

- logy, 21: 427-434.
- [5] Callery, C. D. et al., 1980, *J. Immunol. Meth.*, 35: 213-223.
- [6] Perry, V. P. et al., 1975, *Cryobiology*, 12: 386-396.
- [7] Scheiwe, W. M. et al., 1981, *Cryobiology*, 18: 344-354.
- [8] 郑斯涌等, 1985, 制冷学报, 3: 48-54.
- [9] Merker, R. et al., 1979, *Clin. Exp. Immunol.*, 38: 116-126.
- [10] Lecivero, G. et al., 1981, *Clin. Exp. Immunol.*, 45: 185-190.
- [11] Yang, T. J. et al., 1979, *Immunology*, 38: 85-95.
- [12] 翁醒华等, 1985, 杭州大学学报(自然科学版), 12: 381-385.
- [13] Blatt, J. et al., 1982, *Blood*, 60: 491-494.
- [14] 杨惠新等, 1983, 上海免疫学杂志, 3: 335-339.
- [15] 吕占军等, 1985, 中华血液学杂志, 6: 224-226.

克隆片段 DNA 用于测定 Epstein-Barr 病毒基因组拷贝数

赵德标

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

检测 Epstein-Barr 病毒(EBV)基因组数一般采用纯化的 EBV DNA 进行复性动力学试验^[1], 和纯化的 EBV DNA 经放射性同位素缺口翻译标记^[2]或转录标记^[3,4]后杂交试验。由于至今仍缺乏良好的 EBV 生产株, 从而使得分离和纯化 EBV DNA 相当耗时费力。但近来运用基因工程的方法可较为容易地获得 EBV 亚基因组片段。有人报道用 [³²P] 标记的 EBV DNA 的限制性酶解克隆片段作为标准 DNA 检测正常或异常组织细胞中 EBV 基因组拷贝数^[5]。也有人用 [³²P] 标记的巨细胞病毒 DNA 限制性酶解片段检测尿液中的病毒^[6]。我们实验室也曾应用克隆的 EBV DNA 酶解片段作为探针, 研究 EBV 基因组阳性细胞株中 EBV DNA 相对量^[7]。本文探讨了用非标记的克隆片段作标准, 同时以标记的克隆片段 R 作探针, 通过 DNA 点杂交检测每个 H₁₈ 细胞中 EBV 基因拷贝数, 和 EBV 基因组中 EBV DNA Bam HI-W(W)片段拷贝数。

材料和方法

1. 细胞 DNA 的提取;

所用的四株细胞, K₅₆₂, Raji, H₁₈ 和 P₃HR-I 都用 RPMI-1640 培养液培养。另加 20% 灭活的小牛血

清和 100 μg/ml 卡那霉素。

细胞 DNA 的提取按 Petterson 等人的方法^[8]稍加修改。细胞在 1 mg/ml 蛋白酶 E, 0.5% SDS 和 1 × 10⁻³ mol/L DTT 溶液中 37℃ 温育 3 小时, 用酚和氯仿分别萃取, 所得核酸液经透析后, 加热变性的 Rnase (1 mg/ml), 37℃ 再温育 3 小时, 再分别用酚和氯仿萃取, 以乙醇沉淀 DNA, 沉淀物溶于 TE 缓冲液 (10 × 10⁻³ × mol/L Tris 1 × 10⁻³ × mol/L EDTA pH 7.6), 再用 TE 透析, 所得 DNA 含量借光密度 (A_{260 nm}) 定量。

2. EDV DNA Bam HI-R(R)和W片段的制备;

参照 Maniatis 等人的方法^[9]用碱变性法提取, CsCl 密度梯度超速离心纯化 R 和 W 片段分别与 pBR₃₂₂ 质粒重组的。将酶解, 琼脂糖电泳后鉴定为 W 或 R 片段的胶带切下(图 1), 装入含有 Tris-醋酸缓冲液 (TAE; 0.04 mol/L Tris-醋酸-0.002 mol/L EDTA) 的透析袋中, 在 TAE 中电泳 1 小时, 再反向电泳 1 分钟, 吸出袋中 TAE, 过 DEAE-Sephacel 4 B 柱, 先用平衡液 (100 × 10⁻³ × mol/L NH₄Ac-10 × 10⁻³ × mol/L Tris-Cl, pH 8.0, 10 × 10⁻³ mol/L EDTA) 平衡柱, 然后上样品, 再用洗脱液 (2 mol/L NH₄Ac-10 × 10⁻³ mol/L Tris-Cl, pH 8.0, 10 × 10⁻³ mol/L EDTA) 洗脱, 洗脱液用酚和氯仿分别萃取后, 用二倍无水乙醇沉淀 DNA, 沉淀物溶于 TE 中。

