

# SARS冠状病毒多聚酶基因临床检测方法的建立

杨洁<sup>1</sup>王战会<sup>2</sup>袁金军<sup>2</sup>吴金林<sup>2</sup>第一军医大学南方医院感染内科<sup>2</sup>广东 广州 510515

摘要 为分析 SARS 冠状病毒广东株多聚酶基因片段的异质性，建立 RT-PCR 检测 SARS 冠状病毒的方法。为 SARS 的快速诊断提供依据。方法 合成针对 SARS 冠状病毒多聚酶基因区段的特异性引物，从广东省 SARS 病人及疑似病人标本中提取 RNA，经反转录和巢式 PCR 扩增出相应大小的 DNA 片段，通过对这些片段克隆后进行 DNA 序列分析，将序列与 SARS 冠状病毒和其他已知冠状病毒进行同源性分析。结果 从多例 SARS 病人痰、咽拭子或血液标本中得到 RT-PCR 阳性片段，随机选取其中 8 例经克隆和 DNA 序列分析证实均为 SARS 冠状病毒序列，同源性 100%。而所有阴性参照标本 RT-PCR 均为阴性。结论 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。

关键词 严重急性呼吸综合征 SARS 冠状病毒 RT-PCR

中图分类号 R783.2 文献标识码 A 文章编号 1000-2588(2003)05-0424-04

## Clinical detection of polymerase gene of SARS-associated coronavirus

YANGJie,<sup>1</sup>WANGZhan-hui,<sup>2</sup>CHENJin-jun,<sup>2</sup>HOUJin-lin

Department of Infectious Diseases, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract:** Objective To analyze the heterogeneity of polymerase gene fragment of SARS-associated coronavirus from SARS patients, and establish a RT-PCR method for detecting SARS-associated coronavirus. Method RT-PCR was performed using SARS coronavirus-specific primers to amplify the polymerase gene fragment of SARS-associated coronavirus from specimens of suspected and established SARS cases. The amplicons were cloned and sequenced. All the obtained sequences were compared with the sequence of published SARS-associated coronavirus, and alignment was proceeded with other coronavirus sequences. Results Specific amplicons can be amplified from the sputum samples, throat swab and plasma of most SARS patients, and 8 were random selected and sequenced. All of them possessed 100% homology with the published SARS-associated coronavirus sequence, while all the negative controls were RT-PCR negative. Nucleotide-sequence and amino acid-sequence alignment of the fragment BNI109 with others six known coronavirus show that the fragment BNI109 is more close to bovine coronavirus (BCV) and murine hepatitis virus (MHV). The BNI109 fragments showed 75% homology with BCV and MHV at amino acid level. Conclusion The polymerase fragment BNI109 of SARS coronavirus is highly conservative and is suitable for detecting SARS-associated coronavirus using RT-PCR method.

**Keywords:** severe acute respiratory syndrome (SARS); coronavirus; RT-PCR

自 2002 年 11 月中旬以来，先后在广东和世界一些国家和地区流行一种以发热、干咳为主要症状，少数可以很快出现呼吸困难甚至呼吸衰竭，肺部病变进展迅速的急性非典型肺炎。后来被世界卫生组织命名为严重急性呼吸综合征（severe acute respiratory syndrome，SARS）。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。加上不明原因的传播途径，使之目前在近 30 个国家和地区广泛流行。因此，尽快找到 SARS 的病原体并建立灵敏的病原体检测方法，对于

SARS 的临床诊断和有效控制传染源有重要的意义。2003 年 4 月 16 日，WHO 正式确认一种新的冠状病毒是导致 SARS 的病原体。将该冠状病毒命名为严重急性呼吸综合征冠状病毒（SARS-associated coronavirus，ARSV）。目前，ARSV 的 RNA 全基因组序列已经由世界几个科研机构完成。ARSV 是包含约 3 万个核苷酸的正链 RNA 病毒。我们从 WHO 官方网站 (<http://www.who.int/csr/sars/primer/en/>) 下载 SARSV 特异性引物序列，用这些引物对我科收容的 SARS 病人及疑似病人的咽拭子标本进行 RT-PCR，扩增的 DNA 片段进行序列分析，验证以建立 SARSV 的 RT-PCR 检测方法。

## 1 材料方法

### 1.1 标本

收稿日期 2003-05-08

基金项目 国家杰出青年基金 20225042

Supported by National Foundation for Outstanding Young Scientists (30225042)

