

· 实验研究 ·

HCV 5'-NCR 序列克隆和转录重组质粒构建^①

吕 凌^② 王 斌

(中山医科大学分子医学研究中心, 广州, 510089)

提 要 选取 IV 基因型 HCV 及中国和台湾代表株 HCV 的 5'-NCR 区保守序列合成引物, 以 RT-PCR 从输血后非甲非乙型肝炎病人血浆中扩增一段 300 bp 的 cDNA 片段作目的基因, 钝端插入 pUC19 的 *Sma* I 切点, 构建了 pUHCV-NC 重组质粒。对 pUHCV-NC 分别或混合应用 HCV 序列特异的内外引物和载体序列特异的通用引物进行 PCR 扩增, 所得产物分子量均同预期相符; 酶切分析查出 HCV 基因所带有和克隆位点融合所产生的两个外源 *Nco* I 切点也存在; 证实 pUHCV-NC 中克隆基因是 HCV 的 5'-NCR 序列且插入方向为反向。应用 *Bam*HI 和 *Eco*R I 双切出克隆 HCV 基因, 粘端插入 pSP72 的多克隆位点, 构建了 pSHCV-NC 转录重组体, 对之进行了 PCR 和酶切鉴定。

主题词 丙型肝炎病毒/微生物学; 基因克隆/方法; 聚合酶链反应/方法

中图分类号 R 512.62; Q 523.1

丙型肝炎病毒(HCV)是输血后非甲非乙型肝炎(PT-NANBH)的主要病原, 基因组为一长 9 600 nt 的正链 RNA, 含一个 ORF^[1]。ORF 两侧各有一段非编码序列(NCR), 其中 5'-NCR 高度保守, 内含核糖体结合位点^[2], 对 HCV 复制和翻译起调控作用, 是诊断 HCV 感染的 RT-PCR 引物的首选序列。本文将这一序列的 PCR 产物进行了克隆, 并构建了能转录的重组体, 试图作为 HCV-RNA 检测的基因标准。

1 材料与方 法

1.1 HCV 基因引物

参考 HCV-US、HCV-J、HCV-BK、HCV-台湾株、HCV-中国河北株、HCV-IV、HCV-V 等 7 株 HCV 的全基因组序列^[3~9], 以 DNASIS 7.21 版本软件进行比较, 取完全保守的 5'-NCR 区域设计引物, 然后用 ABI 391

型全自动寡核苷酸合成仪人工合成。在 HCV-J 基因记位上上游引物(NC1)为 32~51, 下游引物(NC2)为 331 R~312 R。

1.2 RNA 提取

取 1 例男性、45 岁的输血后非甲非乙型肝炎病人的新鲜血浆 500 μ l, 加 30 μ l SiO₂ (Sigma 公司产品)悬液、1ml 含胍裂解液^[10], 室温下间歇摇均 45 min, 待 SiO₂ 自然沉降后, 小心吸除上层液相后加乙醇悬浮洗涤, 10 000 g 离心 3 min, 吸除上清, 风干 10 min。

1.3 逆转录

向干燥之 SiO₂ 沉淀中直接加入 30 μ l 逆转录混合液, 43 $^{\circ}$ C 逆转录 1h。逆转录混合液含 AMV 逆转录酶、dNTPs、随机引物和相应的缓冲系统。

1.4 PCR 扩增

逆转录后离心, 取 10 μ l 上清加入 90 μ l PCR 反应液进行 PCR 扩增, 条件同一般 PCR 反应, 引物为 NC1 和 NC2。

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

1.5 PCR 产物以 pUC19 进行钝端克隆

PCR 完毕,加入 2U Klenow 酶,室温下反应 25 min,补平突出末端之后以低熔点琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物,琼脂酶消化后与 *Sma* I 酶切的 pUC19 载体混匀,加入 T4 DNA 连接酶进行连接。连接物转化钙化菌 *E. coli* JM109,在含 IPTG/X-gal 的 LBA 平板上筛选白色菌落,快速提取质粒 DNA 以限制性内切酶酶切和 PCR 鉴定插入序列。

