

# 人乳头瘤病毒(HPV)基因芯片的研究

刘翠华<sup>1</sup> 马文丽<sup>1\*</sup> 张 宝<sup>1</sup> 石 嵘<sup>1</sup> 郑文岭<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 第一军医大学分子生物学研究所 广州 510515)

(<sup>2</sup> 广州军区广州总医院分子肿瘤学研究所 广州 510010)

**摘 要** 探讨将基因芯片与限制性显示技术相结合对 HPV 进行基因检测和分型的方法。分离 HPV6、11、16 和 18 型的基因片段作为探针,纯化后应用 PixSys 5500 点样仪将其打印在氨基包被的玻璃片上制作 HPV 基因芯片,对 HPV 样品进行荧光标记后与芯片杂交,经清洗和干燥后对芯片进行扫描和结果分析。对 HPV 基因检测芯片的制作与检测的实验条件进行了初步研究,并对应用 HPV 基因芯片进行分型做了初步探讨。建立的检测芯片实验方法可行,并且显示了在 HPV 分型中的应用前景。

**关键词** 基因芯片 限制性显示技术 人乳头瘤病毒

中图分类号:R373、Q75 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2003)05-0613-06

人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)在人类的感染非常普遍,可引起多种人类良性和恶性肿瘤性疾病,且其型别与致病性密切相关。对 HPV 尤其是高危型 HPV 进行检测和分型已成为肿瘤早期诊断和预防的重要环节。传统的 HPV 检测方法主要是通过形态学方法和免疫学方法对其进行检测,特异性和灵敏度均不够理想,目前主要是应用分子生物学方法对 HPV 进行 DNA 检测,包括基于核酸杂交的方法和基于聚合酶链式反应(PCR)的方法<sup>[1]</sup>。但单一的 PCR 反应或分子杂交技术在应用上总存在一些不足,因而我们尝试将近年来发展迅速的 DNA 芯片技术应用于 HPV 感染的检测。本文对 HPV 基因芯片的制备、杂交、检测等过程进行了初步研究,并探讨了其在 HPV 分型中的应用,为疾病诊断芯片的研制及应用打下了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

**1.1.1 HPV 质粒** 含 HPV 全长基因的 4 种 HPV 质粒(包括 HPV6、11、16 和 18 型)由德国海德堡癌症研究中心的 De Villier E M 博士惠赠。

**1.1.2 主要试剂** Klenow 片段、dNTP、随机引物 p(N<sub>6</sub>)、限制性内切酶 *Sau3AI*、T4 DNA 连接酶及 PCR 试剂购自大连宝生物工程技术有限公司;3S PCR 产物纯化试剂盒购自上海博彩生物科技有限公司;二甲亚砜(DMSO)购自上海生工生物工程有限公司;Cy3-

基金项目 国家自然科学基金(39880032) 广州市重点科技攻关项目(99-Z-022-01)

\* 通讯作者。Tel 86-20-85148210;Fax 86-20-85147755;E-mail: wenli@fimmu.edu.cn

作者简介 刘翠华(1976-)女,博士研究生,湖南长沙人,研究方向为 DNA 芯片技术及应用研究。E-mail: liuch@fimmu.edu.cn

收稿日期 2002-11-30,修回日期:2003-06-23

dUTP 购自 Amersham Pharmacia 公司 ;Cy3 标记的通用引物由 Trilink 公司合成。

**1.1.3 主要仪器** :PixSys 5500 型基因芯片打印仪购自 Cartesian Technologies 公司 ;紫外交联仪购自 BIO-RAD 公司 ;ScanArray Lite 扫描仪购自 GSI Lumoncis 公司 ;CMT-GAPS™ 氨基硅烷包被的玻片、杂交盒购自 Corning 公司 ;9700 型 PCR 仪为 ABI 公司产品。

**1.2 HPV 基因芯片的制备**

**1.2.1 探针的制备** : ( 1 )探针制备 :应用限制性显示 PCR( Restriction display PCR ,RD-PCR ) 技术<sup>[2~4]</sup>制备基因探针。 ( 2 )设计特定引物获取 HPV 基因探针 :通用引物根据文献<sup>5</sup> ]从 HPV L1 区中选择保守序列设计 ,型特异性引物选用 Pao 等<sup>[6]</sup>设计的各型 HPV E6 区的特定序列和自行设计的共 10 对引物( 表 1 )。引物均由上海博亚生物技术有限公司合成。PCR 反应条件为 :94℃ 5min ,94℃ 30s ,60℃ 30s ,72℃ 1min ,35 次循环 ,72℃ 8min。对 PCR 产物进行克隆、测序 ,并扩增和纯化相应的探针片段。

