

Genetics, 1991, 87: 571

Cloning and Sequencing of ZFY and ZFX Gene From Cow. Tang Rong, Ma Congcong, Mao Yumin (*Institute of Genetics of Fudan University, Shanghai 200433, China*); Xu Yaou, Gong Rongci (*Southwest Nationalities College, Chengdu 610041, China*).

Abstract Sex identification of cow embryo in its early stage is very important. It is the premise of the possibility that the technology of separating and transplanting cow embryo can bring about great economic efficacy. PCR technology is an accurate, speedy and sensi-

tive method in sex identification of cow embryo. Using the human sex differentiation relevant DNA sequences ZFY and ZFX, two primers are designed and a fragment is amplified from the male or female cow genomic DNA. Then the fragments are cloned into the vector pUC118 and are sequenced. It is found that the fragments from ZFY gene and ZFX gene have 88.2% homologous regions. Upon this, primers and probes can be designed to identify the cow sex sensitively by means of PCR.

Key words ZFY, ZFX, clone, sequence

巢-PCR 分型检测人乳头状瘤病毒同源序列*

陈 嵩 吕懿娟

(重庆医科大学生物化学教研室, 重庆 630046)

摘要 采用 L_1 通用引物 MY 11/9 介导聚合酶链反应 (PCR), 从人生殖道疣、癌组织中扩增人乳头状瘤病毒 (HPV) 同源序列得 394—552bp DNA 片段, 再以内引物 GP 5/6 介导第二次扩增得 139—154bp 片段. 然后根据 Rsa I 酶切扩增片段的电泳图谱来分出 HPV 型别, 无需特异型别的探针进行分子杂交. 35 例宫颈癌和 30 例生殖器疣 HPV 同源序列检出率分别为 85.75% 和 96%; 12 例卵巢腺癌检出 HPV 同源序列者 7 例. 本法简便、灵敏、可靠, 并适合于临床应用.

关键词 人乳头状瘤病毒 (HPV), 聚合酶链反应 (PCR), 宫颈癌, 限制性内切酶图谱, 生殖器疣

人乳头状瘤病毒 (HPV) 感染可引起生殖器疣. 近年来细胞学^[1]、免疫组化^[2]及核酸分子杂交证实特异型别 HPV 感染与宫颈癌关系密切^[3]. 因此 HPV 分型检测具有重要理论和实践意义. 随着 PCR 技术的广泛应用, 国外学者已采用通用引物介导 PCR 和特异性寡核苷酸探针分子杂交来检测不同型别 HPV 同源序列^[4]. 本文采用 Manos 等^[5]设计的一对 L_1 通用引物 MY 11/9 扩增生殖道疣、宫颈癌和卵巢腺癌组织中 HPV 相关序列, 又以 Snijders 等^[6]设计的 L_1 通用引物 GP5/6 为内引物作第

二次扩增, 根据不同型别的 Rsa I 酶切扩增片段的特征性电泳图谱即可分型, 无需分子杂交. 本法简便、可靠、灵敏、无论活检组织、脱落细胞以及石蜡包埋组织均适用.

1 材料与方法

1.1 标本来源

女性生殖器疣活检组织 30 例. 宫颈高、中及低分化鳞癌 35 例, 其中 30 例为石蜡包埋组

* 四川省卫生厅资助项目.

收稿日期: 1994-01-17, 修回日期: 1994-04-25

织, 5 例为活检组织. 慢性宫颈炎活检组织 10 例, 同时取脱落细胞. 17 例为卵巢肿瘤, 12 例为卵巢腺瘤, 4 例为卵巢良性囊肿. 上述标本共 92 例, 均来自重庆医科大学附属一院妇科, 均经病理确诊.

