

HBV X 区基因部分序列的亚克隆与 PCR 检测^{*}

袁 媛 陈 强 杨继红 熊国梅 刘中来

(华中师范大学生命科学学院 武汉 430079)

摘要 目的: 探讨 HBV X 区基因用于乙型病毒性肝炎早期诊断价值和意义。方法: 设计特异性引物, 将 pBR322- HBV 质粒 X 区部分序列 PCR 产物 AT 亚克隆至 pBS- T 载体, 提取和纯化质粒 DNA, 再对 HBV X 区序列进行 PCR 扩增。结果: 获得了预期希望的质粒。PCR 的最佳退火温度为 51 ℃, 灵敏度达到 101 拷贝/2 μ l, 线性范围 101- 1010 拷贝/2 μ l。讨论: pBR322- HBV 质粒中的靶基因成功地被亚克隆至 pBS- T 载体。pBR322- HBV 中 X 区目的序列扩增产物为 57bp, 该小片段勿需纯化就可直接 AT 亚克隆至新载体, 有利于后续的常规 PCR 检测和 TaqMan MGB 荧光定量 PCR 检测。

关键词: 乙型肝炎病毒; X 区基因; 亚克隆; 灵敏度

中图分类号: R512.6 文献标识码: A

Subclone of partial sequence of gene of HBV X region and PCR detection

YUAN Yuan, CHEN Qiang, YANG Ji- hong, LIU Zhong- lai

(College of life science, Central China Normal University, Wuhan 430079, Hubei, China)

ABSTRACT Objective: To explore the significance and value of HBV X region genes in the early diagnosis of Hepatitis B. **Methods:** The partial gene sequence of HBV X region in pBR322- HBV was amplified by PCR. The products amplified by PCR were sub- cloned into the pBS- T vector, which were an effective AT clone plasmid. The positive AT sub- clones were sequenced. **Results:** The expected plasmid with HBV X region gene was obtained. The optimal annealing temperature was 51 ℃. The sensitivity reached 101 copies per 2 μ l. The linear range was 101- 1010 copies per 2 μ l. **Discussion:** The target genes in pBR322- HBV were sub- cloned to pBS- T. The amplification product of the target gene sequence in pBR322- HBV was 57bp. It can be directly sub- cloned to the new vector without purification, which favors the routine PCR and TaqMan MGB fluorescent quantitative PCR for the early detection of HBV.

Key words: HBV; Gene of X region; Sub- clone; Sensitivity

本文主要研究 HBV X 区基因保守区段, 试图应用 PCR 技术检测 HBV, 为乙型病毒性肝炎的早期诊断, 探索最直接、最灵敏的检测方法和检测指标。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

pBR322- HBV 质粒由本院微生物实验室杨继红教授提供; DH5 α 菌株由本实验室保存; PCR 引物是利用引物和探针设计软件 Primer Express2.0^[1] (AB Biosystems 产品), Invitrogen 公司合成; pBS- T 连接试剂盒、50bp 分子量标准购自北京天为时代有限公司; DL3000 分子量标准购自上海生工; Taq DNA 聚合酶购自 Bio Basic Inc. (Canada); X- gal、IPTG 购自 Sigma 公司; 3S Spin Plasmid Miniprep Kit V3.1 质粒小抽试剂盒、dNTP 购自上海申能博彩有限公司; Eco RI 购自宝生物工程公司; 其余常规试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计: 用 Primer Express2.0 软件对 HBV ay (Genebank 序列号: X04615) X 区保守序列设计特异性引物, 引物序列和位置如下, 正向引物 BF1545 (1545- 1563): CTCCG- CGTCTGTGCCITCT, 反向引物 BR1601 (1601- 1620): TGCAGAG- GTGAAGCGAAGTG。

1.2.2 PCR 扩增 pBR322- HBV 目的基因: 反应体系为: 总体

积为 50 μ l, 其中含 0.2mmol/L dNTP, 1.5mmol/L MgCl₂, 0.4mmol/L BF1545, 0.4mmol/L BR1601, 0.02U/ μ l Taq DNA 聚合酶, 模板 2 μ l, 1 $\times$ 反应缓冲液; 在 Bio- Rad PTC- 200 PCR 仪上 94℃ 10min, 94℃ 10s, 60℃ 30s, 循环 44 次。

