

# 中枢神经系统感染性疾病病原体检测 芯片的研究\*

庞靖祥 韩金祥\*\* 高雪芹 潘继红

(山东省医药生物技术研究中心 卫生部生物技术药物重点实验室 山东省现代医用药物与技术重点实验室 济南 250062)

**摘要** 目的:构建一种用于检测巨细胞病毒(CMV)、风疹病毒(RV)、单纯疱疹病毒 I 型(HSVI)、结核分枝杆菌(TB)、EB 病毒(EBV)五种病原体的寡核苷酸芯片,用于中枢神经系统疾病的常见病原体的病因学诊断,为临床治疗提供依据。方法:首先根据病原体的特异性蛋白的相关序列设计 70 mer 寡核苷酸长探针,选择特异性好的探针构建不同种属多种病原体的寡核苷酸芯片,用随机引物方法对靶基因进行生物素直接标记,标记产物与芯片杂交后再与 avidin-cy3 反应,对杂交阵列洗涤后扫描。采用该寡核苷酸芯片对临床样本进行检测并与 PCR 检测方法进行检测比较。结果:通过标准菌株检测证明该检测芯片具有很高的特异性。对临床标本的检测结果表明,该芯片检测体系只需要一次就可以完成对 5 种常见病原体的检测。与 PCR 法的检测结果相比,两种检测方法没有显著性差异( $>0.05$ ),且一致性较好(Kappa 值均大于 0.75),其特异度均在 95% 左右,敏感度均在 83% 以上。结论:构建的寡核苷酸芯片检测体系具有快速、方便、准确的特点,可以高通量的检测临床样本而无须进行细菌培养,为中枢神经系统重要病原体检测提供了一种有效工具。

**关键词** 中枢神经系统疾病 寡核苷酸芯片 巨细胞病毒 单纯疱疹病毒 风疹病毒 结核杆菌 EB 病毒

**中图分类号** Q81

中枢神经系统疾病是一种由多种病原体引起的严重威胁人类生命健康的病症,该种类型的疾病发病急,诊断困难,致死率高,这就要求对脑脊液中病原体进行快速准确的检测鉴定,以期早期采取有效的针对性治疗措施。由于不同的病原体感染,病变范围、程度相差悬殊,临床表现十分复杂,给诊断带来困难,长期以来病原体诊断主要依靠形态学检查、脑脊液细菌培养及组织学的方法,但脑脊液中病毒含量甚低,其病毒培养检测不但费时、费力,且敏感性和特异性很差,远远不能满足临床要求,造成该类疾病的死亡率居高不下或病后严重后遗症。为解决这一难题,该领域的工作者在细菌学、免疫学、分子生物学以及微生物学等领域做

了大量的工作,建立了许多新的病原体诊断技术。

以 PCR 技术为基础的各种分子生物学诊断技术,成为生物医学领域内最有价值的研究手段和病毒学诊断的金标准,已经广泛应用于临床标本的检测,为该类疾病的基因诊断带来了突破性进展。为从基因水平诊断脑脊液病原体奠定了基础,使建立一种早期快速的诊断方法成为可能。PCR 的方法能有效地提高病原体检测的敏感性,而且通过特殊的简并引物的设计能够平行、方便的检测多种病原体。但引起疾病的病原体往往是几种甚至几十种,这些病原体可能属于不同物种,有的不能完全表现出病原作用,且一些病毒不能进行体外培养,不断出现的病毒亚型也为病原体的检测设置了障碍,PCR 的方法虽然敏感性高,但可同时检测多种病原体的数量有限。而芯片技术的发展则提供了一种解决问题的途径<sup>[1,2]</sup>,本研究拟构建平行检测中枢

收稿日期:2008-01-22 修回日期:2008-03-25

\* 山东省科技攻关计划资助项目(2004GG2202150)