1.2 主要试剂和仪器

L_1 通用引物 MY11/9 及 HPV16、HPV18 特异性寡核苷酸探针^[5] (上海复旦大学遗传学研究所合成). 其序列为:

MY11 5' GCA (C) CAGGGA (T) CATAAC (T) AATGG 3'

MY9 5' CGTCCA (C) AA (G) A (G) GGAA (T) ACTGATC 3'

HPV16 探针 CATAACCTCCAGCACCTAA

HPV18 探针 GGATGCTGCACCGGCTGA

L_1 通用引物 GP5/6^[6] (北京海军总医院皮肤科刘元林博士惠赠) 其序列为:

GP5 5' TTTGTTACTGTGGTAGATAC 3'

GP6 5' GAAAAATAAACTGTAAATCA 3'

Taq DNA 聚合酶 (复旦大学遗传所); dNTP (Boehringer manheim); $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (北京福瑞生物工程公司); 限制性内切酶 Rsa I (Promega); HPV16/18 重组质粒 (华西医科大学黄光琦教授赠). 自动 PCR 扩增仪 (Perkin Elmer Cetus); Mutiphor II 电泳仪 (LKB).

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 提取 新鲜生殖器疣等组织 DNA 按 Baginski 等法^[7]; 石蜡包埋宫颈癌组织 DNA 按 Weizsacker 等法^[8]; 宫颈脱落细胞 DNA 按 Kawasaki 法^[9]提取.

1.3.2 巢-聚合酶链反应 (nested PCR) 反应体积为 50 μl , 其中含 DNA 模板 0.5—1 μg 或粗制模板 10 μl ; dNTP 各 200 $\mu\text{mol/L}$; 引物 50 pmol; 5 $\times$ 反应缓冲液 [Tris-HCl 25 mmol/L (pH 8.2), MgCl_2 2 mmol/L, gelatin 0.25 mg/ml, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25 mmol/L, Formamide 5%] 10 μl . 95 $^\circ\text{C}$ 变性 10 min 后, 再加入 Taq DNA 聚合酶 2 U, 复盖以 50 μl 灭菌石蜡油. 以 MY11/9 引物对进行 30—35 周期循环, 为第一轮扩增, 程

序设置为: 退火 54 $^\circ\text{C}$, 45 s; 延伸 72 $^\circ\text{C}$, 1.5 min; 变性 93 $^\circ\text{C}$, 45 s. 取扩增产物 1 μl , 再以 GP5/6 引物对进行 30 周期, 为第二轮扩增. 在每轮程序完毕后均于 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min. 取 10 μl PCR 产物进行检测, 经过 2% 琼脂糖凝胶电泳, 用溴化乙锭 (0.5 $\mu\text{g/ml}$) 染色后, 在紫外灯下观察电泳结果. 无 DNA 样品为阴性对照, HPV16 重组质粒为阳性对照.

1.3.3 斑点杂交 用 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 标记的 HPV16, HPV18 寡核苷酸探针^[5], 并进行比放射性测定^[10].

10 μl PCR 产物加入 90 μl 0.4 mol/L NaOH, 25 mmol/L EDTA, 旋涡混合, 置于 100 $^\circ\text{C}$ 水浴 10 min, 取出于 -20 $^\circ\text{C}$ 保存. 再将 Hybond 膜在双蒸水中浸透后, 置于 2 $\times$ SSC 数分钟, 装入斑点印迹真空装置, 每孔加样品 100 μl , 真空抽干. 于 80 $^\circ\text{C}$ 真空干燥 2 h, 即可用于杂交. 杂交反应体系^[5]: 6 $\times$ SSC, 5 $\times$ Denhardt, 0.1% SDS, 100 $\mu\text{g/ml}$ 鲑精 DNA. 预杂交液与杂交液相同, 杂交液含同位素标记探针 9.2×10^6 cpm/ml. 50 $^\circ\text{C}$ 下预杂交 2 h, 弃去预杂交液, 加入杂交液, 55 $^\circ\text{C}$ 下杂交 3 h. 杂交膜用 2 $\times$ SSC/0.1% SDS 室温漂洗 2 次, 每次 15 min, 再于 58 $^\circ\text{C}$ 漂洗 2 次. 将膜凉干后, 压上 X 光片和增感屏, 于 -70 $^\circ\text{C}$ 显影 7 d (天).

