

· 实验研究 ·

HCV 广东株 5' NCR cDNA 的克隆及序列测定^①

李刚^② 姚集鲁 彭文伟 王斌^③ 吕凌

(中山医科大学传染病学教研室:广州, 510630)

摘要 从广东省 1 例慢性丙型肝炎病人血清中提取 HCV RNA, 随机引物逆转录为 cDNA 后用 HCV 5' 端非编码区 (5' NCR) 特异引物进行聚合酶链反应 (PCR) 扩增产物 302 bp, 经补齐和提纯后插入 pUC 19 质粒, 获得的重组质粒 pUN 采用双脱氧链终止法测定核苷酸序列, 与国内外多个株比较, 核苷酸同源性介乎 92.6% ~ 100%, 其中与 HCV II (1b) 型的同源性最大。本文的测序结果可为引物设计提供依据。获得的 HCV cDNA 在常规 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。

关键词 肝炎病毒组, 丙型; 克隆, 分子; 碱基序列

中图分类号 R 512.62; Q523.1

HCV 5' NCR 在整个基因组中是最保守的, 在设计用于诊断 HCV 感染的 PCR 引物时, 此区段是首选部位, 其检测敏感性优于其它区域。同时, 制备杂交探针和基因分型研究时亦常选择 5' NCR。由于 HCV 在血清中浓度极低, 应用 PCR 技术确立 HCV 感染成为重要手段, 在 PCR 步骤中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, 本文从广东省 1 例慢性丙型肝炎患者血清中获得 HCV 5' NCR 302 bp 的 cDNA 克隆, 并进行了序列测定及同源性分析。

1 材料与方 法

1.1 血清标本

来自广东省阳春县 43 岁男性患者, 临床诊断为慢性活动性丙型肝炎, 抗 HCV(+), 谷丙转氨酶 110 单位 (赖氏法), HBV 标记物阴性, 无输血史。

1.2 主要试剂

二氧化硅 (Sigma 公司), RNasin, AMV 逆转录酶, Taq DNA 聚合酶 (华美公司), 随机引物, pUC 19 低熔点琼脂糖 (BRL 公司), Klenow 酶, agarase, SmaI、EcoRI、PstI (BM 公司), T₄ DNA 连接酶, JM 109 菌株, pBR322/HinfI、λ DNA

/HindIII (Promega 公司), Sequencing kit (ABI)。

引物: 中国科学院上海细胞生物研究所合成, 序列及位置如下:

NC1 5' CCCTGTGAGGAACTACTGTCTT
3' - 299 至 - 278; NC2 5' CATGGTGCACGCTC
TACGAG 3' - 17 至 3; NC35' TTCACGCAGAAA
GCGTCTAG 3' - 279 至 - 260; NC4 5' AACACT
ACTCGCTAGCAGT 3' - 156 至 - 137 NC3
NC4 为内引物, 用于鉴定克隆。

1.3 PCR 产物的获取

采用微粒吸附法提取 HCV RNA^[1], 血清 100 μL 加入微粒吸附剂 15 μL, 裂解液 300 μL, 室温放置 1 h, 间中摇匀几次, 4 000 r/min 离心 30 s, 弃液相, 用 1 mL 70% 酒精洗 1 次, 弃酒精后在无菌台吹干。加入随机引物 300 ng, AMV 逆转录酶 10 U, 0.25 mmol/L dNTP 3 μL, RNasin 40 U, 10 × Buffer 3 μL, 逆转录反应体积 30 μL, 42℃ 1 h, 间中摇匀几次。离心后吸出液相作 PCR 模板, PCR 总反应体积 50 μL, 内含特异引物 NC1 NC2 各 100 ng, 0.25 mmol/L dNTP 5 μL, 5 × Buffer 10 μL, TaqDNA 聚合酶 2 U, 在 93℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min 循环 32 次, 最后在 72℃ 延伸反应 7 min (热循环仪为 Perkin Elmer 公司产品) 取

① 广东省科委基金部分资助项目; ② 第一作者, 1964 年出生, 男, 博士, 讲师; ③ 中山医科大学免疫学教研室

10^μL电泳,紫外灯下观察结果

1.4 PCR产物的分子克隆^[2]

PCR产物经 Klenow 酶补齐后在低熔点琼脂糖中电泳,切下相应条带处凝胶,加入琼脂酶 (agarase) 消化,无水乙醇沉淀,获得纯化的 PCR 产物。pUC 19 经 *Sma*I 内切酶消化成平端切口,饱和酚抽提后沉淀纯化。连接反应在总体积 20^μL 中进行,内含 pUC 19 PCR 产物、T₄DNA 连接酶 2 U,在 20[°]C 过夜连接。连接物转化 JM 109 钙化菌,然后均匀涂布于 LB 平皿 37[°]C 过夜培养。挑取白色菌落接种 LBA 液体培养基,37[°]C 振荡过夜增殖。碱裂解法提取质粒,获得的质粒用酶切法和 PCR 法鉴定。阳性克隆以 pUN 表示。

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经 Taq DNA 聚合酶 (测序级) 及荧光标记的通用引物进行测序反应,制备 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶,样品在 373 A DNA 全自动测序仪 (ABI) 上电泳测定核苷酸序列。所得序列与多个已知分离株及不同基因型代表株的相应序列进行同源性分析。

