

低密度基因芯片技术检测人乳头瘤病毒基因型

王 敏¹, 王方金², 吴 健³, 王伟毅², 何蕴韶¹

(中山大学 1. 中山医学院解剖学教研室; 2. 达安基因股份有限公司, 广东 广州 510080;
3. 广东省出入境检验检疫局, 广东 广州 510623)

摘 要:【目的】利用低密度基因芯片方法对人乳头瘤病毒(HPV)进行分型检测, 建立一种经济实用的临床 HPV 感染的基因型检测方法。【方法】利用低密度基因芯片方法对 145 例阴道镜门诊病人的宫颈拭子标本进行 HPV-DNA 检测并分型。【结果】被检人群中共检测出 57 例 HPV 阳性, 88 例 HPV 阴性, HPV 的感染率为 39.3%, 阳性标本中检测出 12 种高危型别, 2 种低危型别。其中单型感染 51 例(89%), 混合感染 6 例(11%), 16, 31, 18, 58 型检出率较高。【结论】低密度基因芯片是一种快速、简便、特异性强、灵敏度高的检测方法, 在 HPV 和宫颈癌的筛查与诊断中有很大的应用价值。

关键词: 人乳头瘤病毒; 低密度基因芯片; 基因分型

中图分类号: R373.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)04-0431-04

Detecting and Genotyping of Human Papillomavirus by Low-Density DNA Array

WANG Min, WANG Fang-jin, WU Jian, WANG Wei-yi, HE Yun-shao

(1. Department of Anatomy, Zhongshan Medical College; 2. Da'an Gene Company Ltd, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080; 3. Inspection and Quarantine of Guangdong, Guangzhou 510623, China)

Abstract: 【Objective】To establish a high efficient and simple method for detecting and genotyping HPV from clinical sample. 【Methods】Cervical scrape samples were collected from 145 patients who attending the clinic of colposcopy. DNA was extracted and amplified by PCR with general primer set. All PCR-positive samples were then genotyped by low-density DNA array. 【Results】HPV-DNA was detected in 39.3% of the samples by low-density DNA array. Fifty-one patients were infected with single-type HPV and 6 patients were infected with multiple-type HPV. Twelve high risk types (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66) and 2 low risk types (6, 11) were detected. The most commonly found high-risk types were HPV-16, HPV-31, HPV-18, and HPV-58. 【Conclusion】Low-density DNA array is a rapid, convenient method for detecting of HPV DNA with high sensitivity and high specificity in diverse clinical sample. It is a valuable method for the molecular diagnosis and epidemiology of this important virus.

Key words: human papillomavirus; low-density DNA array; genotyping

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(4):431-434]

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是宫颈癌重要的致病因子^[1]。大部分 HPV 感染是一过性^[2]。根据不同型别 HPV 的致病能力不同, 可将 HPV 型分为高危型和低危型, 前者包括与宫颈癌密切相关的 HPV-16、18、31、33 等型别, 后者包括 HPV-6、11、42、43 引起尖锐湿疣等良性病变的 HPV 型别。高危型 HPV 的持续或反复感染才可能

导致宫颈癌。从感染 HPV 至宫颈癌发生需数年时间, 若能及早发现并积极处理高危 HPV 感染, 则可有效阻断致癌环节, 从而预防宫颈癌的发生。因此 HPV 筛查及分型在宫颈癌防治中具有非常重要的意义。本研究利用低密度基因芯片方法对临床宫颈标本进行检测, 旨在利用低密度基因芯片建立一种快速、简便、灵敏、特异性强的 HPV 感染

收稿日期: 2006-01-25

作者简介: 王 敏(1979-), 女, 湖南郴州人, 硕士生; 何蕴韶, 教授, 博士生导师, 通讯作者. E-mail: xiaomin618@126.com

和宫颈癌的筛查与诊断方法。

1 材料和方法

1.1 标本采集

省医 2004 年 3 月至 2004 年 4 月阴道镜门诊病人 145 例,在阴道镜的直视下,将灭菌棉拭子伸入宫颈管 2 cm,沿宫颈管旋转刮取上皮细胞,采出的标本置于盛 1 mL 生理盐水的小试管中备检。

