

片叶提取其 DNA。进行 SCAR 分析。分析结果见图 1、图 2。图 1 为 OPN - 07₇₂₇ 的 SCAR 扩增结果,可见抗亲(1)及 F₃ 抗蚜单株(3 - 13)扩增出了 OPN - 07₇₂₇ 这条特异性谱带,而感亲(2)及 F₃ 感蚜单株(14 - 22)的扩增产物无谱带存在。图 2 为 OPN - 08₃₇₃ 的 SCAR 分析结果,从图谱中也可见,抗亲(1)及 F₃ 抗蚜单株(3 - 13)扩增出了 OPN - 08₃₇₃ 这条特异性谱带,而感亲(2)及 F₃ 感蚜单株(14 - 22)未有扩增产物的存在。这表明了以 SCAR 标记进行分子标记辅助选择及后代跟踪鉴定的可行性及准确性。

2.2 对几种抗感品种的 SCAR 分析

取已鉴定的稳定的抗蚜保持系 TAM428、LR9198、5 - 27、2000 - 3259B - 1 及感蚜品种 ICS - 12B、矮四、TX622B、三尺三于 3 叶 1 心期取叶片,每个品种取 20 株的叶片装入塑料袋,用四分法取样,分别提取各个品种的 DNA,以提取的 DNA 为模板进行 SCAR 分析。分析结果如图 3、图 4 所示。

从图 3 和 4 可见,对抗蚜品种 TAM428(1)、LR9198(2,3)、5 - 27(4,5)、2000 - 3259B - 1(6)分别以 OPN - 07₇₂₇ a、OPN - 07₇₂₇ b 及 OPN - 08₃₇₃ a、OPN - 08₃₇₃ b 二对特异性引物进行扩增,结果分别扩增出了 OPN - 07₇₂₇、OPN - 08₃₇₃ 这两条特异性谱带。而在感蚜品种 ICS - 12B(7)、矮四(8)、TX622B(9)、三尺三(10,11)的扩增产物中都没有扩增出任何产物。这再一次证实了 SCAR 标记检测的可靠性及用与抗蚜基因紧密连锁的分子标记作为抗蚜育种辅助选择的可行性。

3 讨论

3.1 通过用 SCAR 标记对 F₃ 代单株的跟踪鉴定分析发现,如果在 F₂ 代的分离群体中找到与抗蚜基因抗蚜紧密连锁的分子标记,即可以在 F₃ 代抗蚜单株中得到此特异性标记且保持稳定。

3.2 本试验所选用的抗感品系皆为已鉴定过的稳定的抗感品系,故可不用田间鉴定,可以直接取其种子或幼苗进行 SCAR 分析。通过对抗感品系幼苗叶片的 SCAR 分析,可见,利用一种抗蚜品种与另一种感蚜品种杂交后的 F₂ 代分离群体去寻找多态性的分子标记这种方法的可行性及准确性,并可将在此群体中寻找到的标记应用于其它抗感品种或后代群体的鉴定中,从而进一步有力证明了分子标记在作物遗传育种中作为辅助选择工具的可行性。

3.3 用已鉴定的抗感品种来检测与抗蚜基因紧密连锁的 SCAR 标记,在实践应用中具有重大的意义,虽然本试验由于时间关系只做了苗期叶片的 SCAR 分析,但仍完全可以说明问题(因为应用分子标记去鉴定抗感品种不受发育时期的限制)。若增加抗感品种成株期间田间 SCAR 分析,便能更加准确地确认本试验建立的 2 个与抗蚜基因紧密连锁的 SCAR 标记的应用价值,并可在此标记直接应用于抗感品种的鉴定中去。

参考文献:

- [1] Michelmore RW, Paran I and Kesseli RV. Identification of markers linked to disease - resistance genes by bulked segregate analysis: A rapid method detect markers in specific genomic regions by using segregating populations[J]. *Proc. Natl. Acad. USA*, 1991, 88: 9828 - 9832.
- [2] 张德水, 陈受宜. DNA 分子标记、基因组作图及其在植物遗传育种上的应用[J]. *生物技术通报*, 1995, 5: 15 - 22.
- [3] 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J]. *中国农业科学*, 1996, 29(4): 1 - 10.
- [4] Doyle JJ, Koye JL. Isolation of plant DNA fresh tissue[J]. *Focus*, 1990, 12: 13 - 15.
- [5] 李玥莹, 赵姝华, 杨立国, 等. 高粱抗蚜基因的分子标记的建立[J]. *作物学报*, 2003, 29(4): 534 - 540.
- [6] 李玥莹, 赵姝华, 杨立国, 等. 高粱抗蚜基因的 RAPD 分析[J]. *生物技术*, 2002, 12(4): 6 - 8.

