

## 用于HIV诊断的Oligo基因芯片研制

据专家估计我国现已进入艾滋病危险的流行期,如不采取积极有效的措施,到2010年,我国艾滋病病毒感染者将超过1000万人[1]。我国HIV主要基因型为HIV1B(47.5%)、C(34.3%)、A/E(9.6%)以及A,D,G(5.7%)亚型,广州特有F(0.3%)亚型[2]。由于HIV1突变率高及全面筛查存在一定困难,我们尝试利用生物信息学方法,以一株B亚型典型性代表株为靶序列,设计Oligo探针,并以此芯片来检测其它亚型样品。此研究模拟临床DNA和RNA样品,运用质粒酶切和转录产物作为模板,分别经RD-PCR及随机特异性引物PCR的标记方法处理样品与芯片杂交,旨在探讨以Oligo芯片研制快速筛查诊断HIV病毒及分型的可行性。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

HIV B(U26942)、C(U46016)、F(AF075703)、G(AF061640)4种亚型质粒均为美国Jean K Carr博士(Advancement of Military Medicine, Maryland)惠赠;4例对照样品为正常人抗凝全血标本,取自广州军区广州总医院;限制性内切酶Sau3AI、Xba I、Bam HI、Sac I、Not I和HindIII, Premix Taq, AMV等 购自TaKaRa公司; Human Cot-1 DNA(1mg/ml)购自GIBCO BRI; 30条HIV Oligo探针,接头引物SIP(5'-GAT CCA CAC CAG CCA A AC CCA-3')及SIR(5'-GGT TTG GCT GGT GTG-3')、SII P(5'-GAT CAA CGA CTC AGT ATA GGC A-3')、SII R(5'-CCT ATA CTG AGT CGT T-3'),S0100(5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'), S0101(5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC)由本科室ABI3900DNA合成仪合成;随机特异性引物U2N2(5'-CTA TAC TGA GTC GTT GAT CNN-3')由 BioAsio公司合成;Cy3标记的通用引物U1(5'-Cy3-GTT TGG CTG GTG TGG ATC-3')由Trilink公司合成;DMSO及Formamide购自Amresco公司;芯片玻片片基购自康宁公司;GFP(绿色荧光蛋白)全长基因片段连接于pMD18-T载体上(本科室留存)。

探针设计及序列比对分析软件Oligo 6.0、BLAST、Alignment。

#### 1.2 Oligo探针和阵列的设计与合成

以HIV-1B亚型U26942(9 000 bp)全基因组为靶序列[3],根据预期的杂交效果[4][5],采用软件Oligo6.0设计60 mer探针,并分析其GC含量、二级结构、 $T_m$ 值、发夹结构、二聚体的数目及 $D(\lambda)$ 值。探针设计遵循原则为:(1) $T_m$ 值在 $(89 \pm 4)^\circ\text{C}$ ;(2)GC含量为40%~55%;(3)重复的单一碱基连续不超过5个;(4)探针分子最稳定二级结构配对碱基长度少于6 bp;(5)探针内部发夹结构不超过5个。衡量多种指标取其最优值,以确保探针的特异性、敏感度及其反应条件均一化[6][7]。利用BLAST软件对所设计的Oligo探针进行序列比对,排除与非HIV基因序列Score分值高于40的探针,确保探针的特异性,设计出具有高度特异性的Oligo探针22条,各基因编码区域设计2~6条探针。确定的Oligo探针采用ABI3900全自动DNA合成仪进行合成,经C18柱纯化后备用。

#### 1.3 Oligo基因芯片的制备

采用Corning公司的氨基化玻片制备HIV Oligo芯片。Oligo探针溶解于50%DMSO中,调整终浓度为 $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。选取70 mer Poly(U1)作为阳性对照;乙型脑炎(A, B) 60 mer Oligo 2条,流感(C, D)51 mer、50 mer Oligo 2条为鉴别探针;50% DMSO为空白对照(E),GFP(G)60 mer Oligo 2条((a)-(f),阴性对照;(g)(h),阳性对照),用Cartesian PixSys 5500基因芯片打印仪将探针打印成 $12 \times 8$ 的阵列(图1),每个探针3个点,将芯片用BIO-RAD紫外交联仪600 mJ的总能量进行交联固定后备用。