1.6 克隆 HCV 基因以 pSP72 进行粘端克隆

以 *Bam*H I 和 *Eco*R I 切出 pUC19 上克隆的 HCV 基因作为靶序列,并同时以这两种酶酶切质粒 pSP72,两者均用低熔点琼脂糖凝胶电泳回收,回收产物加入 T4 DNA 连接酶进行连接。连接物转化 JM109 钙化菌,然后接种 LBA 平板,挑取单个菌落快速提取质粒 DNA 后以限制性内切酶酶切和 PCR 鉴定插入序列。

2 结果

在 HCV-J 基因记位上引物 NC1 为 32~51,NC2 为 331 R~312 R,将之用于 RT-PCR 扩增丙肝病人血清,得一长 300 bp 的 PCR 产物,分子量大小同预期相符。以此 300 bp 产物为模板,以基因记位分别为 50~69 和 252 R~233 R 的另一对内引物 NC3 和 NC4 作套式 PCR 扩增,得一长 202 bp 的产物,分子量大小也同预期相符。上述两步 PCR 试验扩增了目的基因,也鉴定了其 HCV 特异性。

将此 300 bp 的 PCR 产物与载体 pUC19 钝端连接,构建了重组质粒 pUHCV-NC。在空载体 pUC19 基因记位上,通用引物 Forward 为 359~375 nt 核苷酸,Reverse 为 481 R~465 R,两引物所跨 123 bp 含有 pU19 的多克隆位点。以此通用引物作 PCR 扩增 pUHCV-NC,产物大小 423 bp;同步扩增空载体 pUC19,产物大小 123 bp;两者比

较,前者增大 300 bp。以 NC1 和 NC2 为引物扩增 pUHCV-NC,产物大小 300 bp。以引物 NC1 和 Reverse 或 NC2 和 Forward 混合配对扩增 pUHCV-NC,产物分别为 384 bp 和 339 bp(图 1)。以引物 NC2 和 Reverse 或 NC1 和 Forward 混合配对扩增 pUHCV-NC,则未见扩增产物。pUC19 不含 *Nco* I 切点,pUHCV-NC 则预测有两个 *Nco* I 切点,一个位于克隆 HCV 基因中,另一个由克隆 HCV 基因末端与 pUC19 的酶切平端连接而成,两者间距 257 bp;以 *Nco* I 酶切 pUHCV-NC,结果得到一个 257 bp 的片段(图 2)。上述结果说明,300 bp 的 HCV 目的基因已克隆进载体 pUC19 的 *Sma* I 切点,插入方向为反向,即 NC1 靠近 *Eco*R I 切点,而 NC2 靠近 *Bam*H I 切点。

M 1 2 3 4 5 6 H



图 1 pUHCV-NC 的 PCR 鉴定

M: pBR322/*Msp* I, 片段由上至下的 bp 依次为: 622, 527, 404, 309, 242~217, 201~180, 160~123; H: pBR322/*Hinf* I, 片段由上至下的 bp 依次为: 1632, 517~506, 396, 344, 298, 221~220; 1 Forward/Reverse 扩增 pUC19; 2 Forward/Reverse 扩增 pUHCV-NC; 3 Forward/NC2 扩增 pUHCV-NC; 4 Reverse/NC1 扩增 pUHCV-NC; 5 NC3/NC4 扩增 pUHCV-NC; 6 NC1/NC2 扩增 pUHCV-NC

用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 切下 pUHCV-NC 中克隆的 HCV 基因,与同样以这两种酶酶切的载体 pSP72 进行粘端连接,构建了重组质粒 pSPHCV-NC。对 pSPHCV-NC 用引物 NC1 和 NC2 作 PCR 扩增,得产物大小为 300bp。以 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双切 pSPHCV-