\*\*通讯作者,电子信箱:jinxianghan@163.com

神经系统感染的常见病原体的寡核苷酸芯片,并对其在临床标本的检测进行应用评价。

# 1 材料与方法

## 1.1 病原体标准株

CMV ( AD169 ), HSV I ( Stocker ), RV ( JR23 ), EBV( B95-8 ),由山东省医学科学院病毒所孟红老师惠赠,TB( H37Rv)由山东省胸科医院提供。

## 1.2 样本的收集

收集时间从 2006 年 10 月到 2007 年 11 月。其中结核分枝杆菌血液样本 74 例由山东省胸科医院提供,巨细胞病毒 65 例、单纯疱疹病毒 I 型 57 例、风疹病毒 24 例、EB 病毒 11 例血液样本由潍坊市人民医院及济南市中心医院提供。

## 1.3 核酸的提取及临床样本 PCR 扩增验证

用 TaKaRa 试剂盒从临床样本中提取核酸,并经 PCR 扩增验证,扩增程序为:PCR 体系总体积 25μl,其中 10 × bufer2. 5μl,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1. 5μl,10mmol/L dNTP 混合物 0. 5μl,20μmol/L 的上下游引物各 1μl,DNA 模板 5μl,rTaqDNA 聚合酶 0. 5μl,双蒸水 13μl,离心。扩增程序:94℃ 3 min,94℃ 30s,51℃ 45s。72℃ 1 min,共 34 cycles,最后 72℃ 延伸 10 min。琼脂糖凝胶

电泳,有相应目的带的样本判断为阳性样本。

## 1.4 引物、探针的合成及芯片的设计和构建

选择 CMV、RV、HSVI、TB、EBV 等 5 种病原体,根据其特异性蛋白从 GenBank 中找到其核酸序列,利用 Arraydesigner4. 0 软件根据相关病原体的序列设计 70mer 特异性的探针。共设计五对引物(表 1)、十条探针(表 2)。所有探针由上海博尚有限公司合成。选择 10 条有效探针用 3 × SSC 稀释成 20mmol/L,采用 Cartisan5500 点样仪将探针点至到氨基化修饰的玻片表面上,每个探针点 4 个重复,以 Tamara 修饰的探针为阳性对照,以乙脑探针为阴性对照,双蒸水为空白对照。每个对照也点四个重复,阵列上探针的分布如图 1 所示。

表 1 病原体检验的引物序列

Table 1 The primers of five pathogens		
Name	Primer sequence(5'-3')	Product size
CMV	CMV-F:GATCCCGTGGCTGCGCTCTT	298bp
	CMV-R:AGGATGCTGATTTCGCTTTG	
HSV I	HSV-F:CTGAGGACGTCGAGAAGGAC	284bp
	HSV-R:CGCACC AATACACAAAAACG	
RV	RVE1-F:GCAACACGCCGCACGGACAA	302bp
	RVE1-R:ACGCGCTGGGAGCCTATGA	
TB	TB-F:ACAACGGCTGGGATATCAAC	942bp
	TB-R:CCAAGATCATTGCCGACGAG	
EBV	EBV-F:CCCAGTCACCCTCCTACTCA	407bp
	EBV-R:TCGTGGTGCTGTTTCATCACT	

