

鸡呼吸道传染病基因芯片诊断方法的建立

陈凤梅^{2,3}, 吴时友^{1*}, 尹燕博¹, 牛钟相^{2*}

(1. 山东澳兰生物工程研究院, 青岛 266515; 2. 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018;
3. 山东畜牧兽医职业学院, 潍坊 261061)

关键词: 基因芯片; 生物素; 新城疫; 禽流感; 传染性支气管炎; 传染性喉气管炎; 鸡毒支原体
中图分类号: S854.4 文献标识码: A 文章编号: 0366-6964(2005)12-1358-05

随着养禽业集约化程度的不断提高, 鸡呼吸系统疾病的发生呈逐年上升趋势。而且大多数的呼吸道疾病不是单一病原感染, 而是多种病原混合感染, 从临床上难以及时鉴别诊断, 延误防治时机, 从而给养禽业造成巨大的经济损失。因此, 禽呼吸道疾病已经成为生产和研究中的一类重要疾病^[1]。目前, 禽呼吸系统疾病的诊断方法主要有病毒分离、血凝(HA)、血凝抑制(HI)、琼脂扩散、ELISA、PCR等, 但是传统的检测方法灵敏度较低, 而且当病原发生变异或感染禽处在潜伏期时会造成误诊。PCR方法每次只能检测一种病毒, 费时费力。采用基因芯片的方法可以快速、准确地同步检测多种病原体, 且需要样品量少、灵敏、特异、快速、费用低廉, 将生物芯片技术用于禽呼吸道疾病诊断意义重大。

本研究制备了可同时检测新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)、禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)、传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus, IBV)、传染性喉气管炎病毒(Infectious laryngotracheitis virus, ILTV)和鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*, MG)5种病原的基因芯片, 一次试验即可对禽常见呼吸道疾病进行准确、快速特异的检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶购自上海生工; PCR产物纯化试剂盒购自 *v-gene* 生物科技有限公司; M-MLV、dNTP 购自 Promega 公司; RNA-

sin-pMD18-T Vector 购自大连宝生物工程有限公司; 鲑鱼精 DNA 购自 Sigma 公司。

1.1.2 种毒 NDV 弱毒株 LaSota 株购自中国兽医药品监察所; AIV, A/Duck/Hong Kong/610/79 (H9N2), IBV H₁₂₀, ILTV 中国王岗株, 山东澳兰生物工程研究院保存。IC A 型, *E. coli* O₁、O₂、O₇₈, 山东农业大学动物科技学院微生物实验室保存, 鸡毒支原体 PG31 株购于中国兽医药品监察所。

1.2 芯片设计方案

通过分子克隆操作, 获得 NDV、AIV、IBV、ILT、MG 各一段特异性核苷酸序列, 用芯片点样仪点样, 同时点上用于系统监控的参照基因, 制备成“禽呼吸道疾病诊断基因芯片”。监控系统由以下3个部分组成^[2], (1) 空白点: 是不含任何基因片段的空白样液, 作为芯片制备过程中的污染监控指标; (2) 阴性参照: 是一段与靶基因没有同源性的猪血红蛋白珠蛋白基因片段, 作为杂交过程中非特异性杂交的监控指标; (3) 阳性参照: 鸡的血红蛋白中珠蛋白基因片段监视标记和杂交、显色系统是否有效。

1.3 5种病原克隆的构建

从 GenBank 中选择 NDV F 蛋白、AIV M 蛋白、IBV S 蛋白、ILTV TK 片段和 MG 脂蛋白基因序列, 通过 Blast 得到其保守序列, 根据所需要克隆的基因片段, 利用软件 Oligo6.0 设计引物(见表1)。提取5种病原的核酸, 经 PCR 扩增纯化, 将纯化产物与 pMD18-T 载体连接, 转化 JM109 感受态细胞, 筛选阳性克隆, 阳性克隆通过 PCR、测序进行鉴定。

1.4 基因芯片的制备

分别提取上述5种病原的重组质粒, 用特异性引物分别对这5种病原的重组克隆质粒进行 PCR 扩增。为排除载体序列对体系的干扰, PCR 产物需

收稿日期: 2004-11-23

基金项目: 青岛市科技攻关资助项目(02-1-kj-nr-41)

