

## 基因芯片技术检测肾综合征出血热病毒核酸的研究\*

朱 进, 陶开华, 操 敏, 张 云, 李越希\*\*, 张锦海, 唐家琪

(南京军区军事医学研究所, 江苏南京 210002)

Establishment of Diagnostic Assay for *Hantavirus* with Microarray Techniques

ZHU Jin, TAO Kai-hua, CAO Min, ZHANG Yun, LI Yue-xi\*\*, HANG Jing-hai, TANG Jia-qi

(Nanjing Military Institute, Nanjing Command, Nanjing 210002, China)

**Abstract:** To establish a rapid, sensitive and specific diagnostic assay for Hantavirus with microarray techniques, specific primers and probes were designed according to the conservative and specific DNA sequence of 76-118 strain and R22 strain. The probes were spotted on glass slides to form microarrays. The Cy3-labeled single stranded DNA fragments prepared by dissymmetrical PCR were hybridized with the probes on the glass slides. The microarrays were scanned and analyzed with a scanner. The results showed that the DNA microarray could detect the different typed DNA of HTN and SEO with adequate specificity and sensitivity. The developed DNA microarray and techniques might be a very useful method for diagnosis and prevention, and could be widely applied in specific pathogens detection of infectious diseases such as hemorrhagic fever with renal syndrome.

**Key words:** Hemorrhagic fever with renal syndrome; *Hantavirus*; DNA microarray

关键词: 肾综合征出血热; 汉坦病毒; 基因芯片

中图分类号: Q811.4

文献标识号: A

文章编号: 1003-5152(2004)01-0079-03

肾综合征出血热 (Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, HFRS)是由布尼亚病毒科汉坦病毒属 (*Hantavirus*, HV)中的病毒引起的急性传染病,该病的病死率较高,早期诊断和治疗尤为重要。既往的血清学手段在敏感性、特异性和早期诊断率上均受到一定限制,且为病毒感染的间接证据。虽然 RT-PCR 用于检测感染动物组织、病毒培养上清及感染细胞中的 HV 基因,结果较稳定,但早期临床标本的阳性检出率仍不高,易出现假阳性等缺点<sup>[1]</sup>,并且难以适应大规模、高通量和平行检测的要求,近几年发展起来的基因芯片技术<sup>[1, 2]</sup>为上述问题的解决,提供了途径。本研究利用核酸扩增技术对样品核酸进行荧光标记,然后与基因芯片阵列中的相应寡核苷酸探针进行杂交,通过激光共聚焦荧光扫描对荧光信号的强度进行检测,可对 HFRS 作出迅速、准确、特异性的诊断。

## 1 材料和方法

## 1.1 材料

HV76-118 株和 R22 株由湖北医科大学病毒所提供,鼠脑标本(76-118 株)和 Vero-E6 细胞培养物(R22 株)均由本室制备冻存。Trizol RNA 提取试剂盒购自美国 GIBCO 公司,PCR 产物纯化试剂盒购自德国 QIAGEN 公司,Taq DNA 聚合酶、AMV 逆转录酶等购自 Takara 公司,蛋白酶 K、溶菌酶为上海生工公司产品。

探针对照标本:疟原虫、钩端螺旋体、恙虫病东方体、大肠杆菌 O157、霍乱弧菌、血吸虫六种病原体的特异性探针。

## 1.2 引物和探针的设计与合成

根据发表的 HV76-118 株和 R22 株 S 基因片段序列的资料,结合核酸序列的特异性分析,设计引

收稿日期: 2003-07-26, 修回日期: 2003-10-20

\* 基金项目: 全军十五重点课题 (01L006)

作者简介: 朱进(1968-), 男, 博士生, 研究方向为病原生物学和抗体工程。

\*\* 通讯作者。Corresponding author. Tel: 025-80867014-3540, E-mail: Liyxi@163.com

物和探针。两对引物序列为:

P1: (595-614)AGCATGAAGAGCATGAAGAGAT;

P2: (934-953)CATATTGATGATGGTGACTC;

P3: (114-133)GGATGCAGAAAA/GCAGTATG;

P4: (376-393)CCAG/ATCA/TGCTGTCTGTCC。

四条探针序列分别为:

Probe 1: AACATTAAGTACCGAGAGGGGCGTTG;

Probe 2: ACCAAGGAGGCTAACTGCTGCTGTAT;

Probe 3: CATGATCGGGAGAGTGTGCGAGCTT;

