

应用纳米金探针检测 HSV-2 的目视化基因芯片*

刘明贵¹, 王业富^{1**}, 隋放², 万志香¹, 高文娟¹

(1. 武汉大学生命科学院 病毒学国家重点实验室, 湖北武汉 430072; 2. 辽阳市中心医院, 辽宁辽阳 111000)

A Visual Gene Array for the Detection of HSV-2 Based on Nanogold Probes

LIU Ming-gui¹, WANG Ye-fu^{1**}, SUI Fang², WAN Zhi-xiang¹, GAO Wen-jun¹

(1. State key Lab of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. Liaoyang Center Hospital, Liaoyang 111000, China)

Abstract: A visual HSV-2 detection gene array was developed based on nanogold probes. The specific primer and probe of HSV-2 were designed based on the highly conservative region of HSV-2 DNA polymerase gene and the HSV-2 PCR amplicon were labeled by biotin through PCR reaction. Amino-modified probes were spotted on an activated glass surface on which hybridized with the PCR amplicon. Subsequently, the streptavidin-nanogold was added to form the amplification system of the biotin-streptavidin-nanogold complex. At last, the step of silver staining amplified the signal of hybridization, Therefore it was easy to detect the HSV-2 by naked eyes. As little as 100fmol/L of HSV-2 amplicon could be detected on the array, The HSV-2 detection gene array can detect the HSV-2 virus infection with high sensitivity and low cost.

Key words: Gene array; HSV-2; Nanogold; Biotin-streptavidin; Sensitivity

摘要: 本实验建立了一种应用金标链霉亲和素探针的目视化高灵敏度检测单纯疱疹病毒 2 型 (Herpes Simplex Virus-2, HSV-2) 的基因芯片。该芯片以 HSV-2 DNA 聚合酶的高保守区为靶序列, 设计 HSV-2 特异性引物和探针, 通过 PCR 反应使扩增产物标记上生物素; 氨基修饰的探针固定在活化的玻片上, 与生物素标记的扩增产物杂交; 利用生物素与链霉亲和素高亲和力的特性, 加入纳米金标记的链霉亲和素后形成生物素-链霉亲和素-纳米金生物反应放大系统; 银染反应后, 达到目视化检测 HSV-2 效果。该 HSV-2 检测基因芯片能目视化检测出 100fmol/L 的 HSV-2 扩增产物, 具有灵敏度高, 低成本的特点, 通过临床标本验证表明该芯片具有较高的准确性。

关键词: 基因芯片; HSV-2; 纳米金; 生物素-链霉亲和素; 灵敏度

中图分类号: Q 819

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)03-0294-04

单纯疱疹病毒 (Herpes simplex virus, HSV) 属 α 疱疹病毒亚科, 分 1 型和 2 型, 其中, HSV-2 病毒主要的危害为生殖系统的感染, 引发生殖系统疱疹、脓疱。HSV-2 子宫内感染和新生儿感染可致死胎和发育不全^[1]。另外, 单纯疱疹病毒 2 型感染与子宫颈癌的发生有着密切联系^[2]。

基因芯片是 90 年代中期发展起来的一项前沿生物技术, 它融合了生命科学、化学、微电子技术、计算机科学、统计学和生命信息学等多种学科的最新技术。其基本原理是应用已知的核苷酸序列作为探针与标记的靶核苷酸序列进行杂交, 通过对信号的检测进行定性与定量分析。用于标记靶核苷酸序

收稿日期: 2005-10-19; 修回日期: 2006-02-24

* 基金项目: 国家质量监督检验检疫总局重点科研项目 (2002IK006-01)

作者简介: 刘明贵 (1978-), 男, 江西省籍, 硕士研究生, 现从事基因芯片诊断系统研究。

** 通讯作者: 王业富 (1962-), 男, 湖北省籍, 教授。现从事分子诊断与生物芯片研究。 Corresponding author. Tel: 027-68754627, Email: wangyefu88@126.com

列的有酶、放射性同位素、荧光、化学发光及其他
的标记物质^[3]。

近年来, 由于纳米金标记技术本身的优点, 越
来越多的科学家选择纳米金来取代上述标记物。

Mirkin 等报道了一系列使用纳米金标记核酸探针的基因芯片方法^[4-6], 为了放大检测信号, 常常用银染来加强纳米金信号, 以达到更高的灵敏度^[7,8]。

