

反向点杂交法快速检测 HPV 基因型的临床应用

齐凤菊 徐 铃 黄扬中

(第一军医大学生物化学教研室, 广州 510515)

摘要 应用反向点杂交法 (RDB) 的原理, 针对 HPV 6B, 11, 16, 18, 31, 33 和 35 设计了 7 条序列作为未标记的特异性寡核苷酸 (SSO) 探针, 分别固定在尼龙膜条上, 形成 7 个点, 再与经 PCR 扩增的样品 DNA 序列杂交, 即可在一个膜条上分辨出这 7 型 HPV 中的任一型。此法快速简便, 特异性高, 不存在假阳性; 且因 PCR 灵敏度高, 亦不易出现假阴性。用 PCR-RDB 法检测保存的宫颈癌组织石蜡包埋标本 32 例, 结果: HPV16 阳性 22 例 (68.8%), HPV18 阳性 5 例 (15.6%), HPV16/18 双重感染 2 例 (6.3%), 阴性仅 3 例 (9.3%)。

关键词 反向点杂交, 聚合酶链反应 (PCR), 子宫颈癌, 尖锐湿疣, 人乳头瘤病毒

学科分类号 Q789

人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 是迄今已被肯定的 DNA 肿瘤病毒之一。在女性下生殖道肿瘤中的检出率高达 90% 以上。迄今已鉴定的 HPV 有 70 多型。HPV 的 DNA 检测和分型对女性生殖道肿瘤的病因学和癌情预报具有重要意义。然而, HPV 异质性很大, 为基因型的检测带来一定困难。用目前国内外 DNA 诊断方法诊断未知样品的基因类型有一定困难, 因为只有将常见的几种型 HPV 逐一过筛, 才能最后确定感染病毒的基因型。本文将 Saiki 等^[1]首先提出的反向点杂交法 (reverse dot blot, RDB) 应用在 HPV 不同型别的鉴别和检测上。根据 Duggan 等^[2]的建议, 我们选用了 7 个较常见型的 HPV, 即 HPV 6B, 11, 16, 18, 31, 33 和 35; 合成了针对 7 型 HPV 的 7 个序列特异性寡核苷酸 (SSO) 探针, 分别固定在尼龙膜上, 再与经 PCR 扩增的 DNA 靶序列杂交, 即可在同一张膜上一次分辨这 7 种基因型, 使基因诊断的程序大大简化; 实现了对 HPV 感染的快速诊断。

1 材料和方法

1.1 材料

含 HPV 全基因组的 7 种质粒: HPV 6B,

11, 16, 18 和 31 由德国海德堡癌症研究中心 de Villier 博士赠送; HPV33 由法国巴黎巴斯德研究院 Orth 博士赠送; HPV35 由美国 Digene Diagnostics 公司 Lorincz 博士赠送。其他试剂均为国内外市售产品。

1.2 方法

1.2.1 提取了肿瘤组织 (新鲜组织和石蜡包埋组织) DNA, 再用 GP3, GP4 和 GP5 三种不同引物对样品进行 PCR 扩增。各引物的核苷酸序列如下: GP5: 5'-ACCGTTTTCG-GTAGTACCGTTTTTCGTT-3'; GP4: 5'-AG-GTACATATTGCCCTGC-3'; GP3: 5'-GCT-GTTAGGCACATATTTT-3'。

GP5 是 7 型 HPV DNA 所公用的引物, 其 5' 端由生物素标记。用 GP5 和 GP4 一对引物可扩增 HPV 6B, 11 两型的 DNA 片段, 长度分别为 335 bp 和 311 bp。GP5 和 GP3 一对引物则可扩增 HPV 16, 18, 31, 33, 35 五型的 DNA 片断, 长度依次为 267, 240, 234, 250, 281 bp。PCR 扩增过程中各参数为: 94℃变性 50 s, 55℃退火 50 s, 72℃延伸 50 s, 30 个循环。最后一次延伸延长至 7 min。

1.2.2 我们设计的 7 条探针 (长 18~21 bp)

收稿日期: 1996-12-02, 修回日期: 1997-03-16

则分别对应于该 7 型 HPV DNA 中被扩增的片段的一部分, 7 条探针的序列见表 1. 探针均为特异性的, 不能交叉杂交, 故称 SSO 探针. 引物与探针均由中科院上海生物化学研究所合成.