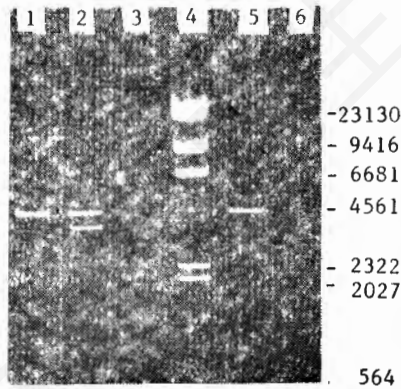


图1 W和R片段的分子量测定

1和4分别为纯化的W和R片段; 2.5和6分别为BamHI酶解的P-W, P-R和PBR₃₂₂; 3为Hind III酶解的λ噬菌体DNA, 片段的碱基对数见图右侧

3. 纯化的R和W片段的浓度测定;

已知浓度的W-pBR₃₂₂质粒DNA经BamHI酶解后, 取不同量与提纯的R片段一起在0.7%琼脂糖胶上电泳1小时, UV灯下拍照(图2)。然后底片用CS-900薄层扫描仪扫描, 求出各条带的积分面积, 以重组质粒在酶解, 电泳后产生的W片段作标准, 求出纯化的R片段的浓度。采用上述同样方法, 也测定了纯化的W片段的浓度。

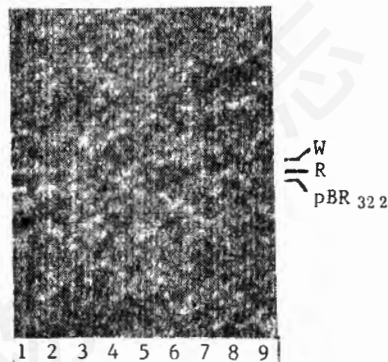


图2 测定R片段浓度的电泳图

1-5中W DNA含量分别为50, 40, 30, 20和10 ng; 6-9分别为4, 3, 2和1 μl纯化的R片段。

4. DNA-硝酸纤维膜的制备;

一定量的DNA在热变性后, 加等体积1mol/L NaOH, 室温中20分钟, 再加等体积冰水冷却的复性中和液(1.5 mol/L NaCl; 1 mol/L Tris-HCl, pH 7.0)点在膜上的样品, 空气干燥, 用6 ssc洗二次, 80°C烘

2小时, 备用。

5. DNA标记和杂交

纯化的R和W DNA通过缺口翻译法标记[α³²-P]dGTP-dTTP使标记DNA的比放射性强度达到约10⁸cpm/μgDNA。杂交液中含50%甲酰胺, 43°C杂交36小时。在DNA点杂交过程中, K₅₆₂细胞DNA作阳性对照, 其它DNA的点杂交cpm值都减去K₅₆₂细胞DNA的cpm值, 取得净值。

结果

1. W和R片段的分子量

λ DNA经Hind III酶解后产生七个片段, 各片段的核苷酸数的负对数, 对相应条带在凝胶电泳后的迁移距离作图(图3), 作为标准曲线。再根据W和R片段的迁移率求出它们的碱基对分别为3.090和3.802, 与文献报道的3.070 bp(W片段)和3.640 bp(R片段)基本一致^[10]。

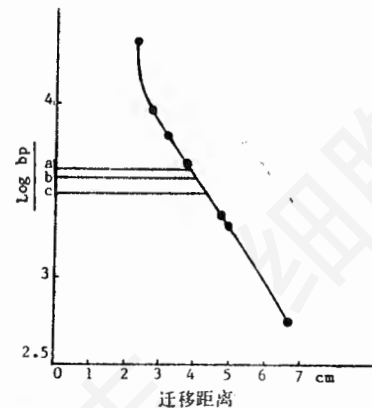


图3 DNA分子量测定标准曲线

Hind III酶解λ DNA产生的七条DNA片段作标准分子量DNA。(a) 4,3 bp的PBR₃₂₂ (b) 3.802 bp的R片段 (c) 3.090 bp的W片段。

