

采用基因微阵列技术对常见呼吸道病毒进行检测的初步研究

孙梅生¹, 王征², 周蕊¹, 马学军¹, 舒跃龙¹, 侯云德¹

(1. 中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所, 北京 100052;

2. 病毒生物技术国家工程研究中心 北京金迪克生物技术研究所, 北京 100176)

摘要:建立一种高通量的基因微阵列检测技术,对常见呼吸道病毒感染进行监控。根据公开发表的8个病毒科38种常见呼吸道病毒的序列,计算其保守区域,设计病毒的特异性检测探针,制备呼吸道病毒检测基因微阵列。利用随机引物PCR方法标记样品中的病毒靶序列,标记产物与基因微阵列上的探针杂交、清洗、扫描后进行结果分析。采用流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒和风疹病毒作为报告病毒,并对80例上呼吸道感染患者的咽拭子标本进行验证测试。初步结果表明,该呼吸道病毒微阵列基因芯片检测是可行的,在利用基因微阵列技术对病毒监控方面进行了有益的尝试,得到了有经验的信息。

关键词:呼吸道病毒;基因微阵列;病毒监控

中图分类号:R373.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8721(2005)06-0416-06

呼吸道病毒是指一组能引起急性呼吸道感染的病毒,并不是病毒分类学上的名称。常见的呼吸道病毒有正粘病毒科的流感病毒,副粘病毒科的副流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、呼吸道合胞病毒,以及腺病毒、冠状病毒、风疹病毒、呼肠病毒等。据统计,在急性呼吸道感染中,90%以上是由病毒引起的,大多数急性上呼吸道感染具有感染力强、传播快、潜伏期短、发病急、以呼吸道局部免疫为主,感染后免疫力不持久等特点。呼吸道病毒病是人类传染病中发病率最高、最为常见的疾病,在我国公共卫生中具有重要地位。无论是1918年的流感大流行,还是2003年春季的SARS-CoV暴发,都对人类社会造成了巨大的损失和破坏。呼吸道病毒感染是以空气或飞沫形式传播的,病毒种类繁多,症状相似,临床上很难鉴别,因此,如何对主要呼吸道病毒感染进行检测和监控一直是一项重要的研究热点^[1]。

基因微阵列技术作为一种高通量的检测新技术,可以同时检测数以万计的生物分子,现在已经广泛应用于各个方面,其中包括病原生物的监控和诊断^[2-5]。针对呼吸道病毒种类繁多的特点,建立一种基因微阵列检测技术,对重要呼吸道病毒感染进

行检测和监控,可以实现对多种病毒同时平行监控,具有特异和快速筛选的特点。

材料与方法

1 病毒及病毒培养 流行性感冒病毒A/PR/8/34(H1N1)株(本室保存),接种9日龄鸡胚尿囊腔0.2ml/枚,33℃培养48h后冷冻过夜,收获尿囊液。将收获的病毒液接种MDCk细胞,做空斑形成单位(PFU)试验标准化感染性病毒颗粒数。史克必成有限公司的麻疹、腮腺炎、风疹联合减毒疫苗由Schwarz麻疹病毒株、RIT4385流行性腮腺炎病毒株(来自Jeryl Lynn株)和Wistar RA 27/3风疹病毒株组成。病毒含量分别是Schwarz麻疹病毒 $10^{3.0}$ 半数组织培养感染量(TCID₅₀),RIT4385流行性腮腺炎病毒为 $10^{3.7}$ TCID₅₀,Wistar RA 27/3风疹病毒为 $10^{3.0}$ TCID₅₀。

2 探针设计合成 根据GenBank数据库,将多条同种病毒基因序列导入到Clustal X(1.81)软件中进行比对,选取同源性一致的序列,作为备选探针。每条探针再进行BLAST比对,根据比对结果的分值大小不同排列,选取病毒特异性好的探针。同时对设计好的探针进行T_m值计算,T_m值在75±2设计为优选。在上海博亚生物技术有限公司合成探针,并在5'端进行氨基修饰。

