

两个周期的点子相匹配. 当 T 较小时也能融合, 但容易造成假匹配; 当 T 太大时, 两眼可能无法融合.

b. 本文所做的立体图均采用随机点作纹理, 也可采用其他的纹理作背景, 包括有规则的纹理, 利用本文所述的作图方法不会产生单眼线索.

c. 通过实验可知, 周期性随机点立体图与一般的立体图相对比, 用立体镜观察后者容易达到双眼融合. 原因是通过立体镜观察时, 眼睛可以盯着不动, 人们可以移动两幅图的相互距离达到双眼融合. 而周期性随机点立体图是靠眼睛的自身调节使之融合, 这对无经验的观察者要花一些时间, 但因其周期在双眼的融合范围之内, 所以通过眼睛的调节是可以达到融合的.

致谢 本研究工作得到郑竺英研究员的支持和帮助, 谨致衷心感谢.

参 考 文 献

1 Julesz B. Binocular depth perception of computer-generated

patterns. Bell Syst Tech J, 1960, XXXIX (5): 1133~1137
2 [日] 应用物理学会光学讨论会编. 杨雄里译. 生理光学 (眼的光学与视觉). 北京: 科学出版社, 1980, 257~260
3 Tyler C W, Chang J-J. Visual echoes: the perception in quasi-random patterns. Vision Res, 1977, 17: 109~116

The Principle and Method of Periodical Random-Dot Stereogram. ZHANG Jingzhi, JIN Guichang, ZHOU Guirong (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

Abstract The Principle and method of a new kind of stereogram, Periodical random-dot stereogram (PRDS) was described. An example of a circle of PRDS and flowchart were given. The effect of the value of Period on depth perception was discussed.

Key words Periodical random-dot stereogram, fusion, stereoscopic match, visual disparity

登革热病毒基因组末端 cDNA 的克隆及序列分析*

王升启 马立人 杨佩英¹⁾ 朱宝珍

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 采用磁性分离技术从登革热病毒 (D2-04 株) 感染的 C6/36 细胞中分离了 D2-04 病毒 RNA. 以该 RNA 为模板进行 RT-PCR, 分别扩增了 D2-04 RNA 5' 和 3' 端 cDNA 片段, 该 cDNA 片段分别克隆到 pGEM-3Z 质粒多聚接头的 Hinc II 位点得到含有 5' 端 284 bp 及 3' 端 525 bp cDNA 的重组质粒. 通过荧光标记引物及双脱氧核苷酸 PCR 方法测定了上述 cDNA 插入片段的序列. 同源性比较结果证明 D2-04 株与其他不同株间的同源性较高, 可达 93%~98%; 不同型间的同源性较差, 仅 80% 左右; 属间的同源性更低.

* 总后卫生部“八·五”招标重点课题 (9205013). ¹⁾ 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100850.
收稿日期: 1996-04-16, 修回日期: 1996-08-15

关键词 登革热病毒, D2-04 株, 磁性分离

登革热是登革热病毒引起的一种热带及亚热带地区主要传染病之一, 它通过埃及伊蚊及白蚊伊蚊传播. 登革热病毒属黄病毒科, 这类病毒基因组长约 11 kb, 属正链 RNA, 中间有一长的 ORF, 5' 及 3' 各有一不同长度的非编码区^[1]. 目前尚无预防登革热病毒的有效疫苗, 这主要是因为该病毒血清型较多, 且蛋白质免疫原性较差, 因此有必要发展特异性抗病毒药物.

反义寡核苷酸^[2]能与特定病毒基因互补, 抑制该基因的复制、转录或翻译, 从而达到抑制或杀灭病毒的目的. 这类药物是根据核酸杂交原理设计的, 因此具有高度的选择性. 正是由于这一特点, 在设计反义寡核苷酸时需对其作用靶基因的关键序列有一定认识以增加针对性. 通常这些关键性序列位于该基因的 5' 或 3' 非编码区及相邻部分编码区, 对基因的复制, 转录或翻译, 甚至剪接加工等均起着主要的调控作用. 因此, 分析这些区域的结构和功能对反义核酸的设计及作用机制的研究具有主要意义.

