

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03121884.9

[45] 授权公告日 2007 年 2 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1300333C

[22] 申请日 2003.4.17 [21] 申请号 03121884.9

[73] 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号

[72] 发明人 王升启 陈苏红 张敏丽

[56] 参考文献

JP6 - 253847A 1994.9.13

US6472155B1 2002.10.29

US6087104A 2000.7.11

审查员 俞可嘉

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

[54] 发明名称

炭疽菌诊断基因芯片的制备及应用

[57] 摘要

本发明涉及一种生物工程类检测产品及其用途，具体地说是联合 PCR 技术和基因芯片技术检测炭疽杆菌。本发明可同时检测炭疽的 PXO1、PXO2 质粒及染色体等多个标志物，并能同时分析多份标本，具有特异性好、灵敏度高的特点，可作为战时或平时生物战剂检测、临床诊断、环境监测、卫生检疫等的检测工具。

1. 一种利用 PCR 技术结合基因芯片检测炭疽杆菌的方法，其特征在于包括以下步骤：

(a) 针对炭疽 PX01、PX02 及染色体上的基因，设计合成特异扩增引物及报告探针，其中每组中各有一条引物向 5'端延伸一段寻址条码序列，该序列与引物间有一间隔臂，阻止 PCR 延伸，并且该序列与固定在通用芯片上的可寻址捕获探针互补；

(b) 通过 PCR 扩增使产物的末端连上一段可寻址的条码序列，然后将所有 PCR 扩增产物混合，与报告探针一起加入到杂交体系，与通用芯片进行杂交，使 PCR 产物上连接的可寻址条码序列与芯片上互补的识别捕获探针杂交，将扩增产物定向地锚定在芯片对应位置上；

(c) 将被锚定的 PCR 产物再与荧光等报告分子标记的特异报告探针杂交，通过信号扫描等分析检测每份样品的结果。

2. 根据权利要求 1 所述的检测方法，其特征在于步骤 a 中设计合成特异扩增引物时，炭疽 PX01 上的基因选自 pag、lef 或 cya 中任一特异基因或片段，PX02 上的基因选自 capA、capB 或 capC 中任一特异基因或片段，染色体上的基因选自 rpoB、Ba813 或 16sRNA 中任一特异基因或片段。

3. 根据权利要求 1 或 2，所述的检测方法，其特征在于一次杂交同时检测炭疽的三个标志物 PX01、PX02 及染色体基因。

4. 根据权利要求 1 所述的检测方法，其特征在于步骤 a 中的报告探针按照复合探针设计原则设计，长 15-80mer，位于扩增片段内，5' 末端标记荧光素或生物素报告分子，且与连有可寻址条码序列的引物所延伸的链互补。

5. 根据权利要求 1 所述的检测方法，其特征在于步骤 b 中通用芯片被分隔成 2-12 个杂交孔，每个杂交孔点制有相同的捕获探针阵列。

6. 根据权利要求 5 所述的检测方法，其特征在于步骤 a 中的每条寻址条码序列对应一份样本的一个基因，一次杂交同时检测多份样本中炭疽的三个标志物 PX01、PX02 及染色体基因。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的检测方法，其特征在于每张芯片的每个杂交孔同时检测 2-96 份标本。

炭疽菌诊断基因芯片的制备及应用

炭疽杆菌是人畜共患致病菌，可通过消化道、呼吸道及皮肤接触感染人和动物，具有高度致病性，其芽孢能大量繁殖，易在空气中传播，并可存活十年以上，所以被认为是最有效的生物武器之一。它的存在对人类的健康和生命构成了极大的威胁，其检测和防御一直倍受重视。炭疽检测现在面临两个主要问题：一、如何快速确定某人是接触了炭疽芽孢还是其他无害细菌；二、如何快速诊断出有可能致命的吸入性炭疽感染以挽救病人的生命。

通常炭疽的检测诊断都是基于形态学特征或表型特征，如：革兰氏阳性染色试验、噬菌体试验、串珠和青霉素抑制试验、拉丝试验（粘型菌落）、溶血试验、芽孢形成试验等，这些方法在一定程度上都存在着费时、操作繁琐、灵敏度低等缺点。PCR 等技术的出现为炭疽的快速、高效检测提供了有力的工具，也越来越受重视。