生物素-亲和素系统是七十年代后期发展起来的一种生物反应放大系统。本实验通过用生物素标记的引物对 HSV-2 DNA 聚合酶的高保守区进行 PCR 扩增^[7], 扩增产物与固定在基片上的探针杂交, 杂交信号经过扩增产物上的生物素与纳米金标记的链霉亲和素结合, 再经过银染能够显示出来, 从而可以目视化检测 HSV-2 病毒。该检测方法具有灵敏度高、廉价的特点, 有效的克服了已有检测方法存在的灵敏度低、仪器昂贵、污染环境, 费时等诸多缺陷。

1 材料与方法

1.1 实验材料

硅烷化偶联剂- γ -氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 为教育部有机硅工程研究中心 (武汉大学) 产品, 1, 4-苯二异硫氰酸酯 (PDITC) 购于 Sigma 公司, Tag DNA 聚合酶, dNTPs 和链霉亲和素为 Promega 公司产品; 其它化学和生物试剂使用国产分析纯试剂。所配试剂溶液均用 0.1% 焦碳酸二乙酯 (DEPC, Sigma 公司) 处理。配制试剂的玻璃器皿经王水浸泡后用去离子水冲洗, 在 180°C 干燥 8h 以上。所有离心管、试管、吸头等用品均经高压蒸汽灭菌, 一次性使用。

HSV-2 病毒样本取自患者生殖器溃疡部位, HSV-2 DNA 提取严格按广州中山大学达安基因诊断中心提供的检测试剂盒说明书进行。

1.2 引物和探针的设计与合成

根据有关文献的报道^[9], 本实验选择 HSV DNA 聚合酶基因序列高保守区为检测靶序列。从 GenBank 找到 HSV-1 与 HSV-2 HSV DNA 聚合酶基因序列。利用 CLUSTALWR 多序列比对软件和 BLAST 软件选出最保守区序列, 用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计出 HSV-2 上游引物 P₁, 下游引物 P₂ 和探针 (根据 GenBank 中编号为 M16321 的序列设计)。上游引物的 5' 端用生物素标记, 探针的 5' 端标记带氨基的“手臂分子” (H₂N-(CH₂)₆-O-(PO₃)-(T)₁₀) 来防止探针形成空间位阻^[10]。引物与探针由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物和探针序列如下:

HSV-2 上游引物 P₁: 5'-biotin-AACATCACCC GCACCATC-3' (2058-2076) HSV-2 下游引物 P₂: 5'-TGAAGCACAGGTTGTGGC-3' (2430-2449)

HSV-2 探针: 5'-H₂N-(CH₂)₆-O-(PO₃)-(T)₁₀-GTCCCC GTCTCGTCGT-3' (2260-2277) 阳性质控点的上游引物 P₃: 5'-biotin-GTTGGTCCGAATAACGTGCC-3' (547-566) 阳性质控点的下游引物 P₄: 5'-ACCG CCAGACGCTCCATC-3' (942-959) 阳性质控点探针: 5'-H₂N-(CH₂)₆-O-(PO₃)-(T)₁₀-CCATCGGCACCAT CGCATCT-3' (677-698) 阴性质控点探针: 5'-H₂N-(CH₂)₆-O-(PO₃)-(T)₁₀-ACTCCCCTGTGAGGAAGTACT -3' 其中, 阴性质控点探针是一段不与阳性质控点 PCR 产物和 HSV-2 PCR 产物杂交的序列。

1.3 HSV-2 PCR 扩增

5 μ L HSV-2 DNA 提取液, 2 μ L P₁ (61.83 μ mol/L) 和 2 μ L (55.58 μ mol/L) P₂, 10 μ L PCR buffer [0.075 mmol/L Tris, pH9 50mmol/L KCl, 2mmol/L MgCl₂, (NH₄)₂SO₄], 2 μ L 50 μ mol/L dNTPs, 2U Tag DNA polymerase, 加无菌蒸馏水至总体积 100 μ L。经过 95°C 变性 5 min, 扩增 35 个循环 (94°C: 50s, 54°C: 45s and 72°C: 50s), 最后 72°C 延伸 5 min。

1.4 纳米金制备

按照文献^[11]提供的方法制备纳米金: 取 41.2mg 氯金酸 (HAuCl₄ · 4H₂O) 溶于 100mL 双蒸水中煮沸, 搅拌下迅速加入 10mL 38.8mmol/L 柠檬酸三钠水溶液。纳米金胶体形成后, 用 0.45 μ m 尼龙滤膜过滤, 滤液即为需要的纳米金胶体。

