维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)06 - 0849 - 03

SARS - CoV 5' - UTR 相应 cDNA 作启动子时转录起始位点研究

张建军[1,2],黄爱龙[1],史小玲[2],张晓锋[2]

(1. 感染性疾病分子生物学教育部重点实验室、重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400016;
2. 泸州医学院附属医院感染病科,泸州 646000)

【摘 要】目的:分析具有启动子功能的 SARS - CoV 基因组 5' - UTR cDNA 在转录出 mRNA 时,转录起始的位点,从而分析序列功能。方法 将 SARS - CoV 5' - UTR 驱动下报告基因的真核表达质粒 pGL3 - 5' - UTR,转染 HepG2 细胞,然后提取总 RNA,采用 5' - RACE,扩增出相应序列,通过比照,查找转录其始的位点。结果 通过逆转录和二轮 PCR,得到一个约 440bp 的产物,经 A - T 克隆后测序,转录体起始位点在 SARS - CoV 5' - UTR 的第 56 位核苷酸,其下游是保守的保守的转录调控序列(TRS)。结论 SARS - CoV 5' - UTR 在调控基因转录时,第 56 位核苷酸及其下游的 TRS 具有重要作用。

【关键词】SARS - CoV,5' - 非编码区,启动子,起始位点
【中国图书分类法分类号】R695 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 05 - 8

Localization of the initiation site of the transcription driven by the cDNA corresponding to SARS - CoV 5' - UTR

Zhang Jianjun, et al

(*Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】Objectives To localize the initiation site of the transcript driven by the cDNA corresponding to SARS - CoV 5' - UTR when it act as a promoter. Methods The plasmid pGL3 - 5' - UTR, in which a reporter gene Luc was driven by the cDNA corresponding to SARS - CoV 5' - UTR, was transfected into HepG2 cells, and then the total RNA was extracted. Subsequently, the extracted total RNA was reverse - transcribed using a specific primer and subjected to two turns of semi - nested PCR. The PCR product was cloned into a T - vector for sequencing. Results A 440bps product was harvested by reverse - transcription and two turns of semi - nested PCR, and the 56th nucleotide of SARS - CoV 5' - UTR was found being the initiation site, followed downstream with a highly conserved transcription - regulating sequence (TRS). Conclusion The 56th nucleotide and its downstream TRS of SARS - CoV 5' - UTR is key roles in regulating gene transcription.

【Key words】SARS - CoV, 5' - UTR, Promoter, Initiation site

在分析 SARS - CoV 基因组 5' - UTR 二级结构基础上,分别以 5' - UTR 正义和反义全长 cDNA 序列,取代质粒 pGL3 - Control 中 SV40 启动子,构建成萤火虫荧光素酶的表达质粒,分别转染 HepG2 细胞,发现 SARS - CoV 5' - UTR 相应的 cDNA 序列,具有启动子活性(另文发表)。本研究为进一步证实,采用 5' - RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)方法,确定了转录起始位点,报告如下。

作者介绍:张建军(1965 -),男,教授,博士生,
主要研究方向:感染性疾病分子生物学防治。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌细胞 HepG2,为本所收藏;质粒 pGL3 - 5' - UTR 由本所构建,系以 SARS 5' - UTR cDNA 取代 pGL3 - control 中的 SV40 启动子而构建的表达质粒,为"在 SARS 5' - UTR cDNA 驱动下"的萤火虫荧光蛋白酶表达载体;RNA 抽提试剂盒、5' - Full RACE Core Set 试剂盒 TAKARA 公司产品;脂质体转染试剂盒(Lipofectamine)为 Gibco 产品。

1.2 方法

1.2.1 引物寡核苷酸的设计根据试剂盒技术手册和实验原理,设计 RT 引物、S1、A1、S2、A2 共 5 条如下寡核苷酸引物。其中,RT 引物在 5' - 端磷酸化:

RT 引物:5' - (P) GTCATCGTCTTTCCGTGCT - 3'

维普资讯 http://www.cqvip.com

外套引物:S1 上游:5' – TTTGGAGCACGGAAAGACGA –3'

