维普资讯 http://www.cqvip.com

第18卷3期 中国病毒学 18(3): 232—236
2003年6月 VIROLOGICA SINIGA June 2003

# 一步法双重RT-PCR检测SARS冠状病毒技术研究

周敦金[1]，唐少文[1]，王 斌[1]，杨华芬[3]，刁平[1]，许 青[3]，刘 斌[3]，杨继红[1,2**]

(1. 武汉市疾病预防控制中心，湖北武汉，430022；2. 中国科学院武汉病毒研究所，中国科学院分子病毒学重点实验室，湖北武汉，430071；
3. 武汉市传染病医院，湖北武汉，430022)

# One-step Duplex RT-PCR Assay for Detection SARS Associated Coronavirus

ZHOU Dun-jin[1], TANG Shao-wen[1], WANG Bin[1], YANG Hua-fen[3], DIAO Ping[1],
XU Qing[3], LIU Bin[3], YANG Ji-hong[1,2**]

*(1. Wuhan Centers for Diseases Prevention and Control, Wuhan 430022, China; 2. The Key Laboratory of Molecular Virology, Wuhan Insititute of Virology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 3. Wuhan Infection Diseases Hospital, Wuhan 430022, China)*

**Abstract:** According to PCR primers for SARS developed by WHO network laboratories we synthesize 4 primer pairs: BNIin-s/as、BNIout-s/as、SARl-s/as、COR1/COR2 and establish assays of one-step RT-PCR for detection of SARS associated coronavirus. Specific DNA fragments as predicted were produced from specimen W20 by the assays using all 4 primer pairs, while one specific DNA fragment was produced from specimen W1 using primer pair BNIin-s/as. The PCR products from W20 were sequenced and the sequence showed high identity to that of all SARS associated coronavirus in GenBank, which showed that PCR products amplified from W1 and W20 by our assays was specific for SARS associated coronavirus. Based on the one-step RT-PCR we developed four one-step duplex RT-PCR for amplifying two fragment in one reaction by combination of 4 primer pairs above. And the assays of one-step duplex RT-PCR have higher specificity and were reliable for detection of SARS associated coronavirus.

**Key Words:** SARS; Coronavirus; One-step RT-PCR; Duplex RT-PCR; Detection

**摘要**：参照WHO公布的PCR检测SARS相关冠状病毒的引物序列，我们合成了4对引物，建立了一步法RT-PCR检测SARS相关冠状病毒的方法。利用该方法，对武汉市非典型肺炎疑似病例喉漱液进行了SARS相关冠状病毒检测，其中w20用4对引物检测均在相应的位置出现了DNA条带，W1只有BNIin-s / as引物出现预期产物。同时我们将样品W20的RT-PCR扩增产物进行了序列测定，结果显示该片段序列与其他地区和国家分离的SARS冠状病毒基因高度同源性，这进一步说明RT-PCR扩增的产物是SARS冠状病毒基因片段。在此基础上我们又建立了四种SARS冠状病毒一步法双重RT-PCR检测方法，在一个RT-PCR反应中用两套引物同时对SARS冠状病毒基因两个不同的片段进行检测，检测结果具有更高的特异性。

**关键词**：传染性非典型肺炎；冠状病毒；一步法RT-PCR；双重RT-PCR；检测

**中国分类号**：R373 **文献标识码**：A **文章编号**：1003-5125 (2003) 03-0232-05

严重急性呼吸综合征(Severe Acute Respiratory Syndrome，SARS)，即传染性非典型肺炎(简称非典)，是指目前病原尚不完全明确，近期在我国局部地区发生流行，主要通过近距离空气飞沫传播的一种呼吸道传染病，临床主要表现为肺炎，在家庭和医院有显著的聚集现象的感染性疾病[1]。据WHO统计，截止2003年5月16日，全球累计30个国家和地区、7739人感染SARS，死亡611人[2]。尽

收稿日期：2002-05-25，修回日期：2002-05-28
作者简介：周敦金（1955-），男，湖北武汉籍，硕士，主任医师，研究方向为分子流行病学。
** 通讯作者：杨继红（1965-），男，湖北云梦籍，主任技师，硕士，研究方向为医学病毒学。027-85805874，E-mail: stanyang33@hotmail.com

