

聚合酶链反应及基因芯片技术检测 日本血吸虫的研究

周钧 陶开华 李越希 钱万红 张锦海 王勇 张兆松

【摘要】 目的 探索研制检测日本血吸虫的基因芯片。方法 依据日本血吸虫高度保守的编码免疫原性毛蚴抗原的 5D 基因, 筛选、设计聚合酶链反应(PCR)的引物和基因探针, 制成日本血吸虫基因芯片。检测时首先抽提尾蚴、成虫、虫卵、感染性钉螺的 DNA, 同时利用对照华支睾吸虫、姜片虫、卫氏并殖吸虫的 DNA 分别进行 PCR 扩增及不对称 PCR 荧光标记, 然后用荧光标记后的靶序列与制备的检测芯片进行杂交, 杂交结果用 ScanArray 3000 扫描仪扫描。结果 研制的基因芯片能有效地检测出单个尾蚴、虫卵、阳性钉螺或极微量成虫组织 DNA, 而常见的华支睾吸虫、姜片虫、卫氏并殖吸虫等未见阳性结果。结论 成功制备了检测日本血吸虫的基因芯片, 并具有快速、灵敏、特异等特点。

【关键词】 日本血吸虫; 基因芯片; 钉螺

Detection of *Schistosoma japonicum* 5D gene by polymerase chain reaction and genechip technique

ZHOU Jun*, TAO Kai-hua, LI Yue-xi, QIAN Wan-hong, ZHANG Jin-hai, WANG Yong, ZHANG Zhao-song.

*Department of Pathogenic Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 210002, China

【Abstract】 Objective In order to develop the diagnostic genechip for specific detection of *Schistosoma japonicum* (Chinese mainland strain). **Methods** Probe and primers were designed based on the *Schistosoma japonicum* 5D gene encoding an immunogenic miracidial antigen. The probe for the conservative and specific gene sequence was spotted onto the specially treated glass slides by pin-based spotting robot Pixsys 5500 and was employed to make genechips. A polymerase chain reaction(PCR) protocol was designed to effectively amplify the 5D gene fragment containing the probe sequence from cercaria, egg, adult worm and infected *Oncomelania* DNA as well as other flukes DNA, respectively. After 35 cycles by PCR, the products were then labeled with fluorescent Cy3-labeled primer, using dissymmetrical PCR. The labeled PCR products of the target genes were hybridized to the diagnostic genechips for detection of *Schistosoma japonicum* and a fluorescent scanner (ScanArray 3000) was used to observe and record the hybridization signals. **Results** The result obtained from the study showed that a 262 bp DNA fragment was amplified from cercaria, egg and adult worm with the designed primers and enable the genechip be applied to detect a single cercaria, egg and adult worm. When the genechip was used to detect *Clonorchis sinensis*, *Fasciolopsis busk*, and *Paragonimus westermani* DNA, the results showed negative, indicating that the genechip had good specificity. **Conclusion** The genechip technique for detection of *Schistosoma japonicum* was established successfully and having the characteristics of high sensitivity and specificity.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*; Genechip; *Oncomelania*

血吸虫病是一种人兽共患的寄生虫病, 在全世界范围内广泛分布, 中国的某些地区疫情仍很严重。在防治过程中, 人群再感染和控制地区血吸虫病的再度流行, 一直是防治实践中的难题^[1]。由于钉螺是日本血吸虫的惟一中间宿主, 钉螺的扩散和重新分布是造成血吸虫病再度流行的基本因素。因此,

高效、正确地监测血吸虫和钉螺在血吸虫病防治工作中显得极为重要。目前已建立的血吸虫检测系统, 主要依赖于免疫学诊断, 其敏感度和特异度皆不够理想。而传统的钉螺压碎镜检血吸虫幼虫法尽管简单易行, 但在检测效率、标准化及鉴别方面存在诸多不足, 已满足不了当前防治工作的需要。近年来发展的基因芯片技术, 适应于大规模、高通量的检测要求, 尤其适用于血吸虫病流行区现场的检测及监测, 具有广泛的应用前景。本研究初步建立了检测日本血吸虫尾蚴、阳性钉螺及动物模型标本中血吸虫的基因芯片。

基金项目: 全军“十五”重点课题资助项目(01L006)

