

N 亚型流感病毒分型基因芯片检测方法的建立*

杨晓琳^{1,2}, 彭丽萍¹, 田明尧², 孙珊珊³, 龙川^{2,4}, 金宁一^{2**}

1. 吉林大学第一医院, 长春 130021; 2. 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130062; 3. 沈阳农业大学畜牧兽医学院, 沈阳 110161; 4. 吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118

摘要: 利用生物信息学软件对流感病毒 9 种 N 亚型基因序列进行分析筛选, 设计用于 9 种 N 亚型流感病毒基因芯片分型的特异性探针, 制备了针对 N1-N9 亚型流感病毒的鉴定基因芯片, 对 9 种 N 亚型流感病毒基因芯片分型检测方法进行初步研究。结果表明: 所建立的 N 亚型流感病毒分型芯片检测方法可以检测 A 型流感病毒, 可对 N1-N9 亚型进行特异性区分, 待检样品的拷贝数需大于 1×10^2 个/ μL , 并且重复性好, 稳定性高。

关键词: 流感病毒; N 亚型; 基因芯片

中图分类号: S852.65; Q78

文献标识码: A

文章编号: 1000-5684(2011)

DOI: CNKI:22-1100/S.20110714.0941.002

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/22.1100.S.20110714.0941.002.html>

Establishment of the Detected Method of Grouping the Gene Chip of N Subtypical Influenza Virus

YANG Xiao-lin^{1,2}, PENG li-ping¹, TIAN Ming-yao², SUN Shan-shan³, LONG Chuan^{2,4}, JIN Ning-yi²

1. No. 1 Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Military Academy of Medical Sciences, Military Veterinary Institute, Changchun 130062, China; 3. Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China; 4. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Utilizing biographical information, the sequence of 9 kinds of N subtypes about influenza virus was analyzed and sifted. The designing is used to identify the specific probing pin of the 9 kinds of N subtypes about influenza virus. Aimed at identifying the N1—N9 subtypical influenza virus, it is prepared the gene chip. It provides the efficient checking technology in the research of the tentative program on the detected method of the grouping the gene chip of N subtypical influenza virus. The results indicate that the method established in this study about N subtypes about influenza virus can detect a influenza virus, and can be used for distiguishing N1 - N9 subtypes, influenza virus sample copy number should be more than 1×10^2 ind/ μL , and it is of repeatability and high stability.

Kew words: influenza virus; N subtype ; gene chip

流感病毒根据其核蛋白(NP)和基质蛋白(MP)抗原性不同, 分为甲(A)、乙(B)、丙(C)三型^[1], 甲型流感病毒根据其表面蛋白血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)的抗原性差异, 可分为不同的亚型, 目前在水禽中已发现 16 种 HA 亚型和 9 种 NA 亚型^[2]。流感是一种常见的病毒性呼吸道传染性疾病, 流感病毒最显著的特点是极易发生变异并引起大流行, 不仅严重危害人们的身体健康, 还威胁生命。

目前流感的实验室诊断方法有病毒分离培养、检测抗体的血清学方法、检测抗原的免疫学方法^[3]和基于 PCR 的分子生物学方法^[4]。

由于流感病毒亚型众多, 变异速度快, 传统检测方法已经无法适应对该病毒进行快速、准确、高通量检测的要求, 因而需要建立一种能够对其进行高通量快速排查、准确鉴别的集成化诊断技术。

* 基金项目: 国家科技重大专项 (2009ZX10004-103), 国家科技支撑计划项目 (2010BAD04B02), 吉林省科技发展计划项目 (20090486, 20090487)

作者简介: 杨晓琳, 女, 硕士研究生, 研究方向: 流感病毒的拯救。

收稿日期: 2010-11-26

网络出版时间: 2011-07-14 09:41

** 通讯作者

基因芯片又叫DNA微阵列(DNA Microarray),是近年发展起来的一种高科技分析技术,现已广泛应用于医学的多个领域,包括基因表达的检测^[5]、疾病的分子诊断^[5]、病毒进化研究^[6]等。流感病毒基因芯片分型鉴定技术成为人们研究的热点^[7-8]。与传统方法相比,在传染性疾病的诊断上,基因芯片显示了无可比拟的优越性,可以快速、准确地检测流感病毒型和亚型,并且应用基因芯片技术适合于流感病毒基因和宿主多态性的特点^[9],能同步检测流感病毒等多种病原体,且具有需要样品量少、灵敏、特异、快速等特点,将基因芯片用于流感诊断意义重大。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、细胞和病毒 DH5 α , 克隆载体的宿主菌,由军事医学科学院军事兽医研究所保存,载体 pMD18-T, TaKaRa 产品, A/New Caledonia/20/99(H1N1)、A/Swine/GuangDong/1/2003(H3N2)、AIV Isolate3(H9N2)等亚型流感病毒及 A/chinken/JL/9/2004(H5N1)亚型流感病毒 cDNA 军事医学科学院军事兽医研究所全军基因工程重点实验

