

基于 TaqMan 探针的猪繁殖与呼吸障碍综合症病毒 实时荧光定量 PCR 方法的建立*

祝秀梅, 马全英, 杜平, 王凡, 吕志慧, 牟克斌

摘要:目的 建立一种能检测猪繁殖与呼吸障碍综合症病毒(PRRSV)的 TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法。方法 根据 PRRSV 的 ORF7 基因保守区的核苷酸序列设计引物和 TaqMan 探针, 通过探针浓度的优化, 建立检测 PRRSV 的 TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法。用该方法对 30 份临床疑似病料进行检测, 并与常规 RT-PCR 方法和病毒分离方法进行比较。结果 TaqMan 荧光 PCR 检测 PRRSV 的最佳探针浓度为 0.4 μmol , 检测灵敏度可达 3.51 拷贝/ μL 。检测的 30 份样品与病毒分离结果的符合率为 100%, 与普通 PCR 的检测结果(25/30)比较, 本方法对临床样品的检出率(28/30)更高。结论 建立的方法特异性强、敏感性高、重复性好, 可用于临床样品的检测。

关键词:猪繁殖与呼吸综合症病毒; ORF7 基因; TaqMan 荧光定量 PCR

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2012)06-0579-04

Development of real-time fluorescent quantitative PCR assay for detection of PRRSV based on TaqMan probe

ZHU Xiu-mei, MA Quan-yin, DU Pin, WANG Fan, LÜ Zhi-hui, MU Ke-bin

(China Agricultural Veterinary Biological Science and Technology Co., Ltd, Lanzhou 730046, China)

ABSTRACT: We establish a TaqMan real-time PCR assay for detection of PRRSV. The specific primers and probes were designed in the conserved region of the ORF7 gene for PRRSV, and the real-time fluorescent quantitative PCR was established by optimizing the probe concentration. Thirty clinical samples were detected by using the established quantitative RT-PCR assay, and the results were compared with that of conventional RT-PCR and viral isolation tests. TaqMan fluorescent quantitative PCR for detection of PRRSV was established successfully with the optimal probe concentration 0.4 μmol , and detection limit was as low as 3.51 copies/ μl . The results by the TaqMan real-time PCR method were 100% consistent with the viral isolation tests. Sensitivity and positive rate (28/30) for clinical samples of TaqMan fluorescent quantitative PCR were relatively higher than conventional PCR (25/30). The results indicated this method has high specificity, sensitivity and reproducibility, and could be used for the diagnosis of PRRSV infection.

KEY WORDS: PRRSV; ORF7 gene; TaqMan fluorescent quantitative PCR

This study was funded by Development Program for Research & Application of Agricultural Biotechnology in Gansu Province (No. GNSW-2009-10).

Corresponding author: ZHU Xiu-mei, Email: beckyxiumei@163.com

猪繁殖与呼吸障碍综合症病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 于 1987 年首先出现于美国^[1], 由猪繁殖与呼吸综合症病毒引起。其症状主要表现为怀孕母猪流产、早产、死胎、木乃伊胎及仔猪感染后的成活率下降。PRRS

的一显著特性是具有高度传染性, 1987 年在北美首次爆发后, 迅速在全球蔓延^[2-3], 给畜牧业的发展带来了严重的危害。十多年来, 因它给世界养猪业造成巨大经济损失而引起了科学界的关注。2006 年在我国暴发的高热病, 给我国的养猪业带来巨大的破坏, 由于诊断不及时, 未做好应对工作, 使许多中小型猪场因此倒闭, 养殖户损失惨重^[4-5]。因此建立快速有效实用的诊断方法是防制 PRRS 流行的重

* 甘肃省农业生物技术研究与应用开发项目 (GNSW-2009-10)

作者单位: 中农威特生物科技股份有限公司, 兰州 730046;

Email: beckyxiumei@163.com

要环节。目前的诊断方法存在操作复杂费时、灵敏度或特异性不强等缺点。普通 RT-PCR 易出现假阳性,且核酸染色剂(溴化乙锭,EB)对人体健康有很大的危害。

实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 具有敏感性和特异性高、重复性和稳定

性好、耗时短、无污染的特点,已成为核酸定量检测的首选方法而得到广泛应用^[6-8]。本研究选用 PRRSV 中的最保守的 ORF7 基因,设计引物和探针,建立了检测 PRRSV 的 TaqMan 实时荧光定量 PCR,并对体系进行了优化。分别进行特异性、敏感性、稳定性试验,并对临床样品进行检测,建立了可准确、快速检测 PRRSV 的方法。

