论著

文章编号:1000-5404(2011)11-1144-04

基于 pJFH-1 的 HCV 全基因组扩增方法的建立

郭 艳,兰 林,何长龙,洪国祜,程 玲,毛 青 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军感染病研究所)

【摘要】 **目的** 基于 pJFH-1 建立能稳定扩增 HCV 全基因组的长链 PCR 方法。**方法** 以 pJFH-1 为测试模板,通过优化 PCR 扩增中各个重要环节,包括引物的选择、甘油和/或 DMSO 最适浓度的筛选、循环条件的摸索等,建立能稳定扩增 HCV 全基因组的长链 PCR 方案。**结果** 高 Tm 值(>65 ℃)的引物更有利于 HCV 全基因组的扩增;5%、10% 甘油或 5% DMSO 可显著提高 PCR 扩增的特异性和扩增效率,且甘油的促进作用优于 DMSO;双温法较三温法能获得更高产量的 PCR 产物。**结论** 通过优化长链 PCR 反应体系及条件,成功实现 HCV 基因全长的扩增。

【关键词】 长链 PCR;pJFH-1;HCV 全基因组

【中图法分类号】 R394-33;R373.21;Q781 【文献标志码】 A

Amplification of full-length hepatitis C virus genome based on plasmid pJFH-1

Guo Yan, Lan Lin, He Changlong, Hong Guohu, Cheng Ling, Mao Qing (Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To optimize the protocols of long-PCR for amplifying full-length HCV genome based on plasmid pJFH-1. **Methods** Optimization of long-PCR strategies was performed by testing a series of primers, adding various concentrations of glycerol, DMSO or both, using different cycle systems to select the optimal long PCR conditions. **Results** Primers that have higher melting temperatures (>65 ℃) could improve the efficiency of amplification. Glycerol of 5% and 10% or DMSO of 5% improved the specificity and efficiency of PCR amplification of full-length HCV genome. The promoting effect of glycerol was better than that of DMSO. Compared to three-stage temperature method, two-step temperature produced more PCR product. **Conclusion** Through the optimization of long-PCR protocol, full-length HCV genome is successfully achieved.

【**Key words**】 long-PCR; pJFH-1; full-length HCV genome

Supported by the Starting Funds for Personnel Returning From Overseas of Third Military Medical University of China (2009XGH08). Corresponding author: Mao Qing, Tel: 86-23-68754475, E-mail: qingmao@yahoo.com

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus,HCV)感染是导致慢性肝炎、肝硬化和肝癌的主要原因之一,一直受到研究者的关注[1-3]。建立 HCV 多基因(亚)型,尤其是我国最主要 1b 基因亚型的体内、外培养模型,是深入进行 HCV 生物学特性及抗病毒药物研究的重要基础。目前被大量采用的多片段扩增拼接 HCV 全长基因组的方法[4-7]已经证明是很难获得高复制特性的 HCV 病毒株(仅 2a 型毒株 JFH-1[8] 除外),这是由于 HCV 存在复杂的准种特性,多片段拼接法易造成不同变异株间的错误连接,得到的只是人工重组体,而不是患者体内真实存在的病毒基因组。但 HCV 病毒 RNA 基因组长达 9.6 kb,并具有复杂的二级结构,从 HCV 患者血清中一次性直接扩增出全长 HCV 基因组的难度非常大。本研究首先以 HCV pJFH-1 质粒为模板,通过优化各种反应体系及条件,摸索出了适用于 HCV 全长扩增的长链 PCR 方案,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

pJFH-1 质粒由日本 Takaji Wakita 博士惠赠、浓度为 0.5 μg/μl。DMSO、甘油(SIGMA 公司);Platinum *Taq* DNA polymerase High Fidelity、DEPC-treated water、10 mmol/L dNTP Mix(invitrogen 公司);Agarose(GIBCO 公司);1 kb DNA ladder(Promega 公司);

【基金项目】 第三军医大学回国人员启动资金(2009XHG08)