室保存, N3-N9 亚型流感病毒 NA 基因阳性质粒大连宝生物工程有限公司合成。

1.1.2 主要设计用软件 DNASTar、Primer5.0、DNAMAN Version 5.2.2(Lynnon BioSoft)、DS GENG 2.5 (ACCELRYLS)、Array Designer 4.2 (premierbiosoft)。

1.1.3 主要仪器与耗材 SuperAldehyde Substrates (ArrayIt 公司), Idehydeslide-1.0 (CapitalBio Coporation), MicroGrid TAS 型芯片点样仪 (BioRobotics 公司), Hybri-Slips (Sigma)、UVC500 紫外交联仪 (Hoefer Pharmacia biotech inc.USA), 384 孔板、Personal 4100A 型芯片扫描仪 (GenePix 公司), Biofuge stratos 台式高速离心机 (Kendro 公司), GenePix4.1 软件 (GenePix 公司), 醛基玻片、多样品杂交围栏为 CapitalBio Corporation 产品。

1.2 方法

1.2.1 检测样品荧光标记引物的设计 应用生物信息学方法设计了芯片检测用 PCR 引物,其中 M 为流感病毒通用引物, N1~N9 为各种 N 亚型检测样品的荧光标记引物,由大连宝生物工程有限公司合成, HEX 为荧光染料 (表 1)。

表 1 M 及 N 亚型荧光标记引物

Table 1. Fluorescence labeled primers of M and N subtypical influenza virus

亚型 Subtype	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	长度/bp Product length
M	M-uf	Hex-GCACTACGGCAAAGGCTATG	192
	M-ur	GCACTCCCATTCGCTTCTG	
N1	N1-N1F	Hex-CAGTGGAGTTTTYGGWGAC	317
	N1-N1R	ACCCAGAARCAAGGTCTTATRC	
N2	N2-N2F	Hex-GACCAACACCACCWTAGAGAAG	299
	N2-N2R	GGAYCGCAYGAYACATAAGG	
N3	N3-N3F	Hex-AGGAGATATGTGTGCTTGGTC	235
	N3-N3R	GCACTATTAGCCGACGAGAC	
N4	N4-N4F	Hex-TGGGAAGGGAAGATATGGAGTG	225
	N4-N4R	CCTGTGTCTCACCTCTAATGC	
N5	N5-N5F	Hex-AGGGAGTGGACGAACAAC	201
	N5-N5R	CCGCTGTATCCTGACCAATTC	
N6	N6-N6F	Hex-GCCACAGGAATGACACTATCG	247
	N6-N6R	CTTCACATAGAGGCTTGGTCAG	
N7	N7-N7F	Hex-GCCAGACACATAGAGGAATGC	259
	N7-N7R	CACTATCCAGGAAGCCGAATC	
N8	N8-N8F	Hex-AGGCAGTAGCGTGGTCAG	219
	N8-N8R	TTGCTGGTCCATCTGTCATTAC	
N9	N9-N9F	Hex-TCTGAATGCGTATGCCACAAC	213
	N9-N9R	TGAGCCCTGCCAATTATCCC	

注: Y=(C,T); W=(A,T); R=(A,G); M=(A,C)

1.2.2 探针设计与合成 应用 Array Designer2.0 在 M

及 NA 引物序列所扩增片段内设计多条特异性寡核苷酸作为 DNA 探针,保证所选探针与流感病毒其他亚

型无较高同源性。

1.2.3 芯片的制备 用芯片点样仪通过机械手臂分别以夹缝针接触式点样方式印迹于玻片上, 探针的点样浓度为 35 μmol/L, 芯片点样完毕后, 将点样后的玻片阵列面朝下, 放在盛有 37℃ 水的湿盒中, 放置 2~12 h 固定, 进行水合及洗涤处理, 完成基因芯片制备。

