

## Bst DNA 聚合酶的纯化及等温扩增检测体系的构建

谭拥军<sup>†</sup>, 吴莎莎, 谭桂湘, 向勤  
(湖南大学 生物学院, 湖南 长沙 410082)

**摘要:** Bst DNA 聚合酶是等温扩增反应中的一个关键酶, 但由于专利限制, 目前国内实验室所使用的 Bst DNA 聚合酶大多需要从国外进口, 价格昂贵且长途运输影响酶活性, 因此亟需自主生产出 Bst DNA 聚合酶应用于等温扩增检测技术. 通过构建 Bst Fragment 的原核表达质粒, 采用原核蛋白表达系统和 His-Tag 亲和纯化手段, 制备成本低, 活性高, 特异性强的 Bst DNA 聚合酶. 同时, 针对特定的模板, 对自制 Bst DNA 聚合酶的扩增反应进行了进一步优化, 用不同的产物鉴定方法对扩增效果进行检测, 并最终筛选出该酶最优的扩增反应条件为 60 mM K<sup>+</sup>、30 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、pH 为 9.0. 最后, 验证了 Bst DNA 聚合酶能用于快速准确检测肺炎支原体、肺炎衣原体, 降低了相关病原体核酸检测的成本, 为之后核酸检测在基层医疗的更广泛应用提供了条件.

**关键词:** Bst DNA 聚合酶; 重组蛋白; 扩增; 核酸检测

**中图分类号:** Q784

**文献标志码:** A

## Purification of Bst DNA Polymerase and Construction of Isothermal Amplification Detection System

TAN Yongjun<sup>†</sup>, WU Shasha, TAN Guixiang, XIANG Qin  
(College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, China)

**Abstract:** Bst DNA polymerase is a key enzyme in isothermal amplification reaction. However, due to the patent restrictions, most of the Bst DNA polymerase used in domestic laboratories need to be imported abroad, which is expensive and needs long distance transportation. Therefore, it is urgent to produce Bst DNA polymerase for isothermal amplification detection technology independently. From constructing a plasmid containing Bst Fragment, Bst DNA polymerase was prepared on a large scale by prokaryotic expression system followed by His-tag affinity purification method. The purified Bst DNA polymerase possessed the advantages such as low cost, high activity, and strong specificity in the isothermal amplification reaction. The activity of Bst DNA polymerase was optimized for specific DNA templates by detecting the products of amplification. At the same time, the optimal amplification reaction conditions of the enzyme were finally selected, which were 60 mM K<sup>+</sup>, 30 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and pH 9.0. With reference to the relevant patents, the obtained Bst DNA polymerase was able to detect mycoplasma pneumonia and Chlamydia pneumonia quickly and accurately through isothermal amplification reactions. In conclusion, a low cost

\* 收稿日期: 2019-01-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81472718), National Natural Science Foundation of China(81472718)

作者简介: 谭拥军(1967—), 男, 湖南长沙人, 湖南大学教授, 博士生导师

<sup>†</sup> 通讯联系人, E-mail: yjtan@hnu.edu.cn

enzyme was provided for isothermal amplification detection of related pathogen DNA, which can be potentially used in the primary medical care.

**Key words:** Bst DNA polymerase; recombinant proteins; amplification; nucleic acid detection

近年来,核酸扩增技术<sup>[1-2]</sup>已广泛应用于涉及民生的传染病的预防与控制、遗传疾病诊断等方面,并逐步渗透到食品与环境微生物的检验检疫、法医鉴定等领域<sup>[3-10]</sup>。这种技术常用的 PCR (Polymerase Chain Reaction) 方法敏感、准确、快速,但由于需要昂贵的仪器设备、较高的检测费用以及对检测人员较高的技术要求而使其不适用于现场快速检测及临床普及应用。与常规 PCR 相比,等温扩增技术可摆脱对大型仪器依赖且价格相对低廉,更适合被基层所采用<sup>[11]</sup>。

等温技术自 2000 年发展至今,已有多种类型的等温扩增方法<sup>[12-13]</sup>,其中以 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 最为常见,LAMP 技术较其他病原检测方法更敏感、快速、方便,且可通过多种方法使其反应结果可视化<sup>[14-16]</sup>,而更适用于临床,将成为最具潜力的易于普及的病原检测方法。LAMP 成功的关键因素之一是 DNA 聚合酶。根据氨基酸序列与三维结构的不同,DNA 聚合酶可分为 6 个不同的家族<sup>[17-19]</sup>。其中,Bst (*Bacillus stearothermophilus*) DNA 聚合酶是来源于嗜热脂肪芽孢杆菌 DNA 聚合酶的一部分,具有 5'—3'DNA 聚合酶活性,但不具有 5'—3'外切核酸酶活性<sup>[20]</sup>。与其他 DNA 聚合酶相比,Bst DNA 聚合酶有较强的热稳定性、链置换活性及聚合酶活性,因此更适用于等温扩增中。但是,目前市场上 Bst DNA 聚合酶受限于国际性大公司如 NEB 的专利限制,国内实验室所使用的 Bst DNA 聚合酶大多需要从国外进口,其价格昂贵且运输时间长,造成实验成本提高,又极易影响酶活性,所以自主生产出批量的高效、特异性强的 Bst DNA 聚合酶对于等温扩增检测技术在国内基层医疗中的应用十分必要。目前,已有课题组尝试过提取 Bst DNA 聚合酶<sup>[21]</sup>,但其批量生产、扩增特异性及扩增体系的建立还需要进一步研究优化。

本实验通过构建 Bst 大片段的原核表达质粒,使其在大肠杆菌中表达,通过蛋白质提取及纯化手段<sup>[22]</sup>自主获得 Bst DNA 聚合酶,针对特定引物初步