3 基因微阵列制备 根据GeneMachines公司提供的操作手册对OmniGrid Microarrayer调试。设计程序,进行点样。点样结束后80℃干烤2h固定探针,室温干燥,避光保存。微阵列醛基化修饰玻片购自美国CEL公司。

4 病毒核酸提取、扩增、标记和纯化 分别用流行性感冒病毒,麻、风、腮三联减毒活疫苗,以及4种病毒混合物作为靶病毒,用QIAGEN公司的QIAamp Viral RNA Mini Kit提取病毒RNA。敏感性实验设计是分别将4种病毒按已经标定好的病毒量,采取梯度稀释并提取相应的病毒核酸的方法。

收稿日期:2005-05-19;修回日期:2005-07-25

基金项目:国家863高技术研究发展计划(2004AA2151421);科技部重大专项禽流感防治研究[2004BA519A47,2004BA519A34(加强)];973计划重要生物恐怖病原特异核酸标识研究(2002CB513202)。

作者简介:孙梅生(1971-),男,吉林人,博士研究生,从事病原生物学研究。

责任作者:舒跃龙,马学军,E-mail:maxj2004@yahoo.com.cn

流行性感冒病毒 PR8 (H1N1) 株病毒液分别采用尿囊液原液、 10^3 PFU、 10^2 PFU、 10 PFU 和 1 PFU 梯度稀释,麻、风、腮三联减毒活疫苗的梯度稀释为 $10^{3.0} \sim 10^{-8}$ TCID₅₀。逆转录采用 Invitrogen 公司的 Superscript 试剂盒,病毒核酸采用 Round A B C 随机引物扩增、标记^[2]。A 步骤随机引物序列为 5 - GTTTCCTCA GTAGGTCTC NNNNNNNN - 3 ,B 步骤引物为 5 - GTTTCCTCA GTAGGTCTC - 3 ,C 步骤用荧光染料 Cy3 或 Cy5 直接掺入标记,具体步骤详见参考文献^[2,3]。标记产物用 QIAGEN 公司的 QIAQUICK PCR PURIFICATION KIT 纯化,操作按其说明书进行。纯化产物经真空浓缩后溶于 10 μ l 杂交液中。

5 基因微阵列杂交、清洗 把杂交混合物小心滴加到制备好的微阵列矩阵上,覆盖 Sigma 杂交用盖玻片,置于杂交舱中,42 $^{\circ}$ C 水浴避光杂交 6~8 h。0.2% SDS 和 H₂O 各清洗 2 次,每次 5 min。离心晾干。

6 扫描、提取数据及分析 用 Axon 公司的 GenePix 4100A 扫描仪扫描微阵列,用 GenePix Pro5.0 软件提取数据并进行分析。

7 上呼吸道感染患者咽拭子验证测试 50 例咽拭子标本来源于北京友谊医院儿科呼吸科住院患儿,以发热、头痛和咳嗽为主要症状,临床诊断为上呼吸道感染。标本采集时间为 9~10 月,取自患儿咽部分泌物。标本采集后接种细胞,同时做免疫荧光,提供做基因微阵列测试的是有细胞病变并经过免疫荧光初步鉴定的标本。另有 30 例咽拭子标本来源于 2003 年 9 月海军总医院发热门诊,以发热、咳嗽为主要症状。标本在基因微阵列检测前未做任何其它检验。标本检测工作在 P3 实验室进行。使用 QIAamp UltraSens Virus Kit 进行病毒核酸提取、扩增,基因微阵列检测。剩余标本存放在 -70 $^{\circ}$ C 冰箱内保存。对呼吸道咽拭子标本同时使用已公开发表的经过验证的引物序列(表 2)进行平行的 PCR/RT-PCR 检测。对 PCR 产物测序进一步确证。