1.5 纳米金与链霉亲和素结合物的制备

为了确定稳定 1mL 纳米金所需的最小蛋白质用量, 采用目测法来确定蛋白质用量^[12]。最后确定稳定 1mL 纳米金最小量约为 8 μ g。取 1mL 的纳米金, 调节 pH 值至 6.5, 加入 8 μ g 链霉亲和素, 磁力搅拌混匀, 室温下静置 5~10 min 后加入 5% 的小牛血清白蛋白 (BSA) 溶液至其终浓度为 1%, 放置 30 min, 然后在 4°C 下以 12000g 高速离心 45 min。除去上清液, 红色沉淀物用含 1% BSA 和 0.02% NaN₃ 的 Tris buffer (pH 6.5) 重悬。重离心一次, 红色沉淀物用同样 Tris buffer 重悬, 4°C 下保存。

1.6 HSV-2 检测芯片的制备

玻片根据 Chrissey 等的方法^[13]处理活化, 用作固定探针用的基片。氨基修饰的探针用 0.01mol/L NaCl, 0.15mol/L NaHCO₃ buffer 稀释。取 0.5 μ L 上述稀释的探针点样。点样完毕后, 将载有探针的玻片在温度为 37°C, 湿度为 80% 的恒温培养箱中固定 2 h, 蒸馏水洗 3 次, 1% BSA 封闭 25min^[14], 然后 40~50°C 恒温箱中烘干, 即得到所需基因芯片, 4°C 保存。

1.7 杂交

5 μ L PCR 产物用 30 μ L 杂交液 (2 \times SSC, 5 \times Denhar-

dt, pH7, and 100 μ g/mL salmon sperm DNA) 稀释, 沸水中变性5分钟立刻置冰上2 min, 迅速倾倒在芯片表面, 盖上盖玻片(22mm \times 22mm), 置于湿润培养箱内54 $^{\circ}$ C杂交2h后, 依次2 \times SSC+0.1%SDS洗一次(3 min), 0.1 \times SSC+0.1% SDS洗一次(2 min), 0.1 \times SSC洗一次(3 min), 然后去离子水洗一次(2 min)^[10]。995 μ L 0.1mol/L PBS buffer中加入适量的金标链酶亲和素探针, 37 $^{\circ}$ C下杂交25 min, 再用去离子水洗2 min, 除去未杂交上的金标链酶亲和素探针。

1.8 银染

700 μ L 的柠檬酸缓冲液(pH3.5)与300 μ L的对苯二酚(0.51mol/L)充分混匀, 临用前加入25-30 μ L 硝酸银溶液(0.15mol/L)混匀。常温下避光银染12 min, 阳性对照出现后, 立即放入水中终止银染反应。

2 结果

2.1 HSV-2 PCR 扩增

PCR 扩增产物用1%琼脂糖凝胶(含EB)检测, 在紫外光照射下有一条大小与预期相符的PCR扩增物条带(391bp)。PCR 扩增产物用上海生工生物工程技术服务有限公司提供的DNA 纯化试剂盒纯化。

2.2 纳米金及金标探针的性质鉴定

制备高质量的纳米金及金标探针是本实验的重要步骤。将4 $^{\circ}$ C下保存6个月的纳米金, 用透射电子显微镜(TEM)观察, 用上述方法制备的纳米金大多数颗粒为圆形, 较为均匀。颗粒间不聚集成团, 具有良好的单分散性。对超过50个纳米金颗粒进行计算, 得出颗粒直径为15nm左右。金标探针用磷钨酸负染, 在TEM电镜下观察, 纳米金颗粒周围有明显灰黑色晕环, 表明纳米金颗粒表面吸附有蛋白质, 且纳米金的标记并未导致金标探针形成聚集, 金颗粒仍然稳定存在, 分散性好。

2.3 不同的氨基探针浓度对杂交效率的影响

固定在玻片上的探针浓度有一个最适合的浓度, 高于某一浓度或低于某一浓度都会影响最佳的杂交效率。为了探索本实验方法最适合的探针浓度, 氨基探针被系列稀释成浓度为 3.37×10^{-5} mol/L到 3.37×10^{-10} mol/L。实验结果(图1)表明: 探针浓度为 3.37×10^{-6} mol/L时, 杂交信号与背景信号不能显著的区别开来, 而浓度低于 3.37×10^{-8} mol/L时, 杂交信号与背景信号也不能区别开来。通过实验结果显示, 探针浓度在 3.37×10^{-7} mol/L到