优化其扩增反应条件,最终获得 Bst DNA 聚合酶。并尝试利用实验室已提取并处理的肺炎支原体、肺炎衣原体 DNA,参照已发表的专利方法<sup>[23-24]</sup>,检测 Bst DNA 聚合酶是否可以用于快速准确检测肺炎支原体和肺炎衣原体。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种和材料

DH5 $\alpha$  感受态细胞,Rostta (DE3) 感受态细胞,Bst Fragment,pET-15b 载体质粒,FOXMI cDNA,293T 细胞。

肺炎衣原体 DNA 来源:通过 PCR 扩增得到肺炎衣原体基因组保守基因 DNA 片段,模板来源:湖南圣湘公司赠予的肺炎衣原体 ATCC J-21 菌株,NCBI Reference Sequence:NC\_000922.1,1 501 bp, *Chlamydomphila pneumoniae* CWL029 chromosome complete genome,引物 F-CTCTGA GCATAAATCA-GAGCCT,R-GGCCGTTTTTCAATGATAAGAGC。

肺炎支原体 DNA 来源:实验室培养肺炎支原体 *Mycoplasma pneumoniae* M129,通过氯仿抽提法提取基因组 DNA。

### 1.2 主要试剂和仪器

蛋白核酸分析仪,Nano Drop,摇床,细菌恒温培养箱,质粒小提试剂盒,胶回收试剂盒,Nde I,BamH I 限制性内切酶,PBS,氨苄青霉素(Amp),氯霉素(Chl),IPTG 诱导剂,溶菌酶,His-tag 亲和镍珠,1 kb DNA Ladder marker,双色蛋白预染蛋白 marker,过硫酸铵(APS),十二烷基磺酸钠(SDS),imidazole,TEMED,Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,NaCl,Tris,Tryptone,Yeast Extract,Agar,Acrylamide,Bis-acrylamide,Agarose,EB 染料,浓盐酸,SYBR Green I 染料,考马斯亮蓝 G250,His-Tag 抗体(小鼠单抗),anti-mouse(鼠二抗)。

1%琼脂糖凝胶配制方法:Agarose 2 g,1XTE Buffer 200 mL,EB 9  $\mu$ L;LB 液体培养基配方:Tryp-  
tone 10 g、Yeast Extract 5 g、NaCl 10 g,加 ddH<sub>2</sub>O 定容

至 1 L; Binding Buffer 配方: 20 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.5; Elution Buffer 配方: 20 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 500 mM NaCl, 300 mM imidazole, pH 为 7.5; 12% SDS-PAGE 分离胶配方: ddH<sub>2</sub>O 2.31 mL、30% Acrylamide 2.8 mL、1.5 M Tris-HCl (pH8.8) 1.75 mL、10% SDS 70  $\mu\text{L}$ 、10% APS 70  $\mu\text{L}$ 、TEMED 3  $\mu\text{L}$ ; SDS-PAGE 浓缩胶配方: ddH<sub>2</sub>O 1 mL、30% Acrylamide 0.5 mL、0.5 M Tris-HCl (pH6.8) 0.38 mL、10% SDS 30  $\mu\text{L}$ 、10% APS 30  $\mu\text{L}$ 、TEMED 3  $\mu\text{L}$ ; 考马斯亮蓝染色液配方: 考马斯亮蓝 G250 为 0.25 g、甲醇 45 mL、冰醋酸 10 mL、加 dd H<sub>2</sub>O 定容至 100 mL; 考马斯亮蓝脱色液配方: 甲醇 125 mL、冰醋酸 40 mL、加 ddH<sub>2</sub>O 定容至 500 mL; 1X Transfer Buffer 配方: 甘氨酸 1.45 g、Tris 2.9 g, 甲醇 100 L, 加 ddH<sub>2</sub>O 定容至 500 mL; TBST 配制方法: 5M NaCl 溶液 30 mL, 1M Tris-HCl (pH8.0) 20 mL, Tween 20 0.5 mL, 加 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L; 封闭液配方: 脱脂奶粉 2.5 g, 加 TBST 定容至 50 mL.

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 重组质粒 pET-15b-Bst Fragment plasmid 的构建

1) Bst Fragment 的获取. 取一支 15 mL 的离心管, 加入 5 mL LB 液体培养基 (氨苄青霉素浓度为 0.1 mg/mL), 吸取从公司订购的宿主菌 top10 菌液 5  $\mu\text{L}$ , 置于摇床中 37  $^{\circ}\text{C}$ , 以 220 r/min 的转速摇菌 14 h, 利用质粒小提试剂盒从菌液中提取 Bst Fragment 所在的原始质粒 pUC-SP, 利用 Nano Drop 测定浓度并通过双酶切获得 Bst Fragment, 酶切体系及反应条件为: pUC-SP (150 ng/mL) 6  $\mu\text{L}$ , Nde I 限制性内切酶 1  $\mu\text{L}$ , BamH I 限制性内切酶 1  $\mu\text{L}$ , 10X Fast Digest Buffer 2  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 至总体积 20  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 120 min 后, 1% 琼脂糖凝胶电泳 30 min, 收集目的条带所在胶体并利用胶回收试剂盒获得 Bst Fragment;

2) 对载体质粒 pET-15b 进行双酶切. 酶切体系及反应条件为: pET-15b 质粒 (150 ng/mL) 6  $\mu\text{L}$ , Nde I 限制性内切酶 1  $\mu\text{L}$ , BamH I 限制性内切酶 1  $\mu\text{L}$ , 10X Fast Digest Buffer 2  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 至总体积 20  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 120 min 后, 1% 琼脂糖凝胶电泳 30 min, 收集目的条带所在胶体并利用胶回收试剂盒获得酶切后的 pET-15b (Nde I/BamH I);

3) 连接 Bst Fragment 和 pET-15b (Nde I/BamH I). 连接体系及反应条件为: pET-15b (Nde I/BamH I) 2  $\mu\text{L}$ , Bst Fragment 6  $\mu\text{L}$ , T4 DNA Ligase (5 U/mL) 1  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  T4 DNA Ligase buffer 1  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 至总

体积为 10  $\mu\text{L}$ , 22  $^{\circ}\text{C}$  连接过夜, 备用.