1 材料

1.1 毒株 PRRSV SY0608 细胞毒均由本实验室分离、鉴定并保存 PCV-2、CSFV、HCV、PRV、PPV 细胞毒均为本实验室保存;临床样品采自周边地区猪场。

1.2 试剂与仪器 病毒基因组 RNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司, Premix ExTaqTM、T4 DNA ligase、反转录试剂盒、Ex-Taq 聚合酶、pMD-18T、DNA Marker 等均购自 TaKaRa(大连)公司;DNA 胶回收试剂盒购自 Promega 公司;荧光定量 PCR 仪为 StrataGen 公司产品(Mx3000P)。

1.3 引物的设计与合成 根据 GenBank 上下载的 PRRSV 基因组全序列进行比对,找出 PRRSV ORF7 相对保守的区域,设计一对引物和探针,并送至宝生物工程(大连)有限公司合成。引物、探针序列如下。

PRRSV ORF7

F:TCAGCTGTGCCAGATGCTGG

R:AAATGGGGCTTCTCCGGGTTTT

P: 5'-(HEX) TCCCGTCCCTTGCCTCTG-GA (Eclipse)-3'

2 方法

2.1 标准阳性模板的制备

2.1.1 ORF7 基因的扩增 按照 QIAGEN RNA 提取试剂盒说明书,从 PRRSV 感染的细胞培养物中提取病毒全基因组 RNA,用宝生物反转录试剂盒中的 Oligo(dT)进行反转录,合成 cDNA。以 cDNA 为模板,用 PRRSV 上、下游引物扩增 PRRSV ORF7 基因,扩增条件为:94 °C 4 min;94 °C 1 min,58 °C 45 s,72 °C 1 min,共 35 个循环;72 °C 8 min。

反应结束后取 8 μL PCR 产物经 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果。

2.1.2 ORF7 基因的克隆与鉴定 将扩增出的 ORF7 基因按胶回收试剂盒说明回收后与 pMD-18T 载体连接,转化工程菌 DH5 α 感受态细胞,通过抗性筛选挑取单菌落,接种到含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养过夜至液体混浊,用小量质粒提取试剂盒提取质粒,并分别进行酶切鉴定。将鉴定正确的重组质粒送至上海生工生物工程有限公司测序。

2.1.3 标准阳性模板的稀释 用紫外分光光度计分别测定阳性重组质粒的 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀,并计算浓度与拷贝数。将重组质粒进行 10 倍梯度稀释后作为标准阳性模板,用于荧光定量 PCR 反应条件的优化和标准曲线的建立。

2.2 不同探针浓度对扩增产物量的影响 本试验采用 TaKaRa 公司的 Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time) system,是优化好的含有酶、dNTP、Mg²⁺ 等成分的 2×预混液,按照试剂盒操作说明书进行操作。采用 25 μL 反应体系,其中 Premix Ex TaqTM 12.5 μL, PRRSV 上、下游引物各 0.5 μL, Rox II 0.5 μL, 10⁸ 拷贝/μL 的重组质粒 1 μL;探针浓度依次为 0.05 μmol; 0.1 μmol; 0.2 μmol; 0.3 μmol; 0.4 μmol; 0.5 μmol 0.5 μL,补足水至 25 μL。混匀后进行 PCR 扩增,反应程序按宝生物 Premix Ex TaqTM 中推荐的程序进行:95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 20 s 循环 40 次。同时设立无模板的阴性对照。

2.3 荧光定量 PCR 反应标准曲线的建立 利用经优化后的 PRRSV 探针浓度,应用相同的反应程序,对 10 倍系列稀释的 PRRSV 阳性标准模板进行扩增,收集荧光数据,建立标准曲线。

2.4 荧光定量 PCR 的敏感性试验 取以 10 倍梯度稀释的标准阳性质粒作为模板并用无 RNA 酶水设阴性对照分析敏感性,以优化的反应体系和条件进行荧光定量 PCR 反应。