1.2 引物与探针设计

通用引物^[3]、内参基因 Globin 引物 PC04/GH20,引物 5 端标记生物素;根据多序列比对结果设计 HPV21 种亚型的特异性探针,其中包括 15 种常见高危型和 5 种低危型及 cp8304 型,探针用氨基标记;引物、探针由中山大学达安基因股份有限公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 提取及基因扩增 将分泌物洗脱于盐水中,10 000 r/min ($r=15$ cm)离心 5 min,弃上清,加 50 μ L DNA 提取液并混匀,沸水浴 10 min,然后再离心 5 min,取上清液 5 μ L 做 PCR 反应。扩增仪为 PE9700,反应体系为 50 μ L,反应条件为:93 预变性 3 min,93 变性 40 s,55 退火 40 s,72 延伸 40 s,共 40 个循环,最后 72 延伸 7 min。PCR 产物在 20 g/L 的琼脂糖电泳检测后-20 保存备用。

1.3.2 芯片处理 将尼龙膜用 10%EDC 浸泡 30 min 以活化膜条,按一定顺序(见图 1)将探针点于膜条上,晾干后用 0.1 mol/L NaOH 固定探针,蒸馏水清洗后晾干存于 4 冰箱备用。

PC ○	IC ○	16 ○	18 ○	31 ○	33 ○
35 ○	39 ○	45 ○	51 ○	52 ○	53 ○
56 ○	58 ○	59 ○	66 ○	68 ○	cp8304 ○
6 ○	11 ○	42 ○	43 ○	44 ○	

图 1 探针分布图

Fig.1 Contribution of probes

1.3.3 基因分型 扩增产物 98 变性 10 min 后立即放置冰上 2 min,然后将产物与杂交液混合,放置 DNA 杂交仪(香港凯普公司)快速杂交 5 min,用杂交液清洗膜条;再用链霉素-生物素蛋白-辣根过氧化物酶结合物(POD)25 下浸泡 2 min,最后用 TMB 显色观察结果。

1.3.4 灵敏度检测 将不同型别 HPV 扩增产物克隆测序鉴定,抽提质粒,用紫外分光光度计测定质粒 OD 值,确定质粒的拷贝数,对不同质粒稀释梯度进行杂交检测,从而确定各型的灵敏度。

1.3.5 特异性检测 收集常见生殖道和呼吸道病原体如解脲支原体、淋球菌、肺炎衣原体等利用低密度基因芯片检测,验证该方法的特异性。

2 结果

2.1 PCR 产物鉴定

通过用 PCR 对提取 DNA 后的宫颈标本进行扩增,利用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,可见内参基因(268 bp)与目的基因条带(450~470 bp)(图 2)。145 例样本中,57 例电泳阳性,阳性率为 39.3%。

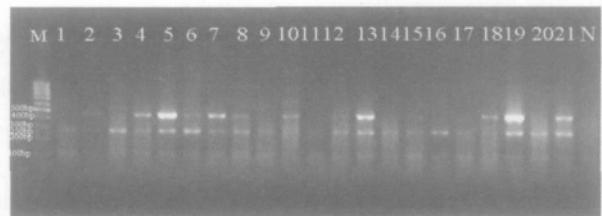


图 2 PCR 结果

Fig.2 Result of PCR

M: 100 bp ladder DNA marker; N: negative control; 1-21: product of PCR

2.2 基因芯片分型

利用基因芯片对 57 例阳性的 PCR 产物进行分型,55 例杂交结果阳性,另有两个标本电泳阳性而未分出具体的型别,经克隆测序鉴定分别为 73 型和 54 型。57 例阳性标本中单型感染 51 例(89%),混合感染 6 例(11%)。在 55 例中,共检测出 12 种高危型(16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66)46 例和 2 种低危型(6, 11)及 cp8304 型 9 例。其中 16, 31, 18, 58 型比率较高,分别为 10 例(14.3%),7 例(12.3%),7 例(12.3%),6 例(8.8%),其余型占 38%(见表 1)。

2.3 灵敏度和特异性结果

筛选出的具体型别均经克隆测序鉴定,抽提质粒进行梯度稀释,用基因芯片来确定每一型的最低检测灵敏度,其中 18、31、35、39、56 型最低检测限度为 10^3 拷贝,其余型最低检测限度为 10^4 拷贝。其余病原微生物利用低密度基因芯片检测

