

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(3):400-405; 4 March 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

甲型流感病毒流行毒株检测和分型基因芯片的研制

李稀罕¹, 王宇^{2,3}, 刘方政^{2,3}, 顾宏伟¹, 杨永华¹

(¹ 南京大学病毒学研究所, 医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093)

(² 泰州亲和力生物技术有限公司, 泰州 225300)

(³ 泰州市病毒研究所, 泰州 225300)

摘要:【目的】研制一种可同时对甲型流感病毒 H1N1、H1N2、H3N2、H5N1 和 H9N2 等 5 种流行亚型进行检测和分型的基因芯片。【方法】根据 National Center for Biotechnology Information 中 Influenza Virus Resource 数据库, 针对 H1N1、H1N2、H3N2、H5N1 和 H9N2 等 5 种亚型甲型流感病毒的 HA 和 NA 基因设计 46 条特异性寡核苷酸探针和 1 条质控探针, 点制成基因芯片。利用通用引物扩增流感病毒 HA 和 NA 基因, 使用 Klenow 酶对扩增产物进行荧光标记和片段化, 将标记后产物和芯片杂交, 清洗、扫描后根据荧光信号判定检测结果。用 18 株不同种属来源的甲型流感病毒分离毒株和 186 份咽拭子对芯片特异性、敏感性和临床应用进行初步评价。【结果】所有 18 株分离毒株均能被芯片准确检测并分型, 芯片检测灵敏度能达约 1×10^4 个病毒基因拷贝。同时 8 份咽拭子检测结果为 H1N1 阳性, 4 份咽拭子为 H3N2 阳性。【结论】研究表明该芯片具有较高的特异性和灵敏度, 可为甲型流感病毒的监测提供一种有效的方法。

关键词: 甲型流感病毒; 基因芯片; 检测

中图分类号: Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 03-0400-06

流行性感 (Influenza) 简称流感, 是由流行性感 (Influenza virus) 引起的一种急性呼吸道传染病。长期以来, 流感一直是危害人类健康和公众安全的严重传染病, 每年由此造成的经济损失亦十分巨大。流感病毒在分类学上属正粘病毒科, 根据其核蛋白 (NP) 和基质蛋白 (MP) 抗原性的不同, 分为甲 (A)、乙 (B)、丙 (C) 三型^[1]。甲型流感病毒可以感染多种动物, 是人类流感和动物流感的主要病原。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]。人群中流行的甲型流感病毒亚型有 3 种 HA (H1、H2、H3) 和两种 NA (N1、N2)。

流感病毒的有效检测技术对于指导临床预防和

治疗流感具有重要意义, 同时也是流感监测和控制世界性流感大流行的重要技术支撑。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]。用鸡胚或细胞分离培养病毒是流感病毒鉴定的“金标准”, 但需耗时 3-7 d, 不适合早期诊断。血清学方法属于回顾性诊断, 具有流行病学意义, 但对于急性早期诊断意义不大, 且敏感性低。直接检测抗原方法适合早期快速诊断, 但敏感性低, 且不能同时进行大量样本检测。分子生物学方法主要包括 RT-PCR、多重 PCR、real-time PCR、NASBA 等, 这些方法都具有灵敏度高、特异性强、快速的特点, 但不能对大量临床标本进行同时平行检测和筛查。

基金项目: 江苏省科技支撑计划 (BG20077035)

作者简介: 李稀罕 (1981-), 男, 浙江宁波人, 博士, 从事流感病毒快速诊断技术研究。Tel/Fax: +86-25-83594374; E-mail: xihanli81@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-08-03; **修回日期:** 2009-10-06

基因芯片,又叫 DNA 微阵列 (DNA Microarray),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^[6]、病毒进化研究^[7]等。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。基因芯片具有快速、敏感、特异、高通量的特点,可以平行地对大量病原进行同时检测,在实际应用中能够实现微型化、集成化和自动化,特别适用于对流感病毒等宿主范围广、血清型多、变异快的病原微生物的检测。