目前国外已经全部测定的登革热 2 型病毒 RNA 核酸序列有三个病毒株^[1,3,4], 国内毒株的部分编码区序列也有报道^[5], 但非编码区尚未测定, 为设计和制备登革热病毒特异性反义

寡核苷酸, 研究其抗登革热病毒作用, 我们测定了国内病毒株 (D2-04) 的 5' 及 3' 核酸序列并比较了 D2-04 株与其他株及型间的同源性.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株: 登革热 2 型 04 株 (D2-04) 为 1985 年从海南登革热流行高峰期病人血清中分离^[5].

1.1.2 试剂: 除特殊说明外均为美国 Promega 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 病毒 RNA 的分离: 按磁性分离技术进行^[6].

1.2.2 引物设计与合成: 根据文献 [1, 3, 4] 发表的登革热 2 型病毒 RNA 序列设计两对分别扩增 D2-04 RNA 5' 和 3' 末端非编码区及相邻部分编码区序列的引物和探针 (表 1). P1 和 P2 扩增 5' 和 3' 末端非编码区和大部分 C 蛋白基因序列, 限制扩增长度 284 bp. PA 为 5' 端非编码区寡核苷酸探针. P3 和 P4 扩增 3' 端非编码区和少部分 NS5 蛋白基因序列, 限制扩增长度 525 bp, PB 为合成 3' 端非编码区寡核苷酸探针.

表 1 D2-04 基因组 RNA 5' 及 3' 端 RT-PCR 引物和探针

引物/探针	区域	位置	序列 (5' → 3')	扩增长度
P1	5'-NC	1~ 20	AGTTGTTAGTCTACGTGGSCCGAC	284 bp
P2	C	260~ 284	GCGGTTGGTGCGGATTGTTAGGAAA	
PA	5'-NC+ C	82~ 111	TCGTTGCTTATTTCATCAGAFATATGCTCTC	
P3	NS ₅	10199~ 10224	AGGAATACACAGACTACATGCCATCC	525 bp
P4	3'-NC	10700~ 10723	AGAACCTGTTGATTCAACAGCACC	
PB	3'-NC	10509~ 10534	GCTGCGATTGTGAAGGGAGGGGTVTC	

引物合成在 DNA 合成仪 (ABI, 381A) 上用标准的 β -氰乙基亚磷酸酯法合成, 浓氨水

55℃脱保护 12 h, 真空离心浓缩后, 直接用高效薄层色谱法纯化^[7], 薄层扫描定量^[8], 分装

后- 20 ℃储存.

1.2.3 RT-PCR 扩增: 反转录用反转录试剂盒及推荐的操作程序进行. 反转录后的 cDNA 按文献 [9] 条件进行 PCR 反应. PCR 产物电泳, DNA 印迹及酶切分析按文献 [10] 方法进行.

1.2.4 克隆: RT-PCR 扩增 cDNA 片段经低熔点琼脂糖纯化后用 Klenow 酶补平并用 T4 激酶磷酸化, 然后插入 pGEM-3Z 的 Hinc II 位点, 转化大肠杆菌感受态 (RR1). 生长后的平板直接挑取转化子, 按 PCR 方法^[11] 进行筛选. PCR 筛选出的阳性转化子扩增培养, 碱变性法提取质粒 DNA.

1.2.5 序列分析: 采用荧光-引物 (Dye primer, ABI) 和荧光-双脱氧核苷 (Dye deoxyterminator) 测序试剂盒及推荐的操作步骤在 PCR 仪 (Thermocycler, PE) 上进行延伸/终止反应. 电泳及数据处理在自动序列分析仪上完成 (ABI, 373A), 同源性比较在 VAX-11-780 计算机上用 IDEAS 软件处理.