3.37×10^{-8} mol/L这个范围内能得到一个好的杂交效率。

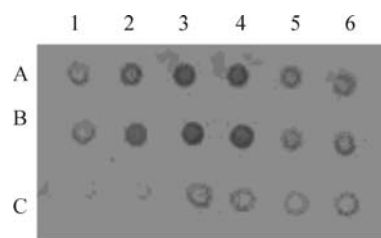


图1 不同氨基探针浓度对杂交效率的影响

Fig.1 The effects of different concentrations of probes on hybridization

Line 1-6 represented the concentrations of probes: 3.37×10^{-5} mol/L, 3.37×10^{-6} mol/L, 3.37×10^{-7} mol/L, 3.37×10^{-8} mol/L, 3.37×10^{-9} mol/L and 3.37×10^{-10} mol/L, respectively. Row A, B and C represented positive control sample, HSV-2 and negative control sample, respectively.

2.4 检测方法灵敏度的分析

为了分析本方法的检测灵敏度, 将扩增产物系列稀释成10000fmol/L, 5000fmol/L, 1000 fmol/L, 500fmol/L, 100fmol/L, 50fmol/L。每一浓度的扩增产物分别与一片固定有氨基探针的芯片杂交, 杂交后分别加入不同用量的纳米金标链酶亲和素探针(2.5 μ L, 5 μ L, 7.5 μ L, 10 μ L), 银染12 min检测试验结果(图2)。当金标探针的用量在2.5 μ L到7.5 μ L这一范围内, 检测信号随着扩增产物浓度的提高而增强; 当金标探针的用量达到10 μ L, 背景信号迅速增加, 检测信号减弱。从图2可以得出, 加入适量的金标探针(5 μ L-7.5 μ L), 该方法能检测到100fmol/L的靶序列, 当扩增产物浓度稀释低于100 fmol/L, 检测信号迅速降低, 检测点不能与背景明显区别开来。根据实验可以得出本芯片的检测灵敏度是100 fmol/L, 实验结果可以直接用肉眼观察到。

2.5 临床标本的检测

为了验证本芯片检测的准确性, 对经荧光定量PCR确诊的35例阳性标本和35例阴性标本来验证。每个样本重复5次。结果表明, 荧光定量PCR确诊的35例阳性标本中基因芯片检测出阳性结果34例, 阴性结果1例; 荧光定量PCR确诊的35例阴性标本中基因芯片检测出阳性结果4例, 阴性结果31例。HSV-2检测点及阳性对照检测点均有良好的显色结果, 肉眼清晰可见, 而阴性对照无明显显影结果, 且背景清晰。

3 讨论

HSV-2病毒引发生殖系统的感染, 临床检验常用PCR方法来诊断。PCR方法^[9,15]作为一种新型诊断

方法, 特别是它的灵敏度高, 已初步在临床病毒检

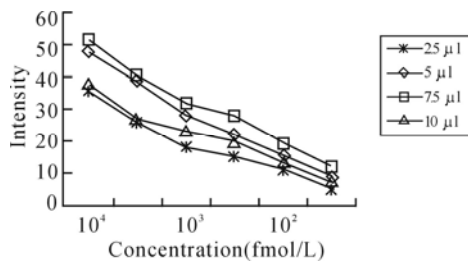


图2 探针用量和扩增产物浓度的检测信号强度

Fig. 2 The signal intensities of different dosage of probes and concentration of HSV-2 amplicon
Results were the mean of twelve replicates of array.

