

多重基因遗传表达分析系统及其应用研究进展

陈小金, 王乃福, 黄 晨, 董志珍*

(天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心, 天津 300461)

摘 要: 核酸检测技术广泛用于生命科学、微生物学及医学领域。随着分子生物学的发展, 在经典技术的基础上研究人员又开发出多种新型检测技术。其中多重基因遗传表达分析系统(gene expression profiler genetic analysis system, GeXP)技术作为聚合酶链式反应和芯片的换代技术, 具有特异性好、灵敏度高的特点, 能够同时检测多个目的基因, 真正意义上实现了高通量检测。本文详细介绍了 GeXP 技术的原理以及优缺点, 并对 GeXP 技术在畜牧兽医研究、转基因食品检测、微生物检测及医学研究中的应用进行阐述, 以期为该技术将来在食品检测方面的推广提供参考。

关键词: 多重基因表达分析系统; 多重 PCR; 微生物检测; 食品检测

Development of gene expression profiler genetic analysis system and its application

CHEN Xiao-Jin, WANG Nai-FU, HUANG Chen, DONG Zhi-Zhen*

(Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300461, China)

ABSTRACT: Detection of nucleic acid is widely used in life science, microbiology and medical science. With the developments of molecular biology, new testing approaches are constantly emerging on the basis of classical technology. As the regeneration technology of PCR and chip, gene expression profiler genetic analysis system (GeXP) has a broad application prospect, with features of high specificity and sensitivity, rapid speed and easy operation. This system truly realized the detection of high throughput for samples. This article reviewed the basic principle of GeXP system and its applications in veterinarian and animal husbandry, detection of genetically modified (GM) food and microorganism and medical research, which could provide a reference for detection of foodstuffs and microbiology.

KEY WORDS: gene expression profiler genetic analysis system; multiplex-PCR; detection of foodstuffs; detection of microbe

1 引 言

在过去的 30 年, 生物科学研究取得了巨大成就, 其中分子生物学技术的发展对生物科学的推动尤为重要。尤

其是 Mullis 建立的 PCR 技术, 如今已成为最经典的实验技术^[1], 其应用极其广泛, 包括基因扩增、检测、克隆、改造及遗传分析等, 甚至扩展到非生物学领域^[2]。同时 PCR 技术本身也在不断进步, 稳定性和准确性不断提高。此外, 依

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2014IK250)

Fund: Supported by the Scientific and Technological Project of the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (2014IK250)

*通讯作者: 董志珍, 研究员, 主要研究方向为动物疫病及动物性食品检测。E-mail: baobao152@126.com

*Corresponding author: DONG Zhi-Zhen, Researcher, Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, No.158 Jingmen Road, Free Trade Zone, Tianjin Port, Tianjin 300461, China. E-mail: wangnf@tjciq.gov.cn

据 PCR 原理研发的一系列新实验技术, 在生命科学研究中有重要的应用价值。在一个反应管中使用多套引物, 针对多个 DNA 模板或同一模板的不同区域进行扩增的过程即为多重 PCR(multiplex PCR)^[3], 满足同时分析不同 DNA 序列的需要, 尤其是在临床检测和科学研究时, 在一个反应管中能够同时检测多种目的 DNA, 这不仅能节省珍贵的实验样品而且能使以往繁琐的操作变得省时、省力。Chamberhan 等于 1988 年首次提出多重 PCR 以来, 又经过了多年的完善与发展, 多重 PCR 技术已广泛应用于生物学如各类病原微生物的检测与鉴别、遗传疾病诊断以及基因缺失、突变和多态性分析等多个领域^[4-6]。与常规 PCR 相比, 多重 PCR 由于在一个反应体系中添加多个模板和多对引物, 扩增反应过程中影响因素更多, 如不同引物在反应体系中的比例、热循环条件和退火温度及延伸温度等。所以, 在实际操作过程中需要对反应条件进行优化。多重 PCR 可用于同时检测多种病原体, 也可以用于鉴定是哪一种型病原体感染, 该技术在肝炎病毒检测、肠道致病性细菌及厌氧菌检测等传染病诊断以及食品和环境检测领域都有着广阔的应用前景^[7]。