2 结果

2.1 重组体 pUN 的鉴定

HCV 5' NCR 302 bp 片段经补齐后以钝端方式

插入 pUC 19 多克隆位点的 *Sma*I 切点,重组质粒经 *Eco*RI 单酶切后与空载体 pUC19 比较,电泳时迁移较慢,*Eco*RI 及 *Pst*I 双酶切后电泳,见切出一条带,比插入片段 302 bp 稍大 (302 bp + *Eco*RI、*Pst*I 切点间的 40 bp)。另外,以重组质粒为模板,用外引物 NC1、NC2 和内引物 NC3、NC4 作 PCR 及巢式 PCR 扩增,获得 302 bp 和 203 bp 的产物,见图 1。



图 1 重组质粒 pUN 的鉴定

M₁ pBR 322/*Hinf*I; 1. pUN 经 NC3/NC4 扩增; 2. pUN 经 NC1/NC2 扩增; 3. pUN 经 *Eco*RI、*Pst*I 消化; 4. pUN 经 *Eco*RI 消化; 5. pUC19 经 *Eco*RI 消化; M₂ λ DNA/*Hind*III

2.2 HCV 广东株 (HCV-GD) 5' NCR 核苷酸序列及其与 HCV-HB^[3]、HCV-T^[4]、HCV-I^[5]、HCV-J^[6]、HCV-BK^[7]、HC-J^[8]、HC-J^[8] 等株的比较

见图 2,同源性分析情况见表 1。

表 1 HCV-GD 5' NCR 核苷酸序列与多个已知分离株的同源性分析 (%)

| 核苷酸 | HCV-HB | HCV-T | HCV-I | HCV-J | HCV-BK | HC-J ₆ | HC-J ₈ |
|--------|--------|-------|-------|-------|--------|-------------------|-------------------|
| HCV-GD | 100 | 100 | 99.62 | 99.62 | 100 | 94.62 | 92.69 |

3 讨论

HCV 5' NCR 含有内部核糖体结合位点及正向重复序列,对 HCV 的复制和翻译起重要的调节控制作用^[10]。5' NCR 在整个 HCV 基因组中是最保守的。我们对广东省 1 例慢性丙型肝炎病人血清中的 HCV 5' NCR 进行了序列测定,分析其同源性,发现此序列与河北株、台湾株及日本的 HCV-BK 株等 II 型的序列完全一致,与属于 IV 型的 HC-J₈ 亦有 92.69% 的同源性。

作者选择的病例无输血制品历史,以便能更好地反映本地区 HCV 株的序列情况。因为 5' NCR 的保守性,目前用于临床检测的 PCR 所设计的引物多来自 5' NCR,这样可使检出率达到最高。在设计 PCR 检测本地区病例时,选择合适的引物序列有利于提高敏感性和特异性。本文的测序结果可为引物设计提供依据。

由于 HCV 在血清中滴度极低,在人血液中的感染滴度约为 10⁵ CID₅₀/ml (黑猩猩半数感染量),而具有百万倍扩增的 PCR 技术在 HCV 的检测中成为确定感染的重要手段。HCV 为 RNA 病毒,RNA

在抽提过程中易被 RNA 酶破坏造成假阴性,或因试剂不稳定出现假阴性等,使 RT-PCR 技术的推广应用受到局限。大多数实验室在 PCR 检测 HCV 时无阳性对照,当出现阴性率太高或成批检测阴性时,无法解释结果,不能排除是否为假阴性。当用 cDNA 克隆作模板对照时,可判断错误环节是否在 PCR 阶段,这样就可确立和消除假阴性,同时对试剂的有效性作出评估。我们用 5' NCR 特异引物扩增构建的 cDNA 克隆时出现很好的 PCR 产物。证实我们克隆的 cDNA 完全可作为阳性对照模板。

(本文测序工作得到中国预防医学科学院病毒所基因工程国家重点实验室陈南海博士的帮助,特此致谢)

参 考 文 献

- 1 Yamada O, Matsumoto T, Nakashima M, *et al.* A new method for extracting DNA or RNA for polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 1990, 27: 203
- 2 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, *et al.* Molecular cloning, A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 3 毕胜利,白宪鹤,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
- 4 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
- 5 Choo QL, Richman KH, Han TH, *et al.* Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88: 2451
- 6 Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, *et al.* Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci*, 1990, 87: 9524
- 7 Takamizawa A, Mori C, Fukui T, *et al.* Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol*, 1991, 65(3): 1105
- 8 Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, *et al.* Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J Gen Virol*, 1991, 72: 2697
- 9 Okamoto H, Kurai K, Okada S, *et al.* Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology*, 1992, 188: 331
- 10 Tsukiyama Kohara K, Izuka N, Kohara M, *et al.* Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol*, 1992, 66(3): 1476

(1995-11-06收稿 1996-08-28修回)

MOLECULAR CLONING AND SEQUENCING OF HCV 5' NCR cDNA

Li Gang Yao Jilu Peng Wenwei Wang Bin Lu ling

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

HCV RNA derived from the serum of a patient with chronic hepatitis C was extracted before it was converted to cDNA by reverse transcription using random primers. Polymerase chain reaction (PCR) was performed with primers specific for HCV 5' NCR. Amplified product with 302 bp was subsequently filled in 3' recessed ends, isolated, purified and inserted into pUC19 plasmid vector. The recombinant plasmid pUN obtained was sequenced by dideoxy nucleotide chain termination method. A comparison of the nucleotide sequence of HCV 5' NCR with several previously reported strains showed the homology to be 92.69% ~ 100% and most identical to strains belong to genotype II. The sequence of the HCV 5' NCR determined in this report was useful for the selection of primers. The cDNA clone constructed can be used as effective positive control template for PCR, which will be helpful in eliminating false-negative results and evaluating the quality of reagents.

Subject headings hepatitis C viruses; cloning, molecular; base sequence