表 1 对应于 7 型 HPV DNA 的 7 条探针 (SSO) 的序列

HPV 型别	探针序列
HPV6B	5'-TATGCACTGTAGCCAACTG-3'
HPV11	5'-CACAATACCCACCAAATGAG-3'
HPV15	5'-CTGTGTAAAGTTAGTCATAG-3'
HPV18	5'-TTTGTACAACACTTTTCATGG-3'
HPV31	5'-TAGATTATCTATATCCTTG-3'
HPV33	5'-CCAGGTGTGGACTAACCG-3'
HPV35	5'-CACCACCCTACACATCCT-3'

1. 2. 3 将合成的 7 种探针通过碳二亚胺的介导, 固定在尼龙膜条上, 形成 7 个点. 然后与相应 7 型 HPV DNA 的 PCR 扩增产物杂交, 具体步骤如下: 用已固定有 7 种探针的膜条浸入 2×SSC 液中, 再加入 PCR 扩增产物 20 μl, 于 100℃水浴中变性 10 min, 立即放入 52℃水浴中振摇 30 min, 以完成杂交. 然后将膜条用 0.5×SSC 液 (先预热至 52℃) 洗涤数次后, 转入链霉抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶溶液中, 室温振摇 15 min. 膜条再经 2×SSC 液洗涤后, 用 TMB 显色. 杂交用的尼龙膜 (Biodyne C) 购自美国 Pall Biosupport 公司.

2 结 果

7 种质粒 DNA 分别含 HPV 6B, 11, 16, 18, 31, 33 和 35 的全基因组, 长度分别为 10.59 kb, 12.26 kb, 12.26 kb, 12.26 kb, 10.59 kb, 11.7 kb, 7.85 kb. 经相应的限制酶切割和琼脂糖凝胶电泳, 结果和预期值相等 (数据从略). 将 7 型 HPV 质粒经 PCR 法扩增后将其产物分别再经限制酶切割, 即可见这些 PCR 扩增产物和他们的限制酶消化产物的 DNA 片段长度与预计的相符合 (图 1 和图 2).

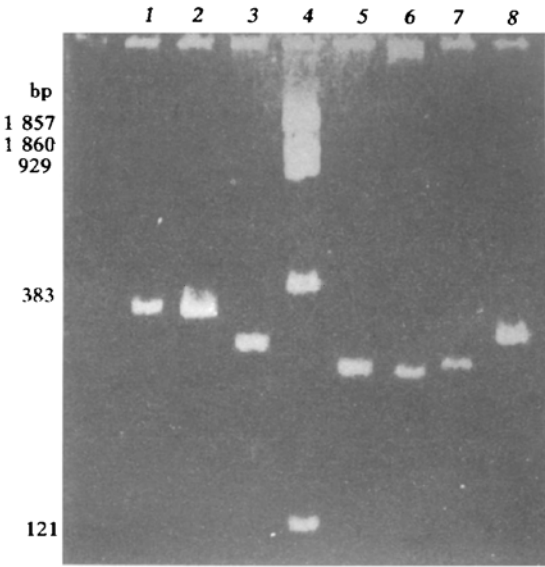


图 1 HPV DNA 经 PCR 扩增片段的 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳图
1: HPV6B (335 bp); 2: HPV11 (311 bp); 3: HPV16 (267 bp); 4: DNA/Hind III; 5: HPV18 (240 bp); 6: HPV31 (234 bp); 7: HPV33 (250 bp); 8: HPV35 (281 bp).

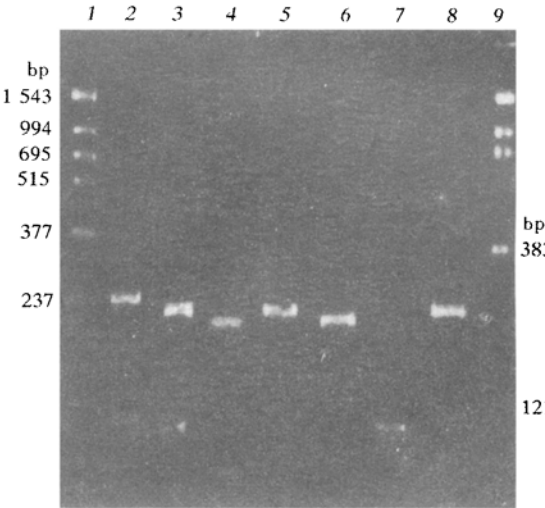


图 2 HPV DNA 的 PCR 扩增产物再经限制酶消化后的 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳图
1、9: 分子质量标准; 2~8: PCR 扩增产物经限制酶切割; 2: HPV6B (Hpa II), 235, 100 bp; 3: HPV11 (Hae III), 221, 90 bp; 4: HPV16 (Hae III), 191, 76 bp; 5: HPV18 (Mae III), 214, 26 bp; 6: HPV31 (Dde I), 198, 36 bp; 7: HPV33 (Mae III), 111, 103, 36 bp; 8: HPV35 (Mae III), 223, 29, 29 bp.

