DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.02.040
第22卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 2
194 2000年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2000

技术方法

文章编号:1000-5404(2000)02-0194-02

GPPCR-RDB法对HPV感染的快速基因诊断

Establishment of GPPCR-RDB method for rapid genetic diagnosis of HPV infection

郭华阳[1],汪江华[1],周来新[1],叶治家[2],陈 安[1] (第三军医大学:[1]医学检验系临床生物化学教研室;[2]基础医学部生物化学与分子生物学教研室;重庆 400038)

提 要 目的:对人乳头瘤病毒(HPV)感染进行快速的基因诊断。方法:采用通用引物介导的聚合酶链反应(GPPCR)扩增皮损组织DNA,并同时将扩增产物标记上地高辛配基,再结合扩增产物的非放射性反向斑点杂交技术,对HPV亚临床感染和假性湿疣进行了快速的基因分型诊断及鉴别诊断。结果:14例亚临床感染中HPV_6阳性12例,HPV_{11}阳性4例,HPV_{16}阳性4例,HPV_{18}未检测出,所用探针以外型别1例,混合感染5例;11例假性湿疣中仅有1例为HPV_{16}阳性。结论:该方法对HPV感染特别是亚临床感染和隐性感染的基因诊断是快速敏感特异的,值得推广应用。

人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)有100多种型别,在人类广泛传播,其感染可致皮肤疣(特别是尖锐湿疣)和皮肤粘膜癌(特别是宫颈癌)等。尖锐湿疣(CA)的亚临床感染(SPI)与假性湿疣在临床上有时难以鉴别,前者是CA复发的重要原因[1],确诊者必须接受治疗,后者则不然,可以不予治疗,因而临床上必须对它们早期诊断和鉴别诊断。通常的方法诊断率较低,特异性也欠佳,因而有赖于基因诊断技术对病原体HPV进行检测作出病因诊断。单一的聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR)或分子杂交技术在临床上应用总存在一些不足[2],本文探索建立一种快速敏感特异且实用的改良方法。

1 材料与方法

1.1 标本收集及处理

门诊患者25例,其中经醋酸白试验证实为SPI的14例,含11例典型CA皮损周围的SPI(典型CA皮损经激光烧灼清除,SPI未清除)及3例单纯SPI;经醋酸白试验阴性的假性湿疣患者11例。活检皮损一部分作病理组织学检查,另一部分液氮贮存备用。所有病例均随访半年,14例SPI均于3个月内出现典型皮损(复发),复发标准参见文献[1],11例假性湿疣10例皮损无变化,1例出现典型CA皮损(女性,3个月时)。

1.2 主要材料和仪器

HPV L1通用引物和$HPV_{6,11,16,18}$型特异性寡核苷酸(SSO)探针[3]由中科院上海细胞所合成。HPV_{11}重组质粒由德国海登保癌症研究中心赠。地高辛检测试剂盒、dNTP(含Dig-dUTP)和蛋白酶K为德国宝灵曼公司产品。PCR扩增试剂盒为复旦大学产品。硝酸纤维素膜为Promega公司产品。PCR仪为美国产品(DB80230)。

1.3 模板DNA制备

组织剪碎后加SDS和蛋白酶K 37℃消化,饱和酚及氯仿-异戊醇抽提,无水乙醇沉淀。沉淀溶于0.1×SSC,加RNase A 42℃消化。同上抽提沉淀,离心弃上清,干燥沉淀,适量的双蒸水溶解沉淀,琼脂糖凝胶电泳观察,4℃保存。

1.4 通用引物介导的聚合酶链反应(GPPCR)

PCR反应总体积为50 μl,含5×PCR缓冲液5 μl,模板DNA适量,dATP、dGTP和dCTP各1 mmol/L,dTTP 0.65 mmol/L,Dig-dUTP 0.35 mmol/L,50 pmol的L1通用引物一对,去离子水适量,混匀,95℃变性后加Taq酶2 U,混匀后覆石蜡油30 μl,在PCR仪上按93℃ 30 s,52℃ 1 min,72℃ 1 min循环30个周期,最后72℃延伸10 min。取出10 μl扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶上电泳,观察特异性带。同时设有方法对照和HPV_{11}质粒的阳性对照及正常包皮组织DNA的阴性对照。

1.5 反向斑点杂交(RDB)

将$HPV_{6,11,16,18}$SSO探针通过碳二亚胺的介导固定在硝酸纤维膜上,形成4个点。按文献[4]进行预杂交30 min,然后取经氯仿抽提的PCR扩增产物分别与已固定的SSO探针进行杂交约1 h,漂洗后籍PCR产物上携带的Dig标记物进行碱性磷酸酶显色。

2 结果

2.1 PCR扩增结果

14例SPI组织DNA以GPPCR扩增后,扩增产物均为约450 bp的电泳带;11例假性湿疣组织DNA扩增后仅有1例出现了

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39600175)
作者简介:郭华阳(1966.4),男,湖北省英山市人,硕士,主治医师,讲师。
收稿日期:1998-09-16;修回日期:1999-03-03

