

经验交流

甲肝病毒减毒株 (H₂) RNA 的全长 RT-PCR 扩增周翔¹⁾ 谭德勇²⁾ 赖建华 咎瑞光

(云南大学生物系, 昆明 650091)

摘要 通过 RT-PCR 技术扩增了甲肝病毒减毒株 (H₂) 全长 RNA, 并对长片段 RT-PCR 扩增进行了方法学上的探讨. 采用抗血清特异沉淀病毒; 盐酸胍-酸性酚、氯仿一步法分离纯化病毒 RNA, 可得到高质量的 RNA 样品; 以此 RNA 为模板, 在无 RNA 酶的逆转录酶作用下, 合成单链 cDNA; 继续以此 cDNA 为模板, 利用 32 mer 寡核苷酸引物, 在 Taq 和 Deep Vent DNA 多聚酶的作用下进行 PCR 扩增, 得到 7.4 kb 的扩增产物.

关键词 甲肝病毒, 全长 RNA, RT-PCR 扩增

学科分类号 R512.6, Q522, R977

常规 PCR 扩增 DNA 片段多局限于 3~4 kb. 最近已有报道扩增出 42 kb λ DNA 和 22 kb 人类 β 珠蛋白基因簇^[1]. 较长序列的 RT-PCR, 目前国内有报道可扩增 2.6 kb 的片段^[2], 国外报道可扩增达 9 kb 的片段^[3], 但该作者认为以 5 kb 片段扩增较为容易. 我们的体会是, 长片段 RT-PCR 扩增和短片段 RT-PCR 扩增在原理上是相同的, 但在实际操作中许多满足普通 PCR 扩增的条件并不能满足长片段 PCR 扩增. 按常规优化模板量, Mg^{2+} 浓度, Taq 酶量, 引物量等措施都无法获得大于 3 kb 的 PCR 产物. 所以在实际应用中, 长片段 DNA 的 PCR 扩增需要一套与短片段不同的扩增条件. 本文旨在对长片段 RT-PCR 扩增的特殊要求进行探讨.

1 材料和方法

1.1 材料

甲肝病毒减毒株 (H₂) 由中国医学科学院昆明医学生物研究所提供, 盐酸胍为 Sigma 公司产品, 逆转录酶和 DNA 聚合酶为 Boehringer Mannheim 公司产品, Oligo (dT) 由 Sybersen (USA) 公司合成, PCR 引物由 Sangon (Canada) 公司合成, PCR 仪为 Biorad 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 病毒 RNA 的提取: 取病毒悬液加兔抗 H₂ 血清后离心, 沉淀参照 Chomczynski 等^[4]一步法 (略有改动) 进行 RNA 提取.

1.2.2 逆转录反应: 按陈勇等^[5]的资料设计并合成引物 1: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTT-TTTAT-3'. 取前述制备的 RNA 5 μ l 置于 200 μ l 的 PCR 扩增专用小管中, 加入 100 pmol 的引物 1, 置于 65 $^{\circ}$ C 变性 10 min 后, 立即置于冰上, 加入 10 $\times$ 逆转录缓冲液 2 μ l, 1 mmol/L 4 $\times$ dNTP, 20U RNasin, 和 50U ExpandTM Reverse transcriptase, 加水至终体积 20 μ l. 混匀后 42 $^{\circ}$ C 温育 2 h.

1.2.3 PCR 扩增

a. 甲肝病毒全序列 PCR 扩增: 按陈勇等^[5]的资料设计并合成引物 2 和引物 3. 引物 2: 5'-TTCAAGAGGGGTCTCCGGGAATT-TCCGGAGTG-3' (1~32); 引物 3: 5'-ATT-TATTTACTAATAAAAGAAATAAACAAACC-3' (7451~7482). 取上述逆转录产物 5 μ l 置于 200 μ l 的 PCR 扩增专用小管内, 加入 10 $\times$

¹⁾ 昆明医学院生物教研室, 昆明 650031.

²⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1997-08-04, 修回日期: 1998-02-04

PCR 缓冲液, 350 μmol $4 \times \text{dNTP}$, 350 nmol 引物 2 和引物 3, 8U 含 Deep Vent 的 Taq DNA 聚合酶, 混匀后置 PCR 仪进行扩增, 循环参数: 96 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 1 个循环, 93 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 69 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 10 个循环; 93 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 69 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 min (每次增加 20 s), 30 个循环. 反应产物取 2 μl 于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测.

b. 检测 PCR 扩增: 按陈勇等^[5]的资料设计并合成引物 4~9. 引物 4: 5'-TTCAA-GAAGGGTCTCCGGAATTTTC-3' (1~25); 引物 5: 5'-CCAAAGAACAGTCCAGCTGTT-AATG-3' (642~666); 引物 6: 5'-CCTA-GATCAGAGGAAGATAAAAGA-3' (3078~3101); 引物 7: 5'-ATCTCTTAACAGT-TGGAAAACTC-3' (3995~4019); 引物 8: 5'-TGATGCTAGTCTTAGTCCATTTATG-3' (6691~6715); 引物 9: 5'-CATTAACAAAT-CATGAAAGGTCAC-3' (7398~7422). 上述 PCR 产物按 1:10 稀释后取 2 μl 分别置于三个 PCR 专用小管内, 加入 2.5 μl 10 $\times$ PCR 缓冲液, 250 $\mu\text{mol/L}$ $4 \times \text{dNTP}$, 350 nmol/L 引物 4 与 5, 引物 6 与 7 和引物 8 与 9, 2U Taq DNA 聚合酶, 加水至 25 μl , 混匀后置 PCR 仪进行扩增, 循环参数: 96 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 1 个循环; 93 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 30 个循环, 1 $\times$ 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min 1 个循环, 反应产物各取 2 μl 进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测.

2 结果和讨论

2.1 病毒 RNA 的提取

选用抗 H₂ 血清特异性与病毒结合, 抗原抗体复合物经 10 000 r/min 离心 25 min, 所得沉淀用一步法提取 RNA, 得到的 RNA 大部分为病毒 RNA, 经 1.4% 琼脂糖凝胶电泳分析, 该 RNA 大小在 7~8 kb 范围, 与文献报道一致, 并能被 RNA 酶消化 (图 1). 该方法减少了细胞 RNA 的污染, 同时减少了 RNA 酶降解的机会, 保证了所提 RNA 的特异性和完整性.



图 1 甲肝病毒 RNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

1: 病毒 RNA 经 RNase 消化, 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h; 2: 病毒 RNA; 3: 对照细胞 RNA.

2.2 甲肝病毒全序列 RT-PCR 扩增

使用引物 1, 在无 RNaseH 活性的逆转录酶作用下, 合成 cDNA, 并以单链 cDNA 为模板, 32mer 寡核苷酸为引物, 在含 Deep Vent 的 TaqDNA 聚合酶的作用下, 扩增得到 7.4 kb 的产物, 电泳迁移率与预期相符 (图 2).

用甲肝病毒 3' 端, 5' 端和中间序列设计的引物对全序列 RT-PCR 扩增产物再进行扩增, 结果见图 3, 其片段大小分别为 666 bp, 939 bp 和 731 bp, 与靶序列一致.

2.3 长序列 RT-PCR 扩增应注意的几个问题

影响 PCR 扩增效果的因数很多, 但在长序列 PCR 扩增中, 除了通常应注意的问题外, 以下几点应特别注意:

2.3.1 模板: cDNA 模板量对长序列 PCR 扩增效果的影响见图 3, 2 ng 模板量并不能得到满意的效果 (图 3 第 3 道), 直到模板量达到 100 ng 以上时, 才得到了 7.4 kb 的 PCR 产物 (图 3 第 2 泳道). 常规 PCR 模板量只需 0.5~2 ng^[6], 上述结果表明大片段 PCR 扩增所需模板量比常规 PCR 扩增模板量要高. 长序列 RT-PCR 扩增中一个重要又易被忽略的细节是逆转录产物应及时用于 PCR 扩增, 当逆转录产物必需储存时, 应置于 4 $^{\circ}\text{C}$, 冻结可导致扩增失败 (图 3 第 4 泳道).

