

SARS冠状病毒 N 基因的扩增与克隆

肖维威¹ 袁文丽¹ 袁张宝¹ 袁王艳¹ 袁毛向明¹ 袁彭翼飞¹ 袁宋艳斌¹ 袁袁清华¹ 袁邵文岭² 第一军医大学分子生物学研究所 广东 广州 510515 白广州军区广州总医院分子肿瘤学研究所 广东 广州 510010 冤

摘要 目的 RT-PCR 扩增并克隆 SARS 冠状病毒 N 蛋白基因遥方法 根据 GenBank 数据库中 TOR₂ 株的全基因组序列袁利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 RT-PCR 巢式扩增 SARS 冠状病毒的 N 基因袁CR 产物克隆后进行测序鉴定遥结果 序列分析表明袁MD18-T 载体中已成功重组了 N 基因遥结论 N 蛋白基因的扩增袁克隆成功袁N 蛋白的表达袁蛋白结构与功能的研究奠定了基础遥

关键词 严重急性呼吸综合征 基因 冠状病毒 逆转录 - 聚合酶链反应

中图分类号 院786 文献标识码 院 文章编号 院000-2588 院004 院1-0039-03

Amplification and cloning of the N gene of SARS-associated coronavirus

XIAO Wei-wei¹, MA Wen-li¹, ZHANG Bao¹, WANG Yan¹, MAO Xiang-ming¹, PENG Yi-fei¹, SONG Yan-bin¹, WU Qing-hua¹, ZHENG Wen-ling²

¹Institute of Molecular Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Institute of Molecular Oncology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China

Abstract: Objective To amplify and clone the N gene of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. Method Using primer Premier 5.0 software, two pairs of nested PCR primers were designed to amplify the N gene. After purification, the amplified products were cloned into pMD18-T vectors, and the positive clones with the inserted fragments were identified by sequence analysis. Results The amplified products was about 1 375 bp in length, and sequence analysis demonstrated that the N gene fragments had been successfully inserted into pMD18-T vectors. Conclusion The successful amplification and cloning of N gene facilitates further investigation of the expression of the N protein and study of its structure and functions.

Key words: severe acute respiratory syndrome; SARS; N-gene, coronavirus; reverse transcription-polymerase chain reaction

2003 年 4 月 16 日袁WHO 正式确认 SARS 冠状病毒是 SARS 感染的病原体遥生物信息学分析和病毒学研究表明袁SARS 冠状病毒不属于任何已知的冠状病毒家系袁是一类新型病毒遥SARS 病毒颗粒周围环绕着象日冕一样的圆环袁圆环之上和外壳表面分布着大大小小的蛋白遥但对感染致病起重要作用的可能是 6 种关键蛋白 蛋白 蛋白 蛋白 蛋白 蛋白 多聚酶和 3CL 蛋白水解酶遥本研究应用自行设计的巢式引物 RT-PCR 扩增了其中的 N 基因袁并对 N 基因进行了克隆和鉴定袁现将实验结果报告如下遥

1 材料与方法

1.1 材料

样品取自北京 SARS 住院患者的痰液标本 受体菌 TOP10 由本研究所保存 印MD18-T 载体 袁nase 抑制剂 袁⁶ 随机引物 袁CR 试剂及相对分子质量 Marker DL2000 购自大连宝生物工程有限公司 白逆转录酶 SuperScript 域购自 Invitrogen 公司遥

收稿日期 院003-07-01

作者简介 肖维威(1974-)袁袁袁998 年毕业于第一军医大学袁现为第一军医大学在读博士研究生袁讲师袁电话 院20-61648114- 89097

通讯作者 袁文丽 电话 院20-61648210, E-mail: wenli@fimmu.com

Corresponding author: MA Wen-li, E-mail: wenli@fimmu.com

1.2 方法

1.2.1 引物 根据 GenBank 提供的 SARS 病毒 TOR₂ 株全基因组序列袁利用生物学软件 Primer Premier 5.0 自行设计扩增 N 基因的巢式引物 渊表 1 冤 引物采用本研究所的 ABI 3900 DNA 合成仪合成遥