食品微生物是影响食品安全重要因素之一, 食源性微生物引起的病例越来越多。目前常用的检测技术包括荧光标记噬菌体技术、PCR、RT-PCR^[8-12]。多重 PCR 的出现, 为多种微生物的检测提供了新的平台, 但是多重 PCR 的影响因素较多且不适合进行高通量检测^[13-16]。随着基因技术的发展, 转基因食品成为研究的热点, 同时也引发社会对转基因食品安全问题的关注。对转基因食品实行严格的检验监控才能制定出安全的食用标准, 从而让基因技术更好地服务于人类。转基因检测技术主要包括酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、蛋白生化检测、基因芯片和 PCR^[17-20], 其中以 ELISA 和 PCR 检测技术最成熟。但是 ELISA 检测转基因作物时, 外源基因可能只在植物的特定部位表达因此该法检测存在一定的局限性, PCR 技术以其灵敏度高、速度快的优点在转基因检测中应用广泛^[21,22]。但是当前对于转基因检测不仅要求定性而且要求定量, 同时又能对多个目的基因进行快速检测, 传统 PCR 只适用于小量样本, 样本量较大时试验耗时耗力, 且操作繁琐, 因此新型检测技术的开发迫在眉睫。

多重基因遗传表达分析系统(gene expression profiler genetic analysis system, GeXP)融合了多重 PCR 和毛细管电泳分离技术的优点, 可以实现对多个目的基因同时进行检测分析, 而且具有快速、准确、高通量等优势。

2 GeXP 技术简介

2.1 GeXP 技术原理

GeXP 系统是以多重 PCR 和毛细管电泳技术为基础, 用于研究多基因表达定量分析的平台, 该技术是以

RNA 为模板, 在同一 PCR 反应体系里由通用引物和嵌合引物进行多重 PCR 反应, 经过毛细管电泳分离技术, 仅用极少量总 RNA 即可在同一个体系里对多个目的基因进行分析。

GeXP 采用荧光标记通用引物和嵌合引物相结合引发多重体系扩增。反应体系中荧光标记引物和嵌合引物的以一定比例混合。PCR 反应第一步, 先由下游嵌合引物与原始 RNA 模板结合进行反转录反应, 再由上游嵌合引物合成 cDNA 的第二链; 第二步, 由正、反向嵌合引物的特异性序列以 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 分别扩增出通用引物的互补序列; 第三步由反应体系中占主导地位的荧光标记通用引物, 与其互补序列结合, 引发后续扩增, 扩增原理如图 1 所示^[23]。PCR 产物经毛细管电泳分离, 含有荧光标记的 PCR 产物依据检测片段与标准分子片段(DNA size standard, DSS)迁移时间计算出扩增片段的长度, 根据片段大小区分基因类型, 荧光信号强度代表该目的片段的扩增含量^[24]。

2.2 GeXP 技术优缺点

GeXP 技术检测样品省去凝胶电泳的过程, 由仪器直接对实验结果进行分析, 节省了大量人力物力。GeXP 可以将多个内参基因、目的基因及内质控基因整合在同一反应中进行分析, 消除了分管操作的移液误差和孔间系统误差, 提高了实验结果的准确性和可重复性。GeXP 能够检测 0.5 倍基因表达量变化, 具有无可比拟的线性关系(0.5 倍递增稀释, $R^2 > 0.99$)。GeXP 还可以实现单个孔定量分析 30 个基因, 每天累计可分析 5760 个基因。不仅降低了实验成本, 同时提高了实验效率。GeXP 采用的多重 PCR 技术将特异性引物和通用引物共用, 既能保证高特异性扩增又能有效克服传统 PCR 因为产物和引物差异导致的扩增效率不等引起的结果偏差。利用 GeXP 平台可在一个反应中同时完成 30 余种微生物检测, 一天可完成 192 个样品检测。此外, GeXP 还可用于 DNA 测序分析、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分析、短串联重复(short tandem repeat, STR)分析、杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)分析、多重连接探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)分析、甲基化分析、可变剪接变异体、融合基因等, 是目前功能最为全面的分析平台。只需要 5~50 ng 总 RNA 就能够定量分析基因的表达水平, 非常适合分析珍贵样本及单细胞。