作者简介 杨洁，湖北广水人，硕士，助理研究员，E-mail: yangjie@fimmu.com

通讯作者 陈金林，电话 20-61641941，E-mail: jlhou@fimmu.com

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。-70℃ 保存备用。

### 1.2 RNA 的提取

使用美国 Invitrogen 公司 TRIZOLLS 试剂盒 (Cat. No. 10296-010) 参照试剂盒使用说明。将 250 滴标本加入含 750 滴 TRIZOLLS Reagent 溶液的离心管中混匀后室温 5 min。加入 200 滴氯仿混匀。室温 15 min 后 12000 g 离心 15 min。将上清转移到含 5 滴糖原的离心管中。加入 500 滴异丙醇混匀后室温放置 10 min。2000 g 离心 10 min。去上清加 1 ml 75% 乙醇洗涤。7500 g 离心 10 min。去上清，沉淀凉干后溶入 20 滴 DEPC 水中备用。

### 1.3 RT-PCR

使用美国 PE 公司 GeneAmp PCR System 9700 扩增仪。T-PCR 引物为：BNIoutS' - ATGAATTACC AAGTCATGGTTAC 和 BNIoutAS' - CATAACCAG TCGGTACAGCTAC。二次 PCR 内引物为：BNIinS' 5'-GAAGCTATTGTCACGTTCG 和 BNIinAS' - CTG TAGAAAATCCTAGCTGGAG。

RT-PCR 使用美国 Invitrogen 公司 SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum Taq 试剂盒 (Cat. No. 10928-034)。具体方法参照试剂盒使用说明。反应条件为：55℃ 5 min / 95℃ 5 s / 0 s / 55℃ 5 s / 60℃ 0 s (drop 1℃) / 72℃ 0 s / 0 s / 55℃ 5 s / 60℃ 10 s / 72℃ 0 s。

二次 PCR 反应条件为：55℃ 5 s / 0 s / 0 Cycles / 95℃ 0 s / 60℃ 0 s (drop 1℃) / 72℃ 0 s / 0 Cycles / 95℃ 0 s / 56℃ 0 s / 72℃ 0 s。

### 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。

### 1.5 同源性比较

采用 DNASIS 2.5 分析软件进行。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR

经过 RT-PCR 我们从多例 SARS 疑似病人的咽拭子或痰标本中扩增出预计大小的 109 bp DNA 片段。

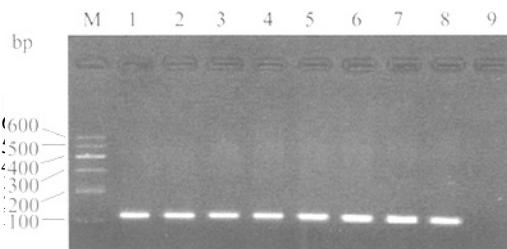


图 1 RT-PCR 结果

Fig. 1 Result of RT-PCR

M: 100bp DNA ladder; 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，每例取 3 个克隆进行序列分析。所有测序结果与 WHO 所公布的 SARS 冠状病毒的序列完全一致。所示序列为：AAGCTATTGTCACGTTCG TGCCTGGATT GGCTTGATG TAGAGGGCTG TCATGCAACT AGA。

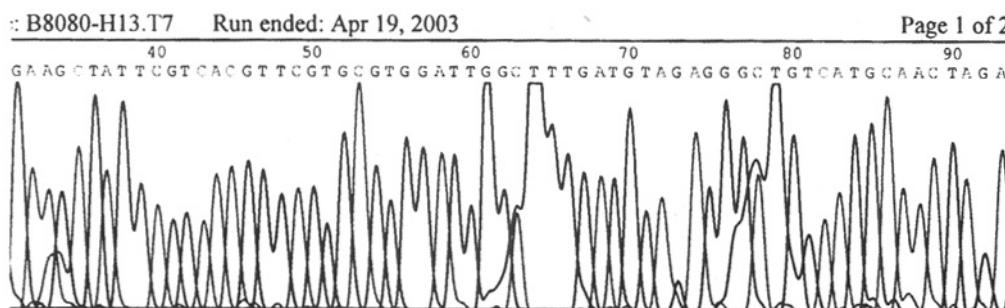


图 2 BNI109 部分序列分析图谱

Fig. 2 A part of DNA sequence map of BNI109

所测序列与人呼吸道冠状病毒 229E、human respiratory coronavirus 229E, HCV 229E、BCV、鼠肝炎病毒、hepatitisvirus, MHV、猪传染性胃肠炎病毒、transmissible gastroenteritisvirus、GEV、猪流行性腹泻病毒、epidemic diarrheaviruses EDV、禽

传染性支气管炎病毒、avian infectious bronchitis virus, IBV 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。结果见图 3。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。其中与 BCV 和 MHV 的同源性高达 75%。

|             | 10   | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 |
|-------------|--|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| BNI109.DNA  | GAAGCTATTCTGTCACGTTCTGCGTGGATTGGCTTGATGTAGAGGGCTGTCACTAGAGATGCTGGGTACTAACCTACCTCCAGCTAGGATTTCTACAG         |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |
| 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.CAAC.....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.... |

