

两种 HPV 基因芯片质控标准品质粒的构建*

兰金芝^{1**}, 刘 扬¹, 徐 澍², 张金娟¹, 王 欢¹, 肖 俊¹, 江银辉^{3***}, 陈腾祥^{1***}

(1. 贵州医科大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 临床医学院, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 贵州省分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 构建人乳头状瘤病毒 (HPV) HPV26 和 HPV73 亚型的单克隆标准品质粒, 用于 HPV 基因芯片制备的质量控制。方法: 收集 HPV26 和 HPV73 两种亚型感染的临床宫颈刮片脱落细胞样品, 提取并 PCR 扩增样品中 HPV 的 L1 区 DNA 片段, 琼脂糖凝胶电泳验证 DNA 分子量大小; 利用基因克隆技术, 将 L1 区 DNA 片段连接到线性化的 pMD18-T 质粒载体上, 进行琼脂糖凝胶电泳验证质粒连接反应, 将构建的 HPV 质粒转化进入大肠杆菌进行扩增, 对质粒进行测序, 验证插入 DNA 序列的正确性; PCR 扩增 HPV 亚型单克隆质粒的 L1 区特异性 DNA 片段作为检测标准品, 用该标准品与本课题组制备的 HPV 分型基因芯片进行杂交反应, 显色和扫描成像, 检测 HPV26 和 HPV73 位点的显色情况, 从而评估基因芯片 HPV26 和 HPV73 探针的特异性和点样质量。结果: 从感染 HPV 患者宫颈刮片脱落细胞成功提取 HPV26 和 HPV73 的 DNA, 并 PCR 扩增了 L1 区 DNA, 琼脂糖凝胶电泳显示扩增的 DNA 片段符合预期分子大小, 将这些 DNA 片段连接到 pMD18-T 载体上, 电泳结果显示连接后的质粒大小符合预期值, 基因测序证实插入的 HPV26 和 HPV73 的 DNA 片段序列正确; PCR 扩增了 HPV26 和 HPV73 单克隆质粒的 L1 区特异性 DNA 片段, 电泳显示分子量大小符合预期值; 杂交反应显示 HPV26 和 HPV73 探针特异性和重现性好, 探针的灵敏度为 100%, 特异性为 100%。结论: 制备了的 HPV26 和 HPV73 的单克隆靶标 DNA 标准品, 可用于 HPV 基因芯片的质控。

[关键词] 人乳头状瘤病毒; 基因芯片; 标准品; 质量控制; 基因克隆

[中图分类号] Q789; R373; R446.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)08-0894-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.08.006

Construction of Two Quality Control Standard Plasmids for HPV Gene Chips

LAN Jinzhi¹, LIU Yang¹, XU Shu², ZHANG Jinjuan¹, WANG Huan¹,
XIAO Jun¹, JIANG Yinhui³, CHEN Tengxiang¹

(1. School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Key Laboratory of Molecular Biology in Guizhou, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To construct monoclonal plasmids used as standard sample of HPV26 and HPV73 subtypes of human papillomavirus for quality control of HPV gene chip preparation. **Methods:** Clinical specimens of exfoliated cells from cervical scrapes of two subtypes of HPV26 and HPV73 infection were collected, and the fragment of HPV L1 region was extracted and amplified by PCR. The molecular weight of DNA was verified by agarose gel electrophoresis. By gene cloning technique, the L1 region DNA fragment was ligated to the linearized pMD18-T plasmid vector, and the agarose gel electrophoresis was performed to verify the reaction of plasmid ligation. The constructed HPV plasmid was transformed into escherichia coli for amplification, and the plasmid was sequenced to verify the correctness of the inserted DNA sequence. The L1 region specific DNA fragment of HPV subtype monoclonal plasmid was amplified by PCR as the detection standard. Hybridization reaction, color development

*[基金项目] 贵州省科技合作计划项目[黔科合 LH 字(2016)7348]; 贵阳市人民政府-贵州医科大学联合基金项目[筑科合同(20161001)002 号]