4) 连接产物的转化与鉴定. 取一管 DH5 $\alpha$  感受态细胞 (1 001  $\mu\text{L}$ ) 置于冰上溶解, 待感受态完全溶解后, 加入 3  $\mu\text{L}$  的连接片段, 用拇指轻弹混匀, 冰上放置 30 min, 42  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中热激 90 s, 冰上放置 2 min, 加入 150  $\mu\text{L}$  LB 液体培养基, 置于摇床中 37  $^{\circ}\text{C}$ , 以 220 r/min 的转速摇菌 45 min; 短暂离心后, 涂布 LB 平板 (氨苄青霉素浓度为 0.1 mg/mL), 倒置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中过夜 (12~16 h); 次日挑取单菌落, 接种到 5 mL LB 液体培养基中 (氨苄青霉素浓度为 0.1 mg/mL), 置于摇床中 37  $^{\circ}\text{C}$ , 以 220 r/min 的转速摇菌过夜 (12~16 h); 次日收集菌体提取质粒, 用限制性内切酶 Nde I, BamH I 进行酶切鉴定, 测序正确后即获得了重组质粒 pET-15b-Bst Fragment plasmid, 保存质粒与菌种于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱. pET-15b-Bst Fragment plasmid 结构示意图 (图 1(a)).

#### 1.3.2 重组蛋白 Bst DNA 聚合酶的表达

1) Bst DNA 聚合酶的表达. 将表达载体 pET-15b-Bst Fragment plasmid 转化大肠杆菌 Rosetta (DE3) 感受态细胞, 涂布 LB 平板 (氨苄青霉素浓度为 0.1 mg/mL, 氯霉素浓度为 0.1 mg/mL), 倒置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中过夜 (12~16 h), 随机挑选一个单菌落, 接种到 5 mL 的 LB 液体培养基中 (氨苄青霉素浓度为 0.1 mg/mL, 氯霉素浓度为 0.1 mg/mL), 置于摇床中 37  $^{\circ}\text{C}$ , 以 220 r/min 的转速摇菌 4~6 h, 将菌液加到 200 mL 的 LB 液体培养基中 (氨苄青霉素浓度为 0.1 mg/mL, 氯霉素浓度为 0.1 mg/mL), 置于摇床中 37  $^{\circ}\text{C}$ , 以 220 r/min 的转速摇菌过夜 (12~16 h), 取少量菌液检测 OD<sub>600</sub> 值, 并调整 OD<sub>600</sub> 值至 0.8~1, 取 100 mL 菌液加入 IPTG 诱导剂 (终浓度为 0.8 mM), 剩余 100 mL 菌液加相同体积的 ddH<sub>2</sub>O, 两者均置于摇床中 37  $^{\circ}\text{C}$ , 以 220 r/min 的转速摇菌 6 h, 以 4 000 r/min 的转速离心 20 min 分别收集菌体, 用 15 mL Binding Buffer (20 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 为 7.5) 重悬菌体, 超声 40 min (超 6 s, 停 9 s) 破碎菌体, 以 8 000 r/min 的转速离心 10 min, 收集上清于 50 mL 离心管中, 两者均取少量用于对照 (即分别为诱导前蛋白样品、诱导后蛋白样品), 向诱导后蛋白上清中加入 50  $\mu\text{L}$  His-Tag 亲和镍珠, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中旋转孵育 3 h, 以 800 r/min 的转速离心 5 min, 收集镍珠, 用 PBS 洗两次后, 加入 500  $\mu\text{L}$  Elution Buffer 置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中旋转孵育 2 h, 以 800 r/min 的转速离心 5 min, 收集上清, 并转移至干净的 1.5 mL EP 管内, 即获得纯化后蛋白样品, 样

品测定浓度后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱;

2) Western Blotting 检测蛋白表达. 将空白 Rosseta(DE3)蛋白裂解液和导入了 Pet-15b-Bst Fragment plasmid 的 Rosseta(DE3)蛋白裂解液分别取等量进行高温变性处理后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电压为 80 V, 电泳 30 min 后调节电压至 120 V, 电泳 90 min, 100 V 恒压下转膜 1 h, 然后在将 PDVF 膜放入适量封闭液中, 确保封闭液可以充分覆盖 PDVF 膜, 置于水平摇床上室温孵育 2 h, 由于重组蛋白带上了 His-tag, 所以 SDS-PAGE 电泳结束后, 用 TBST 洗膜 3 次(每次 5 min)后, 用 Anti-His 抗体(1:1 000)室温孵育 2 h, 用 TBST 洗膜 3 次(每次 5 min)后, 用 Anti-mouse 抗体(1:2 000)室温孵育 2 h, 洗膜后进行曝光检测, 观察条带位置.

3) 考马斯亮蓝染色检测纯化效果. 将诱导前蛋白样品、诱导后蛋白样品及纯化后蛋白样品分别测定浓度后, 取等量蛋白量进行高温变性处理后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 先电泳 80 V, 30 min 后调节电压至 120 V, 电泳 90 min, 切下胶体放入适量考马斯亮蓝染色液中, 确保染色液可以充分覆盖凝胶, 置于水平摇床上室温孵育 2 h, 至胶体完全染成蓝色, 然后将胶体放入脱色液中, 确保脱色液可以充分覆盖凝胶, 置于水平摇床上室温孵育, 期间更换脱色液 2~4 次, 直至完全脱去蓝色背景颜色, 结束后参照 Marker 观察蛋白条带位置及亮度, 以判断诱导效果、纯化后蛋白的大小及浓度是否达到预期.

