

## HIV基因芯片的初步研究

艾滋病(AIDS)是由人类免疫缺陷病毒(HIV)感染所引起,由于其危害的严重性和特殊性,以及治疗、预防效果差,因此需要一种高效、敏感、特异的方法对该病进行早期诊断。我们尝试将近年来发展迅速的基因芯片技术[1][2]应用于HIV感染的检测。目前HIV分为HIV-1和HIV-2两型,其中HIV-1型的流行范围较广。该型包括A~J等11个亚型,在我国以B、C、E亚型为主[3]。本文着眼于HIV-1B亚型基因的检测,对基因芯片的制备、杂交、检测等过程进行了初步研究,为疾病诊断芯片的研制及应用打下基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

HIV-1B亚型质粒HIV1U26942由美国Jean K Carr博士(The Henry M. Jackson for the Advancement of Military Medicine, Maryland)惠赠。Klenow片段、dNTP及PCR试剂购自大连宝生物工程有限公司;二甲基亚砜(DMSO)购自上海生物工程股份有限公司;Cot-1 DNA(1mg/ml)购自GIBCO BRL;吖啶二羧菁(cyanine)Cy3标记的dUTP购自Amersham Pharmacia。

PixSys 5500型基因芯片打印仪购自Cartesian Technologies公司;紫外交联仪购自BIO-RAD;ScanArray Lite扫描仪购自GSI Lumonics公司;CMT-GAPSTM氨基硅烷包被的玻片、杂交盒购自Corning公司。

#### 1.2 HIV基因芯片的制备

1.2.1 探针的制备 应用限制性显示PCR(restriction display polymerase chain reaction, RD-PCR)技术[4][5]制备短的基因片段作为探针,具体方法如下:从质粒上分离HIV基因后,以Sau3A I酶切,得到多个大小合适的限制性酶切片段。然后在这些片段两端接上接头,根据酶切位点、接头的序列设计通用引物。在该通用引物的3'端分别延伸一个碱基后,通过引物间的两两组合,将PCR反应分成10个亚组。纯化各组PCR产物,克隆到T载体上。阳性克隆经鉴定、扩大培养后提取质粒。以质粒为模板扩增靶片段并进行序列分析[6]。

1.2.2 探针的打印及打印后处理 应用PixSys 5500型基因芯片打印仪,将探针有序地打印在玻片上。打印后将玻片置于90 mJ的紫外光下,使DNA交联在玻片表面;然后80 °C干烤2 h。

#### 1.3 样品的荧光标记

采用随机引物延伸法标记样品:取200 ng的HIV全长基因与75 ng随机引物(6 mer)混合,煮沸3 min,然后冰浴5 min。加入0.5  $\mu$ l dNTP(含dATP, dGTP, dCTP各5 mmol/L; dTTP 1 mmol/L), 0.5  $\mu$ l Cy3-dUTP(1 mmol/L), 10 $\times$ Klenow Fragment 缓冲液1  $\mu$ l, Klenow片段(4 U/ $\mu$ l)1  $\mu$ l, 加ddH<sub>2</sub>O至10  $\mu$ l, 37 °C温育2~3 h, 65 °C灭活5 min后以乙醇沉淀法纯化。

#### 1.4 分子杂交与杂交后清洗

1.4.1 预杂交 将预杂交液(25%甲酰胺、5 $\times$ SSC、0.1% SDS)预热至42 °C,放入玻片,42 °C温育45 min;分别用水、异丙醇清洗玻片;然后甩干玻片,或用N<sub>2</sub>吹干。

1.4.2 杂交 将荧光标记的样品与2 $\times$ 杂交液(50%甲酰胺, 10 $\times$ SSC, 0.2%SDS)、Cot-1 DNA(1  $\mu$ g/ $\mu$ l)混合,95 °C变性5 min,以最大转速离心2 min。将玻片放入杂交盒,加适量上述样品至玻片表面,小心盖上盖片(避免产生气泡);同时在盒内两个小孔中加入10  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O以保持湿度,装上杂交盒,置于42 °C水浴中杂交3~12 h。

1.4.3 杂交后清洗 玻片朝上打开杂交盒;取出芯片,立即浸入杂交后清洗液中,先以42 °C预热的2 $\times$ SSC +1 g/L SDS清洗5 min;再移入0.1 $\times$ SSC +1 g/L SDS的溶液中室温清洗10 min;最后移入0.1 $\times$ SSC清洗1 min,重复4次,以去除SDS。空气干燥或用N<sub>2</sub>干燥玻片。