1.3.4 Rsa I 酶切片段分析 取 10 μl PCR 二次扩增产物, 加入 Rsa I 酶解缓冲液 [Tris-HCl 10 mmol/L (pH 7.9), NaCl 50 mmol/L, MgCl_2 10 mmol/L, β -巯基乙醇 6 mmol/L, BSA 0.1 mg/ml], Rsa I 酶 5 U, 混匀, 37 $^\circ\text{C}$ 保温 12 h.

表 1 L_1 通用引物 GP5/6 扩增 HPV 同源序列经 Rsa I 酶切的 DNA 片段长度

型别	扩增 DNA 片段 长度/bp	Rsa I 酶切的 DNA 片段长度/bp		
HPV6	139	30,	42,	67
HPV11	139	30,	109	
HPV16	142	30,	42,	70
HPV18	145	30,	38,	77
HPV31	142	30,	112	
HPV33	139	30,	39,	70

取酶解产物 10 μ l, 于 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 400V, 2h. 以 pBR322/Hae III 为片段长度标志, 得酶切片段电泳图谱. 按各型特征性酶切片段长度即可分型 (见表 1)^[6].

2 结果和讨论

2.1 巢-PCR

采用 MY11/9 引物可扩增 25 种型别的 HPV DNA 中高度保守的 L₁ 开放阅读框架 (L₁ORF) 片段长度为 394—552bp (HPV16 6584/7035). 由于 MY11/9 引物序列中各有 3—4 处碱基位点简并, 本文先用 37℃ 和 45℃ 退火各扩增一个周期, 然后把退火温度提高到 54℃ 扩增 30 个周期, 使引物和靶 DNA 充分配对, 减少非特异扩增, 而靶 DNA 得最大程度扩增 (见图 1). 为进一步增加扩增效率和特异性, 本文采用 GP5/6 引物为内引物进行第二次扩增. GP5/6 引物可扩增 6 种型别 HPV 的 L₁ ORF 部分 (HPV16: 6624/6746), 片段长度为 139—154bp. 二次扩增产物在电泳时在特定位置呈现单一 DNA 带, 产率也明显提高. (见图 2).

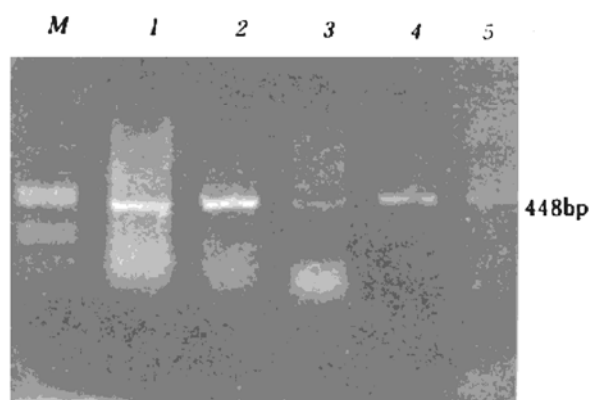


图 1 L₁ 通用引物 MY11/9 PCR 最佳退火温度的选择

2% 琼脂糖电泳 PCR 产物和溴化乙锭染色. 自左至右: M: pBR322/Hae III DNA 长度标志; 1、2、3、5: 含 HPV6 生殖器疣分别用 37℃、45℃、50℃、55℃ 退火温度扩增; 4: 含 HPV6 生殖器疣先用 37℃ 和 45℃ 各扩增一个周期, 再用 55℃ 扩增 30 个周期.

