

PCR 条件对扩增 SARS - CoV 多聚酶部分基因的影响

赵卫¹, 晏辉钧², 张文炳¹, 方丹云², 周经姣², 胡琼¹, 龙北国^{1*}, 江丽芳^{2*}

(广东省防治非典型肺炎科技攻关病原学研究专题组:1. 第一军医大学热带军队卫生学系微生物学教研室, 广东广州 510515;2. 广州中山大学中山医学院微生物学教研室, 广东广州 510080)

摘要:目的:对该实验室已建立的检测 SARS 冠状病毒多聚酶基因的套式 RT-PCR 方法进行优化。方法:从 SARS 病人的嗽口水标本中提取 RNA,调整套式 PCR 的退火温度,扩增 SARS 冠状病毒多聚酶部分基因。扩增出的阳性片段连接入 pGEM-T 载体中,测序后比较其与已知 SARS 冠状病毒的同源性。结果:通过改变 PCR 条件,成功从一 SARS 病人的嗽口水中扩增出 SARS 冠状病毒多聚酶部分基因。结论:针对不同标本优化 PCR 反应条件非常重要。

关键词:SARS 冠状病毒;套式 RT-PCR;检测;条件

中图分类号:R563.1+903 文献标识码:A 文章编号:1004-311X(2003)06-0011-02

Effects of PCR Conditions on the Amplification of the Partial Polymerase Gene of SARS - CoV

ZHAO Wei¹, YAN Hui-jun², ZHANG Wen-bing¹, FANG Dan-yun², ZHOU Jing-jiao², HU Qiong¹, LONG Bei-guo^{1*}, JIANGLi-fang^{2*}

(1. Department of Microbiology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, PRC;

2. Zhongshan Medical College Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, PRC)

Abstract: Objective: To optimize the RT-PCR method for detection the partial polymerase gene of SARS coronavirus (SARS-CoV) in our laboratory. Methods: The RNAs of the SARS-CoV contained in the gargles patients with SARS were extracted. The annealing temperatures were modified and then the partial polymerase gene was amplified. The amplicons were cloned into the pGEM-T vectors and then sequenced. The obtained sequences were compared with the published sequence of SARS-CoV. Results: The partial polymerase gene was got from the gargles of a patients with SARS after the annealing temperatures were changed. Conclusion: It is very important to optimize PCR conditions according to different samples of SARS patients.

Key words: SARS coronavirus (SARS-CoV); Nested RT-PCR; Detection

套式 PCR 是在一个反应体系中完成两次扩增,因此具有高度的敏感性,但合适的 PCR 反应条件是保持套式 PCR 高度敏感的必要条件,因此应对 PCR 条件进行优化。

重症急性呼吸综合征(severe acute respiratory SARS)是一种由 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)引起的新型传染病^[1]。本实验室采用世界卫生组织推荐的套式 RT-PCR 引物^[2],用于对 SARS 确诊及疑似病人的咽拭子、嗽口水标本的筛查工作。我们对 1 例 RT-PCR 结果与病毒分离结果不一致的标本进行了复查,通过调整 PCR 条件,成功扩出了阳性条带,说明了 RT-PCR 条件的重要性及标本本身对扩增结果影响的复杂性。

1 材料与amp方法

1.1 材料

1.1.1 实验标本:嗽口水标本 GDA14,取自广州非典型肺炎确诊病例。

1.1.2 菌株和细胞系:Vero-E6、大肠杆菌 DH5 为本实验室保存。SARS-CoV A14 株,从嗽口水标本 GDA14 中得到,为本实验室分离。

1.1.3 酶和试剂:提取质粒试剂盒用 QIAGEN 公司的 QIAamp Viral RNA Mini Kit (Cat. No. 52904),逆转录及第一次 PCR 用 QIAGEN 公司的 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Cat. No. 210210)。第二次 PCR 所用 Taq 酶和核酸凝胶回收试剂盒为 TaKaRa TaqTM和 PCR Fragment Recovery Kit,均购自宝生物工程公司,dNTP 购自 Pharmacia 公司,克隆载体 pGEM-T 购自 Promega 公司,IPTG 和 X-gal 购自华美生物工程公司。

