

日本脑炎病毒 WHe 株全长 cDNA 的 长链 RT-PCR 法的扩增

唐青海¹, 乔宪凤², 马秋明¹, 何维明¹, 郑新民²,
刘西梅², 安立国¹, 颜 艳², 魏庆信²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 湖北省农业科学院 畜牧兽医研究所, 湖北 武汉 430064)

[摘 要] 为深入探索日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV) WHe 株的致病机理, 并为新型疫苗研发提供技术支持, 采用长链 RT-PCR 技术对其基因组全长 cDNA 进行了扩增鉴定, 并对含复杂二级结构的 3' 末端和 5' 末端非编码区扩增片段进行了测序分析。扩增结果表明, 扩增出的 JEV WHe 株基因组全长 cDNA 分子近 11 kb 大小; 非编码区测序分析表明, 扩增产物为 WHe 株所特有。提示长链 RT-PCR 法可用于 JEV WHe 株基因组全长 cDNA 的扩增。

[关键词] 日本脑炎病毒 WHe 株; 全长 cDNA; 长链 RT-PCR

[中图分类号] R373.3⁺1; S855.9⁺9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)08-0019-05

Amplification of full-length cDNA of Japanese encephalitis virus WHe strain by long RT-PCR

TANG Qing-hai¹, QIAO Xian-feng², MA Qiu-ming¹, HE Wei-ming¹, ZHENG Xin-min²,
LIU Xi-mei², AN Li-guo¹, YAN Yan¹, WEI Qin-xin²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Hubei Academy of Agriculture Science, Wuhan, Hubei 430064, China)

Abstract : In order to elucidate the pathogenesis of Japanese encephalitis virus (JEV) WHe strain and develop novel vaccine, the full-length cDNA was amplified by long reverse transcription-polymerase chain reaction (long RT-PCR). The full-length cDNA was identified by PCR and the fragments which contain the 3' and 5' untranslated regions were cloned into pGEM-T vector, and the sequences of inserted fragments were determined by Invitrogen Corporation. The results showed that the approximate 11 kb full-length cDNAs of WHe strain were amplified by long RT-PCR and its correctness was proved by partial nucleotide sequence analysis. The genomic cDNAs of WHe strain were successfully amplified.

Key words : Japanese encephalitis virus WHe strain; full-length cDNA; long RT-PCR

日本脑炎也称流行性乙型脑炎, 简称乙脑, 是一种由蚊虫传播的人畜共患病, 主要流行于东南亚地区。猪是日本脑炎的主要传染源和放大器, 猪患日

本脑炎后的主要表现为怀孕母猪流产、产死胎、弱仔、公猪睾丸炎及少数仔猪呈神经症状, 给养猪业造成了巨大的经济损失^[1]。

[收稿日期] 2006-07-17

[基金项目] 湖北省自然科学基金项目(2005ABA195)

[作者简介] 唐青海(1982-), 男, 湖南祁阳人, 在读硕士, 主要从事分子病毒学和免疫学研究。

[通讯作者] 乔宪凤(1968-), 女, 黑龙江鸡西人, 副研究员, 主要从事分子病毒学研究。E-mail: qiaoxianfengzi2001@163.com

日本脑炎的病原是日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV),属于黄病毒科(Flaviridae)黄病毒属(Flavivirus)。JEV 核酸为单股正链 RNA,长度约为 11 kb,由 5 端非编码区(5'NCR)、一个开放阅读框(ORF)和 3 端非编码区(3'NCR)构成,编码 3 个结构蛋白(C、preM 和 E)和 7 个非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5)^[2]。JEV 可分为不同的基因型,不同地区流行的 JEV 基因型不尽一致^[3]。1988 年,我国学者方雨玲等^[4]从武汉地区规范化猪场的母猪流产胎儿脑组织中,分离到武汉地区地方性毒株,命名为 WHe 株。目前,虽对 WHe 株的生物学特性进行了一些的研究^[5],但对其基因组功能和致病的分子机理等尚不清楚。