表 1 型特异性引物对

Table 1 Sense and anti-sense primers for different HPV sub-types

No.	Sense	Anti-sense
1	5'-GCACAGGGTCATAACAATGG-3'	5'-CGTCCCAGGGGATACTGATC-3'
2	5'-AGACCAGTTGTGCAAGACGTTTAA-3'	5'-GCACGCTAAGATGTCITTGTTTAG-3'
3	5'-AGACCAGTTGTGCAAGACGTTTAA-3'	5'-AAGGGAAAGTTGCTCTGCCACACA-3'
4	5'-ACCGAAACCGGTTAGTATAAAAGC-3'	5'-GATCAGTTGTGCTCTGGTTGCCAAAT-3'
5	5'-CACACCACAATACTATGGCGGCT-3'	5'-TGGATTCAACGGTTTCTGGC-3'
6	5'-CACCTGTGACTCAGTGGCT-3'	5'-CCGAAAACGGTTGCAAATAT-3'
7	5'-TGTGCAATAACAATTATTATGT-3'	5'-GGGTAACATAGTATAGGTAT-3'
8	5'-TGTAGCGCCAGGCCATTIT-3'	5'-CAAGCAGTGCAGGTCAGGAA-3'
9	5'-GGCGCAATGTATGTACTGG-3'	5'-CATAGCTCCTTGTATTGTCTTACT-3'
10	5'-CGGAAATGGCGGCAGTGTA-3'	5'-TTTGTTACTTGCTTGAATAGCT-3'

**1.2.2 芯片的阵列设计、打印和打印后处理** :基因芯片的设计为 15 × 11 的阵列( 图版 I - B-a ) ,每个探针横向重复打印 5 个点( 如 A1 ~ A5 :探针 1 ;A6 ~ A10 :探针 2 ;A11 ~ A15 :探针 3 ;B1 ~ B5 :探针 4 ;以后依次类推 )。阵列中的 C11 ~ C15 位点为 HIV 阴性对照探针 ,I11 ~ I15 位点为 HCV 阴性对照探针 ,B6 ~ B15 以及 K11 ~ K15 为空白对照( 50% DMSO ) ,其余均为 HPV 各型的基因探针( 共 28 个 )。应用 PixSys 5500 型基因芯片打印仪 ,将探针有序地打印在玻片上。打印后将玻片置于 150mJ 的紫外光下 ,使 DNA 交联在玻片表面 ,然后 80℃ 干烤 2h 备用。

**1.3 样品的荧光标记**

**1.3.1 随机引物延伸法标记样品** :取 2 ~ 3μg 的含 HPV 全长基因的质粒与 150ng 随机引物 p( N )<sub>6</sub> 混合 ,煮沸 3min ,冰浴 5min ,在冰上加入 10mmol/L 的 dATP、dGTP 和 dCTP 各 0.5μL ,1mmol/L 的 dTTP 3μL ,1mmol/L 的 Cy3 dUTP 1.5μL ,10 × Klenow Fragment 缓冲液 2.5μL ,Klenow 片段( 5U/μL )2μL ,加 ddH<sub>2</sub>O 至 25μL ,37℃ 温育 3h ,用 3S PCR 产物纯化试剂

盒纯化上述产物 ,真空干燥后以 5μL ddH<sub>2</sub>O 溶解。

**1.3.2 RD-PCR 法标记样品 :**用 *Sau*3AI 酶切 HPV 质粒样品获得 DNA 片段后 ,连接通用接头 ,然后用 Cy3 标记的通用引物进行 RD-PCR 扩增以标记样品。PCR 体系 :连接产物 0.01μg 作模板 加入 Cy3 荧光标记的通用引物 1μg 25 μL 2 × PCR 缓冲液[ 100 mmol/L KCl , 20 mmol/L Tris-HCl ( pH 8.3 ) 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub> ] 5U *Taq* DNA 聚合酶 ,加 ddH<sub>2</sub>O 至终体积 50 μL。PCR 反应条件 95℃ 5min ,95℃ 30s ,60℃ 30s ,72℃ 1min ,35 次循环 ,72℃ 5min。