2.5 荧光定量 PCR 的特异性试验 以 PRRSV 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴ 拷贝/μL 的阳性质粒以及 PCV-2、CSFV、HCV、PRV、PPV 病毒核酸为模板,按照优化的条件进行荧光定量 PCR 检测,以检测本方法的特异性。

2.6 荧光定量 PCR 的重复性试验 以 10⁹、10⁸、10⁷ 拷贝/μL 的重组质粒作为标准阳性模板,每个浓度重复 3 次,按照优化的扩增体系进行荧光定量 PCR,计算变异系数(CV%),以评价本方法的准确

性和稳定性。

2.7 临床样品的检测 采集来自周边猪场的 30 份组织样品,提取 RNA,用建立的该方法及常规 PCR 法对上述组织样品进行检测,同时用细胞培养来进行病毒分离,分离的病毒用普通 RT-PCR 进行扩增。

3 结果

3.1 ORF7 基因的扩增、克隆及鉴定结果 扩增出的 ORF7 基因 RT-PCR 产物大小为 105 bp,与预期结果相符。扩增产物连接到 pMD-18T 载体上,得到的重组质粒命名为 pMD-ORF7。经双酶切鉴定,分别切出 2690 bp 和 105 bp 大小的片段结果与预期结果一致(图 1)。测序结果表明重组质粒中含有 PRRSV ORF7 基因的部分核苷酸序列。

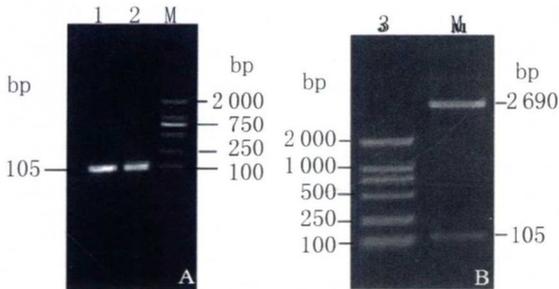


图 1 PRRSV ORF7 基因 PCR 及双酶切鉴定图

1, 2: PRRSV ORF7 基因 PCR 产物; 3: pMD-ORF7 双酶切产物; M: DL2000 Marker

Fig. 1 PRRSV ORF7 gene PCR and double enzymatic digestion identification

1, 2: PRRSV ORF7 gene PCR product; 3: pMD-ORF7 double enzymatic digestion product; M: DL2000 Marker

3.2 重组质粒浓度的测定 提取的质粒 DNA 经核酸蛋白仪测定,其质粒浓度为 0.404mg/mL, OD260nm/OD280nm 比值为 1.83,符合纯度要求。经计算该阳性重组质粒的拷贝数为 3.51×10^{12} 个拷贝/ μL 。

3.3 探针浓度的优化 引物浓度以宝生物 Premix Ex Taq™ 中推荐的 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 为最佳引物浓度,并以相同浓度的核酸为模板的反应体系中,先用不同浓度范围的探针,进行荧光定量 PCR。以循环 Ct 值最小,荧光强度增加值(ΔRn)最大为选定原则。经优选后探针的最佳浓度分别为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 。

3.4 标准曲线的建立 按上述优化的反应条件,取 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 拷贝/ μL 的重组质粒作为标准阳性模板,分别进行扩增,系统自动分析软件显示 Ct 值与标准阳性模板浓度的对数之间存在良好

的线性关系,相关系数(R^2)为 0.998,PCR 扩增效率为 97.9%(图 2)。

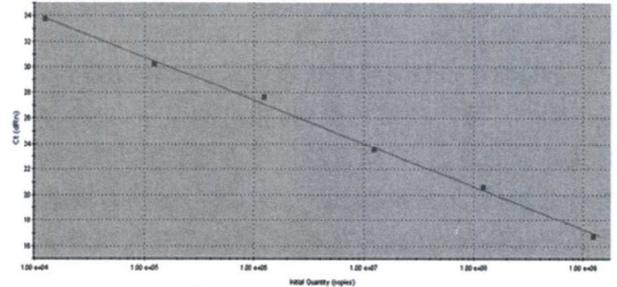


图 2 浓度为 10^9 - 10^4 拷贝/ μL 的 PRRSV 质粒标准品的 FQ-PCR 扩增标准曲线

Fig. 2 Concentration 10^9 - 10^4 copies/ μL PRRSV plasmids standard amplification plot of real-time FQ-PCR for PRRSV