Probe 4: AGTCTCCCATTGCCGGGAGTTTATCT。

探针的 5' 端加臂和氨基化修饰。另合成 5' 端标记 Cy3 的引物 1、2 和 4, 以上寡核苷酸由上海生工和大连宝生物公司合成。

### 1.3 总 RNA 的提取

用 Trizol 试剂提取总 RNA, -20℃ 冻存备用。

### 1.4 RT-PCR 扩增及荧光标记

RT-PCR 扩增参照常规方法进行。用不对称 PCR 制备荧光标记的单链 PCR 产物, 引物对的摩尔浓度比为 1: 100。

### 1.5 芯片制备

芯片载体的醛基化。将已经硅烷化的玻片浸泡在 5% 的醛溶液中 50min, 超声 10min, 水洗两次, 晾干备用。

点样。将合成的探针(七种病原体共 16 种探针分别溶于 3×SSC 溶液内, 采用芯片点样仪机点和人工手点两种方式。条件摸索用手工点样, 0.1-0.2μL/点, 机点用 Chipmaker Pin40 点样针, 分别把不同探针溶液逐点分配在玻璃表面的不同位点上, 通过化学的共价结合使之固定于相应位点, 每个探针点样 2 点, 在每个探针点样的一端均设有一个植物阳性内参探针。点样完毕, 雾化保温 2h 后 37℃ 水浴 1h, 室温放置。

芯片的封闭。为了封闭芯片上未与寡核苷酸结合的醛基, 将芯片按下述步骤进行处理: 依次用洗液 A、B、C 冲洗后再用 ddH<sub>2</sub>O 洗 2min, 甩去水珠, 将芯片放入封闭(还原)液内 15min。再次用洗脱液和 ddH<sub>2</sub>O 冲洗, 芯片自然干燥后即可用于杂交。

### 1.6 杂交检测

Cy3 荧光标记 PCR 产物在 98℃ 变性 5min, 速置冰浴, 取出 7μL 约 200ng DNA, 与 3μL 杂交液(掺入 Cy3 标记的阳性内参照植物基因探针)充分混合, 取出点在探针阵列区域, 盖上大小合适的经硅化的盖玻片, 注意避免气泡, 将芯片放入杂交盒(盒内有适当的 2×SSC 以保持湿度), 50℃ 杂交 1h。取出芯片, 依次用预温至 55℃ 的洗液 A、B、C 冲洗

后再用 ddH<sub>2</sub>O 洗, 晾干后用芯片扫描仪读片。

荧光数据的获取和定量分析。杂交后的玻璃片用 Scan Array Lite 3000, 扫描, 5mm 分辨率。每个点的荧光强度用 Quant Array 软件分析, 荧光信号强度与背景信号强度统计学上显著性差异(P<0.01)为阳性点。

## 2 结果与讨论

### 2.1 HFRSV-RNA 的 RT-PCR 检测结果

用两对 HTN 型和 SEO 型通用引物分别扩增标准株 76-118 株和 R22 株以及实验室分离 HV 病毒株鼠脑标本(76-118 株)和 Vero-E6 细胞培养物(R22 株)的病毒核酸, 均可获得 359bp 和 280bp 的目的条带, 核酸片段与预期的片段大小相一致(见图 1)。

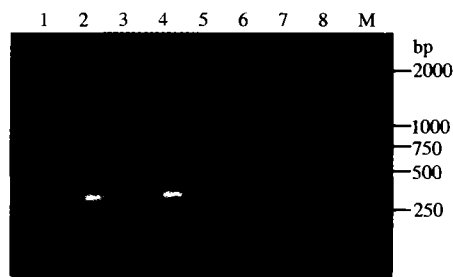


图 1 HV RNA 的 RT-PCR 扩增结果

Fig.1 cDNA of four HV samples amplified by RT-PCR 1/3/5/7, cDNA of four HV samples amplified by RT-PCR with Primer 4; 2/4/6/8, cDNA of four HV samples amplified by RT-PCR with Primer 1 and Primer 2 M: Maker.

### 2.2 PCR 产物的荧光标记

分别用荧光标记核苷掺入法和荧光标记引物法两种方法标记核酸片段。在常规的 PCR 反应中加入适量的荧光标记 dUTP, 用不对称 PCR 标记 DNA 片段; 用 Cy3 荧光标记的引物进行不对称 PCR 反应制备荧光标记的 PCR 产物。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测表明, 荧光标记单链核酸的泳动速率稍大于相应的双链 DNA 片段。

### 2.3 基因芯片的检测结果

四种寡核苷酸探针检测标记 PCR 产物的结果如图 2、3。探针 1、2 和探针 3、4 互为反向序列。标记 76-118 株核酸片段仅与探针 1、2 发生反应, 而标记的 R22 株核酸片段仅与探针 3、4 反应, 有较强的荧光检测结果, 不仅能够用于 HV 的检测, 也能用于 HV 的分型。引物标记核酸的检测效果要好于荧光标记核苷掺入标记。

### 2.4 基因芯片检测的敏感性和特异性

将 TCID<sub>50</sub>/mL 滴度在 10<sup>-1</sup>~10<sup>-6</sup> 的不同样品的

病毒 RNA 经 RT-PCR 扩增、荧光标记的单链 PCR 产物倍比稀释, 紫外分光光度计定量分析。以此稀释产物约 10ng 荧光标记核酸进行芯片杂交检测, 发现仍可检测出荧光信号。荧光标记的 HV 单链核苷酸片段仅与 HV 探针结合, 与其他六种病原体病原虫、钩端螺旋体、恙虫病东方体、大肠杆菌 O157、霍乱弧菌、血吸虫的特异性探针均无反应(图 3)。

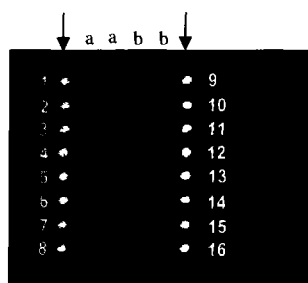


Fig.2 Detection of Cy3 labeled 76-118 DNA by genechips a and b are probes 1, 2 of 76-118 strain; 1-16 are 16 probes of other 7 pathogens.