### 1.3.3 重组蛋白 Bst DNA 聚合酶的纯化

根据上述确认的菌液进行扩大培养, 取菌液加入 4 瓶 500 mL 的 LB 液体培养基中, 每瓶加入 50

$\mu\text{L}$  菌液, 置于摇床中  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 以 220 r/min 的转速摇菌过夜 (12~16 h), 取菌液检测 OD600 值, 调整 OD600 值至 0.8~1, 加入 IPTG 诱导剂 (终浓度 0.8 mM), 置于摇床中  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 以 220 r/min 的转速摇菌 6 h, 以 4 000 r/min 的转速, 离心 20 min 收集菌体(分 4 个 50 mL 离心管进行离心), 每管加入 30 mL Binding Buffer (20mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 为 7.5)重悬菌体, 超声 40 min(超 6 s, 停 9 s)破碎菌体, 以 8 000 r/min 的转速离心 10 min, 收集上清于 50 mL 离心管中, 向上清中加入 100  $\mu\text{L}$  His-Tag 亲和镍珠, 置于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中旋转孵育 3 h, 以 800 r/min 的转速, 离心 5 min 收集镍珠, 镍珠用 PBS 洗两次后, 加入 1 mL Elution Buffer 后置于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中旋转孵育 2 h, 以 800 r/min 的转速, 离心 5 min 收集上清, 转移至干净的 1.5 mL EP 管内, 即获得纯化后蛋白样品, 样品测定浓度后小管分装保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱;

### 1.3.4 重组蛋白 Bst DNA 聚合酶的活性鉴定

1) 重组蛋白 Bst DNA 聚合酶等温扩增活性鉴定. 取 4 个 PCR 管, 编号 1~4, 按照表 2 所示体系依次向每管中加入各成分, 再按照表 3 中的实验设置向各组中加入余下的成分, 其中内外引物对序列如表 1 所示. FOXM1 CDNA 浓度为 200  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 每管取 1  $\mu\text{L}$ , 用 ddH<sub>2</sub>O 补齐至反应体系总体积为 20  $\mu\text{L}$ , 充分混匀各管, 将 1~4 号管同时置于  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴 50 min 后,  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴 2 min 终止反应. 取每管反应产物 10  $\mu\text{L}$  进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 将胶体置于紫外光下观察并拍照; 剩余反应产物加入 2  $\mu\text{L}$  SYBR Green I 染料, 混匀并短暂离心, 在紫外光照射下观察每管颜色, 以此判定是否扩增成功.

表 1 FOXM1 扩增引物序列

Tab.1 Amplification primer sequence of FOXM1

引物名称	序列(5'-3')	终浓度/ $\mu\text{M}$
FOXM1-F	GGAGG AAGAA A TCCAGCCTG	0.32
FOXM1-B	CATTTCCGAG ACACACCGG	0.32
FOXM1-FIP	AGGGCCACTCTTCCAAGGGAGGGAGGA AATG CCACACTT	0.04
FOXM1-BIP	TCTCACTCTGGGAGGATTCGTACCTAAGCCCACT GTAGGAC	0.04

表 2 LAMP 扩增反应体系

Tab.2 Amplification reaction system of LAMP

试剂	Tris buffer /mM	KCl /mM	MgSO <sub>4</sub> /mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /mM	Tween20 /%	Betaine /M	dNTPs /mM each	内引物对 / $\mu\text{M}$	外引物对 / $\mu\text{M}$
终浓度	20	10	8	10	0.1	0.8	1.4	0.32	0.04

2) 重组蛋白 Bst DNA 聚合酶等温扩增条件初步优化. 根据对有关等温扩增反应体系的文献及研究, 总结得出影响等温扩增效果的几个关键因素及范围, 据此分别设置  $K^+$  浓度梯度,  $(NH_4)_2SO_4$  浓度梯度, 不同 pH 值条件来检验自制 Bst DNA 聚合酶的扩增效果, 以达到优化 Bst DNA 聚合酶反应体系的目的. 除设置的各个不同成分梯度外, 其他体系成分及实验条件均与 1.3.4 节中 1) 的描述保持一致, 利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物.

表 3 扩增实验设置

Tab.3 Treatments of amplification experiment

编号	1	2	3	4
扩增模板	FOXMI cDNA	—	FOXMI cDNA	FOXMI cDNA
等温扩增酶	—	重组蛋白 Bst DNA 聚合酶	重组蛋白 Bst DNA 聚合酶	Bst 2.0 DNA Polymerase M0537(NEB)

### 1.3.5 重组蛋白 Bst DNA 聚合酶检测特定病原体

1) 检测肺炎支原体. 参考肺炎支原体与肺炎衣原体的相关检测专利<sup>[23-24]</sup>, 将实验室已有肺炎支原体基因组 DNA 按 10 倍递增稀释  $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10$  copies/ $\mu$ L 5 个梯度. 取稀释后的基因组 DNA 各 1  $\mu$ L, 及表 4 中对应的内外引物对, 按表 2 设计的 LAMP 扩增反应体系进行混合, 最后加入 Bst DNA 聚合酶, 将反应混合物分别置于 65  $^{\circ}$ C 水浴 50 min 后, 80  $^{\circ}$ C 水浴 2 min 终止反应. 取 5  $\mu$ L LAMP 产物在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳检测, 将实验室保存

的几种不同病原体的基因组 DNA 分别稀释到  $10^5$  copies/ $\mu$ L, 各取 1  $\mu$ L, 加入扩增肺炎支原体 DNA 的内外引物对, 按表 2 设计的 LAMP 扩增反应体系进行混合, 最后加入 Bst DNA 聚合酶, 将反应混合物分别置于 65  $^{\circ}$ C 水浴 50 min 后, 80  $^{\circ}$ C 水浴 2 min 终止反应. 取 5  $\mu$ L LAMP 产物在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳检测.

