

简报

一种合成全链长类病毒cDNA的有效方法

宋传正 张渝英 杨开宇

(中国科学院微生物研究所, 北京)

以类病毒为模板经过反转录合成全长cDNA比较困难,这是由于它具有高度有序的二级结构^[1]。最先研究者采用与真核生物mRNA相同的方法^[2],即将其环状分子打开,人工连接上Poly(A)片段,再以oligo(dT)为引物引发cDNA的合成。由于环状分子的断点是随机的,反转录的起点不专一,产物复杂,为克隆的筛选及cDNA的拼接带来不便。1981年, Rohde等^[3]首先报道了以专一的寡聚DNA为引物合成马铃薯纺锤状块茎类病毒(PSTV)的cDNA。此方法的优点是反转录在特定的位点起始并可以放松对模板纯度的要求,但类病毒复杂二级结构的障碍依然存在,反转录往往提前终止,不易得到全长的cDNA。为此,1985年Martin^[4]提出了双引物法合成cDNA。这样,即使不能得到全长的cDNA克隆,但因两个引物引发反转录的起点不同,仍能从cDNA库中获得可以互相补充的插入片段,最终拼接成全长cDNA。并认为这是进行类病毒cDNA分子克隆的通用战略。实际上,这一方法并没有从根本上克服模板二级结构所造成的困难。为了解决这一问题,我们以菊花矮化类病毒(CSV、天坛株系)为材料对其cDNA的合成方法进行了探讨。

材料与方 法

(一) CSV RNA的提纯

采集病叶,按陈炜等^[5]的方法得半提纯品。经5%聚丙烯酰胺凝胶电泳后,将含CSV RNA的凝胶切下,在4℃进行洗脱。洗脱液冷冻干燥,再以无菌无离子水溶解,过Sephadex-G50柱,收集紫外峰区洗脱液冷冻干燥,置-20℃保存。

(二) 寡聚脱氧核糖核苷酸引物的合成与纯化

用DNA合成仪(Applied Biosystem, 381A型)合成两个寡聚DNA片段(P₁: d(CTCATTTTCTTTTCTTT); P₂: d(ACCGGGTAGTTGCCAAA))。脱去保护基并从合成柱上洗脱下以后用Sephadex-G50凝胶过滤进行脱盐,经冷冻干燥,-20℃保存。以15%聚丙烯酰胺凝胶电泳(凝胶含0.375% Bis, 8 mol/L 脲)进行纯度分析。

(三) 单链cDNA的合成

第一条链cDNA的合成主要按Martin等^[4]的方法进行,略加修改。用三种方法对模板进行预处理(1)慢退火方法:引物与模板于82℃水浴加热6 min,自然冷却24h;(2)快退火方法:同(1),只是加热后立即置冰浴中;(3)羟甲基汞变性方法^[6,7]:1μg CSV RNA加入羟甲基汞至10mmol/L,体积2μl,室温放置10min

本文于1987年11月26日收到。

国家自然科学基金资助项目。

杨希才同志提供天坛株系 CSV 病叶,王永力同志合成寡聚DNA片段,一并致谢。

后加入 $1\ \mu\text{l}$ 90mmol/L β -巯基乙醇, 置冰浴。模板预处理后加入其他试剂, 至总体积 $12.5\ \mu\text{l}$, 其中含 $1\ \mu\text{g}$ CSV RNA, $1.5\ \mu\text{g}$ 引物 (P_1 或 P_2), 10mmol/L DTT, $6\ \text{mmol/L}$ MgCl_2 , $15\ \text{mmol/L}$ KCl, $2\ \text{mmol/L}$ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 100mmol/L Tris-HCl, pH 8.2, $800\ \mu\text{mol/L}$ dNTPs, $880\ \text{u/ml}$ RNasin (Promega), $600\ \text{u/ml}$ AMV 反转录酶 (Boehringer)。 37°C 保温 2h 后加入 EDTA 至 20mmol/L 终止反应, 然后以酚/氯仿抽提二次, 以水饱和的乙醚抽提一次, 以 NH_4Ac -乙醇进行沉淀, 用 70% 乙醇洗一次, 备用。

