



南方医院感染内科 2003 年 2 月至 4 月所采集的 SARS 病人及疑似病人咽拭子和痰标本 136 例将标本洗涤或稀释到 1 ml 经 DEPC 处理的 Hanks 液中袁 -70 益保存备用遥

1.2 RNA 的提取

使用美国 Invitrogen 公司 TRIZOLLS 试剂盒 at.No.10296-010 参照试剂盒使用说明袁将 250 滋标本加入含 750 滋 TRIZOLLS Reagent 溶液的离心管中混匀后室温 5 min 袁加入 200 滋 氯仿混匀袁室温 15 min 后 12000g 离心 15 min 遥将上清转移到含 5 滋 糖原的离心管中袁加入 500 滋 异丙醇混匀后室温放置 10 min 袁 2000g 离心 10 min 袁去上清袁 1 ml 75% 乙醇洗涤遥 7500g 离心 10 min 袁去上清袁沉淀凉干后溶入 20 滋 DEPC 水中备用遥

1.3 RT-PCR

使用美国 PE 公司 GeneAmp PCR System 9700 扩增仪袁 T-PCR 引物为 BNIoutS 院'-ATGAATTACC AAGTCAATGGTTAC 院 BNIoutAS 院'-CATAACCAG TCGGTACAGCTAC 遥二次 PCR 内引物为 院 BNIinS 院' 5'-GAAGCTATTTCGTCACGTTTCG 院 BNIinAS 院'-CTG TAGAAAATCCTAGCTGGAG 遥

RT-PCR 使用美国 Invitrogen 公司 SuperScript<sup>TM</sup> One-Step RT-PCR with Platinum Taq 试剂盒 at. No. 10928-034 参照试剂盒使用说明遥反应条件为 院 5 益袁 5 min / 95 益袁 1 min 院 0 s 院 5 益袁 0 s / 60 益袁 0 s (drop 1 益) / 72 益袁 0 s 院 0 s 院 5 益袁 0 s / 56 益袁 10 s / 72 益袁 0 s 遥

二次 PCR 反应条件为 院 5 益袁 1 min 院 0 Cycles 院 5 益袁 0 s / 60 益袁 0 s (drop 1 益) / 72 益袁 0 s 院 0 Cycles 院 95 益袁 0 s / 56 益袁 0 s / 72 益袁 0 s 遥

1.4 PCR 产物的克隆和序列分析

序列分析由上海申友公司利用 DNA 全自动分析仪完成遥

1.5 同源性比较

采用 DNASIS2.5 分析软件进行遥

2 结果

2.1 RT-PCR

经过 RT-PCR 袁我们从多例 SARS 疑似病人的咽拭子尧痰液或血清标本中扩增出预计大小的 109 bp DNA 片段遥 图 1 袁

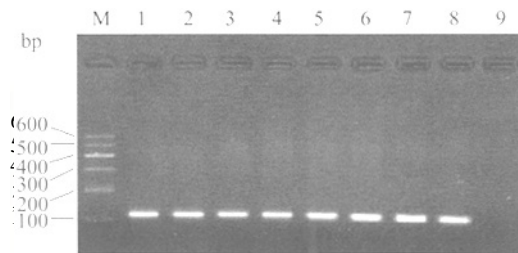


图 1 RT-PCR 结果

Fig.1 Result of RT-PCR

M: 100bp DNA leader; Lanes 1-8: RT-PCR-positive samples; Lane 9: RT-PCR-negative sample

2.2 序列分析和同源性比较

将 8 例 SARS 冠状病毒阳性 DNA 片段克隆到 pGEM-T 载体后袁每例取 3 个克隆进行序列分析袁所有测序结果与 WHO 所公布的 SARS 冠状病毒的序列完全一致 遥图 2 袁所示序列为 院 AAGCTATTCGTCACGTTTCG TGCCTGGATT GGCTTTGATG TAGAGGGCTG TCATGCAACT AGA 院