炭疽与苏云金、蜡样杆菌、蕈状杆菌等同属蜡样菌群，都是哺乳动物和昆虫的病原体。它们之间具有很高的同源性，属同一种属。炭疽杆菌与蜡样菌群的其他菌株的重要区别在于它有两个毒性质粒即编码炭疽热毒素的 pXO1（185kb）和编码荚膜的 pXO2（95kb），缺失任何一个质粒其毒性都会下降。荚膜为 D-谷氨酸聚合物，其合成酶由 capA, capB, capC 基因编码；而毒素由三个因子组成：pag 基因编码的保护性抗原，lef 基因编码的致命因子，cya 基因编码的水肿因子。这些基因都可被用做 PCR 法鉴定炭疽的标志物，检测这些特异致病因子成为鉴定炭疽的主要手段。然而质粒非常不稳定，易缺失，现已发现自然界中存在缺失上述一种或两种质粒的菌株；而且质粒可被导入其它菌株，在异源系统中也发现毒素基因（如：aslef、cya 等）的表达。因此，应用质粒鉴定炭疽的方法并不完全可靠。而染色体表达相对稳定，在炭疽的准确鉴定中起着重要的作用。染色体标志物：rpoB 基因、16sRNA、vrrA 基因、Ba813 及 SG-850 标志物等都可用于炭疽的鉴定。但常规 PCR 检测一般是将扩增后的产物经琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色后，在紫外灯下通过观察有无特异性的荧光条带的出现判定阴阳结果，其结果的准确性、可靠性受主观及客观因素影响较大，同时溴化乙锭有强致癌毒性。而基因芯片技术的出现为基因检测提供了一个更高通量、更安全、更有效的手段。

基因芯片是近年来发展成熟的一种高通量基因检测技术 (Hacia J. Nature genetics(Supl),1999,21(1):42-47)。他可用于基因表达分析、突变检测、药物筛选等,用途非常广泛。基因条码识别通用芯片属于寡核苷酸芯片,是由 F.Barany 等(J. MOL. BIO. 1999, 292:251-262)发明的,它最初用于进行高通量的单碱基点突变检测,是通过结合 PCR、连接酶检测技术(LDR)以及基因编码杂交技术而实现的,其中所采用的可寻址的基因条码序列是随机产生的人工设计探针,其序列独一无二,因此由这些序列组成的芯片可作为通用芯片,用于任意基因的突变检测,

只需变换一下可寻址条码序列后所连接的靶核酸的序列就可实现。我们在试验中发现利用寻址编码识别通用芯片不仅可进行突变检测,而且还可实现多基因、多样本分析。其检测多样品、多基因的原理如下(附图1):设计合成待检基因的特异扩增引物及报告探针(可按复合探针设计原则设计 Wang SQ et al,Anal.BioChem. 2002),其中一条引物向5'端延伸一段寻址条码序列,该序列与引物间有一间隔臂,可阻止PCR延伸,并且该序列与固定在通用芯片上的可寻址捕获探针互补,通过PCR扩增使产物的末端连上一段可寻址的条码序列,然后将所有PCR扩增产物混合,与报告探针一起加入到杂交体系,与通用芯片进行杂交,这样这些PCR产物上连接的可寻址条码序列与芯片上互补的寻址捕获探针杂交,从而将扩增产物定向地锚定在芯片对应位置上,被锚定的PCR产物再与荧光或生物素等报告分子标记的特异报告探针杂交,通过信号扫描等分析即可检测出每份样品的结果。因为一条寻址条码序列可对应一份样本或一个基因,有多条寻址条码序列就可对应多份样本或多个基因,这样通过一次杂交就能同时检测出多份样本或多个基因,从而实现多样本、多基因检测的目的。

本发明的目的是,联合PCR技术和基因条码识别通用芯片检测炭疽杆菌,可同时鉴定炭疽杆菌的PXO1、PXO2两个质粒及染色体标志物,并实现多份标本同时分析的目的,为快速确定某人是否接触了炭疽芽胞还是其他无害细菌以及指导临床合理用药提供快速高效的检测手段。本发明的主要内容包括:通用芯片的制备、针对炭疽两个质粒及染色体的基因条码引物以及报告探针的设计与合成、通用芯片检测炭疽标志物的杂交条件的优化以及特异性/灵敏度的分析、通用芯片在检测多份炭疽标本中的应用。

