

用聚合酶链式反应法检测人乳头状瘤病毒 DNA*

何玉凯 张基增 高基民 徐 铃

(第一军医大学生生化教研室, 广州)

实验研究表明, 宫颈癌的发生和发展与人乳头状瘤病毒 (Human papillomavirus, HPV) 的感染有着密切关系。约有 80% 的宫颈癌组织中含有人乳头状瘤病毒第 16 型 (HPV 16) 及 18 型 (HPV 18) 的 DNA, 因此, 检测宫颈癌组织中的 HPV DNA 对研究宫颈癌的发生和发展机制以及宫颈癌的防治都有重要意义。目前检测 HPV DNA 的手段都采用 DNA 探针杂交技术, 该方法要有高比活同位素, 而且费时。聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 体外 DNA 放大技术, 是在体外对某一 DNA 片段用一对引物进行反复复制, 使该片段成百万倍扩增, 这种扩增后的特异性

片段用电泳就可以直接检测。基于这种特点, 我们建立了 PCR 技术用来直接检测宫颈癌组织中 HPV DNA 的方法。

用一对引物引发 HPV 16 DNA 的 PCR, 放大的片段长度为 100 bp, 另一对引物引发 HPV 18 DNA 的 PCR 则会产生长度为 130bp 的片段。如果宫颈癌组织中有 HPV 16 或 HPV 18 的 DNA 序列, 经过 PCR 放大后将会出现相应的特异性片段。用于引发 HPV 16 或 HPV 18 DNA PCR 的引物是对应于 HPV DNA 基因组的非编码区 (noncoding region) 如图 1 所示, 因为基因组中这段 DNA 在感染细胞中不易丢失, 只要有 HPV 的感染就会有

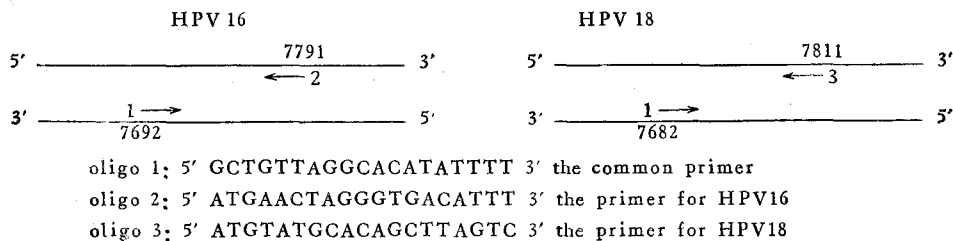


图 1 引发 HPV PCR 的引物及所在 HPV 基因组上的位置

寡核苷酸 1、2 是引发 HPV 16 DNA PCR 的引物; 寡核苷酸 1、3 是引发 HPV 18 DNA PCR 的引物

这段 DNA 的存在, 这就提高了检测的准确性。

首先, 我们研究了该方法的特异性。用这种方法对质粒 HPV 16-pBR 322、HPV 18-pBR 322、HPV 6-pBR 322、HPV 11-pBR 322 DNA; HPV 16 DNA 杂交阳性及阴性的宫颈癌样品 DNA; 宫体癌样品 DNA 及正常白细胞 DNA 进行了 PCR。结果表明, 只有 HPV 16-pBR 322 DNA 和 HPV 16 DNA 杂交阳性的宫颈癌样

品 DNA 出现特异的长度为 100 bp 的片段, 而 HPV 18-pBR 322 DNA 出现了特异的长度为 130 bp 的片段。其他组织 DNA 及 HPV 6-pBR 322, HPV 11-pBR 322 DNA 均无特异的 DNA 片段出现 (见图 2 和图 3)。这说明该方法具有较高的特异性。

进而, 我们研究了该方法的敏感性。0.01

* 国家自然科学基金资助项目。

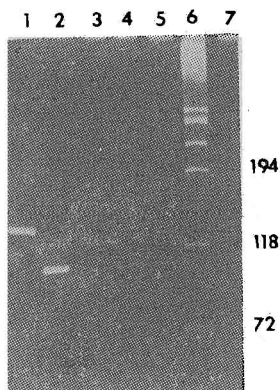


图2 不同质粒 DNA 及样品 DNA PCR 放大后
进行聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果