** 贵州医科大学 2015 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: gzctxin@qq.com; hzjyh123@qq.com

网络出版时间: 2018-08-21 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180821.0759.003.html>

and scanning imaging were performed with the HPV typing gene chip prepared by our team. The specificity and spot quality of HPV26 and HPV73 probes were evaluated by detecting the color development of HPV26 and HPV73 sites. **Results:** The DNA of HPV26 and HPV73 were extracted successfully from the exfoliated cells of cervical scrapes of infected patients with HPV, and the L1 region DNA was amplified by PCR. Agarose gel electrophoresis showed the expected molecular size of the amplified DNA fragment. These DNA fragments were ligated to pMD18-T vector. The results of electrophoresis showed that the size of the inserted plasmid was in line with the expected value. Gene sequencing confirmed that the sequence of DNA fragments of inserted HPV26 and HPV73 was correct. The L1 region specific DNA fragment of HPV26 and HPV73 monoclonal plasmids was amplified by PCR, and the molecular weight was in line with the expected value by electrophoresis. The hybridization reaction showed that HPV26 and HPV73 probes were specific and reproducible. The sensitivity and specificity of the probes were 100% and 100%, respectively. **Conclusion:** The monoclonal target DNA standard of HPV26 and HPV73 can be used in the quality control of HPV gene chip.

[**Key words**] human papillomavirus; gene chip; standard sample; quality control; gene cloning

人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是一种无包膜的双链环状 DNA 病毒^[1],其亚型繁多,至今已鉴定出上 80 多种 HPV 型别,且致病力各异^[2]。明确感染妇女生殖道上皮的约 35 种,根据 HPV 导致宫颈癌风险的高低将其分为高危型(HRHPV)和低危型(LRHPV)^[3-5],高危型 HPV 主要包括 16、18、26、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、67、68、69、73、82 等亚型,低危型 HPV 包括 6、11、40、42、43、44、54、55、57、61、71、81、83 等亚型,其中低危型主要导致湿疣类病变^[6],而高危型可能导致宫颈癌的发生^[7]。越来越多研究表明,持续性 HRHPV 感染是宫颈癌发生的必要因素^[8-12]。目前 HPV 检测方法主要是核酸杂交法,杂交所使用的探针标记方法有同位素、生物素、地高辛等^[13-14]。基因芯片技术能进行多重诊断,操作简便,耗时短,且检测灵敏度和特异性高^[15]。然而,由于一些主要的 HPV 芯片研发地的 HPV26 和 HPV73 等亚型出现频率相对较低,不易获得其 DNA 标准品和制备相应的探针,所以一些国产的 HPV 分型基因芯片尚不能检测这些亚型 HPV,会导致这些亚型被漏检,增加相应亚型引起宫颈癌发病风险。本研究通过构建 HPV26 和 HPV73 等亚型标准品,用于本课题组设计的基因芯片的质控。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集感染 HPV 女性患者门诊宫颈刮片脱落细

胞标本(40 例),患者年龄为 21 ~ 67 岁,平均 37.9 岁。40 例标本已经由临床检验科室用人乳头瘤病毒基因分型检测试剂盒和 PCR 等其它检测方法明确了 HPV 亚型,并在其中获得了 HPV26、和 HPV73 等亚型的样本。

1.2 主要试剂与仪器

HPV 分型基因芯片由本课题组研发制备。Ex Taq Marster DNA Mix、pMD18-T simple vector 和 DNA Marker 购自宝生物(大连)有限公司,HPV DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司,生物素标记引物和氨基标记探针由天一辉远生物科技有限公司合成,TBM 显色液、Gel Extraction Kit 和 DNA Clean-up Kit 购自康为世纪生物科技有限公司,Biodyne® C 膜购自 Pall Life Science,Streptavidin-HRP 购自碧云天生物科技有限公司。ABI 9700 型 PCR 仪购自 Life Technologies,恒温孵育摇床购自杭州米欧仪器有限公司,凝胶成像仪购自英国 Syngene。

1.3 临床样本 HPV 的 DNA 抽提

向 HPV 感染的宫颈脱落细胞标本管中加入 50 μL DNA 提取液,充分混匀,100 ℃保温 10 min,以 10 000 r/m 离心 5 min,保留上清液,DNA 样品立即使用或放置于 -20 ℃保存。

1.4 HPV 检测标准品的制备

参考 Gravitt 等用改进的位于 HPV 基因组 L1 区域保守区中的 PGMY09 引物,根据 HPV 基因组设计通用引物,扩增临床样品 HPV 的 DNA。PCR 反应体系为:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 40 s,55 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 40 s,共 35 个循环;行琼

