

基因芯片技术检测丁型肝炎病毒的研究

当今,全世界已经有超过5亿人感染了病毒性肝炎[1],慢性病毒性肝炎发病率和死亡率均较高,肝炎的诊断、治疗和预防越来越引起人们的关注。丁型肝炎病毒(HDV)是一种相对分子质量很小的缺陷性嗜肝RNA病毒,必须依附乙型肝炎病毒(HBV)才能复制,由于乙肝广泛流行和对人类的严重危害,对HDV感染进行诊断十分重要。在过去的20年里,分子生物学技术的发展突飞猛进,使之日益成为诊断病毒性肝炎的有力工具。微集排列是近年出现的DNA分析技术,与传统基因诊断技术相比,基因芯片技术具有明显的优势[2]。我们利用Oligo 6.0软件针对HDV基因保守区域设计多对PCR引物,探索制备HDV诊断cDNA 基因芯片的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

探针模板:HDV质粒pCDNA3.1(+)由台湾大学医学院陈培哲教授馈赠;HDV PCR引物由本室自行合成;单链的寡核苷酸片段(SIP:5'-pGATCmCAC ACC AGC CAA ACC CA及SIR:5'-GGT TTG GCT GGT GTG)采用Oligo6.0软件设计,通过Gibco公司合成、纯化及SIP5'端磷酸化;有Cy5标记RD-PCR通用引物U:5'-GTT TGG CTG GTG TGG ATC购自Gibco公司;Pixsys5500芯片打印仪购自Cartesian公司;ScanArray Lite芯片扫描仪及分析软件Quantarray购自Gsi Lumonics公司;玻片及芯片杂交盒购自Corning公司。受体菌XL-1由本室保存;pMD18-T 载体、PCR试剂、dNTP、EcoR I、Sau3A I购自大连宝生物公司;纯化试剂盒购自上海博彩生物公司。阴性对照基因片段水稻、K562细胞、大肠杆菌由本室保存。

1.2 方法

1.2.1 HDV质粒EcoR I酶切初步鉴定 0.2~0.5 μg 的质粒溶于20 μl 酶切反应体系中,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴4~5 h。取6 μl 酶切产物电泳。

1.2.2 制备HDV 基因芯片探针 针对HDV保守区域设计4对引物(表1)。PCR扩增94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,30个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。1.5%琼脂糖凝胶电泳,观察结果。纯化PCR产物按照纯化试剂盒操作说明书操作。部分纯化后PCR产物放-20 $^{\circ}\text{C}$ 留做探针待用。

表1 实验中 PCR 合成引物序列表

Tab.1 Sequences of the synthesized primers used in this study

No.	Primers(5'→3')	Length (bp)
1	P1:GGAGACCGAAGCGAGGAGGAAAGCA P2:CGACCTGGGCATCCGAAGGAGGACG	468
2	P3:CTGCAGGGTCCGCGTTCCATCCTT P4:CCAGTGAATAAAGCGGGTTTC	266
3	P5:CGACCCGAAGAGGAAAGAAGGACGC p6:GGTGTGAACCCCTCGAAGGTGG	255
4	P7:CTTCGTCGGTGATCCTGCCTCT P8:CCAGCAGTCTCCTCTTACAGA	333

1.2.3 PCR产物的鉴定 纯化PCR产物T载体克隆,将部分纯化PCR产物与pMD18-T载体连接,16 $^{\circ}\text{C}$ 2 h。转化XL-1细菌,平板克隆。用pMD18-T载体引物(引物A 5'-CTAAAACGACGCCAGT-3',引物B 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')初步鉴定后测序。用ABI PRISM310自动测序仪对克隆进行序列分析,经Blast检索与GenBank数据库进行同源性比较分析。

1.2.4 HDV 基因芯片打印 将纯化后PCR产物加DMSO调整浓度为500 ng/ μl 。以水稻基因、K562细胞、大肠杆菌为阴性

对照, 50% DMSO为空白对照, 用Pixsys5500芯片打印仪在Corning玻片上打印阵列为7×12的点阵, 从上至下, 从左到右分别是: 阴性(K562细胞、大肠杆菌、水稻基因)、空白(50% DMSO)、阳性对照; 再接着是HDV基因片段共计4个片段, 每个探针打印12个点。打印后的玻片经紫外线交联仪(能量为90 mA), 80 °C干烤2 h。避光放置备用。