2. W和R片段的浓度;

图4、是不同浓度的W片段DNA对相应DNA量的积分面积(图5)所作出的标准曲线。根据W和R片段DNA的积分面积, 分别求出W和R片段浓度为25 μg/ml和5 μg/ml。这两份DNA溶液就作为测定细胞DNA中W和R片段拷贝数的标准。

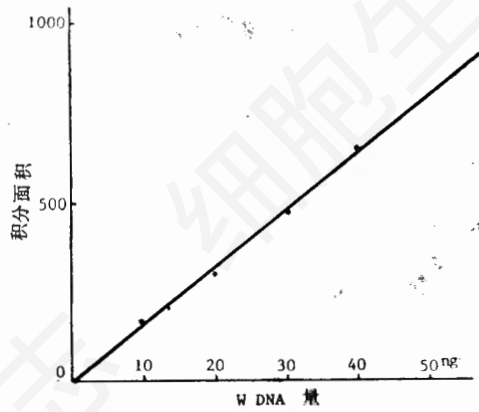


图4 DNA浓度测定标准曲线

相当于含有 10 μg/ml W 片段的 P-W 溶液 1, 2, 3, 4 和 5 μl 分别经 BamHI 酶解后电泳, 拍照, 扫描, 积分, 以 W 片段量对积分面积作图



图5 不同浓度W片段的扫描图谱

峰 1-5 分别为 10, 20, 30, 40 W 和 50 ngW。

3. 每个细胞 DNA 中含 EBV 基因组拷贝数

采用 DNA 点杂交法, 将不同浓度的标准 R 片段 DNA 连同作为载体的 1 μg *K*₅₆₂ 细胞 DNA (相当于 2×10^5 个细胞)^[6], 一起点在膜上 (见图 6) 后, 用 [³²P] 标记的 R DNA 作探针杂交后, 以不同浓度的 DNA 对在相应浓度测定的 cpm 值作图, 画出标准曲线 (图 7)。在同一

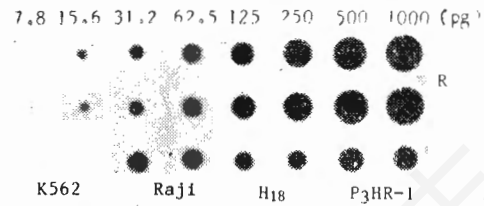


图6 DNA点杂交测定细胞DNA中R片段拷贝数

R 为纯化的 EBV DNA BamHI R 片段。K₅₆₂, Raji 和 P₃HR-1 细胞 DNA 各为 1 μg。H₁₈ 细胞 DNA 和 0.25 μg。探针为 $\sim 5 \times 10^7$ cpm/μg DNA 的 P-R DNA。

张硝酸纤维膜上, 分别点上 H₁₈, Raji 和 P₃HR-1, 及作为阴性对照的 K₅₆₂ 细胞 DNA 各 1 μg。根据杂交后测得的 cpm 值, 从标准曲线上查得各自含 R 片段拷贝数 (结果见表 1)。从实验结果可见, Raji 细胞 DNA 所含 R 片段数二次结果一致, 都为 1.3×10^7 , 相当于每个细胞含 65 个 R 片段。因为已知 R 片段在 EBV 基因组中是单拷贝, 每个 R 片段可代表一个 EBV 基因组, 所以等于每个 Raji 细胞所含 EBV 基因组拷贝数为 65。H₁₈ 细胞 DNA 所含 R 片段, 二次结果分别为 5.4×10^7 和 5.6×10^7 相当于每个细胞含 2.7×10^2 和 2.8×10^2 个 EBV 基因组拷贝数。然而 P₃HR-1 细胞 DNA 中所含 R 片段, 二次结果相差较大, 分别为 2.6×10^7