1.1.4 引物:引物由上海生物工程公司合成。外引物位于 SARS 冠状病毒 Tor2 株 18138-18327 位,分别为 BNoutS:5'-ATG AAT TAC CAA GIC AAT GGT TAC-3', BNoutAS:5'-CAT AAC CAG TCG GIA CAG CTA C-3'。内引物位于 Tor2 株 18186-18294 位,分别为 BNinS:5'-GAA GCT ATT CGT CAC GGT CG-3',BNinAS:5'-CTG TAG AAA ATC CTA GCT GGA G-3'。

1.2 方法

1.2.1 病毒培养

Vero E6 细胞用 20%小牛血清 RPMI 1640 营养液培养。将来自嗽口水标本的病毒接种于已长成单层的 24 孔细胞培养板中,每孔 0.5ml,33℃ 吸附 90min,然后加含 2%小牛血清的 RPMI 1640 维持液 1.5ml,置 33℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。12h 后吸出培养液弃去,加入 2ml 维持液,在相同的条件下继续培养。每天光镜下观察细胞病变情况,出现病变后收集病毒液。

1.2.2 标本处理及 RNA 的提取:使用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 提取 RNA。参照试剂盒使用说明,从 160μl 嗽口水或病毒

培养上清中提取 RNA,溶于 30μl 水中备用。

1.2.3 RT-PCR:使用 Biometra 公司的 UNOII Thermocycler,进行 RT-PCR。

逆转录和第一次 PCR 使用 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit,参照试剂使用说明加样。

条件 1:反应条件为 45℃,30min;95℃,3min。/95℃,10s;60℃,10s(drop 1);72℃,30s。共 10 次循环。/95℃,10s;56℃,10s;72℃,30s。共 40 次循环。/72℃,7min。取 RT-PCR 产物,稀释 100 倍。取稀释 PCR 产物 3μl,10×PCR 缓冲液 3μl,引物 BNinS 和 BNinAS 各 1μl,TaKaRa TaqTM聚合酶 1U,10μM dNTPs 1μl,补水至总体积 30μl 进行 PCR 扩增。反应参数为:95℃,3min。/95℃,10s;60℃,10s(drop 1);72℃,20s。共 10 次循环。/95℃,10s;56℃,10s;72℃,20s。共 20 次循环。/72℃,7min。

条件 2:第一次 PCR 的退火温度改为 45℃,第 2 次 PCR 的退火温度改为 50℃,均不采用降落 PCR 的方法,其余同条件 1。

扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.2.4 PCR 产物的克隆测序:用 TaKaRa 的 PCR Fragment Recovery Kit 回收特异的扩增片段,直接与 pGEM-T 载体(Promega)连接,转化感受态菌 DH5,涂布含氨苄青霉素、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板,37℃ 培养后,挑取白色菌落经 PCR 及酶切鉴定后测序。

1.2.5 序列分析:对所测得序列用 Blast 同源性分析。收集 GenBank 中 SARS 冠状病毒的核苷酸序列,利用 DNASTAR 软件包中 MEGALIGN 程序对测得序列与收集序列进行同源比较。



图 1 RT-PCR 结果

Fig 1. Result of RT-PCR. M, DNA Marker DL2000 (TaKaTa); Lane 1: 条件 1 GDA14 外引物扩增产物; Lane 2: 条件 1 GDA14 内引物扩增产物; Lane 3: 条件 1 A14 外引物扩增产物; Lane 4: 条件 1 A14 内引物扩增产物; Lane 5: 条件 2 GDA14 外引物扩增产物; Lane 6: 条件 2 GDA14 内引物扩增产物; Lane 7: 条件 2 A14 外引物扩增产物; Lane 8: 条件 2 A14 内引物扩增产物

2 结果

2.1 RT-PCR

在用条件 1 和条件 2 分别对 SARS 病人的嗽口水 GDA14 及

收稿日期:2003-07-05;修回日期:2003-08-10

基金项目:广东省科技攻关项目("SARS 病毒感染细胞模型的建立及初步应用")

