

## 应用PCR快速制备乙型、丁型肝炎病毒诊断基因芯片探针

在尚无特效抗肝炎药的情况下，对肝炎的早期诊断和预防将是目前控制肝炎继续发展的重要途径。DNA基因芯片技术为肝炎病毒诊断提供了一种快速、高效、敏感、经济、自动化的方法，与传统基因诊断技术相比，DNA芯片技术具有明显的优势[1] [2]，其突出特点是集成化、微型化、自动化。我们应用PCR快速制备乙型肝炎病毒(HBV)和丁型肝炎病毒(HDV)诊断基因芯片探针，探索此方法制备基因芯片探针的可行性。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

探针模板：HBV直接来自临床确诊乙型肝炎患者DNA阳性血清(实验室检查：乙肝病毒血清标志物HBsAg/HBcAg、抗HBc阳性，肝功能异常)；HDV质粒pCDNA3.1(+)由台湾大学医学院肝病研究中心陈培哲教授馈赠；受体菌XL-1由本室保存，pMD18-T Vector、PCR试剂、dNTP、EcoR I购自大连宝生物公司；质粒抽提试剂盒购自上海博彩生物公司；HBV、HDV PCR引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

#### 1.2 方法

1.2.1 HBV DNA提取 HBV DNA阳性血清100  $\mu$ l，加入100  $\mu$ l DNA裂解液(25 mmol/L醋酸胺、2.5 mmol/L EDTA、1%SDS、2 mg/ml蛋白酶)，68  $^{\circ}$ C消化2 h后常规苯酚和氯仿抽提。

1.2.2 HDV质粒的EcoR I酶切初步鉴定 0.2~0.5  $\mu$ g质粒于20  $\mu$ l酶切反应体系中，37  $^{\circ}$ C水浴4~5 h。取6  $\mu$ l酶切产物电泳。

1.2.3 引物设计 针对HBV、HDV保守区域分别设计10对、4对引物(表1)。

表 1 PCR 合成引物序列表

Tab.1 Sequences of the synthesized primers for PCR

Virus	Primers (5'→3')	Length of the fragments (bp)
HBV	P1:ACTCGTGGTGGACTTCTCTC	414
	P2:GAACCACTGAACAAATGGCA	
	P3:CATCTTCTTGTGGTTCTTCTG	373
	P4:TTAGGGTTCAAATGTATACCC	
	P5:CTGTGAGGAGTTGGGGGAGGAGATT	610
	P6:GGCGAGGGAGTTCTTCTTCTAGGGG	
	P7:GGGTCACCATATTCTTGG	260
	P8:CCCTGAGCCTGAGGGCTCCACC	
	P9:CTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCC	726
	P10:ATAACTGAAAGCCAAACAGTGGG	
	P11:ATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAG	716
	P12:GCAGCACAGCCTAGCAGCCATGG	
	P13:CCATACTGCGGAACTCCTAGC	735
	P14:CAATGCTCAGGAGACTCTAAGGC	
	P15:GGAGCTACTGTGGAGTTACTCTC	431
	P16:CTTCGTCTGCGAGGCGAGGG	
	P17:GGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACT	628
	P18:TTGGGATTGAAGTCCCAATCTGG	
	P19:GGGGTGGAGCCCTCAGGCTCAGG	300
	P20:CTGTAACACGAGAAGGGGTCTAG	
HDV	P1:GGAGACCGAAGCGAGGAGGAAAGCA	468
	P2:CGACCTGGGCATCCGAAGGAGGACG	
	P3:CTGCAGGGTCCGCGTTCCATCCTT	266
	P4:CCAGTGAATAAAGCGGGTTTC	
	P5:CGACCCGAAGAGGAAAGAAGGACGC	255
	P6:GGTGTGAACCCCTCGAAGGTGG	
	P7:CTTCGTCCGGTGATCCTGCCTCT	333
	P8:CCAGCAGTCTCCTCTTTACAGA	

1.2.4 PCR扩增 HBV: 94 °C、5 min、94 °C、55 s、55 °C、55 s、72 °C、55 s, 30个循环, 72 °C、5 min; HDV: 94 °C、5 min, 94 °C、45 s, 50 °C、45 s, 72 °C、60 s, 30个循环, 72 °C、5 min。

1.2.5 1.5%琼脂糖凝胶电泳 观察结果。

1.2.6 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 °C留作探针待用。

1.2.7 纯化PCR产物T载体克隆 将纯化PCR产物与pMD18-T载体连接，16 °C、2 h。转化XL-1细菌，平板克隆。用pMD18-T载体引物(引物A: 5'-CTA AAACGACGGCCAGT-3'; 引物B: 5'-CAGGAAACA GCTATGAC-3')初步鉴定后，对所有14个克隆测序。

