

技术交流

HCV 定量 RT-PCR 竞争性参比标准的构建^①

吕凌^② 王斌

(中山医科大学分子医学研究中心; 广州, 510089)

摘要 将克隆的 HCV 5' NCR 序列反向插入 pSP7 的 *EcoRV* 切点, 构建一种能转录 HCV -RNA 的质粒 pSnc-2 以 RT-PCR 从抗 HEV IgM 阳性病人血浆中扩增一段 238bp 的 HCV -cDNA, 反向插入 pSnc-2 中克隆的 5' NCR 序列的 *NcoI* 切点, 构建插入突变型 HCV -cDNA 重组体 pSnc-e 应用限制性酶切和 PCR 对这两种重组质粒进行了鉴定, 为 HCV -RNA 的定量 PCR 提供有用的内参照模板。

关键词 克隆 / 分子; 聚合酶链反应 / 方法; 肝炎病毒组, 丙型 / 遗传学

中图分类号 R 512.62; 523.1

内参比法定量 PCR 的原理是先制备一种与靶分子相近但又有差别的参照品, 经系列稀释后分别与样品中的靶分子同管扩增, 然后根据参照品特性定量测定其产物, 并以此参比推导出靶分子产物的量。这一方法是目前诊断丙型肝炎病毒 (HCV) 感染、判断其传染性和病情, 以及评估其药物疗效的最精确方法。要建立之就需先制备其参照品, 为此我们应用分子克隆技术构建了其转录重组体。

1 材料与方 法

1.1 5' -NCR 序列在 pSP7 中的克隆

以 *Bam*HI 和 *Eco*RI 切出 pUHC-NC^[1] 中的 5' -NCR 序列, Klenow 酶补平末端后插入 pSP7 的 *Eco*RV 单切点并转化 JM109 钙化菌, 然后从 LBA 平板上挑取单个菌落快速提取质粒 DNA 以限制性酶切和 PCR 鉴定插入序列, 得 HCV 基因反向插入的转录体 pSnc-2

1.2 HEV 序列在 pUC19 中的克隆

以 RT-PCR 法从抗 HEV IgM 阳性肝炎病人血清中扩增 238bp HEV -cDNA 作为目的基因, 钝端插入 pUC19 的 *Sma*I 切点, 构建重组质粒 pUHE-HEV 中^[2]引物基因记位: 上游为: 2345~ 2364 nt, 下游为 2582~ 2563 nt

1.3 HEV 基因在 5' -NCR 序列中插入

*Eco*RI 和 *Bam*HI 双切出 pUHE 中克隆的 HEV -cDNA 后钝端反向插入 pSnc-2 中克隆的 5' -

NCR 序列的 *Nco*I 单切点, 得 HCV 基因有插入突变的转录体 pSnc-e

2 结 果

图 1 表明, *Eco*RI 和 *Bam*HI 切下 pUHC-NC 中克隆的 5' -NCR 序列长 325 bp (第 6 电泳道), 钝端插入载体 pSP72 (第 5 电泳道) 的 *Eco*RV 切点后, 构建了重组质粒 pSnc-2 (第 4 电泳道) pSnc-2 (2762 bp) 电泳迁移比 pSP72 (2462 bp) 后移, 反映 5' -NCR 序列插入后该片段增长 300 bp *Eco*RI 和 *Bgl*II 酶切点位于 pSP7 的多克隆位点中, 分别在 *Eco*RV 上游和下游, 为 5' -NCR 序列所不含有, 在 pSnc-2 序列上的基因记位分别是 68 nt 和 386 nt, 在 5' -NCR 克隆位点的两侧, 横跨 318 bp *Nde*I 是 pSP7 的限制性酶切点, 在 5' NCR 序列中缺如, *Nco*I 是 5' -NCR 序列的限制性酶切点, 在 pSP7 序列中缺如, 两者在 pSnc-2 上的基因记位分别是 2680 nt 和 339 nt, 横跨 421 bp 对 pSnc-2 以 *Eco*RI 和 *Bgl*II 双切, 可切出一长约 318 bp 的片段 (第 2 电泳道), 以 *Nde*I 和 *Nco*I 双切, 可切出一个长约 421 bp 的片段 (第 3 电泳道), 两者均同设计相符。克隆前的 5' -NCR 靶序列长 300 bp, 乃以引物 NC 和 NC 扩增而来^[1], 本文用之扩增 pSnc-2 中的 5' -NCR 序列, 得产物大小也为 300 bp, 与预期一致。图 2 表明, *Eco*RI 和 *Bam*HI 切下 pUHEV 中克隆的 HEV 序列长 263 bp, 钝端插入 pSnc-2 的 *Nco*I 切点后, 构建了重