广东地区 SARS - CoV 细胞培养模型的建立和初步应用

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

(1. 广东省防治非典型肺炎科技攻关病原学研究专题组, 广东广州南方医科大学热带军队卫生学系微生物学教研室, 510515, 广东 广州; 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: 建立中国广东地区 SARS - CoV 细胞培养模型。方法: 通过将 SARS - CoV 广东地区分离株 GD322 在 Vero E6 细胞中连续传代, 检测 TCID₅₀ 获得稳定的细胞模型。利用此细胞培养模型, 对不同温度、紫外线等条件下 SARS - CoV 的存活时间进行了比较。对重组人复合干扰素 抗病毒效果进行了筛查。结果与结论: SARS - CoV 对外界环境抵抗力比普通冠状病毒强, 对重组人复合干扰素 有较高的敏感性, 抑制指数达 4.9。

关键词: SARS 冠状病毒; 细胞模型; 温度; 干扰素

中图分类号: Q813.1⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 311X(2005)01 - 0013 - 03

Establishment and Application of Cell Model Infected by SARS Coronavirus in Guangdong

ZHAO Wei¹, FANG Dan - yun², ZHOU Jing - jiao², ZHANG Wen - bing¹, YAN Hui - jun², HU Zu - qiong¹, LONG Bei - guo^{1*}, JIANG Li - fang^{2*}

(1. Department of Microbiology, Southern Medical University, Guangzhou 510515;

2. Zhongshan Medical College Sun Yat - sen University, Guangzhou 510080, P. R. China)

Abstract: Objective: To establish a cell model of SARS coronavirus (SARS - CoV) in Guangdong. **Methods:** The Vero E6 cells were consistently infected by SARS - CoV GD322 and TCID₅₀ were assayed. The surviving time of SARS - CoV GD322 were compared in different temperatures and ultraviolet ray. The antiviral effect of rIFN - γ was studied. **Results and Conclusion:** The resistance of SARS - CoV to conditions was stronger than the other coronavirus. The rIFN - γ was effective in SARS - CoV and the inhibit index was 4.9.

Key words: SARS coronavirus (SARS - CoV); cell model; temperature; IFN

传染性非典型性肺炎, 也称严重急性呼吸系统综合症 (severe acute respiratory syndrome, SARS) 是一种新现的传染性较强的病毒性疾病, 国内外研究结果已证明本病的病原体是一种新型冠状病毒 (SARS 冠状病毒, SARS - CoV)^[1]。从临床表现、治疗效果、基因序列分析等资料看, SARS - CoV 与已知冠状病毒和其它微生物有较大差异, 因此它对外界环境的抵抗

力也可能与已知冠状病毒不同。目前已有建立 SARS - CoV 细胞培养模型报道^[2], 考虑到 SARS - CoV 是一种 RNA 病毒, 不同地区、不同流行时期分离株基因组成成分、生物学特性可能有一些变异, 因此建立多株 SARS - CoV 的细胞培养模型非常重要。

本研究利用本实验室分离培养的 SARS - CoV 广东分离株 GD322, 建立了细胞培养模型, 对部分物理因素及干扰素对其影响进行了初步评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

Vero - E6 为本实验室保存。SARS - CoV GD322 株, 为本

收稿日期: 2004 - 08 - 15; 修回日期: 2004 - 12 - 18

攻关项目: 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", GD2003 - 80); 广东省医药科研基金资助项目 ("SARS 冠状病毒基因组特征与流行及临床关系的研究", A2004378)

作者简介: 赵卫 (1970 -), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 分子病毒学, 发表论文 50 余篇; * 通讯作者: 龙北国, E - mail: gzbq @fimmu.com; 江丽芳, E - mail: jianglf @gzsums.edu.cn.

实验室分离^[3]。

1.1.2 培养基

RPMI 1640 为 Gbco 公司产品;新生小牛血清和胎牛血清购自杭州四季青公司。

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。将来自漱口标本的 SARS-CoV GD322 株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 病毒滴度实验

采用 96 孔聚苯乙烯微量培养板,首先用 RPMI-1640 维持液(含 2% FCS、1% 青霉素和链霉素、1% HEPES)将 SARS-CoV 进行 10 倍系列稀释,从 10⁻¹ 到 10⁻⁷,每个稀释度加 4 孔,每孔加 0.1ml,然后每孔加入 Vero E6 细胞悬液(120 万/ml)0.1ml,5% CO₂、33 培养,每天观察细胞病变,共观察 7d,记录观察结果。按 Reed-muench 法计算 TCID₅₀ 值,滴度以 Log(TCID₅₀/ml) 表示。实验重复 3 次。