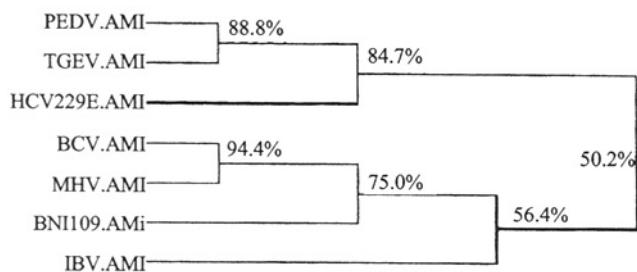


图 4 扩增片段 BNI109 与其它 6 种冠状病毒氨基酸序列同源性比较和进化树图

Fig.4 Alignment and homology of the fragment BNI109 amino acid sequence 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。<sup>袁</sup>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。<sup>世</sup>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。<sup>见</sup> <http://www.who.int/csr/sars/en/>

目前已经有关于酶联免疫法(<sup>ELISA</sup>)<sup>见</sup>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。<sup>见</sup> ELISA 法可从出现 SARS 临床症状 21 d 后的患者血清中检测抗体。<sup>见</sup> 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。<sup>见</sup> 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。<sup>袁</sup>但抗体出现较晚，<sup>袁</sup>对于早期诊断则比不上 RT-PCR 法检测 SARS 冠状病毒核酸。<sup>见</sup> 在国际上 RT-PCR 法检测 SARS 冠

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

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

本研究发现 SARS 冠状病毒多聚酶基因片段 BNI109 的保守性极强。<sup>袁</sup>适合建立 RT-PCR 法检测 SARS 冠状病毒。<sup>见</sup> 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。<sup>袁</sup>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。<sup>遥</sup>

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。<sup>袁</sup>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。<sup>见</sup> 800 copies/ml。<sup>袁</sup>而痰标本中含量则很高。<sup>见</sup> 108 copies/ml。<sup>袁</sup>所以，在临床检测中，<sup>袁</sup>应该尽量使用痰标本。<sup>袁</sup>只是在取不到痰标本时才使用咽拭子或血清标本。<sup>袁</sup>而且即使咽拭子中检测不出 SARS 冠状病毒，<sup>袁</sup>也不能说明病人就不是 SARS 冠状病毒携带者。<sup>见</sup> 我们的研究表明。<sup>袁</sup>很难在病人血清标本得到 RT-PCR 阳性检测结果。<sup>袁</sup>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。<sup>袁</sup>说明 SARS 患者出现病毒血症的时间很短。<sup>见</sup> 另外，<sup>袁</sup>由于 SARS 病人较少，<sup>见</sup> 有痰而咽拭子和血液中 SARS 冠状病毒的含量都很低。<sup>袁</sup> RT-PCR 法的检出率就显得尤为重要。<sup>见</sup> 为尽量提高 RT-PCR 检测的灵敏性。<sup>袁</sup>我们在试剂的选用。<sup>见</sup> 标本

RNA提取方法的选择<sup>②</sup>CR 条件的优化及 PCR 仪的选用等方面进行大量的研究<sup>③</sup>使我们对 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<sup>④</sup>达到 70%<sup>⑤</sup>

## 参考文献院

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 Poutamens M, Low DE, Henry B, et al. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada 咨 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 咨 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 咨 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 咨 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 咨 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 咨 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>袁雅玲<sup>1</sup>袁扬军<sup>2</sup>袁赖文岩<sup>1</sup>袁罗亮<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<sup>①</sup>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<sup>②</sup>获细胞数量多<sup>③</sup>形态正常<sup>④</sup>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大鼠支气管平滑肌细胞。

**关键词** 袁气管袁大鼠袁离子通道袁平滑肌袁细胞分离法

中图分类号<sup>5</sup>562.25 文献标识码<sup>6</sup> 文章编号<sup>院</sup>000-2588(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 Singlerat 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<sup>院</sup>002-10-21

基金项目<sup>院</sup>广东省自然科学基金<sup>渊</sup>80232冤

Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province

作者简介<sup>程仕虎</sup>973<sup>冤</sup>男<sup>袁</sup>湖北十堰人<sup>袁</sup>第一军医大学在读硕士研究生<sup>袁</sup>医师<sup>袁</sup>电话<sup>院</sup>20-61641575<sup>冤</sup>mail:dfzqrl@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<sup>⑤</sup>但细胞培养周期长<sup>⑥</sup>细胞生长易受多种因素影响<sup>⑦</sup>细胞酶分离法自 Kono<sup>咱暂</sup>首先报道以来<sup>⑧</sup>不断改进<sup>⑨</sup>越来越显示出它的优越性<sup>⑩</sup>但国内外单独介绍气管平滑肌细胞(TSMCs)酶分离方法的