

禽流感病毒分型基因芯片的研制

韩雪清¹, 林祥梅¹, 侯义宏², 吴绍强¹, 刘建¹, 梅琳¹, 贾广乐¹, 杨泽晓¹

(¹中国检验检疫科学研究院动植物检疫研究所, 北京 100029)

(²荆楚理工学院生物工程系, 荆门 448000)

摘要:【目的】禽流感病毒是一种全球重要的人和动物呼吸道病原体, 快速确定其不同亚型对于全球流感监测具有重要的意义。本研究意在研制一种可同时鉴定禽流感病毒所有亚型的方法。【方法】根据 GenBank 上已发表的禽流感病毒不同亚型(16 个 HA 亚型和 9 个 NA 亚型)的基因序列, 设计合成了 25 对特异性引物和 1 对通用引物, 然后以各亚型病毒的参考株 RNA 作为模板, 建立扩增不同亚型的多重 RT-PCR 方法。参考各亚型病毒靶 cDNAs 区域的保守序列设计了 52 条亚型特异的探针, 进而利用扩增的各亚型病毒的靶 cDNAs 对其特异性进行评价。在此基础上, 将设计好的探针点制到处理好的玻片上, 制备了禽流感病毒分型鉴定基因芯片, 结合所建立的扩增不同亚型的多重 RT-PCR 方法, 开发了禽流感病毒亚型鉴定基因芯片试剂。利用收集自 49 个地区的 2653 份标本对其特异性和敏感性进行了初步评价。【结果】用于评价的各亚型参考毒株均出现良好的特异性杂交信号, 检测的灵敏度可达 2.47 PFU/mL 或 2.5 ng 靶 DNA 片段, 而且与禽类常见的 IBV、NDV 等 6 种病毒均无交叉反应。【结论】证明该病毒分型基因芯片具有良好的特异性、敏感性。

关键词: 禽流感病毒; 分型; 基因芯片; 杂交; 检测

中图分类号: S852.65+9.5 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 09-1241-09

禽流感 (Avian Influenza, AI) 是由流感病毒属的 A 型流感病毒 (Influenza virus A) 引起的禽类感染和疾病的总称。禽流感病毒血清型众多, 有 16 个血凝素 (HA) 亚型和 9 个神经氨酸酶 (NA) 亚型, 其核酸有 8 个基因组片段, 可随机互相交换^[1,2]。因此, 抗原变异性强, 宿主范围广, 各亚型间几乎没有交叉保护性, 使得禽流感难以控制和频繁暴发。尤其是高致病性禽流感 (highly pathogenic avian influenza, HPAI) 可导致高达 100% 的发病率和死亡率, 并可感染人^[3,4]和致人死亡, 对世界养禽业及人类健康构成了严重威胁, 被动物卫生组织 (OIE) 列入国际生物武器公约动物类传染病名单。

随着全球经济一体化的发展, 国际间动物、动物产品的贸易日益频繁, 规模逐渐变大, 研究快速、敏感、

特异可靠的禽流感病毒 25 个亚型分型检测技术对较早发现新的流行亚型并有效监控禽流感疫情显得非常重要和十分迫切。目前, 用于禽流感病毒诊断及检测方法只能鉴定常见的几个亚型, 无法同时区分更多亚型^[5], 也无法监测所有已经发现的和可能发生的新变异流行亚型。

基因芯片技术 (Gene Chip) 又称基因微阵列 (Gene Microarray), 是上世纪 90 年代发展起来的融多学科为一体的高度交叉的前沿技术。它可以将大量的靶基因片段有序、高密度地排列在芯片载体上, 一次试验就可以对上万种基因进行准确、高效的检测, 具有快速、敏感、特异、高通量和自动化等优点。现已被广泛应用到很多领域包括基因表达的控制^[6, 7]、基因功能及药物的评价^[8]以及近些年在细菌与病毒等病原微生物检测方面的研究^[9-11]。因此, 流感病毒

基金项目: 国家科技攻关计划项目 (2004BA519A56-05)

作者简介: 韩雪清 (1962-), 女, 甘肃兰州人, 研究员, 博士, 从事病原微生物分子生物学及免疫学研究。Tel/Fax: +86-10-64927408; E-mail: hanxueq@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-02-15; 修回日期: 2008-05-27