本研究根据 NCBI 中 Influenza Virus Resource 数据库,针对 H1N1、H1N2、H3N2、H5N1 和 H9N2 等 5 种亚型甲型流感病毒的 HA 和 NA 基因,成功设计 46 条特异性寡核苷酸探针以及 1 条质控探针,并建立了一整套快速、特异、灵敏的用于甲型流感病毒流行毒株检测和分型的基因芯片检测方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒株和临床样本: A/Nanchang/14/1996, A/swine/Henan/01/06, A/swine/Shanghai/1/2005, A/swine/Zhejiang/1/2004, A/HongKong/1180/99, A/swine/Sichuan/01/2006, A/swine/Guangdong/1/2004, A/swine/Shandong/1/2004, A/swine/Shandong/3/2004, A/chicken/China/1204/04, A/chicken/Guangdong/174/04, A/swine/Fujian/1/2003, A/goose/Yunnan/5599/2006, A/Raccoon dog/Shandong/sd1/2005, A/Raccoon dog/Shandong/sd3/2005, A/Chicken/Shanghai/F/98, A/swine/Shandong/1/2004, A/chicken/Guangdong/56/01 等 18 株病毒分离株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和江苏省疾病预防控制中心提供,186 份咽拭子由江苏省疾病预防控制中心和江苏省泰州市人民医院提供。

1.1.2 主要仪器和试剂:芯片点样仪为博奥生物有限公司的 Smart Arrayer 48,激光共聚焦扫描仪为博奥生物有限公司的 LuxScan 10K-A,荧光定量 PCR 仪为 Bio-Rad 公司的 IQ5 Real-Time PCR Detection System。醛基化玻璃基片和芯片点样液购自博奥生物有限公司, QIAamp Viral RNA mini Kit 和 QIAquick PCR purification kit 购自 QIAGEN 公司, One Step RNA PCR Kit 和 One Step SYBR Prime Script RT-PCR Kit 购自宝生物工程(大连)有限公司, Cy3-dCTP 购自 GE 公司, RiboMAX Large Scale RNA Production System-T7 和 Klenow 酶购自 Promega 公司。

1.2 探针的设计与合成

根据 NCBI 中 Influenza Virus Resource 数据库,针对 H1N1、H1N2、H3N2、H5N1 和 H9N2 等 5 种亚型甲型流感病毒,对大量基因序列进行比对,确定每种亚型 HA 和 NA 基因的保守序列。针对这些保守序列,运用 Array Designer 4 软件,设计了 46 条特异性探针与 1 条质控探针,由上海英骏生物技术有限公司进行合成(表 1),每条探针 5'端氨基修饰,以便与基片上的醛基结合,固定于芯片表面。

表 1 芯片探针序列

Table 1 Viral specific oligonucleotide probes of microarray	
Target	Sequence (5'→3')
H1-1	ATGCCAACAACTCAACCGAC
H1-2	ACTTGAGAAGAATGTGACAGTGAC
H1-3	ACACAGAATGCCATTGCACGG
H1-4	GAAATTGGAATGGCTGCTTTGA
H1-5	CTATATGAGAAAGTAAGAAGCCAGC
H3-1	CTGTTACCCCTTATGATGTGCCG
H3-2	GAACGCAGCAAAGCCTACAG
H3-3	CAATAATGAGATCAGATGCACCCA
H3-4	ATGACAACAGCAGCGCAAC
H3-5	CAACAGGTAGAATATGCGACAGT
H3-6	CTGTTACCCCTTATGATGTGCCG
H3-7	TTATGCTCCCTTAGGTCACCTAG
H5-1	CGACAGAGCAGGTTGACACA
H5-2	TCAAGAAAGGGGACTCAGCAA
H5-3	AAGCAATAGATGGAGTCACC
H5-4	GCCGTTGGAAGGGAATTTAATAAC
H5-5	AACAAGAAGATGGAAGACGGATT
H5-6	GCTACAATAATACCAACCAAGAAGA
H5-7	CCTAATGATGCGGCAGAGC
H9-1	GCATCGGCTACCAATCAACAA
H9-2	TGTTCCCTGTGACACATGCCA
H9-3	ATGCCAAAGAATTACTCCACACA
H9-4	CAGGTCAGACATTGCGAGTG
H9-5	ATGGTATGGACACATTCTTTCAGG
H9-6	ACAAGGACTGACACAACAACAA
H9-7	AGGTCAGACATTGCGAGTAAGA
H9-8	TCTATGGCAATCCTTCTGTGA
H9-9	TCCGATTCAATTCTACAGGAGCA
N1-1	CTAGTGGGAGCAGCATTTCTTT
N1-2	ATTTCATCTCTTTGTTCTACAGTGA
N1-3	ATACACAAAAGACAACAGCATAAGAAT
N1-4	GGCATAATAACAGACACTATCAAGA
N1-5	AGCACTAATTCCAGGAGCGG
N1-6	CCAGAAGTACAGGATTAGATTGC
N1-7	GCCGTTTCATCTCATGCTCC
N1-8	TTCCGAGACAATCCACGCC
N1-9	GGTGGACTGGAACGGACAG
N2-1	AGCAGATACAGAAATTGGTCAAAG
N2-2	GGACAGGGAACAACACTAAACAA
N2-3	GCCACAATATGCTTCCTTATGC
N2-4	GCTCAAGTTGTCACGATGGAA
N2-5	GAGGCTTGATAGATAGTATTGGTTCA
N2-6	CATAGTTGACAGAGGTAATAGGTCC
N2-7	GGTATTCTGGTATCTTCTCTGTTGA
N2-8	CCACGGCTAATTCGAAGTCAC
N2-9	AAGTGGCAGAATACAAGAATTGGT
PosCtrl	CGTATATAAAACGGAACGTCCAAGG

