1 Houghton M, Weiner A, Han J. *et al.* Molecular biology of the hepatitis C virus: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology*, 1991, 14(2):381~388
- 2 李刚, 姚集鲁, 彭文伟等. HCV 基因组 NS1 区的分子克隆及序列测定. *中国病毒学*, 1995, 10(2):120~124
- 3 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T *et al.* *Molecular cloning, A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 4 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*, 1977, 74:5463~

5467

- 5 Tsukiyama - Kohara K, Iizuka N, Kohara M *et al.*. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol.* 1992, 66 (3): 1476 ~ 1483
- 6 Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci.* 1992, 89: 4942 ~ 4946
- 7 毕胜利, 白亮鹤, 丛勉尔等. 中国人丙型肝炎病毒基因组的一级结构及其变异. *病毒学报.* 1993, 9(2): 114 ~ 127
- 8 Chen PJ, Lin MH, Tai KF *et al.*. The Taiwanese hepatitis C virus genome: sequence determination and mapping the 5' termini of viral genomic and antigenomic RNA. *Virology.* 1992, 188: 102 ~ 113
- 9 Takamizawa A, Mori C, Fuke I *et al.*. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol.* 1991, 65(3): 1105 ~ 1113

***In Vitro* Transcription of HCV 5' Non-Coding Region cDNA**

Li Gang Yao Jilu Peng Wenwei *et al*

(Department of Infectious Diseases, Sun Yat-sen University
of Medical Sciences, Guangzhou 510630)

Hepatitis C virus (HCV) 5' non-coding region (5' NCR) cDNA with 302 bp obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) from the serum of a patient with chronic hepatitis C in Guangdong Province was subsequently filled in recessed ends, purified and inserted into pUC19 plasmid vector. The recombinant plasmid pUN was sequenced. The target gene in pUN was subcloned into EcoR I / Pst I sites of pSPORT I transcription vector. After the recombinant pSN was linearized, the transcription reaction *in vitro* was performed using SP6 RNA polymerase or T7 RNA polymerase. The sense RNA with 429 bp and anti-sense RNA with 362 bp synthesized by SP6 RNA polymerase and T7 RNA polymerase respectively were identified by electrophoresis on agarose gel and by RT-PCR using HCV-specific primers. It was also verified that the RNAs were transcribed from HCV 5' NCR cDNA. The 5' NCR cDNA clone constructed and RNA synthesized can be used as effective positive control template for PCR and RT respectively, which will be helpful in eliminating false-negative results and evaluating the quality of reagents. In addition, transcription vector of HCV 5' NCR allows the production *in vitro* of RNA probes and anti-sense RNA. After being modified, the recombinant vector will also be utilized as a competitive template for quantitative assay of HCV RNA.

Key words Hepatitis C virus, Molecular cloning, DNA sequence determination, *In vitro* transcription