维普资讯 http://www.cqvip.com

第15卷4期 中国病毒学 Vol 15 No.4
2000年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 2000

(4) R373.31
330-335

乙脑病毒全长cDNA的扩增克隆及体外转录制备感染性RNA的研究

黄庆生，马文煜，姜绍谆，樊英茹，张富泉，肖毅，丁天兵
(第四军医大学微生物学教研室，西安 710032)

摘要：本研究根据已知的乙脑病毒(JEV)SA14株基因序列设计一套引物，利用长模板RT-PCR技术，一次扩增出了JEV的全长cDNA，并采用大片段克隆技术将其克隆于载体的RNA聚合酶启动子下游。阳性克隆转录的RNA转染HBK细胞后细胞产生病变，经乳鼠脑内接种及特异性免疫荧光染色证明为JEV，这一结果表明JEV感染性克隆的构建获得了成功。其次，合成一条含有RNA聚合酶启动子序列的5′引物，利用长模板RT-PCR方法扩增出带有启动子的JEV全长cDNA，以此cDNA为模板作体外转录。转录产物转染BHK细胞后观察到了典型的JEV病变。收获的病毒经乳鼠脑内接种及免疫荧光染色证明为JEV，从而建立了制备JEV感染性RNA的快捷方法。本研究构建的JEV感染性克隆与建立的长模板RT-PCR快速制备JEV感染性RNA的方法，将为JEV分子生物学研究的后续工作提供有力的工具和奠定坚实的基础。

关键词：日本脑炎病毒；感染性RNA；体外转录；全长cDNA
中图分类号：Q785 **文献标识码**：A **文章编号**：1003-5125(2000)04-0330-06

日本脑炎病毒(JEV)简称乙脑病毒，基因结构为单股正链RNA，长约11 kb，5′端有帽状结构，3′端无Poly A。非逆转录RNA病毒由于在复制周期中不形成DNA中间体，要在基因水平直接操作难度较大，感染性转录体制备技术开创了RNA病毒基因分析的新领域[1,2]。将全长的病毒cDNA置于RNA聚合酶启动子的下游，利用体外转录的方法转录出该病毒的全长RNA(转录体)，转录体转染易感细胞后可复制出新的病毒颗粒。利用这一方法人们就可以在DNA水平进行操作，得到重组或突变的子代病毒，为研究RNA病毒的复制、表达及致病机制提供材料。

体外转录需要一定量的全长cDNA作为模板，传统的方法是构建含病毒全长cDNA的克隆，从中获取相对较大量的cDNA[2]。但有些病毒(包括JEV)的全长cDNA无法克隆或是虽然能克隆进载体但在宿主菌中易发生变异而导致转录的RNA失去感染性，推测可能是因为这些病毒序列的潜在毒性和不稳定性所致[3~6]。JEV感染性转录体的研究始于1992年，Sumiyoshi利用分段克隆，体外连接成全长cDNA的方法首次成功转录出了JEV的感染性RNA[6]。但是体外连接效率低、耗费时间(要构建几个片段的克隆)，给转录体的制备带来极大的不便。目前还未查到构建成功JEV感染性克隆的报道。

收稿日期：1999-09-06，修回日期：2000-01-21
作者简介：黄庆生(1963年-)，男，福建籍，实验师，博士学位，研究方向：分子病毒学。现在地址：军事医学院微生物流行病所十一室，北京 100071。

维普资讯 http://www.cqvip.com

对于全长 cDNA 无法克隆的病毒可采用长模板 RT-PCR 技术，5′引物中引入 RNA 聚合酶启动子序列，扩增出含有启动子的病毒全长 cDNA 作为体外转录的模板。有些病毒已采用这一技术转录出感染性 RNA[3,7,8]。但是由于受多种因素的影响，JEV 目前还未见有扩增出全长 cDNA 的报道。本研究拟建立长模板 RT-PCR 扩增 JEV 全长 cDNA 的方法，探索体外转录制备 JEV 感染性转录体的快捷方法，并构建出 JEV 全长 cDNA 的感染性克隆。为 JEV 的致病机理、疫苗构建、基因组功能等病毒的分子生物学研究奠定基础。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　大片段克隆试剂盒：采用宝灵曼公司的 Expand Cloning Kit，大片段 PCR 产物与粘粒载体靠试剂盒提供的平端连接系统相连接，经 λ 噬菌体包装提取物包装后感染大肠杆菌。克隆位点两边有 T7 及 SP6 启动子，可根据不同的插入方向在体外转录时选择相应的 RNA 聚合酶。