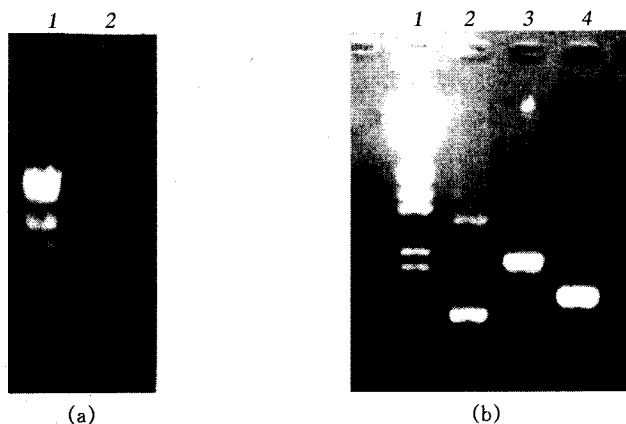


图2 病毒 RNA RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱

(a) HAV (H₂) 株全序列 RT-PCR 扩增产物检测. 1: λDNA/HindⅢ; 2: 全序列扩增产物 (7.4 kb). (b) 全序列扩增产物的 PCR 检测. 1: λDNA/HindⅢ + EcoRI; 2: 引物 4 与 5 扩增产物; 3: 引物 6 与 7 扩增产物; 4: 引物 8 与 9 扩增产物.

2.3.2 酶: 采用无 RNAase H 的逆转录酶和含 Deep Vent 聚合酶的 Taq DNA 聚合酶对的扩增长片段都是必要的. 如图 3 所示, 用普通逆转录酶或普通 Taq 酶均无扩增产物 (图 3 第 5, 6 泳道).

2.3.3 引物长度: 采用通常的 PCR 扩增所用 18~24 mer 引物得不到长片段 PCR 产物, 图 3 第 7 泳道为 25 mer 的引物扩增 H₂ cDNA 全长的结果, 未能得到特异性扩增产物, 将引物长度增加到 32 mer, 同时, 调整退火温度至 69℃ 时, 得到了 7.4 kb 的扩增产物.

2.3.4 循环参数: 在 PCR 循环中变性和延伸时间的选择是长片段 PCR 扩增成功的因素之一, 应尽量缩短变性时间, 以防模板受损, 同时适当延长延伸时间, 以获得大片段产物. 在我们的试验中, 94℃ 变性 5 min 时没有特异性扩增产物 (结果未显示), 缩短至 2 min 才扩增成功; 延伸时间低于 15 min 也不能获得扩增产物 (图 3, 泳道 3).

通过对上述条件的优化, 得出扩增 7.4 kb 序列的最优条件为: 采用无 RNase H 活性的逆转录酶合成 cDNA, 该 cDNA 做为模板的用量为 100 ng, 使用 33 mer 引物, 在 Taq 和 Deep Vent 的作用下进行合成, 延伸时间大于 15 min.

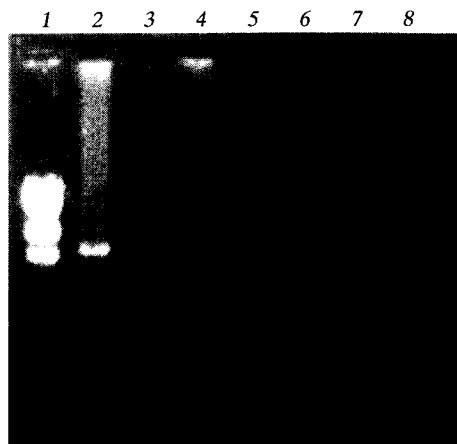


图3 不同扩增条件对长序列 PCR 扩增效果的影响

1: λDNA/HindⅢ; 2: 最优条件下 RT-PCR 扩增产物; 3: 2 ng 模板量扩增产物; 4: 模板经冻结后扩增产物; 5: 普通逆转录酶 RT-PCR 扩增产物; 6: 普通 Taq 酶 PCR 扩增产物; 7: 25 mer 引物 PCR 扩增产物; 8: 延伸时间 10 min 的扩增产物. 图中除指明的条件外, 其他条件均与最优条件一致.