维普资讯 http://www.cqvip.com



管对引起 SARS 的病原有许多争论，但较倾向认为 SARS 可能的病原是一种冠状病毒科的一个新变种。自 2002 年 11 月中旬 SARS 出现以来，全球的科学家在病原的寻找、病原的分离鉴定、SARS 冠状病毒的基因序列分析进行了不懈的努力，2003 年 4 月 16 日 WHO 宣布 SARS 病原是一种以前没有见过的一种新冠状病毒。由于 SARS 病原确认时间较短，目前还难以从市场上得到经过权威机关认可的 SARS 检测试剂。为此我们建立了一步法双重 RT-PCR 检测 SARS 冠状病毒技术，用于临床上 SARS 疑似病例的检测，现将实验结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

SARS 疑似病例患者的痰液、喉嗽液、血液标本在武汉市传染病医院采集，所有病例的诊断均严格按照 WHO 的指导原则进行[3]。健康成人痰液、喉嗽液、血液标本在开始建立一步法 RT-PCR 检测 SARS 冠状病毒方法前从本实验室工作人员中采集，均无流行病学接触史。

### 1.2 PCR 引物

参照 WHO 在 2003 年 4 月 17 日公布的用于 RT-PCR 检测 SARS 冠状病毒的引物序列[4]，我们合成了 BNIin-s/as、BNIout-s/as、SARl-s/as、CORl/COR2、IN2/4、IN6/7 共 6 对引物，经国际互联网在线 BLAST 分析，发现 IN2/IN4、IN6/IN7 两对引物与 GenBank 中 SARS 冠状病毒基因同源性较差，故而舍弃不用。其余四对引物序列以及在 SARS 冠状病毒 TOR-2 基因(GenBank 序列号：AY274119)上的位置、扩增片段见表 1。

表 1 一步法 RT-PCR 检测 SARS 冠状病毒引物

Table 1. Primers for detection SARS associated coronavirus

| 引物 Primer | 序列 Sequence | 位置 Position | 扩增片段 Amplified fragment |
|---|---|---|---|
| SAR1-s | CCT CTC TTG TTC TTG CTC GCA | 15256-15276 | 121bp |
| SAR1-as | TAT AGT GAG CCG CCA CAC ATG | 15356-15376 | |
| COR1 | CAC CGT TTC TAC AGG TTA GCT AAC GA | 15303-15327 | 311bp |
| COR2 | AAA TGT TTA CGC AGG TAA GCG TAA AA | 15588-15613 | |
| BNout-s | ATG AAT TAC CAA GTC AAT GGT TAC | 18138-18161 | 190bp |
| BNout-as | CAT AAC CAG TCG GTA CAG CTA C | 18306-18327 | |
| BNIin-s | GAA GCT ATT CGT CAC GTT CG | 18186-18207 | 109bp |
| BNIin-as | CTG TAG AAA ATC CTA GCT GGA G | 18273-18294 | |

### 1.3 RNA 抽提

患者的痰液、喉嗽液、血液标本中 RNA 抽提采用 GSL 溶液(4mol/L 异硫氰酸胍，25mmol/L 柠檬酸钠，0.5%十二烷基肌氨酸钠)，具体方法简述如下：取 SARS 疑似病人喉嗽液 1mL，台式离心机 8000r/min 离心 2min，将沉淀悬浮在 200μL 的 TE 缓冲液(10mmon/LTris，1mmol/L EDTA，pH8.0)中，加入 GSL 溶液 400μL，400μLTE 缓冲液饱和的重蒸酚，100μL 水饱和的氯仿：异戊醇，每加一种试剂均充分混匀。10000r/min 离心 15min，收集水相，向水相中加入 2μg 酵母 tRNA，1/10 体积 3mol/L 醋酸钠，2 体积无水乙醇，-20℃沉淀 1h 以上，16 000r/min 离心 15min 回收核酸，将核酸溶解在 20μL 无核酸酶水中，-70℃备用。痰液、血液标本中 RNA 抽提采用相同方法。

### 1.4 一步法 RT-PCR 检测 SARS 冠状病毒

SARS 冠状病毒检测采用 Qiagen 一步法 RT-PCR 试剂盒进行。RT-PCR 反应混合液按试剂盒推荐配方配制：5 倍 RT-PCR 缓冲液 10μL，5 倍 Q 溶液 10μL，10mmol/LdNTP 2μL，20μmol/L 上下游引物各 1.5μL，RT-PCR 酶溶液 2μL，无核酸酶水 21μL，样品 RNA2μL。各个引物对热循环条件见表 2。扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳检测。