7 型 HPV 质粒 DNA 经过 RDB 后, 均与其相应的探针产生阳性反应, 呈现蓝紫色的清晰斑点, 而且背景着色极淡 (图 3).

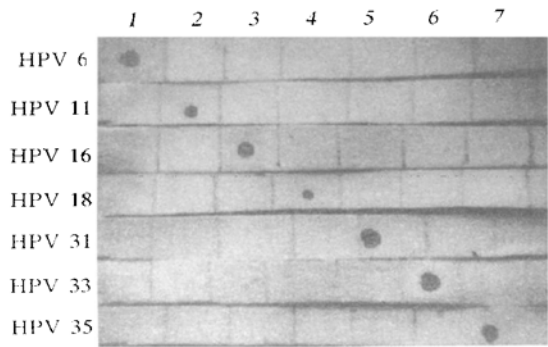


图 3 7 型 HPV 质粒 DNA 在 PCR 扩增后与其相应探针的反向点杂交

我们收集了旧存的子宫颈癌组织的石蜡包埋样本共 32 例, 新鲜宫颈癌活检样本 6 例, 下生殖道尖锐湿疣活检样本 20 例, 总共 58 例. 按已确立的方法分别提取各样品的细胞 DNA, 再用 GP3, GP4, 和 GP5 三种不同引物分别对各样品 DNA 进行扩增. 再将扩增产

物进行 RDB 检测, 获得了满意的结果. 图 4 为其中 7 例患者的检测结果. 总的结果见表 2.

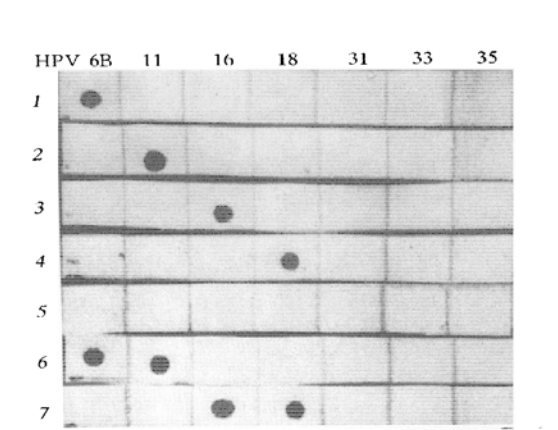


图 4 用 PCR-RDB 法检测下生殖道肿瘤患者 HPV 感染

1: 尖锐湿疣患者 (6) HPV6+ ; 2: 尖锐湿疣患者 (1) HPV11+ ; 3: 宫颈癌患者 (32) HPV16+ ; 4: 宫颈癌患者 (12) HPV18+ ; 5: 阴性对照; 6: 尖锐湿疣患者 (17) HPV 6 和 11+ ; 7: 宫颈癌患者 (15) HPV16 和 18+ .

表 2 女性下生殖道良/恶性肿瘤中 HPV 感染的 RDB 法检测结果

临床诊断	样 品 数			HPV 型别	阳性例数 (阳性率/%)	备 注
	总数	HPV 阳性数	HPV 阴性数			
子宫颈癌 (石蜡包埋)	32	29 (90.6%)	3 (9.4%)	16	22 (68.8)	混合感染
				18	5 (15.6)	
				16/18	2 (6.3)	
(新鲜组织)	6	6 (100.0%)	—	16	5 (83.3)	混合感染
				18	1 (16.7)	
				6B	8 (40.0)	
尖锐湿疣	20	19 (95.0%)	1 (5.0%)	11	9 (45.0)	混合感染
				6B/11	2 (10.0)	

3 讨 论

一般认为 HPV6B 和 11 引起的生殖器湿疣发病率高, 传染性强, 在性传播疾病中最为常见, 但很少转变为癌, 故称低危型; 而 HPV16, 18 则与宫颈癌和癌前病变密切相关, 故称高危型; HPV31, 33, 35 也与癌形成有

关, 但发病率较低, 故处于高危型和低危型之间. 我们以此为依据选择了上述 7 型 HPV, 对临床标本进行了检测^[3]. 我们将设计的 7 个 SSO 探针, 按次序分别点在一张尼龙膜上, 再与 PCR 扩增产物杂交. 检测结果显示了良好的特异性, 准确地检出了已知的 HPV 的 7 个型. 此外, PCR-RDB 是极为灵敏的, 提取

DNA 时, 新鲜肿瘤组织仅需 $1\sim 2\text{ mm}^3$, 在以 HPV 质粒 DNA 为模板时, 则约需 $0.1\text{ }\mu\text{g}$ 质粒 DNA 最为理想.