1.1.2　引物：

P1 引物-5′AGA AGT TTA TCT GTG TGA ACT TCT 3′。P2 引物-5′ATT CCC GGG GTG TTC TTC CTC ACC ACC AGC TAC 3′。逆转录引物-5′CTA GTG GGA GAT CCT GTG TTC TTC CTC ACC ACC AGC TAC 3′。P_{prom}引物：5′AGT TAA TAC GAC TCA CTA TA A GAA GTT TAT CTG TGT GAA CTT CTT GGC 3′（前 20 个碱基为 T7 启动子序列，后 28 个碱基与 JEV SA14 基因 1-28 序列一致）。P1 P2 引物用于扩增 JEV SA14 全长 cDNA，扩增的 cDNA 用于构建 JEV 全长 cDNA 克隆。P_{prom}P2 引物配对扩增的 JEV 全长 cDNA 带有 T7 启动子，可直接用作体外转录制备感染性转录体的模板。

1.1.3　试剂：分别购自 B.M、GIBCOBRL、Promega、Takara、华美公司。

1.1.4　RNA 提取液：含异硫氰酸胍 8 mol/L，枸橼酸钠 50 mmol/L，2-ME 100 mmol/L，Sarkosyl 1%。

1.2　方法

1.2.1　JEV RNA 的提取

200 μL JEV 脑悬液上清与等量的 RNA 提取液混合。加入 1/10 量 2 mol/L 醋酸钠，37 ℃ 5 min。加等量水平衡酚及 2/10 量氯仿抽提，异丙醇沉淀，75% 乙醇洗后凉干，无 RNA 酶的三蒸水 10 μL 溶解

1.2.2　长模板 RT-PCR 扩增 JEV 全长 cDNA

4 μL 新鲜提取 RNA 加 1 μL 25 μmol/L 的逆转录引物，70 ℃ 10 min 后立即冰浴。加入以下成份：5×逆转录缓冲液 4 μL，100 mmol/L DTT 2 μL，10 mmol/L dNTP 各 2 μL，RNA 酶抑制剂 0.5 μL(40 u/μL)，Expand 长模板逆转录酶 1 μL(50 u/μL)，总反应体积 20 μL，42 ℃ 逆转录 120 min。逆转录产物加 20 μL TE(含 RNase A 250 μg/mL)，37 ℃ 水浴 60 min，清除病毒 RNA。酚、氯仿抽提，乙醇沉淀后用 50 μL TE 溶解沉淀，取 10 μL 用于 PCR。长模板 PCR 含下列成份：逆转录产物 10 μL，10×PCR 缓冲液 5 μL，10 mmol/L dNTP 各 2.5 μL，25 μmol/L 5′引物和 3′引物各 1 μL，20 mmol/L $MgCl_2$ 5 μL，Takara 长模板 PCR 酶 0.5 μL(5 u/μL)，补加三蒸水至 50 μL。进入下列循环：94 ℃ 15 s，60 ℃ 30 s，68 ℃ 9 min(延伸时间每个循环增加 10 秒)，30 个循环。反应在 200 μL 薄壁管，基因公司 PTC150 型 PCR 扩增仪上进行。

1.2.3　JEV 全长 cDNA 克隆

回收长模板 PCR 产物，JEV 全长 cDNA 的克隆按照宝灵曼大片段 DNA 克隆试剂盒说明进行。

1.2.4　体外转录制备感染性 RNA

转录反应体积为 50 μL，含下列成份：线状阳性克隆 DNA 或含 T7 启动子的长模板 PCR 产物约 10 μg，RNasin 25 u，10×转录缓冲液 5 μL，10 mmol/L rNTP 各 5 μL，100 mmol/L m^7GpppA 1 μL，50 mmol/L DTT 5 μL，T7 RNA 聚合酶 35 u，补加无 RNA 酶三蒸水至 50 μL，37 ℃ 作用 3 h。