2) 检测肺炎衣原体. 按上述同样的方法检测肺炎衣原体, 只需将模板和引物更换成表 5 中肺炎衣原体基因组 DNA 和对应的内外引物对.

## 2 结果

### 2.1 重组质粒 pET-15b-Bst Fragment plasmid 的构建

按照 1.3.1 节所描述的实验步骤进行实验, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析结果显示, 上端条带位于 2 500 bp 与 3 000 bp 之间, 与 pUC-SP 载体大小相符, 下端条带位于 1 500 bp 与 2 000 bp 之间, 与 Bst Fragment 大小吻合, 如图 1(b) 所示, 1、2 号样品(为重复实验)均符合结果. 重组质粒 pET-15b-Bst Fragment plasmid 经 Nde I, BamH I 限制性内切酶处理, 电泳结果显示, 上端条带位于 4 000 bp 与 6 000 bp 之间, 与 pET-15b 载体大小相符, 下端条带位于 1 500 bp 与 2 000 bp 之间, 与 Bst Fragment 大小吻合, 如图 1(c) 所示, 1~4 号样品(为重复实验)均符合结果, 测序结果显示送检序列与 Bst Fragment 序列比对结果完全重合, 综上所述表明重组质粒 pET-15b-Bst Fragment plasmid 构建成功.

表 4 肺炎支原体内外引物对序列

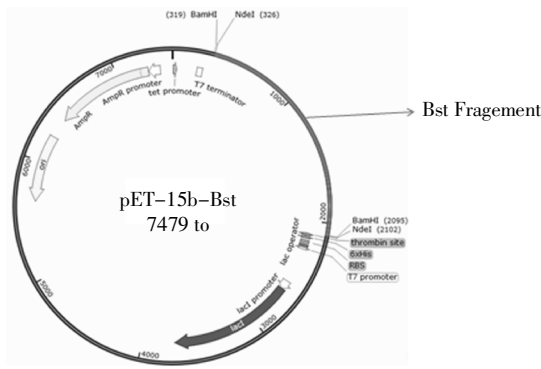
Tab.4 Sequence of primer pairs of mycoplasma pneumoniae

引物名称	序列(5'-3')	终浓度/ $\mu$ M
MP-F	AAACAAGGTCCCGT CGA	0.32
MP-B	CG CCCTGGAGTTTTCATTC	0.32
MP-FIP	CATATTACACCACGCTGCGCTTCAAGAC CCCTCCAATCCCT	0.04
MP-BIP	GCTT ACCACAGCAGCGAACCGTTCGGCGTTCT TCACCTCAAG	0.04

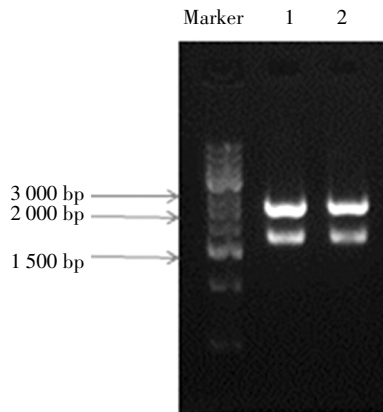
表 5 肺炎衣原体内外引物对序列

Tab.5 Sequence of primer pairs of chlamydia pneumoniae

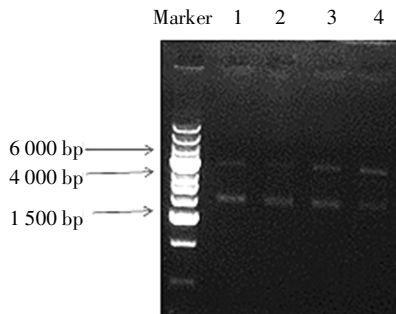
引物名称	序列(5'-3')	终浓度/ $\mu$ M
CP-F	CTTGCGATCCTT GCGCTACTT	0.32
CP-B	GTG AACCACTCTGCATCGTCT	0.32
CP-FIP	GTTTTAGGTGCATCTACTTTTTATTAGCTT ACGTCTGGATT	0.04
CP-BIP	TGGGAGC CAAGCCTACTGGATATTG TAGGCCGG GTTAGGTCT	0.04



(a) 重组表达载体质粒图 pET-15b-Bst



(b) 目的基因 Bst Fragment 的扩增结果



(c) 重组质粒 pET-15b-Bst Fragment plasmid 酶切鉴定结果

图 1 重组表达载体的构建

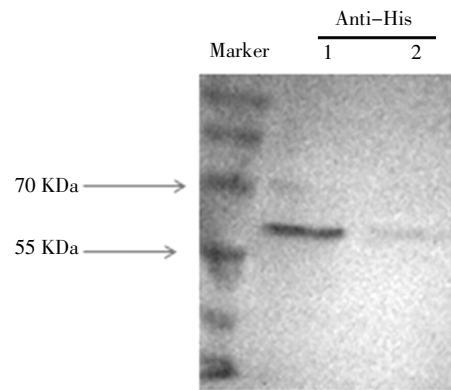
Fig.1 Construction of recombinant expression plasmid