反向遗传学技术为 RNA 病毒的分子生物学研究开辟了新途径,而全长 cDNA 的获得是反向遗传学技术的重要环节。传统构建克隆的方法,是将整个基因组分成小片段进行克隆、再连接,其操作难度较大而且费时^[6]。1998 年 Gritsun 等^[7]首次应用长链 RT-PCR 技术成功构建了蜱传脑炎病毒(Tick-borne encephalitis virus, TBEV)的感染性克隆,使克隆感染性全长 cDNA 的时间由传统的几年缩短为几周甚至更短。但目前,我国有关应用该技术扩增病毒基因全长 cDNA 的报道尚不多见。本试验运用长链 RT-PCR 技术对 WHe 株基因组全长 cDNA 进行了克隆,以期为进一步在分子水平研究其基因组功能、致病机理及构建高效新型疫苗奠定基础。

表 1 日本脑炎病毒 WHe 株基因组全长 cDNA 扩增和鉴定引物

Table 1 Primers for amplifying and identifying the full length of JEV WHe strain

引物名称 Primers	引物序列(5'3') Sequences of primers(5'3')	引物位置/ bp Position of primers	预期扩增片段长度/ bp Size
Fa	5'AGAA GTTTA TCTGTGTGA ACTTCTTGGG-3'	1~28	
Ra	5'GATCCTGTGTTCTTCCTACCACTAG-3'	10 947~10 976	10 976
P1F	5'AGAA GTTTA TCTGTGTGA ACTTCT-3'	1~24	
P1R	5'ATGTCCGTGTTGTTGATGGTG-3'	512~532	532
P2F	5'GGGCA GAAAGCAAAACAAA GA-3'	389~410	
P2R	5'AGCATGCACATTGGTCGCTAAGAA-3'	2 454~2 477	2 088
P3F	5'GCACCATGGGCGTCAACGCA-3'	2 388~2 402	
P3R	5'GCGGATCCTAAGCATCAACCTGTGA-3'	3 519~3 533	1 145
P4F	5'GCCTTCTGGTGA TGTTCGTG-3'	3 568~3 587	
P4R	5'CCTCTAGCCA TAAATTCGGTAG-3'	4 692~4 673	1 105
P5F	5'ACCACTACAGGATCTACCG-3'	4 659~4 678	
P5R	5'GGATTGGGGCA TTTGATCAGG-3'	5 586~5 607	948
P6F	5'GCCACTCTGACCCATAGACTGAT-3'	5 375~5 397	
P6R	5'ACAGCCAA GGAA GACGA G-3'	7 209~7 217	1 842
P7F	5'GCGTGCC TTTTACCGACCT-3'	7 165~7 183	
P7R	5'TCCGTGGTATGTCCAA GTGC-3'	8 582~8 603	1 483
P8F	5'AGACCTGAGCATCCA TAG-3'	8 564~8 583	
P8R	5'TACATGTGTGACACTCTCCTCGCAG-3'	9 009~9 033	569
P9F	5'TTCGCTGAACAGAA TCAATGG-3'	8 919~8 939	
P9R	5'GCGATGTTTCGTGAAAGTGTTAAG-3'	9 509~9 532	613
P10F	5'GGACAGGTGGTCACTTATGCTC-3'	9 489~9 510	
P10R	5'AGGGACCTACTTCCGAGACG-3'	10 474~10 593	1 104
P11F	5'GATACTGGGTA GACGGTGCT-3'	10 486~10 503	
P11R	5'GATCCTGTGTTCTTCCTACCACTAG-3'	10 947~10 976	483

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 毒株、质粒、菌种、试验动物 日本脑炎病毒 WHe 强毒株由湖北省农业科学院畜牧兽医研究所兽医室分离鉴定;pGEM-T 载体购自 Promega 公司;大肠杆菌 DH5α 由本实验室保存;14 日龄 SPF 昆明乳鼠购自湖北省疾病预防控制中心动物室。