参 考 文 献

- 1 Cheng S *et al.* Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, (91): 5695~5699
- 2 周天鸿 (Zhou T H). LDL 受体基因 cDNA 的 RT-PCR 分离. 克隆及其在 RFLP 中的应用. *生物化学杂志 (Chinese Biochemistry Journal)*, 1996, 12 (5): 535~539

- 3 Fang G, Weiser B, Visosky A A. Molecular cloning of full-length HIV-1 genomes directly from plasma viral RNA. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1996, **12** (4): 352~357
- 4 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987, (162): 156~159
- 5 陈勇, 柴少爱, 洪艳等 (Chen Y, Chai S A, Hong Y *et al*). 甲肝病毒减毒活疫苗 (H₂ 株) 的 cDNA 克隆及序列分析. *浙江省医学科学院报 (Acta Academiae Medicinae Zhejiang)*, 1995, (21): 3~4
- 6 林万明 (Lin W M). PCR 技术操作和应用指南. 北京: 人民军医出版社, 1995. 7~8

The RT-PCR Amplification of Full Length RNA of Hepatitis A Virus H₂ Strain. ZHOU Xiang, TAN De-yong, LAI Jian-hua, ZAN Rui-guang (*Department of Biology, Yunnan University, Kunming 650091, China*).

Abstract A method for RT-PCR amplifying long fragments cDNA was established and the

7.4 kb full-length cDNA of Hepatitis A virus (HAV) H₂ strain was amplified by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). HAV H₂ was precipitated by anti-H₂ serum specifically, then the RNA of HAV H₂ was isolated from this precipitation by acid guanidinium hydrochloride-phenol-chloroform extraction. The first-strand of HAV H₂ cDNA was synthesised by reverse transcriptase without RNase H activity, then was amplified by PCR using the 32mer primer and the Taq DNA polymerase with Deep Vent DNA polymerase. For obtaining longer PCR products, it is necessary to prepare high quality RNA and employ the longer primers and special Taq DNA polymerase.

Key words hepatitis A virus H₂ strain, full length RNA, RT-PCR amplification

(上接第 468 页, Continued from page 468)

- 5 李桐柱, 匡廷云 (Li T Z, Kuang T Y). 一种聚球藻属蓝藻类囊体膜上的光系统 II 叶绿素蛋白复合体. *海洋与湖沼 (Oceanology and Limnology Sinica)*, 1988, **19** (3): 232~237
- 6 Shapiro A L, Vinuela E, Maizel J V. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Comm*, 1967, **28** (5): 815~820
- 7 李桐柱, 匡廷云 (Li T Z, Kuang T Y). 从超声波破碎的蓝藻类囊体膜中分离的叶绿素蛋白复合体. *植物学报 (Acta Botany Sinica)*, 1989, **31** (1): 29~35
- 8 Vrba J M, Curtis S E. Characterization of a four-member psbA gene family from the cyanobacterium *Anabaena PCC7120*. *Plant Mol Biol*, 1989, **14** (1): 81~92

Studies on Separation about Chl-Protein Complexes of Blue-green Algae. LI Tong-zhu (*Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China*).

Abstract When the thylakoid membranes of blue-green algae broken over a longer time than usual by sonication were solubilized with low concentration of LDS and subjected to discontinuous SDS-PAGE improved at 4 °C, 15 containing chl bands for the first time was resolved. CPa1-CPa6 of them had similar absorption spectra. The fluorescence spectra of CPas at 77 K were very similar too, all having a emission peaks at 685 nm. It is concluded that 6 CPas were chl α -protein complexes of PS II. The resolved capability to PS II of the new system were 3 times of the popular ones.

Key words gel electrophoresis, chl protein complexes, resolution, absorption spectra, fluorescence spectra