NC, 切下克隆基因的大小也接近 300bp。单以 *Nco* I 酶切 pSPHCV-NC, 则也见一个 257bp 的片段。上述分析反映 pSPHCV-NC 中克隆的 HCV 目的基因已成功克隆至载体 pSP72 的多克隆位点中(图 3)。

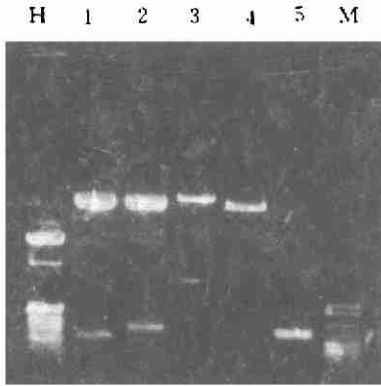


图 2 pUHCV-NC 的酶切鉴定

M pBR322/*Hinf* I; 1 NC1/NC2 扩增 pUHCV-NC; 2 pUHCV-NC 以 *Nco* I 酶切; 3 pUHCV-NC 以 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切; 4 线性化 pUHCV-NC; 5 线性化 pUC19; 6 NC1/NC2 扩增的 5'NCR 目的基因

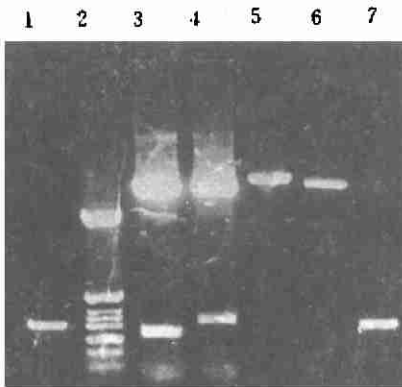


图 3 pSPHCV-NC 酶切鉴定

1 回收之克隆 HCV 基因; 2 pBP322/*Hinf* I; 3 pSPHCV-NC 以 *Eco* I 酶切; 4 pSPHCV-NC 以 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切; 5 线性化 pSPHCV-NC; 6 线性化 pSP72; 7 PCR 扩增 pSPHCV-NC 所得 300bp 产物

3 讨论

与其它病毒相比, HCV 有几个显著特点: ①基因序列已经阐明但病毒颗粒还未确

认; ②在现知的人类病毒中滴度最低为 $10^5 \sim 10^6$ CID/L (CID: chimpanzee infection dosage, 猩猩感染剂量), 只有 HBV 的百万分之一; ③基因极易发生变异, 但 5'NCR 区高度保守; ④有准种系特征, 可能没有固定的基因型; ⑤常为基因有差异的病毒群混合感染, 群中有优势株和非优势株, 后者不断转变为前者, 并产生新的变异病毒, 从而使临床表现与 HCV-RNA 检测呈周期性变化; ⑥人体产生的免疫反应既难以预防再感染也难以确立诊断。由于上述特点导致 HCV 检测的现状是: (1)血清免疫诊断不能检测抗原, 只有检测抗体; (2)RT-PCR 检测 HCV-RNA 是唯一确诊手段; (3)病人血内 HCV 滴度常波浪起伏, 因此其 PCR 动态结果就差别很大; (4)RNA 提取和逆转录经常使 RNA 降解。因此需用 HVC-cDNA, HCV-RNA 和阳性血清作分步质控以提供准确诊断, 其对照基因无法由野生病毒分离, 只能以克隆 DNA 和转录 RNA 取代。