#### 1.5 检测分析

1.5.1 扫描分析 用ScanArray Lite扫描仪扫描芯片,以QuantArray微集阵列分析软件分析杂交点阵Cy3的荧光强度。

1.5.2 统计学处理 用SPSS 10.0软件采用方差分析,再以Student Newman-Keuls(SNK)法进行两两比较(P<0.05为差

异显著)。

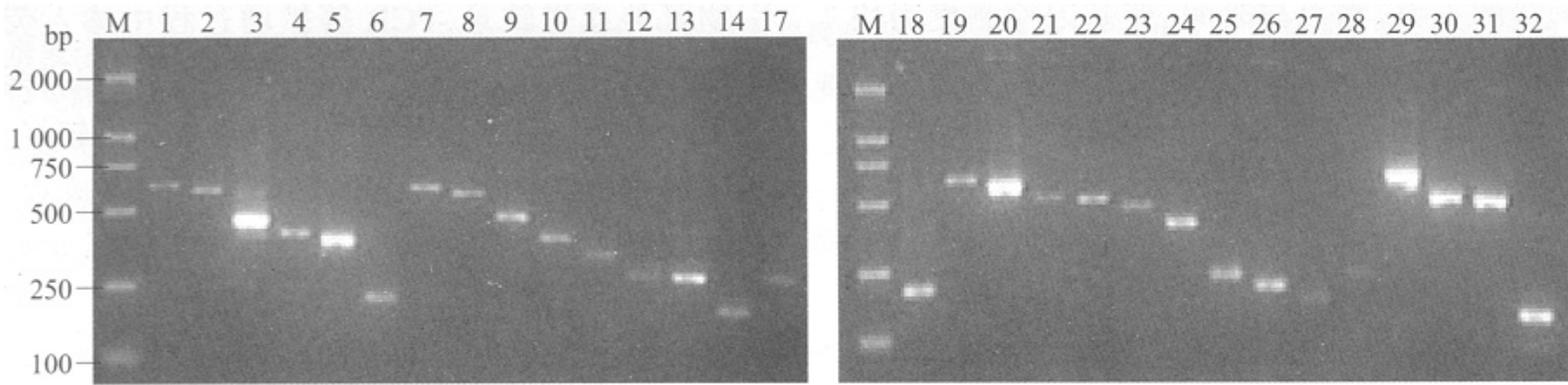


图1 限制性显示扩增的限制性片段

Fig.1 Restriction fragments amplified by restriction display-PCR  
M: DNA marker DL2000; 1-32: The number of the fragment

## 2 结果

### 2.1 基因探针的制备与检测

将 HIV1U26942基因RD-PCR产物克隆到T载体后, 提取质粒。以质粒为模板扩增得到30个100~750 bp的限制性显示型基因片段, 以异丙醇纯化后溶于50%DMSO(250 ng/ $\mu$ l)。取少量进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 如图1所示均为单一片段, 可用作制备DNA芯片的探针。

### 2.2 基因芯片的打印方式

基因芯片的打印方式设计为16 $\times$ 16的阵列, 打印在约0.25 cm<sup>2</sup>的玻璃片上: A~G、I~P行打印HIV-1B基因探针(共30个)。每行打印两个探针, 每个探针打印8个点(图2)。

### 2.3 芯片杂交结果分析

将HIV样品以随机引物法进行荧光标记, 纯化后加入杂交液与芯片进行杂交, 经杂交后清洗和干燥, 扫描芯片进行检测。重复8次实验。结果基本一致。由图3可见, 来自荧光标记的DNA片段, 可特异地与芯片中大部分相应的位点发生杂交呈现阳性杂交信号, 而与对照HCV基因点阵及空白点阵杂交的信号很弱, 该结果证实了该芯片的可行性和特异性。

计算每张芯片上每个探针8个点的荧光强度的平均值, 对8张芯片上32个探针的荧光强度进行配伍组方差分析, 可知这些探针荧光强度的差异显著( $F=7.542$ ,  $P<0.001$ )。两两比较后根据荧光强度的大小, 从中选择了探针17、21、31、27、18、19、29、20、28、32、22、30共12个探针, 分析其序列、GC含量、 $T_m$ 值, 结果表明, 这些探针的大小在100~600之间; GC含量较高, 在40%左右[(34.6~49.8)%];  $T_m$ 值为85 $^{\circ}$ C左右[(83.25~90.57) $^{\circ}$ C]。探针分布在该基因组的不同区段。