1.3 芯片制备

将各探针用纯水稀释成 20 μmol/L 终浓度,与等体积芯片点样液混匀,按图 1 微阵列布局用 Smart Arrayer 48 芯片点样仪将 46 条特异性探针和 1 条质控探针点于醛基化玻璃基片,每条探针 3 个重复,每块芯片点制 4 个相同阵列,点样完成后将芯片 37℃ 温育 12 h,使得探针的氨基和载玻片表面的醛基发生希夫碱反应,将探针固定于芯片表面。将温育后的芯片在 100 r/min 脱色摇床上按下列顺序预洗:(1)0.1% SDS 1 min,(2)纯水 1 min,(3)0.1 mol/L NaBH4 5 min,(4)0.1% SDS 1 min,(5)纯水 1 min。将预洗后芯片 2000 × g 离心 2 min,4℃ 密封保存。

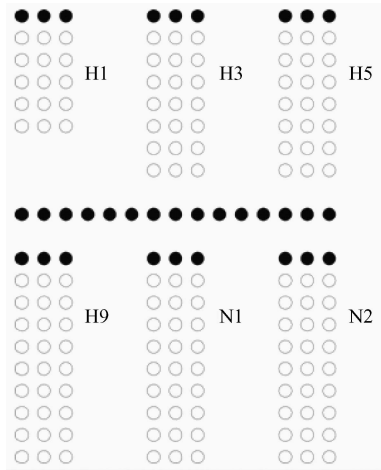


图 1 芯片阵列布局图

Fig. 1 Microarray layout for 46 oligonucleotide probes with positive control sequences (closed symbols) as internal standards and probes spotted in triplicate (open symbols). Samples were grouped in columns by subtype (HA and NA).

1.4 RNA 提取和 RT-PCR

按照 QIAamp Viral RNA mini Kit 的使用说明书对各毒株以及咽拭子中的 RNA 进行提取。将所提取的 RNA 用 OneStep RNA PCR Kit 对 HA 和 NA 基因分别进行 RT-PCR 扩增,PCR 所使用的引物为通用引物^[8],扩增体系为 50 μL。RT-PCR 反应条件:50℃ 15 min,94℃ 2 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 2 min,30 个循环;72℃ 7 min。反应产物用 QIAquick PCR purification kit 进行纯化。

1.5 目的基因的荧光标记

取纯化后 HA 和 NA 基因各 5 μL,加入 1 μL 0.2 μg/μL 随机九聚物,混匀。95℃ 变性 3 min,立即冰浴 3 min,在 50 μL 反应体系中加入 9 U Klenow 酶,1 μL 1 mmol/L Cy3-dCTP,1 μL 1 mmol/L dCTP,6 μL 1 mmol/L dATP, dGTP, dTTP 混合物,10 × buffer 5 μL,加纯水至 50 μL,37℃ 温育 60 min。荧

