

口蹄疫等 5 种动物病毒基因芯片检测技术的研究

杨 素¹ 花群义^{2*} 徐自忠² 杨晶焰² 谭德勇³

(¹ 珠海出入境检验检疫局 珠海 519015) (² 云南出入境检验检疫局 昆明 650228)

(³ 云南大学生命科学学院生物化学与分子生物学实验室 昆明 650091)

摘 要 用分子克隆方法获得口蹄疫病毒、水泡性口炎病毒、蓝舌病病毒、鹿流行性出血热病毒和赤羽病病毒各一段高度保守的基因片段,用芯片点样仪点样到包被过的玻璃片上,制备成检测芯片。提取样品中的 RNA,进行反转录和荧光标记后滴加到芯片上进行特异性杂交,对杂交结果进行扫描检测,可同时诊断上述 5 种动物传染病,此方法不但快速、准确、敏感,而且可同时进行多种病毒的检测,达到大批动物高通量检疫的目的。

关键词 口蹄疫病毒, 水泡性口炎病毒, 蓝舌病病毒, 鹿流行性出血热病毒, 赤羽病病毒, 基因芯片

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209 (2004) 04-0479-04

口蹄疫、水泡性口炎、蓝舌病、鹿流行性出血热和赤羽病均属我国进境动物一类或二类传染病,其中口蹄疫、水泡性口炎和蓝舌病还被世界动物卫生组织(OIE)确定为对动物和动物产品国际贸易有重大影响的 A 类疾病,这些疾病特别是作为人畜共患烈性传染病的口蹄疫和水泡性口炎的爆发与流行过去曾经而且目前正在给世界各国的畜牧生产、社会经济和国际贸易构成严重威胁并造成巨大的经济损失,因而是世界各国动物检疫部门重点防范的动物传染病。随着全球一体化进程的加快,动物的国际贸易日益频繁,而且贸易规模越来越大,经典的血清学和 PCR 检测方法越来越不适应进口动物检疫的快速、准确、高通量的要求。基因芯片(Gene Chip)又称基因微矩阵(DNA Microarray),是 20 世纪 90 年代发展起来的前沿生物技术,它将大量的靶基因片段有序、高密度地排列在玻片、硅等载体上,用荧光检测后,通过计算机软件进行数据比较和分析,一次试验就可对上万种基因进行快速、准确、高效的检测,具有微型化、高通量、并行处理易于自动化等优越性,是动物传染病检疫技术的一个巨大的飞跃。

本研究旨在制备可同时检测口蹄疫病毒(*Foot and mouth disease virus*, FMDV)、水泡性口炎病毒(*Ve-*

sicular stomatitis virus, VSV)、蓝舌病病毒(*Bluetongue virus*, BTv)、鹿流行性出血热病毒(*Epizootic hemorrhagic disease virus of deer*, EHDV)和赤羽病病毒(*Ak-
abane disease virus*, AKV)等 5 种病毒的基因芯片,一次试验即可对这 5 种病毒进行快速准确的检测,以达到快速、准确、高通量的检疫要求。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 种毒 本研究所用的种毒均来自国外参考实验室。

1.1.2 主要试剂 Pbad/Thio TOP 载体、Top₁₀ 感受态细菌均购自 Invitrogen 公司,鲑鱼精 DNA 为 Sigma 产品,总 RNA 纯化试剂(Trizol)购自上海生工生物工程技术服务有限公司;DEPC 购自华美公司;反转录酶 Ready To Go RT-PCR Bead 购自 Amersham 公司;TaqDNA 聚合酶,dNTP 购自 TaKaRa。

1.1.3 主要仪器设备 BioRobotics MicroGrid II 基因芯片点样仪购自美国 Matrix 公司,基因芯片扫描仪 GenePix4000B 购自美国 Axon 公司,UV Stratalinker 2400 购自美国 Stratagene 公司,Eppendoff 5417R 台式高速低温离心机购自德国 Eppendoff 公司,UV1240