作者简介: 陈凤梅(1979-), 女, 山东泰安人, 硕士, 主要从事动物微生物与免疫学的教学科研工作

* 通讯作者: 吴时友、牛钟相, Email: zxniu@sdau.edu.cn

经切胶回收, 纯化, 然后将纯化产物定量, 以 100 ng/ μ L 的浓度按图 1 进行点样, 芯片点样完毕, 编号, 经 80 $^{\circ}$ C 烤膜 2 h, 完成基因芯片的制备。

表 1 DNA 阵列引物序列
Table 1 DNA Microarray primer sequence

病原 Phage	位置 Location	引物序列 Primer sequence	片段长度 Product/bp
NDV	1 000~ 1 621	5'-CTT GAC ACC TCA TAC TGT AT-3' 5'-CCC AAG CCA TAA TAA GGT CTT-3'	622
AIV	310~ 769	5'-CTG GTG CAC TTG CCA GTT G-3' 5'-GAT CAA GAA TCC ACA ATA TC-3'	460
IBV	1 053~ 1 654	5'-CAT AAC TAA CAT AAG GGC AA-3' 5'-TGG TCC TCT TCA AGG TG-3'	602
ILT	109~ 751	5'-ACG ATG ACT CCG ACT TTC-3' 5'-CGT TGG AGG TAG GTG GTA-3'	643
MG	162 079~ 162 810	5'-GGA TCC CAT CTC GAC CAG GAG AAAA-3' 5'-CTT TCA ATC AGT GAG TAA CTG ATGA-3'	732
GLOB.	122~ 569	5'-CCA AAG GAG ATT GCG AGA CAT-3' 5'-ACC AGC GGC CAT CTA CAC TTG-3'	448

阳性参照	NDV	AIV	IBV
阳性参照	NDV	AIV	IBV
阴性参照	ILTV	空白对照	MG
阴性参照	ILTV	空白对照	MG

图 1 鸡呼吸道传染病基因芯片点阵示意
Fig. 1 Design of DNA microarray for poultry respiratory tract diseases

1.5 检测样品的制备和标记

1.5.1 核酸的提取 取待检样品 400 μ L, 加入 600 μ L Trizol 裂解液, 振荡混匀, 冰上静置 5 min, 加入 450 μ L 氯仿振荡混匀, -20 $^{\circ}$ C 沉淀 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min。取上清 600 μ L, 加入 800 μ L 的异丙醇沉淀 1 h。75% 乙醇洗涤, 弃上清, 沉淀自然干燥。

1.5.2 RT-PCR 用混合引物对所提取的样品 RNA 进行扩增, 42 $^{\circ}$ C 反转录 1 h。

1.5.3 生物素标记 取反转录产物 2 μ L, 用检测引物进行 PCR 扩增, 掺入法标记核酸。反应体系: 反应体积 30 μ L, 每种引物浓度 50 pmol, 4 \times dNTP 2.5 mmol, biotin-dUTP, Mg²⁺ 25 mmol, Taq 酶 2.5 U。反应条件: 94.5 $^{\circ}$ C 2 min, 94.5 $^{\circ}$ C 30 s, 55

$^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 9 min。阳性对照和阴性对照同样用生物素标记。

1.6 标记样品与芯片的杂交

取 450 μ L 预杂交液加入芯片槽内, 42 $^{\circ}$ C 预杂交 40 min; 取 20 μ L PCR 产物于 1.5 mL 的离心管内, 100 $^{\circ}$ C 变性 10 min, -20 $^{\circ}$ C 冷却 5 min, 加入杂交液 450 μ L, 振荡离心, 然后将含有 PCR 产物的杂交液加入杂交槽内, 42 $^{\circ}$ C 杂交 1 h; 分别用 2 \times SSC, 0.1 \times SDS 和 0.1 \times SSC, 0.1 \times SDS 各洗 3 次; 400 μ L 3% BSA, 42 $^{\circ}$ C 封闭 30 min; 450 μ L 缓冲液中加入 1.6 μ L AV-AP, 42 $^{\circ}$ C 酶联 20 min; 先用洗涤液洗膜 3 次, 然后加入显色液 (450 μ L 底物液 + 1.6 μ L BCIP + 1.6 μ L NBT), 常温或 42 $^{\circ}$ C 显色 3~5 min; 将杂交完毕晾干的 DNA 阵列用芯片扫描仪进行扫描分析, 根据大量样品的分析设置读数 0.1 以下为阴性, 0.2 以上为阳性, 两者之间为可疑。打印诊断报告。