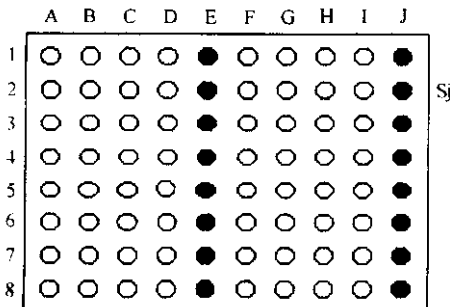
作者单位: 210002 南京军区军事医学研究所(周钧、陶开华、李越希、钱万红、张锦海), 南京医科大学病原生物学系(王勇、张兆松)

材料与amp;方法

1. 实验样本 : 感染性钉螺购自江苏省血吸虫病防治研究所。日本血吸虫卵、成虫、尾蚴由军事医学研究所寄生虫实验室从血吸虫感染家兔的肝脏、门脉静脉及用感染性钉螺常规逸出法收集。对照所用的 6 种常见传染病的病原体如霍乱、恙虫病、钩端螺旋体病、肾综合征出血热、疟疾等为本研究所分离保存。华支睾吸虫、姜片虫、卫氏并殖吸虫的 DNA 由南京医科大学张耀娟教授惠赠。

2. 主要试剂 : 聚合酶链反应(PCR)扩增试剂 : ExTaq 酶等为大连宝生物公司产品 ; 芯片杂交液 : Micro Hyb 购自 BD 公司 , 或用自配的 6 × Denhardt's 液 ; 芯片封闭液 : 新鲜配置的 0.6% (W/V) NaBH₄ 溶液。

3. 芯片的制备 : 选用经硅烷化处理的玻片为芯片载体 , 用 5% 戊二醛浸泡 50 min , ddH₂O 超声清洗 2 次 , 置干燥处备用。点样采用 Cartesian Pix Sys 7500 点样仪 , Chipmaker Pin40 点样针及 Pixsys 5500 Workstation 点样软件编程 , 将探针(TakaRa 公司合成)溶于 3 × SSC 溶液内 , 终浓度为 100 μmol/L , 每个点直径 0.15 mm , 根据图 1 的矩阵进行点样。点样后雾化保温 2 h 后 37℃ 水浴 1 h。室温依次用洗脱液 A (1 × SSC , 0.2% SDS) , B (0.5 × SSC , 0.2% SDS) , C (0.1 × SSC) 和 ddH₂O 各冲洗 5 min , 甩去水珠后 , 将芯片放入封闭液 30 min , 再次依次用洗脱液 A、B、C 和 ddH₂O 冲洗 , 超净台内吹干后待用。



1A ~ 1D, 2A ~ 2D, 3A ~ 3D 阴性对照 (3 × SSC) ; 4A ~ 4D : 大肠埃希菌毒素 SLT1 ; 5A ~ 5D : 大肠埃希菌毒素 SLT2 ; 6A ~ 6D : H7 鞭毛抗原 ; 7A ~ 7D : O157 菌体抗原 ; 8A ~ 8D : 霍乱弧菌毒素 ; 1F ~ 1I : 霍乱弧菌外膜蛋白 ; 2F ~ 2I : Sj : 日本血吸虫 ; 3F ~ 3I : 恶性疟原虫 ; 4F ~ 4I : 间日疟原虫 ; 5F ~ 5I : 钩端螺旋体 ; 6F ~ 6I : 恙虫病立克次体 ; 7F ~ 7I, 8F ~ 8I : 汉坦病毒 ; 1E ~ 8E, 1J ~ 8J 阳性内参(植物基因探针)

图 1 芯片探针点样矩阵示意图

4. DNA 模板制备 : 虫卵和尾蚴在显微镜下计数后 , 分装于 Eppendorf 管中 , 6000 r/min 离心 5 min , 弃

上清加入 100 μl Triton X-100 裂解液 , 60℃ 水浴 2 h , 100℃ 隔水加热 10 min 后 , 10 000 r/min 离心 5 min , 取上清即为模板 DNA。成虫或感染性钉螺的 DNA 采用经典的酚-氯仿抽提法 , 即成虫或钉螺压碎后置适量生理盐水 , 加蛋白酶 K (终浓度为 200 μg/ml) , Triton X-100 , 60℃ 水浴 3 h 后加氯仿、异戊醇抽提一次 , 然后用无水乙醇沉淀 , 经 12 000 r/min 离心 , 80% 乙醇洗涤 1 次 , 弃上清 , 沉淀溶于 TE 或 ddH₂O 中 , 即为模板 DNA^[2]。