**1.4 芯片杂交和清洗**

**1.4.1 预杂交 :**将玻片放入 42℃ 预热的预杂交液( 25% 甲酰胺 ,5 × SSC ,0.1% SDS )中 42℃ 温育 50min ,室温下分别用水清洗 5 次 ,异丙醇清洗 1 次玻片 ,然后空气干燥。

**1.4.2 杂交 :**将荧光标记的样品与等量 2 × 杂交液( 50% 甲酰胺 ,10 × SSC ,0.2% SDS )混合 ,95℃ 变性 5min ,14000r/min 离心 2min。加 6μL 混合样品至阵列上 ,盖上硅烷化处理的盖玻片 ,置于 42℃ 水浴中杂交 8h。

**1.4.3 杂交后清洗** 取出芯片 ,立即浸入 42℃ 预热的清洗液 I ( 2 × SSC ,0.1% SDS )中清洗 5min ,洗液 II ( 0.1 × SSC ,0.1% SDS )中室温清洗 5min ,洗液 III ( 0.1 × SSC )中清洗 1min ( 重复 5 次 ) ,然后移入 ddH<sub>2</sub>O 中洗 3s ,最后在无水乙醇中浸 2s 后空气干燥。

**1.5 扫描和结果分析**

用 ScanArray Lite 扫描仪扫描芯片 ,以 QuantArray 微集阵列分析软件进行分析。

**2 结果**

**2.1 基因探针的制备**

将所获得的 HPV 基因片段克隆并测序后 ,选取其中 28 个 HPV 基因片段作为芯片打印的探针 ,以异丙醇纯化后溶于 50% DMSO 中( 终浓度 250 ~ 300ng/μL ) ,取少量进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测( 图 1 ) ,结果显示基本为单一片段 ,可用于制备 DNA 芯片的探针。

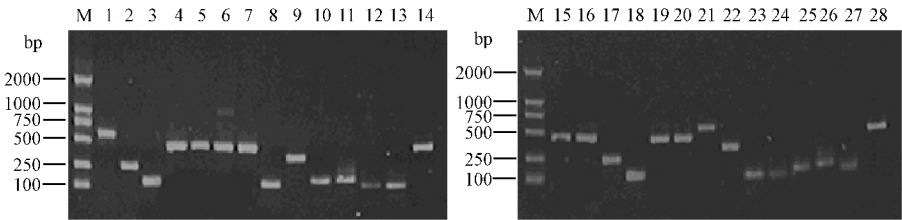


图 1 纯化后用作芯片探针的 HPV 基因片段

Fig.1 Purified HPV gene fragments for microarray preparation

M. DNA marker DL2000 ; 1 ~ 12. HPV gene fragments.

**2.2 芯片杂交结果分析**

**2.2.1 芯片杂交的特异性和重复性 :**通过 QuantArray 微集阵列分析软件对图版 I -B 相应的数据进行转化分析后 ,可得出荧光标记后的 HPV DNA 片段能特异性地与芯片中大部分相应的位点发生杂交产生阳性杂交信号 ,而与 HIV、HCV 阴性对照及空白对照无杂交信

号或信号很弱,说明该芯片特异性好。同一探针 5 个位点的杂交信号强度一致性好,且重复 6 次实验的结果也基本一致。说明该芯片具有良好的可重复性。

**2.2.2 两种样品荧光标记方法的比较:**分别用 RD-PCR 法及随机引物延伸法对 HPV 样品进行荧光标记,杂交扫描后对其结果进行了比较,从表 2 和图版 I -A 可见,RD-PCR 法比随机引物延伸法显示出较明显的优越性。

表 2 RD-PCR 法与随机引物延伸法在样品荧光标记应用中的比较

Table 2 Comparison between RD-PCR technology and random priming method

Labeling method	RD-PCR technology	Random priming method
Specificity	High	Low
Reproducibility	Good	Poor
Signal-to-Noise	High	Low
Required DNA quantity	10ng	> 2μg
Required time	About 2h	3 ~ 12h

**2.2.3 不同 HPV 型别的杂交结果:**分别应用 HPV 的 6、11、16 和 18 型的荧光标记样品与芯片杂交,以 QuantArray 微集阵列分析软件对结果进行分析可得,这 4 种不同的 HPV 型别在杂交后呈现特征性杂交信号图谱(图版 I -B),并且它们在某些相同的位点上均具有杂交信号,尤其是两种低危型别即 6 型与 11 型,以及两种高危型别即 16 型与 18 型的杂交图谱分别较为相似,而低危型别(6 和 11 型)与高危型别(16 和 18 型)之间的杂交图谱差异较大。