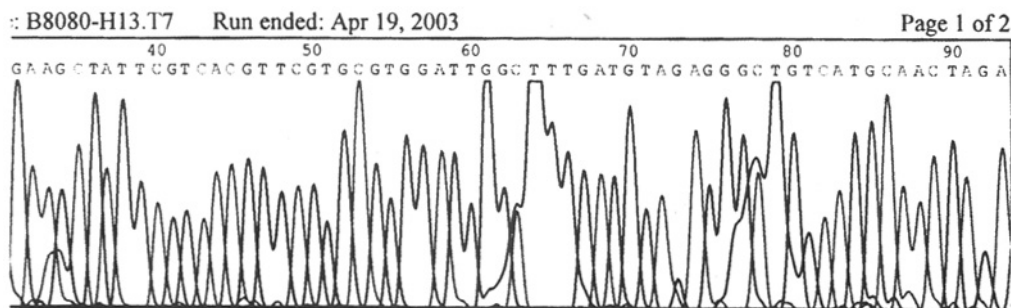


图 2 BNI109 部分序列分析图谱

Fig.2 A part of DNA sequence map of BNI109

所测序列与人呼吸道冠状病毒 229E 院 human respiratory coronavirus 229E, HCV 229E 院牛冠状病毒 院 ovine coronavirus, BCV 院鼠肝炎病毒 院 murine hepatitis virus, MHV 院猪传染性胃肠炎病毒 院 porcine transmissible gastroenteritis virus 院 GEV 院猪流行性痢疾病毒 院 porcine epidemic diarrhoea virus 院 EDV 院禽

传染性支气管炎病毒 院avian infectious bronchitis virus, IBV 院等 6 种已知的冠状病毒在核苷酸序列和氨基酸序列水平上进行比较袁结果见图 3 遥由图 3 上可以看出 SARSV 在该区段与其他 6 种冠状病毒氨基酸水平有很高的同源性袁其中与 BCV 和 MHV 的同源性高达 75% 遥

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
BNI109.DNA	GAAGCTATTTCGTCACGTTTCGTCGCTGGATTGGCTTTGATGTAGAGGGCTGTCATGCAACTAGAGATGCTGTGGTACTAACCTACCTCTCCAGCTAGGATTTTCTACAG										
HCV229E.DNA	TTT..C..G.....T..CA..A..T...T..A..AA..G....G....TGCA...TC..AG..T..CAA...T..C.....TG.....A..AG..T..T....C..AT..										
BCV.DNA	.....G..AAA..G...G...T..G.....CT..A...GC.....C..GC..T..AGCA..T..G..A..TT..C..A..T..AT...G.....										
IBV.DNA	..G..A..C..CA..T..AA..A..GT...G..A..T.....A..CAACA.....TTG..G..CAC..AACA.....G...T..T..AG...T..C.....T..										
MHV.DNA	.....CAAA..GT...A..A..C...G.....C...C...A..TGCC....G..TAC..T...AGCA..T..G..A..TT..C..AT..A..AT...C.....G...T..										
PEDV.DNA	TTT..C..G..CA..T...A..A..GT...T..G..T....C..T..A..AGCA...TTGT..G..CTC..AAC..C....A..TG..C..AT..G..AT...G.....AC..										
TGEV.DNA	TTT.....G...A..T...A..A..A..C...G....C...T..A..TGCA...TCTG..G..T...AA...T..A....TG...AT..A....G...T..C...A..AC..										

图 3 扩增片段 BNI109 与其他 6 种冠状病毒核苷酸序列同源性比较

Fig.3 Alignment of the amplicon (BNI109) nucleotide-sequence with other six coronaviruses

BNI109.AMI	EAIRHVRAWI GFDVEGCHAT RDAVGNLPL QLGFST...
HCV229E.AMI	F.M...G...M...A.V.G.N...V...V...N...
BCV.AMI	..VKR...V...A..A...SI..F.....
IBV.AMI	...N..G.V...AT..C.G.NI...F..V.....
MHV.AMI	...KR...V...A..A..I...SI.....
PEDV.AMI	F.M.N...G.L.....A.VV GSN...V...N...
TGEV.AMI	F.M.N...L.....A.VC G.N...V...N...

