组织的则为(1.85±0.55) ml·min^{-1}·(100 mg)$^{-1}$[5]。我们的观察结果表明,高龄患者冠脉搭桥中采用裸化的乳内动脉作为旁路材料,其手术死亡率低,术后生存率高,心功能显著改善。而胸骨感染的发生率(2%)较Baskett等[6]报道的采用带组织的乳内动脉感染率(3.8%)低,且避免了选取大隐静脉造成的其他并发症。因此,在老年患者中,可以尽量选取裸化的双侧乳内动脉做为桥材料。但在合并有慢性阻塞性肺疾病、糖尿病及急诊手术患者中应慎重考虑。

关键词:乳内动脉;骨骼化;冠脉搭桥;胸骨感染
中图法分类号:R654.2 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] 盖鲁粤,杨庭树,王 禹,等. 冠状动脉旁路移植术后心绞痛的冠状动脉造影分析[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2004, 12(3): 131-134.
[2] El-Oakley R M, Al-Habib H F. Total arterial coronary revascularization using arterial bypass circle with multiple inflows[J]. Ann Thorac Surg, 2007, 83(5): 1911-1912.
[3] Konety S H, Vaughan-Sarrazin M S, Rosenthal G E. 患者和医院差异相关的冠状动脉旁路移植术后结局的种族差异[J]. 世界核心医学期刊文摘:心脏病学分册, 2005, 1(9): 40-41.
[4] Ferrari E R, von-Segesser L K. Arterial grafting for myocardial revascularization: how better is it? [J]. Curr Opin Cardiol, 2006, 21(6): 584-588.
[5] Villareal R P, Mathur V S. The string phenomenon: an important cause of internal mammary artery graft failure[J]. Tex Heart Inst J, 2000, 27(4): 346-349.
[6] Baskett R J, Cafferty F H, Powell S J, *et al*. Total arterial revascularization is safe: multicenter ten-year analysis of 71 470 coronary procedures[J]. Ann Thorac Surg, 2006, 81(4): 1243-1248.

(编辑 邓强庭)

文章编号:1000-5404(2009)01-0089-03

技术方法

人乳头瘤病毒基因分型液态芯片构建中的影响因素

党倩丽[1],陈 超[2],杜 篷[2],杜艳华[2],冯 捷[3] ([1]陕西省人民医院皮肤科, 西安 710068;[2]西北大学生命科学院, 国家微检测系统工程技术研究中心, 西安 710069;[3]西安交通大学第二医院皮肤科,西安 710003)

摘 要:目的 基于Luminex™100技术平台,构建人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)基因分型液态芯片;探讨在构建HPV基因分型液态芯片过程中的影响因素。**方法** 在Luminex™平台上,采用国际公认的标准HPV质粒构建13种基因分型HPV芯片,选择通用引物、探针,将探针有效的偶联到微球上。优化PCR体系和杂交体系,检测反应中PCR浓度、杂交反应时间、微球的时效等对构建芯片的影响,测定标准质粒变异系数(*CV*)值。**结果** 采用构建的HPV液态芯片,可准确区分HPV基因型。对349例标准样本检测结果进行回代特别函数判别分析,检测准确率在96.7%以上。对构建芯片条件进行分析,杂交反应时间对杂交反应结果在一定的杂交时间内有明显的影响;当PCR产物不同浓度范围时,PCR产物的浓度对荧光值有不同的影响,各型HPV探针*CV*范围为0.41%~14.69%。**结论** 杂交反应时间、样品PCR反应中的污染、微球的时效和探针的质量等均可以影响液态芯片系统的构建。构建的HPV基因分型液态芯片检测系统,检测性能稳定,具有可重复性,可应用于临床的大量样品的筛查。

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)基因分型的液态芯片的构建基于Luminex™100 Multi-analyte Suspension Array(MASA)技术平台,对HPV进行基因分型,通过多个靶点的同时检测及高通量多样本的检测,以实现实验过程简单化、结果判断准确化,适用于临床大面积筛查、诊断的检测需要。现就我们在构建HPV基因分型液态芯片过程中的影响因素分析如下。

1 材料与方法

1.1 材料

标准阳性质粒:HPV45、HPV51、HPV53全基因序列质粒,由德国Heidelberg E.-M. de Villiers教授惠赠;HPV31、HPV35、HPV56全基因序列质粒,由美国Attila Lörincz教授(Research and Development Digene Co.)惠赠;HPV58全基因序列质粒由日本Toshihiko Matsukura教授惠赠;HPV6、HPV11、HPV16、HPV18含HPVL1区质粒的菌悬液由第四军医大学皮肤科惠赠。Luminex microsphere(荧光聚苯乙烯球,直径为5 600 nm,带有功能性羧基,密度1.25×10^9/L)购自Luminex公司;TMAC Lot 043k82108、MES lot 042k5467、NLSS lot 082k1028均购自Sigma公司;EDC购自Pierce(Rockford, IL);SA-PE lot:83C2-1

