

人乳头瘤病毒基因分型芯片的建立及其在临床中的应用

杨光 梁彩红 崔金环 陈姝

【摘要】 目的 建立一种适合于临床应用的人乳头瘤病毒(HPV)基因分型检测新方法,并通过
对宫颈分泌物标本检测,验证 HPV 基因分型检测新方法的临床使用效果。方法 利用 HPV 保守的
L1 区设计各型 PCR 扩增通用引物,根据 GenBank 中 HPV 的型特异性序列设计、合成分型探针,制备
可对 16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66 和 68 型 15 种高危型和 6、11 和 42 型 3 种低危
型 HPV 进行联合分型检测的膜芯片。通过对 100 例宫颈炎患者宫颈分泌物标本进行检测,以了解临
床使用效果;对阳性标本进行测序以验证分型的准确性;对标准品进行测定以检测其灵敏度。结果
在 100 例临床样品中发现 HPV 感染病例 30 例,其中包括高危型中的 HPV16、18、33、45、51、58 和 66,
以及低危型中的 HPV6、11 和 42,既有单一型感染也有混合型感染。灵敏度经标准品验证可达 10 个
拷贝的 HPV DNA 分子。对单一类型感染基因测序分型证实,所建立的 HPV 基因芯片分型结果与测
序结果完全一致。结论 利用 PCR-膜芯片技术建立的 HPV 基因分型诊断方法可以简便、有效地检
出所有已知的高危型和低危型 HPV,并能明确其基因类型,适用于临床 HPV 感染的实验室诊断与流
行病学研究。

【关键词】 宫颈癌; 人乳头瘤病毒; 基因分型; 基因芯片

The development and clinical application of papillomavirus genotyping by DNA chip YANG Guang,
LIANG Cai-hong, CUI Jin-huan, CHEN Shu. Institute for Clinical Medicine, The First People's
Hospital of Foshan, Foshan 528000, China

【Abstract】 Objective To develop a new platform for genotyping human papillomavirus(HPV) and
to investigate its effect in clinical application. **Methods** A pair of common primers of 18 HPV subtypes for
PCR, was designed in HPV conservative L1 region. Genotyping probes for detecting 15 high-risk HPV
subtypes 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66 and 68, together with 3 low-risk
HPV 6, 11 and 42 were selected respectively from Genbank and fixed on membrane to make DNA chip.
PCR amplification and DNA chip technology were optimized. 100 clinical samples were used to investigate
the effect of HPV genotyping DNA chip. Veracity of the genotyping results was verified by sequencing.
Results From the 100 clinical samples, 30 were found to be HPV positive, including high-risk HPV
subtypes 16, 18, 33, 45, 51, 58, and 66, and low-risk HPV 6, 11 and 42. The sensitivity tested by
standard samples was up to 10 copies of HPV DNA. **Conclusion** The HPV genotyping system developed
here with DNA chip showed high sensitivity and specificity, suitable to be applied in clinical practice for
HPV diagnosis and investigation on the prevalence of HPV sub-types.

【Key words】 Cervical cancer; Human papillomavirus; Genotyping; DNA chip

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的致病性与其亚型有关,现在人们普遍公认的高危型 HPV 有 15 种,已被确定为宫颈癌的主要病因^[1-3]。要进一步研究不同亚型 HPV 在不同种族人群中的致病性、治疗和预后情况,以及更好地了解 HPV 临床感染类型的变化趋势,就需要建立一种适合于临床应用的、能够对所有已知高危类型和常见低危类

型 HPV 同时进行联合和分型检测的新方法。为此,我们利用 PCR-膜芯片技术,在 HPV 保守的 L1 区设计可对各种亚型 HPV 进行 PCR 扩增的公共引物,通过将扩增产物与固定在膜芯片上的包括 15 种高危亚型和 3 种低危亚型在内的分型探针进行杂交,以检测 HPV 的感染情况。

材料与与方法

1. 材料:研究对象为 2004 年 1-12 月因宫颈疾

患在我院就诊的患者, 年龄 22~60 岁。标本取自子宫颈口分泌物。样本在 2 h 内进行 DNA 抽提, 或 -20℃ 保存, 3 个月内进行 DNA 抽提。

2. 引物和探针的设计与合成: 选取 L1 区 MY09/11 (MY09: 5'-biotin-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3', MY11: 5'-biotin-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3'。M = A/C, W = A/T, Y = C/T, R = A/G) 作为 HPV 通用引物^[4]。β-球蛋白引物 PC03/GH20 (PC03: 5'-biotin-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC-3'; GH20: 5'-biotin-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3') 作为管家基因^[5]。在所有引物的 5' 端均用生物素进行标记。根据 GenBank 中 HPV 相关亚型的序列设计分型探针, 根据 β-球蛋白的序列设计质控探针, 序列见表 1。在所有探针的 5' 端均用氨基进行标记, 按照一定的顺序通过点膜将分型探针固定在尼龙膜上。引物与分型探针均由上海博亚生物技术公司合成。