结 果

1 常见呼吸道病毒的选择及病毒特异性检测探针的设计

根据目前已知的可以通过呼吸道传播的病毒及

其特点,选择以下病毒作为常见呼吸道病毒检测基因微阵列的目标病毒,具体见表 1。

表 1 常见呼吸道病毒检测微阵列包括的检测病毒种类

Table 1 The viruses selected for detection by respiratory virus DNA microarray

Virus Family	Virus Genus
Orthomyxoviridae	Influenza A B C
Paramyxoviridae	Human parainfluenza virus 1 - 5 Sendai virus Measles virus Mumps virus Human respiratory syncytial virus Metapneumovirus
Togaviridae	Rubella virus
Coronaviridae	Human coronavirus 229E Human coronavirus OC43
Picornaviridae	SARS virus Rhinovirus Coxsackievirus ECHO virus
Adenoviridae	Adenovirus
Herpesviridae	Human herpesvirus 6

针对表 1 所示病毒设计不同的特异性检测探针,38 种病毒共设计 350 条探针,每条探针长 40nt,每条探针的 Tm 值为 (75 \pm 2)。质控靶为人工合成拟南芥 40mer 长序列,相应质控(QC)探针为其互补序列。

2 用于验证的 PCR/RT-PCR 引物序列

公开发表的可用于本实验验证的引物见表 2。

3 微阵列制备

根据探针数目,每条探针重复点样 3 次,设计出点样矩阵,生成程序,点样。甲型流感病毒和麻、风、腮病毒测试微阵列单独设计。全呼吸道病毒基因检测微阵列包括质控(QC)和阴性对照点共计 1 200 点,30 个点为一行,共 40 行,包括 38 种病毒的 350 条探针,其中 32 种病毒每种优选探针 10 条,点为一行,其余 6 种病毒每种优选探针 5 条,2 种病毒的探针点为一行。

表 2 公开发表的可用于本实验验证的引物

Table 2 The published primer set for the identification of viruses

Virus	Gene	Sequence of primer	Reference
Influenza A	M	F: A G A T G A G T C T T C T A A C C G A G G T C G R: C A A A G C G T C T A C G C T G C A G T C	J Clin Microbiol, 2002 Sep, 40(9):3256 - 3260.
Influenza B	NS	F: A T G G C C A T C G G A T C C T C A A C R: T G T C A G C T A T T A T G G A G C T G	J Clin Virol, 2004 Mar, 29(3):179 - 188.
Respiratory syncytial virus	F1	F: T T A A C C A G C A A A G T G T T A G A R: T G T T A T A G G C A T A T C A T T G A	J Clin Microbiol, 1999 Jan, 37(1):1 - 7.
Parainfluenza - 3	NCR	F: A G A G G T C A A T A C C A A C A A C T A R: T A G C A G T A T T G A A G T T G G C A	J Clin Microbiol, 1999 Jan, 37(1):1 - 7.
Adenovirus	hexon	F: A T G A C T T T T G A G G T G G A T C C C A T G G A R: C C C G A G A A G G G C G T G C C C A G G T A	J Clin Microbiol, 1999 Jan, 37(1):1 - 7.

4 病毒核酸扩增标记

靶病毒 RNA 提取后,经过随机引物逆转录, Round A B C 随机引物扩增、标记荧光染料。图 1 为 B 步骤随机扩增产物琼脂糖电泳结果,扩增出 250~1 000bp 长度不等的片段混合物。不同靶病毒扩增电泳结果相同,均以 500~750bp 扩增产物浓度最高。

