

应用 RT-PCR 制备登革病毒诊断基因芯片探针

肖维威¹, 马文丽¹, 黄吉城², 郑夔², 郑文岭³

(1. 第一军医大学 分子生物学研究所, 中国广东 广州 510515; 2. 广东省疾病预防控制中心 微生物检验所, 中国广东 广州 510300; 3. 广州军区广州总医院 肿瘤分子生物学研究所, 中国广东 广州 510010)

摘要: 根据 GenBank 数据库中的生物信息, 利用 BLAST 免费分析软件找出 4 种型别登革病毒的保守序列及各型特异性序列, 针对上述序列设计引物经 RT-PCR 扩增登革病毒的特异片段, 利用此 RT-PCR 法收集探针是一种快速、简便制备基因芯片探针的实用方法。

关键词: 登革病毒; 逆转录; 聚合酶链反应; 探针

中图分类号: R512.62; Q75

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2004)01-0067-04

Probe Preparation for Diagnostic Microarray in Detection Dengue Virus by RT-PCR

XIAO Wei-wei¹, MA Wen-li¹, HUANG Ji-cheng², ZHENG Kui², ZHENG Wen-ling³

(1. Institute of Molecular Biology, First Uniform Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China;

2. The Centers for Disease Control and Prevention of Guangdong Province, Guangzhou 510300, Guangdong, China;

3. Institute of Molecular Oncology, Liu Hua Qiao Hospital, Guangzhou 510010, Guangdong, China)

Abstract: To develop the microarray probes for detection of the 4 serotypes of dengue virus by RT-PCR. The genomes were and sequence alignment was done by using BLAST biosoftware and data from Genebank to find the specific sequences. According to the specific sequences, 18 pairs of primers were designed with the Oligo6.4 program to amplify the specific fragments of dengue virus. The amplified fragments were cloned and sequenced. The method of preparing microarray probes by RT-PCR was effective, quick and simple.

Key words: dengue virus; reverse transcription; polymerase chain reaction (PCR); probe

(Life Science Research, 2004, 8(1): 067 ~ 070)

登革病毒(dengue virus, DV)是一种 RNA 病毒, 根据抗原性分为 1、2、3、4 四种血清型。在临床上登革病毒感染可引起登革热(dengue fever, DF)、登革出血热(dengue hemorrhagic fever, DHF)或登革休克综合症(dengue shoke syndrome, DSS)^{11,21}。近20年来, 不同型别的登革病毒在我国南方

广东、广西、海南、香港、台湾等地循环流行, 给广大人民的身体健康和工作生活造成了严重的影响。目前对 DF、DHF 或 DSS 尚无有效的治疗和预防方法, 因此对该类疾病实行早期诊断显得尤其重要。近几年兴起的基因芯片技术是一种新型的基因分析与检测技术, 它为该类疾病的诊断提供了

收稿日期: 2003-10-31; 修回日期: 2004-02-18

作者简介: 肖维威(1974-), 女, 湖南双峰人, 第一军医大学博士研究生, 从事基因芯片技术与分子生物学研究, Tel: +86-020-61640114 转 89097, E-mail: xweiwei@finmu.com.

一种快速、高效、敏感、自动化的方法。本研究以 DV1-4 型基因组 RNA 为材料, 经 RT-PCR 快速扩增各型登革病毒特异的 cDNA 片段, 作为对登革病毒进行快速诊断及基因分型的基因芯片探针。

1 材料与方 法

1.1 材 料

DV1-4 型基因组 RNA 由广东省疾病预防控制中心提供; 受体菌大肠杆菌 TOP10 由本研究所保存; pMD18-T Vector、AMV 逆转录酶、Rnase 抑

制剂、普通 PCR 试剂及分子量 Marker DL2000 购自大连宝生物工程有限公司

1.2 方 法

1.2.1 引物设计

从 GenBank 数据库获取 4 种型别登革病毒的 cDNA 全长序列, 利用美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 中的 BLAST 免费分析软件找出各型登革病毒的特异性序列。针对上述特异性序列利用生物学软件 Primer Premier 5.0 设计引物 (见表 1), 采用本研究所的 ABI 3900 DNA 合成仪合成。