基金项目 国家科技攻关重大专项资助项目(2001BA804A22) 云南省科技攻关计划重点项目[云计科技(98)636 号] 昆明市科技计划项目[昆科(农)字 200202003]

* 通讯作者。Tel 86-871-4613797; Fax 86-871-4615987; E-mail: ziqhua@yahoo.com.cn

作者简介 杨 素(1967-),女,云南大理人,高级兽医师,从事进出口动物检疫工作,博士。Tel/Fax: 86-756-3344537; E-mail: yangsu@263.net

其他作者 董 俊², 杨云庆², 赖建华³

本基因芯片技术未经作者同意不得擅自使用。

收稿日期 2003-10-27, 修回日期 2004-03-25

紫外分光光度计购自日本岛津公司, Eppendorf Mastercycler 基因扩增仪购自德国 Eppendorf 公司, Gel 1000 型凝胶成像分析系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 芯片设计方案

本芯片设计矩阵为 6×6 阵列, 包含 5 条检测目的基因探针, 4 条阳性参照(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ), 检测探针和每个阳性参照均有 4 个重复点, 矩阵设计图见图 1。矩阵图由 3 部分组成: ①阳性参照(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ)改造过的与靶基因没有同源性的一段植物基因片, 加入标记反应体系中, 以测试标记反应是否有效; ②阳性内参照: 与阳性参照(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ)同样为改造过的同一段植物基因片段, 在血清抽提时加入检测体系中作为 FMDV、VSV、BTV、EHDV、AKV 的阳性内参照; ③检测位点 FMDV、VSV、BTV、EHDV、AKV, 每种病原微生物选择一段最为保守、特异的 cDNA 片段作为探针。检测时, 提取样本 RNA, 逆转录后用 Cy5 标记, 同时用 Cy3 标记空白, Cy5 标记的样本 cDNA 和 Cy3 标记的空白等比例混匀后与芯片杂交。通过 Cy3 的信号即可获得是否污染和阴性对照的信息。

1.3 FMDV、VSV、BTV、EHDV、AKV 克隆的构建

从 GenBank 中寻找 FMDV 的 3D 片段、VSV 的核蛋白片段、BTV 的 VPT 片段、EHDV 的 S7 片段、AKV 的核蛋白片段核酸序列, 通过 Blast 得到其保守序列, 根据所需要克隆的基因片段利用引物设计软件 Primer5.0 设计出特异性引物(表 1), 经 RT-PCR 获得

cDNA, 用 Phad/Thio TOP 载体构建重组质粒, 连接转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Top₁₀ 感受态细胞, 筛选重组克隆, 重组克隆经酶切、PCR 及测序进行鉴定。

1.4 芯片的制备

分别提取上述 5 种病毒的重组克隆质粒, 然后用特异性引物(表 1 为探针引物), 分别对这 5 种病毒的重组克隆质粒进行靶基因的 PCR 扩增。为排除载体序列对体系的干扰, PCR 产物需经割胶回收, 进行第二轮 PCR 扩增, 将含有特异带的第二次 PCR 产物进行纯化, 用异丙醇沉淀后, 用 75% 乙醇洗涤一次去上清, 干燥。点样的靶基因需要的量比较大, 产物纯化后进行定量, 然后以 31.25ng/μL 的浓度按设计矩阵图(图版 I -A)点样。

芯片点样完毕后, 水合使靶基因和玻片共价结合后, 将芯片置于加热至 100℃ 的湿盒中保温熏润数分钟, 使点样点在表面张力的作用下变圆, 而圆点的浓度由于液面的流动变得均匀, 同时使 PCR 片段与玻片充分结合。芯片干燥后放入交联仪中紫外线 (60mJ) 照射交联 10min, 使得 PCR 片段与玻片形成更牢固的结合, 然后放常温保存, 最终完成基因芯片的制备。