表 2 探针序列

Table 2 The sequence of probes

Probe name	Probe sequence(5'-3')
CMV	PP65 : NH2-(CH2)6-Poly (dT) 15
	CGTCTCACGGTCTCGGGACTGGCCTGGACGCGTCAGCAGAACCAGTGAAAGAGCCCCAGCTCTACTACA
	PP150 : NH2-(CH2)6-Poly (Dt) 15
HSV I	GAGCGGCAGAAACGGGTGGACGACGAGGTGCTGCAGCGTGAGAAACAGCAGCTGAAGGCTTGGGAGGAGA
	HSV1 : NH2-(CH2)6-Poly (dT) 15
	GACAAACCCAACCGTCCCGTAGTCCCATCCCCGATCCCAACAAC TCCCCGCGCGCCCCGAGACCAGTC
RV	HSV2 : NH2-(CH2)6-Poly (dT) 15
	CCCCGCTGTTCTCGTTCCTCACTGCCTCCCCGCGCTGGACACCTCTTCGTCGTCAGCACCGTCATCCA
	RV1 : NH2-(CH2)6-Poly (dT) 15
TB	CCACCGACACCGTATGAGCGTGTTCGCCCTCGCCAGCTACGTCCAGCACCCCTCACAAGACCGTCCG
	RV2 : NH2-(CH2)6-Poly (dT) 15
	CCCCGACTGGGCCCTCCCGGTTTGCCAACGCCATTCCTGACTGCTCGCGGCTCGTGCG
EBV	TB1 : NH2-(CH2)6-Pol (dT) 15
	GCCAAACATACCCGCCGAGTTCTTGAAGAACTTCGTTTCGTAGCAGCAACCTGAAGTTCAGGATGCGGTACA
	TB2 : NH2-(CH2)6-Pol (dT) 15
EBV	CTGCCAGACTTACAAGTGGGAAACCTTCCTGACCAGCGAGCTGCCGCAATGGTTGTCCGCCAACAG
	EBV1 : NH2-(CH2)6-Pol (dT) 15
	CGTCCCGTAGTCCCATCCCCGATCCCAACAAC TCCCCGCGCGCCCCGAGACCAGTCGCCCCGAAGACAC
EBV	EBV2 : NH2-(CH2)6-Pol (dT) 15
	CCACGACACACTGATGAACACCACCAGATGACTCCCTCCGCACCTCAACAAGCTACCGACGATTCTA

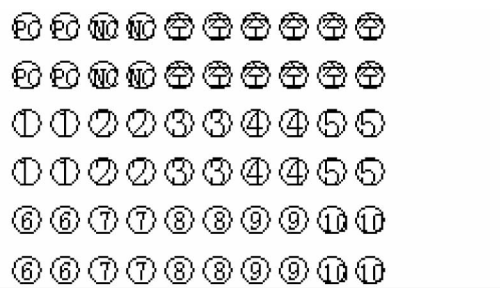


图1 阵列设计

Fig.1 Array Design

- ① and ⑥:CMV probe; ② and ⑦:HSVI probe;  
③ and ⑧:RV probe;④ and ⑨:TB probe;  
⑤ and ⑩:EBV probe

1.5 待测靶基因的随机引物标记

由于5种病原体的基因均是选择的特异性基因,因此如果用特异引物扩增需要用多重PCR,因此选用随机引物标记,避免优化扩增条件的麻烦,而用芯片的特异性杂交进行特异性检测。随机引物标记方法如下:目的片段用在0.2mlEP管中加入模板DNA 1μg, Random primer 2μl,补足水到14μl,95℃加热3min 迅速冰浴5min,加入1μl 10×buffer,0.2mmol/L dNTP mixture (dCTP:Biotin-11-dUTP = 1:4 比例混合) 5μl, 1μl Exo-free klenow fragment,37℃反应3h,65℃加热5min 使酶失活,95℃3min 迅速冰浴。

1.6 寡核苷酸探针的固定化与杂交

用5'端氨基修饰的探针溶于3×SSC中,采用Cartisan5500点样仪将探针点到到氨基化修饰的玻璃片表面上,在湿盒中进行水合温浴、过夜干燥、紫外交联、NaBH4还原、洗脱后4℃避光保存备用。将荧光标记的靶DNA序列溶于2×SSC(0.5% SDS、50%甲酰胺)杂交液中,取2μl标记的DNA溶液加到芯片的表面,用盖玻片压匀(小心不要有气泡):放入杂交盒中62℃杂交6~12h;取出后,先用2×SSC(0.2% SDS)冲洗2遍,再用2×SSC(0.2% SDS)冲洗2遍,最后用三蒸水清洗2min后800r/min离心5min,取2μl avidin-cy3到阵列表面,加盖玻片,在杂交盒中37℃ min,用2×SSC(0.2% SDS)冲洗2遍,最后用三蒸水清洗2min后800r/min离心5min。杂交后的结果采用Scanarray 4000扫描仪扫描,扫描参数为:激光强度100%,PMT100%。如果背景较高可以再用2×SSC洗1次。用Quantarray定量分析软件分析扫描图像的荧光强度。