1.2.3 不同温度条件下 SARS-CoV 的存活实验

将 SARS-CoV GD322 株用 RPMI 1640 维持液稀释到 100 TCID₅₀,放置于 100、10、20、30min;60、30min;56、20、30min;37、12、24h;室温、12、24h;4、12、24、72h。处理的病毒液接种到 Vero E6 细胞中,观察引起的细胞病变情况。实验重复 3 次。

1.2.4 紫外线照射杀病毒实验

将 SARS-CoV GD322 株用 RPMI 1640 维持液稀释到 100 TCID₅₀,将病毒悬液置于细胞培养皿中,暴露于生物安全柜的紫外灯照射下,分别放置 20min、30min,接种 Vero E6 细胞,观察

引起的细胞病变情况。实验重复 3 次。

1.2.5 重组人复合干扰素的抗病毒效果

1.2.5.1 重组人复合干扰素对细胞毒性

将 Vero E6 细胞形成单层后,加系列 2 倍稀释的干扰素处理,其干扰素浓度分别为 0.5、1、2、4、8u/ml,每浓度 3 瓶,对照组用营养液代替,37.5% CO₂ 培养 4d 左右,用胰蛋白酶消化分散,台盼蓝染色,于血球计数盘内计数活细胞和死亡细胞数,并计算死亡率,重复实验 2 次。

1.2.5.2 重组人复合干扰素对细胞病变的抑制作用

将长成单层的 96 孔 Vero E6 细胞板,感染 100 TCID₅₀ 的病毒液,吸附 2h 后,倾去病毒液,加系列 2 倍稀释的干扰素处理,其干扰素浓度分别为 0.5、1、2、4、8u/ml,每浓度 4 孔,37.5% CO₂ 培养 7d 左右,每日观察,记录细胞病变情况,重复实验 2 次。

1.2.5.3 重组人复合干扰素对 SARS-CoV GD322 的抑制指数

将长成单层的 96 孔 Vero E6 细胞板,加入系列 10 倍稀释的病毒液各 0.1ml,每浓度 4 孔,吸附 2h 后,倾去病毒液,加 2u/ml 的干扰素处理,37.5% CO₂ 培养 7d 左右,每日观察细胞病变情况,7d 后确定各组的 TCID₅₀,重复实验 2 次。抑制指数计算公式:抑制指数 = 空白对照 IgTCID₅₀ - 处理组 IgTCID₅₀。

2 结果

2.1 SARS-CoV 的 TCID₅₀

本实验室所分离的 SARS-CoV GD322 株可在 Vero E6 等细胞上多次传代,接种 100 TCID₅₀ 的病毒液 3d 可引起细胞病变,7 日病变可达到 III。3 次病毒滴度实验的 TCID₅₀ 测定值分别为 10^{5.98}、10^{6.33}、10^{6.25},表明 GD322 在 Vero E6 细胞中生长状况较稳定,并可达到较高的生长滴度,是一个较好的可用作 SARS-CoV 生物学特性及药物评价等方面研究的细胞模型。

2.2 温度及紫外线对 SARS-CoV GD322 存活的影响(表 1)

表 1 温度及紫外线对 SARS-CoV GD322 存活的影响
Table 1 Effects of temperatures and ultraviolet ray on the surviving time of SARS-CoV GD322

物理因素	作用时间	结 果					
		2d	3d	4d	5d	6d	7d
4	12h	++++	++++	++++	++	++++	++++
	24h	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	72h	++++	++++	++++	++++	++++	++++
室温	12h	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	24h	±	+++	++++	++++	++++	++++
37	12h	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	24h	±	+++	++++	++++	++++	++++
56	20min	++	++	++	++	++	++
	30min	-	-	-	-	-	-
60	30min	-	-	-	-	-	-
100	10min	-	-	-	-	-	-
	20min	-	-	-	-	-	-
	30min	-	-	-	-	-	-
紫外线	20min	-	-	-	-	-	-
	30min	-	-	-	-	-	-

表 2 重组人复合干扰素对 Vero E6 的细胞毒性

Table 2 Toxicity of rIFN- to Vero E6 cells

浓度(u/ml)	各瓶细胞死亡率(×10 ⁻²)						X ±s	P 值
8	5.0	3.5	4.1	3.6	4.4	5.6	4.37 ±0.83	>0.05
4	6.4	4.3	4.6	4.5	5.2	6.1	5.18 ±0.89	>0.05
2	3.2	5.3	4.7	7.1	3.7	6.8	5.13 ±1.58	>0.05
1	4.4	6.0	6.3	4.4	4.2	5.0	5.04 ±0.87	>0.05
0.5	3.5	5.8	6.4	5.2	4.3	3.8	4.83 ±1.15	>0.05
0	4.4	7.5	3.0	5.3	4.7	3.5	4.73 ±1.58	