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2002AA2Z2031);陕西省自然科学基金(2000SM59)
Supported by the National High-Tech Research Development Plan (863 Program, 2002AA2Z2031) and the Natural Science Foundation of Shaanxi (2000SM59)
作者简介:党倩丽,女,陕西省西安市人,博士,副主任医师,主要从事感染性、过敏性等皮肤病方面的研究。电话:(029)85249600-2347,E-mail:dangql@yahoo.com.cn
收稿日期:2008-04-07;**修回日期**:2008-06-19

购自 Molecular Probes。

1.2 方法

1.2.1 PCR 体系优化 根据 Luminex™ 平台系统的要求,选择理想的 HPV 扩增产物与特异探针有效结合。引物采用 de Roda Husman 等[1]设计的 GP5 +/GP6 + 系统;探针参考 Jacobs 等[2]的序列,见表 1。通过使用美国 NCBI 数据库做 BLAST 比对,探针 5′端均采用 NH_2-C_{14} 修饰,探针由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。对引物的浓度、镁离子浓度、DNA 聚合酶浓度、模板浓度做梯度检测,同时对反应中的退火时间进行梯度检测。

表 1 13 型 HPV 探针序列

探针	序列(5′→3′)
6	ATCCGTAACTACATCTTCCACATACACCAA
11	ATCTGTGTCTAAATCTGCTACATACACTAA
16	GTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGA
18	TGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCA
31	TGTTTGTGCTGCAATTGCAAACAGTGATAC
33	TTTATGCACACAAGTAACTAGTGACAGTAC
35	GTCTGTGTGTTCTGCTGTGTCTTCTAGTGA
45	ACACAAAATCCTGTGCCAAGTACAT
51	AGCACTGCCACTGCTGCGGTTTCCCCAACA
52	TGCTGAGGTTAAAAAGGAAAGCACATATAA
53	TCTATGTCTACATATAATTCAAAGCAAAT
56	GTACTGCTACAGAACAGTTAAGTAAATATG
58	ATTATGCACTGAAGTAACTAAGGAAGGTAC

1.2.2 微球杂交系统的构建

1.2.2.1 探针偶联 分别取每种微球各 100 μl,在每种每管微球中加入 50 μl 的 0.1 mol/L MES 液,充分振荡悬浮微球;在不同微球的管中加入不同的探针,其探针的终浓度为1 nmol。去离子 H_2O 溶解 EDC,将 15 μl EDC 分别加入的每管探针微球中,振荡,避光孵育;每管中分别加入 0.02% TWEEN 500 μl 充分振荡,10 000 × *g* 离心 5 min 弃取上清;然后分别加入 0.1% SDS 500 μl,振荡,之后 10 000 × *g* 离心 5 min,弃取上清液;分别加入 100 μl 的 0.1 mol/L MES 液,振荡悬浮,2 ~ 8 ℃避光保存。

1.2.2.2 偶联效率的检测 设计偶联探针的互补探针,互补探针序列 5′端加 Biotin 修饰,检测探针是否已连接到微球上。

1.2.2.3 微球杂交方法 50 μl 每种偶联好的微球,PCR 产物和 TMAC 液混合后振荡;将混合微球与待测样品放入 PCR 反应仪中,95 ℃变性,55 ℃杂交 30 min;13 000 × *g* 离心 8 min,弃取上清液;取 1∶250 SAPE 液 50 μl 分别加入每管中染色,55 ℃ 30 min,12 000 r/min 离心 5 min,弃取上清;加入 100 μl TMAC,13 000 × *g* 离心 5 min,弃取上清液,加入 100 μl 3 mol/L TMAC 充分振荡,吸入检测板井中,通过 Luminex™ 100 液体芯片技术平台,应用 Bio-Plex 操作系统结合 Bio-Plex Version 3.0 管理软件分析处理样本检测。

1.2.3 标准样品的变异系数(*CV*)的测定 *CV* 值的计算:$CV = s/m$,其中 *s* 代表标准差,*m* 代表平均值。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学分析,对阳性质粒标准的检测数据,采用判别分析法,对结果进行方差分析。