基因芯片分型鉴定技术成为人们研究的热点^[12, 13]。

本研究根据 GenBank 中已发表的禽流感病毒不同亚型 (H1-16, N1-9) 的基因序列, 设计合成 25 对特异性引物、1 对通用引物、52 条特异性探针和 3 条参照探针, 研制了禽流感病毒 25 个亚型分型基因芯片, 可在同一芯片点阵上准确快速鉴定禽流感病毒 25 个亚型, 为禽流感疫情监控和检测检验提供了一种全面可靠手段与技术储备, 具有重要的现实意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒株: H1, H3, H5, H7, H9, N1, N2 亚型病毒 RNA 均由中国人民解放军军事医学科学院提供; H6N2 型 AIV 病毒 RNA 由珠海出入境检验检疫局提供; 流感病毒参考毒株(缺少 H16, N7)病毒 RNA: A/Duck/Alberta/35/76(H1N1), A/Duck/Germany/1215/73(H2N3), A/Duck/Ukraine/1/63(H3N8), A/Duck/Czech/56(H4N6), A/Turkey/England/N28/73(H5N2), A/Turkey/Canada/63(H6N8), A/African Starling/983/79(H7N1), A/Turkey/On tario/6118/68(H8N4), A/Turkey/Wisconsin/1/66(H9N2), A/PD384/79(H10N4), A/Duck/Memphis/546/76(H11N9), A/Duck/Alberta/60/76(H12N5), A/Gull/Maryland/704/77(H13 N6), A/Mallard/Gurjev /263/82(H14N5), A/Duck/Australia/341/83(H15N8) 均由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点开放实验室保存并提供; IBV ,AV10 ,ARV AV2311 CEK3 ,IBDV ,BC6/85 ,FPV 102 株购自中国兽药监察所; MDV Fc-126 株购自北京市动物总医院; NDV 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂: QIAGEN OneStep RT-PCR Kit、QIAamp^R Viral RNA mini Kit(52904), RNeasy^R Mini Kit(74104)均购自 QIAGEN 公司; E.Z.N.A.Gel Extraction Kit, E.Z.N.A.Cycle-Pure Kit 和 Plasmid Mini Kit 购自 OMEGA 公司; AccuPoLTM DNA Polymerase 购自 Lifeson MedicalTech 公司等。

1.2 引物与探针的设计与合成

根据 GenBank 中发表的禽流感病毒不同亚型的基因组序列, 应用 DNASTar、Bioedit、Primer5.0 软件分别对其分析筛选, 设计了 AIV 25 对特异性引物、1 对通用引物、基因芯片分型的 52 条特异性探针与 3 条参照探针, 由上海生工生物工程有限公司进行合成 (表 1 和表 2), 为使特异扩增产物在芯片上杂交后产生荧光信号, 下游引物进行 Tamra 修饰。

1.3 禽流感病毒各亚型阳性质粒构建

1.3.1 获得参考毒株阳性质粒构建: 按 QIAamp Viral RNA Mini Kit 操作说明书进行 H1、H3、H5、H7、H9、N1 和 N2 亚型 AIV RNA 的提取, -80 保存备用。按 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit 操作说明进行 RT-PCR。采用 50 μ L 反应体系; PCR 反应条件: 50 30 min, 95 15 min; 94 30 S, 52 40 S, 72 1 min, 40 个循环; 72 10 min。然后用 E.Z.N.A.Gel Extraction Kit 回收 PCR 产物连接于 T 载体, 按实验室常规方法构建各亚型靶基因片段的重组质粒, -80 保存备用。

1.3.2 其他亚型流感病毒阳性质粒构建: 对未获得参考毒株的 H2, H4, H8, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9 亚型的靶基因片段根据文献[14]进行人工合成: 首先分别筛选出各型的靶基因片段按常规原则设计出两端的上下游引物 (见表 1), 再将靶基因片段分成 58 bp 大小的核苷酸序列, 设计合成含有 15 bp 互补碱基对的搭桥寡核苷酸片段。通过这些含有 15 bp 互补碱基对搭桥寡核苷酸片段不断等温 (72 15min) 延伸获得相应靶基因片段, 以其为模板再加入对应亚型上下游引物按常规反应条件与体系进行 PCR 扩增, 并同上构建重组质粒, -70 保存备用。

1.4 靶基因片段的三重不对称 RT-PCR 扩增

将禽流感病毒 25 个亚型分为 4 组, 进行三重不对称 RT-PCR 反应。第一组包括 8 个亚型: H1, H3, H5, H6, H7, H9, N1 和 N2; 第二组有 8 个亚型: H2, H4, H8, H10, H11, H13, H15 和 H16; 第三组: 5 个亚型 H14, N4, N6, N7, N9; 第四组 4 个亚型: H12, N3, N5, N8。

反应体系 (50 μ L), 反应条件为: 50 30 min, 95 15 min; 94 20 s, 52 1 min, 72 90 s, 20 循环; 94 20 s, 70 90 s, 20 循环; 72 5 min。产物-20 避光保存备用。

1.5 基因芯片的制备

1.5.1 玻片的醛基化: 将玻片在铬酸洗液(重铬酸钾:水:硫酸=1:2:20)浸泡 12 h, 取出后置玻片槽中, 分别用自来水, 蒸馏水依次冲洗各 10 min, 再用超纯水浸泡 12 h。用 1% APTES 溶液对玻片进行硅烷化处理 1 h, 然后用工业乙醇漂洗 5 次, 放置 110 烘箱中 20 min 干燥。将硅烷化的玻片浸泡在 12.5%的戊二醛中, 摇床上 60 r/min 室温轻摇 4 h。3 \times SSC (柠檬酸

