技术方法

文章编号:1000-5404(2005)24-2472-03

体外转录法制备SARS冠状病毒RNA片段

Preparation of a RNA fragment of SARS coronavirus with transcription *in vitro*

张克斌[1],戴福云[1],光丽霞[2],周世文[2],钱桂生[1] (第三军医大学新桥医院:[1]全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,[2]医学实验技术中心,重庆 400037)

提 要:目的 通过体外转录获得SARS冠状病毒RNA片段,为建立RT-PCR和荧光定量PCR诊断方法提供阳性对照。**方法** 根据GenBank登录SARS冠状病毒Tor2株基因组序列,选择基因组中18138-18327nt作为目的扩增序列,并将其分解为首尾重叠的3个片段,人工合成对应的单链DNA序列,通过退火延伸获得全长dsDNA片段,PCR扩增该片段后,连接至载体pMD 18T上,筛选含目的插入片段的阳性重组质粒pMD 18T-SARS,用*Bam*H Ⅰ和*Hind* Ⅲ切出目的片段,连接至线性化表达性质粒pGEM上;筛选阳性重组质粒pGEM-SARS,测序鉴定后,经*Hind* Ⅲ酶切线性化,用T7 RNA聚合酶进行体外转录,得到含SARS冠状病毒目的序列的RNA片段,转录产物经电泳观察后,用RT-PCR验证。**结果** 获得含SARS冠状病毒目的基因序列的RNA片段。**结论** 该RNA片段可用于SARS冠状病毒RT-PCR和荧光定量RT-PCR诊断方法的阳性对照。

严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome,SARS)是一种新出现的传染性疾病,于2002年11月最早在我国广东省发现,后迅速向五大洲蔓延[1,2]。不久确定SARS冠状病毒(SARS coronaviruses, SARS CoV)为SARS病原体[2-5]。开发安全有效的基因诊断试剂对于SARS的临床诊断和疾病控制都具有重要意义[5],为防疫情迅速扩散,2003年全国多家单位研制了相关检测试剂盒[2,6]。2003年4-5月,我们已进行了SARS冠状病毒的RT-PCR、实时定量RT-PCR方法的建立和试剂盒的研制。本研究介绍我们通过体外转录获得SARS冠状病毒RNA片段,并将其作为阳性RNA对照的方法,该研究为SARS冠状病毒RT-PCR、实时定量RT-PCR方法的建立提供基础,并为同类病毒一些基因功能的前期研究提供方法学借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与菌种质粒 Ex-*Tag*酶,RT-PCR试剂盒,T-载体pMD 18T(含连接酶),T7 RNA聚合酶,RNA marker均购自Takara生物公司;DNA marker、DNA片段回收试剂盒购自北京鼎国生物公司;质粒pGEM和大肠杆菌$DH_{5\alpha}$由本室保存。

1.1.2 SARS冠状病毒基因组序列的ssDNA片段及引物的设计、合成 ssDNA片段的设计:SARS CoV为正链RNA病毒,根据当时WHO网络实验室推荐的几对引物,同时考虑到扩增片段的长度与人工合成的成本及难度,我们选择了SARS CoV Tor2株基因组中18138-18327nt序列为模板。将对应于该段序列的DNA共190 bp区域分解为3个片段,采用基因合成的方式先行人工合成单链DNA,片段1:5′-ATGAATTACCAAGTCAATGGTTACCCTAATATGTTTATCACCCGCGAAGAAGCTATTCGT**CACGTTCGTGCGTGG**-3′(黑体字部分为与片段2重叠序列);片段2:5′-**GTAGGTTAGTACCCA**CAGCATCTCTAGTTGCATGACAGCCCTCTACATCAAAGCCAATCC**ACGCACGAACGTG**-3′(黑体字部分分别为与片段1及片段3重叠区域);片段3:5′-CATAACCAGTCGGTACAGCTACTAAGTTAACACCTGTAGAAAATCCTAGCTGGAGAG**GTAGGTTAGTACCCA**-3′(黑体字部分为片段2中5′-端的黑体字部分的相同序列)。

PCR引物设计与合成:上游引物:5′-ATGAATTACCAAGTCAATGGTTAC-3′,下游引物:5′-GAAGCTATTCGTCACGTTCG-3′。上述片段和引物均在上海申友公司合成。

1.2 方法

1.2.1 全长190 bp dsDNA片段的获得 ssDNA片段的退火延伸:在50 μl反应体系中加入:10×PCR buffer 5 μl,$MgCl_2$(25 mmol/L)5 L,dNTP(各2.5 mmol/L)5μl,Ex *Taq*酶(3 U/μl)1 μl,片段1(10 μmol/L)2 μl,片段2(10 μmol/L)2 μl,ddH_2O 30 μl。热循环:[94 ℃,30 s;52 ℃,30 s;72 ℃ 1 min]×10个循环;72 ℃,5 min。取出反应管,再加入片段3(10 μmol/L)2 μl,热循环:94 ℃,3 min;(94 ℃,30 s;52 ℃,30 s;72 ℃ 1 min)×10个循环;72 ℃,5 min。