1.5 检测样品的制备及荧光标记

1.5.1 核酸的提取 取待检样品 200μL, 加入 800μL 裂解液 (TRIzol), 震荡混匀, 静置 5min, 加入 200μL 氯仿震荡混匀, 12000r/min 离心 10min。取上清, 加入 400μL -20℃ 预冷的异丙醇沉淀, 75% 乙醇洗涤一次, 弃上清沉淀自然干燥。

1.5.2 RT-PCR: 用随机引物 pd (N)₆、反转录酶 (Ready To Go RT-PCR Bead) 对所提取的样品 RNA 进行反转录, 42℃ 45min。

1.5.3 荧光标记 取 1μL RT-PCR 产物, 用检测引物进行 PCR 扩增, 反应体系: 反应总体积 25μL, 每种引物浓度 2pmol, 4×dNTP 1nmol, Mg²⁺ 2.5mmol/L, Taq 酶 1 个单位。反应条件: 94℃ 2min; 94℃ 20s, 50℃ 20s, 72℃ 30s, 30 个循环; 72℃ 3min。

取第一次 PCR 产物 1μL, 加入含 Cy5 荧光标记物(红色荧光信号)的标记混合物, 用同样的检测引物进行 PCR 标记。标记反应体系: 总体积 12.5μL, 加入所有位点的检测引物各 1pmol, dNTP (不含 dUTP) 每种 1nmol, 加入标记物 dUTP-cy5 0.1nmol, Mg²⁺ 1.25mmol/L。PCR 反应条件为: 94℃ 20s, 56℃ 20s, 72℃ 30s, 35 个循环; 72℃ 延伸 3min。阴性对照按同样的方式用 Cy3 荧光(1 绿色荧光信号)标记。阳性参照用 Cy3 荧光标记物及 Cy5 荧光标记物混合

Table 1 FMDV、VSV、BTV、EHDV、AKV Genchip Primer Sequence		
Virus	PCR product length/bp	Primer sequence
FMDV	Detective primer(300)	5'-GCTGACAAAGCGACAAAGG-3' 5'-GTGGCCTCTGAGGGATTATG-3'
	Probe primer(168)	5'-CCCTTGAGGCATCTCTCTCC-3' 5'-CCCAACGCCAGGTAAAGTGAT-3'
VSV	Detective primer(302)	5'-TTCCACATGCTCAAAAAGCA-3' 5'-TGTCCCCAGAAATGAAAAGC-3'
	Probe primer(155)	5'-GTGCAGCACTTGCAACATTT-3' 5'-CGGCATGTATGAATCTGCTTT-3'
EHDV	Detective primer(293)	5'-CGCCAGAAGTTACCCAACAT-3' 5'-CGCTTGCCCATCATAAGCTA-3'
	Probe primer(150)	5'-GCGAGTTGGCCAGAATGTTA-3' 5'-GTCCCAATTGCTTCCACAC-3'
BTV	Detective primer (298)	5'-TCGAGTGACTGGGAGACATT-3' 5'-AGTCACACCCGCTTGAGTTT-3'
	Probe primer(149)	5'-CTGAGGAAACCTTCCAACCA-3' 5'-GGGATCATTACGACCTGAA-3'
AKV	Detective primer(293)	5'-GGGCAGCAGCTCAACTTTAC-3' 5'-ACTTCAGCCAAAGGCATCAC-3'
	Probe primer(149)	5'-TCAACCAGAAGAAGGCCAAG-3' 5'-ATGGAGCCTAAAGGCAGTGT-3'

物(黄色荧光信号)进行标记 PCR。

1.6 杂交

将 150 μ L 杂交液滴加于制备好的芯片上,然后将芯片置于专用杂交仓中湿盒封闭,于 42 $^{\circ}$ C 恒温箱预杂交 2h 后弃杂交液。取 8 μ L 荧光标记好的检测样品 PCR 产物加入 150 μ L 杂交液,充分混匀后滴加于芯片点样区,置专用杂交仓中湿盒封闭 42 $^{\circ}$ C 恒温箱杂交 4h。杂交完毕,依次用 1 $\times$ SSC (氯化钠 150mmol/L,柠檬酸钠 17mmol/L,氢氧化钠 10mmol/L,双蒸水 1000mL,调 pH 至 7.4) + 0.03% SDS 溶液、0.2 $\times$ SSC 于 42 $^{\circ}$ C 恒温摇床洗片 2 次,每次 10min,双蒸水冲洗干净,避光晾干。