#### 1.4 样品的处理

##### 1.4.1 B亚型的扩增与标记

##### 1.4.1.1 DNA的RD-PCR反应与标记

1.4.1.1.1 质粒DNA的限制性酶切及HIV基因的回收 HIV1 U26942质粒DNA经限制性内切酶Xba I酶切,以0.6%琼脂糖(EB染色)观察酶切效果并切下含HIV基因的条带,用3S-柱DNA胶回收试剂盒回收HIV基因,测定浓度。

1.4.1.1.2 RD-PCR模板的制备 取 $15 \mu\text{l}$ (约 $1 \mu\text{g}$ )回收的DNA、 $1 \mu\text{l}$  Sau3AI、 $2 \mu\text{l}$   $10 \times$ 内切酶缓冲液,加 $\text{ddH}_2\text{O}$ 至 $20 \mu\text{l}$ , $37^\circ\text{C}$ ,酶切3 h。取SIP、SIR各 $20 \mu\text{l}$ ,加热至 $90^\circ\text{C}$ 保持5 min,然后在30 min内使其温度逐渐降低至室温,形成接头(SIP/SIR)。取酶切产物 $18 \mu\text{l}$ ,加入接头 $1 \mu\text{l}$ , $10 \times 4 \mu\text{l}$ 联接酶缓冲液,T4连接酶 $5 \mu\text{l}$ ,加 $\text{ddH}_2\text{O}$ 至 $40 \mu\text{l}$ , $16^\circ\text{C}$ 反应4 h。

1.4.1.1.3 RD-PCR反应及标记 取连接产物 $1 \mu\text{l}$ ,稀释3倍,加入 $1 \mu\text{l}$  Cy3-U1、 $25 \mu\text{l}$  Premix-Taq,加 $\text{ddH}_2\text{O}$ 将总体积调至 $50 \mu\text{l}$ 。RD-PCR反应循环条件: $72^\circ\text{C}$  10 min、 $95^\circ\text{C}$  2 min、 $95^\circ\text{C}$  30 s、 $58^\circ\text{C}$  30 s、 $72^\circ\text{C}$  1 min,30个循环, $72^\circ\text{C}$  7 min;RD-梯度PCR反应循环条件: $72^\circ\text{C}$  10 min、 $95^\circ\text{C}$  2 min、 $95^\circ\text{C}$  30 s、 $55^\circ\text{C}$  30 s、 $58^\circ\text{C}$  30 s、 $61^\circ\text{C}$  30 s、 $72^\circ\text{C}$  1 min,30个循环, $72^\circ\text{C}$  7 min。

##### 1.4.1.2 RNA的随机特异性PCR及标记

1.4.1.2.1 质粒的线性化及纯化 HIV1U26942质粒 $50 \mu\text{l}$ (约 $10 \mu\text{g}$ ),Sma I  $10 \mu\text{l}$ , $10 \times$ 酶切缓冲液  $8 \mu\text{l}$ ,加 $\text{ddH}_2\text{O}$ 至 $80 \mu\text{l}$ ,

37 °C水浴3 h。线性化后产物与2 μl蛋白酶K, 5 μl 10%SDS, 5 μl Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 μl CaCl<sub>2</sub>, 加ddH<sub>2</sub>O至100 μl。55 °C水浴3 h后, 用酚-氯仿法进行再纯化。

1.4.1.2.2 转录RNA 取纯化后产物20 μl, 按试剂盒(RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7, Promega)操作说明书进行转录RNA及纯化, 测其浓度, 并加入适量RNA酶抑制剂保存。以0.6%变性甲醛琼脂糖凝胶中电泳, 观察转录效果。