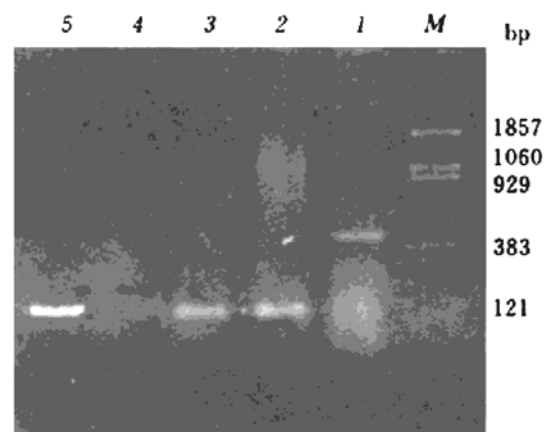


图 2 外引物 MY11/9 和内引物 GP5/6 作二次扩增结果

2% 琼脂糖电泳 PCR 和溴化乙锭染色. 自右至左: M: pBR322/BstNI DNA 长度标志 (1857、1060、929、383、121、13bp); 1: 用外引物 MY11/9 扩增生殖器疣标本; 2: 用外引物 MY11/9 及内引物 GP5/6 二次扩增生殖器疣标本; 3: 二次扩增卵巢癌标本; 4: 无模板 DNA 二次扩增; 5: 二次扩增重组 HPV16 质粒.

2.2 HPV DNA 的型别鉴定

采用 L₁ 通用引物 MY11/9 可扩增多种型别 HPV 同源序列, 但必须用 ³²P 标记特异 HPV 型别的寡核苷酸探针进行斑点杂交才能鉴定出型别. 本文对 35 例宫颈癌组织中 HPV 同源序列检测阳性者 30 例做斑点杂交分型, 结果见图 3. 其中 HPV16 型 24 例, HPV18 型 3 例, HPV16/18 混合型 2 例, 1 例杂交结果阴性. 虽斑点杂交分型结果可靠, 但必须制备多种型别的探针, 要用同位素标记, 操作也较繁琐. 本文对上述宫颈癌标本经杂交证实为 HPV16 和 HPV18 者用 MY11/9 和 GP5/6 内外引物对进行二次扩增, 扩增片段直接用 Rsa I 酶水解, 经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳得酶切片段电泳图谱 (见图 4). 按表 1 所示酶切片段长度进行分型. 本实验证实斑点杂交确定的 HPV 型别与采用巢-PCR 二次扩增和酶切图谱分型所得结果相符. 说明巢-PCR 产物可直接酶切并根据图谱特征即可准确分型, 无需分子杂交. 本文用巢-PCR 扩增及 Rsa I 酶切