表 1 禽流感病毒基因芯片的引物系统
Table 1 The primers of AIV gene microarray

Primer name	Sequence (5 →3)	Reference gene	Product size /bp
Forward universal	TCACTTGCTCCGTTGAGG		
Reverse universal	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGT		
H1f	TCACTTGCTCCGTTGAGGGGAGCAATTGAGTTCAGTATC	CY002688	601
H1r	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTGACACTCTCCTATTGTGACTG		
H3f	TCACTTGCTCCGTTGAGGTGTTACCCTTATGATGTGCC	CY003712	669
H3r	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTCCCTGTTGCCAATTCAGAG		
H5f	TCACTTGCTCCGTTGAGGAGTGAATTGGAATATGGTAACTG	AY770079	380
H5r	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTAACTGAGTGTTCATTTGTCAAT		
H6F	TCACTTGCTCCGTTGAGGAAGGCACTTATTGGRTCAGG	DQ376650	685
H6R	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTGTCTCTAGTTTCAATCTGTGG		
H7f	TCACTTGCTCCGTTGAGGTCAGGWTCTTCWTTCTATGC	AY831668	641
H7r	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTTCYCTTGTGCATTTTGATG		
H9f	TCACTTGCTCCGTTGAGGAAGAGAATGGTCCTACATCGT	AY664671	493
H9r	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTGGATCTTACTCGCAATGTCTG		
N1f	TCACTTGCTCCGTTGAGGTCCCCTTGAATGCAGAAC	DQ095665	328
N1r	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTACATGCACATTGACTCTTG		
N2f	TCACTTGCTCCGTTGAGGATAGCATGGTCCAGCTCAAG	CY002114	299
N2r	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTACATGCTGAGCACTTCTCTG		
H2F	TCACTTGCTCCGTTGAGGCGTCATCTTCAGGAACATGG	AY633228	229
H2R	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTGGCCTTGTGCTATTTTCWGG		
H4F	TCACTTGCTCCGTTGAGGTTGTTAYCCATTTGATGTGCC	CY004939	324
H4R	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTTRACTTTCAGGGTTGTT		
H8F	TCACTTGCTCCGTTGAGGAAGGTTGGTCATACATAGTGG	CY005970	444
H8R	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTGTCTCTTACTAATGGTCTGG		
H10F	TCACTTGCTCCGTTGAGGGATTGAC AAGATAAGCACCGG	CY006000	435
H10R	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTTTACTYACTTACTAGGTGCTAT		
H11F	TCACTTGCTCCGTTGAGGACTTAGAAATGTCCCAGCAA	DQ080993	437
H11R	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTCATTTCCCTCGTCTTTGGC		
H12F	TCACTTGCTCCGTTGAGGAGTACAAGAACCAGAGATT	CY006008	537
H12R	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTCTGGCCATCCGCCTTCTAT		
H13F	TCACTTGCTCCGTTGAGGGACCCTTCTGCTCCTCATG	AY684886	474
H13R	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTGAAACTGATTGATCCCCTGG		
H14F	TCACTTGCTCCGTTGAGGTCTCCGACTAAACTGGCTA	M35997	247
H14R	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTCTGCCGCTCTGATTCCTTAC		
H15F	TCACTTGCTCCGTTGAGGGACTCCTTGACTGAGATCTGG	CY006032	305
H15R	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTAGTATCACATCTTTGTACCCAC		
H16F	TCACTTGCTCCGTTGAGGTAAACTTCTCGTGCTAATCG	AY684888	252
H16R	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTGTCTTCAACTTGATCCCTTC		
N3F	TCACTTGCTCCGTTGAGGGGAAAGARTGGATGCATGT	AY611526	366
N3R	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTGTGTTGATTCTCATCCAAGG		
N4F	TCACTTGCTCCGTTGAGGGGAAGCAATCGACCATGGAT	CY005359	260
N4R	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTCGACACCCATCCATTAGCAT		
N5F	TCACTTGCTCCGTTGAGGACTGTTATTGGGTAATGACG	CY004340	459
N5R	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTGTCTGTTTGGTCCAACCG		
N6F	TCACTTGCTCCGTTGAGGACCTAATAACAATGCTTCGG	AF285887	246
N6R	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTCACTCTTCTATATGCTGTGC		
N7F	TCACTTGCTCCGTTGAGGTGTGCAGAGATAAYTGGA	AJ620349	352
N7R	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTCCGGAATAGCCTGACCAATT		
N8F	TCACTTGCTCCGTTGAGGGGGCMTGATGTATGGATGG	AY300948	340
N8R	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTAAGAATAGCTCCATCGTGCC		
N9F	TCACTTGCTCCGTTGAGGTTCTATGCTCTCAGCCAAGG	CY005332	310
N9R	TAMRA-GGTTTCGGATGTTACAGCGTGGCATAACGCATTGATTC		

