

应用 PCR 快速制备乙型 尧 型肝炎病毒诊断基因芯片探针

孙朝晖^{1,2}袁文岭¹袁向明²袁宝²袁梁²袁晓冬²袁石嵘²袁文丽² 渊广州军区广州总医院肿瘤分子生物学研究所 袁 东 广州 510010 曰第一军医大学分子生物学研究所 袁 东 广州 510515 冤

摘要目的 应用 PCR 技术扩增乙型 尧 型肝炎病毒保守区域基因片段 袁 进行克隆 尧 测序分析 袁 制备联合诊断乙型 尧 型肝炎病毒基因芯片探针遥方法 利用 Oligo6.4 软件分别针对乙型 尧 型肝炎病毒基因保守区域设计 PCR 引物 袁 纯化 PCR 扩增产物 袁 扩增后的产物克隆至 pMD18-T 载体并进行快速鉴定 袁 提取阳性克隆质粒进行测序分析及鉴定遥结果 获得多个乙型 尧 型肝炎特异性基因片段 遥 序列分析表明 袁 新扩增的片段均属于乙型 尧 型肝炎病毒特异基因遥结论 利用 PCR 扩增产物制备基因芯片探针是一种快速 尧 简便的实用方法遥

关键词 肝炎病毒, 乙型肝炎病毒, 丁型 聚合酶链反应 曰 基因芯片 曰 分子探针技术

中图分类号 袁 394.2 文献标识码 袁 文章编号 袁 000-2588 渊2003 冤 7-0677-03

Rapid preparation of DNA microarray using PCR for hepatitis B and D virus detection

SUNZhao-hui^{1,2}, ZHENG Wen-ling¹, MAOXiang-ming², ZHANGBa², L 袁 Liang², MAXiao-dong², SHIRong², MAWen-li²

¹InstituteofMolecularOncology,GuangzhouGeneralHospitalofGuangzhouCommand,Guangzhou510010, China;

²InstituteofMolecularBiology,FirstMilitaryMedicalUniversity,Guangzhou510515,China

Abstract: Objective ToprepareDNAmicroarrayfordetectingbothhepatitisBandDvirusas(HBVandHDV). Methods WiththeassistanceofOligo6.4software, specific PCRprimerstargetingthe conserved region ofHBVandHDVweredesigned.ThePCRproductswerepurifiedandclonedintothepMD18-Tvectors,followedbyrapididentification.Therecombinantplasmidswerethenextractedfrompositiveclonesandthetargetgenefragmentsunderwentsequenceanalysis. Results ThegenefragmentsofHBVandHDVwereobtainedbyPCR,whichwereconfirmedbysequenceanalysistobespecificgenefragmentsofHBVandHDV. Conclusion UsingPCRamplificationproductstopreparetheDNAmicroarrayisquick,simple andeffective.

Key words: hepatitisBvirus;hepatitisDvirus;polymerasechainreaction;DNAmicroarray;molecularprobetechiques

在尚无特效抗肝炎药的情况下 袁 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遥 DNA 基因芯片技术为肝炎病毒诊断提供了一种快速 尧 高效 尧 敏感 尧 经济 尧 自动化的方法 袁 与传统基因诊断技术相比 袁 DNA 芯片技术具有明显的优势遥 袁 其突出特点是集成化 尧 微型化 尧 自动化遥 我们应用 PCR 快速制备乙型肝炎病毒 渊BV 冤 和丁型肝炎病毒 渊DV 冤 诊断基因芯片探针 袁 探索此方法制备基因芯片探针的可行性遥

1 材料和方法

收稿日期 袁 002-12-09

基金项目 袁 国家自然科学基金 渊9880032 冤 曰 广州市重点科技攻关项目 渊99-Z-022-01 冤

SupportedbyNationalNaturalScienceFoundationofChina (39880032) and by Key Sci-tech Research Project of Guangzhou Municipality (99-Z-022-01)

作者简介 袁 孙朝晖 渊970 冤 袁 男 袁 上海人 袁 1992 年毕业于第三军医大学 袁 主管技师 袁 现为第一军医大学在读硕士研究生

通讯作者 袁 袁文丽 袁 电话 袁 20-61648210 袁 e-mail:Wenli@fimmu.edu.cn

1.1 材料

探针模板 袁 BV 直接来自临床确诊乙型肝炎患者 DNA 阳性血清 袁 实验室检查 袁 肝病病毒血清标志物 HBsAg/HBcAg 尧 抗 HBc 阳性 袁 肝功能异常 袁 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 曰 受体菌 XL-1 由本室保存 袁 pMD18-T Vector 尧 CR 试剂 尧 NTP 尧 coR 玉购自大连宝生物公司 曰 质粒抽提试剂盒购自上海博彩生物公司 曰 HBV 尧 HDV PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成遥