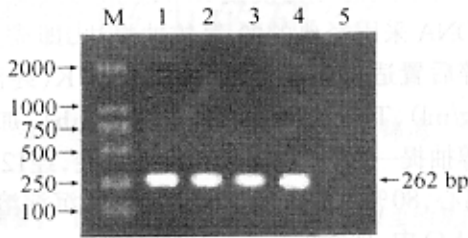
5. PCR 扩增及荧光标记 : 根据日本血吸虫 5D 基因的 DNA 序列 , 设计并合成了引物 P1 : 5' TCA CAC ATT CAA ACA CAG TAC 3' , 引物 P2 : 5' AAG TAC CAC CAC CAT AAT GTC 3' (TakaRa 公司合成) , 同时在这对引物相应扩增片段内设计出 1 个负链探针 5' CCA GTC ATC TCA ACA CGT CAG CAT ATT GAT 3' , 经 BLAST 基因检索 , 与曼氏、埃及血吸虫及 GenBank 内的其他所有基因均无显著同源性。

第一轮常规 PCR 反应制备虫卵、尾蚴、成虫、感染性钉螺双链 DNA 模板 : 反应体积 50 μl , 包括 10 × Buffer 5 μl , 25 mmol/L MgCl₂ 4 μl , 2.5 mmol/L dNTP 2 μl , 5 U/μl Taq 酶 0.3 μl 及模板 5 μl。反应程序为 94℃ 变性 4 min , 按 94℃ 30 s , 57℃ 45 s , 72℃ 45 s 扩增 35 个循环 , 然后 72℃ 延伸 7 min^[3]。PCR 产物经纯化(TakaRa DNA 片段纯化试剂盒)作为第二轮 PCR 反应模板 , 并经 ABI377 测序仪测序 , 证实为 5D 基因序列后 , 采用 Cy3 荧光标记引物掺入模板进行不对称 PCR 扩增 , 即加 10 mmol/L Cy3-dUTP (Amersham Pharmacia 公司合成) 1 μl 掺入 , 退火温度降为 50℃ , PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测。

6. 杂交及芯片检测 : 第二轮扩增的 Cy3 荧光标记产物于 98℃ 变性 5 min 后迅速冰浴。取荧光靶序列 7 μl 与 3 μl 杂交液(掺入阳性内参照植物基因探针)混匀后点入探针阵列区域 , 盖上硅化的盖玻片 , 置湿杂交盒(内有 2 × SSC)避光 50℃ 水浴 1 h。取出后依次用洗液 A、B、C 及 ddH₂O 洗涤^[4] , 吹干后用 ScanArray 3000 扫描仪检测。

结 果

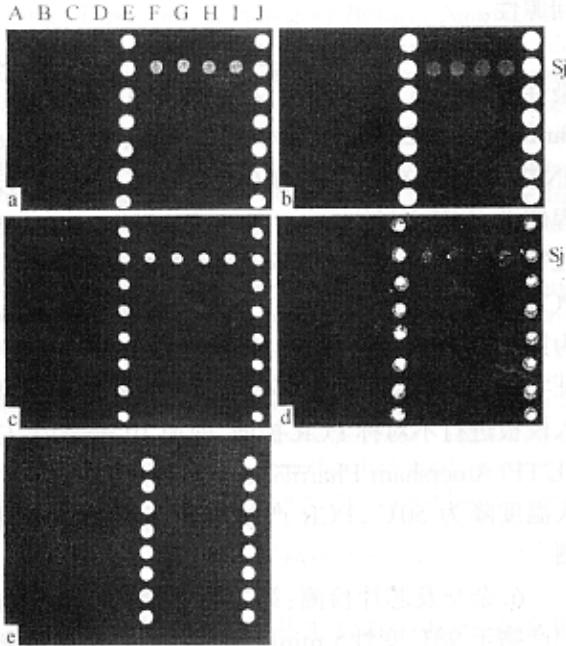
1. PCR 扩增结果 : 感染性钉螺、尾蚴、成虫、虫卵抽提的 DNA 模板 , 常规扩增经纯化后进行 1% 的琼脂糖电泳检测 , 结果显示 , 除对照阴性钉螺未见特异性条带外 , 四种样本均扩增出大小为 262 bp 的特异性条带(图 2)。



M:Marker(DL2000);1~4:依次为感染性钉螺、成虫、尾蚴和虫卵 5:阴性钉螺对照

图2 不同样本处理后的 PCR 结果

2. 芯片特异性检测:通过杂交后芯片检测,日本血吸虫探针处均出现较强的阳性信号(图3);对照6种病原体及阴性钉螺标本相应的探针处皆无杂交阳性信号,结果显示未发生非特异性结合,表明了芯片检测血吸虫的高度特异性。