表 2 禽流感病毒基因芯片的探针系统
Table 2 The probes of the AIV gene microarray

Subtypes	Probes sequence(5' 3')	Reference gene
PC Probe	TAMRA-CCTCAACGGAAGCAAGTGAT NH2-T15-ATCACTTGCTTCCGTTGAGG	
QC Probe	NH2-GCTGCCTCGGCAAGGAGT - TAMRA	
H1 Probes	NH2-T15-TGCTTATGTCTCTGTAGTGTCTTC NH2-T15-AATAGAACCTGGAGACACAATAA NH2-T15-CGAGATATCCCAAGACAAGTT	AY289930 AF408860 AY289930
H3 Probes	NH2-T15-CCTCGGGTTACTTCAAAATACG NH2-T15-GGAAGCATTCCCAATGACAAACC	AY531033 AY779253
H5 Probes	NH2-T15-GTCACCAATAAGGTCAACTCGATC NH2-T15-ACCATAGCAATGAGCAGGGGA	AY830774
H6 Probes	NH2-T15-TGAGATGTTTCCCAAAAGTACATGG NH2-T15-ATGGGAACTGAAAGCATGAATTT	AY474029 AY457713
H7 Probes	NH2-T15-CAGACCAAACCTCTATGGAAGTGGGA NH2-T15-GTCAAACACAGACAATGCTGTCT NH2-T15-CAAGGAAAGACCCAGCTCTGATAAT	AY831668 AY338459
H9 Probes	NH2-T15-CAAGACGCCAATACACAATAAT NH2-T15-AAGCATGTTTCAGATTCATTCTACAG	AF558506
N1 Probes	NH2-T15-AGTTGGTTGACAATTGGAATTTCTG NH2-T15-CAAGAGTTGGAGGAACAACATACT	AY651452
N2 Probes	NH2-T15-GCGTTTGATCAATGGAAGTGTGTA NH2-T15-ATGATGGGAAAGCATGGTTACATG	CY006109 AY862636
H2 Probes	NH2-T15-ACATCAACACTGAATAAGAGGTC NH2-T15-GAACAAAGGACACTGTACCAGAAT	AY633228
H4 Probes	NH2-T15-GACAAAGGTCAACAATGGGGGA NH2-T15-CTTCAACTGACGCAGAACAAA	CY004939
H8 Probes	NH2-T15-TGGAGACATCATTTTCTTATGGG NH2-T15-GCATCTTACAAGAGAATAAGGCTATT	AB289343 CY005970
H10 Probes	NH2-T15-AAAACAACCTTGTGCCTGTGGT NH2-T15-CACAAGAAAAGAATGATCTGTATGG	CY014739 CY006000
H11 Probes	NH2-T15-CAGTGAATAGAGGAGAGGATAAACC NH2-T15-AGAAGGATGCTAAAGGACAATG	DQ080993
H12 Probes	NH2-T15-TAATCACAGGGAAATCACATGGC NH2-T15-CACTAGTAAGCACTATATTGGGAA	CY006008
H13 Probes	NH2-T15-GGATGAAGATTTACTGGTATTGTATG NH2-T15-GTTCATGGAGTAGGAAATACAACC	AY684886
H14 Probes	NH2-T15-CCATCAAGCGATAATGAGCAAAC NH2-T15-TCTTATGTCAGGCTCTATCTCTGG	AB289335
H15 Probes	NH2-T15-GCATACAATTGACCTTGCAGATTC NH2-T15-CCGATGTGACGATCAATGTATG	AB295613
H16 Probes	NH2-T15-GACAGAACATTAGACCTGCATGAT NH2-T15-ATCATGAGGACTACAAAGAAGAG	AY684888
N3 Probes	NH2-T15-TATGTAGGGACAATTGGAAGGG NH2-T15-GATAATGATGCAAGTGCCCAGA	AY611526
N4 Probes	NH2-T15-GGCTATGTATGTAGTGGGATATTG NH2-T15-GATGGCACAGGCTCATGTAATAG	CY005359
N5 Probes	NH2-T15-GTTTGCCGAGATAATTGGAATGG NH2-T15-AGGGAGGTACATTGAAGAGT	CY004340
N6 Probes	NH2-T15-GGCAGGAAATATATTAAGGACTCA NH2-T15-CCAGCTAATAACAGAGCAGAAAC	AF285887
N7 Probes	NH2-T15-ATGTTGAAAATACCTAATGCAGG NH2-T15-AAGGGATTTCGGGTTTCTAAATGG	AJ620345
N8 Probes	NH2-T15-AGCTCCATTGTGATGTGTGG NH2-T15-AACTTAAATTTGGTACAGGATACAGCG	AY531038 AY300948
N9 Probes	NH2-T15-TCATCACCACCCACAGTATACAA NH2-T15-AGAGCCAGGATGTGATATGTA	CYA005332

钠-氯化钠缓冲液)漂洗 2 次,超纯水冲洗 2 次,1000 r/min 离心 8 min 甩干,室温保存。

1.5.2 基因芯片设计方案:根据设计的探针建立了 14×9×4 微阵列(见图 1),包括 5 个部分:QC 为点样阳性参照;NC 为点样阴性参照;PC 为杂交阳性参

照;N 为空白参照;其它位点为检测探针(DC);每条探针至少有 2 个重复位点。

1.5.3 基因芯片点样:将合成的探针按照表 3 进行配制和稀释后使用 BioRobotics MicroGrid II 基因芯片点样仪根据图 1 的点阵排布进行点样,常温避光保存。

QC	QC	H1	H1	H1	H1	NC	NC	H1	H1	H2	H2	QC	QC
H2	H2	H3	H3	H3	H3	H4	H4	H4	H4	H5	H5	H5	H5
H6	H6	H6	H6	H7	H7	H7	H7	H7	H7	H7	H7	H8	H8
H8	H8	H9	H9	H9	H9	H10	H10	H10	H10	H11	H11	H11	H11
NC	NC	H12	H12	H12	H12	PC	PC	H13	H13	H13	H13	NC	NC
H14	H14	H14	H14	H15	H15	H15	H15	H16	H16	H16	H16	N1	N1
N1	N1	N2	N2	N2	N2	N3	N3	N3	N3	N4	N4	N4	N4
N5	N5	N5	N5	N6	N6	N6	N6	N7	N7	N7	N7	N8	N8
QC	QC	N8	N8	N9	N9	NC	NC	N9	N9	N	N	QC	QC

图 1 芯片阵列点样分布图

Fig. 1 Diagram of Microarray. QC: Quality control; PC: Positive hybridization probes; NC: Spotting buffer control; N: Blank control; DP: Detection probes(H1-16,N1-9).