表 1 扩增各型登革病毒的特异性引物

Table 1 Oligonucleotide primers used to amplify specific fragments of dengue virus

	引物 Primer	位置 Location	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	RT-PCR 产物 Products/ bp	
DV-1	P1	1348-1365	AGTGATAGTCACCGTACA	170	
	P2	1500-1517	CATTAAGTCTAGCCCTG		
	P3	3696-3715	ACCTAGCTTTGATGGCCACT		
	P4	3845-3862	TCATGATGCCCATTTGCAA	177	
	P5	4122-4140	GAAGGAAAAGCTGGCCTCT	179	
	P6	4283-4300	AGCCGCTTTCTCCAGTGA		
	P9	4812-4832	TTGCTGTTGAACCGGGGAAGA		
	P10	4905-4925	CAGAGTTGCCGGTTTAAAGT		
	DV-2	P11	1321-1340	ATTGTCCAGCCAGAAAACCT	114
		P12	1464-1483	TCGTAACAGTCCCATAGCCT	163
P13		3582-3601	AGTCGCAGTTTCTTTCGTAA		
P14		3791-3810	GAGAAGAACGATTCCATATGG	229	
P15		6360-6380	AAGAAAGTCCCTAACCCCTGAA		
P16		6521-6540	CAGCAAAAAGCAATGTCTCCA	181	
P17		2317-2337	GTTATCATCACATGGATAGGA		
P18		2452-2472	ACTGCCACATTTTATGTTCTTT	156	
P19		3841-3861	GAAC TGACCGATGCGTTAGCT	170	
P20		3990-4010	GAAACAGACACCACTGCCAAT		
DV-3	P21	1025-1044	GTGACTACCATGGCTAAGAA	127	
	P22	1132-1151	TTGAGTCCGTTGTTATGTTG		
	P23	3771-3790	ATTTA'ITGCTGGGAGTTGGG	155	
	P24	3906-3925	TAGGGAAACTAATGCCGTCC		
	P25	6417-6436	ACTTAGCCACAGAACGAGA	135	
	P26	6530-6551	TCAGTCCCAGGACTAAGAGTGT		
	P27	4754-4773	GGAGGATGGAGATTGACTGC	137	
	P28	4871-4890	ATTGCTCCTATTTCCCTGT		
DV-4	P29	1299-1318	TGTTGGGGAAGATAACAGG	187	
	P30	1465-1485	GTGTTAGTTCTCCATAGTCCG		
	P31	1901-1923	GGTGAAAGTCAAGTATGAAGGTG	122	
	P32	2003-2022	TGGTATTCTCAGCCAAAGGG		
	P33	3140-3121	CCAGATGCTCATTCCAAAAT	168	
	P34	3286-3307	CCTCTATGGTACAATCCTCCT		
	P35	4347-4365	CCAATCGTAGAAGTGAAGC	146	
	P36	4474-4492	AAGCTCATTGCTACTGGAA		
	P37	6362-6382	TGCCAGTGAAGGAAGAGTAT	137	
	P38	6473-6493	CTCCCTCCTTTTCTGTTGTG		

1.2.2 RNA 逆转录和 PCR 扩增

病毒 RNA 逆转录: 取 5 × RT Buffer 4 μl、10 mmol/L dNTP 2 μl、下游引物 25 pmol、AMV 逆转录酶 1 μl、RNA 酶抑制剂 8 U 及登革病毒 RNA 提取液 5 μl。混匀后 42 °C 保温 60 min。冰水中冷却 2 min。PCR 扩增: 上述逆转录反应液中加入 Taq 酶 2.5 U、上游引物 25 pmol、10 mmol/L dNTP 2 μl、94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 1 min 扩增 30 个循环。

1.2.3 电泳

用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳, DL2000 为分子量 Marker, 100 V 电泳 30 min。溴化乙锭染色, 紫外凝胶成像分析仪拍照。

1.2.4 AT 克隆

RT-PCR 产物经乙醇沉淀后, 用灭菌超纯水溶解, 再与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 TOP10, 涂平板, 37 °C 培养过夜。挑取平板上的阳