### 2.2 重组蛋白 Bst DNA 聚合酶的表达与纯化

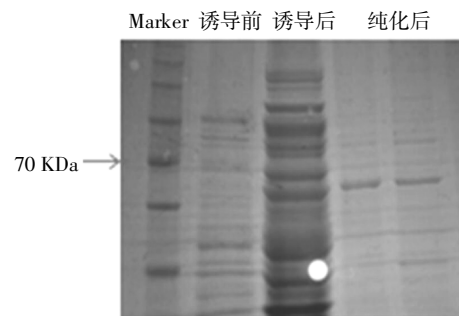
按照 1.3.2 节中 2) 的实验设置与方法步骤, 将重组质粒 pET-15b-Bst Fragment plasmid 转入感受态大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中进行蛋白表达后, 用 Western Blotting 方法检测重组蛋白是否正确表达. 如图 2(a) 所示 (样品 1: 导入了 pET-15b-Bst Fragment plasmid 的 Rosetta (DE3) 蛋白裂解液; 样品 2: 空白 Rosetta (DE3) 蛋白裂解液), 样品 1 出现清晰条带, 而样品 2 无条带, 且条带大小与 Bst DNA 聚合酶大小相符, 再结合之前的测序结果, 可以确定重

组蛋白表达正确.

按照 1.3.2 节中 3) 的实验步骤, 将重组质粒 pET-15b-Bst Fragment plasmid 转入感受态大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中进行蛋白表达、诱导, 提取并纯化 Bst DNA 聚合酶, 优化纯化条件, 最终确定纯化方案, 考马斯亮蓝染色确定蛋白条带的位置及纯化效果. 如图 2 (b) 所示 (Lane 1: Marker; Lane 2: not-induced sample; Lane 3: induced sample; Lane 4: Purified sample 1; Lane 5: Purified sample 2; 蛋白上样量均为 10  $\mu$ g), 考染后 SDS-PAGE 电泳结果显示, 纯化后的目的蛋白位于 50 kD 与 70 kD 之间, 与重组蛋白 Bst DNA 聚合酶的大小 (约为 67 kD) 相符, 综上所述表明所得的纯化后蛋白为 Bst DNA 聚合酶, 之后按照 1.3.3 节中的实验步骤进行 Bst DNA 聚合酶的纯化.



(a) Bst DNA 聚合酶的 WB 检测



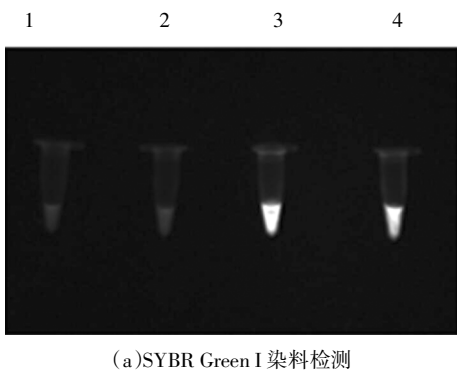
(b) Bst DNA 聚合酶的考染检测

图 2 Bst DNA 聚合酶的表达与纯化鉴定

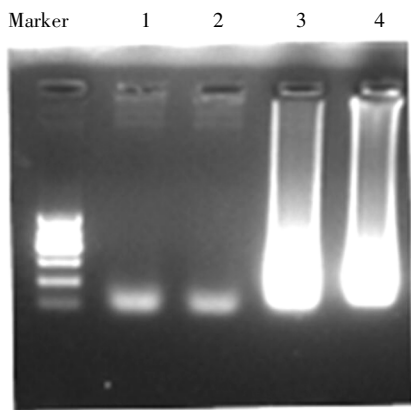
Fig.2 Identification of Bst DNA Polymerase expression and purification

### 2.3 重组蛋白 Bst DNA 聚合酶的活性鉴定

按照 1.3.4 节中 1) 的实验方法进行实验检验重组蛋白 Bst DNA 聚合酶等温扩增活性. 实验结果分别如图 3 所示, 1、2 为阴性扩增, 3、4 为阳性扩增, 表明纯化后的 Bst DNA 聚合酶具备等温扩增活性.



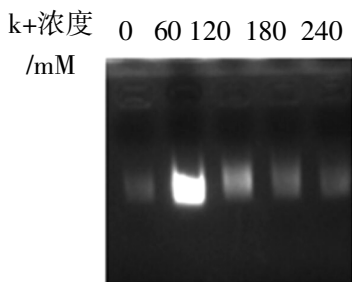
(a)SYBR Green I 染料检测



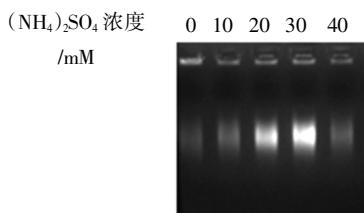
(b)1.5%琼脂糖电泳检测

图3 Bst DNA 聚合酶扩增活性鉴定  
Fig.3 Identification of Bst DNA polymerase amplification activity

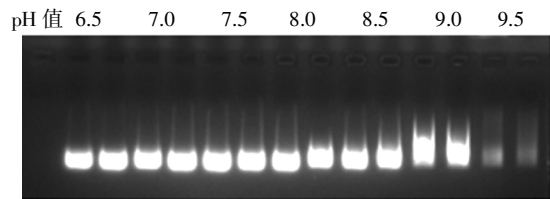
按照 1.3.4 节中 2)的实验步骤初步优化扩增条件,以提高自制 Bst DNA 聚合酶用于等温扩增反应的稳定性和特异性.结果如图 4 所示,在 60 mM K<sup>+</sup>、30 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、pH 值为 9.0 的条件下,自制的 Bst DNA 聚合酶的扩增活性最优.