3 讨论

人乳头瘤病毒不仅是常见的性传播疾病病原体,而且还与多种恶性肿瘤及癌前病变密切相关<sup>[8,9]</sup>。前者主要是由低危型别如 HPV6 和 11 型感染引起,后者则主要由高危型别如 HPV16 和 18 型引起。因此,对 HPV 进行早期检测,特别是型别鉴定对明确诊断、及时治疗 HPV 感染以及预防宫颈癌的发生有重要的临床意义。应用基因芯片对 HPV 进行检测,具有大规模、高通量的特点,不但可以用于分型,而且可以对多个型别的混合感染情况同时进行监控,具有一定的临床应用价值。

目前病原基因检测芯片常用分子克隆结合 PCR 的方法扩增 1 个或少数几个短探针,但仅以 1 个或少数探针检测一种靶基因容易产生假阳性、假阴性结果。应用本实验室创新的 RD-PCR 技术快速分离并扩增得到许多长度较为均一的基因片段作探针,以这些探针来检测同一靶分子可显著提高信噪比,降低假阳性率。此外,我们还通过设计引物的方法获得了一些特定的 HPV 基因探针作为补充,以进一步提高特异性。

在标记方法上,本实验通过比较 RD-PCR 标记法和随机引物延伸标记法,表明用 RD-PCR 方法标记样品在特异性、灵敏度及可重复性等方面明显优于随机引物标记法。这可能是因为(1)RD-PCR 法可对样品进行指数级扩增,因而可检测微量样品,而随机引物延伸法不对样品进行扩增。(2)RD-PCR 法标记的基因片段特异性强且长度较为均一,其杂交动力学易于控制,而随机引物法的随机性较大,基因片段也大小不一,不利于杂交动力

学的控制。

Cy3-dUTP 的加入会对 PCR 反应产生抑制作用<sup>[7]</sup>,且杂交结果并不与 Cy3-dUTP 的掺入率成正比。相反,过高的 Cy3-dUTP 掺入率会影响杂交效率,因而在实验中应相对减少 Cy3-dUTP 的用量,可获得更好的 PCR 产量,提高信噪比。

我们应用芯片对各型 HPV 分别进行了检测,从图版 I-B 的数据分析结果可得 4 种不同 HPV 型别在芯片上呈现特征性杂交信号图谱。由于芯片上的探针包含有 HPV L1 及 E6 等保守区的基因片段,可和多种 HPV 型别进行杂交,故 4 种不同型别的 HPV 与芯片杂交后在保守区的探针位点出现共同的杂交信号。低危和高危型别间的杂交信号图谱有较明显的差异,较易于鉴别。在低危型别 6 和 11 型中信号增强的位点有 D6 ~ D10, J6 ~ J10。而在高危型别 16 和 18 型中信号增强的位点有 D6 ~ D10, J6 ~ J10。由于 HPV6 和 HPV11 型之间以及 HPV16 和 18 型之间分别具有较高的同源性,所以其共同的杂交信号较多。但经仔细地分析比较后,发现 6 和 11 型之间以及 16 和 18 型之间仍然在特定位点表现出杂交信号强度的差异。6 和 11 型的比较:可见在 C1 ~ C5, D11 ~ D15, E1 ~ E5, F1 ~ F5 等位点出现 11 型的杂交信号增强。16 和 18 型的比较:可见 16 型在 G1 ~ G5, J6 ~ J15 位点杂交信号增强,而 18 型在 C1 ~ C5 位点信号增强。因而通过上述位点可进行型别鉴定。进一步分析以上特定位点探针的序列、GC 含量和 T<sub>m</sub> 值,结果表明,这些探针的大小在 100 ~ 600bp 之间,GC 含量较高在 38% ~ 55% 之间, T<sub>m</sub> 值在 83℃ ~ 91℃ 之间,并且包含了 HPV6、11、16、18 型基因组不同区段的基因片段。通过筛选这些探针并获取更多有意义的探针,可进一步优化芯片探针的设计,从而对更多的 HPV 型别进行诊断和分型,从而减少仅通过扩增 1 个特定片段而进行诊断的 PCR 法的假阴性率和假阳性率。

本实验应用自制的芯片对 HPV 进行检测和分型,表明了基因芯片技术结合本室创新的 RD-PCR 技术在病原体检测和分型中的可行性。此外,可进一步将该技术应用于对多种细菌、病毒,进行快速、敏感、准确的检测和分型。