1.1.2 主要仪器和试剂 GeneAmp9700 PCR 仪,美国 PE 公司生产;电泳仪,北京六一仪器厂生产;凝胶成像系统,美国 UVP 公司出品;高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司生产;TRIzol 试剂,Invitrogen 公司生产;DNA 回收纯化试剂盒、质粒小量制备试剂盒、RNAsafe,均为 Biotek 公司产品;SuperScript™ Reverse Transcriptase,Invitrogen 公司生产;PfuUltra™ High-Fidelity DNA Polymerase,Strat-agene 公司生产;Ribonuclease H, E. coli, Fermentas 公司出品;2×PCR LongTaqMix,广东东盛生物科技有限公司出品。

1.2 引物设计

根据 WHe 株全基因组序列(GenBank 登录号为 EF107523),用 Primer Priemer 5.0 软件设计扩增病毒全长 cDNA 的上游引物 Fa、下游引物 Ra 及扩增 JEV 基因组全长 11 个片段的引物 P1F(R)~P11F(R)。引物由 Invitrogen 公司合成,具体引物序列见表 1。

1.3 JEV WHe 株 RNA 的提取

用 DMEM 细胞培养液溶解 WHe 株干粉,脑内接种 14 日龄 SPF 昆明乳鼠,每只注射 20 μL ,接种后于 96 ~ 120 h 选出现明显神经症状的小鼠,无菌取脑,用 TRIzol 试剂并按其说明书提取 RNA,沉淀的 RNA 加入体积分数 75 %乙醇, - 20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 JEV WHe 株 RNA 的 RT-PCR 反应

1.4.1 RT 反应 取 15 μL JEV 总 RNA,75 $^{\circ}\text{C}$ 作用 8 min,迅速冰浴 5 min,然后依次加入 1.5 μL RNAsafe,1.5 μL 反转录引物(25 $\mu\text{mol/L}$),1.5 μL dNTP (10 mmol/L),5 μL 5 $\times$ Buffer,DEPC 处理灭菌五蒸水 1.5 μL ,瞬时离心,60 $^{\circ}\text{C}$ 作用 20 min;再加入 2 μL SuperScriptTM Reverse Transcriptase (200 U/ μL),瞬时离心,42 $^{\circ}\text{C}$ 作用 3.5 h,70 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 终止反应,最后加入 1 μL Ribonuclease H (5 U/ μL),37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h,65 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 20 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存作为下一步 PCR 反应的模板。

1.4.2 PCR 扩增 反应体系为:模板 2 μL ,25 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 2 μL ;10 mmol/L dNTP 2 μL ;PfuUltraTM High-Fidelity DNA Polymerase (2.5 U/ μL) 1 μL ,10 $\times$ PfuUltra Reaction Buffer 2.5 μL ;灭菌 ddH₂O 13.5 μL 。反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 9 min,10 个循环;92 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 9 min,25 个循环(每个循环延伸时间递增 20 s);最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5 JEV WHe 株 cDNA 的 PCR 鉴定

用 DNA 回收纯化试剂盒(Bioteke)回收纯化

病毒全长 cDNA,取 0.5 μL 作为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为:模板(病毒全长)cDNA 0.5 μL ;25 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 1 μL ,2 $\times$ PCR LongTaqMix 12.5 μL ,灭菌 ddH₂O 10 μL 。反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2min,共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。用 DNA 回收纯化试剂盒(Bioteke)回收 PCR 目的产物,连接到 p GEM-T 载体,分别用酶切和 PCR 鉴定筛选阳性克隆并测序分析(测序由 Invitrogen 公司完成)。

1.6 JEV WHe 株 cDNA 测序结果分析

用 Vector NTI 软件,对测序结果和已测定的 WHe 强毒株相应序列进行核酸序列比对分析。

2 结果与分析

2.1 长链 PCR 最佳反应体系和扩增参数的建立

PCR 扩增条件的反复摸索试验证明:(1) Mg^{2+} 、引物浓度和 dNTP 的浓度分别为 2.75 ~ 2.85 mmol/L、1.8 ~ 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、800 ~ 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时最为合适;(2) 35 个热循环数为最佳,而循环数过多则非特异性杂带增多,过少则明显影响扩增的产量;(3) 采用热启动 3 阶段热循环法效果较好,25 μL 反应体系扩增效果优于 50 和 100 μL 反应体系;(4) 退火温度为 60 和 63 $^{\circ}\text{C}$ 时全长扩增的效果较差,68 $^{\circ}\text{C}$ 的退火扩增结果优于 60 和 63 $^{\circ}\text{C}$,但亦不是十分理想(图 1),以 65 $^{\circ}\text{C}$ 时的扩增效果最佳(图 2)。