(a)不同 K<sup>+</sup>浓度下扩增效果



(b)不同(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度下扩增效果

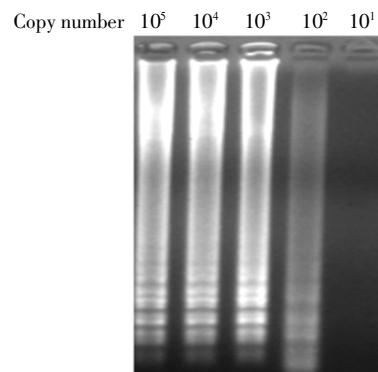


(c)不同 pH 下扩增效果

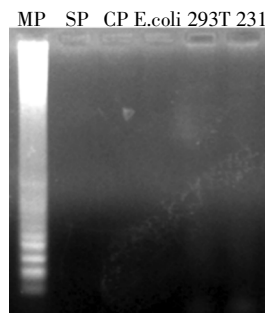
图4 Bst DNA 聚合酶扩增条件初步优化  
Fig.4 Optimization of Bst DNA Polymerase amplification condition

### 2.4 重组蛋白 Bst DNA 聚合酶检测病原体

利用实验室已获得的肺炎支原体和肺炎衣原体 DNA 样本,并利用荧光定量 PCR 计算出拷贝数,参照相关专利<sup>[23-24]</sup>,检测 Bst DNA 聚合酶是否能用于快速准确检测肺炎支原体、肺炎衣原体.按照 1.3.5 节中的实验方法,图 5(a)(c)显示,两种病原体均在 10<sup>2</sup> copies 时就可以用 Bst DNA 聚合酶扩增成功,表明 Bst DNA 聚合酶检测到能在低浓度的病原体,具有良好的灵敏度;图 5(b)(d)显示,在引物一致且特异性好的条件下,只有加入与引物相匹配的的病原体 DNA 才会出现阳性扩增结果,当病原体与体系设置的引物不匹配时则不会出现阳性扩增结果,表明利用 Bst DNA 聚合酶能够在病原体拷贝数相对较低(10<sup>5</sup> copies)的情况下特异性地检测出病原体 DNA,降低了假阳性的风险,表明 Bst DNA 聚合酶具有良好的特异性.



(a)肺炎支原体灵敏度检测结果



(b)肺炎支原体特异性检测结果

MP:肺炎支原体基因组 DNA  
SP:肺炎链球菌基因组 DNA  
CP:肺炎衣原体基因组 DNA  
E.Coli:大肠杆菌基因组 DNA  
293T:人胚肾细胞基因组 DNA  
231:乳腺癌细胞基因组 DNA

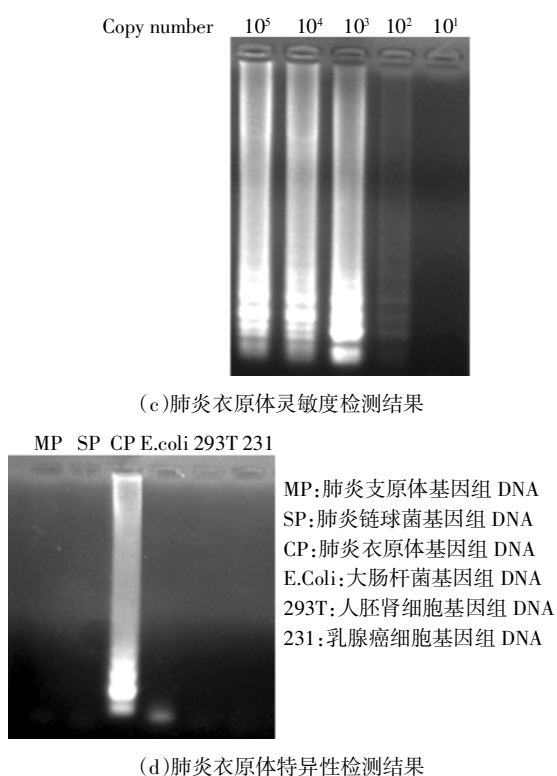


图 5 肺炎支原体、肺炎衣原体检测结果  
 Fig.5 Detection of mycoplasma pneumoniae  
 and chlamydia pneumoniae

### 3 结 论

等温扩增技术经过近 20 年的发展,已经日趋成熟,由于其设备简单、操作方便、结果可视等优点正广泛应用于医学检测、病原微生物的检验检疫,食品检疫等各个领域. Bst DNA 聚合酶有着较强的热稳定性、链置换活性及聚合酶活性,是等温扩增技术中的一个关键工具酶,但由于专利限制,导致其价格偏高,不利于开展广泛科研与实际应用. 本实验成功构建了 Bst Fragment 的原核表达质粒,并利用原核蛋白表达系统和 His-Tag 亲和纯化手段,获得了成本低,活性高,特异性强的 Bst DNA 聚合酶. 下一步实验将尝试其他纯化手段,以进一步提高 Bst DNA 聚合酶的纯度.

肺炎衣原体肺炎、肺炎支原体肺炎的临床症状及 X 线表现均无特异性,难以和其他非典型肺炎相区别,故其确诊有赖于实验室诊断. 实验室检测方法有很多,包括直接涂片和培养法、免疫荧光直接抗原检测法、补体结合抗体检测、核酸扩增检测法和血清检测法等,本实验利用实验室已提取并处理的肺炎

支原体、肺炎衣原体 DNA,利用已发表的专利方法,验证了 Bst DNA 聚合酶可以用于快速准确检测肺炎支原体、肺炎衣原体,且灵敏度和特异性俱佳,为肺炎支原体、肺炎衣原体的基层临床检测降低了成本,同时也为等温核酸检测技术在基层医疗领域的进一步应用提供了可能性.