1.2.2 病毒 RNA 提取 样品加等体积水饱和酚混匀袁65 益加热 10 min 后加 1/2 体积氯仿抽提 1 次袁上清加 1/10 体积 pH 5.2 的 3 mol/L NaAc 袁 倍体积无水乙醇沉淀袁0% 乙醇漂洗后自然干燥袁加适量 DEPC 水溶解遥

1.2.3 逆转录 加上述制备的 RNA 5 滋袁0 mmol/L dNTP 5 滋袁nase 抑制剂 50 U袁⁶ 随机引物 20 pmol袁逆转录酶 SuperScript 域 2.5 滋袁及 DEPC 水至 50 滋 总体积 42 益反应 1 h 遥

1.2.4 PCR 第 1 次 PCR 加上述 cDNA 反应液 5 滋袁引物 P1/P2 各 10 pmol袁伊CR 反应混合液 渊含 PCR 缓冲液 袁NTP 袁Mg²⁺ 及 Taq 酶 冤 0 滋袁加水至总体积 20 滋遥94 益预变性 5 min 院4 益变性 30 s 袁5 益退火 30 s 袁2 益延伸 1 min 30 s 袁循环 30 次遥第 2 次 PCR 院取第 1 次 PCR 产物 0.5 滋 做模板袁用内侧引物 P3/P4 进行扩增袁循环参数同前遥

1.2.5 AT 克隆 将第 2 次的 PCR 产物用乙醇沉淀

表 1 扩增 SARS 冠状病毒 N 基因的引物

Tab.1 Oligonucleotide primers used to amplify N gene of SARS-associated coronavirus

Primer	Location	Sequence (5'真3')	Fragment length of PCR (bp)
Outer sense primer P1	27 686-27 705	TTTAGCCTTTCTGCTATTCC	1 900
Outer antisense primer P2	29 566-29 585	GCTCTTTCAAGTCTCCCTA	
Inner sense primer P3	28 054-28 074	TGAAGGTCACCAAAGTCTG	1 375
Inner antisense primer P4	29 409-29 428	TTTACATAGCCCATCTGCCT	

后袁用 10 滋 灭菌超纯水溶解遥取纯化后 PCR 产物 4.5 滋袁MD18-T 载体 0.5 滋袁连接液 5 滋袁混匀袁6 益 反应 3 h遥连接产物转化宿主菌 TOP10遥

1.2.6 PCR 鉴定阳性克隆 挑取白色菌落扩大培养后袁用 pMD18-T 载体引物 渊O100 5'-CTAAAC-GACGGCCAGT-3'袁O101 5'-CAGGAAACAGCTAT-GAC-3'袁进行 PCR 鉴定遥

1.2.7 测序 挑取阳性克隆袁经 PCR 鉴定后提取质粒 测序遥对测序结果进行 Blast 序列比较遥

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增 N 基因的琼脂糖电泳分析

应用外侧引物 RT-PCR 扩增 SARS 病人的临床 样品袁可观察到与我们设计相符的扩增条带约 1 900 bp遥以外侧引物的 PCR 产物为模板袁继续用内侧引物 扩增袁得到含 N 基因约 1 375 bp 的特异性条带袁基因 片段大小与预期相符渊图 1 冤遥

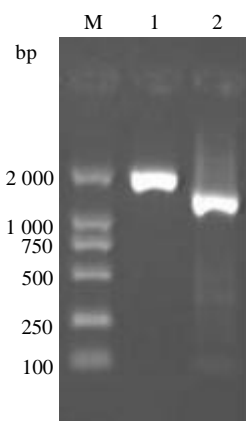


图 1 RT-PCR 电泳图
Fig.1 Results of RT-PCR
M: Marker DL200; Lane 1: Amplification product with outer primers; Lane 2: Second amplification with inner primers

2.2 PCR 鉴定阳性克隆

内侧引物扩增的 PCR 产物用乙醇纯化后进行 AT 克隆遥随机挑选 3 个克隆应用载体引物 SO100 和 SO101 进行 PCR 扩增袁琼脂糖凝胶电泳分析可见到 约 1 400 bp 的目的条带袁初步证明重组质粒中含有 N 基因片段渊图 2 冤遥