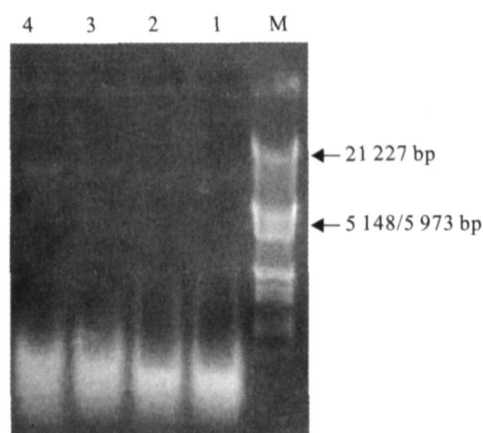


图 1 WHe 株基因组全长 cDNA 的 RT-PCR 扩增

M. λ DNA/ Hind + EcoR Markers;1.60 ;2.63 ;3,4.68

Fig. 1 Amplification results of full-length cDNA of WHe strain

M. λ DNA/ Hind + EcoR Markers;1.60 ;2.63 ;3,4.68

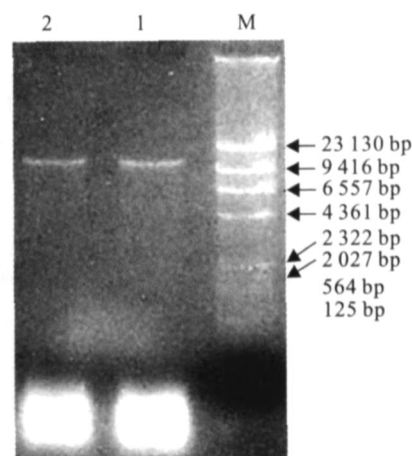


图 2 JEV WHe 株基因组全长 cDNA 的 RT-PCR 扩增

M. λ DNA/ Hind Markers ;1,2.65

Fig. 2 Amplification results of full-length cDNA of WHe strain

M. λ DNA/ Hind Makers;1,2.65

2.2 JEV WHe 株全基因组 cDNA 的扩增

用从 WHe 株感染鼠脑提取的病毒总 RNA 为模板,应用长链 RT-PCR 法扩增获得了约 11 kb 的日本脑炎病毒 WHe 株基因组全长 cDNA 分子(图 2)。

2.3 JEV 基因组全长 cDNA 的鉴定

鉴定结果显示,以 JEV cDNA 为模板可分别扩

增出相互重叠、覆盖 JEV WHe 株基因组全长的 11 个片段(图 3)。其中片段 1 和 11 分别位于 5 末端和 3 末端具有复杂二级结构的非编码区,分别将其克隆到 p GEM-T 载体后进行测序分析,测序结果表明其与日本脑炎病毒 WHe 株相应序列一致,说明扩增到的病毒基因组全长 cDNA 为 JEV WHe 株所特有。