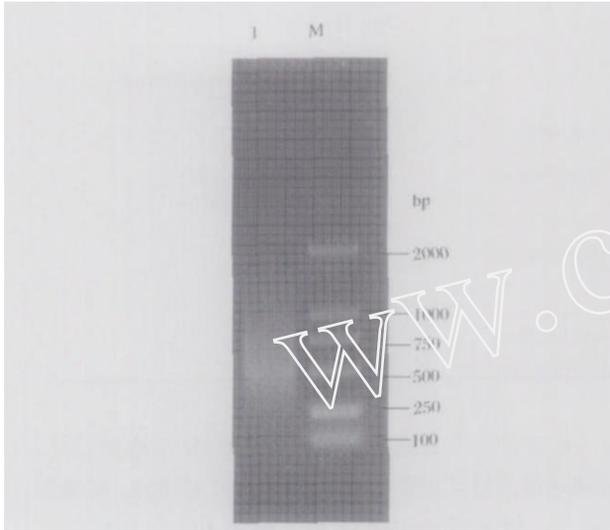


图 1 随机引物扩增病毒核酸产物

Figure 1 Random PCR products of target virus

1. The PCR products of target virus ;M. DNA marker.

标记好的病毒核酸加入杂交液后与呼吸道病毒检测基因微阵列探针进行杂交,杂交后通过清洗去掉未杂交的核酸,最后用微阵列扫描仪进行扫描获得探针信号强度。以甲型流感、麻、风、腮 4 种混合病毒为靶标杂交,经微阵列扫描仪显示为彩图结果(图 2)。

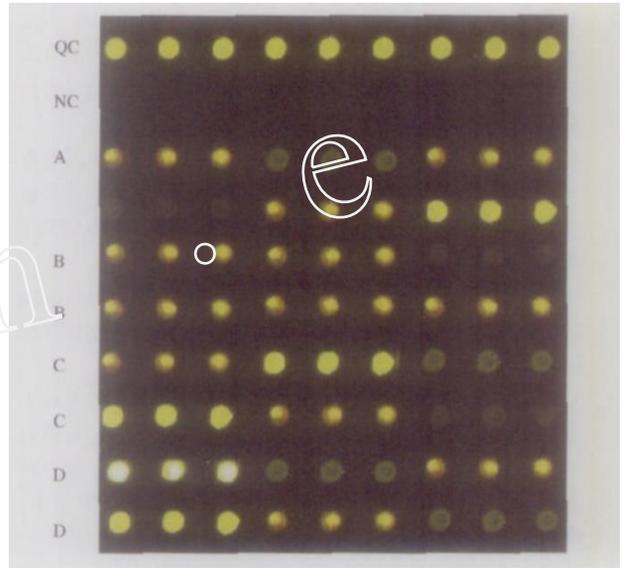


图 2 靶病毒核酸杂交结果

Figure 2 The hybridization results of target viruses

QC. Quality control probes ; NC. Negative control ;

A. Influenza A virus probes ; B. Measles virus probes ;

C. Rubella virus probes ; D. Mumps virus probes.

5 基因微阵列杂交结果

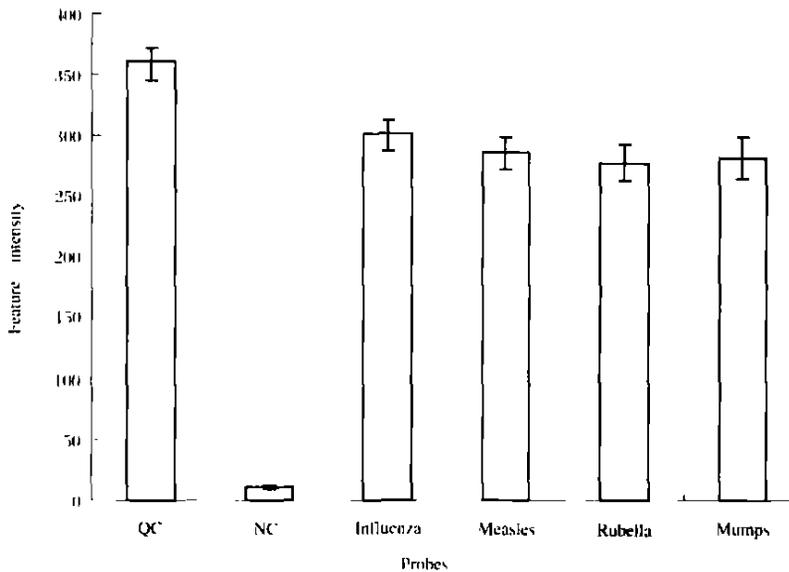


图 3 靶病毒为 4 种病毒混合物时各种病毒杂交信号强度比较

Figure 3 The feature intensity of different viruses when the targets are mixture of influenza virus , mumps virus , rubella virus and measles virus