1.7 芯片扫描检测

将芯片插入 GenePix4000B 扫描仪中进行扫描,Cy3 绿色荧光信号波长为 540nm,Cy5 红色荧光信号波长为 650nm,激光功率 33%,亮度为 90,对比度为 90,PMT 为 550。I、II、III、IV 阳性参照点为黄色,阳性检测样品点为红色,扫描结果用 Tiff 图片保存,见图版 I -B。

1.8 结果判读

对照位点有黄色荧光信号,表明检测处理操作程序是正确的,同时有绿色荧光信号者,表明空白处理对照有效。在检测位点中,如果有绿色信号,表明该位点有系统污染,这时,根据该位点 Ratio 值(红色荧光信号和绿色荧光信号之比)判断,如果该位点的 Ratio 值大于对照位点 Ratio 值,该位点即为阳性,否则为阴性。如果检测位点没有绿色信号,则用该位点的红色荧光信号(F635)与背景红色荧光信号(B635)的的比值(σ)判断,当 >1.5 则为阳性,否则为阴性。每种病毒的 4 个重复点中,3 个及 3 个以上重复点呈现阳性信号的判为阳性,2 个重复点呈现阳性信号的判为可疑,1 个重复点呈现阳性信号或没有阳性信号者判为阴性。

2 结果

2.1 有效性

将上述 5 种病毒等比例混合后,进行检测,所有位点都能检测到信号(对照位点在检测中都要加入模板,故都有检测信号),结果见图版 I -B。

2.2 特异性

按 1.5、1.6 和 1.7 的所描述的方法,分别提取 FMDV、VSV、BTV、EHDV、AKV 的 RNA,然后经 RT-PCR 和荧光标记后分别与芯片进行杂交,扫描检测后仅在各种病毒相应的位点出现阳性信号,除阳

性参照外,其余位点均为阴性。

分别提取禽流感 H9 病毒、牛病毒性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、蓝耳病病毒、猪瘟病毒、伪狂犬病毒的 RNA,经 RT-PCR 和荧光标记后分别与芯片进行杂交并扫描检测,除阳性参照外,其余位点均为阴性。特异性试验扫描结果为插入单一病原物检测的图谱(图版 I 中 C~G)。

2.3 敏感性

取 500 μ L 细胞病毒培养液加入等体积的 TRIzol 混匀,取混合物 100 μ L 作 10 倍递进稀释至 10^{-10} ,按 1.5 的方法提取、反转录、扩增和标记各稀释度病毒液,然后按 1.6 和 1.7 的方法进行杂交和扫描检测,可检测到阳性杂交信号的最高稀释度为 10^{-6} 的病毒液。

3 讨论

基因芯片是分子杂交方法的扩展,与传统的核酸印迹(Southern blot)方法基本相似。将大量已知序列的核酸片段按设计好的排列方式固化于支持物表面,制备成芯片。检测样品 PCR 扩增后加入荧光标记物进行标记,滴加于芯片上,使检测样品 PCR 产物与芯片充分杂交,洗脱后扫描,用图象显示杂交结果。

由于点样探针制备于本研究构建的重组克隆质粒,并进行了反复的扩增和纯化,且点样探针位于样品引物的内侧,避免了样品引物与点样探针的非特异性扩增杂交,因此本芯片具有较好的特异性和稳定性。每份样品均设有阳性参照和阴性对照,通过分子杂交方法克服了 PCR 容易污染的特点,同时通过计算机软件的分析降低了结果判断的主观因素。特异性试验结果也表明,本研究所制作的芯片杂交信号正确,具有良好的特异性。由于使用了随机引物对样品 RNA 进行反转录,并且在第一次扩增的基础上再进行了第二次扩增标记,使得本基因芯片检测系统的敏感性大大提高。