利用 SARS-CoV GD322 株细胞培养模型,对不同温度、紫外线等条件下 SARS-CoV 的存活时间进行了比较。发现 4

可存活 3d 以上,室温及 37 可存活 1d 以上,56 处理 20min,病毒仍具感染性,56 处理 30min、60 处理 30min、100 处理 10min、紫外线照射 20min 可杀灭病毒。

表 3 重组人复合干扰素对 SARS-CoV GD322 株细胞病变的抑制作用

Table 3 Antiviral activity of rIFN- on Vero E6 cells infected by SARS-CoV GD322

病变情况	干扰素浓度(u/ml)					阴性对照
	0.5	1	2	4	8	
	III	III	II	+	±	III

2.3 重组人复合干扰素的抗病毒活性

2.3.1 重组人复合干扰素对细胞毒性

结果表明重组人复合干扰素 对 Vero E6 细胞无毒性作用。
1.2.5.2 重组人复合干扰素 对细胞病变的抑制作用
由表 3 可知,重组人复合干扰素 对 SARS - CoV GD322 的抑制浓度为 (1 - 4) u/ml。
1.2.5.3 重组人复合干扰素 对 SARS - CoV GD322 的抑制指数
加入重组人复合干扰素 的病毒滴度为 $10^{1.2}$ TCID₅₀,空白对照组为 $10^{6.11}$ TCID₅₀,抑制指数为 4.9。

3 讨论

2002 年 11 月份开始以来,SARS 在短时间内在我国和世界上不同的国家和地区迅速蔓延,严重威胁到人类生命健康^[4]。其病原体 SARS - CoV 是一种全新的冠状病毒,基因组结构与一般的冠状病毒有较大的差异,导致其生物学特征可能it发生较大的改变。

国内外多个实验室利用 Vero E6、MDCK、NCI - H292 及 LLC - MK2 等细胞株,从患者咽拭子、嗽口水、尸解组织、血清等标本中分离出多株 SARS - CoV,其中得到较多应用的是 Vero E6 细胞^[5]。李晓英等^[2]建立了可用于筛选抗 SARS 冠状病毒药物的细胞模型,最终认定 BJ01 株最敏感的细胞为 Vero - E6。本实验室以 SARS - CoV 广东分离株 GD322 为研究对象,建立了 SARS - CoV 的 Vero - E6 细胞培养模型,该模型较稳定,细胞病变典型,病毒滴度较高。利用细胞模型,对不同地区 SARS

- CoV 分离株进行研究,有利于全面揭示 SARS - CoV 的生物学特性。

普通冠状病毒对理化因子的耐受力较差,如在 56 处理 10min、37 数小时可使冠状病毒 229E 株的感染性丧失^[6]。本研究发现 SARS - CoV 对外界的抵抗力较强,如在室温及 37 放置 1d 仍具有活性。但对紫外线较敏感,20min 即可杀灭,提示 SARS 病房可用紫外线消毒。重组人复合干扰素 能有效抑制 SARS - CoV 在细胞内的复制,值得进一步开发利用。

参考文献:

- [1]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.
- [2]李晓英,朱舜亚,魏云玲,等. 抗 SARS 冠状病毒药物细胞筛选模型的建立及应用[J]. *军事医学科学院院刊*, 2003, 27(5) :325 - 326.
- [3]江丽芳,赵卫,晏辉钧,等. SARS 冠状病毒的分离与鉴定[J]. *中国病毒学*, 2003, 18(6) :544 - 547.
- [4]WHO. Cumulation number of reported cases (SARS) [EB/OL]. <http://www.who.int/csr/sarcountry/2003-06-19>
- [5]祝庆余,秦鄂德,王翠娥,等. 非典型肺炎病例标本中新型冠状病毒的分离与鉴定[J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(4) :106 - 111.
- [6]闻玉梅. 现代医学微生物学[J]. 上海:上海医科大学出版社, 1999. 1059 - 1067.