3.5 荧光定量 PCR 的敏感性试验 对 PRRSV 阳性标准质粒进行 10 倍稀释后用荧光定量 PCR 方法进行检测,结果表明质粒浓度为 3.51 拷贝/ μL 时,仍能出现典型的扩增曲线,显示出良好的敏感性。

3.6 荧光定量 PCR 的特异性试验 PRRSV 3.51×10^8 、 3.51×10^7 、 3.51×10^6 、 3.51×10^5 、 3.51×10^4 拷贝/ μL 的阳性质粒以及 PCV-2、CSFV、HCV、PRV、PPV 的病毒核酸为模板,用建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 系统进行检测。结果表明除 PRRSV 模板检测有扩增曲线外,其余的均为阴性,无任何交叉反应,呈现出良好的特异性。

3.7 荧光定量 PCR 的重复性试验 以 3.51×10^9 、 3.51×10^8 、 3.51×10^7 拷贝/ μL 浓度的质粒标准品作 3 次重复检测,结果不同核酸浓度各自的检测 Ct 值变异系数分别为 0.78%、0.71%、0.78%,表明检测方法具有较好的稳定性(表 1)。

表 1 FQ-PCR 的重复性试验

Tab. 1 Repeatability test of real-time FQ-PCR for PRRSV

质粒浓度 copies/ μL	检测次数			均值 \bar{x}	标准差 S	变异系数 (CV%)
	1	2	3			
3.51×10^9	15.26	15.88	15.49	15.54	0.26	1.67%
3.51×10^8	18.44	18.67	18.53	18.54	0.10	0.54%
3.51×10^7	22.38	22.56	21.98	22.30	0.24	1.08%

3.8 临床样品的检测 30 份临床样品中用本研究建立的 FQ-PCR 方法检测出 28 份样品为阳性,而用常规 PCR 方法检测仅有 25 份为阳性。对常规 PCR 检测为阳性的样品进行荧光定量 PCR 检测也为阳性。对常规 PCR 检测为阴性的 5 份样品进行荧光定量 PCR 检测,有 3 份样品为阳性。病毒分离

的结果则与 FQ-PCR 法检测得到的结果完全一致,说明,建立的方法可以很好的用于临床样品的诊断。

4 讨论

PRRSV ORF7 编码核衣壳蛋白,即 N 蛋白,它是 PRRSV 最小的结构蛋白,相对的保守,也是免疫原性最强的蛋白,在病毒粒子中含量较高,约占病毒蛋白总量的 20%~40%^[9]。N 蛋白包括对所有毒株保守的共同表位,又有对美、欧洲型分离株特有的表位。国外,有许多研究者制备了多株 N 蛋白的单克隆抗体对其抗原表位进行研究,结果表明欧洲分离株和美洲分离株的 N 蛋白具有高度保守的抗原表位^[10-12]。由于猪感染 PRRSV 后,动物机体首先产生的是针对 N 蛋白的抗体,并且抗体在体内的存留时间较长,可以根据 N 蛋白抗体的水平的高低,对机体的发病情况和免疫水平做出合理的评价,因此,N 蛋白可作为 PRRSV 抗体检测的诊断抗原^[13]。本研究选用相对保守的 N 蛋白,建立了检测 PRRSV 的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法。试验结果显示,所建立的检测方法能特异、灵敏地对 PRRSV 进行快速检测,为 PRRSV 的快速诊断方法的研究奠定了基础。

试验证实该方法特异性强,不与其他任何病原发生假阳性反应;灵敏度高,检测灵敏度可达 3.51 拷贝/ μL 。用该方法初步用于临床疑似病料的检测中,并与常规 RT-PCR 方法进行比较,结果显示:与常规 RT-PCR 相比较,本试验所建立的方法不但可以定性检测 PRRSV,还可以定量检测 PRRSV,而且能够检测出常规 RT-PCR 无法检测的病料,同时也免去了 DNA 水平电泳的步骤,更加省时,且操作简单。因此,该方法具有快速、灵敏、特异、定性、定量等优点。