1.2.4 荧光标记样品的制备和杂交 使用带有荧光标记的引物对提取好的 cDNA 或阳性质粒进行多重 PCR 反应, 制备荧光标记杂交样品。引物分组: 第 1 组为 M/N1/N2/N3/N4; 第 2 组为 N3/N4/N5/N6/N7/N8/N9。反应体系为 cDNA (或阳性质粒) 4 μL, 10 倍 *rTaq* buffer(Mg²⁺ plus) 2.5 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 2 μL, 上游引物 1 μL, 下游引物 1 μL, *rTaq*(5 U/μL) 0.2 μL, ddH₂O 补至 25 μL; PCR 反应条件为 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环, 最后 72 °C 温育 10 min。取变性后的荧光标记 PCR 产物 9 μL, 溶于 7 μL 杂交缓冲液 (5 μL 甲酰胺、1.2 μL 20XSSC、0.8 μL 10%SDS), 96 °C 变性 5 min, 迅速放于冰上冰浴 5 min。将杂交混合液加于芯片阵列上 42 °C 杂交 1 h。以上操作均在暗室中进行。芯片洗涤后以基因芯片扫描仪扫描分析, 出现明显可见的杂交信号(斑点)判为阳性。

1.2.5 特异性试验 取 NA 的 N1-N9、IBV、IBDV、

NDV、FPV 和 MDV(军事兽医研究所保存)扩增产物, 按照芯片检测方法进行检测, 进行特异性试验。

1.2.6 基因芯片检测敏感性试验 使用核酸定量仪测定流感病毒 M 基因阳性质粒浓度, 倍比稀释成浓度为 1×10⁵、1×10⁴、1×10³、1×10²、1×10¹ 个/μL。然后作为反应模板进行 PCR 扩增, 扩增出荧光标记样品链, 同芯片杂交用来检测芯片灵敏度。

1.2.7 芯片重复性试验 根据试验结果, 使用 M 基因阳性质粒, 作为反应模板进行 PCR 扩增, 扩增出荧光标记样品链, 应用同批 10 片芯片, 不同批 10 片芯片, 进行杂交, 以检测不同批次芯片制备的重复性及同批次芯片的同一性。

2 结果

2.1 探针设计

选择流感病毒 M 基因及 N1-N9 亚型流感病毒 NA 基因一段高度保守的序列, 在此段序列内根据芯片探针设计原则, 设计了 32 条特异性寡核苷酸探针, 探针 5' 端用 NH₂ 修饰并使用 T(15) 作为 NH₂ 与探针之间的连接臂, 通过 M 基因可以检测出所有甲型流感病毒, M 基因为甲型流感病毒通用特异性检测探针, 序列见表 2。

表 2 寡核苷酸探针
Table 2. Oligonucleotide probe

探针名称	序号	序列
Probe name NO.		Sequence
M1	1	TTTTTTTTTTTTTT TCCGCTGCCTGTTCACTC
M2	2	TTTTTTTTTTTTTT TCTGCTGCTGTTTCRCTT
M3	3	TTTTTTTTTTTTTT TCCGCTGCCTGCTCACTT
M4	4	TTTTTTTTTTTTTT TCTGCTGCTGCTCACTT
N1A	5	TTTTTTTTTTTTTT CCTGTTAGTCTGGATGCTG
N1B	6	TTTTTTTTTTTTTT CCGCTATATCCTGACCACTC
N1C	7	TTTTTTTTTTTTTT GAAGCAAGGCTTATACAATCCA
N1D	8	TTTTTTTTTTTTTT TATTGAGAAGTTATTGCTGTGCC
N2A	9	TTTTTTTTTTTTTT GGCTTTGACCAATTTCTGTATCTGCTA
N2B	10	TTTTTTTTTTTTTT GCAGGATACAGGAATGGTCAAAACCAC
N2C	11	TTTTTTTTTTTTTT CAGATACACTATCTCTGTTATGTT
N3A	12	TTTTTTTTTTTTTTTCAGACTCTTGAGTCTTAGTATATCCTT
N3B	13	TTTTTTTTTTTTTTTAAATTAATGGAGTCTGTCATTTTCCC
N3C	14	TTTTTTTTTTTTTTTCATTCCTTTCCATCGAAGCAACTGCTA
N4A	15	TTTTTTTTTTTTTTTATTGTCGTTGTCTATAATGTCCTGT
N4B	16	TTTTTTTTTTTTTTTCCATTTGAATCCTTGCTGTCGACA
N4C	17	TTTTTTTTTTTTTTTGACACCATCCCCATACCTAAAGCTG
N5A	18	TTTTTTTTTTTTTTTGTCCAACCGTCTTCTATCAATAGG
N5B	19	TTTTTTTTTTTTTTTAAACCACTTCGGGATGAAATGTTA
N5C	20	TTTTTTTTTTTTTTTGGCCACACACTATTACCCTGTCTG