验工作中显示出了较大的优越性。但该方法易因为污染、引物特异性低等而导致假阳性, 也容易因试剂质量、操作不当等造成假阴性。本基因芯片通过设计特异性的 HSV-2 引物和探针, 确保靶序列与探针特异性杂交, 并在检测时在每份检测样品中都设置阴性和阳性质控点, 有效的克服了 PCR 方法产生假阳性的缺点, 是 DNA 杂交技术和 PCR 扩增技术相结合的分子诊断方法, 有极高的灵敏度、特异性和可靠性。本基因芯片在检测临床标本实验中, 对荧光定量 PCR 确诊的 35 例阳性标本进行检测, 有 34 例阳性检测结果, 检测灵敏度为 97.1%; 而对荧光定量 PCR 确诊的 35 例阴性标本进行检测, 有 4 例阳性检测结果和 31 例阴性结果, 其原因可能是临床诊断过程中由于试剂质量或操作问题而导致出现假阴性。综合上述分析, 在对荧光定量 PCR 确诊的 35 例阳性标本和 35 例阴性标本的检测中, 基因芯片共检测出 38 例阳性结果, 32 例阴性结果, 通过配对卡方检验分析得 $P > 0.05$ ($X^2 = 1.33 < 3.84$), 故可认为基因芯片检测结果与荧光定量 PCR 检测的结果间无显著性差别, 且可以目视化检测, 无须昂贵的仪器, 成本低, 检测结果容易保存。因此, 具有灵敏度高, 低成本的特点的可视化 HSV-2 检测芯片在临床应用上有很大的潜在价值。Ye-Fu Wang^[6]等研制了同步检测乙肝、丙肝病毒检测基因芯片, 但是金标核酸探针是与特定的目标核酸片段相配对, 几种检测项目, 需要几种探针, 而链霉亲和素标记的纳米金探针则不同, 具有发展为多种病原体的同步检测的通用探针的潜力, 更有利于操作使用。目前, 我们正在进一步优化芯片的制备工艺及研制多种性病同步检测基因芯片。

致谢: 感谢国家质量监督检验检疫总局提供资金支持。感谢湖北省妇幼保健医院 PCR 诊断实验

室胡兴医生提供试验标本。

References

- [1] Weidmann M, Meyer K U, Hufert F T. Rapid Detection of Herpes Simplex Virus and Varicella-Zoster Virus Infections by Real-Time PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 1565-1568.
- [2] Ndjoiy-Mbiguino A, Ozouaki F, Legoff J, *et al*. Comparison of Washing and Swabbing Procedures for Collecting Genital Fluids To Assess Cervicovaginal Shedding of Herpes Simplex Virus Type 2 DNA [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 2662-2664.
- [3] Zhen Guo, Richard A G, Andrew J T, *et al*. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports [J]. *Nucl Acids Res*, 1994, 22 (24): 5456-5465.
- [4] Elghanian R, Storhoff J J, Mucic R C, *et al*. Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles [J]. *Science*, 1997, 277:1078-1081.
- [5] Taton T A, Mirkin C A, Letsinger R L. Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes [J]. *Science*, 2000, 289: 1757-1760.
- [6] Park S J, Taton T A, Mirkin C A. Array-Based Electrical Detection of DNA with Nanoparticle Probes [J]. *Science*, 2002, 295: 1503-1506.
- [7] Alexandre I, Hamels S, Dufour S, *et al*. Colorimetric Silver Detection of DNA Microarrays [J]. *Anal Biochem*, 2001, 295: 1-8.
- [8] Wang Y F, Pang D W, Zheng H Z, *et al*. Visual Gene Diagnosis of HBV and HCV Based on Nanoparticle Probe Amplification and Silver Staining Enhancement [J]. *J Med Virol*, 2003, 70: 205-211.
- [9] Lin W M (林万明). Guide for the Application and Operation of the PCR Technology (PCR 技术操作和应用指南) [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 1993.
- [10] Scott T, Stephanie S, Brad W, *et al*. Impact of surface chemistry and blocking strategies on DNA microarrays [J]. *Nucl Acids Res*, 2003, 31(16): 77-87.
- [11] Grabar K C, Freeman R G, Hommer M B, *et al*. Preparation and characterization of Au colloid monolayers [J]. *Anal Chem*, 1995, 67: 735-743.
- [12] Wang F Y. The application and preparation of nanogold probes [J]. *Foreign Medical Sciences (国外医学科学)*, 1991, 12 (14): 145.
- [13] Chrisey L A, Lee G U, O'Ferrall C E. Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films [J]. *Nucl Acids Res*, 1996, 24: 3031-3039.
- [14] Hegde P, Qi R, Abernathy K, *et al*. A concise guide to cDNA microarray analysis [J]. *Biotechniques*, 2000, 29: 548-550.
- [15] Schmutzhard J, Riedel M H, Wirtgart B Z, *et al*. Detection of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varicella-zoster virus in skin lesions. Comparison of real-time PCR, nested PCR and

virus isolation [J]. *J Clin Virol*, 2002, 29 : 120-126.