综上所述,我们对口蹄疫病毒、水泡性口炎病毒、蓝舌病病毒、鹿流行性出血热病毒和赤羽病病毒等 5 种病毒基因芯片的制备进行了成功的探索,由于我们所制作的是低密度芯片,其敏感性强、准确性高、特异性好、重现性稳定、操作简单、成本低,可广泛应用于这 5 种动物传染病的大规模筛检、快速检测和鉴别诊断,尤其是进出境动物检验检疫。

致谢 本文承珠海出入境检验检疫局陈博文研究员审阅,谨致谢意!

参 考 文 献

- [1] 常智杰,张淑平. 基因芯片分析技术. 生物学通报, 2000, 7 (35) 5-7.
- [2] 裴敏燕,李 瑶. 基因芯片技术及其应用. 第二军医大学学报, 2001, 6(22) 534-553.
- [3] Schena M, Shalon D, Dais R W, *et al.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, 270(20) 467-470.
- [4] 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.
- [5] Roger Y H, Ping J B, Huang Z J, *et al.* Immobilization of oligonucleotides on to a glass support via disulfide bond: a method for preparation of DNA microarrays. *Anal Biochem*, 1999, 266(1) 23-30.
- [6] Guo Z, Guilfoyle F A, Thiel A J, *et al.* Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(24) 5456-5465.
- [7] Lashkari D A, Derisi J L, McCusker J H, *et al.* Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(24) 13057-13062.

Study on Diagnostic Gene Chip for Detecting Five Animal Viruses

YANG Su¹ HUA Qun-Yi^{2*} XU Zi-Zhong² YANG Jing-Yan² TAN De-Yong³

(¹ Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuhai 519015, China)

(² Yunnan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Kunming 650228, China)

(³ Laboratory of Biochem & Molecular Biology, School of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: A gene chip was developed by preparing highly conserved DNA fragments for five animal infectious disease viruses (*Foot and mouth disease virus*, *Vesicular stomatitis virus*, *Bluetongue virus*, *Epizootic haemorrhagic disease virus of deer*, *Akabane disease virus*) using molecular cloning methods, and the DNA fragments were spotted on to specially treated glass slides. RNA extracted from samples was reverse-transcribed, followed by PCR amplification and labeling with fluorescent dyes. The labeled cDNA and prepared gene chip were subjected to specific hybridization, and the hybridization results were detected by photoscanning. The results showed that this gene chip technique could identify and distinguish the five animal infectious diseases viruses. This method is rapid, sensitive and specific, and can screen and quarantine a large number of animal samples within a very short period of time.

Key words: *Foot and mouth disease virus*, *Vesicular stomatitis virus*, *Bluetongue virus*, *Epizootic haemorrhagic disease virus of deer*, *Akabane disease virus*, Gene chip

Foundation item: The 10th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2001BA804A22)

* Corresponding author. Tel 86-871-4613797; Fax 86-871-4615987; E-mail: ciquhua@yahoo.com.cn

First Author: YANG Su (1967-), Female, Senior veterinary, Candidate of doctor's degree for preventive veterinary. Tel/Fax: 86-756-3344537; E-mail: yangsu@263.net

Other authors: DONG Jun², YANG Yun-Qing², LAI Jian-Hua³

Received date: 10-27-2003

安玛西亚(中国)有限公司(Amersham Biosciences)迁址

由于公司调整及业务发展需要,本公司更名为 GE Healthcare Bio-sciences,北京代表处于 2004 年 7 月 3-4 日迁往新址 北京经济技术开发区永昌北路 1 号,通用电气(中国)有限公司,邮编 100176,电话 67881880,传真 67871162。公司原有一切业务维持不变,并将一如既往地提供最佳、最快、最优的销售及售后服务。