【通信作者】 毛 青,电话:(023)68754475,E-mail:qingmao@yahoo.com

6×loading buffer(TIANGEN公司);去离子水采用Milli-Q plus超纯水仪制造(Millipore公司);SORVALL LEGEND MICRO 21R离心机(Thermo Scientific公司);C1000热循环仪(Bio Rad公司);GelDoc2000凝胶成像仪(Bio Rad公司);试验所需的一次性耗材均为美国Axygen公司生产的经去DNA酶及RNA酶处理过的耗材。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据GenBank中查得的JFH-1全序列(accession no. AB047639),选择GC含量适当的区域,Primer Premier 5.0软件设计多对PCR正反向引物(表1)。所有引物均由上海英潍捷基贸易有限公司合成,HPLC纯化,以DEPC-treated water溶解,浓度均为10 μmol/L。

表1 JFH-1扩增所用引物的序列及位置

Primers	Polarity	Positiopn(nt)	Sequences(5′~3′)
FP1	Sense	37~61	CACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTC
FP2	Sense	56~82	ACTGTCTTCACGCAGAAAGCGCCTAGC
RP1	Anti-sense	9616~9640	AGTCATGCGGCTCACGGACCTTTCA
RP2	Anti-sense	9633~9653	CGGCACTCTCTGCAGTCATGC
RP3	Anti-sense	9626~9646	CTCTGCAGTCATGCGGCTCAC

1.2.2 不同甘油或DMSO浓度在HCV全长扩增中的作用 选用Platinum *Taq* DNA polymerase High Fidelity进行HCV基因全长的扩增。反应体系及扩增条件如下:25 μl体系中含模板pJFH-1(0.05 ng/μl) 1 μl,10×PCR Buffer 2.5 μl,$MgSO_4$(50 mmol/L)1.0 μl,dNTP Mix(10 mmol/L)0.5 μl,正反向引物(10 μmol/L)各0.5 μl,*Taq*酶0.25 μl,各管甘油或DMSO加入量不同(浓度依次为0%、5%、10%、15%、20%、25%),用DEPC-treated water补足至25 μl,充分混匀。94 ℃变性2 min后进行如下PCR循环:94 ℃ 15 s,58 ℃ 30 s,68 ℃ 9.5 min 15个循环,继之94 ℃ 15 s,68 ℃ 9.5 min(每个循环延长10 s)20个循环,最后68 ℃ 10 min。取10μl PCR产物与2 μl 6×loading buffer混合后进行0.8%琼脂糖凝胶(含溴化乙啶)电泳,观察甘油及DMSO各自的最适浓度范围。

1.2.3 甘油和DMSO对HCV全长扩增的共同作用 选取最适甘油及DMSO浓度同时加入到反应体系中进行HCV全长扩增,观察两者的共同作用(余反应成分及扩增条件同前述)。

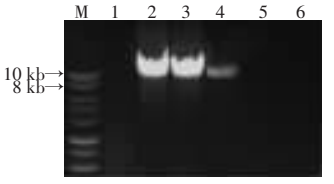
1.2.4 双温法及三温法在HCV全长扩增中的作用 选取含最适甘油及DMSO浓度的反应体系,分别用双温法及三温法进行扩增,观察两种方法扩增效果有无差别。双温法循环条件为94 ℃变性2 min后进行如下PCR循环:94 ℃ 15 s,68 ℃ 9.5 min 15个循环,继之94 ℃ 15 s,68 ℃ 9.5 min(每个循环延长10 s)20个循环,最后68 ℃ 10 min。三温法循环条件同前述。

2 结果

2.1 长链PCR反应条件的优化

2.1.1 引物在HCV全长扩增中的作用 在设计的多对PCR引物中,仅有FP1和RP1能够稳定地扩增出全长HCV基因组,结果提示高Tm值(>65 ℃)的引物更有利于HCV全长基因组的扩增。

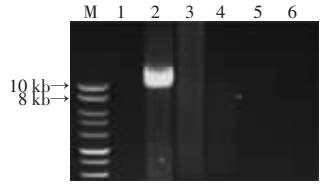
2.1.2 甘油在HCV全长扩增中的作用 当反应体系中加入甘油浓度为5%、10%、15%时可成功扩增出JFH-1基因全长,其中甘油加入量为5%及10%时扩增效果最佳,扩增产物条带较亮,低于5%时未见扩增条带。甘油加入量为15%时目的条带减弱,高于15%则无目的条带的扩增。说明在反应体系中加入一定浓度的甘油有助于促进HCV全长的扩增。不同甘油浓度对HCV全基因组扩增的影响见图1。