当然, GeXP 技术也存在一些局限性。GeXP 系统中的毛细管电泳分离技术本身比较敏感, 对操作人员要求比较高。多重反应体系、反应浓度和多重引物比例需要反复优化。检测成本较普通 PCR 要高, 仪器维护成本也相对较高。检测需要开盖, 容易造成污染, 实验过程操作需注意。

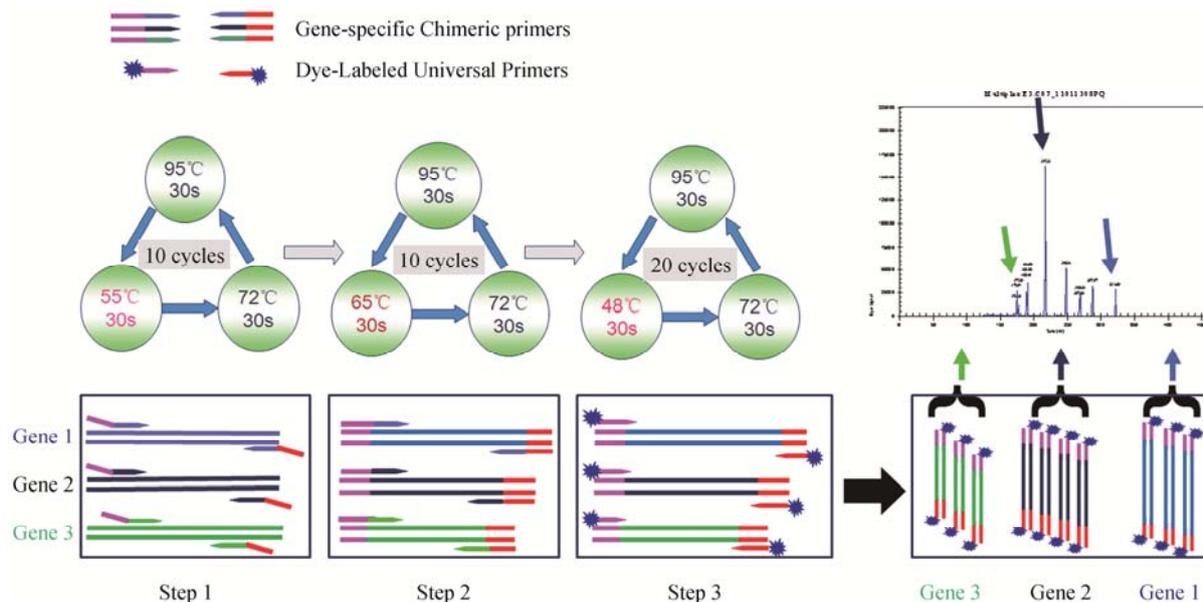


图 1 GeXP 系统原理示意图^[23]
Fig. 1 The principle sketch map of GeXP

3 GeXP 技术的应用

目前 GeXP 技术主要应用于医学上,如 DNA 测序、基因表达谱分析、疾病易感基因筛查、多重病原检测等。随着对该系统研究的不断深入,GeXP 在畜牧兽医研究、转基因食品检测、微生物检测、医学研究方面取得了一定的进展,为该技术在各领域推广奠定了基础。