1.2.5 样品标记 HDV质粒用Sau3A I酶切后接上接头, 之后用Cy5标记的通用引物U扩增, 50 μl 体系, 72 °C 10 min, 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30个循环; 72 °C 5 min。纯化PCR产物, -20 °C保存备用。

1.2.6 杂交 在暗室条件下, 标记后的样品95 °C变性后加到经预杂交的芯片阵列表面, 轻轻覆上盖玻片, 放入杂交盒内, 42 °C杂交10 h。杂交完毕, 60 °C 0.1%×SSC洗涤10 min, 双蒸水冲洗干净, 避光晾干。

1.2.7 检测分析 用Gsi Lumonics公司的ScanArray Lite芯片扫描仪扫描芯片, 并通过分析软件Quantarray分析荧光强度和比值。

2 结果

2.1 HDV cDNA质粒pCDNA3.1(+)的初步酶切鉴定

根据限制酶EcoR I酶切位点, 质粒消化后被切成2个片段, 其中小片段为645 bp, 大片断为约为6 300 bp, 与理论预期一致。

2.2 PCR产物电泳结果

PCR扩增得到HDV保守区域4个基因片段, 在1.5%琼脂糖凝胶电泳, 可得清晰的电泳图, 片段大小与理论预期一致(图1)。

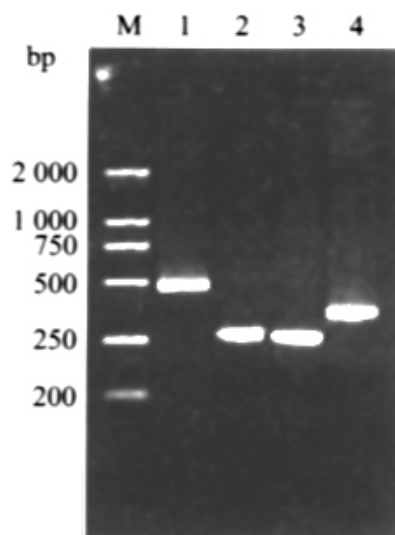


图1 HDV PCR产物片段琼脂糖电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of the PCR products of 4 fragments by different primer combinations

2.3 序列分析

通过PCR得到HDV保守区域4个不同基因片段的克隆。用ABI PRISMTM310自动测序仪对所有4个克隆片段进行序列测定, 然后与GenBank进行BLAST比较, 结果表明克隆基因均属于HDV基因, 与理论一致。图2为其中一个片段的测序图。