## 3 讨论

DNA芯片是国际上兴起的一种基因检测与分析新技术[7][8], 通过将基因探针显微固化在1平方厘米大小的固相支持物上, 不仅节约了试剂与样品, 而且将节省大量的人力、物力与时间, 使基因检测更为快速、敏感和精确。基因芯片技术要点主要包括四个方面: 芯片的制备、样品的准备、分子杂交和检测分析。其中探针的制备及芯片杂交动力学分析最为关键。

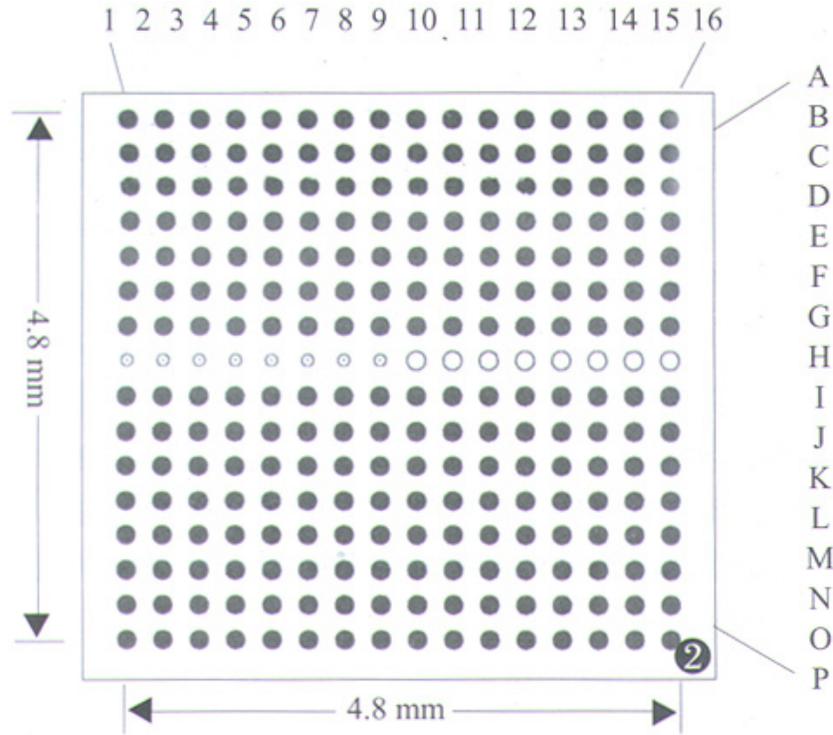


图2 芯片的打印方式

Fig.2 Format design of HIV gene chip

A<sub>1</sub>-A<sub>8</sub>: Probe 1; A<sub>9</sub>-A<sub>16</sub>: Probe 2; B<sub>1</sub>-B<sub>8</sub>: Probe 3; H<sub>1</sub>-H<sub>8</sub> (probe 15): HCV gene fragment subtype (b), negative control; H<sub>9</sub>-H<sub>16</sub> (probe 16): 50% DMSO, blank control space between spots is 300 μm