结合附图说明本发明的具体实施过程

附图1 基因编码识别通用芯片检测多标本的示意图

附图2 通用芯片的外观示意图及点阵布局

附图3 杂交时间对杂交信号的影响

附图4 杂交温度对杂交信号的影响

附图5 通用芯片检测炭疽的特异性分析

(a)检测染色体标志物 (b)检测PXO2标志物 (c)检测PXO1标志物

附图6 通用芯片在多份标本检测中的应用

实施例

1. 寻址条码捕获探针的设计与合成

根据F.Barany等(J. MOL. BIO. 1999,292:251-262)介绍的寻址条码探针设计原则,设计16条(探针数量可按需要增减)长24mer, Tm值相近(由OLIGO6.0软件计算),且相互之间无同源性

的探针，其序列及对应的编号见表 1。合成在 391 DNA 合成仪（Applied Biosystems）上完成，探针的 3' 端进行氨基修饰。利用以四缩乙二醇为基础的氰乙基-N', N'-二异丙基亚磷酰氨试剂在氨基试剂及寡核苷酸探针之间引入间隔臂。合成完毕后浓氨水 55℃脱保护/切割 15hr，经反相柱纯化，紫外定量后真空浓缩至干，-20℃保存备用。

表 1 寻址条码捕获探针的序列及编号

编号	序列 (5' →3')	Tm (°C)
bar1	GTCT TCTG GCAA TCGT CTCA CGTT -spacer-NH2	71.1
bar2	GCAA TCTG ACCT TCGT CCAT CGTT -spacer-NH2	72.9
bar3	ACCT TCTG AGGA TCGT TGTC CGTT -spacer-NH2	71.7
bar4	AGGA TCTG GTCT TCGT CTTG CGTT -spacer-NH2	72.0
bar5	TCTG TGTC TCGT GCAA CGTT CTCA -spacer-NH2	71.4
bar6	TCGT TGTC CGTT GCAA CTGT CTCA -spacer-NH2	71.4
bar7	CGTT TGTC CTGT GCAA TCTG CTCA -spacer-NH2	73.6
bar8	CTGT TGTC TCTG GCAA TCGT CTCA -spacer-NH2	70.7
bar9	CGTT GGTA CTCA TGTC CCAT CTGT -spacer-NH2	69.4
bar10	CTCA GGTA CTTG CGTT TGTC CCAT -spacer-NH2	71.0
bar11	CTGT GGTA CCAT TGTC CGTT GAGT -spacer-NH2	71.4
bar12	CTTG CCAT CTCA GGTA TGTC GGTT -spacer-NH2	70.9
bar13	TCTG CGAA TGTC CTGT ACCT TCGT -spacer-NH2	71.5
bar14	TGTCCAGA AGTG CTTG CTGT TCGT -spacer-NH2	72.5
bar15	TCGT AGTG CTTG ACCT TCTG CTGT -spacer-NH2	69.7
bar16	CTTG GCAA AGTG CTGT TCGT ACTC -spacer-NH2	69.7
bar17	TGTC TCTG AGTG CTTG CTCA ATCG -spacer-NH2	70.2
bar18	CGTT TCTG ACCT CTTG CCAT ATCG -spacer-NH2	70.4
bar19	TGTC CGTT ATCG CTCA TCTG TGTC -spacer-NH2	71.5
bar20	CCAT TCTG GTCT CTTG CGTT ATCG -spacer-NH2	71.5

2. 通用芯片的制备

用厚约 50 微米的防水纸制成方形格栅，将其紧密贴于醛基化的玻片上，使玻片分割成 10 个互相分开的方形小区，每个区的边长为 9 毫米。然后将氨基修饰的捕获探针以 50 μmol/L 的浓度溶于 3×SSC 溶液中，用 Pix sys 5500 芯片制备仪（Catesian Technologies）点到醛基化玻片上的各个方形小区中，这样就得到了包含 10 个完全一样探针矩阵的芯片，探针矩阵的排列及芯片示意图见附图 2，其中前三行的每一列分别对应检测一份标本的三个基因，最后一行分别用于检测三个基因的阳性对照及阴性对照，以监测实验是否成功，芯片点制完毕后晾干，放载玻片盒上室温放置备用。

3. 炭疽检测特异引物及探针的设计与合成

以 PXO1 的 pag 基因、PXO2 的 cap 基因以及染色体的 rpoB 基因为检测对象, 参照引物设计原则, 设计 PCR 扩增检测这些基因的上下游引物 p1/ p2, 其序列见表 2。报告探针 F 的设计可参照 f 复合探针设计的原则(Wang SQ et al, Anal. BioChem. 2002), 引物与探针均用 391A 型 DNA 合成仪合成。

