

基因芯片技术检测丁型肝炎病毒的研究

孙朝晖¹ 袁文岭¹ 张宝² 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 广东 广州 510010
² 第一军医大学分子生物学研究所 广东 广州 510515 冤

摘要 目的 制备检测丁型肝炎病毒(HDV) 基因芯片遥方法 针对 HDV 基因保守区域设计多对 PCR 引物遥用芯片点样仪将 PCR 产物点到玻片上制成基因芯片遥样品标记采用限制性显示技术袁样品标记后进行杂交遥结果 运用 PCR 技术得到多个 HDV 特异性基因片段袁序列分析表明新扩增的片段均属于 HDV 特异基因遥杂交结果显示袁样品和 HDV 诊断基因芯片杂交的敏感性和特异性均佳遥结论 用基因芯片检测 HDV 具有敏感尧高效尧检测结果可靠的优点袁有着较大的应用前景遥

关键词 肝炎病毒 丁型 分子探针 基因芯片 杂交

中图分类号 院 394.2 文献标识码 院 文章编号 院 000-2588(2004)01-0044-03

Preparation of the microarray for detecting hepatitis D virus

SUN Zhao-hui¹, ZHENG Wen-ling¹, ZHANG Bao², SHI Rong², MA Wen-li²

¹Institute of Molecular Oncology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China;

²Institute of Molecular Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To prepare the microarray for detection of hepatitis D virus (HDV). Method Several pairs of specific PCR primers were designed according to the conserved region of HDV genome. The DNA microarray were prepared by blotting the PCR products onto the surface of glass slides with the use of robotics, and restriction display PCR (RD-PCR) was employed to label the samples. Result Sequences analysis showed that the products of PCR amplification were the specific gene fragments of HDV. Hybridization signals on the gene chip demonstrated good specificity and sensitivity of the microarray for HDV detection. Conclusion Microarray-based clinical HDV detection can be sensitive and effective.

Key word: hepatitis D virus; gene probe; microarray; hybridization

当今全世界已经有超过 5 亿人感染了病毒性肝炎,慢性病毒性肝炎发病率和死亡率均较高,肝炎的诊断尧治疗和预防越来越引起人们的关注遥丁型肝炎病毒(HDV)是一种相对分子质量很小的缺陷性嗜肝 RNA 病毒,必须依附乙肝病毒(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遥在过去的 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遥微集排列是近年出现的 DNA 分析技术袁与传统基因诊断技术相比,基因芯片技术具有明显的优势遥我们利用 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

基因芯片的可行性遥

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 5'-pGATCmCAC ACC AGC CAA ACC CA 及 3'-GGT TTT GCT GGT GTG,采用 Oligo6.0 软件设计,通过 Gibco 公司合成,尧化及 5' 端磷酸化,有 Cy5 标记 RD-PCR 通用引物 5'-GTT TGG CTG GTG TGG ATC 购自 Gibco 公司,ixsys5500 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,MD18-T 载体尧CR 试剂尧NTP尧coR 玉尧au3A 玉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尧562 细胞尧肠杆菌由本室保存遥

1.2 方法

1.2.1 HDV 质粒 EcoR 玉酶切初步鉴定 0.2~0.5 滋的质粒溶于 20 滋酶切反应体系中,7 益水浴 4~5 h,遥取 6 滋酶切产物电泳遥

收稿日期 院 003-06-19

基金项目 院 国家自然科学基金 9880032 冤 广州市重大科技攻关项目 99-Z-022-01 冤

Supported by National Natural Science Foundation of China 9880032 冤 and by Key Sci-tech Research Project of Guangzhou Municipality (99-Z-022-01)

作者简介 孙朝晖 渊970-冤男,袁992 年毕业于第三军医大学,袁博士,研究生袁主治医师,袁研究方向 院 DNA 芯片技术及应用研究,袁电话 院 020-61640114-89097

通讯作者 袁文丽,电话 院 020-61648210,袁-mail: wenli@fimmu.com

Corresponding author: MA Wen-li, Tel: 020-61648210, E-mail: wenli@fimmu.com

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 扩增 94 益 5 min 表 4 益 45 s 表 50 益 45 s 表 2 益 60 s 表 0 个循环 曰 2 益 5 min 遥 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 益 留做探针待用 遥

