

# 利用 Taq DNA 聚合酶直接从双链 RNA 模板中扩增靶序列\*

刘 莉<sup>1</sup> 陈集双<sup>2\*\*</sup>

(湖州师范学院生命科学学院 湖州 313000)<sup>1</sup> (浙江理工大学生命科学学院 杭州 310018)<sup>2</sup>

**摘要:** 利用 Taq DNA 聚合酶既具有 DNA 聚合酶活性又具有反转录酶活性的特点, 探索了在 Taq DNA 聚合酶单独作用下以双链 RNA 为模板进行 PCR 反应的条件。结果表明靶序列长度为 277 bp、369 bp、987 bp 时, 均可直接进行 PCR 扩增; 短片段序列扩增的退火温度在 47.0℃、47.9℃、50.2℃、52.6℃、54.9℃、56.7℃ 条件下, 均可有效扩增, 而长片段序列扩增的退火温度在 50.2℃、52.6℃、54.9℃、56.7℃ 条件下, 也可扩增出相应的靶序列。这一结果提示利用 Taq DNA 聚合酶可以 dsRNA 为模板直接扩增目的片段, 尤其是短片段的扩增。

**关键词:** Taq DNA 聚合酶, 反转录活性, PCR, 双链 RNA

**中图分类号:** Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0057-04

## Direct Amplification of Target Sequences by Taq DNA Polymerase Using Double-stranded Rna as Templates\*

LIU Li<sup>1</sup> CHEN Ji-Shuang<sup>2\*\*</sup>

(School of Life Sciences, Huzhou Teachers College, Huzhou 313000)<sup>1</sup>

(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018)<sup>2</sup>

**Abstract:** Taq DNA polymerase has the activities of DNA polymerase and RNA reverse transcriptase. This research used the Double-stranded RNAs were used as templates for direct PCR, making use of the characteristics of Taq DNA polymerase. PCR for target sequences of 277, 369 and 987 bp from dsRNA templates were performed directly with Taq DNA polymerase. When the sizes of target sequences were 277 bp and 369 bp, they were amplified with dsRNA templates on the denaturing temperatures of 47.0℃, 47.9℃, 50.2℃, 52.6℃, 54.9℃, 56.7℃ respectively, and when the size of target sequence was 987 bp, it was also amplified with dsRNA templates on the denaturing temperatures of 50.2℃, 52.6℃, 54.9℃ and 56.7℃ respectively. The results suggested that target sequences can be amplified with dsRNA templates only using Taq DNA polymerase alone and it is more effective for amplification of smaller sequences.

**Key words:** Taq DNA polymerase, Reverse transcript activity, PCR, Double-stranded RNA

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是一种在体外快速扩增特定基因或者 DNA 序列的方法。在传统 PCR 基础之上发展起来的 RT-PCR 主要是以单链 RNA 为模板反转录生成 cDNA, 再在 DNA 聚合酶作用下通过 PCR 扩增得到特异性片段。

DNA 聚合酶 (DNA polymerase) 是一类以 DNA 或 RNA 为模板催化合成互补新链的酶, 大多数聚合酶优先作用于 DNA 模板, 但也可作用于 RNA 模板。耐热 DNA 聚合酶 (Taq DNA 聚合酶) 最初是从一种极度嗜热的栖热水生菌 (*Thermus*

*aquaticus*) 中分离纯化出来的, 它是一种依赖于 DNA 模板的 DNA 聚合酶。根据国外的报道<sup>[1,2]</sup>, 这种 DNA 聚合酶同时也具有反转录酶活性; 国内也曾报道以单链 RNA (mRNA) 为模板利用 Taq DNA 聚合酶进行反转录生成 cDNA 第一链<sup>[3,4]</sup>。

笔者利用 Taq DNA 聚合酶既具有反转录酶活性又具有 DNA 聚合酶活性的特点, 探讨以双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 为模板直接进行 PCR 扩增靶序列的实验条件, 以期简化以双链 RNA 为模板扩增目标序列的步骤与过程。

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30500270, No. 30671361)

\*\* 通讯作者 E-mail: jane-ll@163.com

收稿日期: 2006-03-22, 修回日期: 2006-05-06

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 及其卫星 RNA (369 nt) 的毒原保存于心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*) 上。DNase I, RNase A 和 Taq DNA 聚合酶, dNTP 购自 Takara 公司; 胶回收试剂盒购自上海博彩生物科技有限公司; 梯度 PCR 仪 (T-Gradient Thermoblock) 为德国 BIOME-TRA 公司产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 dsRNA 的提取:** 将保存于心叶烟中的 CMV 和卫星 RNA 进行摩擦接种, 大量繁殖后按文献