1.4.1.2.3 cDNA的合成 RNA15 μl, AMV4 μl, U2N2(500 pmol/ml) 1 μl, 5×Reverse Transcriptase Buffer 8 μl, dNTP (10 mmol/L)4 μl, RNA酶抑制剂3 μl, 总体积40 μl, 室温10 min, 42 °C水浴1 h, 冰水冷却2 min, 合成cDNA第1链, -20 °C保存。取1链混合物20 μl, dNTP(10 mmol) 2 μl, 10×2链Buffer 5 μl, E. Coli. DNA Pol. I(4U/μl) 1.5 μl, E. Coli Rnase H(40 U/μl) 1.0 μl, E. Coli. DNA Ligase(60 U/μl) 1.5 μl, DEPC处理dd H<sub>2</sub>O 19 μl轻轻混匀, 16 °C孵育2 h, 70 °C 10 min灭活酶类, 合成cDNA第2链。

1.4.1.2.4 随机特异性PCR的反应 第一轮5个循环RD-梯度PCR: 取cDNA第二链产物1 μl, 1 U2N2 μl, 2×Premix-Taq 25 μl, 加ddH<sub>2</sub>O至50 μl。PCR反应循环条件: 95 °C 2 min、95 °C 30 s、55 °C 30 s、58 °C 30 s、61 °C 30 s、72 °C 1 min、30个循环, 72 °C 7min。取PCR产物1 μl, 1 μl Cy3-U2, Premix-Taq 25 μl, 加ddH<sub>2</sub>O至50 μl。进行RD-梯度PCR扩增标记, 用博彩3S柱PCR产物纯化试剂盒纯化, 操作见试剂盒说明, 最终洗脱体积为30 μl。-20 °C避光保存备用。

1.4.2 其他亚型RD-PCR产物制备 U46016、AF075703、AF061640三种亚型质粒分别经BamHI, 双酶SacI和NotI, NotI和Hind III 酶切, 切胶回收后, Sau3AI酶切、加接头SIP/SIR及RD-梯度PCR扩增标记(反应条件同1.4.1)。

1.4.3 阴性对照样品的RD-PCR、随机特异性PCR和标记

1.4.3.1 人血中PBMCs的提取 取3名正常人全血各4 ml混合, 用RPMI 1640:1稀释, 向含有2份Ficoll液的试管内轻轻加入1份稀释的血液, 1500 r/min, 离心20 min。吸出中间白膜层, 即PBMCs, 再用RPMI 1640液洗2遍。

1.4.3.2 人基因组DNA/RNA的提取 将PBMCs悬浮于0.5 ml细胞裂解缓冲液中, 56 °C水浴3 h, 用酚-氯仿抽提2次, 将水相转移到一新离心管中, 加入3倍体积无水乙醇, 于-20 °C放置20 min, 13 000 r/min离心10 min, 弃上清, 沉淀物经乙醇沉淀干燥过夜后, 用100 μl ddH<sub>2</sub>O溶解。按照RNA小量提取试剂盒(QIAGEN)操作说明书从PBMCs中提取RNA, 用DEPC处理水80 μl溶解, -80 °C保存。

1.4.3.3 GFP的制备

1.4.3.3.1 GFP全长基因片段的制备 S0100、S0101各2 μl, pMD18-T质粒1 μl(约100 ng), Premix-Taq 25 μl, 加ddH<sub>2</sub>O至50 μl, 94 °C 5 min、94 °C 30 s、50 °C 30 s、72 °C 1 min, 30个循环, 72 °C 7 min。1.0%琼脂糖凝胶电泳, 观察酶切效果并切下含GFP(约800 bp)基因的条带, 用3S-柱DNA凝胶回收试剂盒回收GFP基因, 测定浓度。

1.4.3.3.2 RD-PCR模板的制备 1 μl GFP经Sau3AI酶切, 加接头S II P/S II R(反应条件同1.4.1.1.2)

1.4.3.4 RD-梯度PCR的反应 1 μl人基因组DNA和1 μl GFP混合, 经Sau3AI酶切、加接头SIP/SIR及RD-梯度PCR扩增标记(反应条件同1.4.1.1)

1.4.3.5 随机特异性PCR标记 人RNA合成cDNA(反应条件同1.4.1.2.3), 并经随机特异性引物PCR第1轮后(反应条件同1.4.1.2.4)。取1 μl 与加接头S II P/S II R的GFP混合, 以Cy3-U2进行第2轮RD-梯度PCR扩增标记, 纯化避光备用。