1.7 芯片效能评价

1.7.1 有效性检测 10 份 SPF 鸡阴性样品, 检测阳性参照、阴性参照及空白对照是否正常; 20 份阳性样品, ND、AI、IB、ILT、MG 阳性病料各 4 份, 分别进行杂交, 检测基因芯片相应点杂交是否正常, 其

他位点有无非特异杂交信号;将上述5种病原等比例混合后进行检测,按一定的量加入阳性参照,检验是否所有位点都能检测到信号。在同样条件下,重复3次试验。

1.7.2 敏感性测定 取400 μL NDV 细胞培养液,按1.5.1的方法提取核酸,然后将核酸做10倍梯度稀释至 10^{-12} ,做反转录、扩增、标记各稀释度的模板,然后按1.6和1.7的方法进行杂交和扫描检测,比较PCR扩增电泳结果和芯片杂交的结果(注:本试验只做了NDV敏感性测定,且本次试验芯片上所点病原相应位点均为NDV探针)。

1.7.3 特异性测定(混合引物单一模板) 分别提取NDV、AIV、IBV、ILTV、MG、*E. coli* O₁、O₂、O₇₈混合培养物、鸡副嗜血杆菌IC A型的核酸,然后经PCR或RT-PCR和生物素标记后分别与芯片进行杂交,并扫描检测,检测其特异性。

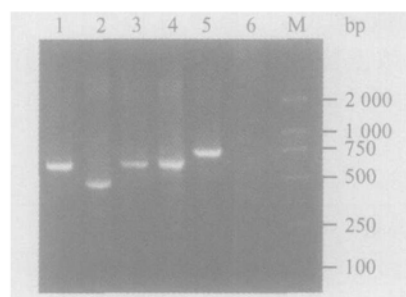
1.7.4 重复性测定 分别取2 mL含有NDV、AIV、IBV、ILTV、MG重组子的大肠杆菌培养液,提取的质粒分别用20 μL 水溶解,各取2 μL 作为PCR反应的模板,每种样品扩增10管,扩增时用混合引物单一模板,均掺入生物素,用50管PCR产物分别作杂交试验,检测其重复性。

2 结果与分析

2.1 阳性克隆鉴定结果

2.1.1 PCR产物电泳鉴定 从图2可以看出,均得到了与目的片段相符的条带。

2.1.2 5种捕获DNA测序结果及分析 将测定序列通过Blast进行序列同源比较,结果表明5种捕获DNA分别与被检病毒的大部分毒株同源性在95%以上,测序及比对结果略。



1. NDV; 2. AIV; 3. IBV; 4. ILTV; 5. MG; 6. Negative control; M. Marker DL2000

图2 各种病原核酸PCR产物鉴定

Fig. 2 PCR identification of five kinds of probe fragments clones

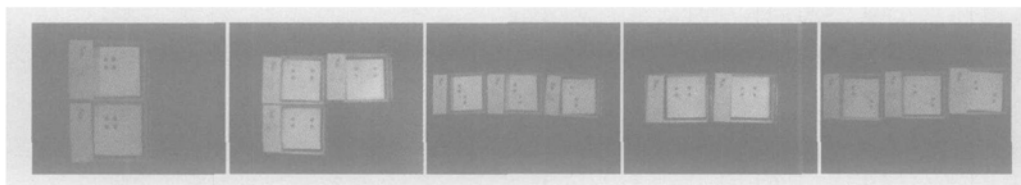
2.2 有效性测定

2.2.1 监控系统 10份阴性样品中,阳性参照有明显的杂交信号,表明试验操作过程中的标记、杂交和显色系统等各个环节正常。阴性参照无信号检出说明杂交过程中无非特异性杂交。空白对照也无杂交信号检出说明芯片制备过程中的无核酸污染。

2.2.2 疾病诊断系统 20份阳性样品中,在相应杂交位点可检测到杂交信号,5种病原等比例混合样品,所有相应位点均可检测到杂交信号。但是杂交位点之间杂交信号稍有差异,估计与手动点样仪用力不等和点样针点样量不均、原始模板的含量的差异引起的PCR扩增效果不同有关。

2.3 芯片效能评价

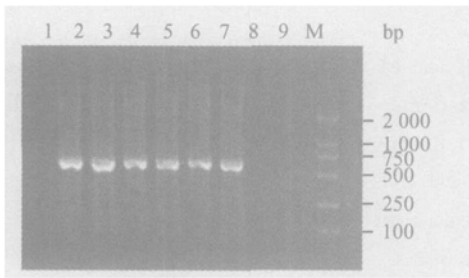
2.3.1 敏感性测定 可检测到的NDV阳性杂交信号的最大稀释度为 10^{-10} ,而凝胶电泳仅能检测到 10^{-6} ,由此得出芯片的灵敏度是PCR的 10^4 倍。结果见图3和4。