1.2.3 感受态细胞的制备

用 CaCl₂ 制备感受态大肠杆菌^[2]。

1.2.4 AT 亚克隆^[3]

1.2.4.1 连接: 电泳检测 PCR 产物, 对照 Marker 估算 DNA 浓度, 将剩余 PCR 产物勿需纯化, 直接使用 pBS- T 连接试剂盒进行连接, 体系为: 10 $\times$ T4 DNA Ligation Buffer 1 μ l, pBS- T 载体 1 μ l (50ng), T4 DNA Ligase 1 μ l (3U), PCR 产物 0.3 μ l (约 5ng), dd H₂O 6.7 μ l, 16℃ 连接 16h。

1.2.4.2 转化: 取 5 μ l 连接液至 100 μ l 感受态细胞中轻轻旋转几次混匀, 冰浴 30 min, 42℃ 静止热激 90s, 快速冰浴 2min, 加入 400 μ l SOC 培养基, 用水浴将培养基加热至 37℃, 转移至 37℃ 摇床 (转速小于 225rpm/min), 温浴 45min, 取 200 μ l 均匀涂布于 90mm LB 平板上 (平板含 Amp 终浓度为 60 μ g/ml, 均匀涂布 40 μ l X- gal 和 16 μ l IPTG 混合物), 待接种液完全吸收后, 颠倒培养板于 37℃ 培养 16h。

1.2.4.3 菌落 PCR^[4] 初步鉴定与测序: 挑取白色菌落接种于新鲜含有 60 μ g/ml Amp 的 5ml 液体 LB 培养基中 37℃, 250rpm/min 振荡培养, 同时也将菌落做模板在 1.2.2 所述 PCR 反应体

^{*} (基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.40172005))

作者简介: 袁媛, (1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 分子遗传学, E- mail: roundness027@yahoo. com. cn

通讯作者: 刘中来 (1952-), 男, 副教授, 研究方向: 分子遗传学, Tel: 027- 67867221; E- mail: zhongliu2000@yahoo. com. cn

(收稿日期: 2006- 06- 10 接受日期: 2006- 07- 12)

系和条件下扩增,初步鉴定阳性亚克隆。将鉴定为阳性克隆子的菌液送 Invitrogen 公司测序。

1.2.5 质粒的提取和纯化: 测序结果验证为阳性亚克隆的菌液接种于新鲜含有 60μg/ml Amp LB 液体培养基中, 37℃, 225rpm/min 培养箱中振荡培养 16 小时(菌液体积:LB 液体培养基体积为 1:100), 用 3S Spin Plasmid Miniprep Kit V3.1 质粒小抽试剂盒提取和纯化质粒 DNA。提取质粒经 EcoRI 单酶切后 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。酶切反应体系为: 10×H 缓冲液 2μl, EcoR I 限制性内切酶 0.5μl (15U/μl), 质粒 2μl, ddH₂O 15.5μl; 37℃ 酶切 3h。

1.2.6 质粒浓度测定: 用紫外分光光度计测出质粒浓度为 60μg/ml (A260/A280= 1.85), 计算其摩尔质量 (60μg/ml × 10⁻⁶) / (3057 × 666), 再与阿佛加德罗常数 6.02 × 10²³ 相乘, 计算出每 2μl 质粒的拷贝数为 3.55 × 10¹⁰ copies。

1.2.7 质粒倍比稀释^[5]

取 100μl 3.55 × 10¹⁰ copies/2μl 质粒用 TE 稀释至 355μl, 浓度为 1010 copies/2μl, 再取 100μl 1010 copies/2μl 质粒至 900μl TE 中, 浓度为 109 copies/2μl, 依此类推, 共稀释 10 个梯度, 直到 101copies/2μl。

1.2.8 PCR 最佳退火温度的确定和灵敏度检测

在 BioRad PTC-200 PCR 仪上做退火温度梯度, 以确定最

佳退火温度。PCR 反应体系为 10×PCR 缓冲液 5μl, 25mM Mg-d2 3μl, 10mM dNTP 1μl, 20μMBF1545, BR1601 各 1μl, Taq 酶 1U, 106copies/2μl 质粒 2μl, 灭菌双蒸水补足至 50μl。反应条件为 94℃3min, 94℃10s, 50℃~60℃梯度 30s, 72℃30s, 循环 44 次, 72℃5min。PCR 产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳, 120v 电压, 30min 后检测。并在最佳退火温度条件下, 对 1011010copies/2μl 10 种浓度的质粒做模板进行 PCR 扩增。PCR 产物以 120v 电压, 30min, 3% 琼脂糖凝胶电泳检测灵敏度。