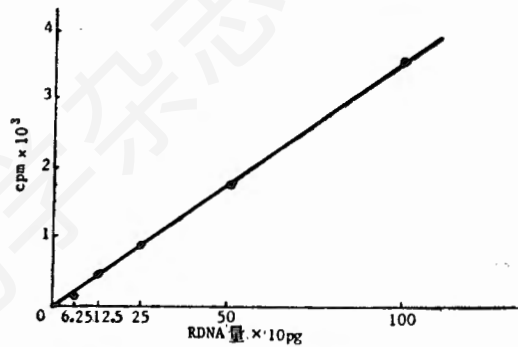


图7 R片段DNA含量测定标准曲线

*K*₅₆₂ 细胞 DNA (1 μg) 作为阴性对照和载体。点杂交后, R 片段的 cpm 减阴性对照的 cpm、探针为 $\sim 5 \times 10^7$ cpm/DNA 标记 P-R DNA

表1 每个细胞DNA中含EBV基因组拷贝数及每个EBV基因组中W片段拷贝数

细胞	项目	次数	R片段数	EBV基因组	W片段数	W片段拷贝数
			μgDNA	拷贝数	μgDNA	EBV基因组
H ₁₈		1	5.4 × 10 ⁷	270	7.2 × 10 ⁸	13
		2	5.6 × 10 ⁷	280	7.56 × 10 ⁸	14
Raji		1	1.3 × 10 ⁷	65	1.2 × 10 ⁸	9
		2	1.3 × 10 ⁷	65	1.29 × 10 ⁸	10
P ₃ HR-1		1	2.6 × 10 ⁷	130	1.68 × 10 ⁸	6
		2	3.4 × 10 ⁷	170	1.62 × 10 ⁸	5

和 3.4 × 10⁷, 相当于每个细胞分别含 130 和 170 个 EBV 基因组拷贝数。这种差异可能与 P₃HR-1 株细胞本身的不均一性有关^[11]。

*计算公式

$$\text{分子数} = \frac{\text{测得 R 片段 pg 数} / 10^{12}}{\text{片段分子量 (m)}} \times 6.022 \times 10^{23} = \frac{\text{pg}}{\text{m}} \times 6.022 \times 10^{11}$$

(Avogadro's number)

4. 不同细胞株 EBV 基因组中 W 片段的重复序列数。

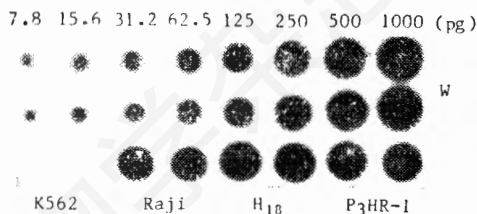


图8 EBV基因组中W片段重复拷贝数检测

W为纯化的EBV DNA Bam HI W片段。K₅₆₂, Raji 和 P₃HR-1 细胞 DNA 各为 1 μg, H₁₈ 细胞 DNA 为 0.25 μg 探针为 ~5 × 10⁷ cpm/μg DNA 的 P-W DNA

同样采用 DNA 点杂交法, 将不同量的纯化 W 片段 DNA 分别和 1 μg K₅₆₂ 细胞 DNA 点在膜上(图 8), 用 [³²P] 标记的 W 片段作探针杂交, 然后以标准 W 片段含量对相应的 cpm 值作标准曲线, 由此查得各株细胞 DNA 中所含 W

片段拷贝数(表 1)。从两次实验结果来看, Raji 细胞中, 每个 EBV 基因组含有 9—10 个 W 片段重复, 与文献的报道一致^[12]。H₁₈ 细胞中每个 EBV 基因组含有 13—14 个 W 片段, 每个 P₃HR-1 株 EBV 基因组所含的 W 片段数为 5—6 个。

讨论

EBV DNA 分子量较大, 为 1.8 × 10⁵ 个 bp^[12], 经 Bam HI 酶解后可产生 29 条片段(图 9)。其中 W 片段前后多次重复(多拷贝), 在不同病毒株中其重复次数不同, 一般约占总病毒 DNA 的 20% 左右。而 R 片段为单拷贝。EBV 基因组在寄主细胞中是以完整的或几乎是整的形式存在^[4, 13], 因而每个 R 片段可代表一个 EBV 基因组。本文用 EBV DNA 的限制性酶解片段作为标准 DNA 和探针, 通过 DNA 点杂交, 定量测定 EBV 基因组阳性细胞中 EBV 基因拷贝数。由于克隆的 EBV DNA 限制性酶解片段提取容易, 可大量制备, 又能够排除细胞 DNA 的干扰, 克服了以往用完整 EBV DNA 进行的复性动力学法和核酸杂交法中所遇到的一些不便。