3.1 GeXP 技术在畜牧兽医研究中的应用

禽类作为食用动物之一,在动物源性食品构成中占很大比例。一些病毒性疾病不仅影响禽肉及相关产品的产量和质量,甚至威胁公共卫生安全(高致病性禽流感),所以对动物疫病进行快速准确的检测具有重要意义。罗思思等^[25]建立了一种能够同时鉴别 H5、H7、H9 亚型禽流感、新城疫、传染性支气管炎、传染性喉气管炎、鸡毒支原体、滑液囊支原体和副鸡嗜血杆菌 9 种鸡病毒性呼吸道病原体的 GeXP 检测方法,并对该方法的特异性、准确性和敏感度进行验证,以 38 份临床样品进一步确证方法的可靠性,结果表明该法可在 100 copies/ μL 水平上同时对这 9 种病毒进行检测,适用于临床混合感染样品的快速检测,对鸡呼吸道疾病的有效防控有重要的应用价值。Qin 等^[26]运用 GeXP 技术对 H1N1 流感病毒、季节性流感 H1N1 病毒及 H3N2 病毒进行检测,结果显示该方法比常规方法更敏感更特异,其中对 H1N1 的检测下限可以达到每个反应 10 拷贝。拟穴青蟹和中华绒螯蟹是我国重要的海水养殖蟹类,具有较高的营养价值和经济价值,但在人工养殖过程中存活率低。关于拟穴青蟹和中华绒螯蟹免疫相关基因的研究

中对基因表达谱的分析是探究基因功能的重要方法之一。国内一些研究人员^[27,28]借助荧光定量 PCR 技术和 GeXP 技术,对拟穴青蟹不同组织中及细菌感染条件下部分免疫相关基因及内参基因的表达变化规律进行了表达模式分析,探讨了免疫相关基因在青蟹免疫过程中的作用,并对不同内参基因在各组织中及细菌感染条件下的表达稳定性进行了分析,为拟穴青蟹免疫相关基因的研究提供必要的理论基础。

3.2 GeXP 技术在转基因食品检测中的应用

转基因食品的安全性问题向来是备受争议的话题也是社会关注的焦点。马学军等^[29]以转基因大豆和转基因菜籽为研究对象,利用 GeXP 系统同时对 6 种外源转基因成分(PAT、NOS、CaMV35S、FMV35S、Bar、EPSPS)进行检测,并与中华人民共和国出入境检验检疫行业标准《植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验方法》^[30]进行比较,试验过程中使用的模板量为 100 ng (行标建议的最低模板量),结果与行标建议的荧光 PCR 检测结果完全一致。

3.3 GeXP 技术在微生物检测中的应用

目前 GeXP 技术在微生物检测中运用较多。Nagel 等^[31]运用 RT-PCR 和 GeXP 系统建立了多重反应体系,可以在潜伏感染水痘带状疱疹病毒病例体内细胞中检测到低丰度的病毒基因转录因子,检测下限可达 20 个拷贝,只需要 5 个 RT-PCR 体系就可以对整个带状疱疹病毒转录组的 68 个基因进行分析。周丽芳等^[32]分别用培养法、快速尿素酶法、PCR 法和 GeXP 法检测胃活检组织标本中的幽门螺杆菌

菌,同时用统计软件评估各种方法的敏感度、特异性、阳性预测值、阴性预测值,从检测方法角度横向评估 GeXP 系统检测幽门螺杆菌的有效性,GeXP 系统不仅可以满足临床标本检测的需求,还可以进行预后监测,具有很高的临床应用价值。何玢等^[33]利用 GeXP 系统建立一种多重逆转录-聚合酶链反应(mRT-PCR)方法,同时检测与病毒性脑炎相关的乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)等 8 种虫媒病毒,可在 10^2 copies/ μ L 水平同时并特异地检测出 8 种(共 13 个特异片段)脑炎相关病毒 RNA,对病毒性脑炎的分子诊断及流行病学调查具有重要意义。李瑾等^[34]建立了一种基于 GeXP 系统的多重 RT-PCR 检测方法用于检测 12 种呼吸道病毒,包括流感病毒 A 型和 B 型、季节性 H1N1、副流感病毒 1~3 型、人鼻病毒、人偏肺病毒、腺病毒、呼吸道合胞病毒 A 型和 B 型、人博卡病毒。胡秀梅等^[35]建立了同时检测引起手足口病的 9 种常见的人肠道病毒 GeXP 方法,用于检测人肠道病毒 71 型(HEV71)、柯萨奇病毒 A 组(CVA)16、4、5、9、10 型和柯萨奇病毒 B 组(CVB)1、3、5 型,并可在 10^3 copies/ μ L 水平同时特异地检测出 9 种病毒 RNA。刘艳等^[36]利用 GenomeLab 的 GeXP 遗传分析系统建立一种同时检测 A 组轮状病毒、诺如病毒 GI、GII 型、札如病毒、肠道腺病毒、星状病毒、人博卡病毒 II 型 7 种常见腹泻相关病毒的方法。杨梦婕等^[37]以 11 种 HPV 亚型为研究对象建立了一种基于 GeXP 多重基因表达遗传分析系统的单管多重 PCR 方法,用于人乳头瘤病毒(HPV)的分型检测。