(四) 双链 cDNA 的合成

完全按 Ueli Gubler 等^[8] 的方法。

(五) ds cDNA 的克隆及插入片段的检查

按常规方法将 ds cDNA dC 加尾后与 Pst I 切开并 dG 加尾的 pBR322 退火并转化入 *E. coli* DH-5 α 细胞中。从对氨苄敏感的菌株中提取质粒后以 Pst I 消化, 插入片段的大小以 2% 琼脂糖凝胶电泳检查。

结果与讨论

(一) 引物的纯化

为了保证引物纯度, 引物在彻底脱去保护基并从合成柱洗脱后, 通常采用 HPLC 纯化。从经济简便的角度出发, 我们采用 Sephadex-G50 凝胶过滤的方法进行纯化, 经过对各种不同的洗脱液比较以后, 确定无菌无离子水效果最好。产物经

紫外全波扫描呈典型的 DNA 图谱, 经 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析为单一条带。反转录实验证明这一步骤是绝对必要的, 未过 Sephadex-G50 柱的引物不能引发反转录。

(二) CSV 单链 cDNA 的合成

引物对反转录效率的影响

根据 CSV 二级结构模式图 (图 1), 我们确定合成两个引物 P_1 和 P_2 , 它们分别能与 CSV RNA 的 50—67 及 248—264 序列互补。按快退火方法与 CSV RNA 模板配对, 进行反转录。放射自显影图谱表明 (图版 I-A), 采用引物 P_1 所得到的反转录产物无论是在总量上还是在在大分子产物所占的比例上都明显高于采用 P_2 的结果, 即 P_1 是一个比较理想的引物。

引物引发反转录效果的好坏决定于引物与模板所形成的杂交链是否稳定。 P_1 是一个富含 T 的 18 核苷酸, P_2 是富含 GC 的 17 核苷酸。根据碱基对的热力学常数推算, P_2 与其互补链所形成的双链应比 P_1 所形成的双链稳定。按此推想做为反转录的引物, P_2 应优于 P_1 , 但实际结果恰恰相反。因此还应考虑问题的另一方面, 即模板方面。通常认为, CSV 的杆状二级结构左半侧较不稳定, 右半侧较稳定^[11] (图 1)。 P_1 正好与左侧不稳定区中最不稳定的第一预溶区上侧链配对, 可以预计一旦形成互补链就比较稳定; 而 P_2 与右侧稳定区茎环结构配对, 在模板变性及引物配对的过程中会出现模板分子内互补链与 P_2 相互竞争的问题, 随着反应的进行, 有

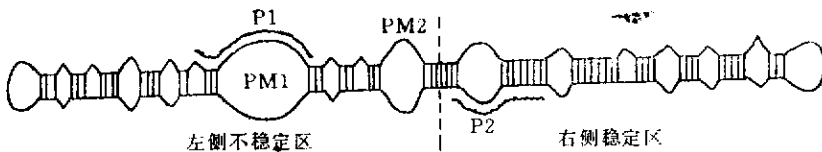


图 1 引物与 CSV 配对示意图
中心部分为 CSV 二级结构模式图 (PM₁, PM₂ 为预溶区), P₁, P₂ 为引物

可能取代 P_2 -模板杂交链。这两方面因素综合平衡的结果很可能使 P_1 -模板杂交链在稳定性及浓度上皆高于 P_2 -模板杂交链,所以用 P_1 做引物可以合成较多较长的 cDNA。