表 2 炭疽检测的特异引物及探针序列

靶基因名称	序列 (5' →3')	序列位置 (nt)
PXO1 (pag)		
F-PAG	CY3-ACA TGT ACA ATC GGA TAA GCT GCC ACA A-NH2	926-899
PAGp1	ACC AAT ATC AAA GAA CGA CGC	1086-1066
PAGp2	ATC ACC AGA GGC AAG ACA CCC	876-896
PXO2(cap)		
F-CAP	CY3-ATC CAA GAG TAG CAA CCC TAA CAC CAT T-NH2	2548-2521
CAPp1	GCT CCT GCT ACA AAT GCA TCT G	2573-2552
CAPp2	GCT GAT CTT GAC TCC TGT GGG TG	2452-2474
染色体 (rpoB)		
F-rpoB	CY3-TCC AAA GCG CTA TGA TTT AGC AAA TGT-NH2	1871-1897
rpoBp1	CCA CCA ACA GTA GAA AAT GCC	1821-1841
rpoBp2	ATG TTT CAG CTA AAC GTT GG	1973-1954

4. 寻址基因条码引物的设计

根据基因条码识别芯片的检测原理, 所设计的报告探针应与连有条码识别序列的扩增片段互补才能通过芯片扫描检测出信号, 因此将将与寻址捕获探针互补的序列与分别连于 CAPp2、PAGp2、rpoBp2 的 5' 端, 合成时在两序列之间引入一个乙二醇作为间隔基团, 以阻止 PCR 扩增, 各引物序列及编号见表 3。

表 3 检测炭疽三个基因的含有基因条码序列的引物

编号	序列 (5' →3')
rpoB	
bar1R1	AACGTGAGACGATTGCCAGAAGAC-OCH2CH2O- ATGTTTCAGCTAAACGTTGG
bar2R1	AACGAGTTACGAAGGTCAGATTGC-OCH2CH2O- ATGTTTCAGCTAAACGTTGG
bar3R1	AACGGACAACGATCCTCAGAAGGT-OCH2CH2O- ATGTTTCAGCTAAACGTTGG
bar4R1	AACGCAAGACGAAGACCAGATCCT-OCH2CH2O- ATGTTTCAGCTAAACGTTGG
bar5R1	TGAGAACGTTGCACGAGACACAGA-OCH2CH2O- ATGTTTCAGCTAAACGTTGG
bar16R1	GAGTACGAACAGCACTTTGCCAAG-OCH2CH2O- ATGTTTCAGCTAAACGTTGG
bar19R1	GACACAGATGAGCGATAACGGACA-OCH2CH2O- ATGTTTCAGCTAAACGTTGG
CAP	
bar6R1	TGAGAACGTTGCACGAGACACAGA-OCH2CH2O- GCTGATCTTGACTCC TGTGGGTTG
bar7R1	TGAGCAGATTGCACAGGACAAACG-OCH2CH2O- GCTGATCTTGACTCC TGTGGGTTG
bar8R1	TGAGACGATTGCCAGAGACAACAG-OCH2CH2O- GCTGATCTTGACTCC TGTGGGTTG
bar9R1	ACAGATGGGACATGAGTACCAACG-OCH2CH2O- GCTGATCTTGACTCC TGTGGGTTG
bar10R1	ATGGGACAAACGCAAGTACCTGAG-OCH2CH2O- GCTGATCTTGACTCC TGTGGGTTG
bar17R1	CGATTGAGCAAGCACTCAGAGACA-OCH2CH2O- GCTGATCTTGACTCC TGTGGGTTG
bar20R1	CGATAACGCAAGAGA CAGAATGG-OCH2CH2O- GCTGATCTTGACTCC TGTGGGTTG

PAG
 bar11R1 ACTCAACGGACAATGGTACCACAG-0CH2CH20- ATCACCAGAGG AAG ACACCC
 bar12R1 AACCGACATACCTGAGATGGCAAG-0CH2CH20- ATCACCAGAGGCAAGACACCC
 bar13R1 ACGAAGGTACAGGACATTTCGAGA-0CH2CH20- ATCACCAGAGGCAAGACACCC
 bar14R1 ACGAACAGCAAGCACTTCTGGACA-0CH2CH20- ATCACCAGAGGCAAGACACCC
 bar15R1 ACAGCAGAAGGTCAAGCACTACGA-0CH2CH20- ATCACCAGAGGCAAGACACCC
 bar18R1 CGATATGGCAAGAGGTCAGAAACG-0CH2CH20- ATCACCAGAGGCAAGACACCC