1.2 方法

1.2.1 HBVDNA 提取 HBVDNA 阳性血清 100 滋 袁 加入 100 滋 DNA 裂解液 渊5mmol/L 醋酸胺 尧 5mmol/L EDTA 尧 1% SDS 尧 1mg/ml 蛋白酶 袁 8 益 消化 2 h 后常规苯酚和氯仿抽提遥

1.2.2 HDV 质粒的 EcoR 玉酶切初步鉴定 0.2~0.5 滋 质粒于 20 滋 酶切反应体系中 袁 7 益 水浴 4~5 h 遥 取 6 滋 酶切产物电泳遥

1.2.3 引物设计 针对 HBV 尧 HDV 保守区域分别设计 10 对 尧 对引物 袁 渊表 1 冤

表 1 PCR 合成引物序列表

Tab.1 Sequences of the synthesized primers for PCR

Virus	Primers(5' 3')	Lengthofthe fragments(bp)
HBV	P1:ACTCGTGGTGGACTTCTCTC	414
	P2:GAACCACTGAACAAATGGCA	
	P3:CATCTTCTTGTGGTCTTCTG	373
	P4:TTAGGGTTCAAATGTATACCC	
	P5:CTGTGAGGAGTTGGGGAGGAGATT	610
	P6:GGCGAGGGAGTTCTTCTTCTAGGGG	
	P7:GGGTCACCATATTCTTGG	260
	P8:CCCTGAGCCTGAGGGCTCCACC	
	P9:CTCCAGTTTCAGGAACAGTAAACCC	726
	P10:ATAACTGAAAGCCAAACAGTGGG	
	P11:ATTCCTATGGGAGTGGCCCTCAG	716
	P12:GCAGCACAGCCTAGCAGCCATGG	
	P13:CCATACTGCGGAAGCTCCTAGC	735
	P14:CAATGCTCAGGAGACTCTAAGGC	
	P15:GGAGCTACTGTGGAGTTACTCTC	431
	P16:CTTCGTCTGCGAGGCGAGGG	
	P17:GGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACT	628
	P18:TTGGGATTGAAGTCCCAATCTGG	
	P19:GGGGTGGAGCCCTCAGGCTCAGG	300
	P20:CTGTAAACACGAGAAGGGTCTAG	
HDV	P1:GGAGACCGAAGCGAGGAGAAAGCA	468
	P2:CGACCTGGGCATCCGAAGGAGGACG	
	P3:CTGCAGGGTCCGCGTTCCATCCTT	266
	P4:CCAGTGAATAAAGCGGGTTTC	
	P5:CGACCCGAAGAGAAAGAAGGACGC	255
	P6:GGTGTGAACCCCTCGAAGGTGG	
	P7:CTTCGTGGTGATCCTGCCTCT	333
	P8:CCAGCAGTCTCCTTTACAGA	

1.2.4 PCR 扩增 HBV 酶 4 益尧 min 尧 4 益尧 5 s 袁 5 益尧 5 s 尧 2 益尧 5 s 袁 0 个循环 袁 2 益尧 min 曰 HDV 酶 4 益尧 5 min 袁 4 益尧 5 s 袁 0 益尧 5 s 袁 2 益尧 0 s 袁 0 个循环 袁 72 益尧 min 遥

1.2.5 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 观察结果 遥

1.2.6 纯化 PCR 产物 按照纯化试剂盒操作说明书操作 遥 部分纯化后 PCR 产物放 -20 益留作探针待用 遥

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 袁 6 益尧 h 遥 转化 XL-1 细菌袁 平板克隆 遥 用 pMD18-T 载体引物 渊物 A 院 5'-CTA AAACGACGGCCAGT-3' 曰 引物 B 院 5'-CAGGAAACA GCTATGAC-3' 冤 初步鉴定后 袁 对 所有 14 个克隆测序 遥

1.2.8 Blast 检索分析 对测序结果进行同源性比较 遥

2 结果

2.1 HDVcDNA 质粒 pCDNA3.1(+) 的酶切

根据限制酶 EcoR 玉酶切位点 袁 质粒消化后被切

成两个片段 渊图 1 冤 袁 其中小片段为 645bp 袁 大片段为 6300bp 袁 与理论预期值一致 遥

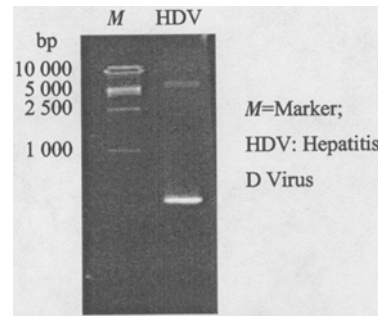


图 1 HDV 质粒 cDNA 限制性内切酶酶切结果
Fig.1 Restriction enzyme analysis of plasmid cDNA from HDV on 1.5% agarose gel