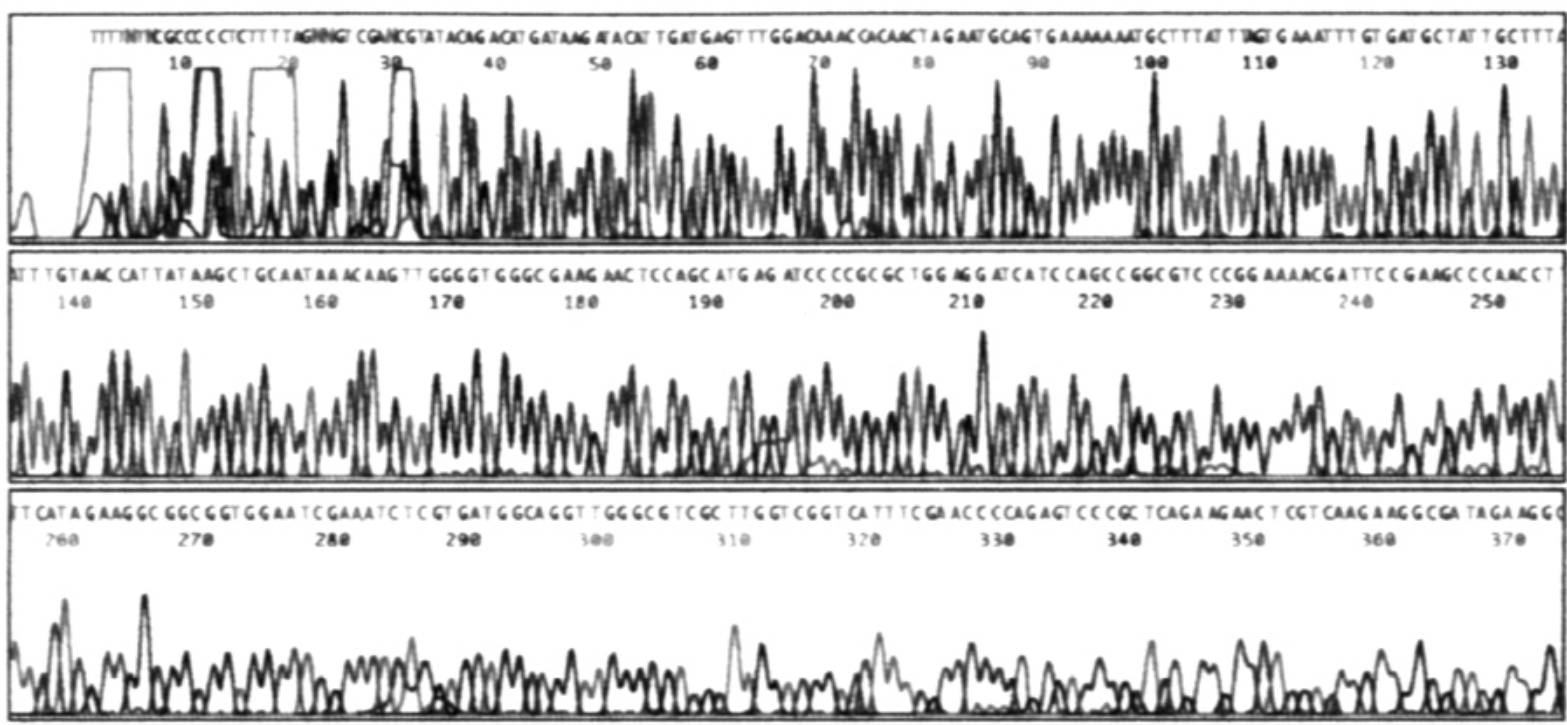


图2 HDV其中一个片段克隆测序图
Fig.2 Sequence analysis of one of the DNA fragments from HDV

2.4 基因芯片杂交信号扫描结果

结果显示，HDV及阳性内参有明显杂交信号，空白和阴性对照均无杂交信号检出(图3)。

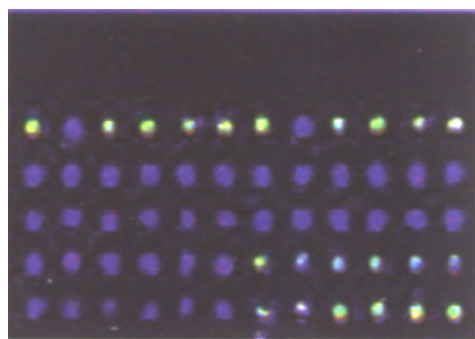


图3 HDV 基因芯片杂交信号扫描结果
Fig.3 Scanning plots of the hybridization signals on HDV microarray

3 讨论

HDV是亲肝细胞的缺陷RNA病毒，其外壳为HBsAg，它的复制与增殖需要HBV辅助，故常发生HBV和HDV联合感染或重叠感染。HDV对肝细胞有直接细胞毒作用，可直接损伤肝细胞。临床病情表现不一，肝功能动态异常，ALT异常，有的伴有黄疸。联合感染可表现为重症肝炎，HDV增加携带者或慢性肝炎的发病率和死亡率[3]。国内报道，内地人群中广泛存在着HDV感染，HBV感染者中HDV感染率平均为2.00%~12.92%[4][5]。

