

编者按 近年来,随着分子技术的发展和成熟,人们不断开拓其应用领域。目前,分子信标不仅可以用于基因的定量、定性检测,还可用于基因点突变等的分析,将分子信标与PNA-DNA环技术结合,使检测双链DNA成为可能。另外,分子信标技术还为研究DNA-蛋白质之间的相互作用提供了一种简单、直接、灵敏、实时、甚至可以用于活体检测的方法。分子信标技术自诞生以来,由于它极高的特异性、灵敏度等特点迅速进入生物学、基础医学、临床医学等各个相关领域。人们对分子信标的结构也进行了数次改进和发展,使之可以在更广的范围内发挥更大的作用。笔者将分子技术用于N蛋白前期的分子克隆设计中,得到了性质均一、纯度化很高的蛋白质,为分子技术在其他领域的应用研究提供科学依据。

SARS COV 结构蛋白N的核酸PCR扩增

袁宁 (陕西教育学院生命科学系,陕西西安710061)

摘要 [目的] 探讨SARS COV 结构蛋白的PCR扩增条件。[方法] 采用正交试验对SARS全基因组进行PCR反应筛选目标片段,确定退火温度、模板浓度、聚合酶量、引物浓度、PCR延长时间对于PCR反应的影响。[结果] 结果表明,在退火温度55~60℃、模板浓度5 ng/ml加入1 μl、DNA聚合酶加入0.25 μl、引物浓度25 pmol/L、PCR反应时间为60 s时,DNA回收量最高,为4.37 μg。[结论] 该研究为SARS冠状病毒核酸的转录和复制提供科学依据。

关键词 SARS COV 结构;核酸;PCR扩增

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)07-02873-02

Study on PCR Amplification of Nucleic Acid of SARS COV Structural Protein

YUAN Ning (Department of Life Science, Shaanxi Institute of Education, Xian, Shaanxi 710061)

Abstract [Objective] The purpose of this research was to discuss PCR amplification conditions of SARS COV structural protein. [Method] The PCR reaction of complete SARS genome was made through orthogonal test to select target fragment. The effect of annealing temperature, template concentration, polymerase amount, primer concentration, PCR prolong time on PCR reaction was studied. [Result] The results indicated that when annealing temperature was 55-60℃, template concentration was 5 ng/ml adding 1 μl, amount of polymerase was 0.25 μl, primer concentration was 25 pmol/L, time of PCR reaction was 60 s, DNA yield was 4.37 μg, which was the highest. [Conclusion] This research will provide the scientific basis for transcription and replication of SARS coronavirus nucleic acid.

Key words SARS COV structure; Nucleic acid; PCR amplification

非典型肺炎(Severe acute respiratory syndrome, SARS)是由SARS病毒引起的急性、致死性,以高热和呼吸道为主要症状的传染病。由于该病的致病途径及机理尚不清晰,加之目前尚无特效药物治疗,又无有效疫苗进行防制,严重威胁人类生命健康。SARS病毒具有冠状病毒科病毒共同的结构特性,单股正链病毒RNA基因组,主要含有钉状(Spike)糖蛋白、M糖蛋白、小糖蛋白E、血凝素、核蛋白、RNA聚合酶、蛋白裂解酶以及调节蛋白等。

N蛋白是SARS冠状病毒构成的重要组成部分。由于其蛋白精细三维结构至今没有解出,所以它在整个病毒复制过程中的作用还不清楚。但是,2003年有关N蛋白N端的NMR(图1)结构已经发表^[1]。据文献介绍,由它编码的蛋白空间拓扑结构包括5个反向的片层,其中2和3之间的环形LOOP很有可能就是夹住单链RNA的“夹子”(图2)。使得单链RNA在空间中稳定形成蛋白核壳体,有利于病毒核酸的转录和复制。

PCR仅应用于扩增位于两段已知序列之间的DNA片段。它是在DNA复制理论的基础上建立起来的,由DNA聚合酶催化的一系列合成反应,反应中必须使用2段寡核苷酸作为引物。引物分别与模板DNA两条链上的各一段互补,而这2段模板序列又分别位于待扩增DNA片段的两侧。反应时,在DNA聚合酶、引物、dNTP参与下对模板DNA经过高