3.4 GeXP 技术在医学研究中的应用

王少慧等^[38]应用 GeXP 系统同时检测 6 个基因,对 rhIL-24 诱导人卵巢癌细胞凋亡的相关基因表达进行分析。Alex 等^[39]运用 GeXP 技术成功地确定了 70 个基因的表达可以区分正常组织和前列腺癌组织,该技术可迅速的在有限的样本中对 35 个基因进行表达分析,确立了 GeXP 系统进行多重基因表达分析的原则。董矜等^[40]通过使用 GeXP 多重基因表达系统检测健康人和不同疾病患者外周血中炎症因子及相关基因的表达,并以 β -actin 作为参考基因,得到血中基因表达的相对含量,为 GeXP 多重基因表达系统向临床研究开展提供了技术支持,使基础研究成果转化为临床检测项目成为可能。张阳东等^[41]对 β -肌动蛋白(β -actin)、信号识别颗粒 14(SPR14)和 18S-rRNA 等 3 个管家基因在冠心病患者和健康对照人群中的表达差异。结果发现 3 个管家基因在对照组和 CAD 组中 β -actin 表达的差异最小,SPR14 次之,18S-rRNA 的表达差异较大,这提示管家基因 β -actin 和 SPR14 可作为检测 CAD 相关基因表达水平的内部参考基因。朱琳等^[42]为了研究转录因子基因 BCL6、KLF5 及核仁蛋白基因 NCL 在急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)患儿骨髓细胞中的表达情况及其在不同疾病状态下的表达特点。运用 GeXP 多重基因表达分析系统检测 BCL6、KLF5、NCL 基因在

ALL 患儿初诊及缓解期的表达变化。李丹等^[43]建立了 GeXP 多重耐药基因检测体系,从败血症患者感染的肺炎克雷伯杆菌检测出 7 个不同大小的耐药基因,可据此指导败血症的临床治疗。

4 结 语

目前针对微生物常用的检测方法包括病原分离鉴定、血清学和分子生物学技术。病原分离鉴定需要耗费大量的人力、物力,且所需检测时间较长。血清学方法的敏感度和准确性相对较低。分子生物学方法中应用最广泛的是 PCR 技术,也是近年来最受青睐的检测方法,广泛应用于各个研究领域,但是该法只适合小量样本检测,故研发高通量检测技术势在必行。基因芯片技术实现了高通量基因表达分析,但是需要对整个芯片的表达情况做出全面分析,不能获得单个基因的遗传信息,此外,基因芯片技术还存在成本较高、试验时间较长方面的问题^[24]。基于多重 PCR 和毛细管电泳的 GeXP 技术弥补了基因芯片技术的不足。多重基因遗传表达系统(GeXP)是一种全新的基因表达分析平台,它能够快速准确的对靶基因进行定性分析而且还可以进行定量分析,是多重 PCR 领域的突破性技术。GeXP 技术采用通用引物与特异引物相结合的方法,通过保持反应体系中各模板 DNA 的比例在扩增过程中不变而实现多重 PCR 产物定量检测的目的。GeXP 技术是基因芯片和定量 PCR 技术的换代产品,把基因表达分析提升到一个更高的水平,该技术可以监控的基因数目多,检测样本大,所需模板少。同时 GeXP 技术在处理批量样本时,可以节省检测时间,提高检测结果的准确性和可靠性。

食品安全问题关系国计民生,而传统的检测方法不能满足目前快速、准确、高通量检测的需求。本文介绍的 GeXP 技术具有诸多优点,可以同时满足上述检测需求,虽然技术本身还是存在一些问题,但是通过进一步完善,将来在食源性微生物及转基因食品的检测中具有广泛的应用前景。