将上步中获得的产物用ddH_2O作1∶1 000稀释后,作为模板,以双侧引物作PCR反应,反应体系50 μl:10×PCR buffer 5

基金项目:重庆市攻关课题(2003年紧急启动项目)
Supported by Urgent Project of Chongqing Science and Technology Committee (2003)

作者简介:张克斌(1968-),男,四川省岳池县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事医学微生物学方面研究,发表论文10余篇。电话:(023)68755381
通讯作者:钱桂生,电话:(023)68755603

收稿日期:2005-05-10;修回日期:2005-09-26

μl, $MgCl_2$(25 mmol/L) 5 μl, dNTP (各 2.5 mmol/L) 5 μl,上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μl, Ex Taq 酶(3 U/μl) 1 μl, 稀释 DNA 模板 1 μl, ddH_2O 29 μl。热循环:94 ℃,3 min;(94 ℃,10 s;52 ℃,10 s;72 ℃ 20 s) ×35 个循环;72 ℃,5 min。

1.2.2　PCR 产物的 T-A 克隆　　将上步所获得的全长 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,回收 190 bp 目的 DNA 条带,产物检测 $D(260)$,计算 DNA 浓度。

回收产物连接至 T-载体 pMD-18T,连接反应参照说明书进行,同时设置阳性对照和阴性对照组。

取全部 10 μl 连接产物,转化大肠杆菌 $DH_{5\alpha}$感受态($CaCl_2$法制备)。转化产物涂布于含 X-gal 和 IPTG 的 Amp^rLB 平板,37 ℃过夜培养,次日挑选白色菌落,各自接种于液体 Amp^rLB 中,37 ℃,180 r/min 振荡培养,碱裂解法小量提取重组质粒。

所提质粒用 ddH_2O 稀释 10 000 倍后作为模板,采用上述引物作 PCR,反应体系与热循环同步骤 1.2.1。观察能否扩增出 190 bp 目的片段。

1.2.3　目的 DNA 转入表达载体 pGEM　　挑选能扩增出 190 bp 目的片段的阳性 T-克隆质粒,用限制性内切酶切出目的片段,由于插入片段中不含 *Bam*H Ⅰ和 *Hind* Ⅲ位点,故本实验采用内切酶 *Bam*H Ⅰ和 *Hind* Ⅲ(TaKaRa)作双酶切。酶切反应按说明书进行。酶切产物琼脂糖凝胶电泳;回收约 230 bp 的 DNA 片段,产物检测 $D(260)$,计算 DNA 浓度。

同时将 pGEM (本实验室自己保存)用 *Bam*H Ⅰ和 *Hind* Ⅲ酶切线性化,产物经琼脂糖凝胶电泳,回收线性化片段,回收产物检测 $D(260)$,计算 DNA 浓度。

将上步回收的约 230 bp 片段与 pGEM 线性化产物作连接反应,反应按说明书进行。

取全部 10 μl 连接产物,转化大肠杆菌 $DH_{5\alpha}$感受态($CaCl_2$法),碱裂解法提取重组质粒。方法同 1.2.2。所提质粒用 ddH_2O 稀释 1∶10 000 倍后作为模板,作 PCR,反应体系与热循环同步骤 1.2.1。观察能否扩增出 190 bp 片段,同时作 *Bam*H Ⅰ与 *Hind* Ⅲ双酶切鉴定。阳性质粒送上海申友公司测序。

1.2.4　T7 RNA 聚合酶体外转录　　选择上步所获阳性重组质粒 pGEM-SARS 经 *Hind* Ⅲ酶切线性化,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳,回收线性化片段,方法同上,回收产物检测 $D(260)$,计算 DNA 浓度。

体外转录采用 TaKaRa 公司的 T7 体外转录试剂盒,反应体系 20μl: 10 × T7 RNA polymerase buffer 2 μl, DTT 2 μl, NTP 4 μl, RNasin 0.5 μl,线性化 pGEM-SARS 质粒(0.8 μg/μl) 2 μl, T7 RNA polymerase(50 U/μl) 1 μl, DEPC 处理水 9 μl。37 ℃,1 h 反应。再向反应管中加入 10 U 的 DNase Ⅰ, 37 ℃,10 min 消化质粒 DNA。产物加入 430 μl DEPC 处理水,稀释,再加入等体积酚∶氯仿∶异戊醇(25∶24∶1)抽提后,乙醇沉淀,方法参照试剂盒说明书进行。用 20 μl DEPC 处理水溶解沉淀。测定 $D(260)/D(280)$值,计算产物浓度。