[5] 的方法提取 dsRNA。

**1.2.2 dsRNA 的纯化、回收:** 上述 dsRNA 提取物溶于 TE 或含 1 mol/L NaCl 的 TE 缓冲液中, 分别经 DNase I (1  $\mu\text{g/mL}$ ) 和 RNase A (20  $\mu\text{g/mL}$ ) 单独或同时在 37 $^{\circ}\text{C}$  作用 20 min, 80 $^{\circ}\text{C}$  作用 5 min 灭活后, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 选择最佳条件处理后, 进行割胶回收卫星 RNA 和 CMV RNA3 组分的 dsRNA。

**1.2.3 引物设计:** 根据 GenBank 中的 CMV RNA3 和卫星 RNA 基因序列及其一级结构特点, 运用 Primer Premier 5.0 软件设计 CMV 的 RNA3 两段靶序列的扩增引物, 以及卫星 RNA 全序列的扩增引物 (表 1)。

表 1 用于 PCR 扩增的 CMV RNA3 及卫星 RNA 的引物序列及靶序列长度

Primers	Primer sequence	Size of target sequence
SatRNA F	5'CCTCTAGAGGCTGTTTTGTGTGTGGAG 3'	369bp
SatRNAR	5'TTGAGCTCCCGGGTCTCTGTAGAGGAAT 3'	
CMVCP 277 F	5'TGTGGGTGACAGTCCGTAAG 3'	277bp
CMVCP 277 R	5'AGATGTGGGAATGCGTTGGT 3'	
CMVCP 987 F	5'GCGATG (CT) CGTGTGAGAA 3'	987bp
CMVCP987 R	5'TTTAGCCGTAAGCTGGATGGA 3'	

**1.2.4 PCR 的条件设定:** 双链 RNA 在 Taq DNA 聚合酶作用下直接进行扩增, 其反应体系中含 Taq 酶 2.5 U, dsRNA 模板 10 ng, 上游引物和下游引物浓度各为 100 pmol/L, dNTP 浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$ 。采用梯度 PCR 仪, 设计 PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min 后, 进入 35 个循环: 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 退火 30 s (温度设定范围 50 $^{\circ}\text{C}$  ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ , 实际温度为 47.0 $^{\circ}\text{C}$ 、47.9 $^{\circ}\text{C}$ 、50.2 $^{\circ}\text{C}$ 、52.6 $^{\circ}\text{C}$ 、54.9 $^{\circ}\text{C}$ 、56.7 $^{\circ}\text{C}$ ), 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

## 2 结果

### 2.1 dsRNA 模板的纯化

利用 dsRNA 在高盐条件下对 DNase I 和 RNase A 的稳定性, 探索了在不同条件下将粗提的 dsRNA 经 DNase I、RNase A 或两种酶同时进行处理的纯化效果, 其结果如图 1 所示。结果表明, 在 1 mol/L NaCl 的 TE 溶液中, 单独加入 RNase A 或同时加入 DNase I 和 RNase A, 均可以得到较清晰的 dsRNA 条带。为了确保 dsRNA 的纯度, 我们

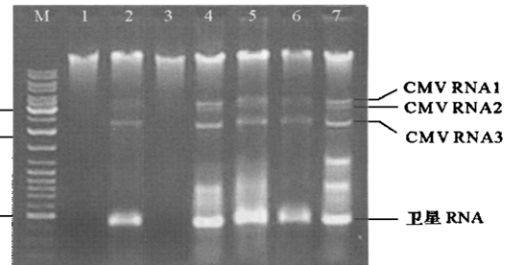


图 1 经 DNase I 和 RNase A 处理后的 dsRNA 粗提物

M DNA mix ladder marker, 1 Crude dsRNA extract treated with RNase A in TE buffer, 2 Crude dsRNA extract treated with RNase A in TE buffer contained 1 mol/L NaCl, 3 Crude dsRNA extract treated with RNase A and DNase I in TE buffer, 4 Crude dsRNA extract treated with DNase I in TE buffer, 5 Crude dsRNA extract treated with DNase I in TE buffer contained 1 mol/L NaCl, 6 Crude dsRNA extract treated with RNase A and DNase I in TE buffer contained 1 mol/L NaCl, 7 Crude dsRNA extract in TE buffer