脂糖凝胶电泳检测扩增产物。用 DNA 回收试剂盒纯化 PCR 产物,将产物进行双酶切,用 Taq 酶连接到 pMD18-T 载体上,将质粒热击转化入大肠杆菌感受态细胞,涂布含氨苄西林的 LB 平板,挑选单菌落进行 PCR 检测,将阳性克隆送至武汉天一辉远生物科技公司进行基因测序验证。

1.5 PCR 反向点杂交

根据 HPV 基因组 L1 区保守区域设计 4 条通用正向引物和 4 条反向引物(见表 1),所有反向引物的 5'末端均用生物素标记,利用兼并引物的原理,以各亚型 HPV 标准品质粒 DNA 作为模版,扩增 HPV 的 DNA;95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 30 s,50 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 40 s,25 次循环;扩增产物行琼脂糖凝胶电泳检测,产物变性后直接用于与基因芯片杂交。小心转移基因芯片至 50 mL 离心管中,向离心管中加入预热的 5 mL 杂交液 I 和 40 μL 变性的 PCR 产物,45 ℃ 温育 50 min,倒掉管中液体,用 10 mL 预热杂交液 II 于 45 ℃ 漂洗,重复两遍,每遍 15 min,弃掉杂交液 II,加入 5 mL 结合液 POD,室温下于摇床避光反应 10 min,用 10 mL 杂交液 I 洗膜 2 min,重复两次,最后加入 5 mL TMB 显色液避光反应 5 min;显色结束后,用 10 mL 无菌蒸馏水洗膜 3 min,室温晾干。

表 1 HPV 扩增的通用引物序列

Tab. 1 Sequences of the general forward and reverse HPV amplification primers

编号	引物名称	序列(5'→3')
1	det-1A	GC(I)CATGG(I)CAAAACAATGG
2	det-1B	GC(I)CAAGG(I)CAGAAAAATGG
3	det-1C	GC(I)CATGG(I)CAGAACAATGG
4	det-1D	GC(I)CACGG(I)CAAAAGAATGG
5	det-2A	(Biotin) GAAAAATAAACTGTAAGT-CACATTCCTC
6	det-2B	(Biotin) GAAAAATAAACTGTAACT-CATATTCGTC
7	det-2C	(Biotin) GAAAAATAAACTGTAAGT-CACATTCATC
8	det-2D	(Biotin) GAAAAATAAACTGTAAGT-CAGATTCGTC

1.6 基因芯片扫描结果判读

待基因芯片干后于扫描仪上扫描,采用 Image J 软件对 HPV 基因芯片上的每个阳性杂交信号进行信号强度采集。采用 IBM SPSS 22.0 软件计算 HPV 基因芯片特异性和灵敏度。计算公式:特异性 = 真阴性的位点数 / (真阴性的位点数 + 假阳性