1.7 种病原体检测的寡核苷酸芯片的临床应用评价

采用构建的长探针寡核苷酸芯片体系,对收集到的5种疾病的临床标本进行芯片检测,计算出每个阵列中阴性对照点4个重复点的平均值( $\bar{x}$ )和标准差(s),得出95%的参考范围( $\bar{x} \pm 2s$ )然后统计出每种探针的4个重复点荧光值的平均值,若此平均值高于 $\bar{x} - 2s$ 为阳性,低于 $\bar{x} - 2s$ 则为阴性。以PCR方法为参照,评价其检测的灵敏度及特异度。统计学分析采用SPSS15.0软件进行分析。

2 结果

2.1 引物的验证及探针的优化

通过相关文献报道及软件设计,选择5对引物、20条探针,设计好后根据试验性杂交结果作经验型调整至最佳,探针和引物详见表1、表2。

2.2 寡核苷酸微阵列对靶基因检测敏感性优化

以EBV B95-8为实验菌株,提取其基因组DNA,各取2μl作为模版进行荧光标记扩增,标记产物用核酸定量仪进行DNA定量,然后用双蒸水1:10定量稀释图2中按(a)~(e)浓度依次为1ng/μl,100pg/μl,10pg/μl,1pg/μl,0.1pg/μl,0.01pg/μl 6个浓度,与芯片杂交,结果显示在浓度为1pg/μl时,荧光强度值高于阳性点荧光值的-2s,显示其敏感性为1pg(图2)。

2.3 特异性的检验

分别用5种病原体的标准株对探针的特异性进行检验,每种病原体的杂交结果见图3,每种标准菌株均特异性的与其相应阵列上的特异性探针杂交,与阴性对照和其他4种病原体的探针均没有非特异的杂交,说明所设计的探针具有良好的特异性,可以用于芯片检图中探针的顺序依次为CMV探针、HSVI探针、RV探针、TB探针、EBV探针。

2.4 临床样本的检验结果

利用寡核苷酸芯片法对从医院收集的五种病原体临床样本进行检测,检测结果的代表图像如图4所示:A图为CMV样本检测结果,B图为HSVI样本检测结果,C图为RV样本检测结果,D图为TB样本检测结果,E图为EBV样本检测结果,F图为CMV临床阴性样本结果。

