

## 登革 2 型病毒 NGC 株基因组亚克隆的构建及其鉴定

贡树基<sup>1</sup>, 曹虹<sup>1</sup>, 赵卫<sup>2</sup>, 张文炳<sup>1</sup>, 周浩<sup>1</sup>, 陈丽丹<sup>1</sup> (南方医科大学公共卫生与热带医学学院<sup>1</sup>微生物学系,  
<sup>2</sup>病毒研究所, 广东广州 510515)

**摘要:**目的 构建登革 2 型病毒 NGC 株基因组全序列的亚 cDNA 克隆, 为进一步构建全长感染性 cDNA 克隆奠定基础。方法 根据登革 2 型病毒 NGC 株基因组全序列中的酶切位点设计 2 对引物, 从病毒感染的乳鼠脑中提取 RNA, 采用长链 RT-PCR 技术扩增出覆盖病毒基因组全长的 2 个 cDNA 片段, 并克隆至 pCR-XL-TOPO 载体后测序。结果 经酶切鉴定和序列测定表明, 获得的 cDNA 克隆为登革 2 型病毒 NGC 株特异的。结论 已成功构建出登革 2 型病毒 NGC 株基因组的 2 个 cDNA 亚克隆。

**关键词:**登革 2 型病毒; RT-PCR; cDNA 克隆

中图分类号: R373.33 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)04-0469-03

## Construction and identification of genomic cDNA subclones of dengue 2 virus NGC strain

GONG Shu-ji<sup>1</sup>, CAO Hong<sup>1</sup>, ZHAO Wei<sup>2</sup>, ZHANG Wen-bing<sup>1</sup>, ZHOU Hao<sup>1</sup>, CHEN Li-dan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, <sup>2</sup>Institute of Virology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract:** **Objective** To construct the cDNA subclones spanning the entire genome of dengue 2 virus NGC strain for further construction of full-length infectious viral cDNA clone. **Methods** Two pairs of primers were designed according to the restriction endonuclease sites in the viral genome of dengue 2 virus NGC strain. After viral RNA extraction from the brain of infected new-born mice, two parts of full-length viral cDNA were amplified by long RT-PCR and cloned into the vector pCR-XL-TOPO. The partial sequence of the recombinant plasmid was determined. **Results and Conclusion** Sequence analysis and digestion with restriction enzymes demonstrated that the two cDNA subclones were specific for dengue 2 virus NGC strain, suggesting the successful construction of the two cDNA subclones of dengue 2 virus NGC strain.

**Key words:** dengue 2 virus; reverse transcriptase-polymerase chain reaction; cDNA subclones

登革病毒(DV)属黄病毒科黄病毒属,基因组为单股正链 RNA,全长约 11 kb,编码 3 种结构蛋白(C, PrM 和 E)和 7 种非结构蛋白(NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b 和 NS5)。共有 4 种血清型,均可引起登革热(DF)、登革出血热(dengue hemorrhagic fever, DHF)和登革休克综合征(dengue shock syndrome, DSS)<sup>[1,2]</sup>。其中 DHF 和 DSS 的病情较为严重,可引起患者死亡,近年来在热带及亚热带地区多有报道,我国东南沿海地区也多次发登革热及登革出血热。通常登革 2 型病毒(Dengue 2 virus, DV2)的感染较其他血清型更为严重<sup>[3]</sup>,本研究利用分子生物学技术扩增出

覆盖 DV2 NGC 株全长基因组的 2 个片段,并克隆至 pCR-XL-TOPO 载体中,为进一步构建全长感染性 cDNA 克隆奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂与材料

RNA 提取试剂盒(RNeasy Mini Kit, QIAGEN 公司产品);质粒提取试剂盒(Plasmid Mini Kit, 优晶公司产品);SuperScript III 逆转录试剂盒(Invitrogen 公司产品);pCR-XL-TOPO 载体(Invitrogen 公司产品);La Taq 酶和 DNA 纯化试剂盒(TaKaRa 公司产品);限制性内切酶(NEB 公司产品)。

#### 1.2 PCR 引物设计与合成

P1、P2 片段根据 DV2 NGC 株基因组全序列(AF038403)设计,由上海英骏生物技术有限公司广州分公司合成。其中 P1 片段的上游引物 5' 端加入 Sp6 RNA 聚合酶启动子核心序列,下游引物 5' 端加入 *Acl* I 内切酶位点;P2 片段上游引物 5' 端加入 *Acl* I 内切酶位点。具体引物序列列表 1。