2 结果

2.1 PCR 体系优化结果及标准 HPV 质粒扩增结果

经对引物的浓度、镁离子浓度、DNA 聚合酶浓度、模板浓度做梯度检测,优化结果,各反应物所需浓度见表 2。采用优化的 PCR 体系对各标准 HPV 质粒扩增,PCR 产物电泳结果显示,扩增条带在 150 bp 处,条带清晰没有杂带,说明优化的 PCR 条件适合。

表 2 HPV PCR 优化体系

反应物	加入量	终浓度
上游引物	2 μl	0.4 nmol/μl
下游引物	2 μl	0.4 nmol/μl
dNTP	2 μl	0.2 nmol/μl
反应缓冲液(10 × Buffer)	5 μl	10 mmol/L Tris HCl(pH 8.3)
镁离子浓度($MgCl_2$)	5.5 μl	2.7 mmol/L
DNA 聚合酶	0.5 μl	1.25 U
无核酶水(ddH_2O)	28 μl	–
模板量(model)	5 μl	–

2.2 探针偶联及标准阳性质粒 PCR 产物微球探针的杂交反应结果

通过寡核苷酸 5′-氨基与微球表面的羧基在偶联反应液中偶联,微球表面的羧基点通过 MES 和 EDC 激活,为了减少蛋白在寡核苷酸与微球杂交中的相互干扰现象,探针设计时通过加上带生物素酶的碳臂,采用偶联探针互补的探针和标准质粒检测探针偶联效果。用 13 种带有不同编号的微球分别与 HPV6、HPV11、HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV35、HPV45、HPV51、HPV52、HPV53、HPV56 和 HPV58 型探针偶联后,使 13 种微球分别带有不同的探针。将这 13 种微球同时放入 1 个反应体系中,在 1 个反应体系中加入 1 种标准 HPV 质粒的 PCR 产物,进行杂交反应,经 Luminex™ 100 Bio-Plex 软件分析平台检测,结果显示 PCR 产物与相应探针杂交后,所对应的荧光值均高于无 PCR 产物、未发生杂交反应探针的荧光值 3 倍以上[3],说明探针已有效地结合在微球表面,并可通过杂交在构建的芯片体系中有效区分出不同型别的 HPV。

2.3 结果的判别分析

将标准阳性质粒分批多次进行 PCR 扩增,并与构建的芯片杂交,获得 349 例杂交结果荧光数值,将这些数值按探针不同分组,将各组数值进行判别分析,其中 286 例中有 4 例被错判,系统评价总判别率为 98.6%;典型判别方差分析,组的特征值(Eigenvalue)为 6.947,典型相关系数(canonical correlation)为 0.93,Wilks λ = 0.134,经 χ^2 检验,$\chi^2 = 37.22$,$P < 0.01$,表明有统计学差异,各组探针间没有交叉反应,可有效地区分不同的 HPV 型别。对 349 例标准样本进行回代特别函数判别分析,判定在特别函数 > 2 时,其检测阳性标本的阳性准确率在 96.7% 以上。

2.4 阳性质粒 PCR 产物与微球探针的杂交反应影响因素

2.4.1 微球与探针杂交时间的优化检测 为了优化微球与探针间的杂交反应,对 HPV51 阳性质粒的 PCR 产物与 HPV51 探针微球和 HPV53 探针微球,做了不同的杂交时间试验,其杂交反应时间对杂交反应结果有明显的影响,见图 1。

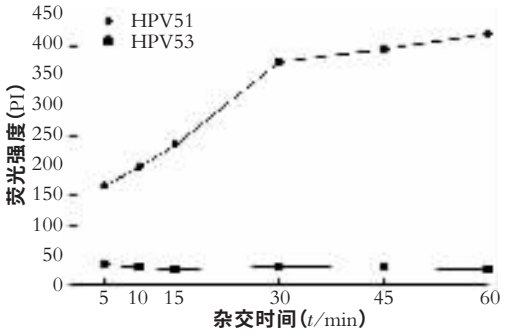


图 1　杂交时间对反应的影响

2.4.2　不同浓度比例 PCR 产物与探针杂交的反应　　选取 HPV11、HPV16、HPV18 质粒 PCR 产物中的 2 种,按不同比例混合加入有 3 型 HPV DNA 探针进行变性杂交,经 SA-PE 荧光染色后检测,结果显示 2 型质粒与其相对应的探针杂交成功后,这 2 型探针所对应的荧光值均高于未杂交探针的荧光值 3 倍以上,见表 3。

表 3　不同比例 HPV PCR 产物浓度与探针杂交的反应结果(荧光值)

质粒	探针		
	HPV11	HPV16	HPV18
HPV11: HPV18(1:1)	1 998	31	1 435
HPV11: HPV18(4:1)	1 750	40	1 234
HPV16: HPV18(1:1)	37	890	1 292
HPV16: HPV18(3:2)	44	961	1 536