国内将荧光定量 PCR 应用于 PRRSV 的检测已有报道。杨宗照等^[14]建立了实时荧光定量 PCR 技术检测高致病性 PRRSV,该方法能快速、简便地检测到 HP-PRRSV 的存在。杨春华等^[15]等建立了检测 PRRSV 的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法,该方法检测灵敏度可达 10 拷贝/ μL ,并具有良好的特异性和重复性。但这些建立的方法均采用了 SYBR Green 染料法,该方法虽然在操作中更加简便,但荧光染料能和任何 dsDNA 结合,因此它也能与非特异的 dsDNA(如引物二聚体)结合,使实验容易产生假阳性信号,从而造成特异性低。而本研究中运用了 TaqMan 技术建立了检测 PRRSV 的实时荧光 PCR,一方面提高了检测的灵敏度和准确

性,另一方面又提高了检测的特异性。

参考文献:

- [1] Bilodeau R, Dea S, Sauvageau RA, et al. 'Porcine reproductive and respiratory syndrome' in Quebec[J]. *Vet Rec*, 1991, 129: 102-103. DOI: 10.1136/vr.129.5.102
- [2] Keffaber KK. Reproductive failure of unknown etiology[J]. *Am Assoc Swine Pract Newsl*, 1989, 1:1-9.
- [3] Wensvoort G, Terpstra C, Pol JMA, et al. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus[J]. *Vet Q*, 1991, 13(3): 121-130. DOI: 10.1080/01652176.1991.9694296
- [4] Hao XF, Zhou YJ, Tian ZJ, et al. Development of a RT-PCR method for differentiation of the highly pathogenic PRRSVs and the classical PRRSVs[J]. *Chin J Prevent Vet Med*, 2007, 29(9): 704-709. (in Chinese)
郝晓芳,周艳群,田志军,等.高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 鉴别诊断方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2007, 29(9): 704-709.
- [5] Tian K, Yu X, Zhao T, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J]. *PLoS ONE*, 2007, 2(6): e526. DOI: 10.1371/journal.pone.0000526
- [6] Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays[J]. *J Mol Endocrinol*, 2000, 25(2): 169-193. DOI: 10.1677/jme.0.0250169
- [7] Niesters HG. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 419-429. DOI: 10.1006/meth.2001.1264
- [8] Walker NJ. Real-time and quantitative PCR: applications to mechanism based toxicology[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2001, 15(3): 121-127. DOI: 10.1002/jbt.8
- [9] Meunberg JJM, Petersen-den Besten A, De-Kluyver EP, et al. Characterization of protein encoded by ORF2 to 7 of Lelystad virus[J]. *Virology*, 1995, 206(1): 155-163. DOI: 10.1016/S0042-6822(95)80030-1
- [10] Bogdanova VS, Tsibezov VV, Grabovetskiĭ VV, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus, by using recombinant nucleocapsid protein N[J]. *Vopr Virusol*, 2007, 52(2): 45-49.
- [11] Zhou YJ, An TQ, Liu JX, et al. Identification of a conserved epitope cluster in the N protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Viral Immunol*, 2006, 19(3): 383-390. DOI: 10.1089/vim.2006.19.383
- [12] Rompato G, Ling E, Chen Z, et al. Positive inductive effect of IL-2 on virus-specific cellular responses elicited by a PRRSV-ORF7 DNA vaccine in swine[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 109(1-2): 151-160. DOI: 10.1016/j.vetimm.2005.08.015

犬病病毒 G 基因编码的糖蛋白(glycoprotein, GP)是病毒唯一暴露在表面的蛋白^[2],是唯一能刺激机体产生中和抗体的病毒蛋白^[3],在狂犬病毒致病和免疫中起着关键作用^[4]。

狂犬病的诊断方法目前主要有中和试验、免疫荧光试验、酶联免疫吸附试验(ELISA)、反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)等,但这些检测方法对仪器和专业人员的依赖性较高,检测成本昂贵,且耗时相对较长,极大的限制了它们在基层单位的应用,由于我国面积辽阔,农村散养犬较多,在开展 RV 的监测及免疫效果评估时,急需建立一种快速、敏感、稳定,可以现场使用的检测方法。

近年来自体红细胞凝集试验发展迅速^[5],已在多个检测领域得到应用^[6-7]。该方法的基本原理是:以红细胞作为指示细胞,利用基因工程方法构建一种重组双功能融合蛋白(目标抗原或抗体与红细胞非凝集型抗体^[8]联结而形成的抗原-抗体或抗体-抗体结合物),该融合蛋白既能与红细胞结合又能与被检抗体/抗原结合,通过样品中被检抗体/抗原的桥联作用,使指示红细胞发生凝集,根据指示红细胞的凝集现象达到快速检测的目的。