M:标准;1:甘油(-);2:5%甘油;3:10%甘油;4:15%甘油;5:20%甘油;6:25%甘油

图1 不同甘油浓度对扩增HCV基因全长的影响

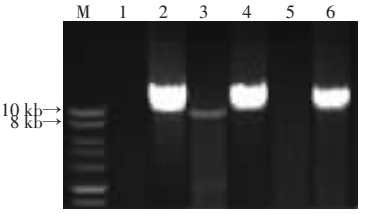
2.1.3 DMSO在HCV全长扩增中的作用 只有当反应体系中加入DMSO浓度为5%时可见JFH-1目的条带扩增,且扩增效果较佳,条带较亮。未加DMSO及DMSO加入量大于5%均无JFH-1扩增。表明一定浓度的DMSO可以促进HCV全长的扩增,但对其加入浓度要求较为严格。不同DMSO浓度对HCV全基因组扩增的影响见图2。



M:标准;1:DMSO(-);2:5% DMSO;3:10% DMSO;4:15% DMSO;5:20% DMSO;6:25% DMSO

图2 不同DMSO浓度对扩增HCV基因全长的影响

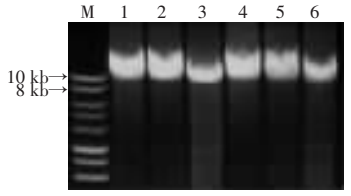
2.1.4 甘油及DMSO在HCV全长扩增中的共同作用 反应体系中未加甘油和DMSO时无法扩增出目的条带;单独加入最适甘油浓度(5%、10%)或最适DMSO浓度(5%)均可以成功扩增出JFH-1全长条带;但将两者最适浓度共同加入到反应体系中却无目的条带扩增。甘油及DMSO对HCV全基因组扩增的共同作用见图3。



M:标准;1:甘油(-),DMSO(-);2:5% 甘油;3:5% 甘油+5% DMSO;4:10% 甘油;5:10% 甘油+5% DMSO;6:5% DMSO

图3 甘油及DMSO在扩增HCV基因全长中的共同作用

2.1.5 双温法及三温法在HCV全长扩增中的作用 双温法及三温法在最适甘油浓度(5%及10%)和最适DMSO浓度(5%)均能扩增出JFH-1目的条带。相比之下,双温法扩增出的目的条带稍亮,扩增产物的产量略高于三温法。无论是双温法还是三温法,甘油对HCV全长扩增的促进作用均优于DMSO。双温法及三温法在HCV全基因组扩增中的作用见图4。



M:标准;1:5%甘油(双温法);2:10%甘油(双温法);3:5% DMSO(双温法);4:5%甘油(三温法);5:10%甘油(三温法);6:5% DMSO(三温法)

图4 双温法及三温法对扩增HCV基因全长的影响

2.2 最终反应条件的确定

2.2.1 长链PCR反应体系 25 μl反应体系中含甘油2.5 μl、模板pJFH-1(0.05 ng/μl)1.0 μl、10×Buffer 2.5 μl、$MgSO_4$(50 mmol/L)1.0 μl、dNTP Mix(10 mmol/L)0.5 μl、FP1(10 μmol/L)0.5 μl、RP1(10 μmol/L)0.5 μl、*Taq*酶0.25 μl、DEPC-treated water 16.25 μl。

2.2.2 长链PCR循环条件 94 ℃变性2 min后进行如下PCR循环:94 ℃ 15 s,68 ℃ 9.5 min 15个循环,继之94 ℃ 15 s,68 ℃ 9.5 min(每个循环延长10 s)20个循环,最后68 ℃ 10 min。

3 讨论

影响PCR成败的因素很多,包括模板的完整性、二级结构的复杂度、引物的特异性、Tm值的高低、Mg^{2+}的浓度及Taq酶的活性等。由于HCV全基因组长达9.6 kb,具有复杂的二级结构,从患者血清中一次性扩增出HCV基因全长难度非常大。目前国内学者扩增的HCV基因组最长片段为6 kb[9],国外为9.1 kb[10],且扩增片段均未包含病毒基因组包装和复制所必须的结构X-tail[11],无法用于体外培养模型的建立,严重阻碍了HCV分子生物学的研究。虽然目前已有嵌合HCV细胞培养系统的报道,但这些嵌合病毒均是基于JFH-1构建而成,不能代表所有HCV基因型的生物学特性,其进展有限[12]。本研究采用pJFH-1质粒为模板,通过优化长链PCR反应中的各个重要环节,获得了稳定性好、特异性高的HCV基因全长扩增的技术方案,为下一步从患者血清中直接扩增HCV全基因组进而构建适用于我国HCV感染的体外细胞模型奠定了基础。在实验过程中,我们发现以下几点对成功实现HCV全基因组的扩增尤为重要。