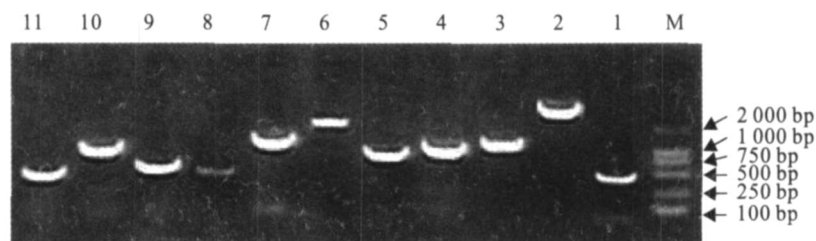


图 3 JEV WHe 株全长 cDNA 分子的 PCR 鉴定图

M. DL2000 Markers; 1 ~ 11. 覆盖 JEV WHe 株基因组全长的 11 个片段

Fig. 3 Identification of full-length cDNA of JEV WHe strain

M. DL2000 Markers; 1 - 11. Fragments F1 - F11

3 讨 论

近年来,反向遗传学技术成为分子病毒学研究中的新亮点,应用长链 RT-PCR 技术获得病毒基因组全长 cDNA,是实现体外对 RNA 病毒进行人工操作、制备感染性转录体的首要步骤。无 RNase H 酶活性逆转录酶的成功开发,大大增加了反转录合成第一条链 cDNA 的长度,这为长链 RT-PCR 技术奠定了基础。范宝昌等^[8]曾应用该技术成功地扩增了登革 2、4 型病毒基因组全长。本试验用该技术成功扩增了日本脑炎病毒 WHe 株近 11 kb 基因组全长 cDNA,是目前文献报道中最长的 RT-PCR 扩增产物。本研究发现,以下几个方面对一次性获得病毒全长 cDNA 是至关重要的。

为了保证模板的质量,小鼠无菌取脑后应立即提取病毒 RNA,且所有操作均在低温下进行;模板单独变性,变性温度降低至 75℃,时间减少为 8 min,以避免对 RNA 的损伤;变性后用 RNAsafe 对逆转录反应体系(逆转录酶不加)于 60℃处理 20 min,以充分破坏可能存在的 RNase,保护模板 RNA;选用 SuperScript™ 逆转录酶,将反应时间延长至 3.5 h 以利于第一链 cDNA 的完整合成。

高质量的模板对实现长链 PCR 扩增是至关重要的^[9]。为充分除去与第一链 cDNA 杂和的 RNA,本试验采用 Ribonuclease H 处理逆转录产物。有学者采用 RNase A 处理和常规的酚-氯仿抽提及乙

醇沉淀法纯化模板 cDNA,均取得了较好的效果^[10];Gritsun 等^[7]报道,用未纯化处理的 TBEV RT 产物为模板进行 PCR 反应,曾成功扩增了 TBEV 全长 cDNA。但本试验中作者发现,将不经过 Ribonuclease H 处理的逆转录产物直接用于长链 PCR,并不能实现病毒基因组全长 cDNA 的扩增。以往的长链 PCR 多在 100 μL 和 50 μL 反应体系中进行,而本研究采用 25 μL 反应体系也取得了较好的扩增效果,这可能和本研究采用与 PCR 仪相匹配的反应管能产生更好的热传递有关。此外,在 PCR 反应中,应尽可能地降低变性温度和减少变性时间,以减少长时间高温处理对模板和酶的损伤^[11],并采用热启动以消除引物寡聚体和 PCR 过程中的错配,这些措施在优化长链 PCR 反应中均收到了较好的效果。Ohler 等^[12]曾报道,对于长链 PCR,在后期循环中增加延伸时间能增加合成长链 PCR 产物的可能,本试验也证明了这一点。在 PCR 后期,由于产物增加导致每个模板拥有的酶分子相对减少,所以使其在给定的单位时间内,沿一段很长的链延伸很大一批引物的能力变得较为有限,因此本试验采用每个循环自动延时以弥补这一缺陷。

关于 Mg^{2+} 、引物和 dNTP 浓度对长链 PCR 的影响情况,目前报道不一^[8,13]。为使 PCR 效率达到最高并保证其忠实性,本试验将引物浓度提高到 1.8 ~ 2.5 μmol/L,确保了模板 DNA 一旦变性即与引物退火而不是与其自身退火,但引物浓度过高则

会导致非特异性产物增加,且易形成引物二聚体。高浓度的 dNTP 满足了长片段扩增的需要,由于核苷酸能整合 Mg^{2+} ,因此在试验中适当地提高 Mg^{2+} 浓度是必要的,而且被证明是有效的。PCR 产物的高保真度是制备病毒感染性全长 RNA 的重要条件^[13],对 3' 末端和 5' 末端非编码区的序列分析表明,本试验建立的 RT-PCR 反应具有很好的保真性。