温变性、低温退火和适温延伸完成1个循环,一轮循环的产物又充当下一轮扩增的模板,在这周而复始的过程中使DNA以2n倍量增加。笔者对SARS COV结构蛋白的PCR扩增条件进行研究,以期能为分子技术的应用提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料 PCR反应体系为50 μl;包括模板的量、前端引物F primer、后端引物R primer、聚合酶Taq、10×PCR buffer和超纯灭菌水。

1.2 方法 该试验主要针对N蛋白前期的分子克隆而设计。要得到性质均一、纯度很高的蛋白质,需要将目标基因片段克隆到能够在E.coli中大量表达的原核载体中,所以在分子克隆阶段需要尽可能得到高浓度高纯度的目标基因片段^[2]。在前期工作中,笔者已经得到浓度已知的SARS病毒cDNA模板,并且设计好了N蛋白相应PCR反应所需要的引物。模板浓度为10 ng/ml、引物浓度为25 pmol/L、聚合酶0.25 μl(0.25 U),常用退火温度55℃下做了预试验,试验表明模板和引物均正确。对SARS全基因组进行PCR反应筛选目标片段,确定退火温度、模板浓度、聚合酶量、引物浓度和PCR延长时间对PCR反应的影响,进一步优化PCR反应条件以得到浓度较高的核酸DNA片段。选用最终核酸回收量,作为因子的响应变量。

试验过程中,在退火温度为50和65℃时通过电泳发现,PCR反应没有得到扩增后的片段。

将PCR反应体系(50 μl)用精准的移液枪添加至EP管,完毕后轻轻的吹打均匀,使得各个组分充分的混合。将混合

作者简介 袁宁(1969-),男,陕西延安人,讲师,从事生物化学及生理学的教学与研究。

收稿日期 2008-12-17

溶液放置到95℃水浴中加热5 min 预热后,继续在95℃中加热30 s,随即将混合液置于退火温度中退火30 s,再立刻转入72℃水浴中延伸一定时间,即完成了1个循环,重复30次后,再将混合液转入72℃水浴延伸10 min,取出后加入Loading buffer 进行电泳,切胶回收后用紫外分光光度计测量核酸复制片段在260 nm 处的光吸收值,得到回收DNA 的量(Y)。各效应因子及水平见表1所示。