1.2.5　RNA 转染细胞

维普资讯 http://www.cqvip.com

转录产物参照 Gibcobrl 公司 Lipofectamine 脂质体说明转染 BHK 单层细胞，37 ℃二氧化碳孵箱培养，观察病变。细胞出现病变后，收集上清，乳鼠脑内接种，发病后取脑子制成10%的脑悬液备用。

1.2.6 间接免疫荧光法检测 JEV 感染细胞：收获的感染鼠脑悬液上清感染 BHK 细胞后，用抗乙脑病毒单克隆抗体免疫荧光染色鉴定，操作按常规方法进行。

2 结果

2.1 长模板 RT-PCR 扩增 JEV 全长 cDNA

P1、P2 引物及 P_{prom}P2 引物都可以扩增出 11 kb 长的产物(图 1A)。扩增产物经 *Bam*H I 和 *Sac* II 双酶切分析证明为 JEV 全长 cDNA(图 1B)。

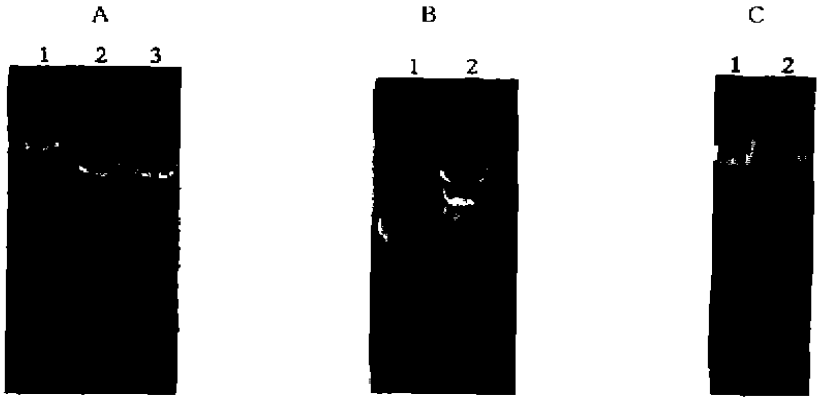

图 1 PCR 产物及 C1 克隆的酶切分析

A 长模板 RT-PCR 扩增 JEV 全长 cDNA；B 长模板 RT-PCR 产物 *Bam*H I, *Sac* II 双酶切结果；

C C1 克隆 *Not* I 酶切结果

Fig. 1 Analysis of PCR product and C1 clone

A Amplification of full-length JEV cDNA by long template RT-PCR

1. λDNA *Hind* III; 2. amplification of JEV full-length cDNA (11 kb);

3. amplification of JEV full-length cDNA with T7 promoter.

B Amplified product of long template RT-PCR digested by *Bam*HI and *Sac* II.

1, digested fragments; 2, λDNA *Hind* III;

C C1 clone digested by NotI. 1, λDNA *Hind* III; 2, digested fragments;

2.2 JEV 全长 cDNA 克隆

将 P1、P2 引物扩增的 JEV 全长 cDNA 克隆于粘粒载体，挑取两个菌落。两个克隆扩大培养后经 PCR 初步鉴定都为阳性克隆。C1 克隆经鉴定证明 JEV cDNA 为正向插入在 T7 启动子的下游，C2 克隆为反向插入在 T7 启动子的下游。

为了对阳性克隆进一步鉴定，用碱裂解法提取 C1 克隆的粘粒 DNA，作以下的鉴定：(1)用多克隆位点两边含有的 *Not* I 酶切位点消化 C1 克隆 DNA，结果切出两个片段，一个片大小相当于 32 kb，与载体大小一致。另一个片段相当于 11 kb，与 JEV 全长 cDNA 大小一样(图 1C)。说明克隆片段的大小与预计的一致。(2)以 C1 克隆 DNA 为模板，用 JEV 5′端 P1 和 3′端 P2 引物作长模板 PCR 扩增，扩增产物为 11 kb，与 JEV 全长 cDNA 大小一致。(3)对 C1 克隆中