2 结果

2.1 阳性亚克隆的初步鉴定: 见图 1。

2.2 测序结果

将菌落 PCR 检测为阳性亚克隆菌液, 送往 Invitrogen 公司, 用 377 测序仪测序。结果鉴定 HBV X 区基因部分序列已亚克隆到 pBS-T 载体。序列为 CTCGCCGTCTGTCCTCTCATCTGCGGACCGTGTGCACTTCGCTTACCTCTGCA (图 2)。长度 57bp, 在 NCBI 上 BLAST 结果证明此序列为 HBV X 区基因的部分序列。

2.3 质粒 DNA 的单酶切鉴定

结果见图 3。可见 3057bp 条带。

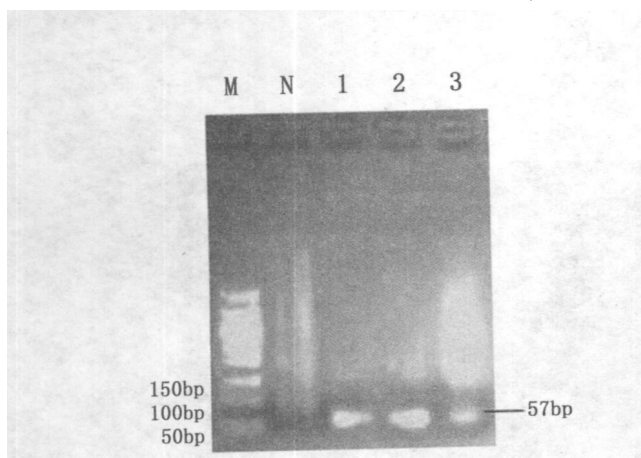


图 1 菌落 PCR 初步鉴定电泳图

M: 50bp 分子量标准; N: 阴性对照; 1~3: 菌落 PCR 产物

Fig. 1 Colony PCR electrophoretogram for primary identifying

M: 50bp Marker; N: Negative control; 13: colony PCR product

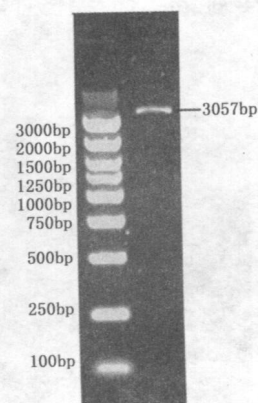


图 3 重组质粒单酶切电泳图

Fig. 3 Digesting electrophoretogram of recombination plasmid

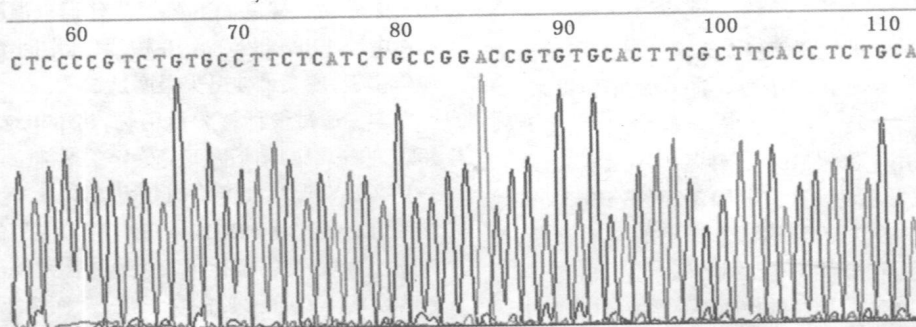


图 2 HBV X 区部分序列测序结果

Fig. 2 The partial sequence of genes of HBV X region by sequencer

2.4 退火温度的优化

