

应用限制性显示技术制备 HCV cDNA 诊断基因芯片的初步研究

孙朝晖^{1,2} 郑文岭^{2*} 彭翼飞¹ 张 宝¹ 马文丽¹

(¹南方医科大学基因工程研究所 广州 510515)

(²广州军区广州总医院肿瘤分子生物学研究所 广州 510010)

摘 要 制备丙型肝炎病毒(HCV)检测芯片并进行验证、初步检测质量评价。采用限制性显示(Restriction display, RD)技术制备芯片探针,从载体 pCV-J4L6S 中切出 HCV 全长 cDNA, *Sau3A I* 酶消化,所得的限制性片段进行 RD-PCR 扩增,经聚丙烯酰胺电泳(PAGE)结合银染法进行分离。切胶回收后作 3 次 PCR,得到较纯净的 HCV cDNA 限制性片段。扩增后的产物克隆至 pMD18-T 载体进行快速鉴定。将筛选出的限制性片段打印在氨基修饰的玻璃片上制备成检测芯片进行杂交验证分析,对芯片检测进行优化、初步的质量评估。运用 RD 技术,得到 24 个 200~800bp、大小均一的基因片段,序列分析表明,均属于 HCV 特异基因,可以作为诊断芯片探针;杂交、测序结果显示,芯片检测的敏感性、特异性、准确度、重复性、线性等指标均佳。利用 RD 技术制备基因芯片探针是一种快速、简便的实用方法,制备的诊断芯片可以用于检测 HCV RNA,具有敏感、检测结果较为可靠的优点。

关键词 丙型肝炎病毒 限制性显示 分子探针 基因芯片 杂交 诊断

中图分类号:R394 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)02-0226-05

HCV 是一种高度变异球形外壳的正链 RNA 病毒,属黄热病毒属,由此引起的丙型肝炎严重危害人们的健康,临床快速、准确检测非常必要。我们利用 RD 技术制备 HCV 芯片探针,并用基因芯片荧光标记杂交方法对这些探针进行了杂交分析,为芯片技术在 HCV 感染检测的应用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 广州军区总医院门诊及住院确诊丙型肝炎患者静脉血,其中阳性血 3 份,阴性血 5 份;HCV RNA 实时定量荧光 PCR(Taqman 法)检测试剂盒由深圳匹基生物工程公司提供,阳性血清中 HCV RNA 定量 $> 5.0 \times 10^3$ copies/mL,标本采集、处理、检测操作、结果分析严格按照说明书执行。

1.1.2 探针模板:HCV 全长 cDNA 克隆 pCV-J4L6S^[1]由美国国立卫生研究院(NIH)的 Jens Bukh 博士馈赠。

1.1.3 主要试剂和仪器:pMD18-T Vector、PCR 试剂、dNTP、*Sau3A I*、*Not I*、*Xba I*、切胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司;单链的寡核苷酸接头(SIP:5'-

pGATCmCACACCAGCCAAACCCA 及 SIR:5'-GGTTTGCTGCTGTG)采用 Oligo6.0 软件设计,通过 Gibco 公司合成、纯化及 SIP5'端磷酸化,硅烷化玻片片基、杂交盒购自美国 Corning 公司;RD-PCR 通用引物 U(5'-GTTTGGCTGCTGTGGATC-3')、Cy5 标记的通用引物、分组引物 UA、UT、UC、UG 由本室自行合成;GenePix 4000B scanner 购自美国 GenePix 科技有限公司。

1.2 制备探针

1.2.1 HCV 全长 cDNA 获得:pCV-J4L6S 用 *Not I*、*Xba I* 作双酶切。1~2 μ g 质粒于 20 μ L 反应体系中 37 $^{\circ}$ C 4h。先取 2~3 μ L 电泳鉴定酶切完全后,将剩余的产物加到一个加样孔中。电泳结束后在紫外灯下用手术刀切下靶片段,用切胶回收试剂盒回收。