表 3 芯片点样浓度

Table 3 The printing concentration of microarray

Probes	c(Printing) /($\mu\text{mol/L}$)	Printing sample components
QC probe	40	QC, ddH ₂ O, 20 \times SSC
PCprobe	40	PC, ddH ₂ O, 20 \times SSC
DP probe	40	DP, ddH ₂ O, 20 \times SSC
NC probe	3 \times SSC	ddH ₂ O, 20 \times SSC

1.6 基因芯片杂交, 洗涤, 扫描与结果判读

取杂交缓冲液 (SSC, SDS, Denhardt's, 硫酸葡聚糖) 6 μL , 多重不对称扩增产物 5 μL , 参照探针 1 μL (4 $\mu\text{mol/L}$) 混匀, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 立即冰浴 3 min; 用移液器吹打均匀后取样品杂交液 7 μL 于芯片点样区, 放入杂交盒, 52 $^{\circ}\text{C}$ 水浴, 杂交 2.5 h。杂交完毕, 将芯片从杂交盒水平取出, 置 45 $^{\circ}\text{C}$ 预热的洗涤液 I (2 \times SSC, 0.1%SDS) 中, 100 r/min 洗涤 5 min, 洗涤 2 次。取出芯片, 置 45 $^{\circ}\text{C}$ 预热的洗涤液 II (0.2 \times SSC, 0.1% SDS) 中, 100 r/min 洗涤 5min, 洗涤 2 次。再用洗液 (0.2 \times SSC), 100 r/min 室温洗涤 5 min。将芯片在无水乙醇中浸提 5~8 次, 然后 1000 r/min 离心 5 min 甩干。将芯片插入 PerkinElmer ScanArray Gx plus 扫描仪中进行分析: Wavelength532 nm; PMT60%; Power90%; Brightness93; Contrast96, 进行扫描并保存结果。当 QC 和 PC 位点都有绿色荧光信号, 且 NC 和 N 位点没有荧光信号时, 芯片检测结果为有效结果。根据图 1 的点阵分布进行判读, 同一条探针出现 2 个绿色杂交信号者为亚型阳性; 1 个杂交信号者为可疑, 进行重复试验; 不出现杂交信号者为亚型阴性。

1.7 基因芯片有效性试验

以等比例混合的各亚型的阳性质粒为模板, 按照 1.4, 1.7 操作进行基因芯片分型检测。

1.8 基因芯片特异性试验

按照实验室常规方法提取 IBV, ARV, IBDV, NDV, FVPV, MDV 等 6 种禽类常见病毒核酸样品, 再按照 1.4, 1.7 操作进行分型基因芯片特异性试验。

1.9 基因芯片敏感性试验

通过病毒噬斑形成试验对接尿囊液病毒进行定量, 对其进行 10 倍梯度稀释, 用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 提取 RNA, 再按照 1.4, 1.6 操作进行基因芯片检测。取 1.4 中各亚型多重不对称扩增产物采用 E.Z.N.A.Cycle-Pure Kit 进行纯化回收, 用 NanoDrop 紫外分光光度仪测定回收产物浓度并对其进行 10 倍梯度稀释, 再按照 1.6 操作进行基因芯片检测。

1.10 基因芯片标准毒株验证试验

按照 1.3.1 操作提取各亚型 AIV 参考毒株病毒 RNA 进行基因芯片验证试验, 其中 H16, N7 亚型以其阳性质粒为模板。

1.11 基因芯片田间样品检测试验

对来自我国 49 个地区的 2653 份口岸检样, 按照 1.4, 1.6 操作进行基因芯片检测, 同时随机抽取芯片检测 H5 阳性样品 33 份, 采用 H5 亚型 AIV RT-PCR 检测试剂盒 (AIH 52007005) 进行验证; 抽取 H1N1, H3N2, H5N1, H7N1, H9N2 共 40 份, 根据文献[19,20] 按照动物疫病诊断技术在中国人民解放军军事医学科学院 P3 实验室进行病毒分离鉴定。

2 结果

2.1 禽流感病毒各亚型靶基因片段的获取结果

按 1.3 的操作采用 RT-PCR 获得了 H1, H3, H5, H6, H7, H9, N1, N2 8 个亚型的靶基因片段; 由搭桥 PCR 获得的 H2, H4, H8, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, N3, N4, N5, N6, N7, N8 和 N9 17 个亚型的靶基因片段(图 2); 其相应基因片段大小分别为 229 bp, 324 bp, 444 bp, 435 bp, 437 bp, 537 bp, 474 bp, 247 bp, 305 bp, 252 bp, 366 bp, 260 bp, 459 bp, 246 bp, 352 bp, 340 bp, 310 bp, 并经测序鉴定。