5. 炭疽 DNA 的 PCR 扩增

将炭疽杆菌悬液在沸水中煮 20min, 然后 10000rpm 离心 15min, 收集上清, 取 5 μ l 加入如下反应体系中: PCR Mix 20 μ l, 上游引物 0.5 μ M, 下游寻址基因条码引物 1 μ M, Taq Polymerase(5u/ μ l) 0.2 μ l. 94 $^{\circ}$ C 5min; [94 $^{\circ}$ C 20 Sec, 55 $^{\circ}$ C 30Sec, 72 $^{\circ}$ C 10Sec]40 cycles; 72 $^{\circ}$ C 3min. 每个 PCR 管做上与寻址条码引物及对应标本相应的标志, 以防弄混。同时设阳性对照及无模板阴性对照。扩增后将这些 PCR 产物等体积混匀, 准备进行芯片杂交检测。

6. 炭疽检测的阳性对照构建

分别以 PAGp1/PAGp2、CAPp1/CAPp2 和 rpoBp1/rpoBp2 为引物, 提取的炭疽 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 将扩增产物用 Wizard PCR Preps DNA Purification System 纯化后, 连接到 pGEM-T 载体上, 并转化至 JM-109 菌株中, 挑取克隆, 进行 PCR 及测序鉴定。重组质粒采用 Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System 提取。紫外定量后, 备用。

7. 寡核苷酸通用芯片处理

Oligochip 先用 0.2%SDS 清洗 2 次, 接着以水清洗 2 次, 空气凉干。用 NaBH₄ 溶液[100ml 含 20%乙醇的 PBS 溶液中加入 1.3g NaBH₄]作用 10min, 封闭玻片表面的醛基。0.2%SDS 清洗 1 次, 水清洗 1 次, 晾干后用于杂交。

8. 杂交及其杂交条件的优化: 将 PCR 混合物与杂交液按比例混匀后, 取 10 μ l 加到芯片的各个方型小区上, 并置于杂交盒中, 在一定温度下杂交一定时间, 芯片杂交完成后用洗液 A(1 \times SSC, 0.2%SDS); 洗液 B(0.2 \times SSC)和洗液 C(0.1 \times SSC)各清洗 2 分钟。然后用 Axon4000 扫描仪对其进行扫描, 并记录结果, 根据信号强度对结果进行判定。

(1) 杂交体系的组成: 5 \times SSC, 0.2%SDS, 10%甲酰胺, PCR 混合物, 0.02 μ M 报告探针。

(2) 杂交时间的确定: 将同一杂交体系分成多份, 分别加在多张芯片上于 45 $^{\circ}$ C 进行杂交, 在杂交 5, 10, 20, 30, 60 及 90 分钟分别取出一张芯片进行扫描, 分析并比较结果显示(附图 3), 随杂交时间的增长, 信号逐渐增强, 到 30 分钟后信号已基本饱和。

(3) 杂交温度的确定: 将同一杂交体系分成多份, 分别加在多张芯片上, 于 37 $^{\circ}$ C, 42 $^{\circ}$ C, 45 $^{\circ}$ C,

50°C, 55°C 杂交 30 分钟后, 取出芯片进行扫描, 分析并比较结果显示(附图 4), 42°C-50°C 杂交信号强度无明显差异, 37°C 杂交则特异性较差, 55°C 杂交信号减弱。

9. 通用芯片特异性分析

将基因条码引物用于扩增其对应的质粒, 然后将这些 PCR 产物混合后进行杂交, 但在杂交时只加入一种报告探针, 其结果显示(见附图 5), 当只加 F-CAP 报告探针时, 只有 bar6-10 及 bar17 对应的点有信号, 只加 F-PAG 时, 只有 bar11-15 及 bar18 对应的点有信号, 而当加 F-rpoB 报告探针时, bar1-5 及 bar16 对应的点有信号, 说明探针之间互相不存在交叉杂交。