性克隆, 接种于含 0.5 ml LB 液体培养基及 100 mg/L 氨苄青霉素的 1.5 ml Eppendorf 管中, 37 °C 培养 5 h。取 100 μl 菌液在沸水中裂解 10 min, 离心沉淀菌体, 取上清作模板, 用 pMD18-T 载体引物 (SO100 5'-CTAAAACGACGGCCAGT-3', SO101 5'-CAGCAAACAGCTATGAC-3') 进行初步鉴定。

1.2.5 测序

将经 PCR 鉴定的阳性克隆进行序列分析, 测序结果用 Blast 检索软件进行序列比对。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增结果

应用各型特异性引物分别 RT-PCR 扩增 DV1-4 型国际参考株, 扩增产物电泳分析结果如图 1。从图 1(a) 和图 1(b) 可观察到扩增片断的大小与我们预期设计的片断大小相符, 表明我们设计的引物能特异性地识别相应的模板序列。

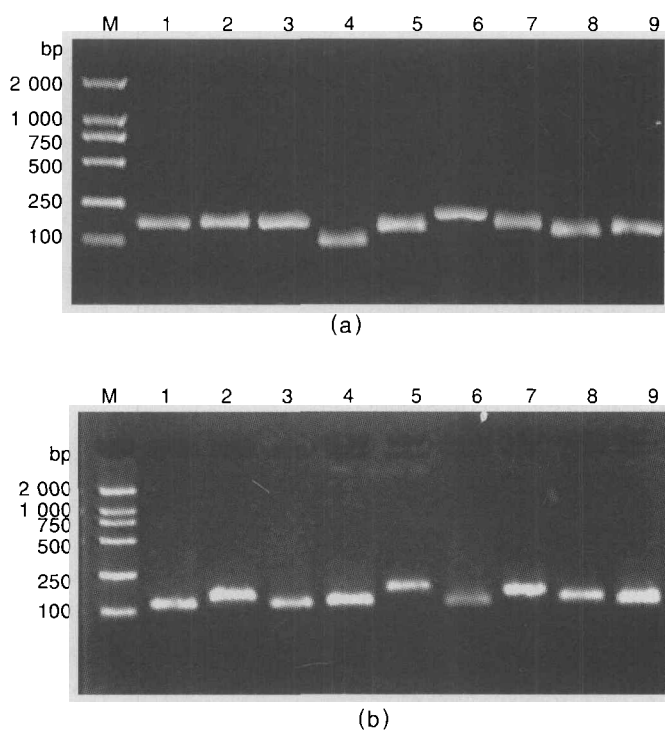


图 1 登革病毒 RT-PCR 产物电泳图

(a): Lane M: DL2000; Lane 1~9: 分别为引物 P1P2、P3P4、P5P6、P9P10、P11P12、P13P14、P15P16、P17P18、P19P20 的 RT-PCR 产物; (b): Lane M: DL2000; Lane 1~9: 分别为引物 P21P22、P23P24、P25P26、P27P28、P29P30、P31P32、P33P34、P35P36、P37P38 的 RT-PCR 产物。

Fig. 1 2.0% agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of dengue virus

(a): Lane M: DL2000; Lane 1~9: RT-PCR products with primer P1P2, P3P4, P5P6, P9P10, P11P12, P13P14, P15P16, P17P18, P19P20, respectively; (b): Lane M: DL2000; Lane 1~9: RT-PCR products with primer P21P22, P23P24, P25P26, P27P28, P29P30, P31P32, P33P34, P35P36, P37P38, respectively.

2.2 克隆序列分析

RT-PCR 产物经 AT 克隆后, 通过阳性克隆质粒的提取, 进行 DNA 序列分析. 将所有的 DNA 测序结果进行 BLAST 分析, 结果证明克隆均来自

于登革病毒. 图 2 所示为引物 P21P22 RT-PCR 产物克隆后 DNA 序列分析结果. 可见 DNA 序列图谱清晰, 可读性强, 可完整的读出 RT-PCR 插入的条带(45-172).