2.4.3　杂交反应的其他影响因素　　①样品 PCR 反应中的污染:在样品 PCR 扩增的过程中,操作或样品受到污染,可明显影响杂交结果,因此在样品扩增时应同时做阴性对照检测。②微球的时效:本实验中曾采用超过保质期的微球检测,结果出现杂乱或错判现象。③探针的质量:实验中曾用短碳臂作为探针的连接,结果较长碳臂差;实验中也曾出现在探针连接方向不同时而无结果现象。④在杂交反应进行的过程中,杂交完成后没有在短时间内进行染色,或杂交染色后在第 2 天进行检测,均会影响杂交的反应结果。

2.4.4　标准样品的 *CV* 测定　　在应用微球测量的过程中存在一些可变因素,如用同一偶联好的微球,在检测不同批次的 PCR 产物时会出现一定的差异,在这种情况下检测 *CV* 值有着重要的意义,采用同一批微球,分别同时多次检测同一批和不同批次的 PCR 产物杂交后的结果,计算的各型探针的 *CV* 值,显示 HPV 各型的 *CV* 值在 0.41% ~14.69%。

3　讨论

Luminex™100 是基于 Luminex® xMAP® 技术而开发可同时检测 100 种待测物的液相芯片技术平台系统,通过鉴定微球的颜色来确定被检测物中存在的反应类型,并通过靶物质上的报告分子对反应物进行定量分析,目前已用于蛋白核酸分析、免疫和酶学分析、受体和配体识别分析等研究。本研究根据 Luminex™ 100 液体芯片技术平台,应用国际上已公认的 HPV 质粒作为阳性参照标准,选择占外生殖器部位 HPV 感染 96% 左右的类型,作为构建液态芯片的首批 HPV 型别,建立了 13 种 HPV 型别液相芯片的诊断体系[3]。

本研究对 HPV 公用引物和 13 种 HPV 的探针进行了筛选,通过对探针 5′端 NH_2-C_{14} 修饰延长了探针,从而有利于探针在液体中捕获待检测物,同时减少蛋白在寡核苷酸与微球杂交中的相互干扰现象;研究显示适合浓度的 MES 和 EDC 可使微球表面的羧基点激活,使探针 5′-氨基与微球表面的羧基有效的偶联;经对引物的浓度、镁离子浓度、DNA 聚合酶浓度、模板浓度做梯度检测,选择了适合的 PCR 反应条件,建立了 HPV PCR 反应体系,确定了待检测物有效扩增方法,保证了待检测物在杂交反应中有效的检出。

微球探针捕捉待检测物的杂交反应体系中,杂交的反应时间和 PCR 产物的浓度存在不同的影响,本实验结果显示杂交时间在 30 min 以下时,杂交时间越短,探针与产物结合反应越差,而杂交时间在 30 min 以上时,杂交时间对反应的影响不明显,探针与产物的结合反应达到饱和;当 PCR 产物达到一定浓度范围时,PCR 产物的浓度对荧光值有明显影响,PCR 产物浓度超过一定高度时,反应的荧光值随浓度变化不明显;在有 2 种一定范围内的、不同浓度 PCR 产物同时存在时,并不影响其与各自相应探针结合的杂交反应。另外,样品 PCR 反应中的污染、微球的时效、探针的质量等均可以影响液态芯片系统的构建,微球的荧光按不同比率配制,存放的时间及存放的位置,都可影响微球荧光效价,从而使检测结果出现杂乱或错判现象;探针合成中碳臂的长短及连接方向对微球偶联的效率有影响,从而影响杂交反应的结果。

在生物学的研究中,*CV* 值被广泛使用于测定重复实验的可信度检测。本实验构建的芯片中,各型 HPV 探针变异系数 *CV* 范围为 0.41% ~14.69%,说明使用同一批微球偶联探针时,检测同一批或不同批 PCR 产物时,去除其阴性对照的背景值后,其检测值相对变异不大,说明构建的 HPV 基因分型液态芯片检测系统,检测性能稳定,具有可重复性。

关键词: 人乳头瘤病毒;基因分型;芯片
中图法分类号: R394-33　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] de Roda Husman A M, Walboomers J M M, Van Den Brule A J C, *et al*. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 39 ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR[J]. J Gen Virol, 1995, 76(Pt 4): 1057 - 1062.

[2] Jacobs M V, de-Roda-Husman A M, van-den-Brule A J, *et al*. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(4): 901 - 905.

[3] 党倩丽,陈　超,杜　篷,等. 人乳头瘤病毒基因分型液态芯片的构建[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2008,24(5):461 - 463.

(编辑　张　维)