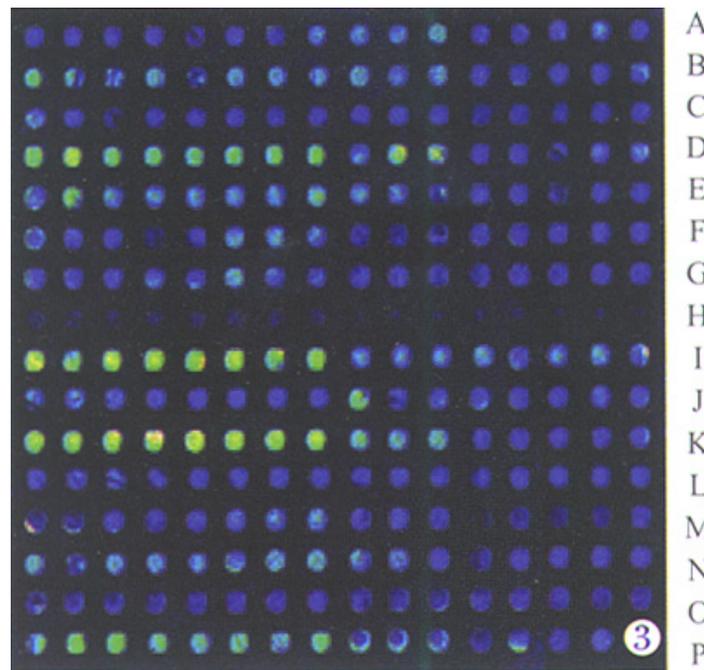


图3 HIV基因芯片的杂交图

Fig.3 Hybridization of HIV gene chip with HIV sample

The color ranging from blue to red which followed the change of spectrum represents gradual fluorescent intensity increment. For example, probe 17(I<sub>1</sub>-I<sub>8</sub>) is strongest and followed by probe 21(K<sub>1</sub>-K<sub>8</sub>), probe 31(P<sub>1</sub>-P<sub>8</sub>) and so on

目前病原基因检测芯片常用分子克隆结合PCR的方法去扩增一个或少数几个短探针或全长基因作探针，但是以一个探针检测一种靶基因容易产生假阳性、假阴性结果，且全长基因探针杂交的条件不易控制。我们应用本实验室创新的限制性显示(RD-PCR)技术快速分离并扩增得到许多大小相近(较短, 100 ~600 bp)的基因片段作探针，以这些探针来检测同一个靶分子可显著提高信噪比，显著降低假阳性率[9]。扩增的探针溶于50%DMSO而不采用常规的SSC来溶解，是因为DMSO可使DNA变性成单链以便于杂交，而且可防止打印时探针溶液的蒸发[10]。由于采用的是双链探针，其浓度不宜过低或过高(过高会因为双链探针自身的

复性而影响杂交), 我们的实验结果表明采用250 ng/ $\mu$ l的探针可取得较满意的杂交效果。打印的介质选用氨基包被的玻璃片, 一方面氨基在中性条件下带正电可与DNA上带负电的磷酸基团以离子键结合; 另一方面, 以紫外线照射及加热干烤作用后, 可使DNA探针上的胸腺嘧啶残基和烷基胺上的碳之间以自由基作用形成非特异偶联, 从而使DNA固定在玻片上。

样品的制备包括扩增、标记等步骤。通常在随机引物延伸或逆转录-PCR等扩增过程中掺入荧光标记物, 这两种方法常用于基因表达谱芯片的研究。本实验采用随机引物延伸的标记方法效果也较好。为进一步提高标记的灵敏度, 实现杂交信号的放大, 并简化标记的步骤, 我们正应用RD-PCR技术研究样品荧光标记的新方法。

分子杂交也是芯片技术的关键步骤之一。虽然上述制备的限制性显示基因片段大小相近, 但仍存在一定的差异。所以需要摸索合适的杂交条件, 分析它们的杂交动力学。实验中我们采用含25%甲酰胺、5 $\times$ SSC等的杂交液、42 $^{\circ}$ C杂交的体系。杂交结果显示大部分片段的杂交信号较强, 而阴性对照、空白对照均不杂交。经过统计学处理后, 从中选定了12个合适芯片杂交的片段作为探针。这些片段长度较短, GC含量、 $T_m$ 值均较高。而且它们在HIV基因组中分布较广泛, 这对靶分子的检测具有重要意义。

杂交及清洗后, 带有荧光标记的样品DNA与其互补的DNA探针形成杂交体, 在激光激发下产生一个荧光信号。以ScanArray Lite扫描仪对荧光信号进行扫描, 该扫描仪利用的是激光共聚焦的原理。扫描结果表明, 杂交的信号较强而背景低。荧光标记样品的纯化不彻底(含未掺入的cy3-dCTP); 非特异性位点的封闭不完全, 杂交后清洗不充分、清洗后玻片上残留液滴和玻片上灰尘污染等均可能会增强杂交背景。