N6A	21	TTTTTTTTTTTTTTTTTATTATTGTTGTTGTTGAGTTGGTT
N6B	22	TTTTTTTTTTTTTTTTTGAAATTATTTTGGAGTATTATTGTT
N6C	23	TTTTTTTTTTTTTTTTTTAGGCCTAAATTGGCAATTCCTA
N7A	24	TTTTTTTTTTTTTTTTCCAGTGATCGGATTATTACAGTCTC
N7B	25	TTTTTTTTTTTTTTTTTGTCTGATGGTCTACTCGTGTGAG
N7C	26	TTTTTTTTTTTTTTTTTGCCAGTTGTCCTGCATACACAAG
N8A	27	TTTTTTTTTTTTTTTTTGCATGATGATTCCTGAGTTCTTAGA
N8B	28	TTTTTTTTTTTTTTTTTCTGCCAGGAATTGATTACATCAG
N8C	29	TTTTTTTTTTTTTTTTTGTGATCCATTCTTCCCATCATG
N9A	30	TTTTTTTTTTTTTTTTTCGTAGCATGAGCATTCTCAATATG
N9B	31	TTTTTTTTTTTTTTTTTGCAGTCCAGCCAGAGGTTCCCAAT
N9C	32	TTTTTTTTTTTTTTTTTCCAGTGGCAGACCCATCTGTGAAC

2.2 基因芯片的制备结果

将经NH₂修饰的寡核苷酸探针打印到醛基基片，N亚型鉴定芯片设计的微矩阵为20×9阵列（见表3，表中每1格代表微矩阵中的4个点），矩阵设计图包括5个部分：QC为点样阳性参照，2个重复位点；NC为点样buffer参照，3个重复位点；PC为杂交阳性参照，2个重复位点；N为空白参照，3个重复位点；其他位点为检测探针；芯片使用的固相载体为醛基玻片（购自博奥生物有限公司）。

表3 探针在芯片上的点样位置

Table 3. The spotting position of probe in slide

QC	NC	NC	NC	PC
M1	M2	M3	M4	
N1A	N1B	N1C	N1D	N2A
N2B	N2C	N3A	N3B	N3C
N4A	N4B	N4C	N5A	N5B
N5C	N6A	N6B	N6C	N7A
N7B	N7C	N8A	N9B	N8C
N9A	N9B	N9C		
PC	N	N	N	QC

注：杂交前无荧光

Note: Hybrid without fluorescence before

2.3 基因芯片检测特异性试验结果

IBV、IBDV、NDV、FPV、MDV 基因芯片检测结果均为阴性，除 QC 和 PC 阳性参照有荧光信号外，其他位点均无杂交反应，为阴性信号（图1），而 AIV 的每个亚型检测结果只在各自相应的位点出现阳性信号（图1）。

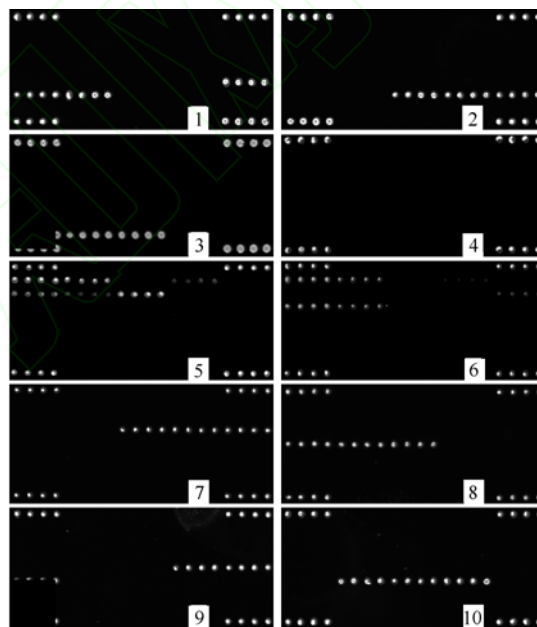
2.4 基因芯片检测敏感性试验结果

由图2可见，当模板所含拷贝数小于1×10²个/μL时不能被芯片检测到。因此本试验设计的芯片，其待检样品的拷贝数需大于1×10²个/μL。

2.3 基因芯片检测重复性试验结果

同批芯片的重复性取同一批制备的芯片10张，应用M基因阳性质粒，在相同条件下同时检测，批内重复性信号结果均可判定为阳性，表明同批制作的芯片具有同一性，取不同时间制备的10批芯片，应