2 结 果

2.1 RT-PCR 产物的特异性

分别合成了 5' 和 3' 非编码区保守区寡核

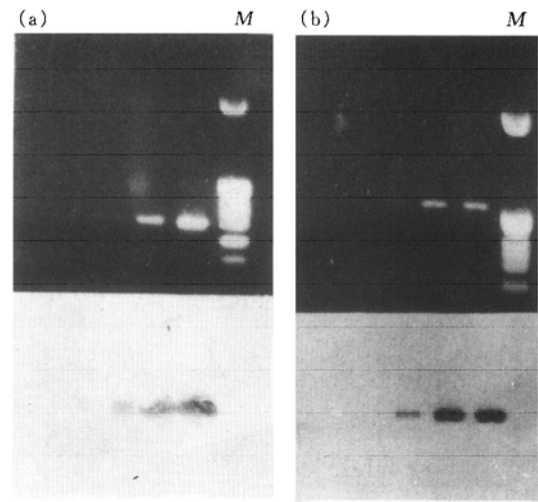


图 1 D2-04 RNA RT-PCR 产物 DNA 分析
(a) 5' 端 (探针: PA); (b) 3' 端 (探针: PB).
M: pBR322/hinf I .

苷酸探针并在其 5' 端标记一分子长臂生物素. 不同稀释度 PCR 产物电泳后进行 DNA 印迹, 分析结果显示 5' 和 3' 端 PCR 产物与其相应的探针杂交, 均呈阳性 (图 1).

平均序列计算机酶切位点分析显示登革热病毒 RNA 5' 端非编码区有一 Bgl II 酶切位点, 相邻的部分 C 蛋白基因编码区有一 Sal I 切点, 3' 端有一 Apa I 切点. 扩增 PCR 产物酶切后电泳分析证实了 3' 端 Apa I 和 5' 端 Bgl II, Sal I 切点的存在 (图 2), 进一步说明扩增片段是正确的. 但 5' 端 Pst I 酶切未获得阳性结果, 提示在 D2-04 病毒 RNA 中该切点发生了突变, 以后的序列分析数据也证明了这一结果.

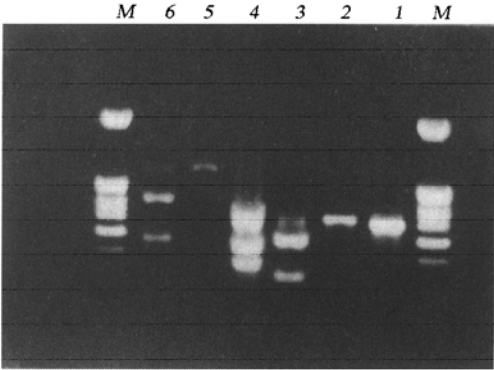


图 2 D2-04 RNA RT-PCR 产物酶切分析
1: 5'-PCR 产物酶切前; 2: 5' / Pst; 3: 5' / Bgl II (88 bp+ 196 bp); 4: 5' / Sal I (169 bp + 115 bp); 5: 3'-PCR 产物酶切前; 6: 3' / Apa I (345 bp+ 180 bp) .

2.2 5' 和 3' 端 cDNA 克隆的鉴定

采用 PCR 方法直接从平板生长的菌落中筛选出了 5' 和 3' 末端 cDNA 阳性转化子并鉴定了其插入方向均为正向插入在 pGEM-3Z T7 启动子下游, 质粒酶切分析与 PCR 结果一致 (图略).

2.3 5' 和 3' 端序列

考虑到登革热病毒 (DFV) RNA 末端非编码区具有广泛的二级结构^[12], 因此选用耐高温的 Taq 酶进行延伸反应. 为减少 Taq 酶的错误掺入, 我们采用了在高温下退火及延伸

的双温 PCR 循环方式并将循环次数控制在 25~ 30个以内. 分析结果见图 3.