1.5 预杂交、杂交与检测

取2.5 μl预杂交液(25%甲酰胺, 5×SSC, 0.1%SDS, 0.1%BSA)滴加到阵列上, 盖上盖玻片, 42 °C水浴90 min进行预杂交, 封闭非特异性杂交点, ddH<sub>2</sub>O清洗, 异丙醇脱水。取2.5 μl荧光标记样品与2×杂交液(60%甲酰胺, 10×SSC, 0.2%SDS, 0.2 mg/ml CotI)等体积混合, 95 °C变性5 min, 10 000 r/min离心2 min, 滴加到阵列上, 盖上盖玻片, 放入杂交盒中42 °C水浴杂交过夜。然后依次经洗液1(2×SSC/0.1%SDS)15 min, 洗液2(0.1×SSC/0.1%SDS)20 min, 洗液3(0.1×SSC)4次, 每次2 min 清洗玻片, 无水乙醇脱水后室温干燥。用Agilent-2562B 扫描仪对芯片进行扫描。

1.6 结果分析及判定

寡核苷酸阵列与样品杂交芯片, 以激光强度90%, 增益70%扫描。用Array-Pro软件进行图像分析和数据采集, 将每点荧光强度均值输出到Excel软件进行统计处理。采用公式均一化值=(该探针所有点荧光强度均值-空白对照所有点荧光强度均值)/(阳性对照所有点荧光强度均值-空白对照所有点荧光强度均值), 对数据进行扣除背景及均一化处理。对阴性对照样品进行统计分析, 求出每个探针均一化值总体均数的上限, 并以该值作为标准进行判断。阵列中探针的判断标准为: 探针的荧光强度均一化值大于该探针判别标准值的2倍, 且大于阴性对照荧光强度的均一化值, 判断为阳性, 否则为阴性。

## 2 结果

### 2.1 Oligo探针设计结果

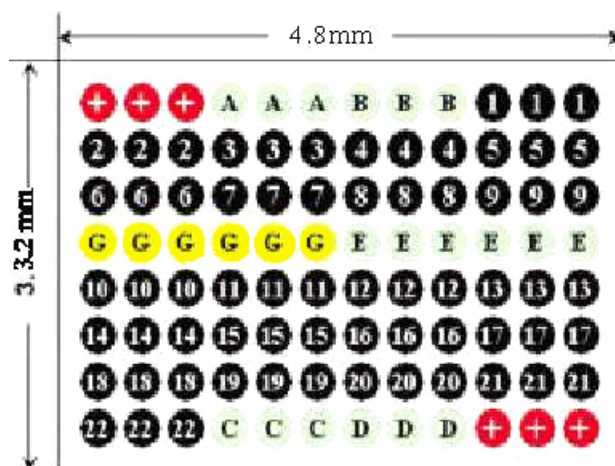
根据上述原则设计了29条Oligo探针(表1), 图1(a~e)阳性对照为重复U1序列, 阴性对照为GFP Oligo探针, 图3(E、F)阳性对照为GFP Oligo探针, 鉴别探针为特异性的流感、乙脑探针。