编号1~8依次为种毒核酸浓度稀释为原浓度的 10^{-5} ~ 10^{-12} 倍;本次试验芯片上所有病原位点均为NDV探针
1~8 represent 10^{-5} ~ 10^{-12} fold dilutions of NDV nucleotide, and only NDV probe was spotted in microarray

图3 芯片敏感性测定

Fig. 3 Sensitivity detection of DNA microarray



1. Negative control; 2~ 9. $10^{-1} \sim 10^{-8}$ fold dilutions of NDV nucleotide; M. Marker DL2000

图 4 PCR 敏感性测定

Fig. 4 Sensitivity detection of PCR

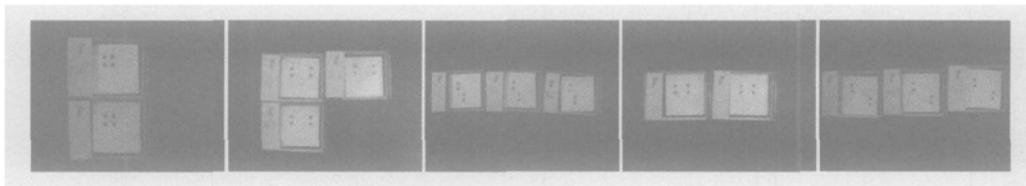
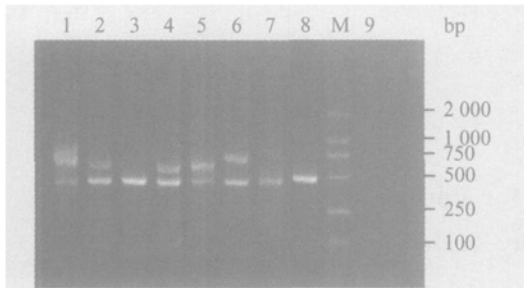


图 5 NDV、AIV、IBV、ILTV、MG 特异性测定

Fig. 5 Specific detection of DNA microarray



1~ 9 全为混合引物, 所加模板如下: 1. NDV、AIV、IBV、ILTV、MG、Glob_c、Glob_s; 2. NDV、Glob_c、Glob_s; 3. AIV、Glob_c、Glob_s; 4. IBV、Glob_c、Glob_s; 5. ILTV、Glob_c、Glob_s; 6. MG、Glob_c、Glob_s; 7. 大肠杆菌 O₁、O₂、O₇₈ 混合模板、Glob_c、Glob_s; 8. 副嗜血杆菌 A 型、Glob_c、Glob_s; 9. 不加模板作为阴性对照

图 6 基因芯片的特异性测定

Fig. 6 Specific detection of DNA microarray

表 2 重复性测定结果

Table 2 The repetitive detection result of DNA microarray

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	阳性率 / % Positive rate
NDV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
AIV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
IBV	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	90
ILT	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	90
MG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100

“+”表示阳性;“-”表示阴性

“+” represent positive;“-” represent negative

2.3.2 特异性测定 对 ND、AI、JB、JLT、MG 以及混合模板的特异性检测结果见图 5、图 6。结果显示, 本研究制备的芯片能特异地检测 ND、AI、IB、ILT、MG 和混合感染, 对照病原体未发生非特异性杂交, 而且 5 种病原之间无交叉反应。

2.3.3 重复性测定 由表 2 重复性测定结果可以看出 IBV 和 ILTV 的重复性在 90%。而其他病原的重复率均为 100%。重复性结果表明, 各位点重复性良好。

3 讨论

本研究设计的 PCR 引物, 一步可扩增出鸡常见呼吸道传染病的相应基因片段, 扩增片段的长度大小差别不大, 这样只需要一步处理和扩增就可用基因芯片诊断 NDV、AIV、IBV、ILTV、MG 及它们的混合感染, 适合基因芯片大规模、高通量、平行化检测的要求。基因芯片探针设计是用计算机软件结合人工比对, 在引物扩增区域内找出可能的探针^[5], 筛选后登陆 GenBank 进行 BLAST 查询, 以找出其中特异性最好的探针, 这样就保证了芯片检测的成功。本研究制备的鸡呼吸道传染病诊断基因芯片未见有非特异性的交叉反应, 并且对几种病原混合感染进行检测, 均显示了较好的特异性和敏感性。试验结果表明, 芯片检测时的灵敏度要比常规 PCR 后琼脂糖凝胶电泳的灵敏度高, 这可能是因为当病原特异性条带过于微弱, 电泳后的结果不清楚甚至无法显示时, 少量的标记生物素的 PCR 产物也能和芯片上的特异性探针杂交并通过显色系统显色, 最后被扫描仪检测出来。

