

用于 HIV 诊断的 Oligo 基因芯片研制

温颖¹, 马文丽¹, 李凌¹, 吴清华¹, 徐秋林¹, 张海燕¹, 郑文岭²(¹南方医科大学基因工程研究所, 广东 广州 510515; ²广州军区总医院分子肿瘤学研究所, 广东 广州 510010)

摘要:目的 研制快速筛查诊断 HIV 病毒的 Oligo 芯片。方法 以 HIV-1B 亚型 U26942 全基因组序列为靶序列, 利用 DNA Club、Oligo 6.0、BLAST、Alignment 等生物信息学软件, 设计高度特异、长度均一、具近似熔解温度(T_m)的 Oligo 探针, 并制备成 Oligo 芯片。B(U26942)、C(U46016)、F(AF075703)、G(AF061640)四种亚型质粒分别经 RD-梯度 PCR 与随机特异性引物 PCR, 经荧光标记后与芯片杂交, 扫描芯片后进行统计学分析。结果与结论 获得 22 条 60 mer 探针, Oligo 芯片特异性、敏感性及稳定性好, 为进一步应用提供了条件。

关键词: HIV; Oligo 芯片; RD PCR

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2005)03-0293-05

Oligonucleotide microarray for human immunodeficiency virus detection

WEN Ying¹, MA Wen-li¹, LI Ling¹, WU Qing-hua¹, XU Qiu-lin¹, ZHANG Hai-yan¹, ZHENG Wen-ling²

¹Institute of Molecular Biology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Institute of Molecular Oncology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China

Abstract: Objective To develop an oligonucleotide microarray for fast detection of human immunodeficiency virus (HIV). **Methods** With complete genome sequence of HIV-1 subtype B (U26942) as the target sequence and bioinformatics software such as DNAClub, Oligo6.0, BLAST, Alignment, oligonucleotide probes of high specificity with identical length and similar melting temperature (T_m) were designed and synthesized. Oligonucleotide microarray was prepared using Cartesian Microarrayer. Using the plasmids of HIV-1 subtype B(U26942), C(U46016), F(AF075703), G(AF061640) and restriction display technique, Cy3-labeled HIV DNA fragments were amplified and the hybridization results were scanned and analyzed with Array-Pro. **Results and Conclusion** Twenty-two optimized oligonucleotide microarray probes were obtained and used to prepare the oligonucleotide microarray for further screening studies. The microarray prepared significantly enhanced the sensitivity, reliability and speed of DNA assay, and possesses the potential for application in clinical setting.

Key word: human immunodeficiency virus; oligonucleotide microarray; restriction display technique; HIV diagnosis

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 *Hind III*、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')、S II P (5'-GAT CAA CGA CTC AGT ATA GGC A-3')、S II R (5'-CCT ATA CTG AGT CGT T-3')、SO100 (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3')、SO101(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

收稿日期: 2004-08-05

基金项目: 国家自然科学基金(39880044); 广州市 221 重大科技项目(39880038)

Supported by National Natural Science Foundation of China (39880044) and by Key 221 Sci-tech Research Project of Guangzhou Municipality (39880038)

作者简介: 温颖(1979-), 女, 南方医科大学在读硕士研究生, E-mail: wenwen97@fimmu.com, 电话: 020-61640114-89097

