

## 登革病毒 NS3 全基因的扩增与克隆\*

R373.33

江丽芳, 晏辉钧, 潘文彤, 方丹云, 郭辉玉

Q78

(中山大学微生物学教研室, 广州 510089)

关键词: 登革病毒 NS3 基因; 逆转录-PCR; 分子克隆 RT-PCR. 基因克隆.  
 中图分类号: R373.33 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2000)02-0193-04

登革热(DF)、登革出血热及登革休克综合征(DHF/DSS)是由登革病毒所致的两种不同临床类型的急性传染病, 广泛流行于全球热带及亚热带地区。DHF/DSS 以高热、出血、休克、高病死率为主要特征, 近年来其发病率有迅速增加的趋势, 已成为严重影响人类健康的公共卫生问题。迄今, DHF/DSS 的发病机制仍不清楚, 亦无有效的特异性预防方法<sup>[1]</sup>。登革病毒属于黄病毒科的黄病毒属, 有 I、II、III、IV 四个血清型, 基因组为单股正链 RNA, 全长约 11 kb, 编码三种结构蛋白和七种非结构蛋白。基因组顺序为 5'-C-PrM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5-3'。其中 NS3 基因在黄病毒中具有高度的保守性, 基因全长 1 854 bp, 编码 618 个氨基酸、Mr 为 69 kD 的 NS3 蛋白<sup>[2]</sup>。近年来的研究表明, NS3 蛋白是一种多功能蛋白, 其 N 末端具有蛋白酶活性, C 末端具有 RNA 螺旋酶和 NTP 酶等活性, 参与病毒前体蛋白的加工及病毒的复制<sup>[3]</sup>。该蛋白还具有很好的免疫原性, 并存在特异性 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> 和 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 细胞识别表位, 可诱导机体产生特异性的体液免疫和细胞免疫反应<sup>[4]</sup>。因此, NS3 蛋白对登革病毒的致病与免疫及疫苗的研究具有重要意义。本研究用 RT-PCR 技术成功地扩增并克隆了登革病毒 2 型(DV-2) NS3 全基因, 旨在为进一步研究登革病毒的致病与免疫及发展登革病毒疫苗打下基础。

## 1 材料与方法

1.1 病毒与细胞 登革病毒 II 型 New Guinea C 株(DV-2 NGC 株)1978 年由法国巴斯德研究所引进, 中国药品生物制品检定所赠送。白蚊伊蚊 C6/36 细胞由本室传代和保存。

1.2 菌种与质粒 pUC18、E. coli JM109 为本室保存。

1.3 工具酶和试剂 RNasin、AMV 逆转录酶、T<sub>4</sub>DNA 连接酶、IPTG、X-gal、KpnI、XbaI、XhoI、低熔点琼脂糖均为 Promega 公司产品。Taq DNA 聚合酶为加拿大 Biostar International Co. 产品。

1.4 引物 P1、P2、P3 根据 DV-2 NGC 株核苷酸序列设计, 由中国科学院上海细胞生物学研究所合成。P1 和 P2 用于扩增 NS3 基因, P3 为内引物, 用于克隆的鉴定。P1: 5'-gcctgcagAGCATGGTACCTGTGGGA-3' 与病毒 RNA 的第 4 488~4 504 碱基序列的反义股互补。P2: 5'-gcctctagaGTCCAGTGCGTCTCTTGC-3' 与病毒 RNA 的 6 453~6 435 碱基序列的意义股互补(小写斜体字母为所加的酶切位点), 两引物扩增片段的长度为

收稿日期: 1998-12-09, 修回日期: 1999-03-01

\* 基金项目: 广东省自然科学基金重点资助项目(5221100203017)

作者简介: 江丽芳(1953年-), 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事病毒致病及免疫分子生物学研究。