选择了高盐条件下, 同时加入 DNase I 和 RNase A 处理 CMV 及卫星 RNA 的 dsRNA 粗提物, 经 1% 琼脂糖电泳后, 分别割胶回收, 溶于 TE 缓冲液中保存备用。

2.2 靶序列长度与 PCR 扩增效果

笔者针对 CMV RNA3 的基因组特点设计了两对引物, 分别用于扩增长片段靶序列 (987bp) 和短片段靶序列 (277bp)。在反应体系其他组分不变的情况下, 设定 6 个退火温度 (47.0℃、47.9℃、50.2℃、52.6℃、54.9℃、56.7℃), 分别加入两对引物进行 PCR 扩增。结果表明: 利用短片段靶序列引物进行 PCR, 在所设定的六个退火温度下均获得了清晰的特异性条带, 扩增片段大小为 277 bp, 与预期的结果相符合 (见图 2); 利用长片段靶序列引物进行 PCR, 在 50.2℃、52.6℃、54.9℃、56.7℃ 4 个退火温度条件下可扩增出特异性条带, 片段大小为 987 bp, 与预期的结果相符合 (见图 3), 但扩增产物的亮度较弱, 而且在退火温度为 47.0℃ 时有非特异性条带出现, 在 47.9℃ 时没有出现特异性条带。以卫星 RNA 的 dsRNA 为模板, 在六个退火温度下, 直接进行 PCR 反应也都得到了较好的扩增产物 (图 4)。由此可见, 利用 dsRNA 为模板直接进行 PCR 扩增的难易程度与靶序列的长短相关。

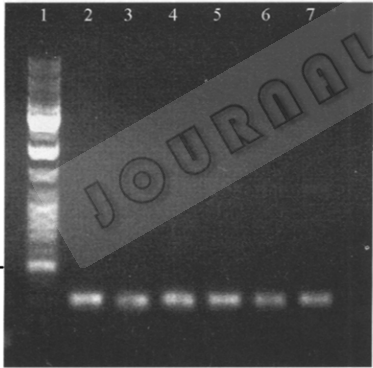


图 2 不同退火温度下以 CMV RNA3 的 dsRNA 为模板扩增 277 bp 的靶序列

1 DNA mix ladder marker, 2 ~ 7 Denaturing temperatures were 47.0℃、47.9℃、50.2℃、52.6℃、54.9℃、56.7℃, respectively

2.3 退火温度对 PCR 扩增效果的影响

Taq DNA 聚合酶在一般情况下的最佳合成温度为 72℃ ~ 78℃, 而其反转录温度则需要探索。笔者将 Taq DNA 聚合酶作用下的反转录及 PCR 反应的温度条件设定为三温变化循环方式。这样既可满足高温变性的需求, 又可满足低温退火引发反转录的需求, 同时还可以在 Taq DNA 聚合酶的

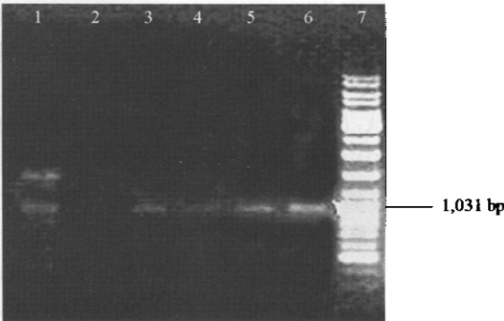


图 3 不同退火温度下以 CMV RNA3 的 dsRNA 为模板扩增 987 bp 的靶序列

1 ~ 6 Denaturing temperatures were 47.0℃、47.9℃、50.2℃、52.6℃、54.9℃、56.7℃, respectively, 7 DNA mix ladder marker

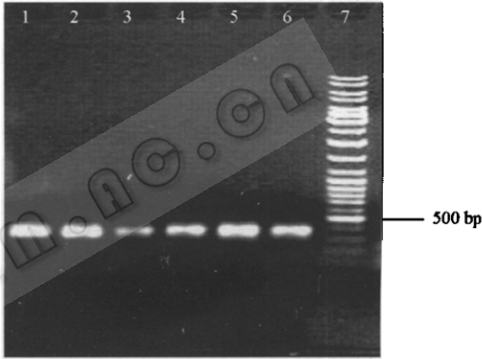


图 4 不同退火温度下以 CMV 卫星 RNA 的 dsRNA 为模板直接扩增卫星 RNA 全长序列

1 ~ 6 Denaturing temperatures were 47.0℃、47.9℃、50.2℃、52.6℃、54.9℃、56.7℃, respectively, 7 DNA mix ladder marker