的位点数) × 100% ,灵敏度 = 真阳性位点数 / (真阳性位点数 + 假阴性位点数) × 100% 。

2 结果

2.1 HPV26 和 HPV73 等亚型的 L1 区 DNA 标准品质粒的构建

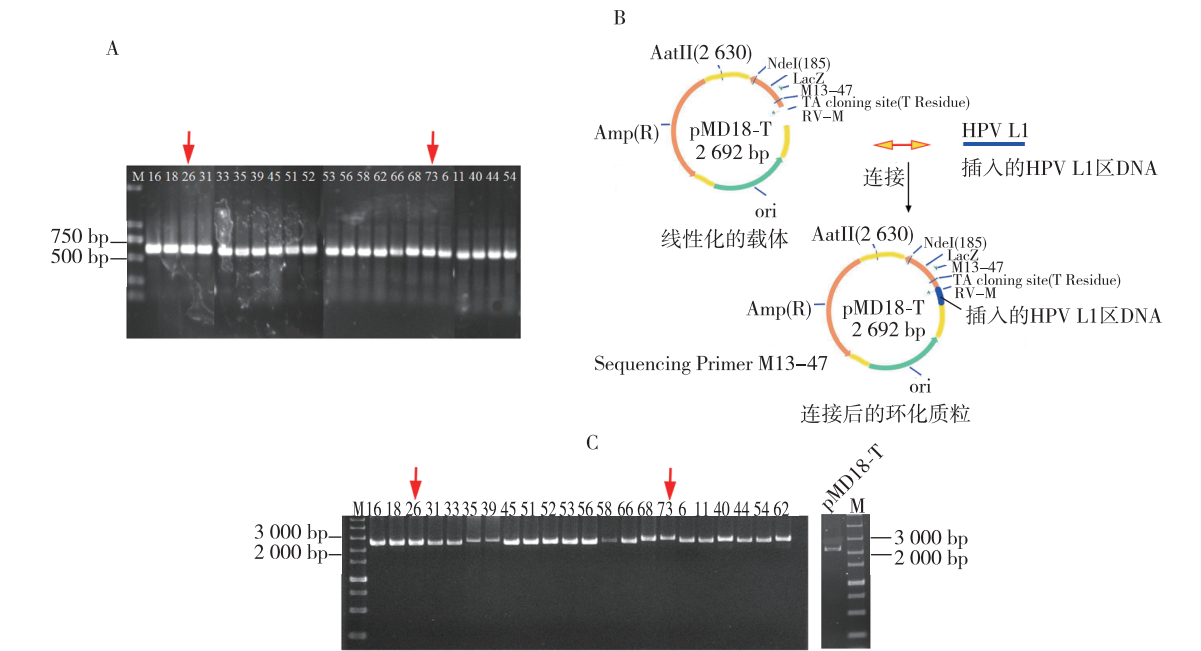
对含 HPV26 和 HPV73 的临床样品进行 DNA 抽提,以抽提的 DNA 作为模版,用 PGMY09 引物扩增 L1 区 DNA,扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,电泳检测目的片段大小约 500 bp(见图 1A),条带大小与拟扩增的 L1 区 DNA 分子大小相符。将扩增的 DNA 片段连接到已经线性化好的 pMD18-T 质粒上(见图 1B),从而形成含有 HPV L1 区 DNA 片段的标准品质粒,通过琼脂糖凝胶电泳检测质粒分子的大小,可见线性化的空载体 pMD18-T 分子为 2 400 bp 左右(见图 1C),比环化的质粒电泳条带略电泳得快一些,符合理论预期,扩增的目的片段连接上去之后,质粒 DNA 环化,电泳的条带约为 3 000 bp(见图 1C),表明连接成功。

2.2 HPV26 和 HPV73 标准品质粒插入 DNA 的测序和 PCR 验证

挑取含 HPV26 和 HPV73 单克隆宿主菌,送测序公司测序,检测重组质粒插入片段 DNA 序列的正确性,结果与 HPV26 和 HPV73 等 L1 区 DNA 序列一致(见图 2A)。以 HPV 基因组 L1 区 DNA 重组质粒为模板,用兼并引物(det-1A, det-1B, det-1C, det-1D, det-2A, det-2B, det-2C, det-2D)进行 PCR 扩展,检测结果如图 2B 所示,图中均可见约为 180 bp 大小的扩增条带,其大小与预计相符,进一步说明 PCR 产物的准确性。可将此扩增序列作为标准品检测基因芯片探针的特异性。

2.3 构建的 HPV26 和 HPV73 标准品与 HPV 基因芯片杂交的特异性

用特异性探针进行重复点样,制备 16 个 HPV 芯片。分别将 PCR 扩增获得的 HPV26 和 HPV73 特异 DNA(约 180 bp)作为标准品与制备好的 HPV 基因芯片杂交显色(每个标准品检测 8 次),进行灰度分析,将显色图像转化为 INS 数据。结果显示,每个 HPV 亚型的 8 次检测的结构高度一致,只有在基因芯片 HPV26 或 HPV73 等检测位点显色(如图 3 所示),没有出现假阳性和假阴性结果,按公式计算特异性为 100% ,灵敏度为 100% ,表明点样操作的重现性很好,未出现探针点样污染等问题。



注:A 为从临床宫颈刮片脱落细胞样本 DNA 中 PCR 扩增获得的 HPV L1 区 DNA 片段(红色箭头指 HPV26 和 HPV73 的 L1 区 DNA 片段电泳条带),B 为质粒构建流程示意图,C 所示为空载体质粒(pMD18-T)和连接 HPV L1 区 DNA 片段后的质粒电泳图(红色箭头指 HPV26 和 HPV73 等 L1 区 DNA 片段的连接质粒)

图 1 HPV26 和 HPV73 等亚型的 L1 区 DNA 标准品质粒的构建

Fig. 1 The construction of L1 region DNA Standard plasmid of HPV26 and HPV73 subtypes