推测 HCV 缺乏自身校读功能, 无法纠正复制产生的碱基错配, 这可能是其基因高变异的原因。包膜蛋白基因突变可能不影响病毒复制, 故突变可以遗传给后代病毒, 5'NCR 区含 HCV 复制所需的内源性核糖体进入位点和基因转录的顺式调控元件, 因此序列高度保守。事实上比较在全世界范围内收集的 80 多个 HCV 分离株的 5'NCR 序列, 结果发现有 3 个片段完全保持不变, 引物 NC2 即取其一。然而此区也有变异较多的序列, 设计 PCR 引物时应尽量避免, 引物 NC1 取位点已考虑到这一点。临床检测 HCV 的目的是诊断 HCV 感染, 实际上是判断病毒的复制力和评估其传染性, 只有复制无缺陷的病毒才能确立感染, 这其中 5'NCR 序列有决定作用, 因此是理论上 PCR 检测的第一靶序列, 世界各地的报道都发现, PCR 检测 5'NCR 区阳性率要明显高于检测其它序列^[10]。只是检测结果还需严格质控。为确保如此, 本文以 NC1 和 NC2 引物扩增了 5'

NCR 区几乎全部序列,并进行了分子克隆,试图由 pUHCV-NC 提供克隆 HCV cDNA 和 pSHCV-NC 转录人工 HCV RNA,结合应用丙型肝炎阳性血清来分步质控 RT-PCR 检测 HCV-RNA 过程中的核酸提取、RNA 转录和 DNA 扩增等步骤^[11]。

参 考 文 献

- 1 Houghton M, Weiner A, Han J, *et al.* Molecular biology of the hepatitis C viruses; implications for diagnosis, development and control of viral diseases. *Hepatology*, 1991, 14(2) : 381
- 2 Tsukiyama-Kohors K, Lizuka N, Kohara M, *et al.* Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol*, 1992, 66(3) : 1476
- 3 Choo QL, Richman KH, Han HJ, *et al.* Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88 : 2451
- 4 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 USA*, 1990, 87(24) : 9524
- 5 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
- 6 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(1) : 103
- 7 毕胜利, 白宪鹤, 刘崇柏, 等. 我国丙型肝炎病毒河北株基因组的克隆及 cDNA 全序列的测序与分析. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1992, 6(4) : 425
- 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(Pt11) : 2697
- 9 Okamoto H, Kurai K, Okada S, *et al.* Full-length sequence of a hepatitis C virus genome have poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology*, 1992, 188(1) : 331
- 10 Book R, Sol CJA, Salimans MMM, *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acid. *J Clin Microbiol*, 1990, 28(3) : 495
- 11 金冬雁. 丙型肝炎病毒分子生物学研究动态和发展趋向. 侯云德, 金冬雁主编: 现代分子病毒学选论. 北京: 科学出版社, 1994. 244~260

(1995-10-17 收稿 1996-05-16 修回)

MOLECULAR CLONING OF HCV 5'NCR SEQUENCE AND ITS TRANSCRIPTABLE PLASMID RECOMBINATION

Lu Ling Wang Bin

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

From published data of five genotypes and two China strains of HCV, the conservative sequences in 5'NCR were applied to synthesize a pair of primers. By RT-PCR, a cDNA fragment of 300 bp was amplified from plasma of a patient with post-transfusion non-A, non-B hepatitis. By blunt ligation, the fragment was inserted reversely into the *Sma* I site of the vector pUC19, and a recombinant plasmid pUHCV-NC was generated. For identification of the insert, a series of testing PCR has been performed using two nested primer pairs specific to HCV, a primer pair specific to pUC19, and 4 mixed primer pairs from the above. In each reaction, an anticipated product was yielded that proves the insert to be 5'NCR sequence with reverse direction. Result of restrictive site analysis also supports it in which two *exo*-pUC *Nco*I sites proved to be 257bp apart, one carried in target and another fused by ligation. The insert was then cut aside by *Bam*HI and *Eco*RI and cloned into the polyclonal sites of pSP72 to generate a recombinant pSHCV-NC which was also determined by PCR and restrictive site analysis as described.

Subject headings hepatitis C virus/microbiology; molecular cloning/methodology; polymerase chain reaction/methodology