### 参考文献

- [1] COMPTON J. Nucleic acid sequence-based amplification [J]. Nature, 1991 (350):91-92.
- [2] MWENDWA F, MBAE C K, KINYUA J, *et al.* Stem loop-mediated isothermal amplification test: comparative analysis with classical LAMP and PCR in detection of Entamoeba histolytica in Kenya [J]. BMC Research Notes, 2017, 10(1): 142.
- [3] MASAKI IMAI A, AI NINOMIYA A, HAUMI MINEKAWA B. Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection [J]. Vaccine, 2006 (24):6679-6682.
- [4] CURTIS K A, RUDOLPH D L, OWEN S MDONNA L. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) [J]. Journal of Virological Methods, 2008, 151(2): 264-270.
- [5] ZENG D D, YE W W, XU M, *et al.* Rapid diagnosis of soybean root rot caused by fusarium culmorum using a loop-mediated isothermal amplification assay [J]. Journal of Phytopathology, 2017, 165 (249):249-256.
- [6] TECHATHUVANAN C, D'SOUZA D H. Reverse-transcriptase loop-mediated isothermal amplification as a rapid screening/monitoring tool for salmonella enterica detection in liquid whole eggs [J]. Journal of Food Science, 2012, 77(4): M200-M205.
- [7] YU Y, MA X Y, ZHANG W. Detection of Staphylococcus aureus in milk using real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification [J]. Advance Journal of Food Science and Technology, 2015, 8(9):678-684.
- [8] MASHOOQ M, KUMAR D, NIRANJAN A K, *et al.* Development and evaluation of probe based real time loop mediated isothermal amplification for Salmonella: a new tool for DNA quantification [J]. Journal of Microbiological Methods, 2016, 126: 24-29.
- [9] CHEN Z Q, ZHANG K, YIN H, *et al.* Detection of Salmonella and several common Salmonella serotypes in food by loop-mediated isothermal amplification method [J]. Food Science and Human Wellness, 2015, 4(2): 75-79.
- [10] RAVAN H, AMANDADI M, SANADGOL N. A highly specific and sensitive loop-mediated isothermal amplification method for the detection of Escherichia coli O157:H7 [J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 91: 161-165.



- [11] OLONINI I K O, KUROSAKI Y, MIYAMOTO H, *et al.* Rapid detection of all known ebolavirus species by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) [J]. *Journal of Virological Methods*, 2017, 246: 8—14.
- [12] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28 (12), e63.
- [13] NAGAMINE K, WATANABE K, OHTSUKA K, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template [J]. *Clinical Chemistry*, 2001, 47 (9): 1742—1743.
- [14] YASHUYOSHI M, KENTARO N, NORIHIRI T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 289 (1): 150—154.
- [15] LEE D, SHIN Y, CHUNG S, *et al.* Simple and highly sensitive molecular diagnosis of zika virus by lateral flow Assays [J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(24): 122—124.
- [16] TEGEGNE B, GETIE S, LEMMA W, *et al.* Performance of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the diagnosis of malaria among malaria suspected pregnant women in Northwest Ethiopia [J]. *Malaria Journal*, 2017, 16(1): 34.
- [17] OSCORBIN I P, BOYARSKIKH U A, FILIPENKO M L. Large fragment of DNA polymerase I from *geobacillus sp. 777*: cloning and comparison with DNA polymerases I in practical applications [J]. *Molecular Biotechnology*, 2015, 57(10): 947—959.
- [18] MCCLARY J, YE S Y, HONG G F, *et al.* Sequencing with the large fragment of DNA polymerase I from *Bacillus stearothermophilus* [J]. *DNA Sequence: the Journal of DNA Sequencing and Mapping*, 1991, 1(3): 173—180.
- [19] 向义和. DNA聚合酶 I 的功能与结构的发现 [J]. *自然杂志*, 2011, 33(6): 346—354.
- XIANG Y H. Discovery of function and structure of DNA Polymerase I [J]. *History of Natural Science*, 2011, 33(6): 346—354. (In Chinese)
- [20] MEAD D A, MCCLARY J A, LUCKEY J A, *et al.* Bst DNA polymerase permits rapid sequence analysis from nanogram amounts of template [J]. *Biotechniques*, 1991, 11(1): 76—78.
- [21] 黄维华, 翟峰, 洪国藩. Bst DNA 聚合酶大片段的克隆、表达、性质及其应用 [J]. *生物化学与生物物理学报*, 1999, 31(4): 379—384.
- HUANG W H, ZAI F, HONG G F. Cloning, expression, properties and application of large fragments of Bst DNA polymerase [J]. *Journal of Biochemistry and Biophysics*, 1999, 31(4): 379—384. (In Chinese)
- [22] 谭拥军, 余景卫, 陈燕, 等. R9-FOXMI(1-234aa)重组蛋白批量纯化及其抑瘤效应研究 [J]. *湖南大学学报(自然科学版)*, 2017, 44(12): 116—120.
- TAN Y J, YU J W, CHEN Y, *et al.* Batch purification of R9-FOXMI (1-234aa) recombinant protein and its antitumor effect [J]. *Journal of Hunan University (Natural Sciences)*, 2017, 44(12): 116—120. (In Chinese)
- [23] 袁静, 柏长青, 苑鑫, 等. 用于检测肺炎支原体的 LAMP 试剂盒及其专用引物 [P]. 中国: 105238860, 2016-01-13.
- YUAN J, BO C Q, YUAN X, *et al.* LAMP kit for detecting *Mycoplasma pneumoniae* and special primer [P]. China: 105238860, 2016-01-13. (In Chinese)
- [24] 孙宜峰, 于丹, 曾冰冰. 环介导恒温扩增检测肺炎衣原体的方法及检测试剂盒 [P]. 中国: 101886122, 2010-11-17.
- SUN Y F, YU D, ZENG B B. Method for detecting *Chlamydia pneumoniae* by loop-mediated isothermal amplification and detection kit [P]. China: 101886122, 2010-11-17. (In Chinese)