1.2.2 RD-PCR 参照文献 2 3 进行。

1.2.3 PAGE 结合银染法分离靶基因片段及 3 次 PCR 取 PCR 反应产物 7 μ L,用 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,间隔上样,90V 恒压电泳 6~7h。电泳结束后,依照文献方法进行银染显色,并制干胶片保存^[4]。将干胶片切胶回收后,再做 PCR,反应条件、步骤同上。纯化 PCR 产物,按照纯化试剂盒操作说明书操作。

基金项目 国家自然科学基金(39880032);广州市重大科技攻关项目(01-Z-005-01)

* 通讯作者。Tel 86-20-61648210;Fax 86-20-61647755;E-mail:wenling@fimmu.com

作者简介 孙朝晖(1970-),男,上海市人,主治医师,博士研究生,生物化学与分子生物学专业,主要从事 DNA 芯片技术及应用性研究。

Tel 86-20-88315798;E-mail:zhaohui2@fimmu.com

收稿日期 2004-05-25,修回日期 2004-12-28

1.3 芯片点样和固定

在纯化后的 PCR 产物中加 DMSO 调浓度为 500ng/ μ L。以植物(水稻, rice) 真核细胞(K562 细胞)和细菌(大肠杆菌, *Eserichia coli*) 基因片段为阴性对照, 50% DMSO 为空白对照, 用 Pixsys5500 芯片打印仪在 Corning 玻片上打印阵列 12 \times 15 的点阵, 从上至下, 从左到右分别是: 阳性对照打印 12 个点, 接着分别是阴性对照(水稻、K562 细胞、大肠杆菌基因片段) 空白各 6 个点, 再接着是 HCV 探针, 每个探针打印 6 个点(图版 I-A)。将芯片正面朝下至于 3 \times SSC 盐水湿盒上方再水合化, 然后迅速的置入 100 $^{\circ}$ C 温箱中干燥, 用紫外交联仪以 65mJ 的总能量进行交联固定, 以使探针共价交联结合在玻片表面, 用封闭液(335mL 1-甲基-2-吡咯酮烷, 6g 琥珀酸酐, 15mL 1mol/L 硼酸钠, pH 8) 进行封闭后备用。

1.4 样品标记

1.4.1 模板制备: 1 μ g cDNA 样品 37 $^{\circ}$ C 用 *Sau*3A I 酶切 3h。连上接头(SIP, SIR), 在 EP 管中加入 5 μ L cDNA 酶切反应液, 3 μ L 通用接头, 2 μ L T4 DNA 连接酶(350U/ μ L), 3 μ L 10 \times buffer, 17 μ L ddH₂O, 16 $^{\circ}$ C 保持 2h, 最后以 Pharmacia S-400 离心柱除去接头二聚体和小于 100bp 的小片段, 收集洗脱液作为 PCR 标记的模板。

1.4.2 PCR 扩增: 反应体系(50 μ L): 25 μ L 2 \times PCR 缓冲液, 5 μ L dNTP(各 2mmol/L), 1 μ L 模板, 2 μ L Cy5 标记的通用引物 U (100 μ mol/L) (5'-GTTTGGCTGCTGTGGATC-Cy5), 加 ddH₂O 至体积为 49 μ L, 最后加入 1 μ L *Taq* DNA 聚合酶(5U/ μ L)。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5min。

1.4.3 样品标记: 血清标本按照试剂盒操作提取 RNA, 反转录后, 标记方法同上。

1.5 杂交

将适量体积的预杂交液放入杂交缸中, 预热到 42 $^{\circ}$ C, 将芯片置入, 保温 45min, 然后去离子水漂洗, 空气干燥。在暗室的条件下, 取 5 μ L 荧光标记好的样品加入等体积的 2 \times 杂交液(50% Formamide、10 \times SSC、0.2% SDS), 95 $^{\circ}$ C 变性 5min, 最大速度离心 2min 冷却, 滴加到阵列上, 盖上盖玻片封闭, 42 $^{\circ}$ C 杂交 2h。然后依次在 2 \times SSC/0.1% SDS, 0.1 \times SSC/0.1% SDS, 0.1 \times SSC 溶液中清洗玻片, 灭菌水漂洗后, 无水乙醇脱水, 室温下干燥。