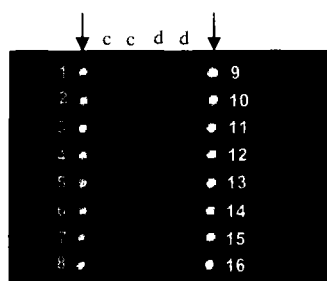


Fig.3 Detection of Cy3 labeled R22 DNA by genechips c and d are probes 1, 2 of R22 strain; 1-16 are 16 probes of other 7 pathogens.

常规的血清学方法对汉坦病毒抗原、抗体检测的敏感性和特异性不够高, 在病毒的分型鉴定中又存在着交叉反应的特点<sup>[7]</sup>; RT-PCR 检测中的假阳性结果, 阻碍其在临床标本检测中的应用<sup>[6]</sup>。基因芯片是采用光刻合成或高速打印技术在玻璃等载体上制造的 DNA 微阵列。通过 PCR 扩增、体外转录等技术荧光标记样品 DNA/RNA, 同 DNA 微阵列杂交后通过荧光扫描仪扫描和计算机分析, 从而获得样品中大量基因序列的信息<sup>[4, 5]</sup>。该技术具有高通量、集成化和自动化的特点, 它是继单克隆抗体技术和 PCR 技术之后生命科学中的又一重大技术创新。尽管基因芯片发展时间不长, 迄今在病原

检测研究中的应用还不多<sup>[2]</sup>, 但由于芯片技术与传统的杂交技术相比, 有检测系统微型化、对样品的需要量非常少、效率高, 能同时分析数千种诊断用 DNA 序列, 以及高特异性、高敏感性的特点, 将会极大地推动诊断医学的发展。

本研究根据汉坦病毒 76-118 株和 R22 株的核苷酸序列, 结合计算机软件分析及 NCBI BLAST 分析, 设计并筛选出两型 (HTN 型和 SEO 型) 两对特异性引物和四条特异性探针, 用于肾综合征出血热病毒核酸的检测, 具有较高的特异性和敏感性, 能够检测 TCID<sub>50</sub>/mL 滴度在 10<sup>-1</sup>~10<sup>-6</sup> 的不同样品的病毒 RNA 的约 10ng 荧光标记物。在建立并完善检测技术的同时, 我们对实验材料、实验方法进行了研究。通过多次实验发现, 采用 Trizol 试剂提取病毒核酸、以国产玻片替代进口玻片、采用自配的杂交液用于芯片杂交等均获得理想结果。本研究在一张芯片上集成包括汉坦病毒在内的七种重要传染病病原体的特异性探针, 建立统一的反应体系, 可同时快速检测出相应病原体。该基因芯片检测方法的建立, 为更多种病原体基因的快速检测, 疫区传染源、传播媒介和传播途径的确定, 以及对传染病的流行病学调查、预防及控制都具有重要意义。

## 参考文献

- [1] 冯永强, 阎小君, 苏成芝. 基因芯片技术[J]. 国外医学分子生物学分册, 2000, 22: 1-5.
- [2] 章军建, 刘煜敏. 基因芯片在医学研究中的应用[J]. 国外医学遗传学分册, 2002, 25: 7-10.
- [3] Wichmann D, Slenczka W, Alter P, *et al.* Hemorrhagic fever with renal syndrome: diagnostic problems with a known disease[J]. J Clin Microbiol. 2001, 39: 3414-3416.
- [4] Kricka L J. Microchips: microarrays and nanochips, personal Laboratories for the 21st century[J]. J Clin Chim Acta, 2001, 307: 219-223.
- [5] Chitnikov V, Rasooly A, Chumakov K, *et al.* Microarray Analysis of Microbial virulenceFactors [J]. Appl Env Microbiol, 2001, 67: 3258-3263.
- [6] Kariwa H, Kamimura M, Arikawa J. Characterization of the mode of Hantaan virus infection in adult mice using a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction: transient virus replication in adult mice[J]. Microbiol Immunol, 1995; 39(1): 35-41.
- [7] Papa A, Johnson A M, Stockton P C, *et al.* Retrospective serological and genetic study of the distribution of hantaviruses in Greece[J]. J Med Virol, 1998 Aug; 55(4): 321-327.