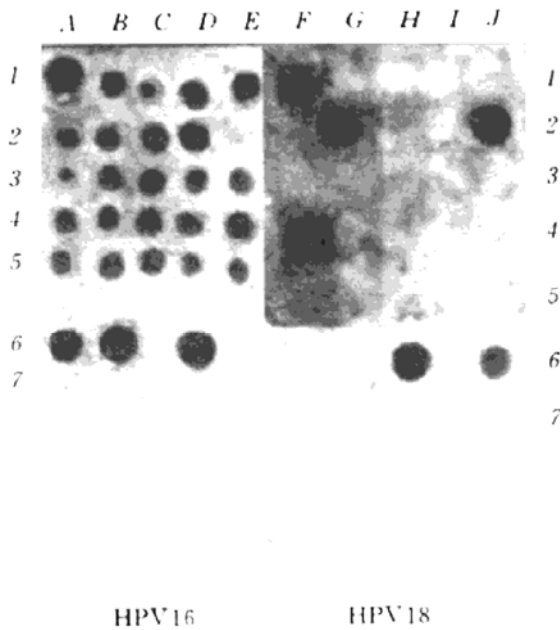


图3 宫颈癌组织 PCR 产物和 HPV16、HPV18 探针斑点杂交的放射自显影图

左: HPV16 A₁ 为阳性对照, B₁-E₁ 为阴性对照, 右: HPV18 F₁ 为阳性对照, G₁-J₁ 为阴性对照。

与生殖器癌的关系的基础和临床研究均有重要意义。

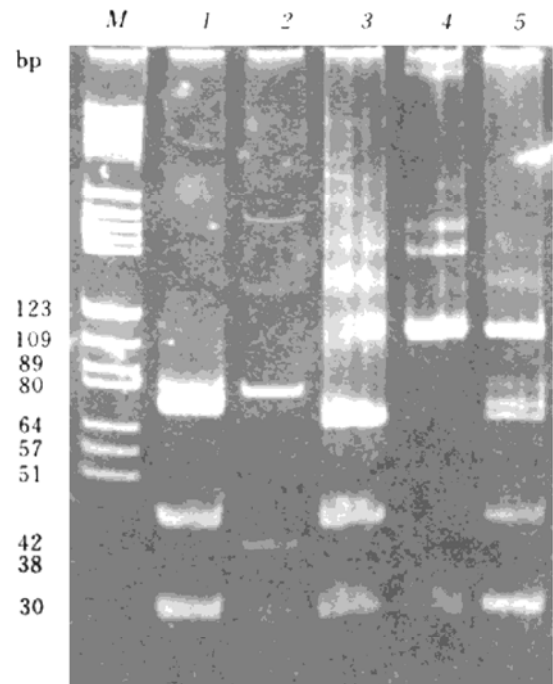


图4 各型 HPV 巢-PCR 扩增产物的 Rsa I 酶切片段电泳图谱

12%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 溴化乙锭染色. 自左至右: M: pBR322/Hae III DNA 片段长度标志; 1: HPV16 DNA; 2: HPV18 DNA; 3: HPV6 DNA; 4: HPV11 DNA; 5: HPV6/11 DNA.

分型检测各组标本其结果见表 2. 用巢-PCR 和酶切片段电泳图谱进行 HPV 同源序列的检测和分型, 方法简便快速, 结果判定正确, 不需同位素, 经济安全. 对探索特异型别 HPV

表2 女性生殖器疣、恶性肿瘤活检及石蜡包埋组织 HPV 型别分析

病种	标本类型 (例数)	检测方法	HPV 阳性 例数 (%)	HPV 型别/例数				
				6	11	16	18	混合型
生殖器疣	活检组织 (30)	REAP/PCR	29 (96.6)	7	17	3	0	2 (HPV6/11)
宫颈鳞癌	石蜡切片 活检组织 (35)	REAP/ DB /PCR	30 (85.7)	0	1	24	3	2 (HPV16/18)
卵巢腺癌	活检组织 (12)	REAP/PCR	7 (58.3)	2	4	0	0	1 (HPV6/11)
慢性宫颈炎	活检组织 (10)	REAP/PCR	1 (10)	0	0	1	0	0
卵巢良性瘤	活检组织 (4)	REAP/PCR	0	0	0	0	0	0

注: DB: 斑点印迹; REAP: PCR 产物的内切酶分析。

2.3 HPV 型别与生殖道疣及肿瘤的关系

能引起人生殖道感染的 HPV 型别以

HPV6、11、16、18 最常见^[11]. 现已发现不同型别 HPV 感染与病变类型和预后密切相关. 本

研究结果表明生殖器疣主要为 HPV6/HPV11 感染, HPV16 仅见极少数病例, 与 McCance^[12]和 Gjoen 等^[13]报导基本一致; 而宫颈鳞癌组织 HPV16 检出率很高, 只有少数 HPV18 感染. 林玉纯等^[14]分析我国江西、山西、山东及河北省 118 例宫颈癌组织中 HPV 型别分布, HPV16 检出率为 35%—68%, HPV18 检出率为 4%—9%. Munoz 等^[15]综合英、美、德、日等国报导, HPV16/HPV18 在浸润性宫颈癌中检出率为 15.2—94%. 可见, 在不同国家或地区, 宫颈癌组织 HPV16 同源序列的阳性检出率都很高, 表明 HPV16 与宫颈癌之间联系具有普遍性. 虽 HPV16 感染发展成宫颈癌尚需其它因素协同作用, 但若能对宫颈涂片异常的患者取脱落细胞作 HPV 同源序列检测和分型, 将有助于宫颈癌的早期预防.