AGTTGTTAGT CTACGTGGAC CGACAAAGAC AGATTCTTTG AGGGAGCTAA GCTCAACGTG
GTTCTAACAG TTTTAAATT AGAGAGCAGA TCTCTGATGA ATAACCAACG GAAAAAGCGC
AGAAGTACGC CTTTCAATAT GCTGAAACGC GAGAAAAACC GCGTCTCGAC TGTCCAACAG
CTGACAAAGA GATTCTCACT TGAATGCTG CAAGGACAAG GACCGTAAA ACTGTTCATG
GCCCTTGTGG CGTTCCTTCG TTTCTAACA ATCCCACCAA CCGC

(5'端)

AGGAATACAC AGACTACTTG CCATCCATGA AGAGATTXAG AAGGGAAGAG GAAGAGGCAG
GTTTCCTGTG G TAGAAGGTA AAACAAACAT GAAACAAGGC TAAAGTCAG GTCGGATTAA
GCCATAGTAC GGAAAAAACT ATGCTACCTG TGAGCCCCGC CCGAGGACGT TAAAGAAGT
CAGGCCATTA CAAATGCCAC AGCTCGAGCA AACTGTGCAG CCTGTAGCTC CACCTGAGAA
GGTGTAAGAAA ATCTGGGAGG CCACAAACCA TGGAAGCTGT ACGCATGGCG TAGGGGACTA
GCGGTTAGAG GAGACCCCTC CCTTACAAAT CGCAGCAACA ACGGGGGCCC AAGGTGAGAT
GAAGCTGTAG TCTCACTGGA AGGACTAGAG GTTAGATTAG ACCCCCCCAA AACAAAAAAC
AGCATTTTGA CGCTGGGAAA GACCAGAGAT CCTGCTGTCT CCTCAGCATC ATTCCAGGCA
CAGAACGCCA GAAATGGAA TGCTCCTGTT GAATCAACAG GTTCT

(3'端)

图 3 D2-04 5' 和 3' 非编码区及相邻部分编码区序列

下划线: 非编码区; 黑体: 重复序列.

2. 4 一级结构同源性比较

采用 IDEAS 软件分别比较了 D2-04 株病毒 5' 及 3' 端核酸序列与其他不同株 (JAM, NGC, S1) 及不同型 (DEN-3, DEN-DEN-4) 登革热病毒核酸序列的同源性 (表 2).

表 2 D2-04 株与其他 DFV 株核酸序列同源性分析

毒株	5' 端 (284 bp) 同源性/ %	3' 端 (525 bp) 同源性/ %
JAM	98. 2	97. 7
NGC	97. 4	96. 6
S1	93. 2	95. 0
DEN-3	79. 8	无报道
DEN-4	80. 2	81. 8

结果表明 D2-04 株与同型不同株之间核酸同源性较高, 5' 端与 JAM 株、NGC 株及 S1 株的同源性依次为 98. 2%、97. 4% 和 93. 2%; 3' 端与 JAM 株、NGC 株及 S1 株的同源性依次为 97. 7%、96. 6% 和 95. 0%. D2-04 与不同

型之间的同源性则较低, 5' 端与 DEN-3 和 DEN-4 的同源性分别为 79. 8% 和 80. 2%; 3' 端与 DEN-4 的同源性为 81. 8%. 上述分析结果提示在设计反义核酸时, 为增加其广谱性应充分考虑不同株及型间的同源序列.

此外, 二级结构分析表明 D2-04 RNA 5' 及 3' 端非编码区存在类似于其他黄病毒科基因组典型的茎-环状二级结构, 而且该二级结构编码区对该二级结构影响较小, 因为在计算机处理时无论考虑编码区序列与否在同一区域均给出类似的结果 (图略). 推测这种二级结构可能参与病毒 RNA 的翻译及复制等调控环节. 在进行计算机分析时假设 5' 及 3' 端 24 个碱基的序列与其他 Derr 2 病毒一致. 分析还发现 3' 端非编码区存在 20nt 的重复序列 (图 4 中黑体部分), 该序列在黄病毒科高度保守, 可能与病毒 RNA 复制有关.