① 广东省自然科学基金资助课题; ② 第一作者, 1958 年出生, 男, 医学博士, 副研究员

组质粒 pSnc-e pSnc-e电泳迁移既比 pSP7后移,也比 pSnc-2后移,反映 263 bp 的克隆 HEV 序列插入 5'-NCR 序列后 pSnc-2 分子增大。EcoRI 和 BamHI 切下的克隆 HEV 序列补平末端后当处于反向时其 5' 末端序列为 AATTG-

明在 pSnc-e 质粒中,克隆 5'-NCR 序列已出现了插入突变,位置是 NcoI 切点,反向插入了 HEV 的 2345~2582 nt 的序列,使得 HCV 与 HEV 序列插入方向一致。

3 讨论

HCV 感染诊断的现状是:① 虽已阐明基因序列但至今不能确认毒粒 ② 血清免疫诊断只能检出抗体而不能检出抗原 ③ RT-PCR 检测 HCV-RNA 是标准确诊手段 [3],但由于病毒准种系特点常使滴度波浪起伏,反映为肝炎周期活动。因此定量检测 HCV-RNA 临床意义就非常重要,而且有不断增多的报道。基于竞争 PCR 建立的内参比法最为精确,其原理是先制备一种与靶分子相近的含小缺失、小插入或以定点突变获得新酶切点的参照品,再以系列稀释度的该参照品分别与样品中的靶分子同时在一个试管中扩增,然后根据参照品的特性,将参照品的产物与靶分子产物分开,并进行比较,找到两种产物量最接近的扩增管后,以该管参照品的稀释度或拷贝数来表示样本中靶分子的数量。这一方法由 Hagiwara 等应用于 HCV-RNA 的定量 PCR 检测中,并测得丙型肝炎患者血清中 HCV-RNA 水平为 $10^4 \sim 10^5$ 拷贝 / mL,敏感性可达 100 拷贝水平 [4]。国内还未见有此类研究,为此我们用基因重组技术制备有插入的参照品试图用于 PCR 检测,即将前文 [1] 克隆的 HCV 5' NCR 序列中反向插入 238 bp 的 HEV 序列,两步亚克隆为 pSnc-e 进一步的研究可借助于 pSnc-e 克隆位点上游的 SP6 启动子,以 SP6 RNA 聚合酶转录 (-) 链 RNA 作为分子杂交所用的探针;借助于克隆序列下游的 T 启动子,以 T7 RNA 聚合酶能转录 (+) 链 RNA,不仅作为定量 PCR 检测 HCV-RNA 的内参照模板,而且还可作为 RT-PCR 检测 HCV-RNA 的标准模板,这对于丙型和戊型肝炎的实验诊断有实用价值。

参 考 文 献

- 1 吕 凌,王 斌. HCV 5' NCR 序列克隆和其转录重组质粒的构建. 中山医科大学学报, 1996, 17(3): 166
- 2 Tsarev S A, Emerson S V, Reyes G R, et al. Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 559
- 3 Gil B, Qian C, Riezu Boj J, et al. Hepatic and

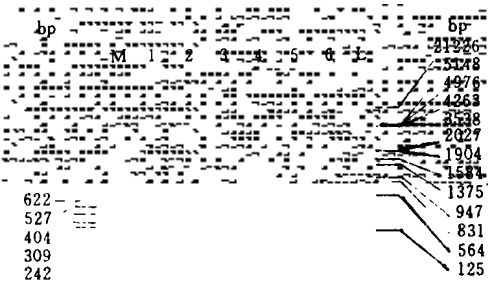


图 1 pSnc-2 质粒的 PCR 和酶切鉴定

L 引物 NC 和 NC 扩增 pSnc-2 所得 300 bp 的 PCR 产物; 2 pSnc-2 以 EcoRI 和 BglII 切出一个 318 bp 的片段; 3 pSnc-2 以 NcoI 和 NdeI 切出一个 421 bp 的片段; 4 pSnc-2 以 EcoRI 线性化; 5 pSP72 以 EcoRV 线性化; 6 pUnc 以 BamHI 和 EcoRI 切出一 325 bp 的片段; L 片段长度标准 lambda DNA / EcoRI and HindIII (Promega); M 片段长度标准 pBR322 / MspI (友谊公司); 2% 琼脂糖电泳