本实验室利用该技术成功建立了检测猪瘟、猪伪狂犬病毒的红细胞凝集试验^[9-10]。因此本试验拟在此基础上利用(SOE) PCR 技术,将狂犬病毒 G 基因主要抗原表位区 kg 与抗人红细胞 H 抗原单链抗体 2E8scFv^[11]拼接成双功能融合基因,进行表达复性并对表达蛋白进行检验,构建既能与人红细胞结合,又能与 RV 抗体反应的双功能融合蛋白。目的是为了进一步建立狂犬病毒抗体快速检测红细胞凝集试验方法。

1 材料与方法

1.1 重组质粒、载体、菌株和血清 重组质粒 pMD-G(含有狂犬病毒 G 基因主要抗原表位区)、鼠抗 RV 高免血清由军事医学科学院军事兽医研究所扈荣良研究员惠赠;重组质粒 pMD-2E8scFv(含有抗人红细胞 H 抗原单链抗体基因)^[11]由军事医学科学院野战输血研究所章金刚研究员惠赠;原核表达载体 pET-TrX、表达菌株 BL21(DE3)pLysS 均由本实验室保存;7 份 RV 阳性血清、7 份 RV 阴性血清、犬细小病毒(CPV)阳性血清、犬瘟热病毒(CDV)阳性血清均由本实验室保存。

1.2 主要试剂 Kod-plus 高保真酶为 TOYOBO(日本)产品;T₄DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、及 *Taq* DNA 聚合酶均购自 TaKaRa(日本)公司;IPTG 购自 Promega 公司产品;BCA 蛋白定量试剂盒购自 TIANGEN 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠 IgG 为 Beyotime 产品;Ni-NTA 蛋白纯化树脂为 QIAGEN 公司产品;氧化型谷胱甘肽和还原型谷胱甘肽均为 Sigma 公司产品;其它化学试剂均为南宁(中国)生化药品仪器公司分析纯产品。

1.3 重组 PCR 引物设计 根据重叠延伸 PCR 的原理和狂犬病毒 G 基因与 2E8scFv 基因序列,设计 4 条重组 PCR 引物(表 1)。其中引物 2E8scFv-U/2E8scFv-D 用于扩增合成 2E8scFv 基因,引物 Kg-U/Kg-D 用于扩增合成 Kg 基因。2E8scFv3' 末端 15 个碱基和 Kg5' 端 15 个碱基为互补序列(阴影部分)用于基因的拼接,拼接顺序为 2E8-Kg。2E8scFv-U 和 Kg-D 中的下划线部分为引入的 *Bam*H I、*Eco*R I 酶切位点。

表 1 2E8scFv、Kg 基因引物序列

Tab. 1 Primers of 2E8scFv and Kg

基因名称	引物名称	引物序列	产物长度/bp
Gene	Primer	Sequences of primers(5'-3')	Length/bp
2E8scFv	2E8scFV-U	cgc gga tcc cag gtg cag ttg aag gag tca	732bp
	2E8scFV-D	<u>ggt gca tcc ttc atc</u> tat ttc caa ctt tgt ccc cga	
Kg	Kg-U	<u>aca aag ttg gaa ata</u> gat gaa gga tgc acc aat ctg	999bp
	Kg-D	c cg gaa ttc tat aat gcc gtt gaa gaa cac	

注:引物均由北京博迈德公司合成

Note: Primers are synthesised by BIOMED CO. ,LTD, Beijing.

1.4 2E8Kg 融合基因原核表达载体的构建及鉴定 以 2E8scFv-U/2E8scFv-D 和 Kg-U / Kg-D 为引物,从 pMD-2E8scFv 和 pMD-G 重组质粒中分别扩增融合基因 2E8Kg 的 5'端片段 2E8scFv 和 3'端片段 Kg 基因。PCR 扩增条件均为:95 °C 预变性 5

min;95 °C 变性 1 min,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 70 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。以纯化后的 2E8scFv 和 Kg 基因为模板,采用(SOE)PCR 方法拼接成 2E8Kg 融合基因。第一轮 PCR 反应体系为:2E8scFv 和 Kg 基因各 0.5 μL,10× Buffer2.5