10. 芯片检测灵敏度分析

将含炭疽 CAP、PAG 及 rpoB 基因的质粒 10 倍系列稀释, 制成浓度为 10^6 - 10^2 拷贝/ul 的系列模板, 然后用基因条码引物分别扩增同一已知浓度的对应质粒, 再将 PCR 产物混合后杂交, 对杂交结果分析显示, 芯片上每个点的检测限都能达到 10^4 拷贝。

11. 基因条码识别通用芯片分析多份标本

将提取的 5 份细菌 DNA 分别用基因条码引物进行 PCR 扩增, 各取 2 μ L PCR 产物混合, 加入 0.02 μ M 的三种报告探针, 5 \times SSC, 0.2% SDS, 10% 甲酰胺, 使终体积为 50 μ L, 取出 10 μ L 加在通用芯片的一个小区上, 放入杂交盒, 置于 45°C 杂交 30 分钟后取出, 甩去表面的杂交液, 用 Axon4000 扫描仪扫描, 其扫描结果见附图 5, 图中, bar1, bar6, bar11 分别对应第一份细菌 rpoB、CAP 及 PAG 基因, 从图看出, bar1, bar6 亮, 而 bar11 没有信号, 说明该细菌不含 PXO1 质粒, 而 bar3, bar8, bar13 对应的第三份细菌, 三个点都亮, 说明该细菌三个基因都有, 以此类推, 第二份细菌、第五份细菌 PXO1 质粒缺失, 第四份细菌则包含完整的基因信息。

总之, 利用本发明进行炭疽检测, 不但可同时分析多份标本, 还可同时分析炭疽的多个特异标志, 确定细菌有无毒性, 可作为生物战剂检测、临床诊断、环境监测、卫生检疫等的分析工具, 指导是否该采取措施尽快避免更大的危害。