表 1 实验中 PCR 合成引物列表
Tab.1 Sequences of the synthesized primers used in this study

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

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 表 6 益 2 h 遥 转化 XL-1 细菌 平板克隆 通用 pMD18-T 载体引物 引物 A 5'-CTAAAACGACGGCCAGT-3', 引物 B 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' 遥 初步鉴定后测序 通用 ABI PRISMTM310 自动测序仪对克隆进行序列分析 表 经 Blast 检索与 GenBank 数据库进行同源性比较分析 遥

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/滋 遥 以水稻基因 尧 562 细胞 尧 大肠杆菌为阴性对照 袁 0% DMSO 为空白对照 袁 用 Pixsys5500 芯片打印仪在 Corning 玻片上打印阵列为 7伊2 的点阵 袁 从上至下 袁 从左到右分别是 阴 性 尧 562 细胞 尧 大肠杆菌 尧 水稻基因 尧 空白 尧 0% DMSO 尧 阳性对照 曰 再接着是 HDV 基因片段共计 4 个片段 袁 每个探针打印 12 个点 遥 打印后的玻片经紫外线交联仪 渊 能量为 90 mA 袁 表 0 益 干烤 2 h 遥 避光放置备用 遥

1.2.5 样品标记 HDV 质粒用 Sau3A 玉酶切后接上接头 袁 之后用 Cy5 标记的通用引物 U 扩增 袁 0 滋 体系 袁 72 益 10 min 袁 表 4 益 30 s 袁 表 0 益 30 s 袁 表 2 益 60 s 袁 表 0 个循环 曰 2 益 5 min 遥 纯化 PCR 产物 袁 表 20 益 保存备用 遥

1.2.6 杂交 在暗室条件下 袁 标记后的样品 95 益 变性后 加到经预杂交的芯片阵列表面 袁 轻轻覆上盖玻片 袁 放入杂交盒内 袁 表 2 益 杂交 10 h 遥 杂交完毕 袁 表 0 益 0.1% 佛 SC 洗涤 10 min 袁 表 蒸水冲洗干净 袁 避光晾干 遥

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

2 结果

2.1 HDV cDNA 质粒 pCDNA3.1(+) 的初步酶切鉴定

根据限制酶 EcoR 玉酶切位点表 质粒消化后被切成 2 个片段 袁 其中小片段为 645 bp 袁 大片段为约为 6 300 bp 袁 与理论预期一致 遥

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 袁 在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 袁 可得清晰的电泳图 袁 片段大小与理论预期一致 遥 图 1 遥

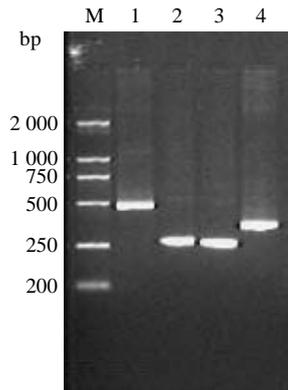


图 1 HDV PCR 产物片段琼脂糖电泳图
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of the PCR products of 4 fragments by different primer combinations

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 遥 通用 ABI PRISMTM310 自动测序仪对所有 4 个克隆片段进行序列测定 袁 然后与 GenBank 进行 BLAST 比较 袁 结果表明克隆基因均属于 HDV 基因 袁 与理论一致 遥 图 2 为其中一个片段的测序图 遥

2.4 基因芯片杂交信号扫描结果

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

3 讨论

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

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 遥 传染途径主要有两方面 1) 经血或血制品 袁 为主要传播途径 曰 2) 日常生活密切接触 袁 隐性经皮肤或粘膜暴露于含有 HDV 的体液传播 遥 开