急性和慢性的丁型肝炎病人以及HDV携带者是本病的传染源。传染途径主要有两方面：(1)经血或血制品，此为传播途径；(2)日常生活密切接触，隐性经皮肤或粘膜暴露于含有HDV的体液传播。开放性伤口、性交、针刺及食入被HDV污染食物也可传播。目前尚无特异性预防手段。本病的实验室诊断主要依靠检测血清中HDAg和抗-HD。目前多采用ELISA法急性期血清中一过性地出现HDAg，几天后消失，继之，血清抗-HD Igm阳性。在慢性HDV感染时，抗-HD滴度较高，主要是抗-HD Igg。持续高滴度抗-HD Igg是慢性HDV感染的主要血清学指标。由于人体对HDV产生免疫应答有一定迟滞，所以对无免疫应答者的检测存在困难。另外，还可用HDV cDNA探针检测血清中HDV的RNA，但操作比较复杂。基因芯片技术为HDV诊断提供了一种快速、敏感、

高效的办法, 基因芯片技术在病毒性肝炎诊断上的长远价值在于, 能对多种肝炎病毒的各种亚型、变异株等情况, 通过一张芯片同时诊断出来。我们正在研制HBV、HDV、HCV等血源性肝炎病毒的联合诊断及HCV分型基因芯片(另文报道)。应用诊断基因芯片可为临床上病毒性肝炎的诊断、用药、疗效判定及疾病的发生、发展与转归提供可靠依据, 具有较大的发展前景[6][7]。

我们用Cartesian芯片打印仪将PCR产物直接点到玻片上, 并同时点上用于系统监控的内参照基因, 制作的基因芯片特点是重现性好, 制作芯片的成本低, 操作简便。由于每份检测样品中都设有阴性和阳性内参, 通过分子杂交确认的方法可有效的克服PCR易被污染的问题, 并利用计算机分析软件对结果信号进行分析、确诊, 大大降低了在模糊结果判断过程中的主观因素。在进行引物设计时, 既针对HDV保守区域, 又尽量涵盖病毒的整个基因组, 使所含基因信息量更为丰富和全面。在设计同时, 还注意使 PCR反应退火温度保持一致, 以便能在相同反应体系下进行, 使操作更简单、方便。从实验结果看, 效果较好。由于PCR方法简便, 产物经纯化后能直接制备芯片探针, 不失为一种快速、简单、成本低的制备探针方法, 有较大的应用价值。在进行芯片杂交时, 对样品标记采用了RD技术[8][9][10][11], 将RD片段扩增时用Cy5标记就可以非常方便地得到大量的标记了的样品基因片段[12], 目前从杂交结果看来, 效果比较理想, 为进一步更多种的肝炎病毒的混和检测奠定了基础。

参考文献:

- [1]Lok AS, Heathcote FJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000-summary of a workshop[J]. Gastroenterology, 2001, 120(21):1828-53.
- [2]孙朝晖, 马文丽, 郑文岭. 基因芯片技术诊断病毒性乙型、丙型肝炎病毒[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(4): 375-6.
Sun ZH, Ma WL, Zheng WL. Microarrays development in the diagnosis of HBV and HCV[J]. Med J Chin PLA, 2003, 28(4): 375-6.
- [3]金 奇. 医学分子病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 325.
- [4]陈宪锐. 丁型肝炎病毒感染的血清学研究[J]. 中国公共卫生, 1994, 10(6): 282-3.
Chen XR. The Seroepidemiological research of hepatitis delta virus infection[J]. Chin J Public Health, 1994, 10(6): 282-3.
- [5]赵 兴, 耿国玉, 赵惠云, 等. 丁型肝炎病毒感染的血清流行病学观察[J]. 中华流行病学杂志, 1990, 11(4): 202-4.
Zhao X, Geng GY, Zhao HY, et al. The seroepidemiological observation on hepatitis delta virus infection[J]. Chin J Epidemiol, 1990, 11(4): 202-4.
- [6]孙朝晖, 郑文岭, 马文丽. 分子生物学技术诊断病毒性肝炎进展[J]. 广东医学, 2003, 24(4): 440-2.
Sun ZH, Zheng WL, Ma WL. The development of molecular diagnosis of viral hepatitis[J]. Guangdong Med J, 2003, 24(4): 440-2.
- [7]孙朝晖, 郑文岭, 毛向明, 等. 应用PCR快速制备乙型、丁型肝炎病毒诊断基因芯片探针[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(7): 677-9.
Sun ZH, Zheng WL, Mao XM, et al. Rapid preparation of DNA microarray using PCR for hepatitis B and D virus detection[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(7): 677-9.
- [8]马文丽, 郑文岭, James FB. 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. 99-113.
- [9]郑文岭, 马文丽, Cater VW. 肿瘤细胞多聚腺苷聚合酶(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.
- [10]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): 815-8.
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): 815-8.
- [11]毛向明, 马文丽, 姜 立, 等. 应用RD-PCR方法制备K562细胞表达谱芯片基因探针[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(6): 548-53.
Mao XM, Ma WL, Jiang L, et al. Application of restriction display PCR in preparing the probes of the gene chip for investigating gene expression profile of K562 cells[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(6): 548-53.
- [12]冯春琼, 马文丽, 李 凌, 等. As203处理前后K562细胞基因表达变化的基因芯片检测[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(9): 772-4.
Feng CQ, Ma WL, Li L, et al. Analysis with DNA chips of the changes of gene expressions in K562 cells in response to As203 treatment[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(9): 772-4.