RDB 的主要特点是多种探针固定在一膜上. 同时参与检测的样品 DNA 又互不干扰, 故能一次性筛查多种不同的序列. 但是同一条膜上的多种探针同时参与杂交, 由于每条探针的长度不同, 难以使每个 SSO 均达到最适杂交条件, 因而不同探针的检测信号, 在检测强度上略有差异. 实验结果也提示了这一点, 但这并不影响阴阳性结果的判断. 在反向点杂交法中, 所有结合于膜上的探针应有大约相同的 T_m 值. 因此, 我们尽可能使设计的探针 T_m 值变动在 $2\text{ }^\circ\text{C}$ 范围内. RDB 方法简便, 灵敏, 特异性好. 应用于临床诊断, 结合快速提取 DNA 技术, 6 h 之内即可获得结果.

对下生殖道 HPV 感染进行精确的分型是很重要的, 因为特别是感染宫颈区域的一些常见的 HPV 可以有不同的致病能力, 因此历来受到医学界的重视. 本文用 RDB 法检测子宫颈癌 38 例标本中 HPV 阳性占 92.1% ($35/38$). 而伍欣星等^[4]用 GP-PCR 法快速检测子宫颈癌样品 55 例, HPV 阳性占 85.5% ($47/55$), 与我们相差不大. 但伍氏等未能分型. 日本学者 Matsukura 等^[5]认为下生殖道 HPV 感染极为复杂, 异质性很大. 他在子宫颈活检标本 235 例中检出 HPV 共有 24 型; 仅在 CIN (I 级至 III 级) 中检测到的 HPV 即有 17 型. 但他指出, HPV6 和 11 型仅见于尖锐湿疣中, 存在于其他病灶中极少. 这点与国内所见相符. 加拿大学者 Duggan 等^[2]收集了 77 例宫颈腺癌标本, 发现在 53 例 (70%) 中有 HPV16, 18 和 33 的感染. 而以 HPV16 型最为多见. 本文宫颈癌中 HPV 感染率显然比 Duggan 等的高出许多.

参 考 文 献

- 1 Saiki R K, Walsh P S, Levenson C H *et al.* Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86** (16): 6230~ 6234

- 2 Duggan M A, McGregor S E, Benoit J L *et al.* The human papillomavirus status of invasive cervical adenocarcinoma: A clinicopathological and outcome analysis. *Human Pathology*, 1995, **26** (3): 319~ 325
- 3 Reid R, Greenberg M, Jenson A B *et al.* Sexually transmitted papillomavirus infections. I. The anatomic distribution and pathological grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am J Obstet Gynecol*, 1987, **156** (1): 212~ 222
- 4 伍欣星, 赵文先, 杨平等. 用通用引物聚合酶链反应对宫颈刮片中人乳头瘤病毒感染的快速筛检. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1995, **9** (3): 272~ 274
- 5 Matsukura T, Sugase M. Identification of genital human papilloma viruses in cervical biopsy specimens: Segregation of specific virus types in specific clinicopathologic lesions. *Int J Cancer*, 1995, **61** (1): 13~ 22

Rapid Detection and Typing of Human Papillomavirus in Tumor Tissue by Reverse Dot Blot Technique. QI Feng-ju, XU Qian, HUANG Yang-zhong (Department of Biochemistry, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China).

Abstract Reverse dot blot (RDB) technique was used. Seven sequence-specific oligonucleotide (SSO) probes directed against 7 types of HPV (HPV6B, 11, 16, 18, 31, 33 and 35) respectively are synthesized and fixed sequentially on a stripe of nylon membrane to form 7 spots. After hybridization with the PCR product of the sample DNA sequence, any one of the 7 types of HPV DNA were distinguished on only one stripe of nylon membrane. 38 cases of cervical carcinoma samples were detected by this PCR-RDB technique. The results show: 29 cases (76.3%) of HPV16 positive; 8 cases (21.1%) of HPV18 positive; 2 cases (7.2%) of double infection; and 3 cases (8.0%) of HPV negative. The method is rapid and simple, with high specificity, no false positive results in general, and as the PCR technique is very sensitive, the method is not liable to show false negative results.

Key words reverse dot blot, polymerase chain reaction (PCR), cervical carcinoma, condyloma acuminatum, human papillomavirus (HPV)