(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;乙型肝炎(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 12X8 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, $1\ \mu\text{l}$ *Sau*3AI, $2\ \mu\text{l}$ $10\times$ 内切酶缓冲液,加 ddH_2O 至 $20\ \mu\text{l}$, 37°C , 酶切 3 h。取 SIP、SIR 各 $20\ \mu\text{l}$, 加热至 90°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 ddH_2O 至 $40\ \mu\text{l}$, 16°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 ddH_2O 将总体积调至 $50\ \mu\text{l}$ 。RD-PCR 反应循环条件: 72°C 10 min, 95°C 2 min, 95°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环, 72°C 7 min; RD- 梯度 PCR 反应循环条件: 72°C 10 min, 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 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 ddH_2O 至 $80\ \mu\text{l}$, 37°C 水浴 3 h。线性化后产物与 $2\ \mu\text{l}$ 蛋白酶 K, $5\ \mu\text{l}$ 10% SDS, $5\ \mu\text{l}$ Tris-HCl (pH 7.5), $0.5\ \mu\text{l}$ CaCl_2 , 加 ddH_2O 至 $100\ \mu\text{l}$ 。 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 $20\ \mu\text{l}$, 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 RNA $15\ \mu\text{l}$, AMV $4\ \mu\text{l}$, U_2N_2 ($500\ \text{pmol}/\text{ml}$) $1\ \mu\text{l}$, $5\times$ Reverse Transcriptase Buffer $8\ \mu\text{l}$, dNTP ($10\ \text{mmol}/\text{L}$) $4\ \mu\text{l}$, RNA 酶抑制剂 $3\ \mu\text{l}$, 总体积 $40\ \mu\text{l}$, 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 $20\ \mu\text{l}$, dNTP ($10\ \text{mmol}$) $2\ \mu\text{l}$, 10×2 链 Buffer $5\ \mu\text{l}$, *E. Coli*. DNA Pol. I ($4\ \text{U}/\mu\text{l}$) $1.5\ \mu\text{l}$, *E. Coli* RNase H ($40\ \text{U}/\mu\text{l}$) $1.0\ \mu\text{l}$, *E. Coli*. DNA Ligase ($60\ \text{U}/\mu\text{l}$) $1.5\ \mu\text{l}$, DEPC 处理 ddH_2O $19\ \mu\text{l}$ 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 $1\ \mu\text{l}$, $1\ \text{U}_2\text{N}_2\ \mu\text{l}$, $2\times$ Premix-Taq $25\ \mu\text{l}$, 加 ddH_2O 至 $50\ \mu\text{l}$ 。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 7 min。取 PCR 产物 $1\ \mu\text{l}$, $1\ \mu\text{l}$ Cy3- U_2 , Premix-Taq $25\ \mu\text{l}$, 加 ddH_2O 至 $50\ \mu\text{l}$ 。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 $30\ \mu\text{l}$ 。 -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 *Bam*HI, 双酶 *Sac*I 和 *Not*I, *Not*I 和 *Hind*III 酶切, 切胶回收后, *Sau*3AI 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 16401:1 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 μ l ddH₂O 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 μ l 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 SO100、SO101 各 2 μ l,pMD18-T 质粒 1 μ l (约 100 ng),Premix-Taq 25 μ l,加 ddH₂O 至 50 μ l,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 μ l 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 μ l 人基因组 DNA 和 1 μ l 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 μ l 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 μ l 预杂交液(25%甲酰胺,5 \times 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,ddH₂O 清洗,异丙醇脱水。取 2.5 μ l 荧光标记样品与 2 \times 杂交液(60%甲酰胺,10 \times 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 \times SSC/0.1%SDS)15 min,洗液 2 (0.1 \times SSC/0.1%SDS)20 min,洗液 3 (0.1 \times 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。

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。

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。

3 讨论

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

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	ΔG	GC%
1	gag	ATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTGCGAGTTAATCCTGGCCTTTTAGAGACA	4	4	-0.9	46.7 88.5
2	gag-pol	AGAAATCTGCGGACATAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACAT	5	5	-1.4	40 85.7
3	gag-pol	CTGTTGACTCAGATTGGCTGCACCTTAAATTTCCATTAGTCCTATTGAGACTGTACCA	6	4	-0.4	40 85.7
4	gag-pol	TAGTATAAACAAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTCCACAGGGATG	6	4	-0.6	40 85.7
5	gag-pol	GGCATGGGTACCAGCACACAAAGGAATTGGAGAAATGAACAAGTAGATAAAATGGTCAG	6	3	0.2	43.3 87.1
6	gag-pol	CACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAAATGGTCAGTGTGGAATCAGGA	4	3	0.4	40 85.7
7	gag-pol-vif	CAGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGA	3	3	0.6	46.7 88.5
8	gag-pol-vif	AGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGAT	3	3	0.6	45 87.8
9	vif	GGGGATGCTAAATTAGTAATAACAACATATTGGGCTCTGCATACAGGAGAAAAGAGACTGG	4	4	-0.1	41.7 86.4
10	vif	TAGAAATGGAGAAAAGAGATATAGCACACAAGTAGACCTGACCTAGCAGACCAACTAA	3	3	0.8	41.7 86.4
11	env	AGGTATCCTTTGAGCCAATCCCCATACATTATTGTGCCCGGCTGGTTTTGCGATTCTAA	4	4	0.8	46.7 88.5
12	env	TGTGCCCGGCTGGTTTTGCGATTCTAAAATGTAATAAAGACGTTCAATGGAACAGGA	4	4	-1.6	41.7 86.4
13	env	TGGAACAGGACCATGTACAAATGTCAGCAGCAGTACAATGTACACATGGAATCAGGCCAGT	6	5	-1.4	45 87.8
14	env	AAGCAATCCTCAGGAGGGACCCAGAAATGTAACGCACAGTTTTAATTGTGGAGGGGAA	4	4	-1	46.7 88.5
15	env	GAAGGTCAAAATAACACTGAAGGAAGTGACACAATCACACTCCCATGCAGAAATAAACAA	4	4	-0.6	40 85.7
16	env	GGAACAGATTTGGAATAACATGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACAC	4	4	-0.1	40 85.7
17	tat-rev-env	GAATAGAGTTAGGCAGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAATCCCGAG	5	5	-0.4	48.3 89.2
18	Rev-env	ACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACAGGATTGTGGAACTTCTGGGACGCA	4	4	-0.4	48.3 89.2
19	env-rev-tat-nef	TACAGTATTGGAGTCAGGAACTAAAGAATAGTGTCTGTTAACTTGCTCAATGCCACAGCCA	5	5	-1.8	41.7 86.4
20	nef	TGTAAGGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGATGGGTGGGAGCAGTATCTCG	4	4	-2.3	55 91.9
21	5'LTR	ACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGCCAAATAAGGAGAGAACACCA	4	3	-0.4	45 87.8
22	5'LTR	GGAGAGAACCAGCTGTTACACCTGTGAGCCTGCATGGAATGGATGACCTGAGAGA	4	3	-0.8	53.3 91.2
23	Ctrl(+)	GTTTGGCTGGTGGATCGTTTGGCTGGTGGATCGTTTGGCTGGTGGATCGTTTGG GTTTGGCTGGTGGATC	4	4	0.9	55 91.9
24	GFP1	ATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCTGTGCCCCAGGATGTTGCCG	4	4	-1.0	50 89.8
25	GFP2	TTGAAGAAGATGGTGCCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCG	4	3	-2.0	56.7 92.6
26	JEV1	GACCTCAGTGTGGTGTGAACAAGCCCGTGGGAAGATATCGCTCAGCCCTAAACGCCTA	6	3	-0.6	55 91.9
27	JEV2	CCATCGTGCAGGGTGACCGTCAGGAGAACAGTCCAGAACGTTACACCCCAACATGT	6	3	-0.6	56.7 92.6
28	INF1	GCACTCATATTGAGAGGGTCAGTTGCTCACAATCTTGTCTGCCCGCTGT	3	4	-0.6	51 88.8
29	INF2	AAATGGCAAGCAGGGTCTATGGGATTCCTTCGTCAGTCCGAGAGAGGC	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