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

约 450 bp 的电泳带。方法对照和正常包皮组织 DNA 扩增后均未出现特异性电泳带。其中 2 例扩增结果见图 1。

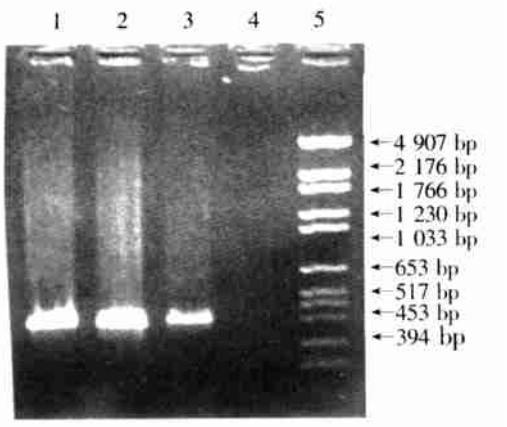


图 **1**　**2** 例 **PCR** 扩增产物电泳图谱 (**1.5**%琼脂糖凝胶)
1、2: 2 例扩增产物; 3: 阳性对照; 4: 阴性对照; 5: pBR328 DNA/*BamH*Ⅰ, pBR328 DNA/*Bgl* Ⅰ, pBR328 DNA/*Hinf*Ⅰ

2.2　RDB 结果

15 例阳性扩增产物与 $HPV_{6,11,16,18}$ 型 SSO 探针反向斑点杂交后, HPV_6 阳性 12 例, 占 80.0%, HPV_{11} 阳性 4 例, 占 26.7%, HPV_{16} 阳性 4 例, 占 26.7%, HPV_{18} 型全部阴性, 所用探针以外型别 1 例; 其中 $HPV_{6/11}$ 混合感染 3 例, $HPV_{6/11/16}$ 混合感染 1 例, $HPV_{6/16}$ 混合感染 1 例。1 例假性湿疣组织 DNA 的 PCR 扩增产物经 RDB 后为 HPV_{16} 阳性。其中 6 例 RDB 的结果见图 2。

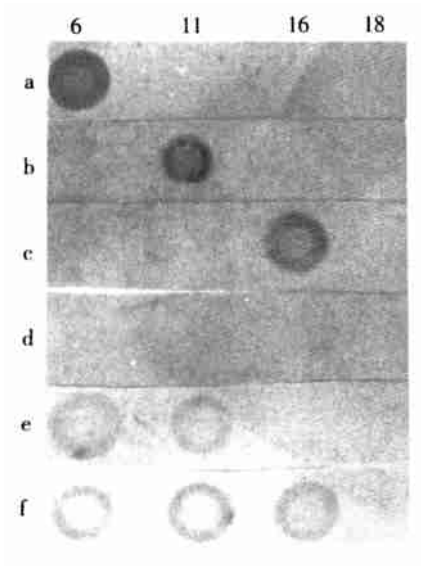


图 **2**　**6** 例 **RDB** 结果
a.b.c: 分别为 HPV_6、HPV_{11} 和 HPV_{16} 阳性; d: HPV 阴性; e: $HPV_{6,11}$ 阳性; f: $HPV_{6,11,16}$ 阳性

3　讨论

本研究采用 GPPCR-RDB 法对 SPI 和假性湿疣进行了快速的基因诊断和鉴别诊断, 并对 HPV 进行了分型。在 25 例患者中, 14 例 SPI 经检测均存在有 HPV DNA, 11 例假性湿疣中仅有 1 例检测出了 HPV_{16}DNA。在随访中, 14 例 SPI 均在 3 个月内出现典型的 CA 皮损 (3 例单纯 SPI) 或复发 (11 例典型 CA 皮损周围的 SPI), 说明 SPI 未治疗是临床上 CA 复发的重要原因, 提示临床上应扩大治疗范围。1 例女性假性湿疣患者中也检测出了 HPV DNA, 随访 3 个月时出现了典型的 CA 皮损, 因此其假性湿疣的临床诊断是否成立值得考虑, 也许是合并有隐性感染。对于所有检测出 HPV_{16} DNA 的病例因有癌变的可能, 应长期随访。

该方法在 PCR 扩增时将地高辛配基标记在扩增产物上, 避免了再次标记; RDB 时可检测出 4 种 (本研究中) 或多种 HPV 型别 (固定上多种型别 SSO 探针), 克服了设计若干对引物的扩增方法或通用引物扩增后斑点杂交的方法存在的成本高和标本量无法满足要求等不足。如果模板 DNA 的制备改为快速裂解法或直接采用拭子浸泡后裂解制备 DNA 法, 就可以缩短检测时间, 半天左右可得出结果, 更便于推广应用。

关键词　聚合酶链反应; 反向斑点杂交; 人乳头瘤病毒; 亚临床感染; 基因诊断

中图法分类号　R394－3; R737.33　　文献标识码　B

参考文献

[1] 郭华阳, 李文维, 赵莉蓉 . 激光治疗后 CA 复发情况调查及原因探讨[J] . 第三军医大学学报, 1995, 17(4): 361－362.

[2] 郭华阳, 汪江华, 周来新, 等 . HPV 隐性感染的两种基因诊断方法比较研究[J] . 中华医学检验杂志, 1997, 20(3): 181－182.

[3] 朱　平 . PCR 基因扩增实验操作手册[M] . 北京: 中国科学技术出版社, 1992. 426－428.

[4] Saiki R K, Walsh P S, Levenson C H, *et al*. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes[J] . Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(16): 6 230－6 234.

(编辑　汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net