1.6 检测分析

用 GenePix 4000B scanner(激光强度 90%, 信号

增益 70%) 扫描芯片, 并通过分析软件 Quantarray 分析荧光强度。阳性点判断标准为荧光信号平均值超过阴性点信号的 3 倍, ratio 比值范围在 2.7 ~ 3.3。用 SPSS 10.0 软件对各探针点的平均荧光强度进行方差分析, 并以 SNK 法进行多重比较。

1.7 对制备的芯片进行探针优化及初步质量评估

1.7.1 对探针进行优化: 根据荧光强度的大小从中筛选了 10 个 HCV 探针, 分析它们的序列并参照图版 I-A 的芯片点样模式用 Pixsys5500 芯片打印仪在 Corning 玻片上打印阵列 12 \times 8 的点阵, 将芯片正面朝下置于 3 \times SSC 盐水湿盒上方再水合化, 然后迅速的置入 100 $^{\circ}$ C 温箱中干燥, 用紫外交联仪以 65mJ 的总能量进行交联固定, 以使探针共价交联结合在玻片表面, 用封闭液(335mL 1-甲基-2-吡咯酮烷, 6g 琥珀酸酐 and 15mL 1mol/L 硼酸钠 pH 8) 进行封闭后备用。

1.7.2 对芯片检测质量进行初步评估: 线性实验对样品进行系列稀释, 然后分别与优化后芯片进行杂交, 用 GenePix 4000B scanner(激光强度 90%, 信号增益 70%) 扫描芯片, 并通过分析软件 Quantarray 分析荧光强度, 同时用 HCV RNA 实时定量荧光 PCR (Taqman 法) 检测试剂盒检测样品, 标本采集、处理、检测操作、结果分析严格按照说明书执行; 特异性用芯片、Taqman 法分别检测 5 例阴性血清, GenePix 4000B scanner(激光强度 90%, 信号增益 70%) 扫描芯片, 重复性: 每一样品在同一玻片(共打印 5 个点阵)上重复检测 5 次, 在 10 张玻片上, 重复检测同一标本, 实验条件完全相同, 用 GenePix 4000B(激光强度 90%, 信号增益 70%) 扫描芯片, 计算荧光值平均值、CV 值, 以阳性对照荧光强度为参照, 对荧光值进行修正, 使荧光值标准化; 准确性: 将 RD-PCR 纯化探针与 pMD18-T 载体连接, 16 $^{\circ}$ C 2h。转化 XL-1 细菌, 平板克隆。pMD18-T 载体引物(primer A 5'-CTAAAACGACGGCCAGT-3', primer B 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') 初步鉴定后, 用 ABI PRISM 3730 自动测序仪对克隆进行测序分析以验证探针的正确性。临床验证试验 HCV 阳性血清 17 份(Anti-HCV 阳性, ALT \geq 80), 分别用芯片法、Taqman 法检测, 对 PCR 产物进行测序, 验证芯片杂交的正确性, 方法同上。

2 结果

2.1 制备探针 RD-PCR 图谱

由于 nCV-1416S 克隆的序列已知, 用软件找出

每一处 *Sau*3A I 酶切位点,继而推断出每种引物组合的 PCR 应扩增出的片段(200bp 以上有 24 条)。PAGE 结合银染法可清晰显示 HCV 的 RD 片段,大小与预期基本相符(图 1)。

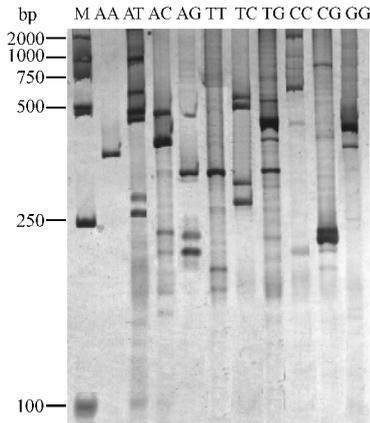


图 1 HCV RD-PCR 分组图谱

Fig.1 RD-PCR patterns of HCV genes, PCR products separated by electrophoresis and stained with silver

M: MDL2000 standard DNA ladder; AA, AT, AC, AG, TT, TC, TG, CC, CG and GG: PCR subgroups.