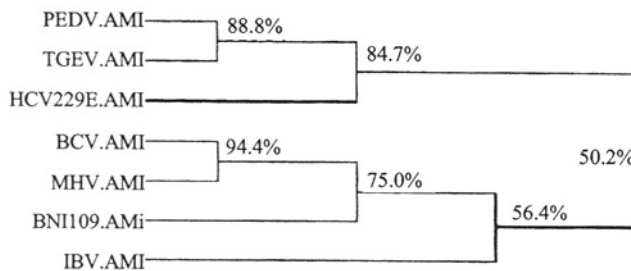


图 4 扩增片段 BNI109 与其它 6 种冠状病毒氨基酸序列同源性比较和进化树图

Fig.4 Alignment and homology of the fragment BNI109 amino acidsequence with other six coronaviruses

3 讨论

由于 SARS 主要经飞沫传播对于与患者密切接触者传染率很高，使之目前在 25 个国家和地区广泛流行。因此建立灵敏的病原体检测方法对于 SARS 的临床诊断和有效的控制传染原有重要的意义。世界卫生组织建立了专门的 SARS 官方网站便于协调共享世界各地研究机构对 SARS 的病原学及诊断研究成果。<http://www.who.int/csr/sars/en/>

目前已经有酶联免疫法 ELISA 检测 SARS 冠状病毒抗体和 RT-PCR 法检测 SARS 冠状病毒核酸的报道。ELISA 法可从出现 SARS 临床症状 21 d 后的患者血清中检测抗体，而免疫荧光法则可从出现 SARS 临床症状 10 d 后的患者血清中检测抗体。SARS: Availability and use of laboratory testing, [http://www.who.int/csr/sars/testing2003\\_04\\_18/en/](http://www.who.int/csr/sars/testing2003_04_18/en/)。这两种方法对于临床确诊具有重要意义，但抗体出现较晚，对于早期诊断则比不上 RT-PCR 法检测 SARS 冠状病毒核酸。现在国际上 RT-PCR 法检测 SARS 冠

状病毒的试剂一般特异性好，但灵敏度较差。标本病毒含量少，因此 RT-PCR 法检测阴性并不能排除人体内 SARS 冠状病毒存在的可能。RT-PCR 法的检测灵敏度有待进一步提高。

关于 SARS 冠状病毒检测的临床意义 WHO 指出：阳性结果表明病人现在或过去被 SARS 冠状病毒感染，但不一定出现 SARS 症状。阴性结果则不一定表明病人没有被 SARS 冠状病毒感染。对于 SARS 病人出现阴性结果的可能原因有：病人不是被 SARS 冠状病毒而是其他病原体感染，却出现类似 SARS 症状；检测灵敏度不够；标本采集时间不合适；病毒血症只在很窄的时间段出现，错过了这一时间，则从血清中很难检测到病毒；如在血清中抗体没有产生以前进行抗体检测，结果自然是阴性。

本研究发现 SARS 冠状病毒多聚酶基因片段 BNI109 的保守性极强，适合建立 RT-PCR 法检测 SARS 冠状病毒。进一步的比较研究发现 SARS 冠状病毒 M 区和 S 区 RT-PCR 法的检测效果比多聚酶基因 BNI109 区段检测效果要差。为此确定对多聚酶基因 BNI109 区段的 RT-PCR 进行临床 SARS 冠状病毒的检测。

在 SARS 冠状病毒的检测中我们发现咽拭子中 SARS 冠状病毒的检出率没有期望的那样高。这主要是因为咽拭子和血液中 SARS 冠状病毒的含量本身就较低。痰标本中含量则很高，约 108copies/ml。所以在临床检测中应该尽量使用痰标本，只是在取不到痰标本时才使用咽拭子或血清标本。而且即使咽拭子中检测不出 SARS 冠状病毒，也不能说明病人就不是 SARS 冠状病毒携带者。我们的研究表明，很难在病人血清标本得到 RT-PCR 阳性检测结果。我们只在两例 SARS 患者发病早期的血清样本中检测到 SARS 冠状病毒。说明 SARS 患者出现病毒血症的时间很短。另外，由于 SARS 病人较少有痰，而咽拭子和血液中 SARS 冠状病毒的含量都很低，RT-PCR 法的检出率就显得尤为重要。为尽量提高 RT-PCR 检测的灵敏性，我们在试剂的选用、标本