光标记后产物用 QIAquick PCR purification kit 进行纯化,最后用 30 μL 纯水洗脱。

1.6 芯片的杂交,扫描与结果判定

取 10.6 μL 荧光标记产物与 9.4 μL 杂交液混匀,使溶液终浓度达到 0.2% SDS,15% 去离子甲酰胺,2.5 × Denhardt's,2.5 nmol/L Cy3 标记质控探针互补序列,95℃ 变性 3 min,立即冰浴 3 min,混匀,取 18 μL 加到四样品型盖片加样孔,使得液体覆盖整个微阵列区域。在杂交盒边缘放入 200 μL 纯水,将芯片置于杂交盒,室温杂交 60 min。杂交完毕,将芯片取出,在 100 r/min 脱色摇床上按下列顺序各洗涤 5 min:(1)0.1% SDS/2 × SSC,(2)0.1% SDS/0.2 × SSC,(3)0.2 × SSC,(4)纯水。洗涤后芯片 2000 × g 离心 2 min 去除表面液体。将芯片插入 LuxScan 10K-A 激光共聚焦扫描仪进行扫描,扫描参数为:波长 532 nm,激光强度 70%,PMT 700 V,分辨率 5 μm。对扫描图像按图 1 阵列布局进行结果判读,同一条探针 3 个重复点 SNR532 > 5 时判定为阳性点,仅 1 个或 2 个重复点 SNR532 > 5 时判为疑似,进行重复实验,3 个重复点 SNR532 < 5 时判为阴性。

1.7 RNA 标准品制备

为了试验芯片检测的灵敏度,将流感病毒(A/HongKong/1180/99)的 HA 和 NA 基因全长进行体外转录,以制备 HA 和 NA 基因的 RNA 标准品。首先使用通用引物 RT-PCR 扩增 HA 和 NA 基因全长,然后与 pGEM-T Easy vector 连接,测序验证。以阳性质粒为模板,使用 RiboMAX Large Scale RNA Production System-T7 试剂盒进行体外转录,转录产物经酚/氯仿抽提和乙醇沉淀,得到 HA 和 NA 基因全长的 RNA 标准品,-70℃ 保存。

1.8 芯片对分离毒株检测试验

按照 1.4,1.5 和 1.6 实验步骤提取 18 株流感病毒分离毒株 RNA,One Step RT-PCR 扩增各毒株 HA 和 NA 基因并进行荧光标记,然后和芯片杂交,以初步检测芯片对已知亚型流感病毒的检测能力。

1.9 芯片检测灵敏度试验

将 1.7 中所制备得到的 RNA 标准品,使用 Nanophotometer 紫外分光光度计确定浓度,按下列公式计算标准品中 RNA 拷贝数:拷贝数 (个/μL) = [RNA 浓度 (g/μL) × 6.02 × 10²³] / [RNA 长度 (bp) × 340]。分别将 10²至 10⁸个拷贝数的 HA 和 NA 基因 RNA 标准品按 1.4,1.5,和 1.6 中方法用芯片进行检测,确定芯片的检测灵敏度。

1.10 临床样本检测试验

按照 1.4,1.5 和 1.6 实验步骤对 186 份咽拭子进行检测,以检验芯片对临床样本的检测能力。同时用 One Step SYBR Prime Script RT-PCR Kit 对 186 份咽拭子进行检测,实验中所使用的引物为文献^[9-11]所报道的引物。反应体系为 25 μL,反应条件为:42℃ 2 min,95℃ 10 s;95℃ 5 s,60℃ 30 s,40 个循环。将芯片或荧光定量 RT-PCR 检测结果为阳性的咽拭子用鸡胚进行病毒分离。3 种检测方法相互印证比较,以考察芯片对临床样本的检测能力。

2 结果

2.1 芯片对病毒分离株的检测结果

按 1.8 实验操作将芯片用于对 18 株甲型流感病毒分离毒株的检测,其中包括 3 株 H1N1 亚型 (A/Nanchang/14/1996, A/swine/Henan/01/06, A/

swine/Shanghai/1/2005),1 株 H1N2 亚型(A/swine/Zhejiang/1/2004),5 株 H3N2 亚型(A/Hong Kong/1180/99, A/swine/Sichuan/01/2006, A/swine/Guangdong/1/2004, A/swine/Shandong/1/2004, A/swine/Shandong/3/2004),6 株 H5N1 亚型 (A/chicken/China/1204/04, A/chicken/Guangdong/174/04, A/swine/Fujian/1/2003, A/goose/Yunnan/5599/2006, A/Raccoon dog/Shandong/sd1/2005, A/Raccoon dog/Shandong/sd3/2005),3 株 H9N2 亚型 (A/Chicken/Shanghai/F/98, A/chicken/Guangdong/56/01, A/swine/Shandong/1/2004)。所有毒株都在其亚型所对应的芯片特定区域出现阳性荧光信号,且信号较强,在其它亚型区域未出现非特异性荧光信号(图 2)。说明芯片能较好的对以上五种亚型甲型流感病毒进行检测和分型,有较好的特异性,并且对不同种属来源的毒株都具有检测能力。