2.2 HCV RD 产物阳性克隆的 PCR 鉴定图

HCV RD 产物 AT 克隆得到的阳性克隆,用 pMD18-T 载体引物进行 PCR 扩增,并用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。从电泳图(图 2)可见扩增条带单一清晰,大小在 200~800bp 范围内。

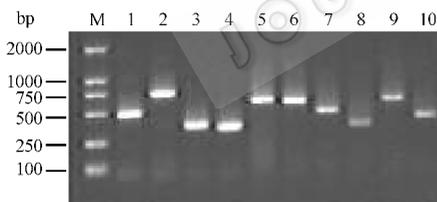


图 2 HCV RD 产物阳性克隆的 PCR 鉴定电泳图

Fig.2 Electrophoresis on 1.5% agarose gel of the RD product from the white clones of HCV genomic fragments

M: MDL2000 standard DNA ladder; 1~10: PCR products of positive clones.

2.3 样品与芯片杂交信号扫描

图版 I-B 显示,样品与 RD 技术分离的 24 条 HCV 探针杂交均有杂交信号,阳性内参也有明显杂交信号,空白和阴性对照均无杂交信号检出。同时也可以看出部分探针的信号较强,而部分探针的信号较弱。对这些探针点的平均荧光强度进行方差分析,可知探针之间的差异显著($F = 8.325, P < 0.001$)。

2.4 探针优化后芯片与样品杂交验证扫描

根据荧光强度从大到小,从中筛选了 10 条探针打印成芯片。杂交结果显示,样品与探针优化后芯片杂交有明显杂交信号,较优化前杂交效果明显改善。图版 I-C 所示为系列稀释样品杂交扫描图。

2.5 探针优化

根据荧光强度的大小从中筛选了 10 个 HCV 探针,分析它们的序列结果表明,这些探针的大小较均一,约为 250~700bp 之间($G + C$)含量均较高,大部分在 40% 以上, T_m 值则在 82℃ 以上,且这两个值较高的 5 个探针的荧光强度值均相对较强。这些探针散布在 HCV 整个基因组中。

2.6 对芯片检测进行质量评估

对样品进行系列稀释,分别用芯片、实时定量荧光 PCR(Taqman 法)同时检测,图版 I-D 为线性实验散点结果图,从图中可见,两种方法相关性良好($r = 0.9819$),在 $10^4 \sim 10^{11}$ copies/mL 之间,芯片检测法显示了较好的线性。其中稀释最低浓度水平为 1.03×10^4 copies/mL,初步认定该芯片的检测灵敏度不低于此水平,但仍然比 Taqman 法灵敏度低了 1~2 个数量级;为验证本方法的特异性,用所制备的芯片检测 5 例正常人血清,结果均显示为阴性,与 Taqman 法检测及临床上完全相符;重复性:批内精密 CV 值为 6.6%,批间精密 CV 值为 7.6%,测序验证正确性:将共计 24 个(200~800bp)限制性片段,全部进行序列测定,与 GenBank 进行 BLAST 比较,结果表明克隆基因均属于 HCV 基因且,与理论一致;临床验证:将 17 例阳性血清分别用芯片法、Taqman 法检测,芯片法阳性检出率为 15 例(88.2%),芯片法与 Taqman 法检测进行比较,结果显示(图版 I-E),临床血清样品芯片法检测与参考方法有良好的相关性($r = 0.9582$);PCR 产物进行测序鉴定,与 GenBank 进行 BLAST 比较,结果表明属于 HCV 特异基因。