6 杂交结果分析

通过 GenePix Pro 5.0 软件分析每个探针点的荧光信号。该软件具有自动识别信号功能,可确定探针名称、位置和信号荧光强度。荧光信号相对强度是每个点的杂交荧光信号强度中值减去背景荧光信号强度中值,通过已知病毒杂交结果,统计处理后,阳性点定义为质控点,杂交信号工作正常时,信号强度必须大于阴性点信号强度 4 倍以上。如靶标为甲型流感病毒时,选取麻疹、风疹、腮腺炎病毒探针信号强度与其信号值进行比较,甲型流感病毒探针的阳性信号强度应高于阴性对照和其它对照病毒的 4 倍以上。实验表明,甲型流感病毒,麻、风、腮三联减毒活疫苗,以及 4 种病毒混合物作为靶病毒的杂交信号均满足阳性信号标准。图 3 仅显示了当靶病毒为 4 种病毒混合物时各种病毒杂交信号强度的结果,表明可以同时监测 4 种病毒。

7 敏感度结果

通过梯度稀释病毒,测定了病毒基因微阵列敏感度,图 4 为敏感度杂交结果。根据阳性点判定标准:流行性感冒病毒基因微阵列敏感度可以达到 2 个 PFU 的病毒感染量。麻、风、腮三联减毒活疫苗基因微阵列敏感度麻疹病毒可以达到 10^{-4} TCID₅₀, 风疹病毒可以达到 10^{-5} TCID₅₀, 腮腺炎病毒可以达到 10^{-5} TCID₅₀。

8 上呼吸道感染患者咽拭子标本基因微阵列芯片检测与常规 PCR/ RT-PCR 检测结果的比较

上呼吸道感染患者咽拭子标本内可能含有 DNA 病毒或 RNA 病毒或两者均有, QIAamp UltraSens Virus Kit 可同时提取病毒的 DNA 和 RNA,经扩增、标记、杂交、结果判读等一系列基因微阵列检测实验,同时对临床样本使用病原体特异引物进行 PCR/ RT-PCR 平行验证,对 PCR 产物测序进一步