2.3 N 基因的序列分析

将上述 PCR 鉴定的阳性克隆扩大培养后袁提取 质粒进行 DNA 序列分析遥图 3 所示为部分 N 基因片 段的测序结果遥对结果进行 BLAST 分析袁与已公布

的 TOR2 株的 N 蛋白基因序列一致袁袁 进一步证实 N 基因克隆成功遥

3 讨论

N 蛋白是 SARS 冠状病毒中一种 重要的结构蛋白袁处于病毒颗粒的核 心部分袁与病毒基因组 RNA 结合的 形式存在袁在病毒的包装过程中起着 重要的作用遥经 BLAST 分析发现袁SARS 病毒的 N

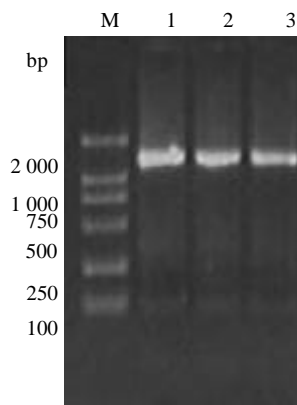


图 2 克隆的 PCR 鉴定电泳图
Fig.2 PCR identification of the clones
M: Marker DL200; Lanes 1-3: Amplification products of the recombinant plasmids with the vector primers

蛋白与鼠肝炎病毒的 N 蛋白同源性很高袁含有其他 冠状病毒 N 蛋白中不存在的一段核转移信号序列遥 研究推测 SARS 病毒在侵入宿主细胞以后是通过这 个核转移信号序列进入到细胞核中袁并与宿主 DNA 整合发挥其生物学作用遥N 蛋白中含有这段特殊 序列提示我们袁对 SARS 病毒 N 蛋白的功能和其在 SARS 发病中的意义还需要更进一步的研究遥

目前袁SARS 的疫情已经得到控制袁但 SARS 病 毒的来源仍不明确袁SARS 的防治还未找到有效的方 法遥对 SARS 关键蛋白 N 蛋白的扩增袁克隆成功袁为 SARS 病毒 N 蛋白的表达袁蛋白结构与功能的研究 袁以及进一步阐明 SARS 病毒致病机制袁开展抗 SARS 药物筛选袁制备快速检测 SARS 病毒的诊断试 剂盒等研究奠定了基础遥

参考文献

咱暂 Peiris J, Lai S, Poon L, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome咱暂 Lancet, 2003, 361(9366): 1319-25.
咱暂 Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome咱暂 N Engl J Med, 2003, 348(20): 1953-66.
咱暂 Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel

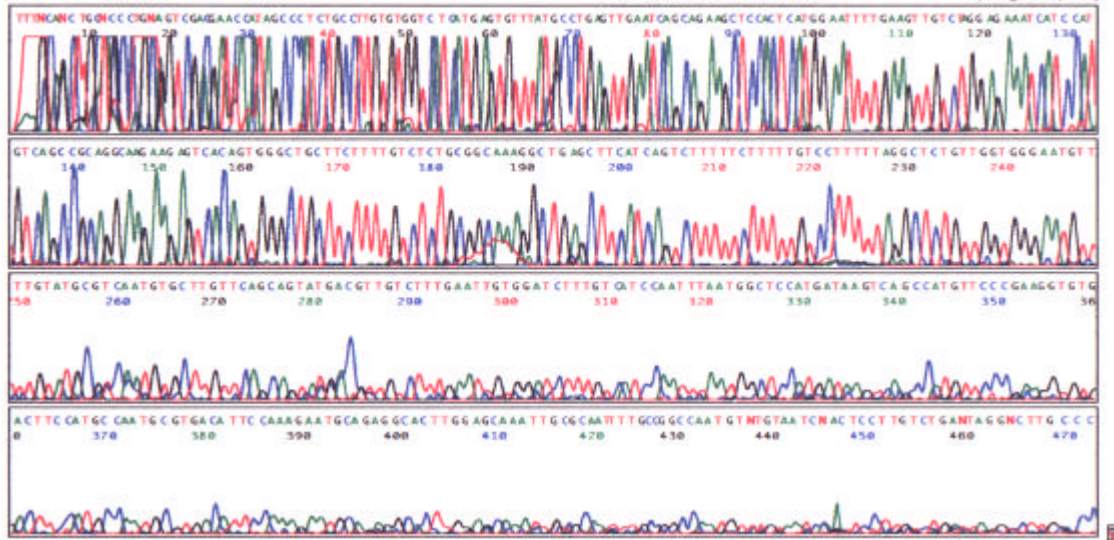


图 3 N 基因的序列分析

Fig.3 A part of DNA sequence map of the N gene

coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome 哨暂 Science, 2003, 300(5624): 1394-9.