转录产物于含 MOPS 的 2% 琼脂糖凝胶电泳,方法参照 Takara生物公司 RNA marker RL1000 说明书进行。

1.2.5　RT-PCR 法鉴定体外转录 RNA 产物　　将上步所获的浓度为 0.53 μg/μl 体外转录 RNA 产物用 DEPC 水依次作 10 倍稀释,直至 10^{-9}后,取各稀释液作模板,作 RT-PCR。

RT-PCR 采用 TaKaRa 公司的一步法试剂盒进行。反应体系 50 μl: 10 × RT-PCR 缓冲液 5 μl, $MgCl_2$(25 mmol/L) 10 μl, dNTP 混合物(各 2.5 mmol/L)5 μl, RNasin(40 U/μl)1 μl, AMV 逆转录酶(5 U/μl)1 μl, *Taq* 酶(5 U/μl)1 μl,上游引物(10 μmol/L)2 μl,下游引物(10 μmol/L)2 μl, 体外转录产物 1 μl, DEPC 处理水 27 μl。

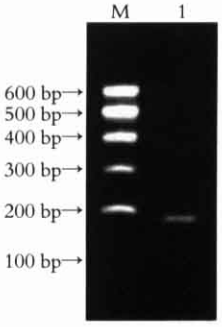
热循环参数:50 ℃ 15 min;94 ℃ 3 min;(94 ℃ 10 s,52 ℃ 10 s,72 ℃ 20 s) ×35 个循环;72 ℃ 5 min

取 5 μl 各管反应产物琼脂糖凝胶电泳。

2　结果

2.1　全长 190 bp dsDNA 目的片段的获得

如图 1 所示,经 3 个单链 DNA 片段延伸退火,产物稀释后作 PCR,扩增出 190 bp 目的片段。



M: DNA marker; 1: 以 3 条单链 DNA 延伸退火片段为模板的 PCR 产物

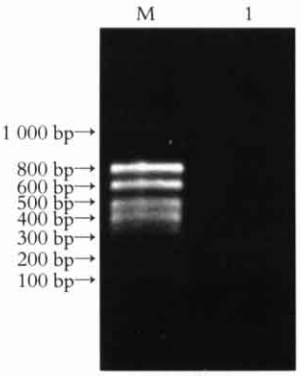
图 1　3 条单链 DNA 延伸退火片段为模板的 PCR 产物电泳图

2.2　表达重组质粒 pGEM-SARS 的鉴定与测序

将 190 bp 的 PCR 产物连接至 T-载体 pMD 18T 后,用载体插入片段两端的 *Bam*H Ⅰ与 *Hind* Ⅲ位点酶切,得到约 230 bp 的片段,将此片段连接至线性化表达型质粒 pGEM 中,重组质粒 pGEM-SARS 经 PCR 和酶切初步确定后,进一步测序发现,重组质粒包含 SARS 冠状病毒基因组序列 18138-18327nt 的 190 bp 片段,经 *Bam*H Ⅰ与 *Hind* Ⅲ酶切后得到约230 bp 的片段中,5′-端带有 T-载体 pMD 18T 的 11 bp 序列,3′-端带有 25 bp 序列。

2.3　T7 RNA 聚合酶体外转录获得含目的序列的 RNA 片段

重组质粒 pGEM-SARS 先行 *Hind* Ⅲ酶切,质粒于插入片段 3′-端断开,使体外转录能终止于该点。体外转录获得的 RNA 产物的琼脂糖凝胶电泳结果见图 2。可见一清晰的约 250 bp 条带,其大小与 pGEM 转录起始点至插入片段 3′-端 *Hind* Ⅲ酶切位点的位置相符。体外转录产物经 DNase Ⅰ消化及酚/氯仿抽提纯化后,检测 $D(260)/D(280)$的比值为 1.86,提示 RNA 纯度很高。