1 978 bp。P3:5'-GCAGCAAGTATAGCGGCTAG-3'与病毒 RNA 的 5 391~5 411 碱基序列的反义链互补。

**1.5 病毒 RNA 的提取** 用 DV-2 NGC 株感染 C6/36 细胞,待细胞病变达 2<sup>+</sup>~3<sup>+</sup>时,取 200  $\mu$ L 病毒培养上清液,根据 Chomczynskin 的异硫氰酸胍氯仿快速一步法<sup>[5]</sup>略加改良后,提取病毒核酸 RNA。简言之,在 200  $\mu$ L 的病毒培养上清液中加入 3 倍体积的变性液(含 4 mol/L 异硫氰酸胍,25 mmol/L 柠檬酸钠,0.5% 十二烷基肌氨酸钠),1/10 体积的 2 mol/L NaAc 及等体积水平衡酚和 120  $\mu$ L 氯仿:异戊醇(49:1),轻轻颠倒混匀 2~3 min,冰浴 15 min,4  $^{\circ}$ C 15 000 r/min,将水相加等体积的异丙醇沉淀 30 min,沉淀物用 70% 的乙醇及无水乙醇各洗一次后,真空抽干,溶于去 RNA 酶的水中。

**1.6 RT-PCR** 在模板核酸 RNA(200  $\mu$ L 病毒培养上清液提取的量)中加入 P2 1  $\mu$ L(25 pmol/L)、10 $\times$  RT buffer 2  $\mu$ L、RNasin 0.5  $\mu$ L(20 u)、AMV 逆转录酶 1.8  $\mu$ L(16 u)、各为 10 mmol/L 的 dNTP 2  $\mu$ L,加入 ddH<sub>2</sub>O 使总反应体积为 20  $\mu$ L,混匀后,室温放置 10 min,42  $^{\circ}$ C 1 h,最后用 95  $^{\circ}$ C 作用 5 min。PCR 总体积为 50  $\mu$ L,内含 10 $\times$  PCR buffer 5  $\mu$ L、各为 10 mmol/L 的 dNTP 4  $\mu$ L、P1 和 P2 各 1  $\mu$ L(15 pmol/L)、模板 cDNA 5  $\mu$ L、Taq DNA 聚合酶 2 u,在 94  $^{\circ}$ C 50 s,55  $^{\circ}$ C 40 s,72  $^{\circ}$ C 110 s 循环 30 次,最后在 72  $^{\circ}$ C 下延伸反应 10 min。

**1.7 NS3 基因的克隆** 重组质粒 pUC18-NS3 的构建见图 1。经纯化的 PCR 产物和 pUC18 用 KpnI/XbaI 分别消化后,经低熔点琼脂糖凝胶回收。连接反应总体积 10  $\mu$ L,内含 T<sub>4</sub> DNA 连接酶、PCR 产物及 pUC18,在 16  $^{\circ}$ C 下连接过夜。连接物转化 *E. coli* JM109 受体菌,然后均匀涂布于含 IPTG 及 X-gal 的 LBA 平板上,37  $^{\circ}$ C 培养过夜,蓝/白斑筛选阳性克隆。