JEV WHe 株全长 cDNA 的获得,为下一步全长 cDNA 克隆的构建、感染性 RNA 的体外制备、致病分子机理的研究及疫苗筛选奠定了基础;本试验建立的长链 RT-PCR 方法,对实现其他 RNA 病毒的长链扩增也有一定的借鉴意义。

[参考文献]

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997.
- [2] Wu S C, Lian W C, Hsu L C, et al. Japanese encephalitis virus antigenic variants with characteristic differences in neutralization resistance and mouse virulence[J]. Virus Reserch, 1997, 51:173-181.
- [3] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [4] 方雨玲,姜天童,徐涤平,等. 武汉地区猪乙型脑炎病毒的分离鉴定及外源性污染检定[J]. 湖北畜牧兽医,1995(2):1-4.
- [5] 乔宪凤,熊东海,郑新民,等. 猪乙脑病毒 WHe 株的 prM-E、NS1、NS2A 基因的克隆及序列测定[J]. 中国预防兽医学报,2003,25(3):191-194.
- [6] Jean C B, Anne L H. Infectious transcripts and cDNA clone of RNA viruses[J]. Virology, 1994, 198(2):415-426.
- [7] Gritsun T S, Gould E A. Development and analysis of a tick-borne encephalitis virus infectious clone using a novel and rapid strategy[J]. Virol Methods, 1998, 76(1-2):109-120.
- [8] 范宝昌,赵卫,胡志君,等. 应用长链 RT-PCR 法扩增我国登革 2、4 型病毒全长 cDNA[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2002,22(5):485-488.
- [9] 迪芬巴赫 C W, 德维克斯勒 G S. PCR 技术实验指南[M]. 黄培堂,俞炜源,陈添弥,等译. 北京:科学出版社,1998.
- [10] Lindberge A M, Andersson A. Purification of full-length enterovirus cDNA by solid phase hybridisation capture facilitates amplification of complete genomes[J]. Virol Methods, 1999, 77:131-137.
- [11] Barnes W M. PCR amplification of up to 35 kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(6):2216-2220.
- [12] Ohler L, Rose E A. Optimization of long distance PCR using a transposon-based model system[J]. PCR Methods Appl, 1992, 2:51-59.
- [13] Zhang F Q, Huang Q S, Ma W Y, et al. Amplification and cloning of the full-length genome of Japanese encephalitis virus by a novel long RT-PCR protocol in a cosmid vector[J]. Journal of Virological Methods, 2001, 96:171-182.

(上接第 18 页)

[参考文献]

- [1] 李宁. 动物遗传学[M]. 北京:中国农业出版社,2003.
- [2] 张艳,张树义. 微卫星方法简介[J]. 动物科学杂志,1999,34(2):42-45.
- [3] 张涛,陈玉林,张恩平. 南江黄羊 4 个微卫星位点遗传多态性研究[J]. 安徽农业科学,2005,33(4):650-651.
- [4] 储明星,程金华,过纬,等. 微卫星标记 OarAE101, BM1309 在五个绵羊品种中的初步研究[J]. 遗传学报,2002,29(6):502-506.
- [5] 雷雪芹,陈宏,徐廷生,等. 小尾寒羊产羔性状的微卫星标记研究[J]. 畜牧兽医学报,2003,34(6):530-535.
- [6] 施启顺. 畜禽主基因研究进展[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,1999,25(1):81-86.
- [7] Piper L R, Bindon B M. The Booroola Merino and the performance of medium non-Peppin crosses at Armidale [M]. Piper L R, Bindon B M, Nethery R D. The Booroola Merino. Australia: CSIRO, 1982:9-20.
- [8] Lord E A, Lumsden J M, Dodds K G, et al. The linkage map of sheep chromosome 6 compared with orthologous regions in other species[J]. Mammalian Genome, 1996, 7:373-376.
- [9] Montgomery G W, Crawford A M, Penty J M, et al. The ovine Booroola fecundity gene (Fec^B) is linked to markers from a region of human chromosome 4q[J]. Nature Genetics, 1993, 4:410-414.
- [10] 储明星. Booroola 羊 Fec^B 基因图谱研究进展[J]. 中国草食动物,2001,3(2):43-46.
- [11] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genenic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum Genet, 1980, 32:314-331.