Kaufman 等^[16]用 HPV6 探针作原位杂交在 12 例卵巢腺癌组织中有 10 例检出 HPV6 同源序列. 本文采用巢-PCR 在 12 例卵巢腺癌中有 7 例检出 HPV 相关序列, Rsa I 酶切片段电泳图谱分析确定 4 例为 HPV11, 2 例为 HPV6, 1 例为 HPV6/HPV11 混合型. 而 3 例卵巢囊肿和 1 例畸胎瘤组织均未发现 HPV DNA 相关序列. 卵巢癌中的 HPV 同源序列最大可能来自生殖道 HPV 感染的上行传播. 然而本组患者均无下生殖道感染史. 卵巢恶变一般认为与机体免疫、激素水平及感染等因素有关. 本文发现卵巢癌组织中检出的 HPV 同源序列是以 HPV11/HPV6 为主, 是否与卵巢恶变有关, 很值得进一步研究.

迄今, 高危性 HPV 致癌机理尚未阐明. Giri 和 Danos^[17]发现高危性 HPV DNA 能够整合入宿主基因组 DNA 中, 持续保留完整的 E6 和 E7 开放阅读框, 并伴随 c-myc 和 c-ras 持续表达. Zur Hausen^[18]认为由于 HPV-DNA 的整合, 破坏了编码细胞调节因子的基因, 使控制细胞生长和抑制病毒 DNA 转录的正常防御机能受损, 这些因素可能是宫颈良性病损发展为恶性病损的关键.

参 考 文 献

- 1 Reid R, Stanhope R, Herschman V R *et al.* Cancer, 1982; **50**: 377
- 2 Howley P M. New Engl J Med, 1986; **315**: 1089
- 3 Cornelissen M T E, van der Velden K J, Walboomers J M *et al.* J Med Virol, 1988; **25**: 105
- 4 Yoshikawa H, Kawana T, Kitogawa K *et al.* Inter J Cancer, 1990; **45**: 990
- 5 Manos M M, Ting Y, Wright D K *et al.* Cancer Cell, 1989; **7**: 209
- 6 Snijder P J F, van den Brule A J C, Schrijnemakers H F J *et al.* J Gen Virol, 1990; **71**: 173
- 7 Baginski I, Ferrie A, Watson R *et al.* In: Innis M A eds. PCR Protocols: A guide to methods and application. New York: Academic Press, 1990: 353
- 8 Weizsacker F V, Labeit S, Koch H K *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1990; **170**: 416
- 9 Kawasaki E S. In: Innis M A eds. PCR Protocols: A guide to methods and application. New York: Academic Press, 1990: 147
- 10 王吉伟. 生命的化学, 1988; **8** (6): 31
- 11 de Vilers E M. J Virol, 1989; **63**: 4898
- 12 McCance D J. Biochim Biophys Acta, 1986; **283**: 205
- 13 Gjoen K, Siebke J C, Flike M *et al.* J Med Virol, 1991; **34**: 159
- 14 林玉纯, 杨学志, 熊思东等. 中华肿瘤杂志, 1988; **2**: 196
- 15 Munoz N, Bosch X, Kaldor J W. Cancer, 1988; **57**: 1
- 16 Kaufman R H, Bornstein J, Gordon A N *et al.* Gynecol Oncol, 1987; **27**: 340
- 17 Giri I, Danos O. Trends in Genetics, 1986; **2**: 227
- 18 Zur Hausen. Cancer, 1987; **59**: 1692

Detection and Typing of Human Papillomaviruses by Polymerase Chain Reaction with Degenerate Nested Primers. Chen Song, Lu Yijuan (Department of Biochemistry, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 630046, China).