2.2 基因芯片有效性试验结果

按照 1.4, 1.6 操作将 25 个亚型阳性模板等比例混合后进行芯片检测, 所对应探针位点都出现了各自的检测信号。

2.3 基因芯片特异性试验结果

根据 1.8 操作进行基因芯片的特异性试验, 结果显示: 除 QC 和 PC 阳性参照有荧光信号和每个亚型

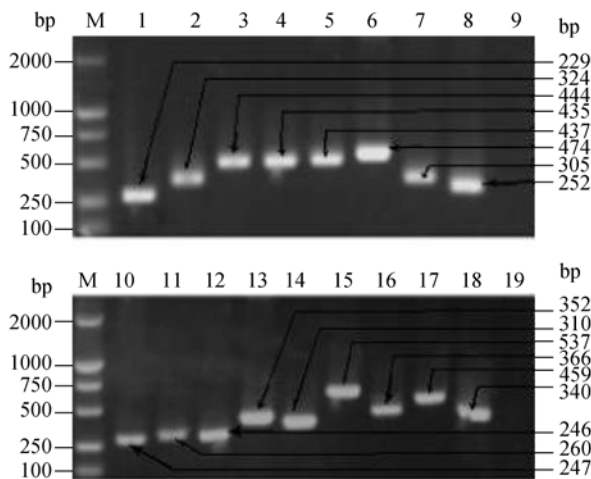


图2 搭桥 PCR 结果

Fig. 2 The results of overlapping-PCR. M: DL2000 marker, 1: H2, 2: H4, 3: H8, 4: H10, 5: H11, 6: H13, 7: H15, 8: H16, 10: H14, 11: N4, 12: N6, 13: N7, 14: N9, 15: H12, 16: N3, 17: N5, 18: N8, 9 and 19: Negative control.

AIV 均有较好的特异性杂交信号外,其它位点均无特异性杂交信号,IBV, ARV, IBDV, NDV, FVP, MDV 基因芯片检测结果均为阴性,表明其具有良好的特异性。

2.4 基因芯片敏感性试验结果

根据 1.9 操作以 H5N1 型 AIV 进行敏感性试验,利用噬斑试验对尿囊液病毒进行定量,噬斑总数为 2.47×10^7 pfu/mL,将其进行 10 倍梯度稀释,按照 1.4, 1.6 操作进行基因芯片检测,基因芯片的检测敏感度可达 2.47 pfu/mL,纯化回收各亚型多重不对称扩增产物用 NanoDrop 紫外分光光度仪定量后 10 倍梯度稀释,

进行基因芯片检测,可检测到 2.5 ng 的扩增靶片段。

2.5 基因芯片验证试验

按照 1.10 操作进行标准毒株验证试验,结果显示(图 3): AIV 参考毒株 A/Duck/Alberta/35/76(H1N1), A/Duck/Germany/1215/73(H2N3), A/Duck/Ukraine/1/63(H3N8), A/Duck/Czech/56(H4N6), A/Turkey/England/N28/73(H5N2), A/Turkey/Canada/63(H6N8), A/African Starling/983/79(H7N1), A/Turkey/On tario/6118/68(H8N4), A/Turkey/Wisconsin/1/66(H9N2), A/PD384/79(H10N4), A/Duck/Memphis/546/76(H11N9), A/Duck/Alberta/60/76(H12N5), A/Gull/Maryland/704/77(H13N6), A/Mallard/Gurjev/263/82(H14N5), A/Duck/Australia/341/83(H15N8) 均出现较好的荧光信号, H11, H13 和 N5 的几条探针中均有一条探针信号稍弱,但可根据其他探针进行该亚型的判读,这同时与 H11, H13 和 N5 亚型 AIV 序列的变异较大的事实是相符合的。

2.6 基因芯片田间样品检测结果

按 1.11 对全国 49 个地区 2653 份不同种类样品进行检测,结果表明(表 4),共检测出 H1N1, H3N2, H5N1, H7N1 和 H9N2 亚型 AIV 阳性 135 份,总阳性率达 5.09% (135/2653); 其中基因芯片检测 H5 阳性的 33 份样品用 H5 亚型 AIV RT-PCR 试剂盒(AIH52007005)验证检测,结果阳性率为 100% (33/33); 抽取 40 份芯片检测 H1N1, H3N2, H5N1, H7N1, H9N2 阳性样品进行病毒分离,结果阳性率达 92.5% (37/40)。

表 4 现场样品检测结果
Table 4 The detection results of field samples

Sample sources	Positive No.	Samples No.	Subtypes	H5 RT-PCR results	Viral Isolation (Positive rate) ^a
Chicken	87	1844	H5N1, H7N1, H9N2	25/25	14(14/17)
Duck	9	218	H5N1, H7N1	5/5	9(9/9)
Partridge	1	4	H5N1	1/1	1(1/1)
Pigeon	1	2	H5N1	1/1	1(1/1)
Pig	35	579	H1N1, H3N2	-	10(10/10)
Human	2	6	H1N1, H5N1	1/1	2(2/2)

^a“-”means undetected; ^a“”means the detection results by Viral Isolation.