表 2 一步法 RT-PCR 热循环条件

Table 2 Thermal conditions for RT-PCR

| 引物对 A pair of primer | 热循环条件 Condition of PCR |
|---|---|
| SAR1-s/as | 50℃ 30min, 95℃ 15min, (94℃ 30s-56℃ 30s-72℃45s)×45, 72℃ 7min |
| COR1/2 | 50℃ 30min, 95℃ 15min, (94℃ 30s-58℃ 30s-72℃45s)×45, 72℃ 7min |
| BNIout-s/as | 50℃ 30min, 95℃ 15min, (94℃ 30s-54℃ 30s-72℃45s)×45, 72℃ 7min |
| BNIin-s/as | 50℃ 30min, 95℃ 15min, (94℃ 30s-53℃ 30s-72℃45s)×45, 72℃ 7min |

维普资讯 http://www.cqvip.com



### 1.5 一步法双重 RT-PCR 检测 SARS 冠状病毒

根据四对引物 BNIin-s/as、BNIout-s/as、SARl-s/as、CORl/COR2 在 SARS 冠状病毒基因上的位置，将他们组成四个引物组合：1)SARl-s/as 和 BNIout-s/as, 2)SARl-s/as 和 BNIin-s/as, 3)CORl/COR2 和 BNIout-s/as，4)CORl/COR2 和 BNIin-s/as，进行 SARS 冠状病毒的一步法双重 RT-PCR 检测。热循环条件为 50℃ 30min，95℃15min，(94℃ 30s，56℃ 30s，72℃45s)45 个循环，72℃7min。

## 2 结果

### 2.1 一步法 RT-PCR 检测

采用一步法 RT-PCR 对在武汉市传染病医院采集的临床上疑似 SARS 感染患者的喉漱液中提取的 RNA 进行检测。结果样品 W20 应用 BNIin-s/as、BNIout-s/as、SARl-s/as、CORl/COR2 等 4 对引物分别扩增出大小为 109bp、190bp、121bp、311bp 的产物，样品 W1 应用 BNIin-s/as、BNIout-s/as、SARl-s/as、CORl/COR2 等 4 对引物只有 BNIin-s/as 引物对扩增出大小为 109bp 的产物(图 1)。这些 RT-PCR 产物与我们根据 SARS 冠状病毒 TOR-2 基因(GenBank 序列号：AY274119)推断的产物大小相吻合，根据这个结果初步判断样品 W1、W20 为 SARS 冠状病毒阳性，我们建立的 SARS 冠状病毒一步法 RT-PCR 检测方法成立。

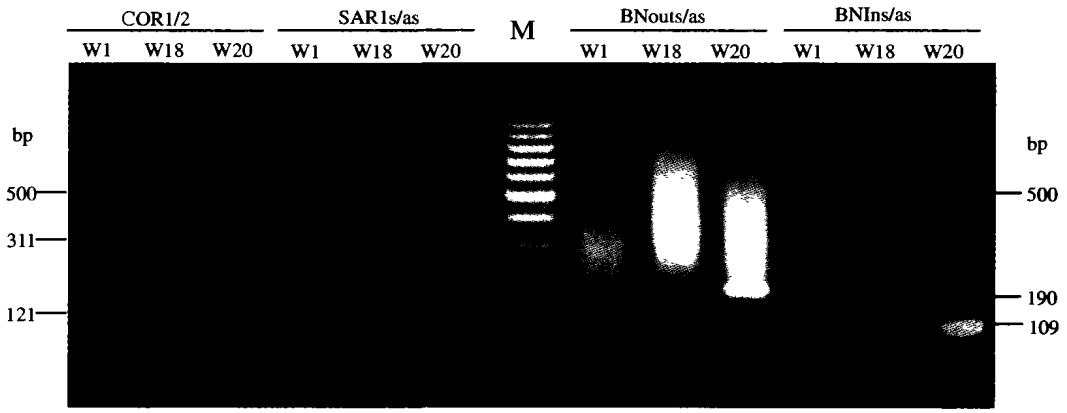


图 1 一步法 RT-PCR 检测 SARS 冠状病毒

Fig.1 One-step RT-PCR for detection associated coronavirus

### 2.2 一步法 RT-PCR 检测结果确认

为了确认采用一步法 RT-PCR 以 BNIin-s/as、BNIout-s/as、SARl-s/as、CORl/COR2 等 4 对引物从 Wl、W20 两个标本中 RT-PCR 扩增的产物是 SARS 冠状病毒基因片段，我们在紫外灯下小心样品 W20 RT-PCR 扩增的产物带，用玻璃奶 DNA 回收纯化试剂(北京原平浩生物技术公司)回收纯化后，以 PCR 引物进行序列测定，序列结果如下(图 2)。