表 1 29 条 Oligo 探针的位置、序列及各参数信息

Tab.1 Location, sequence and parameters of 29 oligonucleotide probes

No	Gene	5'-----3'	Duplexes	Hairpins	$\Delta G$	GC%
1	gag	ATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAAOGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTTTTAGAGACA	4	4	-0.9	46.7 88.5
2	gag-pol	AGAAATCTGCGGACATAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACAT	5	5	-1.4	40 85.7
3	gag-pol	CTGTTGACTCAGATTGGCTGCACCTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATTGAGACTGTACCA	6	4	-0.4	40 85.7
4	gag-pol	TAGTATAAACAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATG	6	4	-0.6	40 85.7
5	gag-pol	GGCATGGGTACCAGCACACAAAGGAATGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAATTTGGTCAG	6	3	0.2	43.3 87.1
6	gag-pol	CACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAATTTGGTCAGTGCTGGAATCAGGA	4	3	0.4	40 85.7
7	gag-pol-vif	CAGGGATTATGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGA	3	3	0.6	46.7 88.5
8	gag-pol-vif	AGGGATTATGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGAT	3	3	0.6	45 87.8
9	vif	GGGGATGCTAAATTAGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAGAGACTGG	4	4	-0.1	41.7 86.4
10	vif	TAGAAATGGAGGAAAAGAGATATAGCACACAAGTAGACCTGACCTAGCAGACCAACTAA	3	3	0.8	41.7 86.4
11	env	AGGTATCCTTTGAGCCAATCCCACATACATTATTGTGCCCGGCTGGTTTTCGATTCTAA	4	4	0.8	46.7 88.5
12	env	TGTGCCCGGCTGGTTTTCGATTCTAAAATGTAATAATAAGAOGTTCAATGGAACAGGA	4	4	-1.6	41.7 86.4
13	env	TGGAACAGGACCATGTACAAAATGTCAGCACAGTACAATGTACACATGGAATCAGGCCAGT	6	5	-1.4	45 87.8
14	env	AAGCAATCCTCAGGAGGGGACCCAGAATGTAAOCACAGTTTAAATTTGAGAGGGGAA	4	4	-1	46.7 88.5
15	env	GAAGGGTCAAATAACACTGAAGGAAGTGACACAATCACTCCCATGCAGAATAAAACAA	4	4	-0.6	40 85.7
16	env	GGAACAGATTGGAATAACATGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACAC	4	4	-0.1	40 85.7
17	tat-rev-env	GAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAATCCOGAG	5	5	-0.4	48.3 89.2
18	Rev-env	ACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAAGTTCTGGGACGCA	4	4	-0.4	48.3 89.2
19	env-rev-tat-nef	TACAGTATTGGAGTCAGGAACATAAGAATAGTGCTGTTAACTTGTCTCAATGCCACAGCCA	5	5	-1.8	41.7 86.4
20	nef	TGTAAGGAAAGAAATGAGAOGAGCTGAGCCAGCAGCAGATGGGGTGGAGCAGTATCTOG	4	4	-2.3	55 91.9
21	5'LTR	ACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCA	4	3	-0.4	45 87.8
22	5'LTR	GGAGAGAACCAGCTTGTTACACCCTGTGAGCTGCATGGAATGGATGACCCTGAGAGA	4	3	-0.8	53.3 91.2
23	Ctrl(+)	GTTTGGCTGGTGTGGATCGTTTGGCTGGTGTGGATCGTTTGGCTGGTGTGGATCGTTTGG GTTTGGCTGGTGTGGATC	4	4	0.9	55 91.9
24	GFP1	ATGATATAGAOGTTGCGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCCCAGGATGTTGCOG	4	4	-1.0	50 89.8
25	GFP2	TTGAAGAAGATGGTGOGCTCCGGAOGTAGCCTTGGGCATGGGGACTTGAAGAAGTOG	4	3	-2.0	56.7 92.6
26	JEV1	GACCTCAGTGTGGTTGTGAACAAGCCOGTGGGAAGATATCGCTCAGCCCCTAAACGCTTA	6	3	-0.6	55 91.9
27	JEV2	CCATGTCAGGGTGACOGTCAAGGAGAACAGTCCCAGAAGCTTACCCCCAACATGT	6	3	-0.6	56.7 92.6
28	INF1	GCACTCATATTGAGAGGGTCAGTTGCTCACAAATCTTGCTGCCCGCTGT	3	4	-0.6	51 88.8
29	INF2	AAATGGCAAGCAGGGGTCTATGGGATTCTTTOGTCAGTCOGAGAGAGGC	3	3	-0.9	54 89.8

$T_m$ : Annealing temperature; GC%: G+C percentage; Ctrl(+): positive control; JEV: Japanese encephalitis virus; GFP: Green fluorescent protein; INF: Influenza virus



+ Positive control    A B JEV probes    C D Influenza probes  
E Blank control    G GFP probes    1 ~ 22 HIV probes

图1 探针阵列示意图

Fig.1 Format design of HIV oligonucleotide microarray  
JEV: Japanese Encephalitis Virus; GFP: Green fluorescent protein