2.5 与PCR方法检验结果比较

以PCR作为实验室检测病原体的金标准,将临床样本用寡核苷酸芯片法检测结果与PCR法进行比较。检测结果如表3。

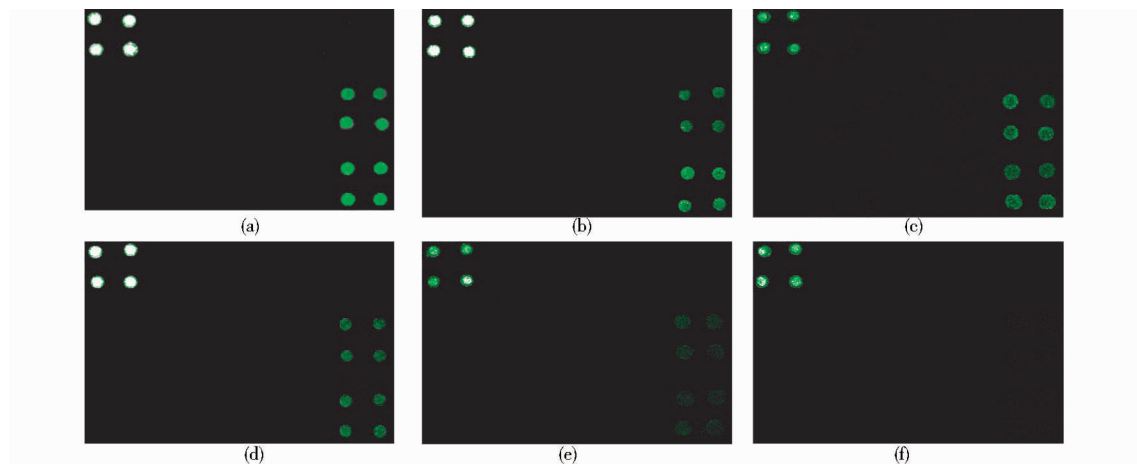


图 2 不同浓度的荧光标记产物的杂交结果

Fig. 2 The hybridization results with different concentration of fluorescent labelling product