确定最佳退火温度为 50.3℃, 50.9℃, 51.7℃, 均值为 51℃(图 4)。

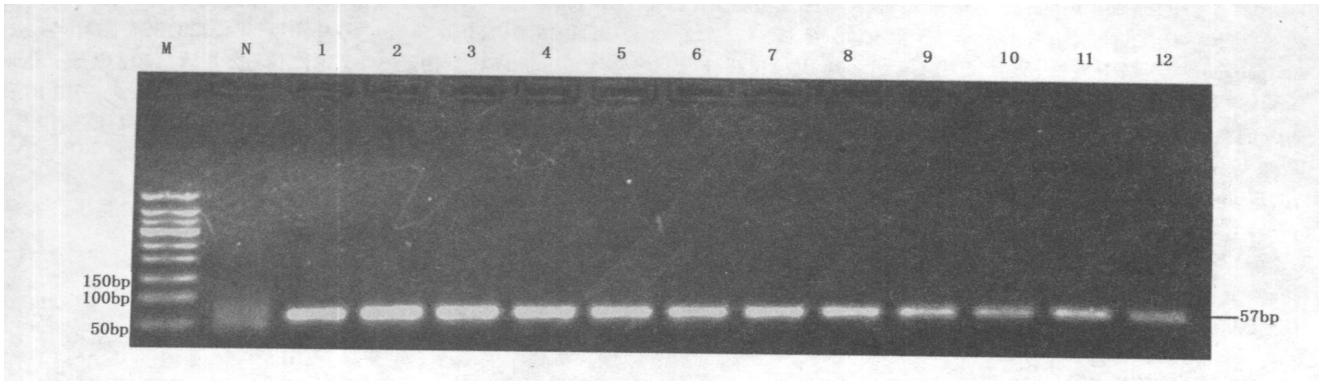


图4 不同退火温度 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图
M: 50bp DNA 分子量标准; N: 阴性对照; 1~12 退火温度分别为 50.0℃, 50.3℃, 50.9℃, 51.7℃, 52.8℃, 54.3℃, 56.0℃, 57.4℃, 58.5℃, 59.3℃, 59.8℃, 60.0℃

Fig.4 3% agarose gel electrophoretogram of PCR product with different annealing temperature
M: 50bp DNA Marker; N: negative control; 1~12: the annealing temperature are 50.0℃, 50.3℃, 50.9℃, 51.7℃, 52.8℃, 54.3℃, 56.0℃, 57.4℃, 58.5℃, 59.3℃, 59.8℃, and 60.0℃ respectively.

2.5 灵敏度的测定

扩增灵敏度达到 101copies/ 2μl, 线性范围为 101~ 1010copies/ 2μl(图 5)。

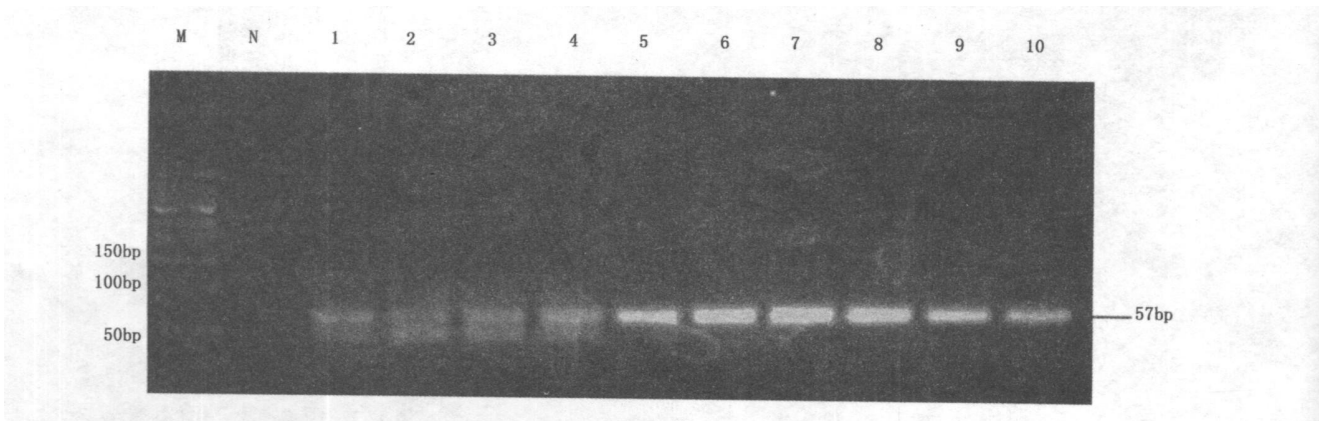


图5 不同浓度模板PCR 产物电泳图
M: 50bp DNA 分子量标准; N: 阴性对照; 1~ 10: 模板拷贝数为 101copies/ 2μl~ 1010copies/ 2μl