3 讨论

基因芯片标记检测模板的方法常用的有两种:一种方法是采用荧光标记的三磷酸脱氧核糖核苷酸, RT-PCR 时在扩增产物掺入荧光素,这种方法可能会对杂交反应产生干扰;另一种是通过标记引物(荧光素或生物素)进行 RT-PCR 扩增,对扩增产物进行标

记。本研究采用了后一种方法并进行了改进,即在通用引物和特异性引物上进行双重荧光标记策略,扩增后不仅通用引物扩增的产物有荧光,特异性引物扩增的产物也有荧光,都可与芯片探针杂交,增强特异性杂交信号,也提高了杂交效率和检测的灵敏度。

芯片制备过程中探针固定的载体有较多种类,玻璃芯片的基质本底荧光低,也可相对地提高芯片检测的灵

JOURNALS.IM.AC.CN

图3 基因芯片验证试验扫描结果

Fig. 3 Specificity test of microarray. A: Detection of each subtype AIV by microarray (1-24 mean H2, H4, H6, H8, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, Negative Control, H9N2, H1N1, H3N2, H5N1 and H7N1 subtypes AIV respectively. B: Detection of IBV, ARV, FPV, IBDV, NDV and MDV by microarray.

敏度。本研究以玻片为载体,采用了反向点杂交方法,将所设计的用于禽流感病毒 25 亚型分型的 52 条特异性探针和 3 条质控探针进行氨基修饰,可直接与醛基玻片上的醛基进行缩合反应,无需点样后的处理过程。

基因芯片检测是先将荧光标记的 PCR 产物通过

热变性或其他方法变为单链,再与固定在芯片上的探针杂交。其中 PCR 产物中只有一条可与探针杂交结合,另一条则与探针竞争并起干扰作用^[15]。有研究表明,单链 DNA 模板与寡核苷酸探针结合的灵敏度要比 PCR 制备双链 DNA 模板与寡核苷酸探针杂交的灵

敏度高 5 倍^[16]。Erdogan 等成功地将不对称 PCR 用于核苷酸多态性检测系统,但他们发现这种方法存在非特异性扩增,产物在凝胶电泳时显现出严重的弥散条带^[17]。为制备大量单链 DNA 模板,提高扩增效率,本研究采用通用引物介导的引物不对称的多重不对称 RT-PCR 扩增,获得了更多单链,可直接用于芯片杂交。

基因芯片中部分亚型的探针是根据搭桥 PCR 技术获得靶核苷酸序列设计的,而设计引物和探针是主要针对近几年发表的(2000~2006)核酸序列设计,参考毒株是 70 年代分离的(1976~1977),由于 H11, H13, N5 亚型 AIV 序列变异(变异率 44.2~65.5%)比较大,因此在参考毒株验证试验中,出现了 H11, H13 和 N5 亚型各有一条探针的杂交信号较弱;这同时反映了基因芯片的检测的准确性,以及其对变异序列检测的可靠性。

应用研制的基因芯片对来自口岸(49 个地区)的 2653 份样品进行检测,结果与经典病毒分离鉴定结果具有良好的一致性,这进一步证明了所建立方法的可靠性。本研究研制的基因芯片具有很好的敏感性和特异性,以 H5N1 为例,可检测到 2.5 ng 的靶基因片段,其敏感度可达 2.47 PFU/mL,而 RT-PCR 试验只检测到 25 ng 的靶基因片段,敏感度为 24.7 PFU/mL,因此基因芯片敏感度比常规 PCR 的敏感高于 10 倍。同时与禽类常见 6 种病毒病(IBV, ARV, IBDV, NDV, FPV, MDV)无交叉反应。目前报道的相关检测方法一般需要 12~24 h^[18];本方法从取得检样到结果判读只需要 7~8 h,因此具有高通量,快速的特点,能准确定型分析禽流感病毒的每个亚型,有助于发现禽流感病毒新变异或基因重排的新流行亚型。

参 考 文 献

- [1] Webster RG, Campbell CH, Granoff A. The "in vivo" production of "new" influenza viruses. 3. Isolation of recombinant influenza viruses under simulated conditions of natural transmission. *Virology*, 1973, 51(1): 149-62.
- [2] Webster, RG, Laver WG, Tumova B. Studies on the origin of pandemic influenza virus v. Persistence of Asian influenza virus hemagglutinin (H2) antigen in nature? *Virology*, 1975, 67(2): 534-43.
- [3] Claas EC, Osterhaus AD, Van-Beek R, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet*, 1998, 351, 472-477.
- [4] Subbarao K, Klimov A, Katz J, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, 1998, 279: 393-396.
- [5] Nicole K., Olivier F, Kevin P, et al. Use of the DNA Flow-Thru Chip, a Three-Dimensional Biochip, for Typing and Subtyping of Influenza Viruses. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(5): 2173-2185.
- [6] Schena M, Shalon D, Heller R, et al. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(20): 10614-10619.
- [7] Kim II, Kang HC, Park JH, et al. RET Oligonucleotide microarray for the detection of RET mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes. *Clin Cancer Res*, 2002, 8, 457-463.
- [8] Debouck C, Goodfellow PN. DNA microarrays in drug discovery and development. *Nat Genet*, 1999, 21, 48-50.
- [9] Hwang TS, Jeong JK, Park M, et al. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray. *Gynecol Oncol*, 2003, 90: 51-56.
- [10] Sengupta S, Onodera K, Lai A, et al. Molecular detection and identification of influenza viruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol*, 2003, 41, 4542-4550.
- [11] 杨素, 花群义, 徐自忠, 等. 口蹄疫等 5 种动物病毒基因芯片检测技术的研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2004, 44(4): 479-482.
- [12] Li J, Chen S, Evans DH. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse Transcriptase PCR. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 696-704.
- [13] 陈红军, 侯义宏, 白华, 等. 猪流感病毒分型基因芯片的建立和初步应用. *畜牧兽医学报(Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica)*, 2007, 38(7): 708-712.
- [14] 贝锦龙, 王瑾雯, 王珣章, 等. 人工合成(CRL)褶皱假丝酵母脂肪酶. *中山大学学报(自然科学版)(Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni)*, 2003, 42(1): 114-115.
- [15] Guo Z, Guilfoyle RA, Thiel AJ, et al. Direct Fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22: 5456-5465.
- [16] Kawai S, Maekawajiri S, Yamane A. A Simple method of detecting amplified DNA with immobilized probes on microtiter wells. *Anal biochem*, 1993, 209: 63-69.
- [17] Edogan F, Kirchner R, Mann W, et al. Detection of mitochondrial single nucleotide polymorphisms using a primer elongation reaction on oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29, E36.
- [18] Michael BT, Erica DD, Martin M, et al. Experimental Evaluation of the FluChip Diagnostic Microarray for Influenza Virus Surveillance. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(8): 2863-2871.
- [19] 朱作锋. *动物防疫新技术标准规程与管理法规手册*. 北京: 光明日报出版社, 2004: 213-215.
- [20] OIE. 2004, *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees)*. 中国农业部兽医局译, 2007, 224-230.

