

技术与方法

登革 2 型病毒 E 基因的克隆及
碱基序列测定*

于 曼 秦鄂德 杨佩英 孙 蕾 徐品芳 司炳银 闫国珍

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100850)

摘要 采用逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 技术扩增了我国登革 2 型病毒 E 基因, 大小为 1.29 kb. 将扩增的 E 基因片段首先克隆到 T 载体 (pBluescript II KS⁺) 中, 用 PCR 和限制性酶切分析鉴定出阳性重组子. 然后利用 M₁₃ 通用引物直接对插入的 E 基因片段进行序列分析. 结果表明, 经限制性内切酶鉴定和 DNA 序列分析证明所克隆的序列与已报道的 E 基因序列是一致的.

关键词 登革 2 型病毒, E 基因克隆, T 载体, 核苷酸序列测定

登革病毒可引起登革热和登革出血热, 它是一组单股正链 RNA 病毒, 在其基因组的读码框架中结构基因 E 编码病毒的包膜糖蛋白, 此种蛋白有多种具有重要生物功能的 B 细胞和 T 细胞抗原表位及生物学活性^[1], 并且在免疫保护性方面起重要作用, 因此在亚单位疫苗的研究中 E 基因引起人们的高度重视.

我们采用 RT-PCR 技术从我国登革热患者血清中分离的登革 2 型病毒株的 RNA 扩增了 E 基因片段. 为对该基因进行表达研究, 首先将扩增的 E 基因片段克隆到 T 载体中, 并对其 5' 端部分碱基序列进行分析, 现将结果报告如下.

1 材 料

1.1 登革 2 型病毒 43 株

1987 年从广西登革热患者血清中分离.

1.2 质粒、菌株和酶

T 载体 (pBluescript II KS⁺) 质粒、*E. Coli* XL-1 Blue 菌、由本所王海涛研究员惠赠; Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶为 Promega 公司和华美公司产品; T7 Sequencing

Kit、M₁₃ 通用引物, Pharmacia 产品; ³²P-dCTP, 福瑞公司产品.

2 方 法

2.1 登革 2 型病毒 43 株 E 基因的 PCR 扩增

运用 RT-PCR 技术, 采用选自标准 NGC 株 E 基因编码序列而设计的一对引物, 扩增了登革 2 型病毒 43 株 E 基因片段. 详细方法见文献 [2].

2.2 扩增片段与 T 载体的连接及转化

将纯化的 cDNA 片段连接到 EcoR V 酶切的 T 载体上 (片段与载体 DNA 之比为 3:1). 见图 1. 转化 *E. Coli* XL-1 Blue 受体菌, 经蓝/白斑筛选及 PCR 鉴定阳性克隆.

2.3 阳性克隆的限制性酶切鉴定

用碱裂解法快速提取阳性重组质粒 DNA, 然后用 EcoR I、Pst I 酶切进行鉴定^[3].

2.4 E 基因 5' 端部分序列的测定

纯化的 E-T 重组质粒 DNA 经 α -³²P-CTP 标记并用 M₁₃ 共同引物, 按照 Pharmacia T7

*国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1995-11-06, 修回日期: 1996-01-25