表1 18种 HPV 亚型分型探针序列

HPV 亚型	序列(5'→3')
6	5'-TCCGTAAGTACATCTTCCA-3'
11	5'-TCTGTGTCTAAATCTGCTA-3'
16	5'-GATATGGCAGCACATAATG-3'
18	5'-CTTAAATTTGGTAGCATCATAT-3'
31	5'-TCTGTTTGTGCTGCAATT-3'
33	5'-CTGTCACTAGTTACTTGTGTGC-3'
35	5'-CTGCTGTGTCTTCTAGTGAC-3'
39	5'-GAGTCTTCCATACCTTCTAC-3'
42	5'-CACCAGATGTTGCAGTG-3'
45	5'-GCACAGGATTTTGTGTAG-3'
51	5'-TATTAGCACTGCCACTGC-3'
52	5'-GCTGAGGTTAAAAAGGAAAG-3'
53	5'-GCAACCACACAGTCTATGT-3'
56	5'-AGTACTGTACAGAACAGTT-3'
58	5'-ATTATGCACTGAAGTAACTAAG-3'
59	5'-GTGTGTGCTTCTACTACTTC-3'
66	5'-ATTAATGCAGCTAAAAAGCACA-3'
68	5'-CTACTACTGAAATCAGCTGTA-3'
PC	5'-CACAACTGTGTTCACTAGC-3'

3. HPV 芯片分型检测: 将样本转移到 1.5 ml 的离心管中, 13 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。加入 50 μl 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 悬浮沉淀, 100℃ 加热 10 min。13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 5 μl, 加入含 10 mmol/L Tris-HCl、50 mmol/L KCl、0.1% Triton X-100、6 mmol/L MgCl₂、MY09 和 MY11 引物各 50 pmol、β-球蛋白引物 PC03/GH20 各 5 pmol、dATP/dCTP/dGTP 各 200 μmol/L、dUTP

600 μmol/L、Taq DNA 聚合酶 5 U、UAG 酶 1 U 的 PCR 反应液中 (20 μl)。PCR 反应条件为: 50℃ 15 min, 95℃ 10 min, 95℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环 40 次; 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物与 HPV 分型膜芯片杂交及显色按常规方法操作。根据蓝色斑点出现的有无和位置判读是否有 HPV 感染及基因亚型。

4. HPV 测序验证: 对膜杂交显示为单一亚型感染的阳性标本 PCR 产物, 纯化后送香港城市大学深圳研究院进行测序。序列通过网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> 进行比对。

5. HPV 标准品克隆质粒的构建: 各型 HPV 检测段 DNA 的克隆质粒的构建按 pGEM-T 载体系统说明书进行操作。重组质粒通过 T7 启动子引物测序, 并与该亚型 HPV 基因组序列进行比对, 以确定构建质粒中所含的各型 HPV 片段与检测序列完全相同。

6. 灵敏度检测: 将经过工程菌扩增的重组质粒提纯后, 应用紫外分光光度计测定核酸浓度, 用 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 配制成 10⁶ 拷贝/ml 的原始标准品, 再将原始标准品稀释成不同浓度的 HPV 标准品。取 1 μl 进行 PCR、杂交、显色, 以确定 HPV 分型芯片的灵敏度。

结 果

1. 芯片分型结果: 在 100 例样本中共检出 HPV 阳性病例 30 例, 其中单一亚型感染 23 例, 多重感染 7 例 (表 2)。HPV 单一感染时, 在膜芯片上相应 HPV 亚型探针位点处可见到一个蓝色斑点; 双重感染或多重感染时, 在膜芯片上可见到两个或两个以上的显色斑点 (图 1)。

2. 测序分型结果: 经过对 23 例 HPV 分型膜芯片检测为单一亚型感染的样本进行测序分型验证, 测序分型结果与芯片分型结果完全一致。

表2 100 例样本中 HPV 各亚型感染构成

HPV 亚型	感染病例数*	构成比 (%)
HPV16	16	42.1
HPV18	4	10.5
HPV58	4	10.5
HPV42	3	7.9
HPV6, 11, 33, 45, 66	10 [#]	10.6
HPV51	1	2.6
合 计	38	100.0