#### 1.3 病毒总 RNA 的制备

DV2 NGC 株经乳鼠脑内接种传代后,取 1/2 发

收稿日期:2005-11-30

基金项目:广州市科技攻关计划重点项目(2004Z2-E0214);广东省自然科学基金(32833)

Supported by Key Sci-tech Research Project of Guangdong Province (2004Z2-E0214) and by Natural Science Foundation of Guangdong Province (32833)

作者简介:贡树基(1978-),男,在读硕士研究生,主要从事登革病毒防治的基础研究,电话:020-62789123, E-mail: gongshuji2004@yahoo.com.cn

通讯作者:曹虹,教授, E-mail: gzhcao@fimmu.com;赵卫,副教授, E-mail: zhaowei@fimmu.com

表 1 设计的引物

Tab.1 Primers used for amplification

Fragment name	Primer	Position	Length of PCR product	Sequence( 5'→3')
P1	1 (+)	1-30	5568 bp	<u>ATTTAGGTGACACTATAGAGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAAGAC</u>
	1 (-)	5544-5519		<u>AACGTTACGGATTTCCTCITTCITTCATCCA</u>
P2	2 (+)	5544-5572	5186 bp	<u>AACGTTGTTGGAGTCTCGACATGAGTGGG</u>
	2 (-)	10724-10695		<u>AGAACCCTGTTGATTCACACGCCACCATCCA</u>

The underlined part in the primer 1 (+) is SP6 promoter, the underlined part in the primer 1 (-) and 2 (+) is Acl I.

病乳鼠脑,用 RNeasy Mini Kit 提取总 RNA,于-70 °C 保存备用。

#### 1.4 反转录合成 DV2 cDNA

取总 RNA 15  $\mu$ l, 加入 10  $\mu$ mol/L 反向引物 1  $\mu$ l, 95 °C 作用 3 min 随后置冰浴中 1 min, 再加入 5 $\times$  缓冲液 5  $\mu$ l, DTT 1  $\mu$ l, RNA 抑制剂 1  $\mu$ l, SuperScript III 逆转录酶 2  $\mu$ l, 10 mmol/L dNTPs 1  $\mu$ l, 最后加 DEPC 处理水至总体积 30  $\mu$ l, 55 °C 保温 3 h 进行反转录, 反应完毕, 70 °C 灭活 15 min。逆转录产物中加入 1  $\mu$ l 重组 RNase H, 37 °C 温育 20 min, 去除 cDNA 中混合的 RNA。

#### 1.5 PCR 反应条件

利用 La Taq 酶进行 PCR 反应, 最终采用 30  $\mu$ l 反应体系: 模板 DNA (250 ng/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, 10 $\times$  缓冲液 (Mg<sup>2+</sup> 25 mmol/L) 3  $\mu$ l, dNTP (50 mmol/L) 8  $\mu$ l, La Taq 酶 (5U/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l, 上、下引物各 1  $\mu$ l (10  $\mu$ mol/L), 水 15.5  $\mu$ l。反应条件: 94 °C 2 min, 94 °C 15 s, 60 °C 1 min, 72 °C 5 min, 扩增 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物于 0.7% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 mg/L EB) 进行电泳。扩增产物用 PCR 纯化试剂盒回收。

#### 1.6 重组质粒的构建与鉴定

将纯化的 PCR 扩增片段分别插入 pCR-XL-TOPO 载体, 转化 Top10 感受态细胞。然后均匀涂布于含卡那霉素 (50  $\mu$ g/ml) 的 LB 平板上, 37 °C 培养后挑取阳性菌落进行 PCR 扩增以及酶切鉴定, 并以 M13 通用引物进行序列测定 (由 TaKaRa 公司完成)。

## 2 结果

### 2.1 DV2 NGC 株病毒基因组 cDNA 片段的扩增

由于登革 2 型病毒基因组较大, 因此根据 NGC 株病毒基因组序列上所具有的酶切位点, 将病毒基因组分为 2 个片段进行扩增, 各片段分别以 P1、P2 表示, 其大小应分别为 5568 bp、5186 bp (图 1)。0.7% 的琼脂糖凝胶电泳显示扩增片段大小与预期一致。