作者简介:赵卫(1970-),男,博士,讲师,研究方向:分子病毒学,发表学术论文 40 余篇; *通讯作者:龙北国(E-mail:gzlbg@fimmu.com);江丽芳(E-mail:jianglif@gzsums.edu.cn)。

SARS - CoV A14 组织培养上清提取的 RNA 进行两轮 PCR 后,电泳结果显示,使用条件 1,嗽口水内外引物均扩增不出阳性条带,而组织培养上清外引物可扩增出约 190bp 的条带,内引物可扩增出约 109bp 的条带,与预期大小完全一致;使用条件 2,嗽口水外引物均扩增不出阳性条带,内引物可扩增出约 109bp 的条带,而组织培养上清内外引物依然可扩增出阳性条带(图 1)。

2.2 序列分析和同源性比较

将所扩增的特异大小的 DNA 片段克隆到 pGEM - T 载体后,每例取 3 个克隆进行序列分析(图 2)。图 2 中 31 - 140 位

置为 SARS - CoV A14 株的序列(反向)。结果发现,所有测得序列的同源性均在 100%。所得测序结果与 GeneBank 中的 TOR2 (NC-004718)、BJ01 (AY278488)、BJ02 (AY278487)、BJ03 (AY278490)、BJ04 (AY279354)、URBANI (AY278741)、CUHKU - W1 (AY278554)、Frankfurt1 (AY291315)、HKU - 39838 (AY278491)、ZJ01 (AY297028)、TW1 (AY291451)、SIN2500 (AY283794)、SIN2677 (AY283795)、SIN2748 (AY283797)、SIN2774 (AY283798)、CUHK - SU10 (AY282752) 等 16 株 SARS - CoV 中相应序列完全相同。

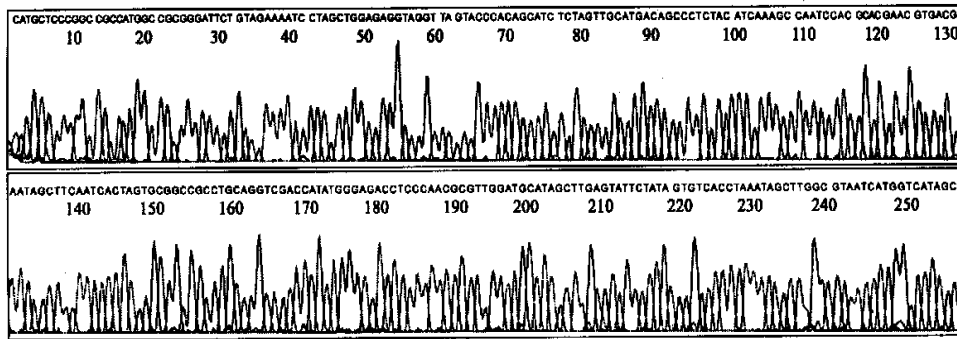


图 2 反转录巢式 PCR 片段测序图
Fig. 2 Sequence analysis of the nested RT - PCR product

3 讨论

PCR 技术可用于扩增大量的特异基因片段,具有敏感性高、特异性较好的优点,近年来已广泛用于各类传染性病原体的检查中^[3]。在此次非典型肺炎流行过程中,本课题组采用此项技术用于衣原体、支原体、流感病毒等微生物感染的排查工作,发挥了巨大作用。

在确定非典型肺炎的病原体为 SARS - CoV 后,本课题组组合成了包括世界卫生组织推荐的引物在内的多对引物,对多种样品进行了 RT - PCR 检测。发现用 BN_{in}outS、BN_{in}outAS、BN_{in}inS、BN_{in}inAS 两对引物进行套式 RT - PCR,使用条件 1,可从非典型肺炎病人的尸解肺组织、咽拭子、嗽口水标本及其相应的细胞培养上清中,扩增出与预期大小相同的特异片段,约在 109bp 左右。