Sequencing Kit 的双脱氧链末端终止法测定 E 基因扩增片段 5' 端的部分核苷酸序列。

得满意的结果。我们采用的这种 T 载体是利用 TaqDNA 聚合酶具有不依赖模板的末端

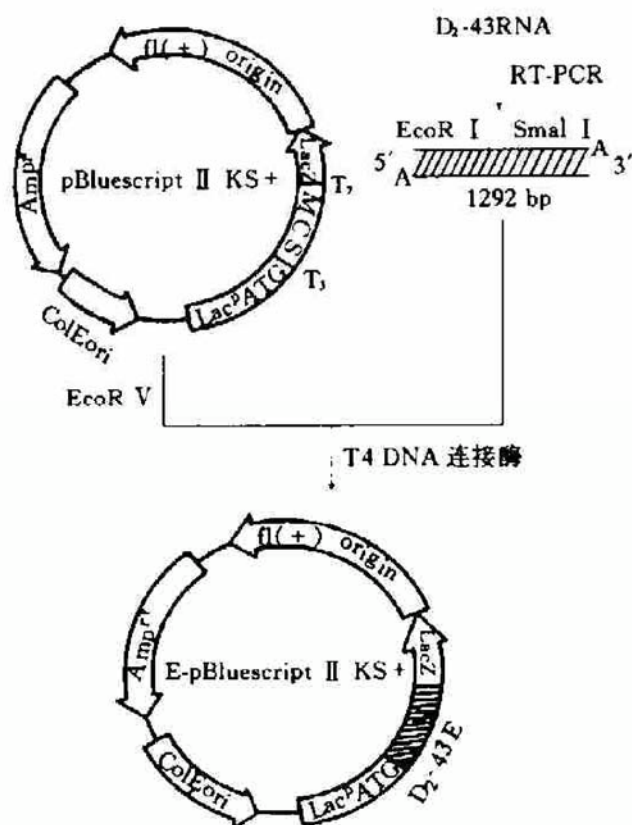


图 1 D₂-43E 基因重组质粒的构建

3 结果与讨论

我们采用 RT-PCR 法首先扩增了我国登革 2 型病毒株的 E 基因片段，长度为 1.29 kb (图 2 中 2)。将纯化的 E 基因片段与 T 载体连接，用蓝/白斑及 PCR 法筛选阳性克隆，实验表明阳性重组率达 90% 以上。又利用限制性内切酶消化对阳性重组子进一步酶切鉴定。从图 2 可以看出，阳性重组子无论是单酶切 (图 2 中 3、4) 及双酶切 (图 2 中 5~8) 分析所产生的 DNA 片段大小与预期的相一致。而且，双酶切所产生的 E 基因片段与用 RT-PCR 扩增的片段大小相同 (图 2 中 5~8)，进一步证明扩增的 E 基因已插入到 T 载体中。PCR 扩增产物无论是平端，还是末端带有限制性的内切酶位点，在进行克隆时，往往由于平端连接效果不佳或位于 DNA 片段两端位点的酶切效率不及位于内部的效率高，而不能获

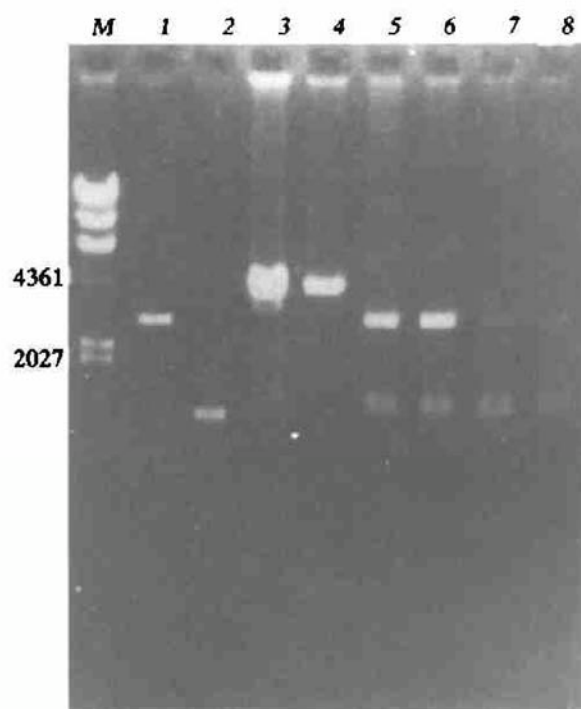


图 2 重组子 DNA 中插入的 E 基因片段的鉴定
1: T 载体 DNA 经 EcoRI 酶切; 2: E 基因的 RT-PCR 扩增片段; 3、4: E-T 载体重组质粒 Pst I 酶切; 5~8: E-T 载体重组质粒 EcoRI / Pst I 双酶切; M: 标准分子质量, λ DNA Hind III 酶切片段。