Fig.5 PCR product electrophoretogram of different copy number template
M: 50bp DNA Marker; N: negative control; 1~ 10: the copy number of templates are 101copies/ 2μl~ 1010copies/ 2μl

3 讨论

随着分子病毒遗传学的发展而建立起来的 PCR 技术已成为病毒等病原性疾病灵敏的检测手段。自 1999 年初以来, 美国对所有采集的血液都进行了核酸扩增检测(NAT) [6], 主要检测 HIV- 1 和 HCV, 也用于检测 HBV [7] 转基因小鼠实验证明, HBV 的 X 基因可诱发肝癌的发生 [8]。因此, 研究 HBV X 区基因, 探索敏感的检测方法, 对乙型病毒性肝炎的早期诊断, 提高治愈率, 减少并发症等都具有积极的意义。

退火温度是影响 PCR 特异性的较重要因素。本实验引物 BF1545 有 19 个核苷酸, BR1601 20 个核苷酸。按公式 $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$; 退火温度 = $T_m - (5 \sim 10^\circ C)$ 计算出 BF1545 的退火温度为 50℃~ 54℃, BR1601 的退火温度为 47℃~ 52℃。

因此, 通过对同一浓度质粒在其他条件相同情况下, 以 50℃~ 60℃退火温度梯度 PCR 确定最佳退火温度, 本实验质粒浓度有 10! ~ 1010copies/ 2μl 10 种, 取其中间浓度 106copies/ 2μl 质粒作模板, 摸索最佳退火温度是 51℃。

本文通过设计特异性引物, 将 pBR322- HBV 质粒(大小 10kb 左右)中的靶基因亚克隆至 pBS- T 载体。pBS- T 载体是一种高效克隆 PCR 产物的专用载体, 大小为 3000bp, 接近 HBV 基因组。通过对 pBR322- HBV 中 X 区目的序列扩增, 产物为 57bp 小片段, 勿需纯化可直接 AT 亚克隆至新载体, 进而探索 PCR 检测亚克隆片段的灵敏度, 从而为下一步荧光定量 PCR TaqMan MGB 探针的设计及为绝对定量标准曲线的制作奠定基础, 为血液筛查、临床应用提供依据。

(下转第 9 页)

3 结论

EGFR 是一种跨膜糖蛋白, 具有酪氨酸激酶活性, 由原癌基因 *c-erbB-1* 所编码, 是 *erbB* 受体家族之一, 广泛分布于分裂增生活跃的组织。其结构分为 3 个区域, 伸向膜外与 EGF 识别并结合的氨基端区域, 位于细胞膜中间单链的 α -螺旋跨膜区以及具有酪氨酸激酶活性的细胞质内的羧基端区域。大量的研究表明, 在多种肿瘤组织中存在 EGFR 高表达。表皮生长因子(EGF) 与其受体(EGFR) 结合成 EGF-EGFR 复合物, 直接参与、启动和调控细胞增殖的基因, 其中包括 *c-fos*、*c-myc*、*c-jun* 等重要编码基因, 以及与生长调节有关的重要蛋白基因, 再通过基因表达使细胞分裂增殖^[14~16]。

本研究结果表明, 超声激活 HpD 对 EGFR 的表达量及活性产生明显的影响, 使其表达量下降及其活性受到抑制。因此抑制了由 EGFR 介导的促肿瘤增殖的路径, 减缓肿瘤的生长速度, 起到一定抑癌作用。EGFR 表达量的下降, 提示可能是损伤信号使 *c-erbB-1* 基因的转录被抑制, 从而使 EGFR 表达下调, 最终使细胞增殖减慢且表现一定的时滞效应。而 EGFR 活性下降, 则表明了超声激活血卟啉对膜受体蛋白的直接损伤, 其结果亦导致肿瘤细胞增殖受阻。

参考文献

- [1] Dougherty T J, Kaufman J E, Goldfarb A, et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors[J]. *Cancer Research*, 1978, 38(8):2628- 2635
- [2] Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, et al. Synergistic effect of ultrasound and hematoporphyrin on sarcoma 180. *Jpn. J. Cancer Res.*, Mar 1990, 81(3):304- 308
- [3] Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, et al. Hematoporphyrin as a sensitizer of cell-damaging effect of ultrasound. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1989, 80(3): 219- 222
- [4] Miyoshi N, Misk V, Fukuda M, et al. Effect of gallium porphyrin ana-

logue ATX- 70 on nitroxide formation from a cyclic secondary amine by ultrasound on the mechanism of sonodynamic activation[J]. *Radiat Res*, 1995, 143(2):194- 202