维普资讯 http://www.cqvip.com

的 JEV cDNA 进行部分的序列测定，测定了约 500 个可读的碱基，与 JEV SA14 序列比较，未发现变异碱基。

2.3　C1 克隆体外转录制备感染性 RNA

提取 C1 克隆的粘粒 DNA，在 JEV cDNA 的 3′末端切开，使其成线状，体外转录后转录 BHK 细胞。第五天起细胞开始出现病变(图 2A)，只转染 C1 克隆粘粒 DNA 的对照细胞，没有出现病变。病变细胞上清乳鼠脑内接种，乳鼠发病死亡。病变鼠脑感染 BHK 细胞，抗 JEV 单克隆抗体间接免疫荧光染色可见特异性荧光。

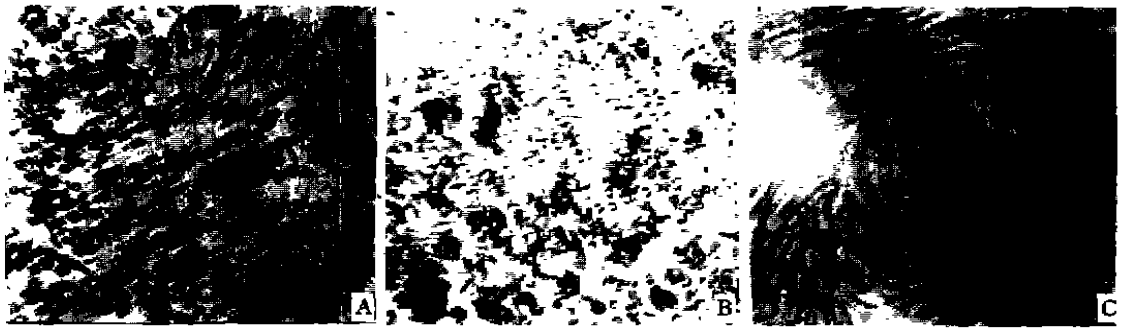

图 2　RNA(转录体)转染 BHK 细胞结果

Fig.2　Results of BHK cell transfected with RNA(transcripts)

A. BHK cell transfected with RNA derived from C1 clone;

B. BHK cell transfected with RNA derived from amplicon of long tetmplate RT-PCR;

C. normal control BHK cell;

2.4　长模板 RT-PCR 产物直接用作体外转录制备 JEV 感染 RNA

用含有 T7 启动子的 5′引物 P_{prom} 和 P2 引物扩增的 JEV 全长 cDNA 直接用作体外转录制备感染性 RNA。转录产物转染 BHK 细胞，第 6 天细胞开始出现病变(图 2B)。病变细胞上清乳鼠脑内感染，乳鼠发病死亡。病变鼠脑悬液感染 BHK 细胞，免疫荧光染色可观察到特异性的荧光。

3　讨论

获得病毒全长 cDNA 是制备感染性转录体的第一步。包括 JEV 在内的黄病毒属多数成员至今还未查到扩增全长 cDNA 的报道。本研究经过多次尝试建立了比较稳定的扩增 JEV 全长 cDNA 的长模板 RT-PCR 方法。这样就可简便而又快速地在一天之内利用长模板 RT-PCR 方法扩增出相对较大量的 JEV 全长 cDNA。此外，黄病毒全长 cDNA 在宿主内不稳定及可能有毒性作用，其克隆成功率是公认的，JEV 也不例外。至今还没有构建成功 JEV 感染性克隆的报道。本研究成功扩增出了 JEV 的全长 cDNA，为构建其克隆奠定了基础　最后采用大容量的粘粒载体，成功克隆了 JEV 全长 cDNA。获得的两株克隆 C1 和 C2 经鉴定分别是以正向和反向克隆在 T7 启动子的下游。其中正向插入在 T7 启动子下游的克隆 C1，进一步经