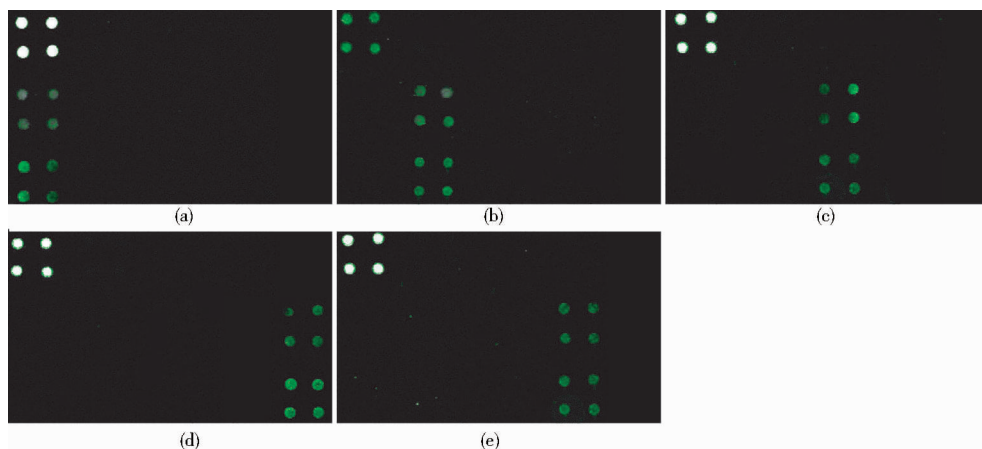


图 3 5 种病原体探针特异性检验结果

Fig. 3 The detection results of five specificity probes

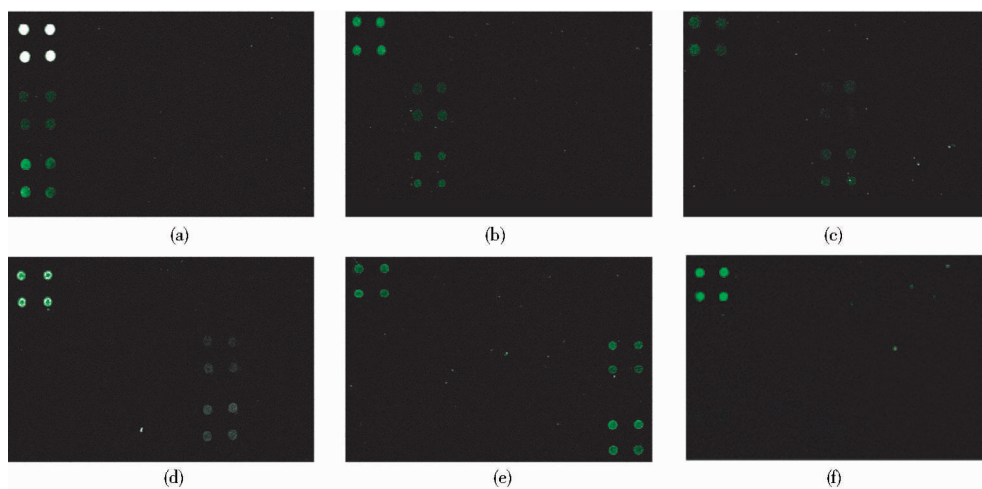


图 4 5 种病原体临床样本芯片法检验结果

Fig. 4 The detection results of five clinical samples with pathogens

表 3 两种方法检测分析结果

Table 3 The analytic result of two methods

	CMV		HSV1		RV		TB		EBV	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Pcr detection	47	18	39	18	13	11	41	33	32	10
Chip detection	45	20	37	21	9	15	36	38	32	10
Chi-square test	$\chi^2 = 0.167$		$\chi^2 = 0.250$		$\chi^2 = 2.250$		$\chi^2 = 1.778$		$\chi^2 = 0.500$	
	$p = 0.683$		$p = 0.617$		$p = 0.134$		$p = 0.182$		$p = 0.479$	
Kappa values	0.777		0.8376		0.7735		0.7575		0.8688	
sensitivity	88.9%		88.9%		84.3%		83.5%		90.0%	
specificity	91.5%		94.9%		100%		94.4%		96.9%	

a) Kappa >0.75, consistency is satisfactory; b) p >0.05, no significance

3 讨论

中枢神经系统(central nervous system,CNS)感染性疾病可以由多种病原体引起,其中包括细菌、病毒、真菌、寄生虫、螺旋体、朊毒体等),它可引起中枢神经系统各部位包括脑膜、脑实质(大脑、小脑、间脑、脑干等)、脊髓、蛛网等的炎症或病灶形成,该种类型的疾病往往发病急病情严重,病原学诊断困难。

鉴定和区分病原体是该类疾病的关键诊断方法。病原体的检测方法已经渐渐从微生物的宏观监测转变为对其蛋白和核酸成分的检测,随着技术的发展生物芯片检测在特异性及敏感性方面有了长足的进步,目前用于检测病原体的芯片技术多是基于病原体保守序列的16S序列来设计病原体的通用引物<sup>[3-5]</sup>,并用通用引物来扩增标记病原体的序列,但是这种方法无法克服种属相近的病原体非特异性杂交的干扰,容易出现假阳性的结果。

为了解决这一问题,实现对不同种属病原体的一次性平行检测,本实验通过设计一种70mer的长片段探针构建寡核苷酸芯片,用随机引物的方法对临床样本进行标记,可以有效的对导致中枢神经系统感染性疾病的不同种属的病原体进行检测。探针的设计是芯片制备的基础<sup>[6,7]</sup>,随着合成技术的进一步发展,长片段探针的合成已经不再是技术上的难题。与短片段相比长片段探针可以提供更高的信号强度,目前研究显示60mer的寡核苷酸探针与25mer的寡核苷酸探针相比敏感性有明显的改进,但是特异性明显降低,而70mer探针被证明在灵敏度和特异度两方面表现最佳<sup>[8,9]</sup>。人工设计的70mer寡核苷酸芯片具有更好的特异性和均一的T<sub>m</sub>值,可明显提高芯片的稳定性和可重复性<sup>[10]</sup>。

本实验应用寡核苷酸芯片法和PCR法对收集的临床样本进行检测,并对检测结果进行比较。结果显示这两种方法对5种病原体的检出率没有显著性差异(>0.05),5种病原体的敏感度在80%~90%之间,检测的特异度均在95%左右。然而实验数据显示RV和TB的检测敏感度明显低于其他几种病原体,这可能是与临床样本中的结核分支杆菌的拷贝数低有关,并且由于在实验方法上采用随机引物标记的方法,该方法不能像PCR法那样对靶序列进行大量扩增,从而导致检测敏感性低。RV病毒是一种RNA病毒,在收集和存储过程中可能会发生降解导致出现假阴性的结果。