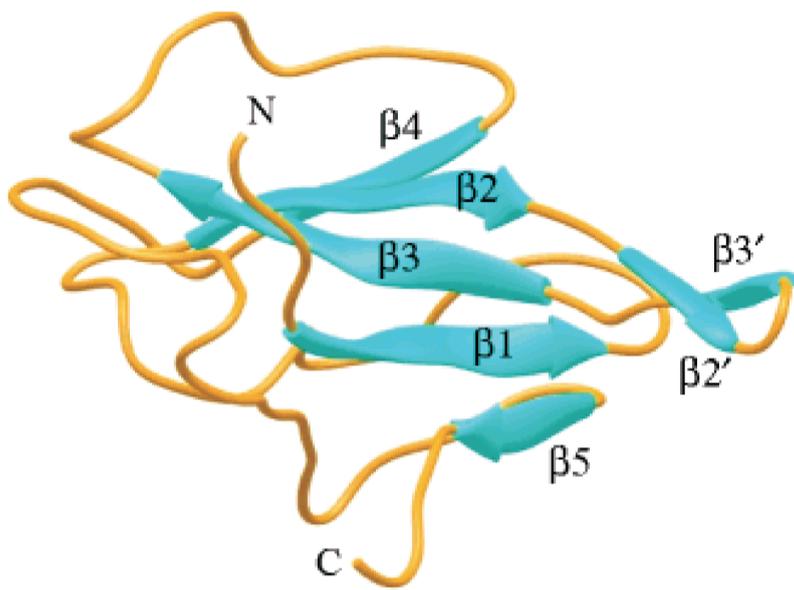


图1 SARS 冠状病毒N 蛋白 NMR 结构

Fig.1 NMR structure of N protein in SARS coronavirus

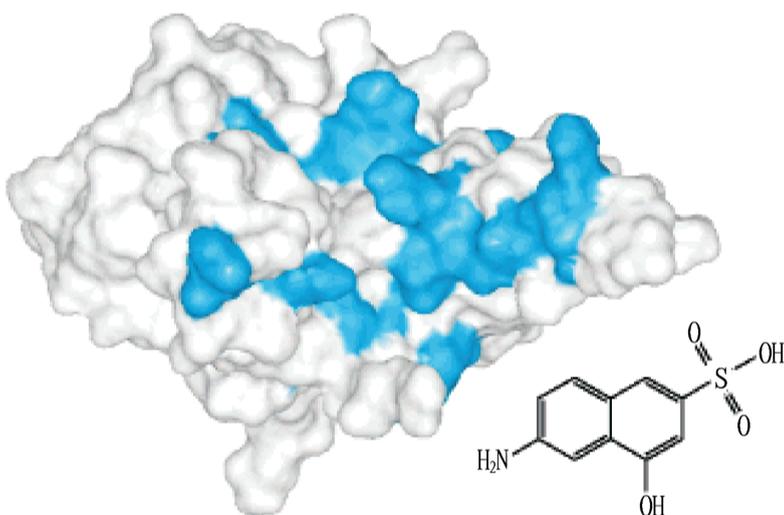


图2 SARS 冠状病毒N 蛋白的表面电势图

Fig.2 The surface potential of N protein in SARS coronavirus

表1 各个效应因子及水平

Table 1 Each effect factor and level

模板浓度 水平 (A)	退火温 度(B)	聚合酶量 (C)	引物浓度 (D)	PCR 延长时 间(E)
Template concentration	Annealing temperature	Polymerase amount	Primer concentration	Prdorg time of PCR
0	55	0.25	25	40
1	60	0.50	100	50
2				60

根据以往试验的经验,在以上的5个因子中,因子A的作用最为重要,它决定了是否能够成功地扩增出目标DNA。因子E 决定扩增DNA 的特异性是否好。该试验分为2个阶段,在预试验的基础上对因子A和B做初筛,发现在因子A中只有在55~60℃才能成功复制出核酸,故选定55和60℃2个水平,然后继续对其余的各因子做进一步的优化。由于加样器系统误差大等原因,进行完全试验是最佳方案(做每一个水平组合试验的成本和耗时都不大)。该试验中有1个3水平因子和4个2水平因子,根据实验室在PCR 试验方面

积累的经验可认为所有的交互效应都可以忽略,通过文献调研A、B 2个因子之间基本可视为相对独立,因此采用正交设计。

2 结果与分析

2.1 DNA 回收量 响应变量见表1所示。总平均值 $\bar{y} = 3.326 \mu\text{g}$ 。

对于2水平因子:用-1代替0,采用线性回归模型参数估计,得到第1个2水平因子(模板浓度)的主效应估计: $\hat{\alpha}_1 = (-3.14 - 2.27 + 2.48 + 2.19 - 3.39 - 3.50 + 3.53 + 3.27 - 3.76 - 4.37 + 3.98 + 4.03) / 12 = -0.0792$ 。

表2 反应程序的水平正交设计(3²)与响应变量

Table 2 The level orthogonal design and response variable of the reaction process

实验序号 Est No.	响应变量 Response variable					DNA 回收量 μg Reclai ned amount of DNA
	A	B	C	D	E	
1	0	0	0	0	0	3.14
2	0	1	0	1	0	2.27
3	1	0	1	0	0	2.48
4	1	1	1	1	0	2.19
5	0	0	1	1	1	3.39
6	0	1	1	0	1	3.50
7	1	0	0	0	1	3.53
8	1	1	0	1	1	3.27
9	0	0	1	1	2	3.76
10	0	1	0	0	2	4.37
11	1	0	0	1	2	3.98
12	1	1	1	0	2	4.03

注:根据切胶回收后用紫外分光光度计测量核酸复制片段在260 nm 处光吸收值的大小计算DNA 回收量。

Note :The reclai ned amount of DNA was calculated through measuring the absorbance value of nucleotide replication fragment at 260 nm by ultraviolet spectrophotometer after cutting and redai ning the gel .