A1 下游:5' – CAGTTCTATGAGGCAGAGC –3'

内套引物 S2(与 S1 同)上游:5' – TTTGGAGCACGGAAAGACGA –3'

A2 下游:5' – TTCGAAGTACTCAGCGTAAG –3'。

上述寡核苷酸由上海博亚公司合成。

1.2.2 细胞转染和总 RNA 提取

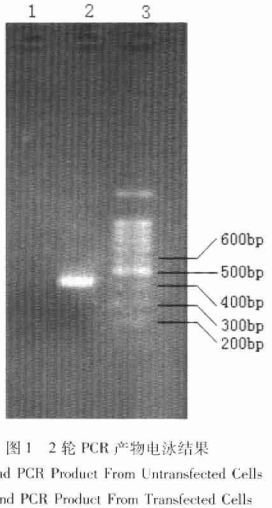


图 1 2 轮 PCR 产物电泳结果

Lane1:The 2nd PCR Product From Untransfected Cells

Lane2:The 2nd PCR Product From Transfected Cells

Lane3:Marker(100bp Ladder)

24 孔板中每孔接种 6×104 HepG2 细胞,培养 24h 后,换无血清培养液,用脂质体转染 pGL3 – 5' – UTR(0.75μg/孔)。转染 6h 后用含 10% 小牛血清的 1640 培养液替换无血清培养液。24h 后,用裂解液裂解转染细胞,按试剂盒说明,提取总 RNA。

1.2.3 cDNA 5'末端快速扩增(5' – RACE)

1.2.3.1 逆转录反应

2μl 总 RNA、1.5 μl 的 10×RT Buffer、0.5 μl 的 RNase Inhibitor、1 μl 的 AMV Reverse Transcriptase XL、1 μl 的 5'端磷酸化的 RT – 引物,加 9μl 去 RNase 水、15μl 体系。30℃、10 min、50℃、30 min、80℃、2 min、–20℃保存备用。

1.2.3.2 RNA:cDNA 复合物中 RNA 的降解反应

15 μl 的 1st strand cDNA 溶液、15 μl 的 5×Hybrid RNA Degeneration Buffer、40μl 灭菌蒸馏水、1 μl RNase H、30℃反应 1 小时。反应结束后进行乙醇沉淀。

1.2.3.3 单链 cDNA 环化连接反应

8 μl 的 5×RNA(ssDNA)Ligation Buffer、20 μl 的 40% PEG、12μl 灭菌蒸馏水、1 μl 的 T4 RNA Ligase,加入经乙醇沉淀的单链 cDNA 中,16℃反应 15 ~ 18h。反应结束后,进行 PCR 反应。

1.2.3.4 PCR 反应

以上述环化的单链 cDNA 为模板,先后以外套引物和内套引物,在 TaKaRa LA Taq 作用下,进行 2 轮 PCR 反应。第 2 轮产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,胶回收。

1.2.4 PCR 产物克隆于 T 载体中,然后挑选数个克隆进行 DNA 测序。按常规进行,送上海博亚公司测序。

2 结 果

2.1 PCR 反应产物

经 2 轮 PCR 反应,1.5% 琼脂糖凝胶电泳,可见一条大小约 440bp 的产物条带(图 1)。



图 2 转录体起始位点确定

2.2 PCR 产物测序及转录起始位点确定

测序结果可读序列为 520bp。可查到 S2 引物、A2 引物位置、以及转录起始点"C",它位于 SARS – CoV 5' – UTR 的第 56 位核苷酸,紧邻一个序列"TAAACGAA"(图 2)。

3 讨 论

近年来,通过对 5' – UTR 的深入研究,发现许多正链 RNA 病毒的 5 – 'UTR,都具有启动子功能。Frolov I 等作体内体外实验,发现辛德毕斯病毒(Sindbs Virus)5' – UTR 中包含对正链和负链合成的核心启动子元件[1]。一般认为,5' – UTR 中的 3'末端区的识别位点和 5'端的 AT 富含区可能就是 RdRp 以负链为模板,合成正链 RNA 的启动子成分。我们早期的研究的结果也证实,SARS – CoV 的 5 – 'UTR 也具有启动子功能。