RNA提取方法的选择对CR条件的优化及PCR仪的选用等方面进行大量的研究。通过对SARS病人咽拭子标本中SARS冠状病毒的检出率提高了2倍以上,达到70%。

#### 参考文献

咱暂 Tsang KW, Ho PL, Ooi GC, et al. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. 咱暂 N Engl J Med, 2003 Apr 1 [epub ahead of print]

咱暂 Poutanen SM, Low DE, Henry B, et al. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. 咱暂 N Engl J Med, 2003 Apr 10 [epub ahead of print] Update: Outbreak of severe acute respiratory syndrome--worldwide, 2003. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2003 Mar 28; 52 (12):241-6,248.

咱暂 Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith C, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. 咱暂 N Engl J Med, 2003 Apr 10 [epub ahead of print]

咱暂 Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. 咱暂 N Engl J Med, 2003 Apr 10 [epub ahead of print]

咱暂 Enserink M, Vogel G. INFECTIOUS DISEASES: Deferring competition, global net closes in on SARS. 咱暂 Science, 2003 Apr 11; 300 (5617):224-5.

咱暂 Barber SA, Chan SY, Cloutier A, et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. 咱暂 Science, 2003 May 1 [epub ahead of print]

咱暂 Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. 咱暂 Science, 2003 May 1 [epub ahead of print]

## 大鼠气管平滑肌细胞的分离及L-钙通道的记录

程仕虎<sup>1</sup> 罗雅玲<sup>1</sup> 袁军<sup>2</sup> 袁文岩<sup>1</sup> 罗亮<sup>1</sup> 第一军医大学<sup>1</sup> 南方医院呼吸科袁教务处袁广东 广州 510515 冤

**摘要** 目的 建立一种大鼠气管平滑肌细胞急性酶分离法并在分离的细胞上研究其L型钙通道(L-Ca)特性。方法 采用链酶蛋白酶分离大鼠气管平滑肌细胞,用膜片钳单通道记录法记录L-Ca通道电流。结果 该方法分离过程简单,所获细胞数量多,形态正常,在这些细胞上容易记录到正常的L-Ca通道电流。结论 应用本方法易得到单个活性正常的、形态完整的大鼠支气管平滑肌细胞。

**关键词** 支气管平滑肌;离子通道;平滑肌细胞分离法

中图分类号:R562.25 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2003)05-0427-03

## Isolation of rat tracheal smooth muscle cells and electrophysiological examination of the L-type calcium channel

CHENG Shi-hu<sup>1</sup>, LUO Ya-ling<sup>1</sup>, YANG Jun<sup>2</sup>, LAI Wen-yan<sup>1</sup>, LUO Liang<sup>1</sup>

Department of Respiratory Diseases, Nanfang Hospital<sup>1</sup>, Department of Teaching Affairs<sup>2</sup>, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract:** Objective To establish a method for acute enzymatic isolation of rat tracheal smooth muscle cells (TSMCs) and study the electrophysiological properties of the L-type calcium channel of the cells. Methods Single rat TSMC was isolated by means of pronase E, followed by recording the electric currents in the single calcium channel using patch-clamp technique with cell attached configuration. Result Large amount of viable TSMCs were isolated through this method, characterized by normal cell morphology and easy detection of the L-type calcium channel activity in the cells. Conclusion This method is relatively simple for high-yield isolation of TSMCs with normal morphology.

**Key words:** trachea, rat; ion channel, calcium; smooth muscle; cell isolation

收稿日期:2002-10-21

基金项目:广东省自然科学基金 80232冤

Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province

作者简介:程仕虎 男, 1973年, 湖北十堰人, 第一军医大学在读硕士研究生, 电话:20-61641575, e-mail:dfzqrll@yeah.net

细胞培养技术和细胞急性酶分离方法是研究生命科学的重要技术。但细胞培养周期长, 细胞生长易受多种因素影响。细胞酶分离法自 Kono<sup>1</sup>首先报道以来, 不断不断改进, 越来越显示出它的优越性。但国内外单独介绍气管平滑肌细胞(TSMCs)酶分离方法的