A

```
  1 CACCGTTTCT ACAGGTTAGC TAACGAGTGT GCGCAAGTAT TAAGTGAGAT GGTCATGTGT GGCGGCTCAC TATATGTTAA
 81 ACCAGGTGGA ACATCATCCG GTGATGCTAC AACTGCTTAT GCTAATAGTG TCTTTAACAT TTGTCAAGCT GTTACAGCCA
161 ATGTAAATGC ACTTCTTTCA ACTGATGGTA ATAAGATAGC TGACAAGTAT GTCCGCAATC TACAACACAG GCTCTATGAG
241 TGTCTCTATA GAAATAGGGA TCTTGATCAT GAATTCGTGG ATGAGTTTTA CGCTTACCTG CGTAAACATT T
```

B

```
  1 ATGAATTACC AAGTCAATGG TTACCCTAAT ATGTTTATCA CCCGCGAAGA AGCTATTCGT CACGTTCGTG CGTGGATTGG
 81 CTTTGATGTA GAGGGCTGTC ATGCAACTAG AGATGCTGTG GGTACTAACC TACCTCTCCA GCTAGGATTT TCTACAGGTG
161 TTAACTTAGT AGCTGTACCG ACTGGTTATG
```

图 2 RT-PCR 扩增产物序列

Fig.2 Sequence of products amplified by RT-PCR

A, Primers of COR1/COR2; B, Primers of BNIout-s/as.

维普资讯 http://www.cqvip.com



在国际互联网上利用基因序列同源性分析软件 BLAST 将 RT-PCR 扩增的产物的序列与 GenBank 中保存的 9 株 SARS 冠状病毒的基因序列进行同源性分析发现，标本 W20 RT-PCR 扩增的产物基因序列与它们具有极高的同源性。引物对 CORl/COR2 扩增的产物与全部 20 株 SARS 冠状病毒的基因序列同源性均为 100%，BNIout-s/as 扩增的产物与 9 株 SARS 冠状病毒的基因序列同源性均在 99%以上。证明我们应用 BNIin-s/as、BNIout-s/as、SARl-s/as、CORl/COR2 等 4 对引物从 W20 中 RT-PCR 扩增的产物是 SARS 冠状病毒基因片段，我们建立的一步法 RT-PCR 是一种可靠的 SARS 冠状病毒检测方法。

### 2.3 一步法双重 RT-PCR 检测

采用一步法双重 RT-PCR 对在武汉市传染病医院采集的临床上疑似 SARS 感染患者 W20 的喉漱液中提取的 RNA 进行检测。结果样品 W20 以引物组合 SARl-s / as 和 BNIout-s / as 进行检测时，同时扩增出大小分别为 121bp、190bp 的两条产物带；以引物组合 SARl-s / as 和 BNIin-s / as 进行检测时，同时扩增出大小分别为 109bp、121bp 的两条产物带；以引物组合 BNIout-s / as 和 CORl / 2 进行检测时，同时扩增出大小分别为 190bp、311bp 的两条产物带；以引物组合 CORl / 2 和 BNIin-s / as 进行检测时，同时扩增出大小分别为 109bp、311bp 的两条产物带；(图 3)。