1.2.8 Blast检索分析 对测序结果进行同源性比较。

## 2 结果

### 2.1 HDV cDNA质粒pCDNA3.1(+)的酶切

根据限制酶EcoR I酶切位点，质粒消化后被切成两个片段(图1)，其中小片段为645 bp，大片断为约为6 300 bp，与理论预期值一致。

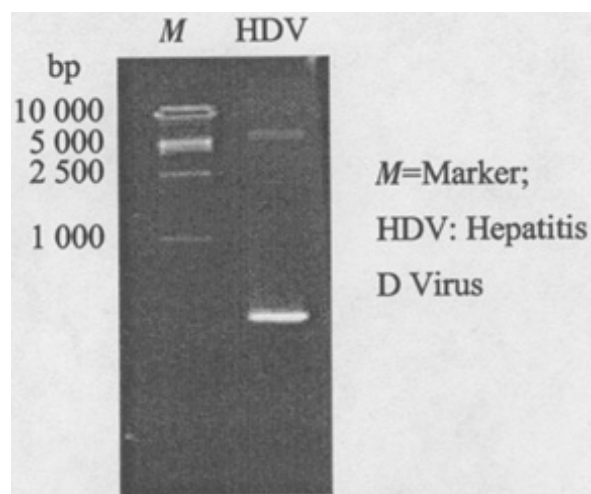


图1 HDV质粒cDNA限制性内切酶酶切结果

Fig.1 Restriction enzyme analysis of plasmid cDNA from HDV on 1.5% agarose gel

### 2.2 PCR产物反应结果

PCR扩增HBV得到10个片段，1.5%琼脂糖凝胶电泳可得清晰的电泳图(图2)。片段大小与理论预期值一致。

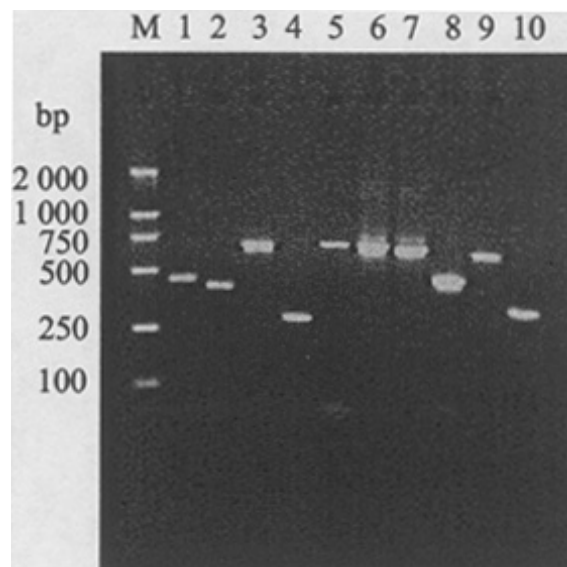


图2 HBV PCR产物片段(10条)琼脂糖电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of 10 fragments of HBV PCR products by different primer combinations

PCR扩增HDV得到4个片段，1.5%琼脂糖凝胶电泳可得清晰的电泳图(图3)。片段大小与理论预期一致。

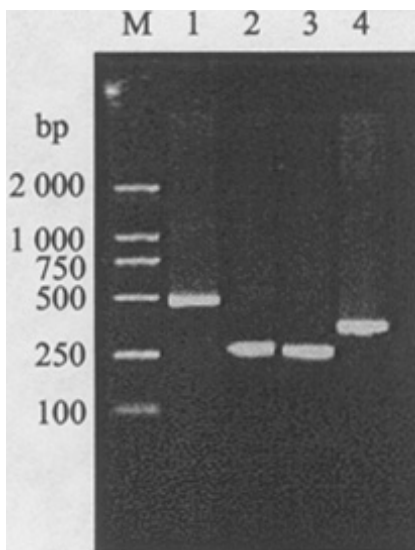


图3 HDV PCR产物片段(4条)琼脂糖电泳图

Fig.3 Agarose gel eletrophoresis of 4 fragments of HDV PCR products by different primer combinations

### 2.3 序列分析

HBV和HDV基因通过PCR方法分别得到了10个和4个不同基因片段的克隆。用ABI PRISMTM310自动测序仪对所有14个克隆片段进行序列测定，然后与GenBank进行BLAST比较，结果表明克隆片段均分别属于HBV和HDV基因，与理论预期一致。