3 讨论

丙型肝炎病毒(HCV)是引起输血后和散发性非甲非乙型肝炎的主要病原体,全球分布。在目前尚无有效抗肝炎药的情况下,对丙肝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。制备 HCV 诊断基因芯片,可为临床快速诊断和有效治疗丙型肝炎提供更新的途径。目前分子生物学技术诊断 HCV 主要有各种核酸杂交法和 RT-PCR 法,常规核酸杂交法操作繁琐,费时费力,结果虽有一定的特异性,但敏感性较低;PCR 操作容易造成交叉污染,假阳性、假阴性结果经常出现,扩增其中部分单一较

短片段并以此作为检测,还将丢失很多有价值的病毒基因信息,且一个较短的基因片段可能会反映出两个以上不同基因的信息,导致错误诊断。基因芯片技术是一种高通量的基因检测与分析方法^[5,6],通过芯片上集成的大量探针对样品进行平行检测,不仅可通过应用许多不同的特异性探针来检测同一靶分子,大大降低假阳性率,显著提高信噪比^[7];而且可通过集成多种肝炎病毒的基因探针来对病原体进行快速诊断、鉴别诊断^[8-10]。

制备基因芯片的先决条件是收集大量含不同基因信息的探针,而特异性探针的制备是其中非常关键的步骤。诊断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。后者合成大量探针成本高,且超过 70mer 长度错配率大大增加^[11],我们采用前者。RD 技术采用四碱基酶限制酶 *Sau3A I* 切割 cDNA 然后接上互补的接头,再根据接头的序列设计通用引物及其 3' 端延伸若干个碱基的选择性引物进行 PCR 扩增,使扩增产物有序归类,最后通过电泳显示扩增片段,再切胶、3 次 PCR 分离基因片段,可以高效地分离到多个基因片段。在进行分组 PCR 时,会出现某些组内部分片段大小接近而无法用普通琼脂糖凝胶电泳分离的状况,我们利用 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电泳结束后银染显色。聚丙烯酰胺法凝胶的分辨率较高,理论上相差 1bp 的片段都能得到有效分离,5% 的胶可以达到很好的分离效果,大大提高了分辨分离效率。银染色的结果是肉眼可见的,可以在直视下进行割胶回收,位置准确,有效地避免了割胶偏差,操作也比较简单,周期比较短,不需要特殊的仪器设备,即使在普通的分子生物学实验里就可完成。

样品与探针优化后芯片杂交较优化前杂交效果明显改善。一般说来,在同一实验条件下,杂交信号的强弱主要与探针基因序列的长短、(G+C)含量、 T_m 有关,分析这些探针的序列结果表明,这些探针的大小较均一,约为 250~700bp 之间,(G+C)含量均较高,大部分在 40% 以上, T_m 值则在 82℃ 以上,且这两个值较高的 5 个探针的荧光强度值均相对较强并散步在 HCV 整个基因组中。对芯片检测的敏感性、特异性、重复性、正确性、线性均作了测试,结果显示较为满意。在 $10^4 \sim 10^{11}$ copies/mL 之间,芯片检测法显示了较好的线性;与 Taqman 法比较,芯片检测 HCV 与之相关性好 ($r = 0.9819$);芯片的检测灵敏度不低於 1.03×10^4 copies/mL,但仍然敏感性不够

高,比 Taqman 法灵敏度低了 1~2 个数量级,往后工作中要在探针制备、样品标记上进行优化以进一步提高检测灵敏度,重复性试验精密度不够好,批内精密度 CV 值为 6.6%,批间精密度 CV 值为 7.6%,还有待继续完善整个试验条件;用优化后芯片初步用于 17 例临床阳性血清的检测,结果显示效果较好 (88.2%),但也出现了假阴性的问题,可能与血清中 HCV RNA 拷贝数太低且容易降解有关系;另外标本例数不够多,目前我们正在进行大样本的临床血清检测试验(另文报道),以进一步验证芯片的可靠性并优化实验条件,为芯片技术进入常规临床检验打下坚实基础。