图 2 pSnc-e 质粒的 PCR 和酶切鉴定

L 标准 lambda DNA EcoRI and HindIII; M: 标准 pBR322 / MspI ; L 引物 NC 和 NC 扩增 pSnc-e 所得 526 bp 的 PCR 产物; 2 引物 NC1 和 NC2 扩增 pSnc-2 所得 300 bp 的 PCR 产物; 3 pSnc-e 以 EcoRI 切出一个 275 bp 的片段; 4 pSnc-e 以 BglII 线性化; 5 pSnc-2 以 NcoI 线性化; 6 pSP72 以 EcoRI 线性化; 7 pUHEV 以 BamHI 和 EcoRI 切出一 263 bp 的片段

5'-NCR 的 NcoI 切点打开并补平后其 3' 末端序列为一 CCATG, 两者相连则产生一个 EcoRI 切点 (GAATTC), 与前述 pSP7 载体所固有的 EcoRI 克隆位点相距 319 bp 以 EcoRI 酶切 pSnc-e, 结果切出一大小与之相符的限制性片段。以引物 NC1 和 NC2 扩增 pSnc-e, 得产物长 563 bp, 恰相当于 300 bp 的 5'-NCR 序列与 263 bp 的 HEV 序列之和。由此说

- extrahepatic HCV RNA strands in chronic hepatitis C
different patterns of response to interferon treatment.
Hepatology, 1993, 18(5): 1050
- 4 Hagiwara H, Hayashi N, Fusamoto H, *et al.*
Quantitative analysis of hepatitis C virus RNA

relationship between the various stages of the carrier
states or the response to interferon therapy.
Gastroenterology, 1993, 28(suppl 5): 48

(1996-03-1 收稿 1996-12-2 修回)

CONSTRUCTION OF A PLASMID WHICH CAN TRANSCRIBE A MUTANT HCV-RNA AS THE COMPETITIVE TEMPLATE IN QUANTITATIVE RT-PCR

Lu Ling Wang Bin

(The Research Center of Molecular Medicine, Sun Yat-sen
University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

A 238 bp HEV-cDNA was amplified from plasma of a patient positive to anti-HEV IgM. It was inserted into the *Nco*I site of HCV 5' NCR sequence cloned into the vector pSP72. A plasmid pSnc-e was recombined that can transcribe a mutated HCV-RNA serving as the competitive RNA template for quantitative RT-PCR assay. The pSnc-e was determined by PCR and restrictive site analysis.

Subject headings cloning /molecular; polymerase chain reaction/methods; hepatitis C virus /genetics

(上接第 14 页)

RELATIONSHIP OF EPSTEIN-BARR VIRUS IN SQUAMOCELLULAR CARCINOMA OF THE ORAL CAVITY

Ding Xueqiang¹ Zhu Zhenyu² Wang Anxun¹ Feng Chongjin¹ Li Chibin¹

(1 Department of Stomatology, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences,
Guangzhou, 510080 2 Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences)

In this study, for inquiring into the relationship of EBV in squamocellular carcinoma of the oral cavity, using polymerase chain reaction (PCR), we detected Epstein-Barr virus (EBV) DNA in paraffin embedded specimens from sixty patients with squamocellular carcinoma of the oral cavity and forty biopsy tissues of normal oral mucosa from the mouth cavity in 40 cases. The results showed that the EBV DNA positive rate was 33.3% (20/60) in the experimental group (*i. e.* oral cancer group), among which 32.5% (13/40) was the EBV DNA positive rate from 40 patients with well-differentiated squamocellular carcinoma, 30% (3/10) within the medium differentiated group was the EBV DNA positive rate, 40% (4/10) was the EBV DNA positive rate from 10 poorly differentiated cases; and 10% (4/40) in the control group. There was significant difference between experimental group and control group ($\chi^2 = 7.16, P < 0.01$); but there were no significant difference ($P > 0.05$) among the lesion sites, age groups and histodifferentiation by statistical test. These results suggested that EBV infection of oral squamous epithelium might take part in carcinogenic or development of oral squamocellular carcinoma.

Subject headings mouth neoplasms; carcinoma, squamous cell; polymerase chain reaction; herpesvirus 4, human