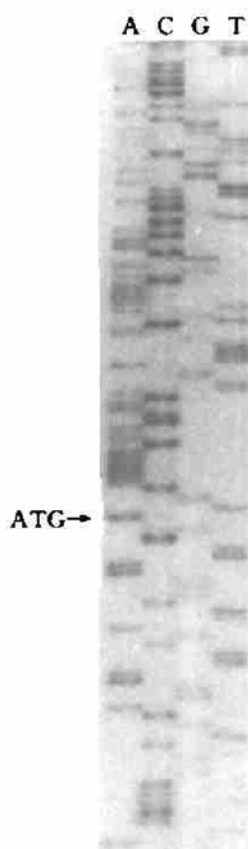


图 3 登革 2 型病毒 43 株 E 基因 PCR 扩增产物的测序凝胶图谱

转移酶活性而使扩增产物 3' 端带有腺苷酸残基 (A) 这一特点进行克隆^[4~6], 不但快速, 效率高, 而且由于在 T 载体的 EcoR V 位点下游具有 M₁₃ 序列, 因而也便于对插入片段进行序列分析. 图 3 是利用双脱氧链末端终止法和 M₁₃ 通用引物测定的重组 DNA 中 E 基因片段 5' 端碱基序列的部分凝胶电泳图谱. 可以看出 E 基因片段 5' 端的起始密码子 ATG. 图 4 为扩增的 E 基因片段 5' 端 120 个核苷酸序列, 与我们以前发表的 E 基因序列结果是一致的^[7].

101 ATG GCA AAA AAC AAA CCA ACA TTG GAT TTT
131 GAA CTG ATA AAA ACA GAAGCC AAA CAA CCT
161 GCC ACT CTA AGG AAG TAC TGT ATA GAG GCA
191 AAG CTG ACC AAC ACA ACA ACA GAA TCT CGT

图 4 D₂-43 病毒株 E 基因 PCR 扩增片段的 5' 端序列分析

上述结果证实, 我们扩增的片段确为 E 基因. 这为进一步对 E 基因进行表达研究和亚单位疫苗的研制奠定了基础. 目前我们正对该基因进行高效表达的研究.

参 考 文 献

- 1 Henchal E A, Putank J R. Clin Microbiol Rev, 1990; 3: 376
- 2 于 曼, 秦鄂德, 杨佩英等. 中华实验和临床病毒学杂志, 1995; 9 (2): 5
- 3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989: 34~35
- 4 Clark J M. Nucl Acids Res, 1988; 16: 9677
- 5 Moles S E, Iggo R D, Lane D P. Nucl Acids Res, 1989; 17: 3319
- 6 Marchuk D, Drumm M, Saulino A *et al.* Nucl Acids Res, 1990; 19 (5): 1154
- 7 司炳银, 杨佩英, 黄祥瑞等. 军事医学科学院院刊, 1992; 16 (4): 274

A Cloning and Partial Nucleotide Sequencing of the Amplified E gene Fragment of Dengue-2 Virus. Yu Man, Qin Ede, Yang Peiying, Sun Lei, Xu Pinfang, Si Bingyin, Yan Guozhen (*Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract The E gene fragment was amplified from RNA isolated the Chinese dengue-2 virus by RT-PCR method. It was 1.29 kb in length. This unmodified E fragment was directly inserted into the EcoRV-cut T-tailed pBluescript II KS⁺ vector DNA. The positive recombinant colonies were identified by the PCR and the restriction endonuclease digesting method. Then nucleotide sequence analysis of the inserted E gene fragment was conducted directly by using the common M₁₃ primer. The result of the restriction endonuclease and sequence analysis confirmed that the 120 bp of 5'-terminal nucleotides sequence of the amplified E gene fragment was the same sequence as reported.

Key words dengue-2 virus, E gene cloning, T-vector, nucleotide sequence analysis

人心肌肌钙蛋白 T 的纯化和单克隆抗体的制备

李志梁 傅朝平 陆 青 黎梅兰 钱学贤 王素华

(第一军医大学附属珠江医院, 广州 510280)

摘要 从人左室心肌中成功纯化心肌肌钙蛋白 T (cTnT). 经匀浆, 70℃ 加热处理, 咪唑盐酸透析,