HPV均为阴性,特异性较好。

表1 HPV各型分布表
Table 1 Distribution of HPV types

Type	Sample counts (%)	Simple-infection counts (%)
High-risk		
16	10(17.5)	9(15.8)
31	8(14.3)	8(14.3)
18	7(12.3)	7(12.3)
58	7(12.3)	6(10.5)
33	6(10.5)	5(8.8)
56	3(5.3)	0(0.0)
66	3(5.3)	1(1.7)
39	2(3.5)	0(0.0)
52	2(3.5)	2(3.5)
35	1(1.7)	1(1.7)
45	1(1.7)	1(1.7)
59	1(1.7)	1(1.7)
Low-risk		
6	5(8.8)	5(8.8)
11	4(7.0)	3(5.3)
Other-types		
cp8304	1(1.7)	1(1.7)
73	1(1.7)	1(1.7)
54	1(1.7)	1(1.7)

3 讨论

人乳头瘤病毒是宫颈癌的直接致病因子,与宫颈癌的发生密切相关。HPV的分型检测能提高宫颈癌细胞学筛查的有效性,是细胞学检测方法的重要补充及有效处理宫颈病变的重要依据,尤其是对细胞学检查不能确定的或位于边界、退化或持续发展的病变的诊断、随诊、防治策略有决定意义,并可获得良好的社会效益,同时也是经济有效的诊断、筛查方法^[4]。

应用 HPV 通用引物(例 MY09、MY11 或 GP5+、GP6+等)扩增后对扩增产物进行检测和分型,包括早期的 PCR-RFLP, PCR-直接测序, PCR-ELISA 以及 PCR-微阵列技术(DNA 芯片),其中 RFLP 法需要了解 HPV 的基因组,尤其是各个酶切位点,以利于辨认不同条带及准确分型;直接测序法结果准确,但费用高,操作繁琐,不利于进行大规模的筛查;高密度基因芯片技术多用于科研,且需要特殊的仪器设备,检测的成本昂贵且

目前应用于临床的报道不多,而低密度基因芯片技术因对仪器设备的要求较低而在临床检测中有望得到广泛应用。

本研究主要利用低密度基因芯片技术对 HPV 进行具体分型检测显示,145 例标本检出 57 例阳性,阳性率为 39.3%,以 16 型,31 型,58 型,18 型为主,与其它研究结果一致^[5-7]。HPV 检测的阳性率与标本类型以及研究方法密切相关,有报道显示^[8]宫颈活检、宫颈刷标本阳性率高于宫颈拭子标本。HPV 各型的分布,因地理位置不同而有所差异,大多研究显示 16 型感染普遍居多^[9,10],且感染 16 型病毒感染在体内持续时间最长,较其他型别感染难以清除^[7]。有报道^[11]南方地区除 16 型外,以 58 型为主,本研究显示广州人群中 58、31、18 型检出率较高,结果相符。

本研究通过灵敏度试验,确定了该方法对 HPV 不同的型别所能检测的最低限度有所不同,总的说来,对 21 亚型的检测灵敏度均达到了 10^4 拷贝,与目前普遍用于临床的杂交捕获一代的灵敏度^[12]大致相同,取得了良好的一致性。特异性试验显示,该方法特异性高,在生殖道和呼吸道的病原微生物中,仅对 HPV 能进行特异性检测,

利用低密度基因芯片方法不仅能检测单一型别感染,还能检测混合感染。该方法方便快捷,整个操作过程在 5 h 内即可完成;将生物素直接标记在引物上,对人体无放射性损害,每一探针对应特定的 HPV 型别,不会发生交叉反应,敏感性高,特异性强。可根据不同检测要求在芯片上添加相应探针,临床上易于推广。准确快速的 HPV 基因分型对宫颈癌的筛查、诊断和治疗有很重要的指导意义,低密度芯片技术将有很大的应用前景。

参考文献:

- [1] WALBOOMERS J M, JACOBS M V, MANOS M M, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J]. *J Pathol*, 1999, 189(1):12-19.
- [2] ELFGREN K, KALANTARI M, MOBERGER B, et al. A population-based five-year follow-up study of cervical human papillomavirus infection[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2000, 183(3):561-567.
- [3] IFTNER T, VILLA L L. Chapter 12: Human papillomavirus technologies [J]. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2003,(31): 80-88.