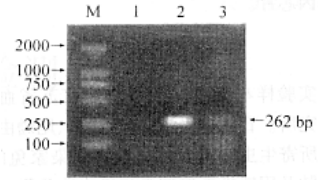


3a, 3b, 3c, 3d, 3e 依次为感染性钉螺、成虫、尾蚴和虫卵、阴性钉螺

图3 不同样本的芯片检测结果

3. 芯片灵敏度检测:抽提单个尾蚴、虫卵或微量成虫组织的 DNA 经 PCR 扩增,电泳后凝胶成像系统下单个尾蚴和单个虫卵能看到较弱的目的条带,而成虫可见明显阳性条带(图4)。

用上述标本进行芯片模型检测,日本血吸虫尾蚴经梯度稀释后,单个尾蚴 DNA 经稀释 10 倍后在芯片上仍可检测到较弱阳性信号(图5)。



M:Marker;1:单个尾蚴 2:微量成虫组织 3:单个虫卵

图4 不同样本处理后的 PCR 结果

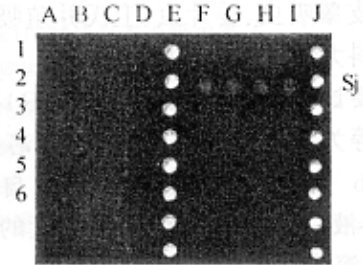


图5 单个尾蚴 DNA 稀释 10 倍芯片检测结果

讨 论

日本血吸虫的惟一中间宿主——钉螺,在中国大陆主要分布于南方 12 省(市、区),同时受水位变化和汛期洪水的影响,一些原已消灭钉螺的地方重新出现螺情,进而发展成为再度流行血吸虫病的区域。传统的钉螺压碎法,需专业人员,技术要求较高,且镜检效率低。近年来发展起来的基因芯片技术,以其敏感性高、特异性强的优点^[5],在短短几年内被全世界许多科研机构 and 实验室采用,因此芯片的高度特异性为及时、准确地报告疫情,有效遏止疫情提供了保障。

本研究首先将设计的引物和芯片上的特异探针,与 GenBank 已登录的曼氏、埃及血吸虫及其他所有基因,进行 BLAST 基因查询,均无显著同源性。经计算机检索,证实不会形成二级结构。其次我们在 PCR 扩增的反应条件上,进行了摸索。在第一轮 PCR 反应时,循环温度采用 94℃、57℃、72℃。利用高度保守的 5D 基因片段,制成 DNA 模板,扩增后的基因片段为 262 bp。第二轮利用荧光标记引物进行不对称 PCR 扩增后,扩增结果较差。通过反复调整温度,将退火温度降至 50℃后,扩增结果得到明显改善。这表明了引物、缓冲体系、温度和循环等参数均比较适宜。同时在芯片探针的选择上,采用了负链探针的设计,使检测结果无非特异性交叉反应,显示了芯片的高度特异性。

目前日本血吸虫的诊断主要依赖于免疫学方法,敏感性与特异性均不太理想。但用基因芯片检测血吸虫,国内外未见报道。本研究利用动物模型

标本中的日本血吸虫 DNA,成功地建立了检测日本血吸虫基因芯片的平台。芯片检测时,少量标记的 PCR 产物通过梯度稀释,琼脂糖电泳后条带模糊,甚至肉眼无法辨认时,但与芯片杂交后,能被扫描仪检测出,显示了芯片的敏感性较高。从本研究来看,基因芯片不但显示有较高的敏感性而且有较好的特异性,与传统的诊断系统相比,解决了操作效率低和结果客观性差等问题,但就血吸虫病的诊断芯片的研制,有待进一步研究。

参 考 文 献

1 郭家刚,郑江.中国血吸虫病流行与防治.疾病控制杂志,2000,4:

289-293.

- Joseph H, HE-NA, Xu Yuxin, et al. A polymerase chain reaction assay for detecting snails infected with *Bilharzia* parasites (*Schistosoma Mansoni*) from very early prepatency. *Am J Trop Med Hyg*, 1998, 59: 872-876.
- 陈一平,翁心华,徐肇,等.聚合酶链反应检测日本血吸虫 DNA 的探索.中华传染病杂志,1997,15:203-206.
- David R, Anne K, David A, et al. Some molecular insights into schistosoma evolution. *Int J Parasitol*, 1997, 27: 11-28.
- 张天浩,张春平,张光寅. DNA 芯片制作原理及其杂交信号检测方法.生物工程进展,2000,20:2064-2067.