1. HPV 18-pBR 322 DNA
2. HPV 16-pBR 322 DNA
3. HPV 6-pBR 322 DNA
4. HPV 11-pBR 322 DNA
5. 宫体癌组织 DNA
6. ϕ X174 DNA/Hae III 片段
7. 正常白细胞 DNA

pg 的质粒 HPV 16-pBR 322 和 HPV 18-pBR 322 DNA 经过 PCR 放大后都有相应的特异性片段出现; 1 ng 的 HPV 16 DNA 杂交阳性的宫颈癌组织 DNA 经过放大后也有清晰的长度为 100 bp 的特异性片段。

研究结果表明, PCR 技术用于检测宫颈

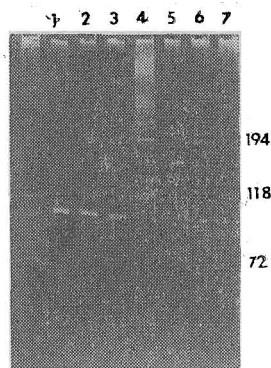


图3 宫颈癌组织 DNA PCR 放大后进行聚丙烯
酰胺凝胶电泳的结果

- 1、2、3 分别代表三个 HPV DNA 杂交阳性的宫颈癌组织 DNA;
- 5、6、7 分别代表三个 HPV 16 DNA 杂交阴性的宫颈癌组织 DNA。
4. ϕ X 174 DNA/Hae III 片段

癌组织中的 HPV DNA 具有较高的特异性和敏感性,而且所需时间短,一日之内即可以完成检测,无需放射性同位素。同时,该研究也为其他致病微生物的检测提供了一条有效的途径。

[本文于 1989 年 3 月 7 日收到]

经验交流

简易聚丙烯酰胺凝胶干燥法

杨克俭 陈淑芬 孟宗达

(河北省卫生防疫站, 保定)

这里我们介绍一种简易聚丙烯酰胺凝胶干燥法, 该法无需特殊设备, 操作条件可灵活掌握。比已报道的凝胶干燥简易方法^[1,2]更为简便易行。操作如下:

1. 用三合板或五合板锯成一个内边长为 17 厘米, 外边长为 23 厘米的正方形木框。

2. 将二张略大于木框的玻璃纸用无离子水浸湿, 将一张平铺于木框之上, 用图钉及硬纸条固定在木框上, 玻璃纸上涂一层用无离子水配制的 50% 甘油, 将凝胶放其上, 再用 50% 甘油涂一次, 将另一张玻璃纸盖上, 赶尽气泡, 玻璃纸的四边用图钉及硬纸条固定于木框上。

3. 小角度将木框斜放于 37℃ 温箱内过夜(使多余的水分及甘油流出, 但不致引起凝胶下滑变形, 第二天从木框上剪下的胶片可照像或用白纸夹住集中于干燥处长期保存(避免强光照射及化学药品腐蚀)。

此种干燥保存方法利用甘油既可控制水分蒸发速度又有一定的保水性质, 使凝胶得到妥善处理。其中

甘油的使用浓度可作适当调整, 使用 30—40% 甘油处理的胶片质地硬些; 使用 60—70% 甘油处理的胶片质地软些, 但都能达到长期保存的效果。

经此法加工处理的凝胶柔韧而有弹性, 可保持原胶大小及色泽, 清晰透明。凝胶干燥后变薄, 其上常能见到湿胶状态下不易见到的核酸或蛋白带型。用此法干燥的胶片已完好地保存了两年之久。此外, 胶片还可直接做底片使用, 上述方法有推广价值。

本文在整理过程中得到河北大学生物工程研究所吴芝清帮助, 特此致谢。

参考文献

- [1] 陈崇光等: 《生物化学及生物物理进展》, 1985, (5), 74。
- [2] 滕斌: 《生物化学及生物物理进展》, 1987, (6), 78。

[本文于 1988 年 4 月 4 日收到]