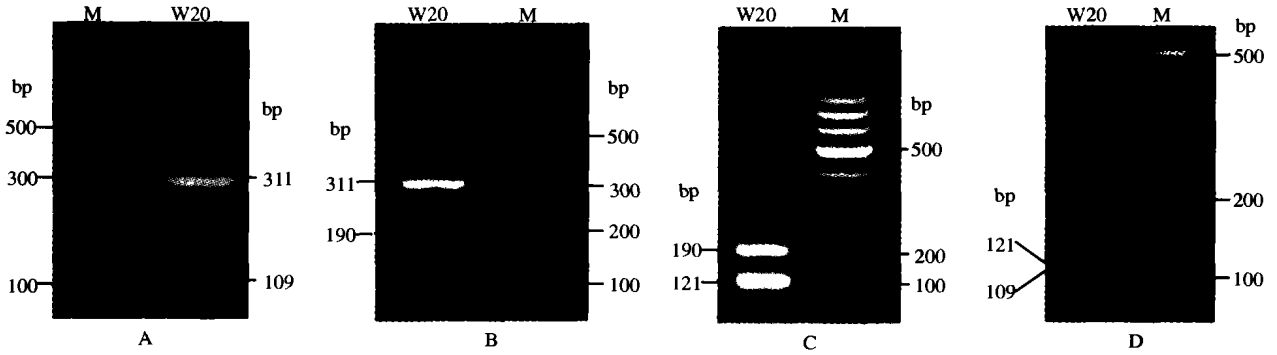


图 3 一步法双重 RT-PCR 检测 SARS 冠状病毒

Fig.3 One-step duplex RT-PCR for detection SARS associated coronavirus

A, Primers combination of COR1/COR2 and BNIin-s/as; B, Primers combination of COR1/COR2 and BNIout-s/as; C, Primers combination of SAR1-s/as and BNIout-s/as; D, Primers combination of SAR1-s/as and BNIin-s/as.

## 3 讨论

由于 SARS 病原确认时间较短，目前还没有成熟大家普遍接受的 SARS 检测方法。目前国内已有卫生部批准的 SARS 冠状病毒特异的 IgG、IgM 抗体 ELISA 检测试剂盒，但从 SARS 冠状病毒到人体内产生特异的 IgG、IgM 抗体需要一段时间。SARS 冠状病毒特异的 IgG、IgM 抗体检测试剂盒虽然可以检测 SARS 冠状病毒感染，但由于特异的 IgG、IgM 抗体出现时间的滞后，这种方法难以对 SARS 冠状病毒感染进行早期诊断。本研究采用一步法 RT-PCR 直接检测 SARS 冠状病毒的 RNA，不管体内是否产生特异的 IgG、IgM 抗体，可以进行 SARS 冠状病毒感染早期诊断。对武汉市 SARS 病人和疑似病例检测中我们观察到，SARS 冠状病毒 RNA 一步法 RT-PCR 比采用 SARS 冠状病毒特异的 IgG、IgM 抗体 ELISA 提前 6d 检测到 SARS 冠状病毒感染(另文报道)。

根据 WHO 的建议[5]，SARS 冠状病毒的 PCR 检测阳性结果，或者经过第二个实验室测试，或者经过从原始标本开始重复 PCR 方可证实。另外可以通过扩增第二个基因片段增加检测的特异度。本研究建立一步法双重 RT-PCR 直接检测 SARS 冠状病毒 RNA 技术，一次完成 SARS 冠状病毒两个基因片段的检测，进一步增加检测的特异度。我们所采用的四个引物组合 SARl-s/as 和 BNIout-s/as、SARl-s/as 和 BNIin-s/as、CORl/COR2 和 BNIout-s/as、CORl/COR2 和 BNIin-s/as，均可以成功地同步扩增 SARS 冠状病毒基因的两个片段。在实验中我们观察到一步法双重 RT-PCR 使用的两套引物，其扩增片段大小越接近，两条带的扩增效率就越接近，SARl-s/as 和 BNIin-s/as 两个扩增产物的扩增效率最接近，其次是引物组合 SAR1-s/as 和 BNIout-s/as、CORl/COR2 和 BNIout-s/as 、CORl/COR2 和

维普资讯 http://www.cqvip.cpm



BNIin-s/as。但是 SARl-s/as 和 BNIin-s/as 两个引物对的扩增产物大小差距太小，电泳检测时又难于分辨。因此我们认为尽管四个引物组合均可成功同步扩增 SARS 冠状病毒基因的两个片段，SARl-s/as 和 BNIout-s/as 是较好的一步法双重 RT-PCR 检测 SARS 冠状病毒引物组合。

**致谢：** 武汉市疾病预防控制中心刘传楠、唐力、周璇、朱洪浩、王远虹、林新明等同志参加了部分实验工作，特致谢意。

## 参考文献

[1] 卫生部疾控司. 非典型肺炎防治技术方案[S]，2003.

[2] Cumulative Number of Reported Probable Cases of Severe Acute Respiratory Syndrome(SARS)[OL]. http: // www. who. int/csr/sars/country/2003_05_16/en, 2003-5-17.

[3] 卫生部. 传染性非典型肺炎病毒研究实验室暂行管理办法[S]. 非典型肺炎病例实验室检测标本采集技术指南（试行）[S]. 2003.

[4] PCR primers for SARS developed by WHO NETWORK laboratories [OL]. http: //www. Who. int/csr/sars/primers/en/, 2003- 4-17.

[5] 采用 PCR 实验室检测 SARS 冠状病毒 RNA 的建议[OL]. http: // www.Chinacdc. net. cn/feiyan/5.2/who5.2_2.htm, 2003-4-29.