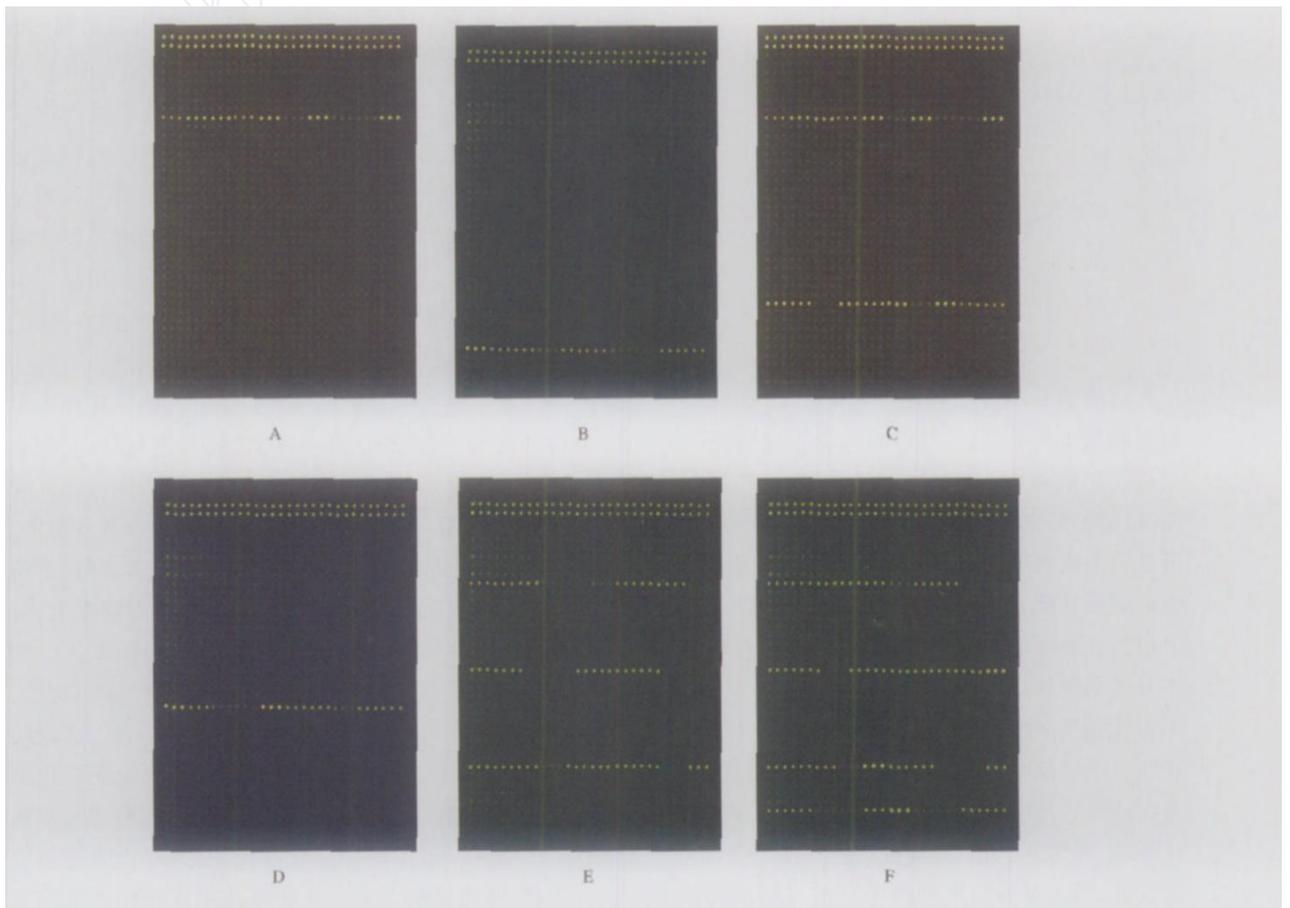


图 4 呼吸道咽拭子标本杂交结果示例

Figure 4 The hybridization results of throat swab specimens

A. Influenza A virus positive; B. Parainfluenza virus 3 positive; C. Influenza A virus + Adenovirus positive; D. SARS-CoV positive; E. Influenza A virus + Adenovirus + Respiratory syncytial virus positive; F. Mixture of Influenza A virus, Adenovirus, Parainfluenza virus 3, Respiratory syncytial virus positive.

确证。图 4 为部分标本杂交结果示例。表 3 为 50 例上呼吸道感染患者咽拭子标本免疫荧光(友谊医院提供)、PCR/RT-PCR 和基因微阵列杂交结果比较,基因微阵列杂交阳性的标本,PCR/RT-PCR 验证全部符合。海军总医院提供的 30 例呼吸道咽拭子标本中,基因微阵列检测腺病毒阳性 1 例,乙型流感病毒阳性 1 例,冠状病毒(SARS-CoV)阳性 1 例,PCR/RT-PCR 验证全部符合。

表 3 50 例上呼吸道患者咽拭子标本免疫荧光、PCR/RT-PCR 和基因微阵列杂交结果比较

Table 3 Comparison of immunofluorescence assay, PCR/RT-PCR and DNA microarray results of 50 throat swab specimens

Virus	PCR/RT	DNA	Immunofluorescence
	-PCR	microarray	assay
Influenza virus A	8	7	7
Influenza virus B	6	6	0
Human parainfluenza virus 3	2	2	2
Human respiratory syncytial virus	16	15	14
Adenovirus	8	8	6
Influenza A + Adenovirus + RSV	1	1	0
Influenza A + Adenovirus	3	3	2
Positive	44	42	31
Negative	6	8	19
Total	50	50	50