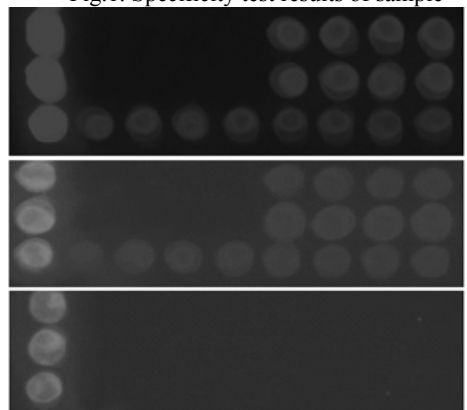
用M基因阳性质粒，在相同条件下同时检测，批内重复性信号结果均可判定为阳性，说明不同时间制备的芯片重复性好，稳定性高，表明芯片制作方法是稳定的。



1-9.N1-N9 的荧光结果 The result of sensitivity for N1-N9 subtype; 10. 匹配组灵敏度结果 The result of sensitivity for matched group

图1 特异性试验结果

Fig.1. Specificity test results of sample



1.模板拷贝数1×10³个/μL Template copy number 1×10³ ind/μL; 2. 模板拷贝数1×10²个/μL Template copy number 1×10² ind/μL; 3.模板拷贝数

1×10个/μL Template copy number 1×10 ind/μL

图 2 基因芯片检测敏感性试验结果

Fig.2. Sensibility test result of gene chip

3 讨论

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,再于固定在芯片上的探针杂交。本试验诊断基因芯片的根据是核酸分子碱基互补配对的原则和酶联显色技术的基本原理,在反相杂交技术的基础上,针对禽流感致病病原,制成诊断基因芯片。从 SPF 鸡胚扩增病毒抽提核酸,经扩增中标记后与芯片进行杂交,杂交信号由芯片检测仪检测分析进行确诊。诊断基因芯片由于在每份检测样品中都设置阳性和阴性内参照,并通过分子杂交确认的方法,有效地克服了 PCR 易被污染的缺点,是 DNA 杂交技术和 PCR 扩增技术相结合地分子诊断方法,有很高的灵敏度、特异性和可靠性。利用计算机软件进行分析、确诊,大大降低了在结果判断过程中的主观因素,使各个实验室得到的结果具有可比性,有利于大规模推广应用。

本研究,建立了流感病毒 NA (N1-N9) 基因芯片检测用多重 PCR 体系,设计了流感病毒通用型检测及 N1-N9 亚型特异性寡核苷酸探针、阳性坐标探针及监测打印后处理过程的探针。因为 A 型流感病毒的 M 基因相对保守,所以本试验设计的流感病毒通用型 M 基因特异性引物、特异性寡核苷酸探针用来对所有流感病毒进行检测,而 N1-N9 等 9 种亚型的

引物和探针可以进一步对 9 种 NA 亚型流感病毒进行区分检测。通过对检测样品的荧光标记、芯片杂交、洗涤、扫描、特异性、敏感性和重复性试验对基因芯片检测方法进行初步研究,为分型基因芯片检测方法的建立提供的科学依据。

参考文献:

- [1] Horimoto T, Kawaoka Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3 (8): 591-600.
- [2] Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79 (5): 2814-2822.
- [3] 李海燕,于康震,辛晓光.部分省市猪流感的血清学调查及猪流感病毒的分离与鉴定[J]. *动物医学进展*,2003,24(3):67-72.
- [4] Claas E C J,Kawaoka Y,De Jong J C,et al.Infection of children with avian-human reassortant influenza virus from pigs in Europe[J]. *Virology*, 1994, 204(1):453-457.
- [5] Chizhikov V,WagnerM, Ivshina A, et al. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40 (7): 2398-2407.
- [6] Cherkasova E,Laassri M, Chizhikov V, et al. Microarray analysis of evolution of RNA viruses: evidence of circulation of virulent highly divergent vaccine-derived polioviruses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2003, 100 (16): 9398-9403.
- [7] Li J,Chen S,Evans D H. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse Transcriptase PCR[J]. *J Clin Microbiol*,2001,39:696?704.
- [8] 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[J]. *畜牧兽医学报*,2007,38(7):708-712.
- [9] StriebelH.M, Birch-Hirschfeld E, EgererR,etal.Virus diagnostics on microarrays[J]. *CurrPharm Biotechnol*, 2003, 4(6): 401-415.