- [5] Misk V, Riesz P. Free radical intermediates in sonodynamic therapy[J]. *Ann NY Acad. Sci*, 2000, 899:335- 348
- [6] Halliwell B, Gutteridge J. M. C. Role of free radical and catalytic metal ions in human disease: An overview[A]. In: *Methods in Enzymology* [M]. San' Diego, CA. Academic Press. Vol. 186, Part B. L. Packer&A. N. Glazer, Eds.: 1- 85
- [7] Miyoshi N, Riesz I, Evidence against singlet oxygen formation by sonolysis of aqueous oxygen-saturated solutions of Hematoporphyrin and rose bengal. The mechanism of sonodynamic therapy[J]. *Ultrasonic Sonochemistry*, 2000, 7(3): 121- 124
- [8] Worthington A E, Thompson J, Rauth A M, et al. Mechanism of ultrasound enhanced porphyrin cytotoxicity. PartI: A search for free radical effects[J]. *Ultrasound Med. Biol.*, 1997, 23(7): 1095- 1105
- [9] Jeffers R , Feng R Q, Fowlkes J B, et al. Dimethylformamide as an enhancer of cavitation-induced cell lysis in vitro[J]. *J Acoust Soc Am*, 1995, 97(1):669- 676
- [10] 刘全宏, 王攀, 李萌, 等. 声化学激活血卟啉诱导艾氏腹水肿瘤细胞凋亡[J]. *动物学报*, 2003, 49(5): 620- 628
- [11] 刘全宏, 孙世惠, 肖娅萍. 超声激活血卟啉对 S180 细胞杀伤作用及形态学研究[J]. *中国科学*, 2002, 32(5): 454- 462
- [12] 齐浩, 谭声江, 马玉英, 等. 不同频率聚焦超声与血卟啉对人体肿瘤细胞的协同作用[J]. *中国科学(C 辑)*, 1998, 28(5): 477- 480
- [13] 刘全宏, 王攀, 李萌, 等. 声化学激活血卟啉诱导艾氏腹水肿瘤细胞凋亡[J]. *动物学报*, 2003, 49(5): 620- 628
- [14] 谭玉梅, 范立青, 卢光 12. 表皮生长因子受体(EGFR) 的细胞内信号转导[J]. *生命科学研究*, 2002, 6(1):29- 33
- [15] 高艳景, 刘晔. 表皮生长因子受体与肿瘤治疗研究进展[J]. *国外医学肿瘤学分册*, 1994, 26(2):74- 75
- [16] 唐剑英. 表皮生长因子受体家族信号转导与肿瘤治疗[J]. *国外医学肿瘤学分册*, 2002, 29(2):95- 97

(上接第 6 页)

参考文献

- [1] Carl W Dieffenbach, Gabriela S Dveksler. PCR primer: A Laboratory Manual[M]. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003: 73
- [2] J. 萨姆布鲁克, DW. 拉塞尔著. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南[M]. 第三版. 北京: 科学出版社, 2001: 98- 105
- [3] Clark J.M. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases[J]. *Nucl Acids Res*, 1998, 16(2): 9677- 9686
- [4] 唐晔盛, 李英, 朱静等. 菌落 PCR 在大规模基因组测序中的应用[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29(2), 316- 318

- [5] Michael Kleined, Kirsten Schellenberg, Klaus Ritter. Efficient Extraction of Viral DNA and Viral RNA by the Chemagic Viral DNA/ RNA Kit Allows Sensitive Detection of Cytomegalovirus, Hepatitis B Virus, and Hepatitis G Virus by PCR[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 11(52): 5273- 5274
- [6] Michael P Busch. Should HBV DNA NAT replace HBsAg and / or anti-HBe screening of blood donors[J]. *Transfusion Clinique et Biologique*. 2004, 11: 26- 32
- [7] Susan L. Stranner, Sally Caglioti, D.M.Strong. 美国和加拿大供血的核酸扩增检测[J]. *国外医学输血及血液学分册*, 2001(24)6: 538- 539
- [8] 周新, 涂植光. 临床生物化学和生物化学检验[M]. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 246