### 2.2 B亚型DNA的扩增结果

B亚型DNA RD-PCR与RD-梯度PCR的电泳图(图2)，可以看到，RD-梯度PCR比RD-PCR扩增效果好，能够更好的扩增出酶切后的各个片段。

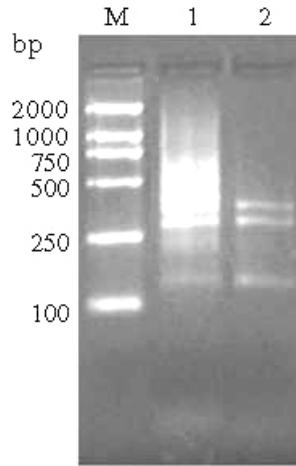


图2 RD-梯度PCR和RD-PCR产物的电泳图

Fig.2 2% agarose gel electrophoresis of HIV-1 subtype B fragments amplified by restriction display (RD) gradient PCR and RD-PCR

Lane1: Amplified fragments of RD-gradient PCR; Lane 2: Amplified fragments of RD-PCR; M: DNA marker DL2000

### 2.3 芯片杂交结果

实验结果见图3。图3 A、B分别为B亚型DNA、RNA的样品，C、D、E分别为C、F、G亚型样品，F、G人基因组DNA和人RNA的样品。图3A中所有22条探针均检测出了阳性荧光信号，图3 B中HIV探针除9、16号外，其余均为阳性信号。四种亚型中探针1、2、3、7、8、11、12、15、21、22号有共性，阴性对照及空白对照基本无荧光信号。而阴性样品除阳性对照探针有荧光信号外其它探针荧光信号均很弱。

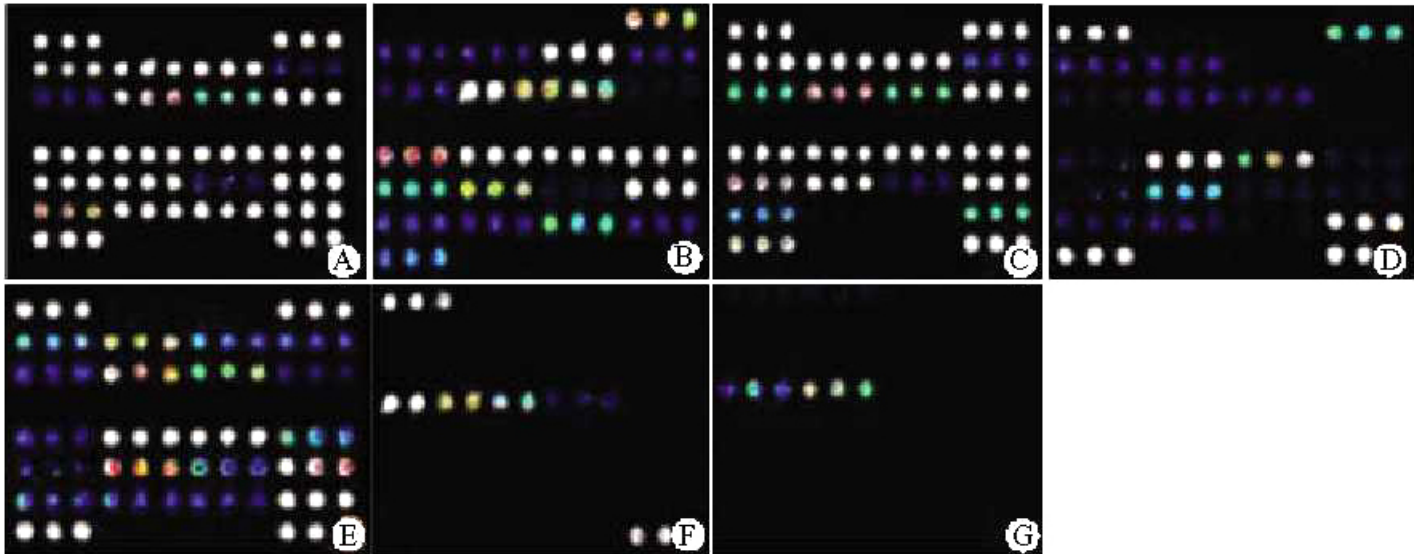


图3 芯片杂交扫描结果

Fig.3 Hybridization of HIV oligonucleotide microarray with HIV sample

A: HIV-1 subtype B DNA with RD-gradient PCR; B: HIV-1 subtype B RNA with random and differential primer-PCR; C: HIV-subtype 1C with RD-gradient PCR D: HIV-1 subtype F with RD-gradient PCR; E: HIV-1 subtype G with RD-gradient PCR; F: Human DNA RD-gradient PCR; G: Human RNA RD-gradient PCR