**1.8 NS3 基因重组质粒的鉴定** 挑取白色菌落接种 LBA 培养基,碱裂解法提取质粒。所含质粒用 kpn I/XbaI、Xho I/Xba I 作酶切鉴定,并用 P2 和 P3 进行巢式 PCR 鉴定。

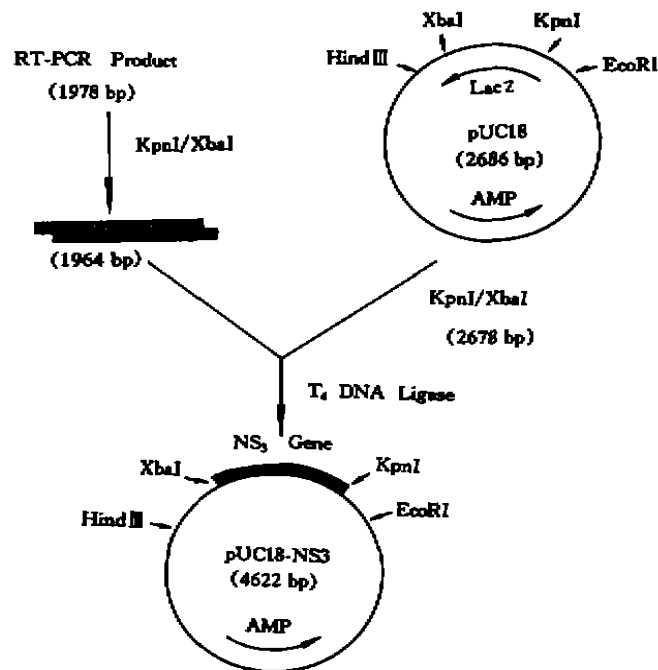


图1 PUC18-NS<sub>3</sub> 重组体的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid (PUC18-NS<sub>3</sub>)

## 2 结果与讨论

**2.1 RT-PCR 产物的鉴定** DV-2 RNA 经逆转录及用 P1、P2 为引物作 PCR 扩增后,琼脂糖凝胶电泳结果表明,扩增的基因片段全长约为 1 978 bp,与预期的结果一致(图 2)。

**2.2 重组质粒的鉴定** 利用 PCR 及限制性酶切位点,对重组质粒进行鉴定。结果显示,用 P1 及 P2 可自重组质粒中扩增出约 1 978 bp 的片段。用 P2 和 P3 作巢式 PCR 扩增,获得 1 065 bp 的条带(图 3)。利用 Kpn I/Xba I 及 Xho I/Xba I 作双酶切,可分别被切出 1 964 bp 和 2 678 bp 以及 1 029 bp 和 3 613 bp 的两种片段(图 4)。上述结果均与预期的结果一致。因此,所获得的重组质粒为携带 DV-2 NS3 全基因的重组质粒。

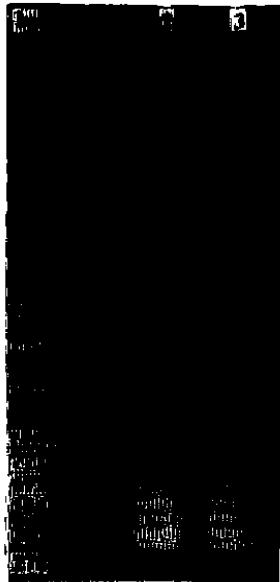


图 2 逆转录 PCR 产物  
Fig. 2 RT-PCR product

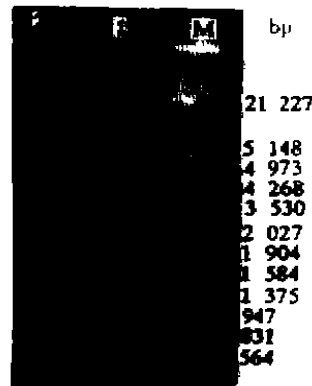


图 3 巢式 PCR 产物  
Fig. 3 Nested PCR product

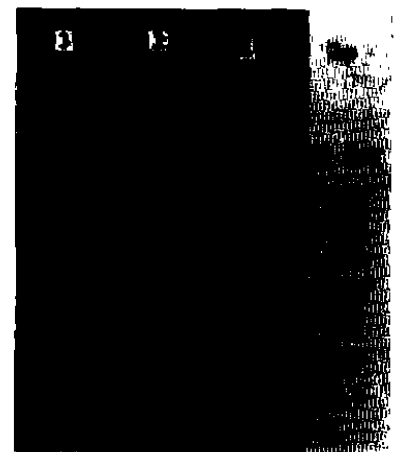


图 4 重组质粒 pUC18-NS3 限制性酶切图  
Fig. 4 Restriction enzyme map of the recombinant plasmid pUC18-NS3  
Lane 1. Marker  
Lane 2. XbaI/XhoI digest  
Lane 3. XbaI/KpnI digest