同理,可以得到其他3个2水平因子的主效应估计: $\hat{\alpha}_2 = -0.0542$, $\hat{\alpha}_3 = -0.1008$, $\hat{\alpha}_4 = -0.1825$ 。

对于3水平因子(PCR 延长时间),分别用0, 1, 2表示对应水平的0,1,2的主效应,可求出: $\hat{\alpha}_0 = (3.14 + 2.27 + 2.48 + 2.19) / 4 - \bar{y} = -0.806$, $\hat{\alpha}_1 = (3.39 + 3.50 + 3.53 + 3.27) / 4 - \bar{y} = 0.093$, $\hat{\alpha}_2 = (3.76 + 4.37 + 3.98 + 4.03) / 4 - \bar{y} = 0.709$ 。总平方和: $SST = \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2 = 5.437$, 自由度 = N - 1 = 11。

对于4个2水平因子,其平方和为12²,分别为0.075、0.035、0.122、0.400,自由度都为1;对于3水平因子(PCR 延长时间),其平方和为4(0² + 1² + 2²) = 4.648,自由度为2。SSE = 5.437 - 0.075 - 0.035 - 0.122 - 0.4 - 4.648 = 0.157, 自由度 = 11 - 1 - 1 - 1 - 1 - 2 = 5。 $\bar{\sigma}^2 = SSE / 5 = 0.031$ 。

对2水平因子,F 统计量为 $12\hat{\alpha}_j^2 / \bar{\sigma}^2$, 它们分别为:2.42、1.13、3.94、12.9, $F_{(1,10),0.05} = 4.96$;对于3水平因子,F 统计量为 $4(0^2 + 1^2 + 2^2) / 2\bar{\sigma}^2 = 74.97$, $F_{(2,9),0.05} = 4.26$ 。

因此,可以看出,对于响应变量Y(DNA 回收量),3水平因子(E:PCR 延长时间)和2水平因子(D:引物浓度)的主效应是显著的。

2.2 各因子对DNA 回收量的影响 由于PCR 实验是非常 (下转第2882页)

- tions[J]. *Genet*, 1985, 60: 293 - 305.
- [4] OHNISHI O, ASANO N. Genetic diversity of *Fagopyrum homotropicum*, a wild species related to common buckwheat[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1999, 46: 389 - 398.
- [5] KUMP B, JAVORNÍK B. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Merck) populations by RAPD markers[J]. *Hort Science*, 1996, 114: 149 - 158.
- [6] IWATA H, IMONO K, TSUMURA Y, et al. Genetic diversity among Japanese indigenous common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) cultivars as determined from amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeat markers and quantitative agronomic traits[J]. *Genome*, 2005, 48(3): 367 - 377.
- [7] ZIEKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genetica*, 1994, 20: 176 - 183.
- [8] BLAIR M W, PANAUD O, MCCOUCH S R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 780 - 792.
- [9] GILBERT J E, LEWIS R V, WILKINSON M J, et al. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections[J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 1125 - 1131.
- [10] SAGHA-MARCOF MA, SOULIMAN K M, JORGENSEN R A. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Ribosomal inheritance, chromosomal location, and population dynamics[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(24): 8014 - 8018.
- [11] KANETIY R V, ZENG X, BENNEIZEN J L, et al. Detection of high levels of polymorphism among dent and popcorn inbred lines using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) amplification technique[J]. *MNL*, 1995, 69: 132 - 134.
- [12] BASSAM B J, CAETANO ANOLLES G, GRESSHOFF P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. *Anal Biochem*, 1991, 196: 80 - 83.
- [13] ROHLF J. *NUMSYS pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system* [M]. NY: Version 1.7 Exeter Software Statket, 1992.
- [14] 杨淑达, 施苏华, 龚洵, 等. 滇牡丹遗传多样性的ISSR分析[J]. *生物多样性*, 2005, 13(2): 105 - 111.
- [15] 陶爱芬, 祁建民, 李爱青, 等. 红麻优异种质资源遗传多样性与亲缘关系的ISSR分析[J]. *作物学报*, 2005, 31(12): 1668 - 1671.
- [16] 杨本超, 肖炳光, 陈学军, 等. 基于ISSR标记的烤烟种质遗传多样性研究[J]. *遗传*, 2005, 27(5): 753 - 758.
- [17] MCKHANN H, CAMILLER C, BERARD A, et al. Nested core collections maximizing genetic diversity in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant J*, 2004, 38: 193 - 202.
- [18] 王莉花, 殷富有, 刘继海, 等. 利用RAPD分析云南野生荞麦资源的多样性和亲缘关系[J]. *荞麦动态*, 2004(2): 7 - 15.
- [19] FRANCO J, CROSSA J, RIBAUT J M, et al. A method for combining molecular markers and phenotypic attributes for classifying plant genotypes[J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 944 - 952.
- [20] 程春明, 石云素, 宋燕春, 等. ISSR分子标记技术在分析玉米自交系遗传关系研究中的适用性[J]. *生物遗传资源学报*, 2005, 6(2): 172 - 177.
- [21] HUI K, GOODMAN M, MUSE S, et al. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites[J]. *Genetics*, 2003, 165(4): 2117 - 2128.
- [22] 王丽侠. 中国栽培大豆遗传多样性分析与核心种质构建 [C]. 北京: 中国农业科学院, 2005.
- [23] MURAI M, OHNISHI O. Population genetics of cultivated common buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Merck X. Diffusion routes revealed by RAPD markers[J]. *Genes Genet Syst*, 1996, 71: 211 - 218.
- [24] HUI C Q, JIN H, GUO X F, et al. RFLP analysis of nethanogens nraA gene in rumen of cashmere goat[J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(3): 49 - 52, 55.
- [25] YU J F, BAO F, HAN X L, et al. Establishment and optimization of ISSR-PCR system in *Tachydermus fasciatus heckel*[J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(5): 37 - 39, 95.
- [26] 李瑞国, 高冬丽, 柴岩, 等. 苦荞资源农艺性状因子聚类分析[J]. *干旱地区农业研究*, 2007, 25(6): 80 - 84.