HIV的诊断,目前常用免疫学ELISA进行初筛、免疫印迹(WB)法对其进行确认[8]。但由于须待抗原或抗体出现后方可检测,因此存在窗口期检测不准确、某些抗体水平终末期降至不可检、围产期HIV感染不可检等问题。传统的PCR核酸检测技术和新近发展的实时定量荧光PCR技术直接检测病毒核酸,具有简便快速等特点而广泛运用于HIV的检测,但其通常只对某一或某几段基因片段进行检测,若样品保存或处理不当,该段病毒核酸降解,则可能检测不出阳性样品[9]。基因芯片从基因水平对病原体进行检测,具有高通量、特异性强等特点,因此对于提高检出率及对疾病各个发展阶段的病毒基因的活动状况具有一定的意义。

由于HIV1病毒株突变很快,要做到全面筛查诊断有一定的困难。本实验中我们试以B亚型典型性序列(U26942)为探针设计的靶序列,通过与其它亚型样品的杂交来获得共阳性探针,研究出以一种亚型典型性序列为模板,同时可检测其它亚型的HIV芯片。

我们以质粒模拟临床DNA和RNA样品,分别通过RD-梯度PCR技术和随机特异性引物PCR对样品进行扩增标记。RD-梯度PCR比RD-PCR能够更好的扩增出全基因组的酶切后的各个片段,降低优势扩增的片段,因此,我们对其它亚型样品采用RD-梯度PCR标记。HIV1B亚型RD-梯度PCR标记样品与22条HIV探针均检出阳性信号,而随机特异性引物PCR标记样品与芯片杂交,除个别探针(9,16号)无信号外,其余均为阳性,说明设计的HIV探针与自身靶序列杂交效果良好。转录时核酸部分信息出现小量丢失,RNA易降解等可能是其原因。由于逆转录时以U2N2作为cDNA合成第1链的引物,第1轮PCR时,又以U2N2为引物,这样可避免RD-PCR时接头连接时的加不上和优势扩增等现象,因此若选择合适的引物,可从RNA标本着手进行样品的全基因组标记,既节约时间且效果相当。

在HIV探针的位点上,各亚型均检测到了阳性的荧光信号,而阴性和空白对照探针没有检测到信号,说明该芯片具有较高的特异性,四亚型的杂交结果存在一些差异是由其序列差异引起。排除人阴性样品的微弱信号后,1、2、3、7、8、11、12、15、21、22号探针为共阳性,这提示我们两点:(1)这10条探针可用作筛查和诊断HIV的优化后探针;(2)从一株代表型株入手,可设计进行全面筛查诊断用的Oligo探针。该实验经样品浓度倍比稀释后(1:2;1:4;1:10),杂交及重复性验证表明此芯片稳定性良好。

与cDNA芯片相比,Oligo芯片具有探针荧光信号弱,但杂交特异性高,成本低廉、制造简便等特点[10][11],我们在经典技术上加以改进,运用RD-梯度PCR,效果较好。鉴于其对临床样品扩增的某些不足,我们探索出基于RD-PCR技术,并结合RT-PCR的技术所改进的随机特异性引物PCR技术,并准备运用于临床样品的检测。

致谢:感谢广州军区广州总医院输血科单桂秋主任给予的热情帮助。

#### 参考文献:

[1] Portsmouth S, Stebbing J, Keyi X, et al. HIV and AIDS in the People's Republic of China: a collaborative review[J]. Int J STD AIDS, 2003, 14(11): 757-61.

[2] <http://phorum.nst.pku.edu.cn/showthread.php?threadid=723>

[3] Salminen MO, Koch C, Sanders-Buell E, et al. Recovery of virtually full-length HIV-1 provirus of diverse subtypes from primary virus cultures using the polymerase chain reaction[J]. Virology, 1995, 213(1): 80-6.