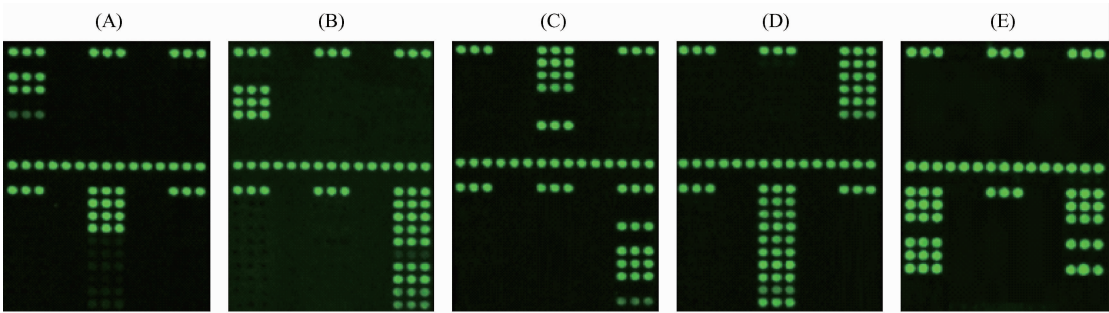


图 2 芯片对病毒分离株检测扫描图像

Fig.2 Fluorescence images showing typical patterns for viral subtypes. A:H1N1 (A/swine/Henan/01/06);B:H1N2 (A/swine/Zhejiang/1/2004); C:H3N2(A/swine/Sichuan/01/2006);D:H5N1 (A/goose/Yunnan/5599/2006);E:H9N2 (A/Chicken/Shanghai/F/98).

2.2 芯片检测灵敏度试验结果

按 1.9 实验操作对流感病毒代表毒株(A/Hong Kong/1180/99)的 HA 和 NA 体外转录 RNA 进行梯度稀释,分别取 10²至 10⁸ 拷贝数 RNA 标准品进行

RT-PCR 扩增和荧光标记,然后用芯片进行检测,芯片对此毒株的检测灵敏度约为 1 × 10⁴ 个基因拷贝 (图 3)。

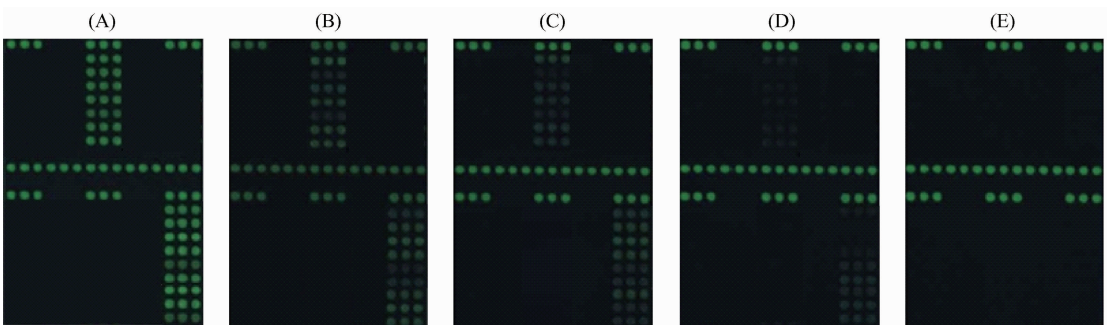


图 3 芯片检测灵敏度试验扫描图像

Fig.3 Microarrays were hybridized with amplicons of in vitro transcribed RNA of H3N2 subtype (A/Hong Kong/1180/99). Fluorescence images showing gene copies of in vitro transcribed RNA as a template in the RT-PCR reaction. A:1 × 10⁷ ;B:1 × 10⁶ ;C:1 × 10⁵ ;D:1 × 10⁴ ;E:1 × 10³ . The limit of detection for the microarray was approximately 1 × 10⁴ gene copies of in vitro transcribed RNA.