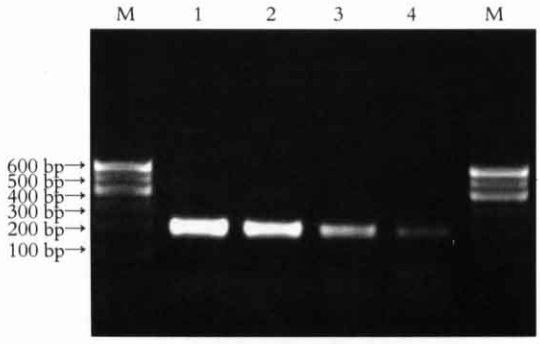


M：RNA marker（Takara 公司产品号：RL 1 000）；1：体外转录 RNA 产物

图2 体外转录 RNA 产物在 MOPS 琼脂糖凝胶电泳图

2.4 体外转录 RNA 产物的 RT-PCR 鉴定结果

体外转录 RNA 产物不同浓度稀释液作模板，作 RT-PCR。结果见图3，可见能扩增出 190 bp 条带。稀释度至 10^{-9} 时，仍出现清晰目的条带。



M：DNA marker；1：以质 pGEM-SARS 为模板的 PCR 产物；2：以阳性对照 RNA 片段（稀释度为 10^{-7}）为模板的 RT-PCR 产物；3：以阳性对照 RNA 片段（稀释度为 10^{-8}）为模板的 RT-PCR 产物；4：以阳性对照 RNA 片段（稀释度为 10^{-9}）为模板的 RT-PCR 产物

图3 阳性对照模板梯度稀释后扩增产物电泳图

3 讨论

SARS 冠状病毒为正链 ssRNA 病毒，后在果子狸和其他野生动物体内分离到与该病毒具有高度同源性的病毒，高度提示 SARS 为人兽共患病[7]。在 SARS 诊断方面，RT-PCR 法和实时荧光定量 RT-PCR 等基因诊断法，对 SARS 患者的早期诊断和疑似患者的筛选意义重大[2,6]。而这些基因诊断方法的建立需要相应的 RNA 片段作为阳性对照，但要获得 SARS 冠状病毒基因组 RNA 有高感染风险，需在生物安全防护三级以上实验室进行。所以我们采用基因合成和体外转录获得 RNA 片段，作为 SARS 冠状病毒 RT-PCR、实时定量 RT-PCR 方法的阳性 RNA 对照。

本研究根据 2003 年 WHO 网络实验室推荐的 1 对引物和当时 GenBank 公布的第 1 株 SARS 冠状病毒基因组，即 SARS 冠状病毒多伦多株（SARS coronavirus TOR2）基因组序列（accession number：AY274119），选择基因组中 18138 - 18327nt 序列为模板。首先将目的序列分解为 3 个区域，合成 3 条相应单链 DNA 片段，其中片段 1 为正链序列，片段 2 和 3 均为负链序列。退火延伸过程中，先将片段 1 与片段 2 退火延伸为约 140 bp 的 DNA 双链，该双链 DNA 在下一轮变性后，与片段 3 退火互补结合，再延伸成全长 DNA 片段。

在片段退火延伸产物中，存在全长片段的双链 DNA，这时用两侧引物扩增，可得到全长双链 DNA 产物。

进一步将 PCR 产物装入 T-载体时，存在片段正反向插入问题，可通过选择适当的限制性内切酶酶切和测序等方法进行鉴定，但因本研究仅为建立 RT-PCR 提供阳性对照，在随后的 RT-PCR 过程中同时采用 PCR 的上、下游引物作为逆转录引物，故正反向模板均能扩增出相应片段，所以并未对片段在 T-载体中的插入方向进行鉴定，而连接至表达性载体 pGEM 后进行测序鉴定，发现为正向插入。

我们以本研究获得的 RNA 片段作为阳性模板，成功建立了 SARS 冠状病毒的 RT-PCR 和实时荧光定量 RT-PCR 诊断方法，并研制了相应试剂盒，因未经临床标本验证，在此不作讨论。如今，国家颁布了实验室生物安全的有关法规，对 SARS 等重要传染病的研究将在更为规范的实验室中进行，但本研究为相关工作提供了借鉴。

关键词：SARS 冠状病毒；RNA 片段；体外转录；RT-PCR
中图法分类号：Q786 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] 王长征. 严重急性呼吸综合征[J]. 第三军医大学学报，2003，25(14)：1305 - 1307.
[2] Poon L L, Chan K H, Wong O K, *et al*. Detection of SARS coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome by conventional and real-time quantitative reverse transcription-PCR assays[J]. Clin Chem, 2004, 50(1): 67 - 72.
[3] Fouchier R A, Kuiken T, Schutten M, *et al*. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus[J]. Nature, 2003, 423(6937): 240.
[4] Ksiazek T G, Erdman D, Goldsmith C S, *et al*. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. N Engl J Med, 2003, 348(20): 1953 - 1966.
[5] 王广发，徐小元. SARS 诊断与治疗中有关问题的思考[J]. 北京大学学报（医学版），2003，35（Suppl）：2 - 4.
[6] 王 艳，马文丽，宋艳斌，等. 反转录巢式 PCR 方法检测 SARS 冠状病毒[J]. 第一军医大学学报，2003，23(5)：421 - 423.
[7] 白春学，刘春涛. SARS 的病原学研究[J]. 中国呼吸与危重监护杂志，2003，2(3)：137 - 140.

（编辑 王 红）