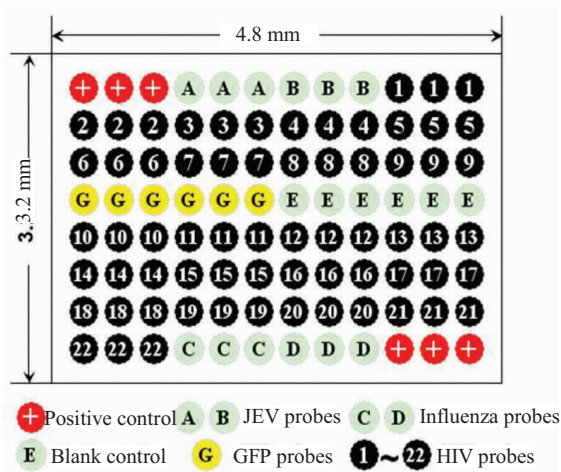


图 1 探针阵列示意图

Fig.1 Format design of HIV oligonucleotide microarray

JEV: Japanese Encephalitis Virus; GFP: Green fluorescent protein

典型性序列为模板，同时可检测其它亚型的 HIV 芯片。



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

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

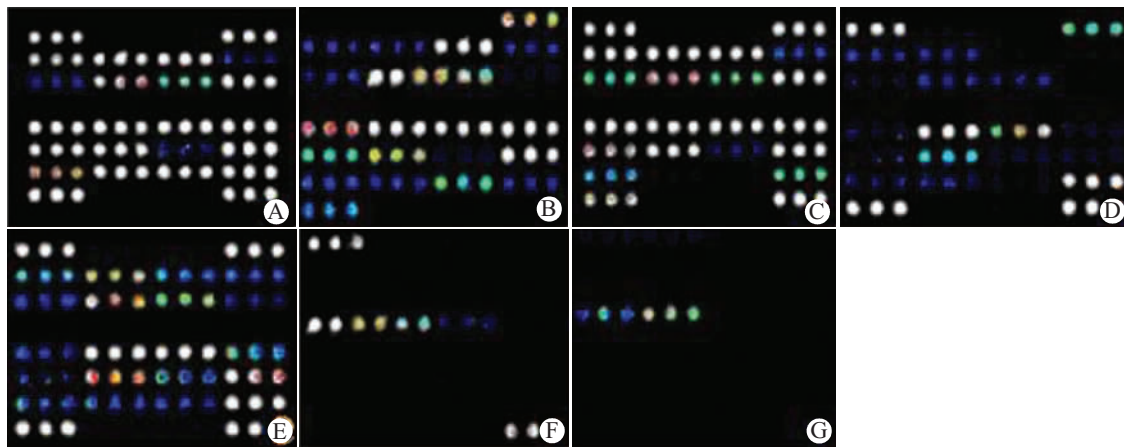


图3 芯片杂交扫描结果

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

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 U_2N_2 作为 cDNA 合成第 1 链的引物,第 1 轮 PCR 时,又以 U_2N_2 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 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.