通过对 SARS – CoV 5' – UTR RNA 进行结构分析(RNADraw3.0),发现其二级结构包含 4 个茎环结构,与 HCV 5' – UTR 结构[2,3]非常相似。

维普资讯 http://www.cqvip.com

本研究确定,在报告基因 mRNA 转录体中,SARS - CoV 的 5 - 'UTR 第 56 位核苷酸是转录起始位点。该位点正好处于 SARS - CoV 5' - UTR RNA 的第二个茎环,所紧邻的下游序列"TAAAC-GAA",为文献[4,5]报道的、在冠状病毒中高度保守的"转录调控序列"(TRS)。

本研究证实,SARS - CoV 5' - UTR 在 SARS - CoV 复制调控中,应该起着很重要的作用。这为进一步研究 SARS - CoV 复制调控机理,提供了一定的理论基础。

参 考 文 献

[1] Frolov I, Hardy R, Rice CM. Cis - acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus - and plus - strand RNA synthesis [J]. RNA, 2001;7(11):1638 - 51

[2] Qi ZT, Kalkeri G, Hanible J, et al. Stem - loop structures II - IV of the 5' untranslated sequences are required for the expression of the full - length hepatitis C virus genome [J]. Arch Virol, 2003;148(3):449 - 467.

[3] Dumas E, Staedel C, Colombat M, et al. A promoter activity is present in the DNA sequence corresponding to the hepatitis C virus 5' UTR [J]. Nucleic Acids Res, 2003;31(4):1275 - 1281.

[4] 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 - 1966.

[5] Marra MA, Jones SJ, Astell CR, et al. The Genome sequence of the SARS - associated coronavirus [J]. Science, 2003;300(5624):1399 - 1404.

(上接第 842 页)

参 考 文 献

[1] Antonio C, Giuseppe P. Oxidative Stress and Diabetic Vascular Complications[J]. Diabetes care, 1996;19(3):257 - 267.

[2] Tatsuya K, Keiji I, George LK. Oxidative Stress: The Lead or Supporting Actor in the Pathogenesis of Diabetic Complications[J]. J Am Soc Nephrol, 2003; 14(8) Supplement 3: S216 - S220.

[3] Guoping Qing, Xuanchu Duan, Youqin Jiang. Induction of Heat Shock Protein 72 in RGCs of Rat Acute Glaucoma Model after Heat stress or zinc Administration[J]. Eye Sci, 2004;20(1):30 - 33,51.

[4] Prasad AS, Bao B, Beck FW, et al. Antioxdant effect of zinc in humans [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2004;37(8):1182 - 1190.

[5] Bonnefont - Rousselot. Dominique Glucose and reactive oxygen species[J]. Curr Opin Clin Nutrition & Metab Care, 2002;5(5):561 - 568.

[6] Kowlurn RA, Kennedy A. Therapeutic potential of anti - oxidants and diabetic retinopathy[J]. Opin Imostig Drugs, 2001; 10(9):1665 - 1676.

[7] Woollard AC, Baseal ZA, Armstrong GR. Abnormal redox status without increased lipid peroxidation in sugar cataract [J]. Diabetes, 1990; 39(11):1347 - 1352.

[8] Thomas JP, Bachowski GJ, Girotti AW. Inhibition of cell membrane lipidperoxidation by cadminium and zinc metallothionine[J]. Biochem Biophys Acta, 1986;884(3):448 - 461.

[9] Suntres ZE, Lui EMK. Biochemical mechanism of metallothionein - carbon tetrachloride interaction in vitro[J]. Biochem Pharmacol, 1990; 39(5): 833 - 840.

[10] Altomare E, Grattagliano I, Vendemaile G, et al. Oxidative protein damage in human diabetic eye. Evidenc of a retinal participation[J]. Eur JClin. Invest, 1997; 27(2):141 - 147.