Oligonucleotide microarray for subtyping avian influenza virus

Xueqing Han^{1*}, Xiangmei Lin¹, Yihong Hou², Shaoqiang Wu¹, Jian Liu¹,
Lin Mei¹, Guangle Jia¹, Zexiao Yang¹

(¹ The Institute of Animal and Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029, China)

(² College of Biotechnology, Jingchu University of Technology, Jingmen 448000, China)

Abstract: [Objective] Avian influenza viruses are important human and animal respiratory pathogens and rapid diagnosis of novel emerging avian influenza viruses is vital for effective global influenza surveillance. We developed an oligonucleotide microarray-based method for subtyping all avian influenza virus (16 HA and 9 NA subtypes). [Methods] In total 25 pairs of primers specific for different subtypes and 1 pair of universal primers were carefully designed based on the genomic sequences of influenza A viruses retrieved from GenBank database. Several multiplex RT-PCR methods were then developed, and the target cDNAs of 25 subtype viruses were amplified by RT-PCR or overlapping PCR for evaluating the microarray. Further 52 oligonucleotide probes specific for all 25 subtype viruses were designed according to published gene sequences of avian influenza viruses in amplified target cDNAs domains, and a microarray for subtyping influenza A virus was developed. Then its specificity and sensitivity were validated by using different subtype strains and 2653 samples from 49 different areas. [Results] The results showed that all the subtypes of influenza virus could be identified simultaneously on this microarray with high sensitivity, which could reach to 2.47 pfu/mL virus or 2.5 ng target DNA. Furthermore, there was no cross reaction with other avian respiratory virus. [Conclusion] An oligonucleotide microarray-based strategy for detection of avian influenza viruses has been developed. Such a diagnostic microarray will be useful in discovering and identifying all subtypes of avian influenza virus.

Keywords: Avian influenza virus(AIV); typing; genechip; hybridization; detection

Supported by the National Science and Technology Development Project(2004BA519A56-05)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64927408; E-mail: hanxueq@yahoo.com.cn

Received: 15 February 2008/ Revised: 27 May 2008

科学出版社生物分社新书推介(2008-06)

家养动物细胞体外培养原理与技术

关伟军 马月辉 等编著

978-7-03-018313-2 ¥198.00 2008年6月25日出版

八年的潜心研究所获取的大量实验数据和家养动物细胞生物学研究所面临的严峻态势,坚定了作者的写作信心和决心,同时也激发了作者的写作灵感、意念和热情,怀着焦虑和迫切的心情,组织国内有关专家学者,从我国家养动物细胞体外培养理论、方法和技术现状及未来发展的迫切需要出发完成此书的撰写工作。全书160余万字,包括绪论、动物细胞体外培养的基本理论、动物细胞体外培养的设施和基本条件、动物细胞体外培养用液、培养器皿的清洗、消毒与灭菌、实验室安全问题、无菌技术、家养动物细胞体外培养的基本方法、家养动物组织细胞体外培养技术、干细胞的培养、肿瘤细胞的体外培养、细胞培养过程中污染的检测、消除和预防、家养动物体外培养细胞的生物学性状检测、家养动物细胞遗传学性状检测、细胞拆合与细胞重组、细胞融合与单克隆抗体、细胞克隆、基因细胞内导入技术、体外细胞的转化、细胞培养的应用研究、细胞周期与同步化和重要、濒危畜禽品种体细胞库构建及其生物学特性研究实例等二十二章内容。

本书内容丰富、深入浅出、图文并茂,充分体现了科学性、系统性、前瞻性和实用性有机结合的特点,适合于全国高等院校、科研院所和企业等从事动物种质资源保存、细胞工程、基因工程、遗传工程、胚胎工程、生物制药、干细胞、微生物学、免疫学和医学等研究的教师、科研人员、研究生和相关科研管理人员使用。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学销售中心 邮编:100717

联系人:周文宇 联系电话:010-64031535(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目