参考文献

- [1] Saiki RK, Scharf S, Faloona F, *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia [J]. *Science*, 1985, 230: 1350-1354.
- [2] Brenner S, Lerner RA. Encoded combinatorial chemistry [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 5381-5383.
- [3] Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, *et al.* Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification [J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16: 11141-11156.
- [4] Caudai C, Padula MG, Bettini V, *et al.* Detection of HCV and GBV-C/HGV infection by multiplex PCR in plasma samples of transfused subjects [J]. *J Virol Methods*, 1998, 70: 79-83.
- [5] Heredia A, Soriano V, Weiss SH, *et al.* Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of HIV-1, HIV-2,

- HTLV-I and HTLV-II [J]. *Clin Diagn Virol*, 1996, 7: 85–92.
- [6] Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, *et al.* Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification [J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(23): 11141–11156.
- [7] 侯瑞生, 王丽, 张勤, 等. 多重 PCR 技术及其在病原体检测中的应用 [J]. *中华全科医学*, 2011, 9(8): 1288–1290.
Hou RS, Wang L, Zhang Q, *et al.* Multiplex PCR technique and its application in pathogen detection [J]. *Chin J Gen Pract*, 2011, 9(8): 1288–1290.
- [8] Flajshans M, Cossonc J, Redina M. The application of image cytometry to viability assessment in dual fluorescence-stained fish spermatozoa [J]. *Cell Biol Int*, 2004, 28(12): 955–959.
- [9] Keer JT, Birch L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability [J]. *J Microbiol Meth*, 2003, 53(2):175–183.
- [10] Vijay KS. Real-time reverse transcription-multiplex PCR for simultaneous and specific detection of rfbE and eae genes of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Mol Cell Probe*, 2006, 20 (5): 298–306.
- [11] Narjol GE, Axe F, Carlos AG, *et al.* Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae* cells entering the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock [J]. *Environ Microbiol*, 2006, 8(4): 658–666.
- [12] Narjol GE, Thomas SH, Mindi R, *et al.* Detection of live salmonella sp. cells in produce by a TaqMan-Based quantitative reverse transcriptase Real-Time PCR targeting invA mRNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(11): 3714–3720.
- [13] Kao CC, Liu MF, Lin CF, *et al.* Antimicrobial susceptibility and multiplex PCR screening of ampC genes from isolates of *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens* [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2010, 43(3): 180–187.
- [14] 张小贤, 张家敏, 黄卫平, 等. 应用多重 PCR 法快速检测伤寒沙门菌的研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(5): 1074–1076.
Zhang XX, Zhang JM, Huang WP, *et al.* Application of multiplex-PCR for the detection of *Salmonella typhi* [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2010, 20(5): 1074–1076.
- [15] 李博, 陈福生, 王小红, 等. 多重 PCR 检测食品中的金黄色葡萄球菌、志贺菌和沙门菌 [J]. *卫生研究*, 2008, 37 (4): 438–442.
Li B, Chen FS, Wang XH, *et al.* Detection of *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp. in food by multiplex PCR [J]. *J Hyg Res*, 2008, 37(4): 438–442.
- [16] Kawasaki S, Horikoshi N, Okada Y, *et al.* Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meal samples [J]. *J Food Prot*, 2005, 68(3): 551–556.
- [17] Lipp M, Brodmann P, Pietsch K, *et al.* IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder [J]. *J AOAC Int*, 1999, 82(4): 923–925.