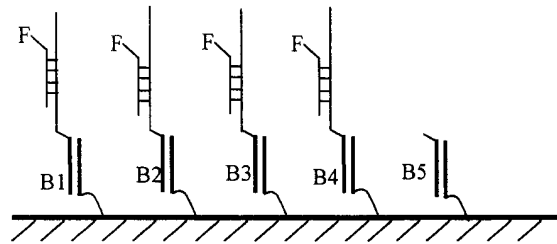


图 1

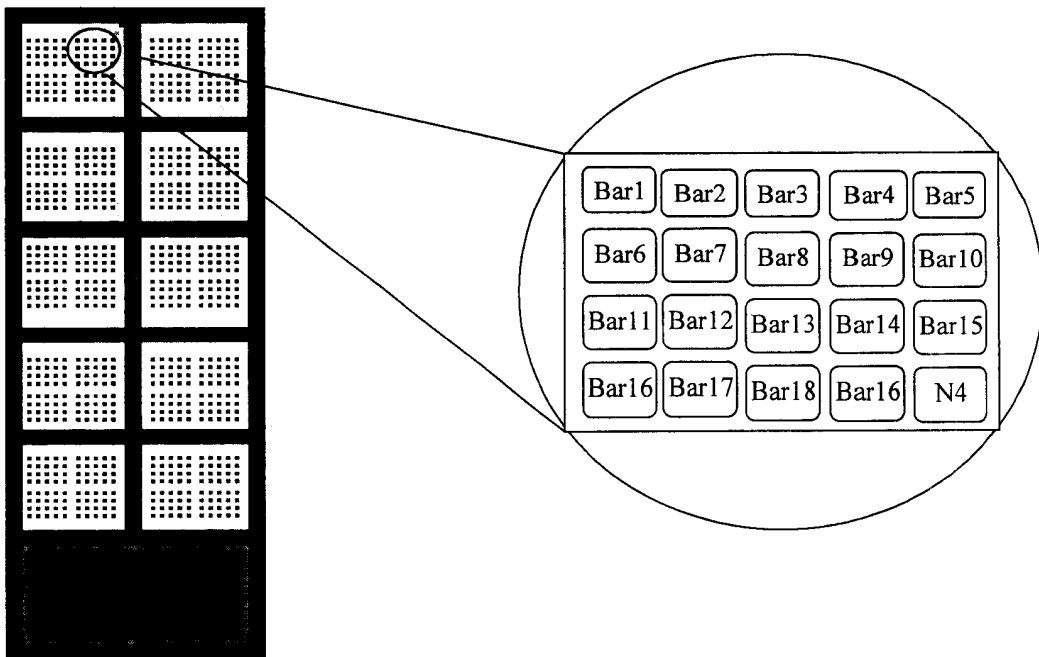


图 2

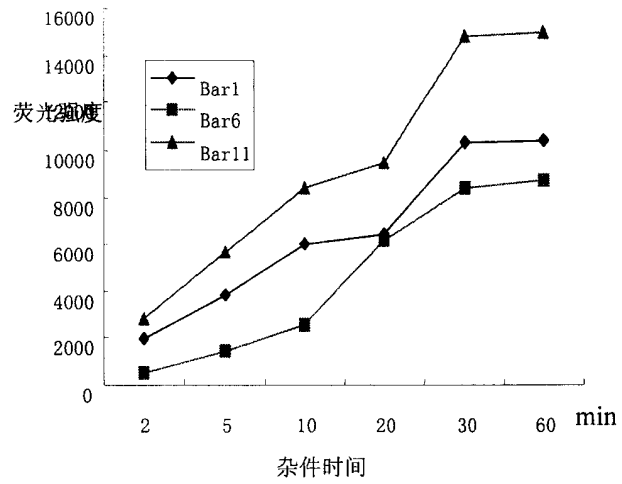


图 3

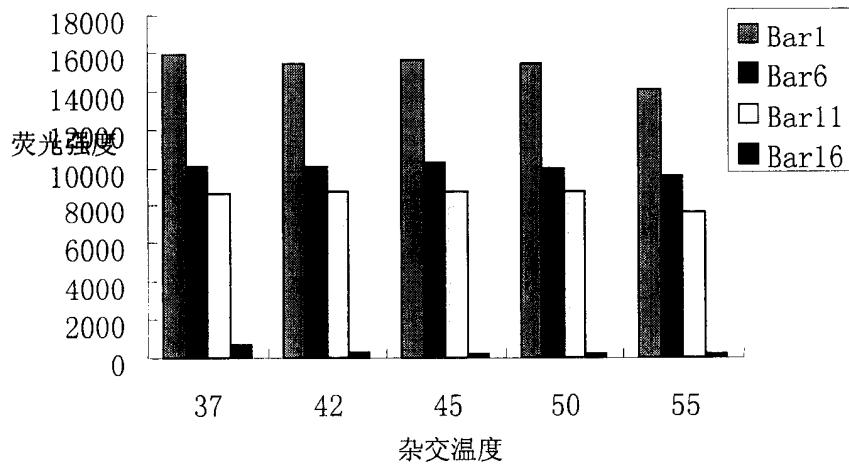


图 4

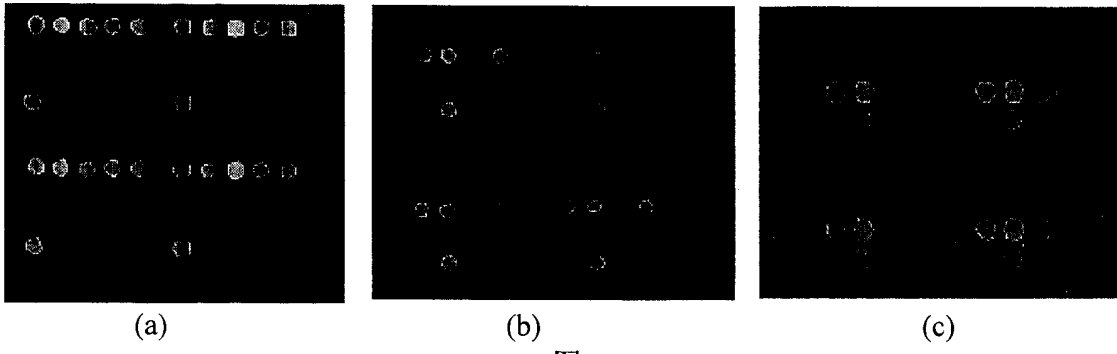


图 5

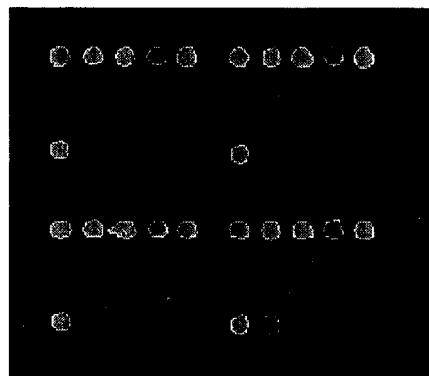


图 6