维普资讯 http://www.cqvip.com

PCR 鉴定、酶切分析、部分序列测定，确认为 JEV 全长 cDNA 克隆。以 C1 克隆的 JEV cDNA 为模板，经体外转录后转染 BHK 细胞可以产生典型的病变，感染乳鼠可引起发病死亡，免疫荧光染色进一步证明了病毒特异性抗原的存在，从而基本上确定了 C1 克隆为 JEV 的感染性克隆。将 RNA 聚合酶启动子序列引入 5′端引物，利用长模板 RT-PCR 方法，在 1-2 天内就可制备出用于体外转录的病毒全长 cDNA。本实验将 T7 RNA 聚合酶启动子序列引入到 5′引物中，扩增出的 JEV 全长 cDNA 直接用于体外转录，成功转录出了有感染性的 RNA。转染后收获的病毒经乳鼠脑内接种、免疫荧光染色鉴定，证明是 JEV，从而建立了长模板 RT-PCR 产物直接用于体外转录制备 JEV 感染性 RNA 的快捷方法。

总之，快速获取 JEV 感染性转录体方法的建立及感染性克隆的构建将为 JEV 的致病机理、疫苗筛选分子病毒学研究提供有力的工具和方法。

参 考 文 献

[1] 兰水云. RNA 病毒感染性转录体的制备[J]. 国外医学-微生物学分册, 1998, 21(2): 1-4

[2] Boyer J C, Haenni A L. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses [J]. Virology, 1994, 198: 415-416

[3] Gritsun T S, Gould E A. Infectious transcripts of tick-borne encephalitis virus, generated in days by RT-PCR [J]. Virology, 1995, 214: 611-618

[4] Lai C J, Zhao B T, Hori H, *et al*. Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(12): 5139-5143

[5] Rice C M, Grakoui A, Chambers T J. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation [J]. New Biol, 1989, 1: 285-296

[6] Sumiyoshi H, Hoke C H, Tren D W, *et al*. Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templlates [J]. J Virol, 1992, 66(9): 5423-5431

[7] Tellier R, Bukh J, Emerson S U, *et al*. Amplification of the full-length hepatitis A virus genome by long reverse transcription-PCR and transcription of infectious RNA directly from the amplicon [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 4370-4373

[8] Wang L F, Radkowski M, Vargas H, *et al*. Amplification and fusion of long fragments of hepatitis C virus genome [J]. J Virol Method, 1997, 68(2): 217-223

维普资讯 http://www.cqvip.com

Amplification and Cloning of Full-length JEV cDNA and Preparation of Infectious RNA by *in vitro* Transcription

HUANG Qing-sheng, MA Wen-yu, JIANG Shao-zhun, *et al*.

(*Dept. Microbiology, The Fourth Military Medical University, Xi'an* 710032, *China*)

Abstract: Preparation of infectious RNA by *in vitro* transcription from full-length cDNA has led to advances in the study of many positive-strand RNA viruses. There are two strategies of preparing full-length cDNA of RNA viruses: (1) construction of infectious clone. (2) amplification of full-length cDNA by long template RT-PCR with the RNA promoter incorporated to 5′ primer. In this study both ways were established to generate Japanese Encephalitis Virus (JEV) infectious RNA. Firstly JEV (SA14 strain) full-length cDNA was amplified by long template RT-PCR and then cloned into the cosmid vector. One clone in which JEV cDNA was downstream of T7 promoter was selected and the RNA derived from this clone showed infectious after transfection of BHK cell. In another way of preparing JEV full-length cDNA by long template RT-PCR, T7 promoter was introduced to 5′ primer. RNA derived from this cDNA also showed infectious after transfection of BHK cell. The recovered viruses were further confirmed by intracerebral inoculation of newborn mice and immunofluorescent staining. These results suggested that JEV infectious clone was constructed and the long template RT-PCR product directly used for in vitro transcription could provide a rapid and simple method for preparing JEV infectious RNA.

Key words: JEV; Infectious RNA; *in vitro* transcription; Full-length cDNA