总之,RD 技术能快速简便地得到大量序列明确、长度均一、适于芯片上分子杂交的探针,制备的诊断芯片可以用于检测 HCV RNA,具有敏感、检测结果较为可靠的优点。

参 考 文 献

- [1] Yanagi M, Purcell R H, Emerson S U, et al. Hepatitis C virus: an infectious molecular clone of a second major genotype (2a) and lack of viability of intertypic 1a and 2a chimeras. *Virology*, 1999, **262**(1): 250-263.
- [2] 马文丽, 郑文岭, James F B. 限制性显示(RD-PCR): 一种新的差异显示技术. 见: 孙志贤主编. 全军生物化学与分子生物学研究进展. 北京: 北京军事医学科学出版社, 1998, 113-114.
- [3] 郑文岭, 马文丽, Cater V W. 肿瘤细胞多聚腺苷聚合酶(PAP)的差异表达显示. 见: 叶鑫生, 沈奋奋主编. 细胞调控探索. 北京: 北京军事医学科学出版社, 1998, 73-79.
- [4] 赵菲, 张素娟, 蒋胜辉, 等. 银染技术及干胶制备的改良. 临床与实验病理学杂志, 1999, **15**(5): 401-402.
- [5] Petrik J. Microarray technology: the future of blood testing? *Vox Sanguinis*, 2001, **80**(1): 1-11.
- [6] 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. 广东医学, 2003, **24**(4): 440-442.
- [7] Robert J L, Stephen P A F, Thomas R G, et al. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet*, 1999, **21**(suppl 1): 20-24.
- [8] 孙朝晖, 马文丽, 郑文岭. 基因芯片技术诊断病毒性乙型、丙型肝炎病毒. 解放军医学杂志, 2003, **28**(4): 375-376.
- [9] Livache T, Fouque B, Roget A, et al. Polyrrole DNA chip on silicon Device: Example of Hepatitis C Virus Genotyping. *Anal Biochem*, 1998, **255**(2): 188-194.
- [10] 孙朝晖, 郑文岭, 张宝, 等. 乙型肝炎、丁型肝炎病毒联合诊断芯片制备的初步研究. 解放军医学杂志, 2004, **29**(4): 327-329.
- [11] Sergei G B, James P A, Vladimir M Z, et al. Portable system for microbial sample preparation and oligonucleotide microarray analysis. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(2): 922-928.

Research of restriction display technique in cDNA microarrays preparation for detecting of HCV

SUN Zhao-hui^{1 2} ZHENG Wen-ling^{2*} PENG Yi-fei¹ ZHANG Bao¹ MA Wen-li¹

(¹ Institute of Genetic Engineering, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

(² Institute of Molecular Oncology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Army, Guangzhou 510010, China)

Abstract: The cDNA microarrays for HCV detection was prepared. With the restriction display technique (RD), restriction enzyme *Sau3A* I was chosen to digest the full-length HCV cDNAs. The products were classified and re-amplified by RD-PCR. We separated the differential genes through polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining. Single bands were isolated which were cut out from the polyacrylamide gel. The third-round PCR could be performed by using the single bands as PCR template. The RD-PCR fragments were purified and cloned into the pMD18-T vectors. The recombinant plasmids were extracted from positive clones and the target gene fragments were sequenced. The cDNA microarray was prepared by spotting PCR products to the surface of amido modified glass slides by the robotics. We validated the detection of microarray by the hybridization and the results of sequence analysis. A total of 24 different cDNA fragments ranging from 200 to 800bp were isolated and sequenced, which were the specific gene fragments of HCV. These fragments could be further used as probes in the microarray preparations. From the results of hybridization and sequence data analysis, the specificity, sensitivity, accuracy, reproducibility and linearity in detecting HCV RNA were satisfactory. RD technique is of great value in obtaining a large number of size-comparable gene probes, which provide a swift protocol in generating probes for the preparation of microarrays, and the optimized microarray is sensitive and effective in clinical diagnosis of HCV.

Key words: Restriction display, HCV, Gene probes, Microarray, Hybridization, Diagnosis

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation (39880032); Major Programs for Science and Technology Development of Guangzhou (01-Z-005-01)

* Corresponding author. Tel 86-20-61648210; Fax 86-20-61647755; E-mail: wenling@fimmu.com

Received date 05-25-2004