目前已知的 RT - PCR 法检测临床标本如咽拭子、嗽口水中的 SARS - CoV,共同存在的问题是阳性率偏低,一般只在 30% 左右,报道阳性率较高的约 70%。由于标本来源较困难,本实验室在利用临床采集的咽拭子、嗽口水进行 SARS - CoV 分离的时候,除对套式 RT - PCR 阳性标本进行重点培养外,对阴性标本也用 Vero E6 等细胞进行接种。结果发现套式 RT - PCR 阴性的 GDA14 标本分离出了 SARS - CoV,且培养物套式 RT - PCR 结果呈阳性。在将 RT - PCR 条件调整为条件 2 后,从 GDA14 标本中也能扩增出阳性条带,且与 SARS - CoV 的同源性为 100%。条件 1 采用了降落 PCR 的方法,此方法的特点是更有利于确

保第一个引物 - 模板杂交事件发生在最互补的反应物之间,即那些产生目的扩增产物已开始几何扩增,在剩下的循环中处于超过任何非特异 PCR 产物的地位^[4]。条件 2 采用的方法相反,即在开始采用较低的退火温度,有利于引物与模板的结合,但缺点是可能有非特异扩增,而在第二个循环则采用较高的退火温度,有利于最互补的引物 - 模板杂交。由于采用条件 1 扩增后未出除引物二聚体外的任何条带,因此不再担心非特异性产物的产生,结果采用条件 2 得到了阳性结果。

PCR 检测的反应条件对检测结果的可靠性有很大影响。通过我们的这一实验,我们认为临床标本由于受采样时机、方法及个体差异的影响,使 PCR 条件的效果更为复杂。因此在情况许可的情况下,采用多种反应模式进行扩增可能是最为可靠的方案。

参考文献:

- [1] Thomas G Ksiazek, D V M, Ph. D. Dean Erdman, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome [J]. N Engl J Med, 2003, 348 (20): 1953 - 1966.
- [2] Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome [J]. N Engl J Med, 2003, 348 (20): 1995 - 2005.
- [3] 宋志荣, 郭宏. 应用 PCR 方法检测致病微生物研究进展 [J]. 临床荟萃, 2002, 17(7): 419 - 420.
- [4] C W 迪芬巴赫, G S 德维克斯勒. PCR 技术实验指南 [M]. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 1999. 34.

纳豆激酶基因的表达及纯化

张淑梅, 李晶, 王玉霞, 王佳龙, 赵晓宇

(黑龙江省科学院应用微生物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150010)

摘要: 利用 PCR 方法从分泌纳豆激酶的枯草杆菌基因组 DNA 中扩增得到纳豆激酶基因(NK), 利用基因重组技术构建了纳豆激酶基因的表达载体 pETNK。在 IPTG 诱导下, 实现了在大肠杆菌中高效表达, 经 SDS - PAGE 电泳分析和薄层扫描结果显示, 表达的目的蛋白占菌体蛋白的 21.5%。将表达产物经过 DEAE - Cellulose - DE52 和 Sephadex - G100 两个柱分离纯化, 得到纯的纳豆激酶蛋白干粉, 经琼脂糖 - 纤维蛋白平板法测出 1mg 纳豆激酶干粉的溶栓活性相当于 2000u 尿激酶。从基因工程角度研究纳豆激酶基因的克隆、表达及纯化, 为用基因工程菌生产纳豆激酶奠定了基础。

关键词: 纳豆激酶基因; 克隆; 表达; 纯化; 活性测定

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 311X(2003)06 - 0012 - 04

Expression and Purification of Nattokinase Gene

ZHANG Shu - mei, LI Jing, WANG Yu - xia, WANG Jia - long, ZHAO Xiao - yu

(Institute of Applied Microbiology, Heilongjiang Academy of Science, Harbin 150010, PRC)

Abstract: Nattokinase gene was amplified from genomic DNA of *Bacillus subtilis* by PCR. And cloned into pET23a + vector. Under IPTG induction, Nattokinase protein was obtained by isolation and purification technology. SDS - PAGE shows the expression protein was 21.5% of total cell protein. Experiment proved Nattokinase protein power the activity of dissolving thrombus. Enzyme activity of 1mg Nattokinase protein equals to 2000u. Cloning, expression and purification of Nattokinase gene were researched in order to product Nattokinase by gene engineering strain.