(二) 模板变性对反转录效率的影响

在确定使用 P_1 为引物后,进一步改变模板变性条件,以期获得更多全长的反转录产物。图版 I -B 表明,采用慢退火方法所得全长 cDNA 的比例最少,快退火方法居中,用羟甲基汞预处理模板所得到的产物分子量明显增大,除全长 cDNA 外尚有少量大于全长的分子。由此可见,模板二级结构的彻底破坏是获得大分子反转录产物的关键。 82°C 6 min 的热变性虽足以使二级结构破坏,但慢退火过程中模板有可能慢慢复性(尤其是环状分子),而 37°C 的反应温度又远低于 CSV 的 T_m 值 (48.5°C),复性形成的茎环结构阻止了反转录的延续;而快退火方法由于降温迅速在一定程度上减弱了模板的复性,因此可以得到较大比例的全长反转录产物。在我们所使用的变性条件中,羟甲基汞方法效果最好,这是因为该试剂通过离子键的相互作用破坏 RNA 的二级结构,模板变

性后复性比较困难,所以可以合成很大比例的全长 cDNA,并可以按滚环机制沿环状 CSV 分子合成少量大于模板全长的产物。因此羟甲基汞变性方法是破坏类病毒二级结构的理想方法,是热变性方法所不及的。

(三) CSV 双链 cDNA 的合成及其克隆中插入片段大小的检查

从 $1\ \mu\text{g}$ CSV RNA 用羟甲基汞方法反转录所得产物全部用于 ds cDNA 的合成,从放射性掺入估算约得到 $0.11\ \mu\text{g}$ 的 ds cDNA。按(材料与方法)所述进行克隆后对部分阳性菌株中插入片段的大小进行了分析。图版 I -C 表明阳性菌株 pBC 6 及 pBC32 的插入片段分别为 310bp 和 610 bp,即一个稍小于 CSV 的单体,另一个接近于 CSV 的双体,这和 ss cDNA 中有大于全长分子的结果是一致的。

根据以上一系列实验的结果,可以看出选择能与模板稳定结合的适当引物,采取能阻止模板复性的羟甲基汞变性方法可以有效地合成全长的 cDNA。可以预计这一方法将会适用于其余类病毒以及其他具有高度有序二级结构的环状 RNA 分子的 cDNA 的合成。

参 考 文 献

- [1] Sanger, H.L. et al., *The Microbe, Part I, Viruses*, Cambridge Univ. Press, pp.281—334, 1984.
- [2] Palukaitis, P. et al., *FEBS Lett.*, 92:268, 1978.
- [3] Rohde, W. et al., *Eur. J. Biochem.*, 118:151, 1981.
- [4] Martin, T. et al., *Biosci. Rep.*, 5:143, 1985.
- [5] 陈炜: *微生物学报*, 22(3):241, 1982.
- [6] Stephen, A. et al., *DNA*, 5:427, 1986.
- [7] Payvar, F. et al., *J. Biol. Chem.*, 254:7636, 1979.
- [8] Gubler, U. et al., *Gene*, 25:263, 1983.

AN EFFICIENT METHOD FOR SYNTHESIZING FULL-LENGTH VIROID cDNA

Song Chuangzheng Zhang Yuying Yang Kaiyu
(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Highly ordered secondary structure of viroids hampers the synthesis of their full-length cDNA counterparts. To overcome this difficulty, Chrysanthemum stunt viroid (CSV, Tiantan strain) was used as a model to investigate the optimal conditions for synthesizing full-length cDNA. It was found that in priming the primer p_1 complementary to the upper strand in the first premelting region of CSV RNA was superior to the primer P2 complementary to the RNA strand in the right stable region, suggesting that the stability of the hybrid between primer and template should be the first consideration on primer selection. When the template was denatured with methylmercuric hydroxide, more full-length even longer than full-length copies of cDNA were produced compared with heating denaturation. The advantages of the method described here for cloning of viroid cDNA were discussed as well.

Key words

Chrysanthemum stunt viroid (CSV); synthesis of cDNA