综上所述,本研究表明我们研制的多种病原体寡核苷酸芯片可以实现对不同种属病原体的快速、平行和高通量的检测,且可以通过优化特异性寡核苷酸探针和提高标记的效率使该芯片的检测敏感性,特异性,稳定性都较高。适合于临床,疾病控制等的病原学诊断,本研究所建立的技术体系尽管只选取了5种危害性较大的病原体进行实验,但是在实际应用中可以根据需要随时增加新的病原体,以增加检测的通量和增加应用范围。但是也存在对个别病原体检测敏感性不高的问题,相信随着技术的发展,将有希望克服这一问题。我们将对标记方法做进一步的研究,使长片段寡核苷酸芯片能够成为一种检测中枢神经系统感染性疾病的敏感特异的高通量的检测方法。

参考文献

[1] Yi L, Han, J X, Huang H Y, et al. Development and evaluation of 16S rDNA microarray for detecting bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. Experimental Biology and Medicine, 2005, 230(8):587~591

[2] Yury S B, Philip S R, Richard A S, et al. DNA microarrays for

- virus detection in cases of central nervous system infection. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(12):5811~5818
- [3] Jin L Q, Li J L, Wang S Q, et al. Detection and identification of intestinal pathogenic bacteria by hybridization to oligonucleotide microarrays. World J Gastroenterol, 2005, 11(48):7615~7619
- [4] Wang X W, Zhang L, Jin L Q, et al. Development and application of an oligonucleotide microarray for the detection of food-borne bacterial pathogens. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(1):225~233
- [5] Maynard C, Berthiaume F, Lemarchand K, et al. Waterborne pathogen detection by use of oligonucleotide-based microarrays. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12):8548~8557
- [6] Chou C C, Chen C H, Lee T T, et al. Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression. Nucleic Acids Research, 2004, 32(12):e99
- [7] Rouillard J M, Zuker M, Gulari E. OligoArray 2.0: design of oligonucleotide probes for DNA microarrays using a thermodynamic approach. Nucleic Acids Research, 2003, 31(12):3057~3062
- [8] He Z, Wu L, Fields M W, et al. Use of microarrays with different probe sizes for monitoring gene expression. Appl Environ Microbiol. 2005, 71(9):5154~5162
- [9] He Z, Wu L, Li X, et al. Empirical establishment of oligonucleotide probe design criteria. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(7):3753~3760
- [10] Bozdech Z, Zhu J, Joachimiak M P, et al. Expression profiling of the schizont and trophozoite stages of plasmodium falciparum with a long-oligonucleotide microarray. Genome Biology, 2003, 4(2):R9

## Development of Oligonucleotide Microarray for The Detection of Pathogen of Central Nervous System Infectious Disease and It's Application

PANG Jing-xiang HAN Jin-xiang GAO Xue-qin PAN Ji-hong

(Shandong Medical Biotechnology Center, Key Laboratory for Biotech-drugs of the Ministry of Health, Key Laboratory For Modern Medicine and Technology of Shandong Province, Jinan 250062, China)

**Abstract** Objective: To construct a oligonucleotide microarray for the detection of 5 pathogens including CMV, RV, HSV1, TB, EBV in central nervous system. Methods: 70 mer oligo probes targeted the specific protein of 5 common pathogens in infectious diseases of the nervous system were designed for the fabrication of microarray. The target genes were labeled with biotin-dUTP by random primer extension method. Using the DNA as template. The labeled products were hybridized with the oligonucleotide microarray. After hybridization, the microarray were binding with avidin-CY3. After scan with Scanarray 4000 cofocal scanner, the fluorescent intensity were analyzed with Quantarray 3.0 software. This oligonucleotide microarray system were used to detect clinical sample and compared with PCR method. Results: Detecting result was analyzed, there is no significant difference, and the consistency is satisfactory. The specificity and sensitivity to achieve clinical requirement. Conclusion: Oligo chip quickly convenient and accurately to detect clinical sample without bacterial culture, it's a effective tool for central nervous system disease detecting.

**Key words** Central nervous system disease Oligonucleotide chip Cytomegalovirus Herpes simplex virus Rubella virus *Mycobacterium tuberculosis* Epstein-barr virus