(收稿日期:2003-04-08)

(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

28 例霍奇金氏病患者生存状况分析

常树建 徐爱乡 沙玲君

霍奇金氏病(HD)是免疫系统的恶性肿瘤,生存时间为评价肿瘤疗效的金标准;本文通过对 28 例患者随访资料分析以了解治疗后的 HD 患者生存情况。

1. 临床资料:收集无锡市第四人民医院 1995 年 12 月 1 日至 2002 年 6 月 30 日的全部 HD 患者共计 28 例,回顾性分析其临床资料及随访结果。男性 19 例、女性 9 例,年龄 8~74 岁,中位年龄 32 岁。25 例经活检确诊,3 例经穿刺确诊(穿刺涂片至少经两家三级医院病理科会诊),结节硬化型(NS)7 例、混合细胞型(MC)9 例、淋巴细胞为主型(LP)4 例、8 例患者未分型、无淋巴细胞消退型(LD)。I、II 期患者 16 例,III、IV 期患者 12 例。有 B 症状 11 例、脾侵犯 2 例、2 例失访,中位随访时间 39 个月(6~88 个月)。随访截止日期 2003 年 1 月。生存分析采用 Kaplan-Meier 法。使用 Stata7 软件进行分析。生存曲线检验 logrank 法。

2. 治疗方法及疗效:I、II 期患者化疗加放疗;III、IV 期患者予以化疗。化疗方案选择:18 例使用了以 ABVD 或 MOPP 为主的方案,另 10 例患者使用了 COP、COPP、COMP、CHOP 等为主的方案。完全缓解 14 例、部分缓解 11 例、稳定 1 例、进展 2 例,总有效率 86%,完全缓解率 50%。

3. 结果:本组患者 26 例得到随访,2 例失访,失访率 7.13%。总的 5 年生存率为 75.84%(s_x :0.0960, 95% CI: 0.5076~0.8934)。①不同分期生存比较:I、II 期 5 年生存率为 88.89%(s_x :0.1048, 95% CI: 0.4330~0.9836);III、IV 期 5 年生存率 64.29%(s_x :0.1460, 95% CI: 0.2982~0.8501)。但上述两组患者生存率经秩和检验(logrank)差异无统计学意义($P=0.1576$)。②不同治疗方法比较:使用

ABVD/MOPP 组的 5 年生存率为 83.57%(s_x :0.1077, 95% CI: 0.4804~0.9570);使用其他方案组 5 年生存率为 0.6481%(s_x : 0.1653, 95% CI: 0.2532~0.8721, 差异无统计学意义($P=0.2411$))。③不同年龄生存率:<50 岁组 5 年生存率为 0.7279%(s_x : 0.1186, 95% CI: 0.4199~0.8903);>50 岁组 5 年生存率为 0.8333%(s_x : 0.1521, 95% CI: 0.2731~0.9747),差异无统计学意义($P=0.8051$)。④不同病理亚型间生存率见表 1。

表1 HD 患者不同病理亚型间生存率比较

病理亚型	生存率(%)	s_x	95% CI
LP	1.0000	-	-
NS	0.7143	0.1707	0.2582~0.9198
MC	0.6857	0.1863	0.2128~0.9121
LD	-	-	-

注: $P=0.7238$ “-”为无

4. 结论:HD 是发生于免疫系统的一种恶性肿瘤。从 1962 年 Kaplan 及其同事证明予肿瘤致死剂量放疗能治愈大部分 I、II 期患者,到 1964 年美国 NCI 第一次使用 MOPP 治疗晚期患者,至 1974 年第一次使用 ABVD/MOPP 治疗初治患者,HD 的治疗取得了巨大的成功。本组病例 I、II 期与 III、IV 期的 5 年生存率差异无统计学意义以及生存率的 95% CI 范围较宽考虑与样本量相对较少有关。目前治疗 HD 首选化疗方案为 ABVD/MOPP,本组病例中 2000 年以前的部分病例同时使用了该方案及其他方案,存在混杂,其结果解释需谨慎。进一步比较不同病理亚型间的生存情况显示淋巴细胞为主型预后最好,但差异无统计学意义,临床一般认为淋巴细胞为主型预后最好,但亦有文献报道结节硬化型预后较好,而不同年龄组间比较显示>50 岁组略好于<50 岁组,但差别亦无统计学意义。

作者单位 214062 江苏省无锡市第四人民医院肿瘤科

(收稿日期:2003-06-05)

(本文编辑:尹廉)