2.3 芯片对临床样本的检测结果

将 186 份咽拭子按 1.10 进行检测,结果见表 2。其中芯片共检测到 12 份样本中存在甲型流感病毒,其中 8 份检测结果为 H1N1 亚型阳性,4 份检测结果为 H3N2 亚型阳性,其余样本检测结果为阴性。

表 2 临床样本检测阳性结果

Table 2 Results for all positive samples tested in the three different assays

Sample identifier	Real-time RT-PCR		Microarray		Virus isolation	
	HA	NA	HA	NA	HA	NA
TZ090107	H3	N2	H3	N2	- ^a	-
TZ090111	H1	N1	H1	N1	-	-
TZ090112	H1	N1	H1	N1	-	-
TZ090139	H1	N1	H1	N1	H1	N1
TZ090152	H1	N1	H1	N1	-	-
TZ090204	H3	N2	H3	N2	-	-
TZ090209	H3	N2	-	-	-	-
TZ090231	H3	N2	H3	N2	H3	N2
TZ090233	-	-	H1	N1	-	-
TZ090277	H1	N1	-	-	-	-
TZ090278	H1	N1	-	-	-	-
TZ090288	H1	N1	H1	N1	H1	N1
TZ090301	H1	N1	H1	N1	H1	N1
TZ090312	-	-	H1	N1	H1	N1
TZ090314	H3	N2	H3	N2	-	-

^a Negative

3 讨论

由于流感病毒 HA 和 NA 基因的高突变率,因此针对某一亚型流感病毒 HA 和 NA 基因仅设计 1 条或 1 对探针,很可能因为特定检测位点的变异而导致所设计探针无法检测到病毒。本研究根据流感病毒基因突变迅速的特点,针对芯片所要检测的 H1、H3、H5、H9、N1、N2 基因分别设计了多条探针,覆盖基因多个位点,从而确保了探针的检测能力,有效避免了因检测位点突变而导致漏检。同时本研究所设计的探针长度在 19-27 bp 之间,且 TM 值非常接近,因此杂交一致性好,且杂交温度低,杂交速度快,在室温 1 h 即可完成杂交,使整个检测时间大幅缩短。

近年来发展起来的流感病毒的基因芯片检测技术大都采用将荧光标记物直接加入到引物或扩增产物中^[12],而本研究所采用的方法是利用 Klenow 酶将 Cy3 荧光染料间接导入 PCR 产物。有研究表明^[13,14],由于空间位阻效应,过大的扩增产物会导致探针与目的片段的杂交效率降低。本研究利用 Klenow 酶进行荧光标记,在导入荧光分子的同时将扩增产物进行片段化,所得到的标记产物大小集中在 50-450 bp 之间,能有效降低空间位阻,优化杂交动力学。产生的标记产物非常适合与芯片上的短片段寡核苷酸探针进行杂交,极大的提高了杂交效率和芯片检测的灵敏度。

检测灵敏度对于病原微生物检测芯片是个非常

同时进行的 One Step Real-time RT-PCR 方法共检测到 8 份样本为 H1N1 亚型阳性,5 份样本为 H3N2 亚型阳性,其余检测结果为阴性。鸡胚病毒分离结果 4 份为 H1N1 亚型阳性,1 份为 H3N2 亚型阳性。

重要的参数,为了提高芯片的检测灵敏度,通常都在杂交前将待检样本中的核酸用特异性引物进行多重 PCR 扩增或用随机引物进行扩增。特异性多重 PCR 灵敏度较高,但是反应条件较复杂,容易导致扩增失败。随机引物扩增可以在一管反应中同时扩增得到多种病原微生物,但是灵敏度较低。本研究根据所有甲型流感病毒 HA 和 NA 基因 RNA 片段两端都具有特异性高度保守序列,设计了两对通用引物分别扩增五种甲型流感病毒的 HA 和 NA 基因,简化了 PCR 反应条件,提高了目的基因扩增效率,使芯片检测的灵敏度得到提高。同时我们将通常用于荧光定量 PCR 灵敏度检测的体外转录 HA 和 NA 基因 RNA 用于芯片灵敏度检测,可以直接得到芯片检测的灵敏度,而不需要通过 PFU 等间接手段。