- [4] 张 菊, 高艳娥, 赵锦荣. HPV 检测在宫颈癌预警和筛查中的研究[J]. 国外医学妇产科分册 2003, 30(5): 319- 322.
- [5] REMMERBACH T W, BRINCKMANN U G, HEMPRICH A, et al. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets [J]. J Clin Virol, 2004, 30(4): 302- 308.
- [6] RIETHMULLER D, GAY C, BERTRAND X, et al. Genital human papillomavirus infection among women recruited for routine cervical cancer screening or for colposcopy determined by Hybrid Capture II and polymerase chain reaction[J]. Diagn Mol Pathol, 1999, 8(3):157- 164.
- [7] CAMARA G N, CERQUEIRA D M, OLIVEIRA A P, et al. Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2003, 98(7): 879- 883.
- [8] GONZALEZ - LOSA MDEL R, ROSADO - LOPEZ I, VALDEZ - GONZALEZ N, et al. High prevalence of human papillomavirus type 58 in Mexican colposcopy patients[J]. J Clin Virol, 2004, 29(3):202- 205.
- [9] PERRONS C, KLETER B, JELLEY R, et al. Detection and genotyping of human papillomavirus DNA by SPF10 and MY09/11 primers in cervical cells taken from women attending a colposcopy clinic [J]. J Med Virol, 2002, 67(2):246- 252.
- [10] HERRERO R, CASTLE PE, SCHIFFMAN M, et al. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica[J]. J Infect Dis, 2005, 191(11): 1787- 1799.
- [11] 王金桃,高尔生. HPV 感染与宫颈癌关系研究进展[J]. 国外医学妇幼保健分册,2003,14(6):399- 403.
- [12] POLJAK M, BRENCIC A, SEME K, et al. Comparative evaluation of first - and second - generation digene hybrid capture assays for detection of human papillomaviruses associated with high or intermediate risk for cervical cancer[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37 (3):796- 807.

(编辑 张恩健)

(上接第 418 页 from page 418)

- transfer and expression in mammalian cells [J]. Nat Biotechnol, 1996, 14(5) :606- 609.
- [3] STURM J W, KEESE M A, PETRUCH B, et al. Enhanced green fluorescent protein - transfection of murine colon carcinoma cells: key for early tumor detection and quantification [J]. Clin Exp Metastasis, 2003,20(5):395- 405.
- [4] YAMAMOTO N, YANG M, JIANG P, et al. Determination of clonality of metastasis by cell - specific color - coded fluorescent - protein imaging[J]. Cancer Res, 2003,63(22):7785- 7790.
- [5] SHINTANI S, MIHARA M, NAKAHARA Y, et al. Lymphnode metastasis of oral cancer visualized in liver tissue by green fluorescent protein expression [J]. Oral Oncology, 2002, 38(7): 664- 669.
- [6] YAMAMOTO N, YANG M, JIANG P, et al. Color coding cancer cells with fluorescent proteins to visualize in vivo cellular interaction in metastatic colonies [J]. Anticancer Res, 2004, 24(6):4067- 4072.
- [7] 蒋扬富. 肿瘤微小转移及肿瘤休眠[J]. 国外医学肿瘤学分册, 1998, 25(4):219- 222.
- [8] CHAMBERS A F, MACDONALD I C, SCHMIDT E E, et al. Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy [J]. Cancer Metastasis Rev, 1995, 14(4):279- 301.
- [9] 曾益新. 肿瘤学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 248- 265.
- [10] FIDLER I J, TALMADGE J E. Evidence that intravenously derived murine pulmonary melanoma metastases can originate from the expansion of a single tumor cell[J]. Cancer Res, 1986, 46(10):5167- 5171.
- [11] NAKANISHI H, ITO S, MOCHIZUKI Y, et al. Evaluation of chemosensitivity of micrometastases with green fluorescent protein gene - tagged tumor models in mice[J]. Methods Mol Med, 2005, 111(6):351- 362.

(编辑 刘清海)