等位基因特异性引物 PCR 技术及其应用研究

马厚勋¹,牛永红²,李章勇²,谢正祥²

(1. 重庆医科大学附属第一医院老年病科,重庆 400016; 2. 重庆医科大学基础学院生物医学工程研究室,重庆 400016)

摘要:目的:研究建立等位基因特异性引物 PCR 技术体系,并将其应用于基因单核苷酸多态性研究工作。方法:通过美国国家生物信息中心(NCBI)的 genBank 获取基因序列及其相应位点的 SNP 信息。利用 Primer 5.0 软件设计引物,并经 NCBI 的 Blast2.0 软件检验其特异性。结果:建立了单一等位基因特异性引物 PCR (SASP - PCR) 与嵌套式等位基因特异性引物 PCR (NASP - PCR) 两种技术,并应用于 β_2 肾上腺素受体及内皮源性一氧化氮合酶基因单核苷酸多态性的研究,证实该技术的稳定性和优越性。结论:等位基因特异性引物 PCR 技术是一种更为简便、特异性较高、费用少的、便于推广的 SNP 检测方法,特别是在群体基因单核苷酸多态性研究中更有优势。

关键词:单核苷酸多态性;等位基因特异性引物 PCR; β_2 肾上腺素受体;一氧化氮合酶

中图分类号:R349.5 文献标识码:A 文章编号:1004 - 311X(2005)01 - 0015 - 04

Study of Allelic Specific Primer Polymerase Chain Reaction Technique and its Application

MA Hou - xun¹, NIU Yong - hong², LI Zhang - yong², XIE Zheng - xiang²

(1. Department of Geriatrics, The First Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016;

2. Department of Biomedical Engineering in Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, P. R. China)

Abstract: Objective: To study and establish an allelic specific primer polymerase chain reaction (ASP - PCR) technique system and to apply this technique to study single nucleotide polymorphism (SNP) of genes. Methods: It got the information of nucleotide sequences and their corresponding SNPs of gene from genBank of National Central of Biotechnology Information (NCBI). The primers were designed by Primer 5.0 software and their specificity was tested by NCBI Blast 2.0 software. Results: They successfully designed and established two technique systems of single allelic specific primer polymerase chain reaction (SASP - PCR) and nested allelic specific primer polymerase chain reaction (NASP - PCR). The two methods were applied to study SNPs of beta - 2 Adrenoceptor and endothelium nitric oxide synthase. The superiority and stability of ASP - PCR technique on determining SNPs of genes have been tested. Conclusions: The ASP - PCR technique is a new method on determination of SNP with more convenient, more specific, less spend and easy to application and has much more advantage especially in the study of population gene polymorphism.

Key words: single nucleotide polymorphism; allelic specific primer; polymerase chain reaction; beta - 2 Adrenoceptor; nitric oxide synthase

研究发现人类健康与疾病的个体差异性就在于其基因多态性,其中基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP, 下同) 是最普遍的基因多态性。目前对 SNP 的检测仍然大量使用 (尤其国内) PCR - RFLP (polymerase chain reaction - Restricted Fragment Length Polymorphism) 技术。该技术需限制性内切酶来识别 SNP 位点。就国内而言,有的限制性内切酶不但昂贵且难于获得。本研究利用 Crick 理论及等位基因位点的

特异性设计特殊引物建立等位基因特异引物 PCR 技术 (allelic specific primer polymerase chain reaction, ASP - PCR) 体系,用于 β_2 肾上腺素受体 R16G SNP 及内皮源性一氧化氮合酶基因 (endothelial nitric oxide synthase, NOS3) NOS3 T - 786C 与 NOS3 A - 922G SNP 的研究;而目前尚未发现有明确提出用 ASP - PCR 技术于上述 SNP 检测的文献。该技术可最大限度地代替 PCR - RFLP 技术,为生物医学基因结构与功能研究提供一种更为简便、特异性较高、费用少的、便于推广 (特别是群体基因多态性研究) 的 SNP 检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

选择自然人群个体 500 例作为研究对象,男 261 例,女 239 例,男女之比为 1.09 1。年龄范围在 23 - 89 岁,平均年龄 62.03 \pm 3.5 岁。留取 EDTA 抗凝外周静脉全血 1ml,用于抽提白

收稿日期:2004 - 05 - 17;修回日期:2004 - 08 - 08

作者简介:马厚勋(1966 -),男,博士生,副主任医师,研究方向:老年心血管疾病基础与临床,获市政府、市卫生局成果奖各 1 项,发表论文 20 余篇, E - mail: mahouxun @public. cta. cq. com; * 通讯作者:谢正祥(1938 -),男,教授,生物医学工程专业博士生导师及心血管专业博士生导师,研究方向:医学信号处理、心血管系统基因型与表现型,获 4 项政府成果奖,发表论文 70 余篇,专著 4 部, E - mail: bmezxxie @sohu. com.