参考文献:

- [1] Lok AS, Heathcote FJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000-summary of a workshop[J]. Gastroenterology, 2001, 120(21):1828-53.
- [2] 孙朝晖, 马文丽, 郑文岭. 基因芯片技术诊断病毒性乙型、丙型肝炎病毒[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(4): 375-6.
- Sun ZH, Ma WL, Zheng WL. Microarrays development in the diagnosis of HBV and HCV[J]. Med J Chin PLA, 2003, 28(4): 375-6.
- [3] 金 奇. 医学分子病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 325.
- [4] 陈宪锐. 丁型肝炎病毒感染的血清学研究[J]. 中国公共卫生, 1994, 10(6): 282-3.
- Chen XR. The Seroepidemiological research of hepatitis delta virus infection[J]. Chin J Public Health, 1994, 10(6): 282-3.
- [5] 赵 兴, 耿国玉, 赵惠云, 等. 丁型肝炎病毒感染的血清流行病学观察[J]. 中华流行病学杂志, 1990, 11(4): 202-4.
- Zhao X, Geng GY, Zhao HY, et al. The seroepidemiological observation on hepatitis delta virus infection[J]. Chin J Epidemiol, 1990, 11(4): 202-4.
- [6] 孙朝晖, 郑文岭, 马文丽. 分子生物学技术诊断病毒性肝炎进展[J]. 广东医学, 2003, 24(4): 440-2.
- Sun ZH, Zheng WL, Ma WL. The development of molecular diagnosis of viral hepatitis[J]. Guangdong Med J, 2003, 24(4): 440-2.
- [7] 孙朝晖, 郑文岭, 毛向明, 等. 应用PCR快速制备乙型、丁型肝炎病毒诊断基因芯片探针[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(7): 677-9.
- Sun ZH, Zheng WL, Mao XM, et al. Rapid preparation of DNA microarray using PCR for hepatitis B and D virus detection[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(7): 677-9.
- [8] 马文丽, 郑文岭, James FB. 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. 99-113.
- [9] 郑文岭, 马文丽, Cater VW. 肿瘤细胞多聚腺苷聚合酶(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.
- [10] 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): 815-8.
- 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): 815-8.
- [11] 毛向明, 马文丽, 姜 立, 等. 应用RD-PCR方法制备K562细胞表达谱芯片基因探针[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(6): 548-53.
- Mao XM, Ma WL, Jiang L, et al. Application of restriction display PCR in preparing the probes of the gene chip for investigating gene expression profile of K562 cells[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(6): 548-53.
- [12] 冯春琼, 马文丽, 李 凌, 等. As203处理前后K562细胞基因表达变化的基因芯片检测[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(9): 772-4.
- Feng CQ, Ma WL, Li L, et al. Analysis with DNA chips of the changes of gene expressions in K562 cells in response to As203 treatment[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(9): 772-4.