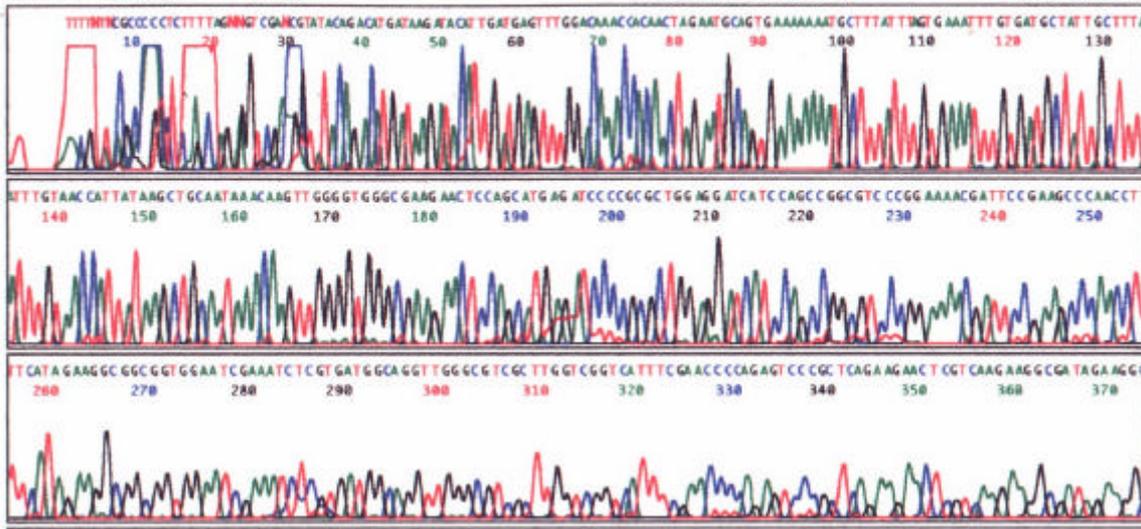


图 2 HDV 其中一个片段克隆测序图

Fig.2 Sequence analysis of one of the DNA fragments from HDV

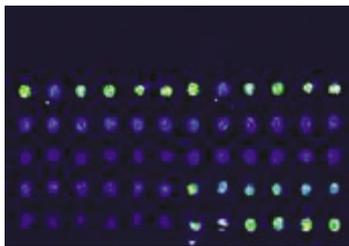


图 3 HDV 基因芯片杂交信号扫描结果

Fig.3 Scanning plots of the hybridization signals on HDV microarray

急性伤口、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。随之血清抗-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，还可利用 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、高效的方法。基因芯片技术在病毒性肝炎诊断上的长远价值在于能够对多种肝炎病毒的各亚型、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。据文报道，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。

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。大大提高了在模糊结果判断过程中的主观因素。在进行引物设计时，我们针对 HDV 保守区域，并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，我们还注意使 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。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。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。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

咱哲 Lok AS, Heathcote FJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000-summary of a workshop.咱哲 Gastroenterology, 2001, 120(21): 1828-53.

咱哲 孙朝晖, 马文丽, 郑文岭. 基因芯片技术诊断病毒性乙型肝炎病毒.咱哲解放军医学杂志, 2003, 28(4): 375-6.

Sun ZH, Ma WL, Zheng WL. Microarrays development in the diagnosis of HBV and HCV.咱哲 Med J Chin PLA, 2003, 28(4): 375-6.

现象,同时也不利于发挥芯片的优势。

总之,基因芯片用于诊断还处于研究起步,需要
将探针和杂交条件进一步优化,降低非特异性杂交
和提高灵敏度,最大限度的发挥芯片的优势,因而将
芯片用于临床诊断,尤其是在传染病的诊断方面将具
有广阔的应用前景。

参考文献

- 咱暂 马文丽,郑文岭,李 凌,等. DNA 芯片技术的方法与应用咱暂广州: 广东科技出版社,2002. 11-6.
- 咱暂 郑文岭,马文丽, Cater VW. 肿瘤细胞多聚腺苷聚合酶 mRNA 的差异表达显示咱暂见: 叶鑫生,沈倍奋,主编. 细胞调控探索咱暂北京: 军事医学科学出版社,1998. 73-9.
- 咱暂 马晓冬,马文丽,吕 梁,等. 炭疽杆菌保护性抗原基因芯片探针的制备咱暂第一军医大学学报,2003,23(8): 816-9.
- Ma XD, Ma WL, Lü L, et al. Preparation of gene chip probes for Bacillus anthracis protective antigen咱暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(8): 816-9.
- 咱暂 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咱暂第一军医大学学报,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咱暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(6): 548-53.
- 咱暂 Li J, Chen S, Evans DH. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR咱暂 J Clin Microbiol, 2001, 39(2): 696-704.
- 咱暂 Farbrother P, Muller S, Noegel A, et al. Comparison of probe prepa-

ration methods for DNA microarrays咱暂 Biotechniques, 2002, 33 (10): 884-8.