#### 参考文献:

- [1] 李 凌, 马文丽. DNA芯片技术研究进展[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16(2): 151-5. Li L, Ma WL. Advances in DNA chip technology[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2000, 16(2): 151-5.
- [2] 李 凌, 马文丽. DNA芯片: 新一代基因诊断技术[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(4): 309-11. Li L, Ma WL. DNA chip: a new generation of gene diagnostic technology [J]. J First Mil Med Univ, 2001, 21(4): 309-11.
- [3] 肖 瑶, 姚 均, 陈 刚, 等. 克隆中国B、C、E亚型的 HIV-1代表株建立适于我国流行株的异源双链泳动分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1999, 13(1): 33-6. Xiao Y, Yao J, Cheng G, et al. Cloning the representative strains of China HIV-1 subtypes B, C and E for heteroduplex analysis[J]. Chin J Exp Clin Virol, 1999, 13(1): 33-6.
- [4] 马文丽, 郑文岭, James FB, 等. 限制性显示(RD-PCR): 一种新的差异显示技术[A]. 见: 孙志贤. 全军生物化学与分子生物学研究进展[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 113-4.
- [5] 郑文岭, 马文丽, Waes CV. 肿瘤细胞多聚腺苷酸聚合酶(PAP)的差异表达显示[A]. 见: 叶鑫生, 沈倍奋. 细胞调控探索[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 73-9.
- [6] 李 凌, 马文丽, 宋艳斌, 等. HIV基因限制性显示片段的克隆与序列分析[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(11): 815-8. Li L, Ma WL, Song YB, et al. Cloning and sequence analysis of HIV-1 gene fragments isolated by restriction display polymerase chain reaction method[J]. J First Mil Med Univ, 2001, 21(11): 815-8.
- [7] Gulino A. Biotechnology and molecular diagnostics[J]. Forum Genova, 1999, 9(Suppl 3): 37-46.
- [8] Favis R, Day JP, Gerry NP, et al. Universal DNA array detection of small insertions and deletions in BRCA1 and BRCA2[J]. Nat Biotechnol. 2000, 18(5): 561-4
- [9] 马文丽, 郑文岭, 崔 东, 等. 利用瓷片材料制备DNA微集芯片[J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(3): 285-9. Ma WL, Zheng WL, Cui D, et al. DNA microarray chips made on surface of ceramic slides[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2000, 32(3): 285-9.
- [10] Robert JL, Stephen P AF, Thomas RG, et al. High density synthetic oligonucleotide arrays[J]. Nat Genet, 1999, 21(suppl 1): 20-4.

#### 参考文献:

- [1] 李 凌, 马文丽. DNA芯片技术研究进展[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16(2): 151-5. Li L, Ma WL. Advances in DNA chip technology[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2000, 16(2): 151-5.
- [2] 李 凌, 马文丽. DNA芯片: 新一代基因诊断技术[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(4): 309-11. Li L, Ma WL. DNA chip: a new generation of gene diagnostic technology [J]. J First Mil Med Univ, 2001, 21(4): 309-11.
- [3] 肖 瑶, 姚 均, 陈 刚, 等. 克隆中国B、C、E亚型的 HIV-1代表株建立适于我国流行株的异源双链泳动分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1999, 13(1): 33-6. Xiao Y, Yao J, Cheng G, et al. Cloning the representative strains of China HIV-1 subtypes B, C and E

for heteroduplex analysis[J]. Chin J Exp Clin Virol, 1999, 13(1): 33-6.

[4] 马文丽, 郑文岭, James FB, 等. 限制性显示(RD-PCR): 一种新的差异显示技术[A]. 见: 孙志贤. 全军生物化学与分子生物学研究进展[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 113-4.

[5] 郑文岭, 马文丽, Waes CV. 肿瘤细胞多聚腺苷酸聚合酶(PAP)的差异表达显示[A]. 见: 叶鑫生, 沈倍奋. 细胞调控探索[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 73-9.

[6] 李 凌, 马文丽, 宋艳斌, 等. HIV基因限制性显示片段的克隆与序列分析[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(11): 815-8.

Li L, Ma WL, Song YB, et al. Cloning and sequence analysis of HIV-1 gene fragments isolated by restriction display polymerase chain reaction method[J]. J First Mil Med Univ, 2001, 21(11): 815-8.

[7] Gulino A. Biotechnology and molecular diagnostics[J]. Forum Genova, 1999, 9(Suppl 3): 37-46.

[8] Favis R, Day JP, Gerry NP, et al. Universal DNA array detection of small insertions and deletions in BRCA1 and BRCA2[J]. Nat Biotechnol. 2000, 18(5): 561-4

[9] 马文丽, 郑文岭, 崔 东, 等. 利用瓷片材料制备DNA微集芯片[J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(3): 285-9.

Ma WL, Zheng WL, Cui D, et al. DNA microarray chips made on surface of ceramic slides[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2000, 32(3): 285-9.

[10] Robert JL, Stephen P AF, Thomas RG, et al. High density synthetic oligonucleotide arrays[J]. Nat Genet, 1999, 21(suppl 1): 20-4.

---

[回结果列表](#)