### 2.2 DV2 NGC 株病毒基因组亚克隆的构建及其鉴定

为了获得 DV2 全长 cDNA 克隆, 并构建 DV2 基因库, 将 P1、P2 两个片段分别与 pCR-XL-TOPO 载体连接, 转化至 Top10 感受态细胞, 用质粒提取试剂盒

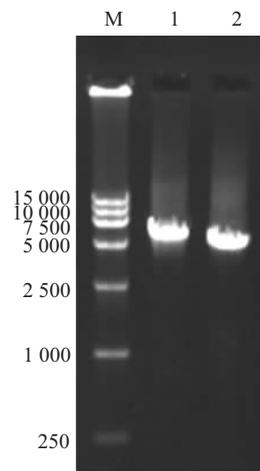


图 1 P1、P2 片段 PCR 扩增结果

Fig.1 Results of PCR amplification of the fragments P1 and P2

M: DNA Marker DL2000; Lane 1: P1; Lane 2: P2

抽提质粒, 通过质粒 PCR 及限制性内切酶酶切的方法初步鉴定。图 2 为重组质粒的 PCR 及酶切鉴定结果。

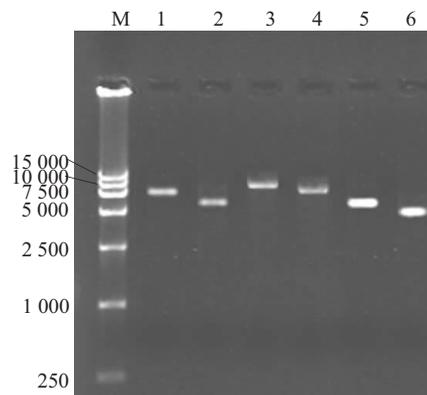


图 2 重组质粒 P1、P2 的鉴定

Fig.2 Identification of the recombinant plasmids P1 and P2

M: DNA Marker DL15000; Lane 1: P1 recombinant plasmids; Lane 2: P2 recombinant plasmids; Lane 3: *Xba* I digestion product of P1 recombinant plasmid; Lane 4: *Xba* I digestion product of P2 recombinant plasmid; Lane 5: Identification of P1 by PCR; Lane 6: Identification of P2 by PCR

经 M13 通用引物进行序列测定, 部分序列是 DV2 NGC 株病毒对应序列, 部分序列为 pCR-XL-TOPO 载体序列, 证明我们所构建的重组质粒是 DV2 NGC 株特异的。

### 3 讨论

登革病毒为非逆转录 RNA 病毒,在复制周期中不形成 DNA 中间体,直接进行分子生物学操作存在一定困难<sup>[4-6]</sup>。反向遗传学技术为 RNA 病毒分子生物学研究开辟了新途径。主要包括病毒基因组全长 cDNA 克隆技术,以及由质粒 DNA 转录 RNA 的感染性转录体制备技术<sup>[7]</sup>。现在通常先采用长链 RT-PCR 技术扩增出覆盖病毒基因组全长的几个 cDNA 片段,构建亚克隆,再进行体外连接,最终体外转录获得感染性转录体。Srburi 等<sup>[8]</sup>利用类似方法已成功获得了一株 DV2 的感染性克隆。

在研究中,我们首先应用长链 RT-PCR 法一次性扩增出 DV2 NGC 株病毒全长基因组片段,试图与 pCR-XL-TOPO 载体连接,构建全长 cDNA 克隆。但经过多次连接后发现,病毒全长基因组片段不能克隆至该载体。主要原因可能是由于 DV2 病毒基因组较大,超过了 pCR-XL-TOPO 载体的承受范围,一般 pCR-XL-TOPO 载体插入片段长度为 7~10 kb。因此,我们将 DV2 NGC 株病毒基因组分为 2 个片段进行亚克隆的构建,利用病毒基因组序列上所含的酶切位点(*Acl* I)设计了 2 对引物,并在第一条引物 5' 端引入 Sp6 RNA 聚合酶启动子核心序列。采用长链 RT-PCR 技术扩增出覆盖病毒基因组全长的 2 个 cDNA 片段,并克隆至 pCR-XL-TOPO 载体。最终构建出 DV2 NGC 株病毒基因组的 2 个 cDNA 亚克隆,经酶切鉴定和序列测定表明,获得的 cDNA 克隆是 DV2 NGC 株病毒特异的。