最适温度下延伸双链 DNA。结果表明, CMV RNA3 的短片段靶序列与其卫星 RNA 在上述各条件下均可扩增出目的条带 (图 2, 图 3); CMV RNA3 的长片段靶序列在 47.0℃ 时, 有非特异性的扩增条带, 随着退火温度的逐渐升高, 目的片段扩增量有所增加。上述结果说明在 PCR 三温变化的范围内 Taq DNA 聚合酶可以发挥其反转录酶与聚合酶的活性, 可直接以 dsRNA 为模板进行扩增反应得到靶序列。此结果同时也表明, Taq DNA 聚合酶的反转录活性的温度适应范围较为广泛。

3 讨论

RNA 病毒的核酸在复制过程中会形成较为稳定的 dsRNA 状态, 可以通过提取、纯化并进行定性定量鉴定。dsRNA 分析方法已广泛应用于 RNA

病毒的检测,而且 dsRNA 是研究 RNA 病毒基因组学很好的材料。但目前实验室以 dsRNA 为材料进行基因扩增时,常用的方法是先将 dsRNA 变性,再以单链 RNA (ssRNA) 为模板,通过反转录酶的作用合成 cDNA 第一链,然后在 DNA 聚合酶作用下得到目的基因片段的扩增。这样,使得整个操作过程相对繁琐,而且涉及到 ssRNA 的不稳定性问题,常常导致扩增失败;另一方面实验所涉及的试剂较多,从而大大增加了实验成本。

进行 RT-PCR 常使用的禽源反转录酶 (AMV) 的最佳反应温度为 42℃。在此温度下, RNA 或者 mRNA 的二级结构仍然存在,解链不完全,在某些情况下会影响反转录的效率和产物的准确性,进而影响下一步 PCR 反应和克隆<sup>[3]</sup>。笔者利用了 Taq DNA 聚合酶的反转录活性,分别以 CMV RNA3 和 CMV 卫星 RNA 的 dsRNA 为模板,直接进行 PCR,能够扩增出靶序列,证明以 dsRNA 为模板,利用 Taq DNA 聚合酶直接进行 PCR 扩增的方法是可行的,而且 Taq DNA 聚合酶的活性也不像 AMV 那样易受温度的影响。较之传统的 RT-PCR,本方法利用了 dsRNA 的稳定性,以及 Taq DNA 聚

合酶的反转录活性和 DNA 聚合酶活性,使目的片段的扩增更为经济,也更为简便和有效。dsRNA 较其它形式的 RNA 更为稳定<sup>[6]</sup>,考虑到这一因素,我们将循环中的变性时间设定较常规 PCR 的变性时间长,得到了较好的扩增效果。此外,根据我们的经验,在相同的条件下,短片段靶序列较易扩增出来,而长片段靶序列的最适 PCR 扩增条件则需进一步探索。

### 参考文献

- [1] Grabko V I, Chistyakova L G, Lyapustin V N, et al. FEBS Letters, 1996, 387 (2~3): 189~192.
- [2] Zhang Y P, Rowhani A. Journal of Virological Methods, 2000, 84 (1): 59~63.
- [3] 张银东,彭存智,曾宪松,等.生物工程学报,1999,15 (1): 79~82.
- [4] 何国庆,阮晖,牛冬,等.农业生物技术学报,2002,10 (1): 89.
- [5] Morris T J, Dodds J A. Phytopathology, 1979, 69 (8): 854~858.
- [6] Batten J S, Schalhaf K B, Milles M E, et al. Journal of Virological Methods, 2000, 84 (2): 209~215.

### • 稿件规范化与标准化 •

## 统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下,希作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写  $\bar{x}$ , 不用大写  $X$ , 也不用  $Mean$ 。标准差用英文小写  $s$ , 不用  $SD$ 。标准误用英文小写  $s_{\bar{x}}$ , 不用  $SE$ 。t 检验用英文小写  $t$ 。F 检验用英文大写  $F$ 。卡方检验用希腊文小写  $\chi^2$ 。相关系数用英文小写  $r$ 。样本数用英文小写  $n$ 。概率用英文大写  $P$ 。

## 正体与斜体

物种的学名: 菌株的属名、种名 (包括亚种、变种) 用拉丁文斜体。属首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*HI、*Eco*RI、*Msp*I、*Sau*3AI 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为英文正体。基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写用正体。