哨暂 Nelson GW, Stohlman SA, Tahara SM. High affinity interaction between nucleocapsid protein and leader/intergenic sequence of mouse hepatitis virus RNA 哨暂 J Gen Virol, 2000, 81(Pt 1): 181-8.

哨暂 Chen H, Wurm T, Britton P, et al. Interaction of the coronavirus nucleoprotein with nucleolar antigens and the host cell 哨暂 J Virol, 2002, 76(10): 5233-50.

哨暂 王 艳, 马文丽, 宋艳彬, 等. 反转录巢式 PCR 方法检测 SARS 冠状病毒 哨暂第一军医大学学报, 2003, 23(5): 421-3.

Wang Y, Ma WL, Song YB, et al. Gene sequence analysis of SARS-associated coronavirus by nested RT-PCR 哨暂 J First Mil Med Univ/DI Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(5): 421-3.

哨暂 车小燕, 丘立文, 潘玉先, 等. SARS 冠状病毒 N 蛋白单克隆抗体的快速、高效制备的方法研究 哨暂第一军医大学学报, 2003, 23(7):640-2.

Che XY, Qiu LW, Pan YX, et al. Rapid and efficient preparation of monoclonal antibodies against SARS-associated coronavirus nucleocapsid protein by immunizing mice 哨暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(7): 640-2.

哨暂 车小燕, 郝 卫, 丘立文, 等. SARS 病人 SARS 冠状病毒核壳抗原抗体的变化规律 哨暂第一军医大学学报, 2003, 23(7): 637-9.

Che XY, Hao W, Qiu LW, et al. Antibody response of patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) to nucleocapsid antigen of SARS-associated coronavirus 哨暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(7): 637-9.

继续 38 页

哨5 暂 Lee NS, Dohjima T, Bauer G, et al. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells 哨暂 Nat Biotechnol, 2002, 20(5): 500-5.

哨6 暂 Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells 哨暂 Nat Biotechnol, 2002, 20(5): 497-500.

哨7 暂 Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, et al. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance 哨暂 Cell, 2000, 101(5): 533-42.

哨8 暂 Wu-Scharf D, Jeong B, Zhang C, et al. Transgenic and transposon silencing in Chlamydomonas reinhardtii by a DEAH-box RNA helicase 哨暂 Science, 2000, 290(5494): 1159-62.

哨9 暂 Catalanotto C, Azzalin G, Macino G, et al. Gene silencing in worms and fungi 哨暂 Nature, 2000, 404(6775): 245-9.

哨0 暂 Catalanotto C, Azzalin G, Macino G, et al. Involvement of small RNAs and role of the qde genes in the gene silencing pathway in

Neurospora 哨暂 Genes Dev, 2002, 16(7): 790-5.

哨1 暂 王吉兴, 姚 军. SV40LTA_g 基因永生化软骨细胞体外培养的生物特性 哨暂第一军医大学学报, 2003, 23(12): 1338-40.

Wang JX, Yao J. Observation of the biological behavior of in vitro cultured immortalized chondrocytes induced by SV40LTA_g gene transfection 哨暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(12):1338-40.

哨2 暂 欧阳平, 陈慧萍, 赖文岩, 等. 金钱鱼凋亡相关基因 SaAR 对 NIH-3T3 细胞凋亡的影响 哨暂第一军医大学学报, 2003, 23(11):1137-8.

Ouyang P, Chen HP, Lai WY, et al. Effects of Scatophagus argus apoptosis-related gene on apoptosis of NIH-3T3 cells 哨暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(11): 1137-8.

哨3 暂 罗 勇, 高建华, 赵 菲. Fas 基因转染瘢痕疙瘩成纤维细胞并诱导其凋亡的实验研究 哨暂第一军医大学学报, 2003, 23(10): 1015-7.

Luo Y, Gao JH, Zhao F. Apoptosis of keloid-derived fibroblasts induced by Fas gene transfection 哨暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(10): 1015-7.