DV2 NGC 株病毒基因组全长 cDNA 亚克隆的成功构建,为我们下一步构建出全长 cDNA 克隆及体外转录获得恢复性病毒奠定基础,由此获得 DV2 NGC 株基因库,为开展其它登革病毒分子生物学研究提供方便。

### 参考文献:

- [1] 贡树基,赵卫,曹虹.登革病毒感染实验室诊断的研究进展[J].中国人兽共患病杂志,2005,21(12):1103-5.
- [2] 赵卫,张文炳,蔡鄂德.登革病毒进化遗传学与毒力关系研究进展[J].微生物学免疫学进展,2003,31(2):54-6.
- [3] Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity[J]. J Infect Dis, 2000, 181(1): 2-9.
- [4] Dar A, Munir S, Vishwanathan S, et al. Transcriptional analysis of avian embryonic tissues following infection with avian infectious bronchitis virus[J]. Virus Res, 2005, 110(1-2): 41-5.
- [5] Khatri M, Palmquist JM, Cha RM, et al. Infection and activation of bursal macrophages by virulent infectious bursal disease virus[J]. Virus Res, 2005, 113(1): 44-50.
- [6] 赵卫,胡志军,杨佩英,等.登革 2 型型内嵌合病毒全长 cDNA 克隆的构建[J].微生物学免疫学进展,2001,29(2):8-12. Zhao W, Hu ZJ, Yang PY, et al. Construction of the full-length cDNA clone of intratypic chimeric dengue 2 virus[J]. Prog Microbiol Immunol, 2001, 29(2): 8-12.
- [7] 范宝昌,杨佩英.RNA 病毒的反向遗传学操作[J].军事医学科学院院刊,2001,25(3):223-7. Fan BC, Yang PY. Reverse genetic manipulation on RNA virus[J]. Bull Acad Mil Med Sci, 2001, 25(3): 223-7.
- [8] Suiburi R, Keelapang P, Duangchinda T, et al. Construction of infectious dengue 2 virus cDNA clones using high copy number plasmid[J]. J Virol Methods, 2001, 9(2): 71-2.

(上接 465 页)

白只是组成 S 蛋白柄的亚单位,并不参与病毒与受体最初的识别,但是在 S2 蛋白上具有介导病毒与宿主细胞膜融合的亮氨酸拉链结构。在体内及体外试验中,识别冠状病毒 S2 蛋白的抗体都可以阻断病毒与宿主细胞的融合,使病毒不能感染细胞,是一种具有中和活性的抗体<sup>[7]</sup>。从 T 细胞抗原表位分析看出,57 位氨基酸变异(Y-D)对 T 细胞抗原表位产生影响。研究发现,T 细胞抗原表位 B<sub>3501</sub> 结构的精细差别影响 MHC I 类分子与 CD8<sup>+</sup> 的 T 细胞的结合<sup>[8]</sup>。S2 蛋白某个碱基的突变就有可能改变病毒对宿主细胞的侵袭能力<sup>[9]</sup>。同时 S2 蛋白在病毒进化的后期非常稳定,是抗病毒药物及疫苗研制的理想靶位。

### 参考文献:

- [1] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. N Engl J Med, 2003, 348(20): 1953-66.
- [2] Krueger DK, Kelly SM, Lewicki DN, et al. Variations in disparate regions of the murine coronavirus spike protein impact the initiation

of membrane fusion[J]. J Virol, 2001, 75(6): 2792-802.

- [3] Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. Science, 2003, 300(5624): 1394-9.
- [4] Marra MA, Jones SJ, Astell CR, et al. The genome sequence of the SARS associated coronavirus[J]. Science, 2003, 300(5624): 1399-404.
- [5] He JF, Peng GW, Min J, et al. Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China[J]. Science, 2004, 303(5664): 1666-9.
- [6] Yeh SH, Wang HY, Tsai CY, et al. Characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus genomes in Taiwan: molecular epidemiology and genome evolution[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(8): 2542-7.
- [7] Fagchi F. The S2 subunit of the murine coronavirus spike protein is not involved in receptor binding[J]. J Virol, 1995, 69(10): 7260-3.
- [8] Gao GF, Willcox BE, Wyer JR, et al. Classical and nonclassical class I major histocompatibility complex molecules exhibit subtle conformational differences that affect binding to CD8alphaalpha[J]. J Biol Chem, 2000, 275(20): 15232-8.
- [9] Guan Y, Zheng BJ, He YQ, et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China[J]. Science, 2003, 302(5643): 276-8.