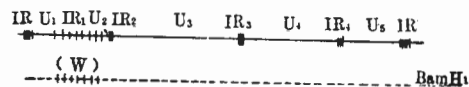


图9 EB病毒基因组的结构^[7]

在 DNA 点杂交中,用 R 片段作标准 DNA, [³²P]标记的 R 片段作探针,在 R 片段 DNA 小于 7.8 pg,即相当于 1.87×10^6 个 R 片段时,阳性反应仍非常明显。如以 10 μg 为细胞 DNA 点样量,则检测的灵敏度小于 1 个 EBV 基因组拷贝数/细胞,与 Brandsma 和 Miller 使用整个 EBV DNA 的点杂交方法^[2]以及复性动力学方法^[6]的灵敏度水平(0.06—0.6 个 EBV 基因组/细胞)十分接近。结合用 W 片段作标准 DNA 和探针,测出每个 Raji 细胞中具有稳定的 EBV 基因组拷贝数 65 个,每个 Raji 株 EBV 基因组中平均含有 10 个 W 片段,与文献报道一致^[14,15],说明该方法的准确性。实际上由于纯化的 EBV DNA 酶解片段可能存在少量细菌 DNA 的污染,因而使所测细胞中病毒基因组拷贝数偏低。但这种污染通过采用 CsCl 密度梯度离心和电泳纯化已降到极小,所以造成的误差不会很明显。另外,用此法测出每个 H₁₈ 细胞(国内不久前建株的人 B 淋巴细胞) DNA 中具有 270 个左右 R 片段,相当于每个细胞中含有 270 个左右 EBV 基因组拷贝。每个 H₁₈ 细胞的 DNA 中存在的 W 片段数为 3.69×10^3 ,相当于每个 EBV(H₁₈ 株)基因组含有 13—14 个 W 片段,其重复数是目前已知的 EBV 基因组中最高的。

本方法在临床病毒学可作为常规的核酸杂交技术,也可在病毒阳性细胞培养时用于定量检测细胞或上清液中病毒核酸。

摘 要

本文报道用非标记的克隆 EBV DNA 限制性酶解片段作标准,同时以标记的克隆片段 R 作探针,经 DNA 点杂交检测每个 H₁₈ 细胞中 EBV 基因组拷贝数。由于实验中结合用 W

片段作标准 DNA 和探针,测定每个 Raji 细胞中所具有稳定的 EBV 基因组拷贝数,以及每个 Raji 细胞中 EBV 基因组的重复序列 W 片段数均与前人报告的结果基本一致,所以说明了本文所用方法及结果的可靠性。此项技术可在病毒阳性细胞培养物中定量测定病毒核酸,也可用于临床分子病毒学作为常规的核酸杂交技术。

参 考 文 献

- [1] Maria A. and T. Lindahl., 1976, *Virology*, 73: 96-105.
- [2] Brandsma J. and Miller G., 1980, *PNAS. USA.*, 77: 6851-6855.
- [3] Nanoyama M. and Pagano J. S., 1971, *Nature (New Biol)* 233: 103-106.
- [4] Patterson M. A. et al., 1976, *Inter, J. Cancer* 20: 486-494.
- [5] Andiman W. et al., 1983, *J. Infect. Diseases.*, 146: 967-977.
- [6] Kulaki J. and M. Norval., 1985, *Intervirology*, 83: 3-5.
- [7] 邓正文等, 1984, *实验生物学报*, 17(3): 323-327.
- [8] Petterson U. and Sambrook J., 1973, *J. Mol. Biol.*, 73: 125-130.
- [9] Maniatis T. et al., 1982, Large-scale isolation of plasmid DNA. *Molecular Cloning*. pp. 86-96.
- [10] Dambaugh T. et al., 1980, *PNAS. USA.*, 77: 2999-3003.
- [11] Heston L. M. et al., 1982, *Nature* 295: 160-163.
- [12] Baer R. et al., 1984, *Nature*, 310: 207-211.
- [13] Matsus T et al., 1984, *Science* 226: 1322-1324.
- [14] Summers W. and G. Klein., 1976, *J. Virology*, 18: 151-155.
- [15] Heller M. et al., 1981, *J. Virology*, 38: 632-648.