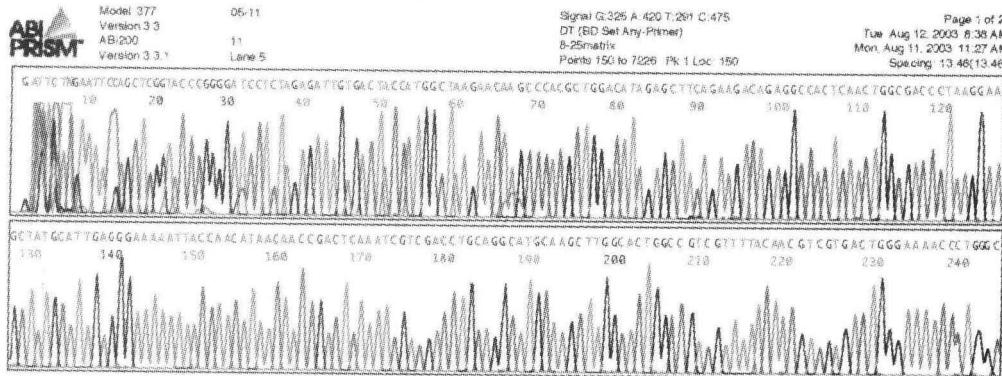


图 2 引物 P21P22 RT-PCR 产物克隆片段的测序结果

Fig. 2 Sequence analysis of the clone RT-PCR amplified by primer P21P22

3 讨论

登革病毒感染的检测, 过去主要依靠病毒分离和血清学检测. 病毒分离法费时繁琐, 至少需 1 周时间才能出结果, 达不到早期快速诊断的目的. 血清学诊断因存在广泛的交叉反应而受到干扰^[3]. 近年来倍受青睐的 RT-PCR 技术^[4, 5]虽简便、快捷, 但 PCR 反应中常出现的假阳性、假阴性结果, 严重影响了疾病的诊断与治疗. 而基因芯片技术的实质是通过核酸杂交来进行序列分析与基因检测, 可有效克服 PCR 法的不足, 是一种新型的现代化基因诊断技术.

在基因芯片的研制过程中, 探针的制备是最关键、最重要的一环. 从技术角度讲, 探针的制备有多种方法: 通过生物信息学分析找出特异性序列, 针对特异性序列设计寡核苷酸探针; 或针对特异性序列设计引物进行 PCR(或 RT-PCR) 扩增制备探针等等. 无论是采取何种方法, 设计或收集特异性的探针总是成功研制基因芯片、尤其是诊断芯片的关键^[6]. 因为探针的特异性是减少非特异性杂交, 提高检测准确性的根本保证. 在本研究中, 为确保探针的特异性, 我们首先采用生物信息学软件 (BLAST 检索软件) 对各型登革病毒实行全基因组序列比对, 挑选出各型与其它物种同源性最低的特异性序列, 然后再针对各型的特异

性序列设计引物进行扩增、收集探针. 从本实验的研究结果看, 利用 RT-PCR 法收集探针是一种快速、简便制备基因芯片探针的有效方法.

参考文献 (References):

- [1] 肖维威, 马文丽, 郑文岭. 登革病毒的基因组结构及其基因检测 [J]. 中华检验医学杂志 (XIAO Wei-wei, MA Wen-li, ZHENG Wen-ling. The genome structure of dengue virus and its gene detection[J]. Chin J Lab Med), 2003, 26 (3): 188-189.
- [2] KAUTNER I, ROBISIN M J, KUBNLE U. Dengue virus infection: Epidemiology, pathogenesis clinical presentation, diagnosis, and prevention[J]. J Pediatr, 1997, 131(4): 516-524.
- [3] SCHWARTZ E, MILEGUIR F, GROSSMAN Z, et al. Evaluation of ELISA-based sero-diagnosis of dengue fever in travelers [J]. J Clin Virol. 2000, 19(3): 169-173.
- [4] HARRIS E, SANDOVAL E, XET-MULL A M, et al. Rapid subtyping of dengue viruses by restriction site-specific(RSS)-PCR[J]. Virology. 1999, 253(1): 86-95.
- [5] DROSTEN C, GOTTIG S, SCHILLING S, et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg Viruses, Lassa Virus, Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, Rift Valley Fever Virus, Dengue Virus and Yellow Fever Virus by Real-Time Reverse Transcription-PCR[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(7): 2323-2330.
- [6] CUZIN M. DNA chips: a new tool for genetic analysis and diagnostics[J]. Transfus Clin Biol, 2001, 8(3): 291-296.