**2.3 登革病毒为 RNA 病毒,扩增登革病毒的基因片段必须先提取病毒的核酸 RNA,用逆转录获取 cDNA 第一链,再用 PCR 方法扩增出目的基因片段。关于登革病毒大片段基因的扩增,国内外虽有过一些报道,但大多采用从感染上清液或感染细胞中大量浓缩或纯化病毒后再作病毒 RNA 提取及 RT-PCR 的方法<sup>[6-8]</sup>。我们研究了直接从少量病毒感染上清液用快速一步法提取 RNA 及 RT-PCR 扩增登革病毒大片段基因的方法,并成功地克隆了 DV-2 NS3 全基因。控制变性液的用量,使其多于病毒液的量(3 倍),让病毒充分裂解,避免剧烈震荡,使病毒核酸 RNA 保持充分的长度,是从少量的核酸 RNA 中扩增出长片段基因的关键。这种少量快速一步法不仅使冗长而繁琐的病毒大量培养和纯化过程得到简化,而且使在体外培养困难的**

某些 RNA 黄病毒的基因克隆成为可能。

由于登革病毒的致病机制尚不清楚,又无有效的疫苗,因此,研究登革病毒基因结构与功能的关系具有重要意义。迄今,国外在这方面做了不少的研究,并取得了较大的进展。我国南方是登革热的高发地区,但我国对登革病毒的研究,特别是对登革病毒分子生物学的研究进展缓慢,虽曾有过研究登革病毒 NS1 基因和 E 基因的报道,但未见 NS3 基因扩增与克隆的报道。本研究利用少量病毒一步法提取病毒核酸 RNA 及用 RT-PCR 方法成功地扩增了 DV-2 的 NS3 全基因,扩增片段的核苷酸位置为 4 488~6 453 nt 全长 1 978 bp,并构建了 DV-2 NS3 全基因的分子克隆,为进一步研究登革病毒 NS3 结构与功能的关系和开发登革疫苗奠定了基础。

### 参 考 文 献

- [1] Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1998, 11(3):480~496
- [2] Hanh YS, Galler R, Hunkapiller T, *et al.* Nucleotide sequence of dengue 2 RNA and comparison of the encoded proteins with those of other flaviviruses [J]. *Virology*, 1988, 162:167~180
- [3] Teo KF, Wright PJ. Internal proteolysis of the NS3 protein specified by dengue virus 2 [J]. *J Gen Virol*, 1997, 78(pt2): 337~341
- [4] Rothman AL, Kurane I, Ennis FA. Multiple specifications in the murine CD<sub>4</sub><sup>+</sup> and CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T-cell response to dengue virus [J]. *J Virol*, 1996, 70(10):6540~6546
- [5] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, 162:156~159
- [6] Garcia G, Vaughn DW, Del-Angel RM. Recognition of synthetic oligopeptides from nonstructural protein NS1 and NS3 of dengue-4 virus by sera from dengue virus-infected children [J]. *Am J Trop Med Hyp*, 1997, 56(4):466~470
- [7] Chen WB, Qu XY, Del-Terry M. A simple and rapid method of preparing large fragments of dengue virus cDNA from replicative-form RNA using reverse transcriptase and PCR [J]. *J Virol Methods*, 1992, 39(1-2):197~206
- [8] 于曼,秦鄂德,韩照中,等.登革 2 型 43 株病毒包膜蛋白 E 基因的聚合酶链式反应扩增[J]. *中华实验与临床病毒学杂志*, 1995, 9(2):103~106

## Amplification and Cloning of NS3 Gene of Dengue Virus

JIANG Li-fang, YAN Hui-jun, PAN Wen-tong, *et al.*

(*Department of Microbiology, Sun Yet-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China*)

**Abstract:** The RNA of dengue-2 virus (New Guinea C strain, NGC) was extracted from small amount of dengue-2 virus culture supernatant. The large NS3 gene fragment was amplified from RNA of dengue-2 virus with RT-PCR method. The amplified NS3 gene fragment was cloned directly into the pUC18 plasmid vector. The recombinant plasmid was identified by agarose gel electrophoresis analysis after digestion with restriction endonuclease and nested PCR method. The results showed that the amplified NS3 gene fragment was about 1978 bp in length; the recombinant plasmid contained NS3 gene of dengue-2 virus. The method of amplified large fragment of dengue virus from small amount of dengue virus culture supernatant was established.

**Key words:** Dengue virus NS3 gene; RT-PCR; Molecular cloning