- [18] Validation of analytical methods for the identification and determination of genetically modified organisms in food and food ingredients [R]. The European Commission, DG Joint Research Centre, 2000.
- [19] Pietseh K, Waiblinger HU, Brodmarm P, *et al.* Screening methods for identification of, genetically modified food of plant origin [J]. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 1997, 93(2): 35–38.
- [20] Luthy J. Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods [J]. *Food Contr*, 1999,10(6): 359–361.
- [21] Thion L, Vossen C, Coudere B, *et al.* Detection of Genetically Modified Organisms in Food by DNA Extraction and PCR amplification [J]. *Biochem Mol Biol Edu*, 2002,30(1): 51–55.
- [22] Tengel JC, Schiissler P, SetZke E, *et al.* Detection of genetically modified soybean and maize in raw and processed foodstuffs[EB/OL]. www.qiagen.com.
- [23] Hu XM, Xu BL, Yang YM, *et al.* A high throughput multiplex PCR assay for simultaneous detection of seven aminoglycoside resistance genes in Enterobacteriaceae [J]. *BMC Microbiol*, 2013, 13: 58.
- [24] 丁森, 聂福平, 王昱, 等. 基因芯片在痘病毒研究中的应用 [J]. *动物医学进展*, 2011, 32(6): 105–108.
Ding S, Nie FP, Wang Y, *et al.* Applications of gene microarray in poxvirus research [J]. *Prog Vet Med*, 2011, 32(6): 105–108.
- [25] 罗思思, 谢芝勋, 刘加波, 等. 九种鸡呼吸道病原体 GeXP 检测方法的建立 [J]. *中国兽医科学*, 2013, 434(10): 1040–1046.
Luo SS, Xie ZX, Liu JB, *et al.* Establishment of a GeXP assay for the differentiation of nine chicken respiratory pathogen [J]. *Chin Vet Sci*. 2013, 434(10): 1040–1046.
- [26] Qin M, Wang DY, Huang F. Detection of pandemic influenza A H1N1 virus by multiplex reverse transcription-PCR with a GeXP analyzer [J]. *J Virol Meth*, 2010, 168: 255–258.
- [27] 房娅博. 拟穴青蟹免疫相关基因的克隆及内参基因的适用性分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
Fang YB. Cloning and expression profile of two immune-related genes and studies on the applicability of eleven internal reference genes in Mud Crab, *Scylla paramamosain* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013.
- [28] 孙曼曼. 拟穴青蟹与中华绒螯蟹几个胁迫响应相关基因的克隆与表达分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
Sun MM. Cloning and expression profile of the response to stress genes from mud crab, *Scylla Paramamosain* and *Eriocheir sinensis* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012.
- [29] 杨梦婕. GeXP-PCR 技术多重检测食品转基因成分和 HPV 分型感染 [D]. 广州: 暨南大学, 2011.
Yang MJ. Detection of genetically modified foods and genotyping HPV infection by a GeXP based Multiplex PCR Assay [D]. Guangzhou: Jinan University, 2011.
- [30] SN/T1204-2003, 植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
SN/T1204-2003, Protocol of the real-time PCR for detecting genetically modified plants and their derived products [S]. Beijing: Standards Press of China, 2003.
- [31] Nagel M, Gilden D, Shade T, *et al.* Rapid and sensitive detection of 68 unique varicella zoster virus gene transcripts in five multiplex reverse transcription-polymerase chain reactions [J]. *J Virol Meth*, 2009, 157(1): 62–68.
- [32] 周丽芳, 保志军, 缪应新, 等. 多重基因分析系统检测幽门螺杆菌的初步研究 [J]. *检验医学*, 2014, 4: 350–356.
Zhou LF, Bao ZJ, Miao YX, *et al.* The preliminary evaluation of multiple genetic analysis system to detect *Helicobacter pylori* [J]. *Lab Med*, 2014, (4): 350–356.
- [33] 何玢, 王环宇, 张晨, 等. 8 种脑炎相关虫媒病毒 GeXP 检测方法的初步