3.1 引物及退火温度

引物的设计在整个长链PCR反应中至关重要。好的引物设计可以减少扩增反应中非特异性产物的产生及提高目的产物的产量。我们在预实验中测试了多对PCR引物,仅FP1和RP1能够稳定地扩增出全长HCV基因组。合理设定退火温度是保证PCR成功扩增的重要前提,我们在实验中发现高Tm值(>65 ℃)的引物更有利于HCV基因全长的扩增,因为采用较高的退火温度有利于解除HCV基因组复杂的二级结构,增强反应的特异性。

3.2 PCR佐剂

优化长链PCR技术的一个常用方法是向反应体系中加入PCR佐剂。甘油和DMSO是最常见的2种,甘油通过增强Taq酶的热稳定性和降低Tm值促进长链PCR反应;DMSO虽然可能降低聚合酶的热稳定性,但其能大大降低变性温度,并有助于局部二级结构的解除,因而也常应用在长链PCR中。已有多个研究通过在PCR反应体系中加入甘油或DMSO而获得了满意的扩增结果[13-15]。然而,不同目的片段的扩增,其PCR体系中要求加入化学佐剂的浓度不尽相同,尤其对于片段长,二级结构复杂的模板而言,其加入浓度要求更为严格,因为加入浓度过低达不到促进扩增的效果,而浓度过高则会抑制长链PCR的扩增。研究结果显示,当反应体系中加入5%、10%甘油时JFH-1可达最佳扩增效果,扩增出的目的条带产量最高。加入15%时条带开始减弱,大于此浓度则会抑制JFH-1的扩增,无法得到目的片段。相比之下,HCV全长扩增体系对加入DMSO的浓度要求更为严格,结果表明,只有当反应体系中DMSO浓度为5%时才可见到JFH-1的扩增条带,低于或高于此浓度均无法扩增出目的片段。未加甘油和DMSO的样本均无法成功扩增出JFH-1全长片段,表明在HCV全基因组扩增体系中加入适当浓度的PCR佐剂是非常必要的。然而,将两者最适浓度共同加入到反应体系中,却扩增不出HCV基因全长目的片段,这与胡晓梅[14],Cheng等[15]认为在PCR体系中同时加入甘油和DMSO扩增效果更佳的研究结果相反,其原因可能与所扩增的目的片段不同有关。此外,PCR佐剂种类的选择也是影响PCR的重要因素。匡晓燕等[16]在单细胞PCR中选择BSA作为佐剂可以显著提高单细胞PCR的扩增率,而加入5%甘油和DMSO却无明显作用。由此可见PCR佐剂种类的选择、加入的浓度以及加入方式都会影响PCR扩

增效率,需要通过一系列对照实验选择出最佳方案。

3.3 长链 PCR 反应循环条件

有研究者认为长片段 PCR 扩增条件采用双温循环法效果较好,因此我们在三温法的基础上将退火延伸温度合为一步变为双温法,并比较了三温法和双温法的差别。结果表明,2 种方法均能扩增出目的条带,且双温法获得产物的产量略高于三温法,这应该与双温法用时较少,更能保证 *Taq* 酶的活性有关。此外,研究还发现,虽然甘油和 DMSO 均能促进 JFH-1 全长的扩增,但无论是双温法还是三温法,甘油对长链 PCR 的促进作用均优于 DMSO,其原因可能与甘油在降低 Tm 值,增加引物与模板特异性结合的基础上还能稳定 *Taq* 酶的活性有关。

3.4 热启动

热启动是除引物设计外提高 PCR 特异性的重要方法之一,也可以达到减少非特异性扩增和提高目标产物产量的目的。包括手工热启动、蜡防护层法等在内的常规热启动方法操作繁琐,易于污染。因此我们在实验中采用了 Platinum *Taq* DNA 聚合酶,其成分含有抗 *Taq* DNA 聚合酶单克隆抗体,在室温及热循环开始阶段可以抑制酶的活性,从而减少引物和模板的非特异性结合。为了进一步确保热启动的效果,我们参照 Keeney[17] 的方法,将热循环仪加热到 94 ℃后迅速将 PCR 反应管从冰上移到热循环仪中,从而避免 *Taq* 酶在加热过程中逐渐恢复活性而造成的非特异性扩增。通过一系列对照实验,我们发现这个方法可以获得较满意的扩增条带。