在扩增后的杂交检测中, 应该严格遵守基因芯片操作的杂交程序和杂交条件^[6]。温度太低或离子强度太高都会降低杂交的严格性, 还会给检测信号的特异性带来负面影响。相反, 提高温度和或降低离子强度会增加杂交的严格性。因此, 严格控制温度和试剂的离子强度是避免假阳性和假阴性结果的

先决条件^[4]。需要注意的是;温度和离子强度不能同时改变。杂交温度应控制在 42 ℃,温度过低,会出现非特异杂交点,过高常出现假阴性。样品核酸的标记,掺入的生物素必须达到一定的浓度,以保证杂交点的灵敏度,若浓度不够,杂交结果常出现假阴性^[3]。

病原同步检测技术是临床基因检测的发展趋势,可大大提高检测效率,缩短检测时间^[6]。本试验只是在微生物基因诊断领域的初步尝试,确实体会到基因芯片诊断的诸多优点,但也还存在一些矛盾和缺陷,需要进一步改进,提高检测的特异性和灵敏度。在建立了芯片检测方法以后,芯片灵敏度的定量,保存一段时间后的重复性测定、敏感性测定以及批内、批间、人间、日间的试验数据还需要补充。

注:本研究成果已申请专利,专利号:ZL02155408.0。

参考文献:

- [1] 王红宁.禽呼吸系统疾病[M].中国农业出版社,2002. 12~ 22.
[2] 吴海,顾少华,胡志前,等.检测乙、丙型肝炎病毒基因芯片的制备[J].第二军医大学学报,2001,22(6):

527~ 529.

- [3] Binder M, Tourmente S, Roth J, et al. *In situ* hybridization at the electron microscope level: localization of transcripts on ultra thin sections of Lowicryl K4M-embedded tissues using biotinylated probes and protein A gold complexes[J]. J Cell Biol, 1986, 102: 1 646 ~ 1 653.
[4] Cheng J, Shoffner M A, Hvichia G E, et al. Chip PCR. II. Investigation of different PCR amplification systems in microfabricated silicon-glass chips[J]. Nucleic Acids Res, 1996, 24(2): 380~ 385.
[5] Cheng J, Waters L C, Fortina P, et al. Degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction and capillary electrophoretic analysis of human DNA on microchip based devices[J]. Anal Biochem, 1998, 257 (2): 101~ 106.
[6] Waterham H R, Koster J, Romeijn G J, et al. Mutations in the 3beta-hydroxysterol Delta24 reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis[J]. Am J Hum Genet, 2001, 69: 685~ 694.

Establishment of Diagnostic Assay for Poultry Respiratory Syndrome with Microarray Techniques

CHEN Feng-mei^{2,3}, WU Shi-you^{1*}, YIN Yan-bo¹, NIU Zhong-xiang^{2*}

(1. Shandong Oland Bioengineering Institute, Qingdao 266515, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China;

3. Shandong Animal Science and Veterinary Medicine professional Academy, Weifang 261061, China)

Abstract: A microarray technique was developed by preparing highly conserved DNA fragments for five poultry respiratory tract diseases (New castle disease virus, avian influenza, infectious bronchitis virus, infectious laryngotracheitis virus, *Mycoplasma gallisepticum*) using molecular cloning methods and the DNA fragments were spotted onto NC filter to form microarrays. RNA extracted from samples was reverse transcribed, then followed by PCR amplification and labeling with biotin-11-dUTP. The labeled DNA and prepared DNA microarray were subjected to specific hybridization, the hybridization results were scanned and analyzed with a scanner. The results showed that the microarray technique could identify and distinguish the five poultry respiratory tract diseases. The method is rapid, sensitive and specific, and can screen or quarantine a large number sample samples within a very short time.

Key words: microarray technique ; biotin; ND; AI; IB; ILT; MG

* Corresponding author