讨 论

目前病毒的检测技术主要基于三个方面:一是通过病毒培养检测;二是检测病毒的抗原或者抗体;三是检测病毒核酸^[6-7]。病毒核酸的检测具有快速、敏感的特点,在病毒的检测中越来越受到重视。但是目前所有的核酸检测方法的缺点是不能同时检测多种病毒。虽然人们采用多重 PCR 的方法可以对几种病原生物进行检测,但是由于 PCR 方法本身的局限性,多重 PCR 最多只能针对 10 个靶标,不可能实现对病原生物高通量的检测。基因微阵列检测技术的原理是基于核酸碱基配对的原则,同时基因微阵列检测技术又结合了类似电子微阵列的集成原理,通常在 1cm² 的支持物上可以结合成千上万条探针,因此基因微阵列技术同时可针对靶标多点检测,具有任何其它技术所无法比拟的优势。

由于引起呼吸道感染的病毒种类繁多,就目前已知的就有几十种。为了实现对多种呼吸道病毒的同时监控,我们通过对现有的呼吸道病毒基因组及基因片段核酸序列信息进行分析比对,设计了针对

各种呼吸道病毒的特异性检测探针,通过基因微阵列技术实施监控。该文分别用流感、麻疹、腮腺炎、风疹和 4 种病毒混合物作为报告病毒,建立了基因微阵列技术平台,并初步应用于临床标本中病毒的检测,证明特异性的病毒探针可以区分不同病毒,特异性较强,表明该技术可以用于病毒的监控。探针特异性是基因微阵列技术的一个优势,多条探针阳性可以弥补个别探针的交叉反应(cross-hybridization),通过设计多条探针可以提高检测靶病毒的特异性。本文临床标本的检测结果表明,每种病毒用 10 条优选探针可以满足监测需要,大部分探针杂交效果较好,少部分可能由于靶基因数量少和探针设计等原因,无杂交信号,需要进一步优化。通过随机引物扩增标记法可以同时多种病原生物进行标记,而不需要针对每种病原生物设计特异性引物,避免了多重 PCR 的限制^[8-12],这样从真正意义上解决了高通量检测技术的瓶颈。

检测基因微阵列灵敏度针对鼻病毒可达到 100 个病毒拷贝^[2],对肾综合征出血热病毒可达到 10⁻⁶ TCID₅₀^[13]。该文建立的基因微阵列技术检测流行性感病毒病毒的灵敏度可以达到 2 个 PFU 的病毒感染量。麻、风、腮三联减毒活疫苗基因微阵列灵敏度麻疹病毒可以达到 10⁻⁴ TCID₅₀,风疹病毒可以达到 10⁻⁵ TCID₅₀,腮腺炎病毒可以达到 10⁻⁵ TCID₅₀。由于判定标准每个系统各不相同,国际上还没有统一的标准,所以灵敏度并没有严格的可比性。

该文建立的基因微阵列技术在检测临床标本中也可以初步筛选病原体种类,同时通过 PCR/RT-PCR 进一步验证,测序证明病原体的基因特征。某些标本 PCR/RT-PCR 阳性而基因微阵列并未检出,可能由于微阵列技术复杂,影响因素较多,降低了检出率。12% (6/50) 的标本两种技术均未能检出,可能是因为样本处理不好、灵敏度不够或病原体类型超出检测范围等原因。呼吸道咽拭子标本来自北京友谊医院儿科呼吸科上呼吸道感染住院患儿,腺病毒、流感病毒、呼吸道合胞病毒和副流感病毒检出率较高,而鼻病毒却未检出,与临床上引起呼吸道症状较重的病毒谱相吻合。鼻病毒一般只引起普通感冒症状,儿童感染少见^[11]。检测结果还与标本采集季节(9~10月)相关,没有某种病毒感染明显占优势,各种病毒感染呈散发。