为了试验所研制芯片实际检测能力,将采集自江苏地区的 186 份咽拭子用芯片进行检测,结果显示了其特异性、敏感性都较高,表明芯片对临床流感样本有较强的检测和分型能力。通过和荧光定量 RT-PCR 及鸡胚病毒分离检测结果的比较,更进一步确认了芯片检测结果的可靠性。在世界 H1N1 流感大流行的严峻形势下,我们所研制的芯片可以为流感的快速诊断提供一种新方法。

参考文献

[1] Horimoto T, Kawaoka Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *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. *Journal of Virology*, 2005, 79 (5) : 2814-2822.
- [3] Storch G A. Essentials of diagnostic virology. New York: Churchill Livingstone, 2000.
- [4] Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, et al. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000, 13 (4) : 559-570.
- [5] Margalit O, Somech R, Amariglio N, et al. Microarray-based gene expression profiling of hematologic malignancies: basic concepts and clinical applications. *Blood Reviews*, 2005, 19 (4) : 223-234.
- [6] Chizhikov V, Wagner M, Ivshina A, et al. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40 (7) : 2398-2407.
- [7] 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 2003, 100 (16) : 9398-9403.
- [8] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology*, 2001, 146 (12) : 2275-2289.
- [9] Ong W T, Omar A R, Ideris A, et al. Development of a multiplex real-time PCR assay using SYBR Green 1 chemistry for simultaneous detection and subtyping of H9N2 influenza virus type A. *Journal of Virological Methods*, 2007, 144 (1-2) : 57-64.
- [10] Suwannakarn K, Payungporn S, Chieochansin T, et al. Typing (A/B) and subtyping (H1/H3/H5) of influenza A viruses by multiplex real-time RT-PCR assays. *Journal of Virological Methods*, 2008, 152 (1-2) : 25-31.
- [11] Wu C, Cheng X, He J, et al. A multiplex real-time RT-PCR for detection and identification of influenza virus types A and B and subtypes H5 and N1. *Journal of Virological Methods*, 2008, 148 (1-2) : 81-88.
- [12] Sengupta S, Onodera K, Lai A, et al. Molecular detection and identification of influenza viruses by oligonucleotide microarray hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41 (10) : 4542-4550.
- [13] Shchepinov MS, Case-Green SC, Southern EM. Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (6) : 1155-1161.
- [14] Eklund AC, Turner LR, Chen P, et al. Replacing cRNA targets with cDNA reduces microarray cross-hybridization. *Nature Biotechnology*, 2006, 24 (9) : 1071-1073.

Microarray for detecting and subtyping of circulating influenza A virus

Xihan Li^{1*}, Yu Wang^{2,3}, Fangzheng Liu^{2,3}, Hongwei Gu¹, Yonghua Yang¹

(¹Institute of Virology, State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

(²Taizhou Affynigen Biotechnologies, Inc., Taizhou 225300, China)

(³Taizhou Institute of Virology, Taizhou 225300, China)

Abstract: [**Objective**] We designed and characterized an oligonucleotide microarray for detecting and subtyping of circulating influenza A virus including subtypes H1N1, H1N2, H3N2, H5N1 and H9N2. [**Methods**] Based on the sequences of influenza A viruses obtained from the Influenza Virus Resource database of National Center for Biotechnology Information, 46 oligonucleotides probes and one quality control probe were designed to fabricate the microarray. The full-length cDNAs of hemagglutinin and neuraminidase genes were amplified by RT-PCR using universal primers, and the resulting PCR products were labeled and fragmented using *Klenow* fragment before hybridized with the microarray. A total of 18 different influenza A virus strains representing 5 subtypes and 186 clinical samples were used to validate the specificity and sensitivity of the microarray. [**Results**] All 18 strains were accurately detected and subtyped by the microarray and no cross hybridization could be detected. The limit of detection for the microarray was approximately 1×10^4 gene copies of in vitro transcribed RNA. Of the 186 clinical samples, 8 were successfully subtyped as H1N1 and 4 were subtyped as H3N2. [**Conclusion**] The results show that the microarray is a useful diagnostic method with high specificity and sensitivity, and could be used for influenza surveillance.

Keywords: Influenza A virus; microarray; diagnostic

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Grant for Technology R & D Program of Jiangsu Province (BG20077035)

* Corresponding author. Tel/Fax: + 86-25-83594374; E-mail: xihanli81@ yahoo. com. cn

Received: 3 August 2009 / Revised: 6 November 2009