3 讨 论

已发表的 DEN-2 RNA 序列一般采用

RNA 反转录或将其 cDNA 克隆后用 T7 测序。我们用反转录测定 D2-04 RNA 非编码区序列未能获得理想的结果, 这可能是其二级结构的原因。PCR 测序因在高温下进行, 可克服二级结构的影响, 因此应用越来越普遍。为减少 PCR 合成 cDNA 时测序 Taq 酶的错误掺入^[13], 本文采用了在高温下退火及延伸的双温 PCR 循环方式并将循环次数控制在 25 个以内。在序列分析时也采用了减少退火时间的手段, 获得了理想的分析结果。

病毒 RNA 和复制蛋白的相互作用受 RNA 信号序列的调控。黄病毒科是唯一不具 3' 端多聚 A 尾的正链 RNA 动物病毒, 取而代之一稳定的茎-环状二级结构。许多正链 RNA 植物病毒和 RNA 噬菌体也具备类似的 3' 端二级结构。黄病毒 3' 端序列比较显示尽管其一级结构的基部不同但它们的大小及形状高度保守, 提示这些茎-环结构可能是 RNA 多聚酶识别, 结合及复制的启动信号。D2-04 RNA 非编码区序列与其他株, 型及属的黄病毒有类似的茎-环状二级结构。这些分析结果提示在设计反义核酸时首先考虑其 5' 及 3' 非编码区的序列, 另外这些序列的二级结构的形状分析也可提供进一步的细节, 如可用反义寡核苷酸封闭其茎-环结构的单链环部及一些重复序列等, 这些位点可能是复制及翻译的调节关键, 因此也是反义核酸作用的关键靶点。

参 考 文 献

1 Hanh Y S, Galler R, Hunapiller T *et al.* Nucleotide sequence of dengue 2 RNA and comparison of the encoded proteins with those of other flaviviruses, *Virology*, 1988, **162**: 167~ 180

2 王升启, 马立人. 反义核酸技术及其应用——反义寡核苷酸. 军事医学科学院院刊, 1991, **15** (3): 191~ 196

3 Deuble V, Kinney R M, Trent D W. Nucleotide sequence and deduced aminoacid sequence of the nonstructural proteins of dengue type 2 virus, Jamaica genotype: comparative analysis of the full-length genome. *Virology*, 1988, **165**: 234~ 244

4 Irie K, Mohan P M, Sasaguri Y *et al.* Sequence analysis of cloned denguevirus type 2 genome (New guinear C strain).

Gene, 1988, **75**: 197~ 203

5 杨佩英, Lam S K. 我国登革 2 型病毒 04 株包膜蛋白基因的核苷酸及其相应的氨基酸序列. 军事医学科学院院刊, 1991, **15** (3): 182~ 185

6 王升启, 马立人. 感染细胞中病毒 RNA 的磁性分离. 军事医学科学院院刊, 1991, **15** (4): 294

7 王升启, 马立人. 高效薄层色谱法纯化合成寡核苷酸及其衍生物. 生物化学与生物物理进展, 1993, **20** (3): 234~ 237

8 王升启, 马立人. 薄层扫描法测定寡核苷酸含量. 生物化学与生物物理进展, 1993, **20** (2): 130~ 132

9 王升启, 马立人. 用磁性分离 RNA 直接进行反转录 PCR. 生物化学与生物物理进展, 1992, **19** (3): 204~ 206

10 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. 194~ 195

11 Mcpherson M J, Quirke P, Taylor G R. *PCR*. New York: Oxford University Press, 1991. 210~ 214

12 Brinton M A, Dispoto J H. Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. *Virology*, 1988, **162**: 290~ 299

13 Mcpherson M J, Quirke P, Taylor G R. *PCR*. New York: Oxford University Press, 1991. 229~ 230

Sequence Analysis of the Terminal Region of Dengue Fever Virus Genome RNA. WANG Shengqi, MA Liren, YANG Peiying¹⁾, ZHU Baozhen (*Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China;* ¹⁾*Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100850, China*).

Abstract D2-04 RNA was isolated magnetically from cultured C6/36 cells. With this RNA as template, the cDNA both 5' and 3'-termini were amplified by RT-PCR respectively. After inserted into pGEM-3Z plasmid, the cDNAs were sequenced by dye-primer and dye terminator PCR sequencing strategy, and the primary and stable secondary RNA structure were analyzed by computer software on VAX-11-780 computer.

Key words dengue fever virus, D2-04 strain, magnetic isolation