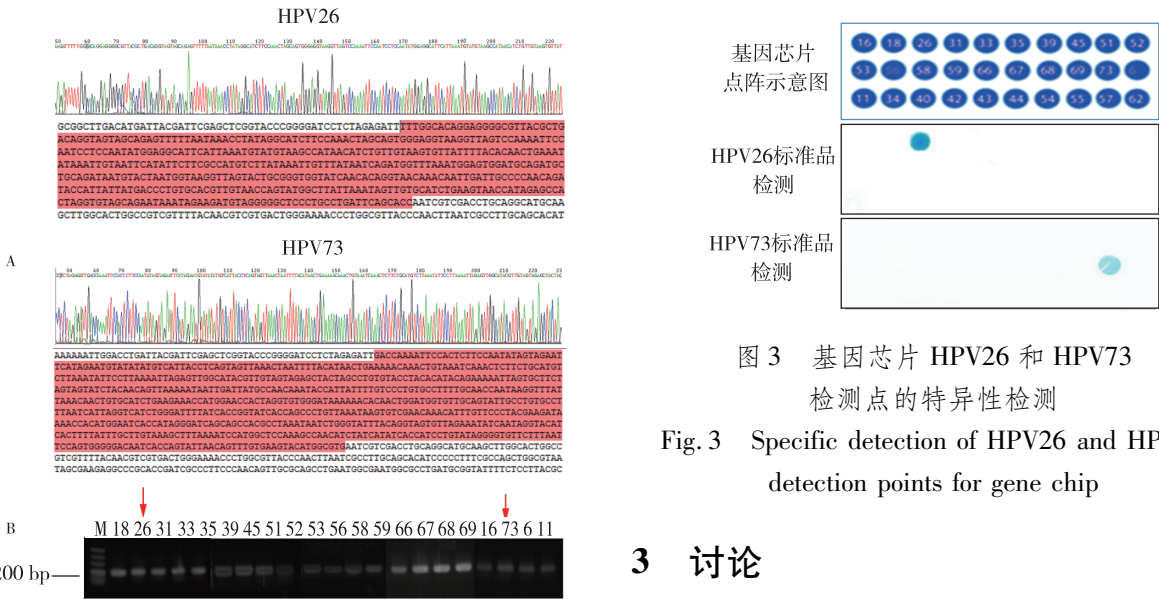


图 3 基因芯片 HPV26 和 HPV73 检测点的特异性检测

Fig. 3 Specific detection of HPV26 and HPV73 detection points for gene chip

3 讨论

基因芯片工作原理是将特异性探针点在膜上,制备基因芯片,与被特定标记物标记的临床样本 DNA 扩增产物进行杂交和显色,经过扫描分析检测样本 HPV 型别^[16]。目前国产 HPV 基因芯片只能检测并鉴定至多 24 型 HPV,还有一些 HPV 亚型未能检测出来,其中包括了 HPV26 和 HPV73 等型高危 HPV。HPV26 和 HPV73 在一些 HPV 研发公司所在地的感染率并不高,因此不易获得这些亚

注:A 为 HPV 质粒测序峰形图,涂红部分为插入的 HPV L1 区 DNA 序列;B 为 PCR 扩增的用于检测基因芯片特异性的标准品 DNA 电泳图,红箭头指示 HPV26 和 HPV73 相应 DNA 条带

图 2 HPV26 和 HPV73 标准品质粒插入 DNA 的测序和 PCR 验证

Fig. 2 Sequencing and PCR Verification of HPV26 and HPV73 standard plasmid inserted into DNA

型的 DNA 进行研发^[17-18]。

本课题组获得了 HPV26 和 HPV73 等感染的临床样本,通过提取样品 DNA,并进行基因测序,确定获得了 HPV26 和 HPV73 的 DNA 序列,利用该序列,课题组制备了 HPV26 和 HPV73 的特异性探针,并点样到基因芯片阵列中,制备成检测范围更广的 HPV 分型基因芯片,并将临床样品获得的 HPV L1 区的 DNA 序列插入到 pMD18-T 质粒中,制备成标准品质粒。标准品在基因芯片质控中具有重要意义,通过标准品可以检测芯片探针的特异性,也可以检测基因芯片探针的点样是否出现错误和交叉污染。HPV 探针的设计是根据 L1 区来进行的,在这个区域内具有保守性较强的序列,可以作为 HPV 病毒区别于其它区域的鉴别特征;同时也具有各亚型之间互不相同的可变区域,可以作为亚型分类的依据^[19-20]。而标准品则是与特异性探针互补的 DNA 序列,同样具有的 DNA 序列的特异性,如果点样出现错误,则标准品的杂交显色就会出现异常,从而起到检测 HPV 分型基因芯片的产出质量的作用。如研究结果所示,本研究制备的 HPV26 和 HPV73 标准品 DNA 测序正确,而且与制备的基因芯片杂交特异性及重复性均很好,可用于后续产品质量监控。