## 参 考 文 献

- [1] 刘翠华,马文丽,郑文岭.人乳头瘤病毒的诊断研究进展.国外医学妇产科学分册,2002,29(4):213~216.
- [2] 马文丽,郑文岭,James F B,等.限制性显示(RD-PCR):一种新的差异显示技术.见:孙志贤主编.全军生物化学与分子生物学研究进展.北京:军事医学科学出版社,1998.113.
- [3] 郑文岭,马文丽,Cater V W.肿瘤细胞多聚腺苷酸聚合酶(PAP)的差异表达显示.见:叶鑫生,沈倍奋.细胞调控探索.北京:军事医学科学出版社,1998.73~92.
- [4] 马文丽,郑文岭,崔东,等.利用瓷片材料制备 DNA 微集芯片.生物化学与生物物理学报,2000,32(3):285~289.
- [5] Monos M, Ting Y. PCR Protocols: A Guide to Methods and Application. San Diego: Academic Press, 1990. 365~367.
- [6] Pao C C, Lin C Y, Maa J S, et al. Detection of human papillomaviruses in cervicovaginal cells using polymerase chain reaction. J Infect Dis, 1990, 161(1): 113~115.
- [7] Yu H, Chao J, Patek D, et al. Cyanine dye dUTP analogs for enzymatic labeling of DNA probes. Nucleic Acids Res, 1994, 22(15): 3226~3232.
- [8] McFadden S E, Schumann L. The role of human papillomavirus in screening for cervical cancer. J Am Acad Nurse Pract, 2001, 13(3): 116~125.
- [9] Bosch F X, de S S. Human papillomavirus in cervical cancer. Curr Oncol Rep, 2002, 4(2): 175~183.

[10] Vernet G. DNA-chip technology and infectious diseases. *Virus Res*, 2002, **82** (1-2): 65 ~ 71.

## Study on Development of DNA Microarrays for Human Papillomavirus (HPV) Diagnosis

Liu Cuihua<sup>1</sup> Ma Wenli<sup>1\*</sup> Zhang Bao<sup>1</sup> Shi Rong<sup>1</sup> Zheng Wenling<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Molecular Biology, First Medical University, Guangzhou 510515, China)

(<sup>2</sup> Institute of Molecular Oncology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China)

**Abstract:** To study the technology for establishing DNA microarrays for the diagnosis of HPV. HPV6, 11, 16 and 18 gene fragments were isolated and printed onto aminosilane-coated glass slides by PixSys 5500 microarray printer as probes to prepare the HPV. HPV samples, after labeled with Cy3 or Cy5, were hybridized with the microarray followed by scanning for analysis. The experimental condition for preparing the HPV gene chips was investigated and the possibility of HPV genotyping using DNA microarrays was discussed. The technique established in this study for preparing HPV DNA microarrays is applicable and has potential clinical application significance.

**Key words:** DNA microarrays, Restriction display technology, Human papillomavirus

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation (39880032); Key Programs for Science and Technology Development of Guangzhou (99-Z-022-01)

\* Corresponding author. Tel 86-20-85148210 Fax 86-20-85147755 E-mail: wlenli@fimmu.edu.cn

Received date: 11-30-2003

### 欢迎订阅《微生物学通报》(双月)

本刊是以微生物学应用基础研究、高技术创新及教学为主要内容的综合性学术期刊。**主要报道**微生物学、病毒学、生物工程、发酵工程、酶工程、细胞工程最新研究成果、新技术、新进展。**栏目设置**研究报告、技术与方法、专论与综述、高等院校教学、新技术快报、专家论坛、专题专栏(一般为连续报道)争鸣、信息交流等。**读者对象**科研院所、大专院校、医院、农业、环保、动物医学、卫生防疫、检疫监察、生物工程公司、高新技术企业等从事相关工作人员。本刊报道内容宽泛,形式多样,突出创新性,实用性,通过多年努力已成为在微生物学及相关领域具有一定影响的学术期刊,深受广大读者、作者的欢迎。

本刊是中国生物类核心期刊、中国医学核心期刊和权威的文献源期刊,被国内多种重要的检索系统收录,连续多年名列美国《CA千种表》2002年入选“中国科技期刊方阵”。

本刊为双月刊,16开本,2004年更换彩色封面,增加印张,每期定价25元,全年150元,欢迎订阅。邮发代号2—817,请读者及时向当地邮局订阅,漏定者请直接与编辑部联系订阅,免收邮寄费。地址:北京市中关村微生物研究所《微生物学通报》编辑部,邮编:100080;传真:(010)82626208;电话:(010)62630421;E-mail: xuj@sun.im.ac.cn