综上所述,扩增 HCV 全长基因组,除了必要的 PCR 条件优化外,引物设计是至关重要的,其次在常规 HCV 反应体系中加入一定量的甘油或 DMSO 也是非常必要的。热启动在提高长链 PCR 反应特异性上发挥了重要的作用。HCV 全基因组扩增一直是国内外研究的难点,本研究以 pJFH-1 为模板,通过优化各种长链 PCR 反应条件成功实现了一次性扩增 HCV 基因全长,为下一步通过长模板 RT-PCR 直接扩增血清 HCV 全基因组,进而建立适用于我国 HCV 感染的复制子和细胞模型奠定了基础。

参考文献:

[1] 张连峰,李继昌,韩莉,等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因 NS5ATP1 的反式调节基因筛选[J]. 郑州大学学报(医学版),2007,42(4):638-641.

[2] 张艳敏,孙国清,张郑民,等. 河南省艾滋病流行区 HIV 共感染 HBV 和 HCV 状况分析[J]. 郑州大学学报(医学版),2009,44(3):542-544.

[3] 孔令保,刘志文,吴晓玉,等. 丙型肝炎病毒 NS5B 在 Hep3B 细胞的表达及活性分析[J]. 第三军医大学学报,2010,32(1):54-56.

[4] Sheehy P, Scallan M, Kenny-Walsh E, *et al*. A strategy for obtaining near full-length HCV cDNA clones (assemblicons) by assembly PCR [J]. J Virol Methods, 2005, 123(2): 115-124.

[5] Lu L, Nakano T, Smallwood G A, *et al*. A refined long RT-PCR technique to amplify complete viral RNA genome sequences from clinical samples: application to a novel hepatitis C virus variant of genotype 6 [J]. J Virol Methods, 2005, 126(1/2): 139-148.

[6] Wang Y, Xia X, Li C, *et al*. A new HCV genotype 6 subtype designated 6v was confirmed with three complete genome sequences[J]. J Clin Virol, 2009, 44(3): 195-199.

[7] Timm J, Neukamm M, Kuntzen T, *et al*. Characterization of full-length hepatitis C virus genotype 4 sequences [J]. J Viral Hepat, 2007, 14(5): 330-337.

[8] Wakita T, Pietschmann T, Kato T, *et al*. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome [J]. Nat Med, 2005, 11(7): 791-796.

[9] 朱研,毛青,兰林,等. 慢性 1b 型丙型肝炎病毒感染者包膜 2 基因正选择位点分析及功能意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2010,26(6):548-551.

[10] Fan X, Xu Y, Di-Bisceglie A M. Efficient amplification and cloning of near full-length hepatitis C virus genome from clinical samples[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 346(4): 1163-1172.

[11] Fukuda K, Toyokawa Y, Kikuchi K, *et al*. Isolation of RNA aptamers specific for the 3′ X tail of HCV[J]. Nucleic Acids Symp Ser (Oxf), 2008, (52): 205-206.

[12] 卢莎,沈晓玲,谭文杰. 丙型肝炎病毒细胞培养系统的研究进展[J]. 中华实验和临床病毒学杂志. 2009,23(1):76-78.

[13] Yasukawa K, Konishi A, Inouye K. Effects of organic solvents on the reverse transcription reaction catalyzed by reverse transcriptases from avian myeloblastosis virus and Moloney murine leukemia virus [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(9): 1925-1930.

[14] 胡晓梅,饶贤才,黄建军,等. 采用 PCR 技术从高 GC 含量绿脓杆菌模板中扩增长片段外毒素 A 全基因[J]. 第三军医大学学报,2003,25(9):833-834.

[15] Cheng S, Fockler C, Barnes W M, *et al*. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(12): 5695-5699.

[16] 匡晓燕,陈芳,郭家林,等. 激光捕获显微切割-单细胞 PCR 技术的应用研究[J]. 第三军医大学学报,2009,31(5):464-466.

[17] Keeney S. Long-PCR amplification of human genomic DNA [J]. Methods Mol Biol, 2011, 688: 67-74.

(收稿:2011-03-10 修回:2011-04-05)

(编辑 王 红)