* 包括多重感染病例; # 各 2 例

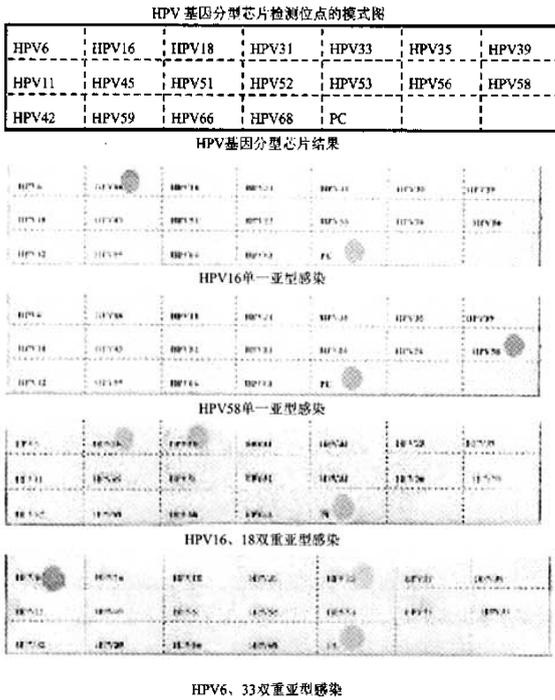


图1 HPV 基因分型芯片结果

3. 灵敏度检测结果: 对不同稀释浓度的 HPV DNA 标准品检测, 结果显示可以对含有 10 个拷贝以上的 HPV DNA 分子进行分型诊断。

讨 论

高危型 HPV 的持续性或反复性感染已被确定为宫颈癌发生的最主要原因^{16, 17}。由于不同亚型 HPV 其编码外壳蛋白的基因变异很大, 不同亚型 HPV 之间基本上没有交叉保护性抗体, 容易造成不同高危型 HPV 多重感染或多次感染。及时发现高危型 HPV 感染是早期防治宫颈癌的重要措施。临床上对 HPV 感染的诊断多是通过检测其 DNA 来进行的, 目前常用的 DNA 杂交捕获法和荧光定量 PCR 法均无法显示 HPV 具体感染的亚型, 不利于流行病学和病因学的进一步深入研究。

本文利用 HPV 相对保守的 L1 区序列设计出可以扩增各种亚型 HPV 的通用引物。为避免因为 HPV 在引物结合区发生突变造成的扩增失效, 我们在相对容易发生突变的碱基处合成了含不同碱基的引物。另外, 为了方便扩增产物的反向杂交检测, 我们在通用引物的一端还标记了生物素, 在引物间的变异区设计各亚型 HPV 的特异性分型探针。PCR 扩增后, 将产物与固定在尼龙膜上的 HPV 分型探

针进行杂交, 生物素与偶联链霉亲和素的过氧化物酶结合, 与 TMB 发生显色反应从而在膜条上显现蓝色斑点。实验表明, 利用膜芯片技术, 特异性分型探针分辨率可达一个碱基的差异, 而我们选择的 HPV 各亚型探针的碱基差异都在 30% 以上, 故其杂交结果的特异性很高, 阳性样品经 DNA 序列分析, 也未发现有非特异性杂交出现。通过质粒构建的 HPV 各型标准品检测显示, HPV 基因分型芯片法的灵敏度可达到对 10 个拷贝 HPV DNA 分子进行有效检测, 并可明确地显示出 18 种 HPV 亚型具体种类。

不同地区和不同种族人群对各个亚型的易感性以及高危型 HPV 中不同亚型对各种人群的致癌性的强弱是否存在差异目前还不十分清楚, 利用本实验所建立的膜芯片杂交方法对所有已知的高危型 HPV 进行联合与分型诊断, 将有助于这些问题的解决。

本实验所建立的 HPV 分型检测方法经初步临床应用及测序验证, 结果表明具有通量高、灵敏度高、特异性好等优点, 特别适用于临床进行 HPV 感染的诊断以及开展宫颈癌防治的研究。

参 考 文 献

- 1 Zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochemica Biophysica Acta*, 1996, 1288: F55-F78.
- 2 Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, et al. A general primer GP51/6 (1)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 791-795.
- 3 Van Ranst MA, Kaplan JB, Burk RD. Phylogenetic classification of human papillomaviruses; correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol*, 1992, 73: 2653-2660.
- 4 Manos MM, Ting Y, Wright DK, et al. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*, 1989, 7: 209-214.
- 5 Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, 239: 487-491.
- 6 Bachtiry B, Obermair A, Dreier B, et al. Impact of multiple HPV infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Int J Cancer*, 2002, 102: 237-243.
- 7 Ylitalo N, Josefsson A, Melbye M, et al. A prospective study showing long term infection with human papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma in situ. *Cancer Res*, 2000, 60: 6027-6032.

(收稿日期: 2005-01-11)

(本文编辑: 孙强正)