## 3 讨论

我国是乙型病毒性肝炎的高流行区，占全球HBs- Ag总携带率的近50%，8%~10%的人为HBsAg携带者，年发病率为158/10万，现患慢性乙型肝炎的病人约1 500万[4]。此外，受HBV慢性感染的人群罹患原发性肝细胞癌的相对危险性至少增加300倍[4]。丁型肝炎病毒是一种缺陷病毒，需要乙型肝炎病毒的辅助才能感染和复制。乙型肝炎病毒患者重叠感染丁型肝炎病毒，常导致肝炎的重型化和慢性化[5]。

目前临床上诊断乙型、丁型肝炎病毒的主要方法有免疫学上传统的酶联免疫吸附试验(ELISA)及分子生物学方法等。ELISA方法检测的对象是抗原和抗体，由于人体对肝炎病毒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。近年来发展的各种核酸杂交方法和PCR方法各具优点，可对其进行定性、分型、半定量和定量检测。常规核酸杂交虽有一定的特异性，但敏感性较低；而PCR操作容易造成交叉污染，经常出现假阳性、假阴性结果，且存在操作较繁琐、一次检测的肝炎病毒种类有限、检测的效率和自动化程度不高。DNA芯片技术为肝炎病毒诊断提供了一种快速、敏感、高通量、高效的方法[3]，并可同时对多种肝炎病毒进行大规模筛查和多种肝炎种类的鉴定。芯片技术在病毒性肝炎诊断上的价值还在于，能对各种肝炎病毒的各种亚型、变异株、耐药性等情况，通过一张芯片同时诊断出来。应用诊断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。

基因芯片探针的制备一般可以通过以下两个途径：(1)分子克隆结合PCR扩增基因片段；(2)在DNA合成仪

上人工合成寡核苷酸片段。前者目前应用已经十分广泛[6] [7] [8]。利用Oligo6.4软件分别针对乙型、丁型肝炎病毒设计PCR特异引物,在进行引物设计时,尽量分别使扩增HBV、HDV的PCR反应退火温度保持一致,使PCR反应能在相同反应体系下进行,使操作更简单、方便。由于PCR方法简便,产物经纯化后能直接制备芯片探针,针对简单、基因组较小的乙型肝炎病毒(3.2 kb)和丁型肝炎病毒(1.7 kb),利用此方法制备探针不失为一种快速、简单、低成本的实用方法,有较大的应用价值。

(责任编辑:黄开颜)

#### 参考文献:

- [1] 马文丽, 郑文岭. DNA微集阵列技术的研究进展[J]. 中国科学基金, 1999, 13(5): 270-3. Ma WL, Zheng WL. The research and development of DNA microarray technology[J]. Chin Sci Found, 1999, 13(5): 270-3.
- [2] 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. The research and development of DNA genechip technology[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2000, 16(2): 151-5.
- [3] Petrik J. Microarray technology: the future of blood testing[J]? Vox Sang, 2001, 80(1): 1-11.
- [4] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 325.
- [5] Porres JC, Carreno V, Bartolome J, et al. Treatment of chronic delta infection with recombinant human interferon alpha 2c at high doses[J]. J Hepatol, 1989, 9(3): 338-44.
- [6] 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.
- [7] 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): 772-5. 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): 772-5.
- [8] 李凌, 马文丽, 祝骥, 等. 用RD-PCR技术制备HIV基因芯片探针[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18(1): 105-9. Li L, Ma WL, Zhu J, et al. Preparation of HIV genechip probes by RD-PCR technology[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2002, 18(1): 105-9.

#### 参考文献:

- [1] 马文丽, 郑文岭. DNA微集阵列技术的研究进展[J]. 中国科学基金, 1999, 13(5): 270-3. Ma WL, Zheng WL. The research and development of DNA microarray technology[J]. Chin Sci Found, 1999, 13(5): 270-3.
- [2] 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. The research and development of DNA genechip technology[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2000, 16(2): 151-5.
- [3] Petrik J. Microarray technology: the future of blood testing[J]? Vox Sang, 2001,

[4] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 325.

[5] Porres JC, Carreno V, Bartolome J, et al. Treatment of chronic delta infection with recombinant human interferon alpha 2c at high doses[J]. J Hepatol, 1989, 9(3): 338-44.

[6] 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.

[7] 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): 772-5.

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): 772-5.

[8] 李凌, 马文丽, 祝骥, 等. 用RD-PCR技术制备HIV基因芯片探针[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18(1): 105-9.

Li L, Ma WL, Zhu J, et al. Preparation of HIV genechip probes by RD-PCR technology[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2002, 18(1): 105-9.