(上接第2874页)

灵敏的实验,引物对于一点点模板就能马上识别并进行复制,一旦初始的引物与模板结合并在第1个循环中复制出了目标基因,那么以后的循环就有了更多的模板。另外,聚合酶是一种高效率的酶,它对温度的变化比较迟钝,也就是说它可以在30次循环中反复的催化反应进行,所以说模板浓度5 ng/ml加入1 μ l, DNA聚合酶加入0.25 μ l已经足够。过多的引物加入,只会使得引物二聚体的生成更加容易。

原理上DNA的解链需要很大的能量,尤其是N蛋白的编码基因有594 bp,且GC含量很高,所以在一开始的熔解温度上,选择了95 $^{\circ}$ C,使得DNA能够成功地解链。随后在退火时,合适的温度使得引物能够特异性的与核酸两端相应的序列结合,避免引物自身或者是前、后端引物之间进行匹配,导致最后目标片段复制的特异性不好造成回收量的减少,对于N蛋白编码基因,退火温度为55~60 $^{\circ}$ C时对引物与模板的结合没有大的影响,但是50和65 $^{\circ}$ C就完全形成了引物二聚体,得不到痕量的目标DNA。

由于DNA双链解旋后,在退火时,引物寻找到相匹配的序列后与其结合,在DNA聚合酶的催化下,dNTP与模板相互匹配,逐渐合成新的DNA单链。这时延伸的时间决定了单链DNA是否能完全合成。过短的时间会导致594 bp的单核

苷酸还没有合成完毕,反应就中止,这将导致回收量的减少。但是如果延伸时间过长,在单链DNA合成完毕后还有较长时间空闲,就会使聚合酶“无事生非”,导致核酸突变,这样的结果会致使蛋白在表达后发现氨基酸产生突变造成空间结构的改变或者蛋白功能的丧失。该试验结果表明,延伸时间在60 s时,效果最好,这与经验上认为聚合酶大约每秒合成10个单核苷酸的结论相符。

3 小结

从数据分析的结果可知,对于N蛋白编码基因进行PCR反应时,反应的延伸时间主要影响到DNA产物回收的量。在PCR反应过程中,有许许多多的因素影响试验结果的好坏,并且根据编码核酸的组成成分和大小长短,每种DNA所受到的牵制因素都不同,甚至是同一种DNA在进行不同次重复的试验时都会得到不同的结果。因此,该试验中,笔者尽量避免了由于试验操作的不规范带来的实验误差,比如在加样的时候,对于微量的样品都采用同一水平的加样方式等。

参考文献

- [1] HUANG Q L, YU L P, ANDREW M. Structure of the N-terminal RNA binding Domain of the SARS CoV nucleocapsid protein[J]. *Biochemistry*, 2004, 43: 6059 - 6063.
- [2] J·萨姆布鲁克 D·W·拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2002.