综上,本研究制备了的 HPV26 和 HPV73 的单克隆靶标 DNA 标准品,能很好地用于本课题开发的 HPV 基因芯片的质控。

4 参考文献

- [1] STANLEY M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females[J]. *Gynecologic Oncology*, 2010, 117(2 Suppl):5-10.
- [2] 麦雄燕,韦迪霞,袁飞飞,等. 不同基因亚型人乳头瘤病毒感染与宫颈病变的关系[J]. *中华医院感染学杂志*, 2018,28(1):121-124.
- [3] 李世君,王芳. 1 803 例女性人乳头瘤病毒基因分型检测及感染情况分析[J]. *内蒙古医学杂志*, 2016, 48(1):46-48.
- [4] 周庆云,王玥元,田芳,等. 甘肃地区人乳头瘤病毒基因型与宫颈病变的相关性分析[J]. *中国生育健康杂志*, 2011, 17(1):5-8.
- [5] 魏宝丽,王海平. 北京密云地区宫颈液基薄层细胞学检测与人乳头瘤病毒检测对诊断宫颈病变的临床分析[J]. *中国现代医生*, 2018,11(2):54-56.
- [6] VILLIERS E M D. Cross-roads in the classification of papillomaviruses[J]. *Virology*, 2013, 445(1-2):2.

- [7] 于春丽. 高危型 HPV 感染与宫颈癌前病变及宫颈癌的相关性研究[J]. *实用妇科内分泌杂志*, 2017, 4(21):101.
- [8] ZILS K, BIELACK S, WILHELM M, et al. Osteosarcoma of the mobile spine[J]. *Annals of Oncology*, 2013, 24(8):2190-2195.
- [9] MASROUHA K Z, KHATTAB R, TAWIL A, et al. A preliminary investigation of Beta-hCG expression in patients with osteosarcoma[J]. *Journal of Bone & Joint Surgery British Volume*, 2012, 94(3):419-424.
- [10] LEE B, SUH D H, KIM K, et al. Utility of human papillomavirus genotyping for triage of patients with atypical squamous cells of undetermined significance by cervical cytology[J]. *Anticancer Research*, 2015, 35(7):4197-4202.
- [11] CHAN P K, PICCONI M A, CHEUNG T H, et al. Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing[J]. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2012, 49(4):117-119.
- [12] VAN D W P, VAN L E, WOLFFS P, et al. Correlation between viral load, multiplicity of infection, and persistence of HPV16 and HPV18 infection in a Dutch cohort of young women[J]. *Journal of Clinical Virology the Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 2016, 83(6):6-9.
- [13] 蒋卫,张艳,王瑛,等. 两种人乳头瘤病毒分型检测方法的比较[J]. *上海交通大学学报:医学版*, 2008, 28(8):962-966.
- [14] LIZARD G, DÉMARES-POULET M, ROIGNOT P, et al. In situ hybridization detection of single-copy human papillomavirus on isolated cells, using a catalyzed signal amplification system: GenpointTM[J]. *Diagnostic Cytopathology*, 2015, 24(2):112-116.
- [15] GONG P, WANG Z, GENG J, et al. Comparative study on detection and typing of human papillomavirus (HPV) infection with microarray using paraffin-embedded specimens from squamous cell carcinoma and cervical precursor lesions[J]. *Journal of Nanoscience & Nanotechnology*, 2017, 17(2):990-993.
- [16] RAHMAN M, SASAGAWA T, YAMADA R, et al. High prevalence of intermediate-risk human papillomavirus infection in uterine cervixes of kenyan women infected with human immunodeficiency virus[J]. *Journal of Medical Virology*, 2011, 83(11):1988-1996.
- [17] 钟泽艳,赵花,钟兴明,等. 广东省流动人口育龄妇女 HPV 感染状况调查[J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(10):1635-1637.

(下转第 903 页)