- 建立[J]. 病毒学报, 2012, 28(1): 57-62.
- He B, Wang HY, Zhang C, *et al.* Development of a GeXP based multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of eight arboviruses related to encephalitis [J]. *Chin J Virol*, 2012, 28(1): 57-62.
- [34] 李瑾, 毛乃颖, 秦萌, 等. GeXP 多重 PCR 技术同时检测 12 种常见呼吸道病毒[J]. 病毒学报, 2011, 27(6): 526-532.
- Li J, Mao NY, Qin M, *et al.* A GeXP Based Multiplex RT-PCR Assay for Simultaneous Detection of twelve human respiratory virus [J]. *Chin J Virol*, 2011, 27(6): 526-532.
- [35] 胡秀梅, 张勇, 徐邦牢, 等. GeXP 多重基因表达遗传分析系统在手足口病病原分型检测中的应用[J]. 病毒学报, 2011, 27(4): 331-336.
- Hu XM, Zhang Y, Xu BL, *et al.* Development of a GeXP based multiplex RT-PCR assay for simultaneous differentiation of nine human hand foot mouth disease pathogens [J]. *Chin J Virol*, 2011, 27(4): 331-336.
- [36] 刘艳, 徐子乾, 李金松, 等. 建立新型的常见腹泻相关病毒的多重检测方法[J]. 病毒学报, 2011, 27(3): 288-293.
- Liu Y, Xu ZQ, Li JS, *et al.* A Novel method for multiplex detection of gastroenteritis-associated viruses [J]. *Chin J Virol*, 2011, 27(3): 288-293.
- [37] 杨梦婕, 罗乐, 聂凯, 等. GeXP 多重基因表达遗传分析系统应用于人乳头瘤病毒的分型检测. 中华预防医学杂志, 2013, 47(12): 1163-1163.
- Yang MJ, Luo L, Nie K, *et al.* Detection and typing of human papillomavirus by a GeXP Assay [J]. *Chin J Prev Med*, 2013, 47(12): 1163-1163.
- [38] 王少慧, 郭锦锦, 唐艳丽, 等. 多基因遗传表达分析系统检测 rhIL-24 诱导人卵巢癌细胞凋亡相关基因的应用[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(12): 1312-1316.
- Wang SH, Guo JJ, Tang YL, *et al.* The detection of apoptosis-associated genes in SKOV3, SKOV3 /ddp cells of the recombinant human interleukin-24 induced by GeXP analysis system [J]. *Chin J Immunol*, 2013, 29(12): 1312-1316.
- [39] Alex JR, Rashmi MK, William G, *et al.* Analytical validation of the GeXP analyzer and design of a workflow for cancer-biomarker discovery using multiplexed gene-expression profiling [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 393: 1505-1511.
- [40] 董矜, 田亚平, 张阳东, 等. GeXP 多重基因表达系统检测外周炎性相
- 关基因方法学探索[J]. 标记免疫分析与临床, 2009, 16 (1): 37-40.
- Dong J, Tian YP, Zhang YD, *et al.* Optimized detection of peripheral blood inflammatory related gene expression by GeXP multi gene expression system [J]. *Label Immunoass Clin Med*, 2009, 16 (1): 37-40.
- [41] 张阳东, 温新宇, 董矜, 等. 冠心病相关基因表达分析中管家基因表达水平比较[J]. 标记免疫分析与临床, 2010, 6 (17): 154-157.
- Zhang YD, Wen XY, Dong J, *et al.* Comparison of housekeeping genes expression levels in analysis of coronary artery disease related genes [J]. *Label Immunoass Clin Med*, 2010, 6 (17): 154-157.
- [42] 朱琳, 郑胡镛, 刘潇, 等. BCL6、KLF5、NCL 基因在儿童急性淋巴细胞白血病中异常表达的特点[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 79(4): 362-367.
- Zhu L, Zheng HY, Liu X, *et al.* Aberrant expression of BCL6, KLF5 and NCL in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia [J]. *Chin J Cancer Biother*. 2011, 79(4): 362-367.
- [43] 李丹. 应用 GeXP 系统检测败血症患者肺炎克雷伯杆菌多重耐药基因的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 91(7): 591-594.
- Li D. Using a GeXP system to detect genes responsible for the multidrug resistance of klebsiella pneumonia in patients with sepsis [J]. *J Pathog Biol*, 2014, 91(7): 591-594.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



陈小金, 兽医师, 主要研究方向为动物传染病诊断与防治新技术。
E-mail: chenxj0@tjciq.gov.cn



董志珍, 研究员, 主要研究方向为动物疫病检测技术。
E-mail: baobao152@126.com