Abstract Degenerate oligonucleotide primers MY 11/9 (Manos), GP 5/6 (Snijders) were used for *in vitro* amplification by polymerase chain reaction of a relatively conserved portion of L₁ ORF of HPV. A specific fragment of

394—552 bp and 139—150 bp was amplified by PCR from clinical specimens (cervical carcinoma, genital condylomata, ovarian adenocarcinoma etc.) containing DNA from various HPV types. The digestion pattern of restriction endonuclease Rsa I analysis of PCR products by PAGE can be used for typing.

This method is simple, sensitive, specific and is suitable for detection and typing for genital HPV types in clinical samples.

Key words human papillomavirus, polymerase chain reaction, restriction endonuclease analysis, cervical cancer, genital condylomata

二茂铁-交联剂修饰的葡萄糖传感器*

刘海鹰 邓家祺**

(复旦大学化学系, 上海 200433)

摘要 用牛血清白蛋白-戊二醛交联剂把葡萄糖氧化酶固定在 Nafion-二茂铁修饰电极上, 最后在电极上修饰一层 Nafion 膜, 制备成葡萄糖传感器. 电活性物质如抗坏血酸、尿酸等对葡萄糖的测定无干扰. 该传感器的线性范围为 5.0×10^{-4} — 1.3×10^{-2} mol/L, 响应时间小于 60s.

关键词 生物传感器, Nafion, 二茂铁, 葡萄糖

介体修饰的酶传感器近年来发展较快, 由于介体代替了氧的作用, 克服了背景电流大, 易受环境中氧浓度的影响等缺点. 用于修饰的介体有铁氰化钾^[1]、四硫富瓦烯^[2]、金属卟啉化合物^[3]、醌及其衍生物^[4]及麦尔多蓝^[5]、二茂铁及其衍生物^[6,7]. 但上述文献中, 二茂铁的固定主要是吸附在电极表面或混合在碳糊中间, 这种电极, 二茂铁易流失, 从而引起寿命下降, 而且二茂铁对尿酸、抗坏血酸均有电催化作用, 因此造成样品测定误差增大. 我们先把二茂铁 (Fc) 固定在 Nafion 膜内, 然后用牛血清白蛋白-戊二醛把葡萄糖氧化酶 (GOD) 固定在修饰电极上, 最后在电极上修饰一层 Nafion 膜, 成功地制备成一种无干扰而高效的 Nafion-Fc-GOD-Nafion 多层夹心式葡萄糖传感器. 内层 Nafion 膜的作用主要是使二茂铁固定, 防止其流失; 外层 Nafion 膜是使用 Nafion 水溶液形成的, 它不影响酶的活性, 却能把尿酸、抗坏血酸等电活性物质阻挡在电极

外, 消除其干扰. 该传感器具有抗干扰能力强, 稳定性好, 响应快等优点.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

FDH-3204 型循环伏仪 (复旦大学科教仪器厂), TYPE 3086 函数记录仪 (日本横河公司).

葡萄糖氧化酶 (35.3 U/mg, Sigma 公司), Nafion (Dupont 公司), 二茂铁 (Sigma 公司), 葡萄糖及其它试剂均为分析纯, 牛血清白蛋白 (上海化学试剂公司), 戊二醛 (E. Merck 公司), 试验用水均为二次重蒸馏水.

1.2 Nafion 水溶液的制备

取 4ml 5% Nafion 甲醇溶液置于标有刻度

* 国家自然科学基金及中国科学院长春应用化学研究所电化学开放实验室资助课题.

** 通讯联系人.

收稿日期: 1994-01-28, 修回日期: 1994-05-16