基因微阵列的最大优势在于高通量,可以提供大量信息,所以应用于监测是最为适宜的,可以对未知新发病毒进行筛选。美国加州大学旧金山分校的

约瑟·迪里西教授利用病毒基因微阵列技术发现了 SARS 病毒^[2]。目前,检测微阵列技术由于技术、成本等方面还在不断发展中,该文建立的基因微阵列技术在探针设计、靶标富集、Round A B C 随机引物扩增标记、杂交过程和结果判读等方面尚需要进一步深入研究,以优化该系统,同时将应用于更多的不同来源的临床标本。本系统目前适用于呼吸道病毒种水平的监测,亚型微阵列工作正在进行中,使用特异性引物针对特定基因区域扩增,缩短探针长度,可增加亚型微阵列的特异性。相信随着基因微阵列技术的不断完善,新技术的不断应用,病毒基因微阵列系统在病毒的监测、环境微生物学和生物反恐等诸多方面将发挥更重要的作用。

参考文献:

- [1] 侯云德. 急性呼吸道病毒感染的病原学和防治[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2005. 6-10.
- [2] Wang D, Urisman A, Liu Y T, et al. Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays[J]. PLoS Biol, 2003, 1(2): 2.
- [3] Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, et al. Microarray - based detection and genotyping of viral pathogens[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(24): 15687 - 15692.
- [4] Wilson W J, Strout C L, DeSantis T Z, et al. Sequence - specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology[J]. Mol Cell Probes, 2002, 16(2): 119 - 127.
- [5] Straub T M, Chandler D P. Towards a unified system for detecting waterborne pathogens[J]. J Microbiol Meth, 2003, 53(2): 185 - 197.
- [6] 侯云德. 分子病毒学[M]. 北京:学苑出版社,1990. 313 - 326.
- [7] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京:科学出版社,2001. 137 - 177.
- [8] Gharizadeh B, Kaller M, Nyren P, et al. Viral and microbial genotyping by a combination of multiplex competitive hybridization and specific extension followed by hybridization to generic tag arrays[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(22): 146.
- [9] Cherkasova E, Laassri M, Chizhikov V. Microarray analysis of evolution of RNA viruses: evidence of circulation of virulent highly divergent vaccine - derived polioviruses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(16): 9398 - 9403.
- [10] Talla E, Tekaia F, Brino L, et al. A novel design of whole - genome microarray probes for *Saccharomyces cerevisiae* which minimizes cross - hybridization[J]. BMC Genomics, 2003, 4(1): 38.
- [11] Sengupta S, Onodera K, Lai A, et al. Molecular detection and identification of influenza viruses by oligonucleotide microarray hybridization[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10): 4542 - 4550.
- [12] 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(2): 696 - 704.
- [13] 朱进,陶开华,操敏,等. 基因芯片技术检测肾综合征出血热病毒核酸的研究[J]. 中国病毒学, 2004, 19(1): 79 - 81.

A Study of Respiratory Viruses Monitored by DNA Microarray Method

SUN Mei-sheng¹, WANG Zheng², ZHOU Rui¹, MA Xue-jun¹, SHU Yue-long¹, HOU Yun-de¹

(1. National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China;

2. Beijing Jindike Bio - tech Institute, National Engineering Center for Viral Biotechnology, Beijing 100176, China)

Abstract: In this study, we established a high throughput DNA microarray detection method for monitoring of respiratory viruses. Respiratory viruses include 8 viral families and 38 viruses were selected for this study. Specific detection probes for each virus were designed by comparing the conserved sequences of each virus. The respiratory virus detection DNA microarray was prepared according to the probes. The nucleic acids of the selected viruses were amplified and labeled by random-primer PCR method, and then were hybridized with the respiratory virus detection DNA microarray. The microarray were scanned after hybridization and washing, and the results were analyzed. Using influenza virus, mumps virus, measles virus and rubella virus to test the respiratory virus detection DNA microarray, and 80 throat swab specimens as a testing samples were also detected. The results showed that the selected viruses can be detected by this method. So, DNA microarray method can effectively monitor the respiratory viruses.

Key words: respiratory virus; DNA microarray; viral monitor

Responsible authors: SHU Yue-long, MA Xue-jun, E-mail: maxj2004 @ahoo. com. cn