[4] Li L, Ma WL, Zhu J, et al. A modified restriction display PCR method in sample-labeling of DNA microarray[J]. J Virol Methods, 2003, 114(1): 71-5.

[5] 李凌, 马文丽, 宋艳斌, 等. HIV-1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): 815-81.

Li L, Ma WL, Song YB, et al. Cloning and sequence analysis of HIV-1 gene fragments isolated by restriction digest polymerase chain reaction method[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(11): 815-81.

[6] <http://www.hicomb.org/papers/HICOMB2003-05.pdf>

[7] Fugen Li, Gary D. Selection of optimal DNA oligos for gene expression arrays[J]. Bioinformatics, 2001, 17(11): 1067-76.

[8] 邢玉兰. 艾滋病病原学诊断进展[J]. 中华检验医学杂志(Chin J Lab Med), 2001, 24(3): 188-9.

[9] 石嵘, 马文丽, 吴清华, 等. 用于SARS冠状病毒检测的60mer寡核苷酸基因芯片的设计及应用[J]. 科学通报, 2003, 48(12): 1237-41.

Shi R, Ma WL, Wu QH, et al. Design and application of 60mer oligonucleotide microarray in SARS coronavirus detection[J]. Chin Sci Bull, 2003, 48(12): 1237-41.

[10] 王艳, 马文丽, 毛向明, 等. 痘苗病毒寡核苷酸检测芯片的设计及研制[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(2): 180-3.

Wang Y, Ma WL, Mao XM, et al. Design and preparation of oligonucleotide microarray for vaccinia virus detection[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2004, 24(2): 180-3.

[11] Angela Relógio, Christian Schwager, Alexandra Richter, et al. Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(11): e51.

#### 参考文献:

[1] Portsmouth S, Stebbing J, Keyi X, et al. HIV and AIDS in the People's Republic of China: a collaborative review[J]. Int J STD AIDS, 2003, 14(11): 757-61.

[2] <http://phorum.nst.pku.edu.cn/showthread.php?threadid=723>

[3] Salminen MO, Koch C, Sanders-Buell E, et al. Recovery of virtually full-length HIV-1 provirus of diverse subtypes from primary virus cultures using the polymerase chain reaction[J]. Virology, 1995, 213(1): 80-6.

[4] Li L, Ma WL, Zhu J, et al. A modified restriction display PCR method in sample-labeling of DNA

microarray[J]. J Virol Methods, 2003, 114(1): 71-5.

[5] 李 凌, 马文丽, 宋艳斌, 等. HIV-1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): 815-81.

Li L, Ma WL, Song YB, et al. Cloning and sequence analysis of HIV-1 gene fragments isolated by restriction digest polymerase chain reaction method[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(11): 815-81.

[6] <http://www.hicomb.org/papers/HICOMB2003-05.pdf>

[7] Fugen Li, Gary D. Selection of optimal DNA oligos for gene expression arrays[J]. Bioinformatics, 2001, 17(11): 1067-76.

[8] 邢玉兰. 艾滋病病原学诊断进展[J]. 中华检验医学杂志(Chin J Lab Med), 2001, 24(3): 188-9.

[9] 石 嵘, 马文丽, 吴清华, 等. 用于SARS冠状病毒检测的60 mer寡核苷酸基因芯片的设计及应用[J]. 科学通报, 2003, 48(12): 1237-41.

Shi R, Ma WL, Wu QH, et al. Design and application of 60mer oligonucleotide microarray in SARS coronavirus detection[J]. Chin Sci Bull, 2003, 48(12): 1237-41.

[10] 王 艳, 马文丽, 毛向明, 等. 痘苗病毒寡核苷酸检测芯片的设计及研制[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(2): 180-3.

Wang Y, Ma WL, Mao XM, et al. Design and preparation of oligonucleotide microarray for vaccinia virus detection[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2004, 24(2): 180-3.

[11] Angela Relógio, Christian Schwager, Alexandra Richter, et al. Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(11): e51.

---

[回结果列表](#)