2.2 PCR 产物反应结果

PCR 扩增 HBV 得到 10 个片段 袁 1.5% 琼脂糖凝胶电泳可得清晰的电泳图 渊图 2 冤 袁 片段大小与理论预期值一致 遥

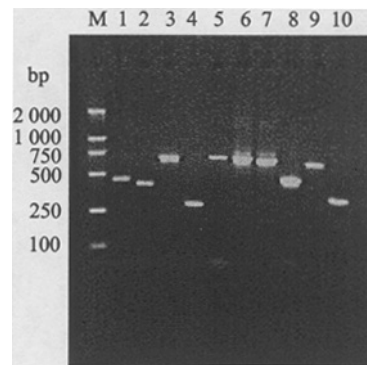


图 2 HBVPCR 产物片段 渊 10 条 冤 琼脂糖电泳图
Fig.2 Agarose gel electrophoresis of 10 fragments of HBV PCR products by different primer combinations

PCR 扩增 HDV 得到 4 个片段 袁 1.5% 琼脂糖凝胶电泳可得清晰的电泳图 渊图 3 冤 袁 片段大小与理论预期一致 遥

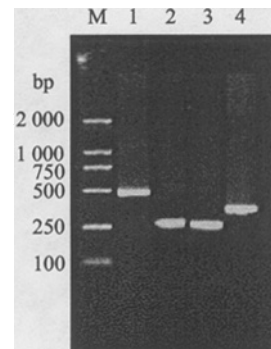


图 3 HDVPCR 产物片段 渊 4 条 冤 琼脂糖电泳图
Fig.3 Agarose gel eletrophoresis of 4 fragments of HDV PCR products by different primer combinations

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... 自动测序仪对所有 14 个克隆片段进行序列测定... 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... 全球 HBsAg 总携带率的近 50%... 约 158/10 万... 慢性乙型肝炎的病人... 此外... 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... 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... 导致肝炎的重型化和慢性化

目前临床上诊断乙型 尧 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... LISA... 及分子生物学方法等... LISA 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... 定量和定量检测... 常规核酸杂交虽有一定的特异性... 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... 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... 分子克隆结合 PCR 扩增基因片段... 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... 利用 Oligo6.4 软件分别针对乙

型 尧 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... 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... 2kb... 和丁型肝炎病毒... 7kb... 利用此方法制备探针不失为一种快速... 简单... 低成本的实际方法... 有较大的应用价值

参考文献

马文丽, 郑文岭. DNA 微集阵列技术的研究进展... 中国科学基金, 1999, 13(5):270-3.
MaWL, ZhengWL. ThereseearchanddevelopmentofDNAmicroarraytechnology... ChinSciFound, 1999, 13(5):270-3.
李 凌, 马文丽. DNA 芯片技术研究进展... 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16(2):151-5.
LiL, MaWL. ThereseearchanddevelopmentofDNAgenechiptechnology... ChinJBiochemMolBiol, 2000, 16(2):151-5.
PetrikJ. Microarraytechnology: thefutureofbloodtesting... Vox Sang, 2001, 80(1):1-11.
金 奇. 医学分子病毒学... 北京: 科学出版社, 2001. 325.
PorresJC, CarrenoV, BartolomeJ, et al. Treatmentofchronicdelta infectionwithrecombinanthumaninterferonalphal2cathighdoses... Hepatol, 1989, 9(3):338-44.
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... 第一军医大学学报, 2002, 22(6):548-53.
MaoXM, MaWL, JiangL, et al. Applicationofrestrictiondisplay PCRinpreparingtheprobefsofthegenechippforinvestigatinggene expressionprofileofK562cells... FirstMilMedUniv/DiYiJun YiDaXueXueBao, 2002, 22(6):548-53.
冯春琼, 马文丽, 李 凌, 等. As2O3 处理前后 K562 细胞基因表达变化的基因芯片检测... 第一军医大学学报, 2002, 22(9):772-5.
FengCQ, MaWL, LiL, et al. AnalysiswithDNAchipssofthechanges of geneexpressionsinK562cellsinresponsetoAs2O3 treatment... FirstMilMedUniv/DiYiJunYiDaXueXueBao, 2002, 22(9): 772-5.
李 凌, 马文丽, 祝 骥, 等. 用 RD-PCR 技术制备 HIV 基因芯片探针... 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18(1):105-9.
LiL, MaWL, ZhuJ, et al. PreparationofHIVgenechippbesby RD-PCRtechnology... Chin J BiochemMolBiol, 2002, 18(1): 105-9.

责任编辑 黄开颜