- 咱暂 Hegde PR, Qi K, Abernathy C, et al. A concise guide to cDNA microarray analysis咱暂 Biotechniques, 2000, 29(3): 548-62.
- 咱暂 董兴齐,叶 枫,彭何碧,等. 云南省鼠疫菌质粒特征及地理分布咱暂中华流行病学杂志,2001,22(10): 344-7.
- Dong XQ, Ye F, Peng HB, et al. Geographic distribution and feature of Yersinia pestis plasmid isolated from Yunnan province咱暂 Chin J Epide Moil, 2001, 22(10): 344-7.
- 咱暂 J 萨姆布鲁克, EF 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南咱暂第 2 版. 北京: 科学出版社,1998. 463-8.
- 咱暂李 凌,马文丽,毛向明,等. HIV 基因芯片的初步研究咱暂第一军医大学学报,2002,22(8): 724-7.
- Li L, Ma WL, Mao XM, et al. Preliminary study of development of gene chips for HIV diagnosis咱暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(8): 724-7.
- 咱暂李 侠,马文丽,庞 义,等. 限制性显示 - 聚合酶链反应扩增苏云金杆菌基因片段的克隆与分析咱暂第一军医大学学报,2003,23 (4): 323-5.
- Li X, Ma WL, Pang Y, et al. Cloning and sequence analysis of Bacillus thuringiensis gene fragments isolated by restriction digest PCR咱暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(4): 323-5.
- 咱暂孙朝晖,郑文岭,毛向明,等. 应用 PCR 快速制备乙型肝炎病毒诊断基因芯片探针咱暂第一军医大学学报,2003,23(7): 677-9.
- Sun ZH, Zheng WL, Mao XM, et al. Rapid preparation of DNA microarray using PCR hepatitis B and D virus detection咱暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003,23(7):677-9.
- 显示技术咱暂见: 孙志贤. 全军生物化学与分子生物学研究进展咱暂北京: 军事医学科学出版社,1998. 99-113.
- 咱暂 郑文岭,马文丽, Cater VW. 肿瘤细胞多聚腺苷聚合酶 mRNA 的差异表达显示咱暂见: 叶鑫生,沈倍奋. 细胞调控探索咱暂北京: 军事医学科学出版社,1998. 73-9.
- 咱暂李 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咱暂第一军医大学学报,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咱暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(11): 815-8.
- 咱暂毛向明,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咱暂第一军医大学学报,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咱暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(6): 548-53.
- 咱暂马春琼,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咱暂第一军医大学学报,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 As₂O₃ treatment咱暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(9): 772-4.

链接 46 页冤

- 咱暂 金 奇. 医学分子病毒学咱暂北京: 科学出版社,2001. 325.
- 咱暂 陈宪锐. 丁型肝炎病毒感染的血清学研究咱暂中国公共卫生,1994, 10(6): 282-3.
- Chen XR. The Seroepidemiological research of hepatitis delta virus infection咱暂 Chin J Public Health, 1994, 10(6): 282-3.
- 咱暂 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咱暂中华流行病学杂志,1990,11(4): 202-4.
- Zhao X, Geng GY, Zhao HY, et al. The seroepidemiological observation on hepatitis delta virus infection咱暂 Chin J Epidmiol, 1990, 11(4): 202-4.
- 咱暂 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咱暂广东医学,2003,24(4): 440-2.
- Sun ZH, Zheng WL, Ma WL. The development of molecular diagnosis of viral hepatitis咱暂 Guangdong Med J, 2003, 24(4): 440-2.
- 咱暂 孙朝晖,郑文岭,毛向明,等. 应用 PCR 快速制备乙型肝炎病毒诊断基因芯片探针咱暂第一军医大学学报,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咱暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003,23(7):677-9.
- 咱暂 马文丽,郑文岭,James FB. 限制性显示 D-PCR 冤一种新的差异