

• 论 著 •

SYBR Green 实时荧光 PCR 方法检测广谱人乳头瘤病毒的方法建立^{*}

徐 平¹, 章晓鹰^{2△}, 张慧敏¹

(上海中医药大学附属曙光医院: 1. 皮肤科; 2. 检验科 200021)

摘 要:目的 建立实时荧光 PCR 方法以检测广谱人乳头瘤病毒。方法 该实时荧光 PCR 方法利用了 degenerate PCR 引物与非特异性的 SYBR Green 染料替代通常使用的 PCR 特异性引物与探针, 并与市售高危 13 型、低危 6 型试剂盒以及 degenerate PCR 方法进行比较。结果 对于用高危 13 型试剂盒及低危 6 型试剂盒检测的 100 例黏膜型人乳头瘤病毒阳性标本, 用 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法检出的阳性数为 69 例, 敏感性为 69%, 相反, 用 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法检测出的 40 例皮肤型人乳头瘤病毒阳性标本, 用高危 13 型试剂盒以及低危 6 型试剂盒检测均为阴性; 对于用 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法及 degenerate PCR 方法检测的 90 例黏膜型、60 例皮肤型标本, 其检测结果显示两种方法有高度一致性 (Kappa=0.907)。结论 与市售试剂盒相比, SYBR Green 实时荧光 PCR 方法可以覆盖广谱的 HPV 型别 (皮肤型与黏膜型), 并且比 degenerate PCR 方法高效、快速和简便, 不失为一个可用于临床与科研的良好检测手段。

关键词: 皮肤; 人乳头瘤病毒; 聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.07.006

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)07-0734-02

Establishment of SYBR Green Real-time Fluorescence PCR Assay covering a broad range of Human Papillomavirus Genotypes

Xu Ping², Zhang Xiaoying^{2△}, Zhang Huimin¹

(1. Department of Clinical Laboratory, University of Traditional Chinese Medical attached Shu-guang Hospital, Shanghai 200021, China; 2. Dermatology, University of Traditional Chinese Medical attached Shu-guang Hospital, Shanghai 200021, China)

Abstract: **Objective** To establish a novel Real-time fluorescence PCR assay for simultaneous detection of a broad range of HPV. Genotypes. **Methods** Instead of universal specific PCR primers and specific probe, degenerate PCR primers and SYBR Green stain were used in novel Real-time fluorescence PCR assay, positive rates were compared with the kits (13 high-risk and 6 low-risk) used in clinical diagnosis, meanwhile, detected rate were compared between SYBR Green Real-time Fluorescence PCR and degenerate PCR. **Results** Detected rate of SYBR Green Real-time fluorescence PCR was 69 percent among the 100 positive case from cervical swab samples detected by the kits, but the kits showed negative results for 40 positive case of cutaneous warts detected by methods of SYBR Green Real-time Fluorescence PCR. Positive rates of SYBR Green Real-time Fluorescence PCR for 90 cervical type and 60 cutaneous type consist with degenerate PCR (Kappa=0.907). **Conclusion** Compared with the kits used in clinical, SYBR Green Real-time Fluorescence PCR covered a wide types of HPV genotypes including cutaneous types and cervical types. It also has high efficiency, quick and simple features than degenerate PCR. However, it is satisfactory for clinical and research.

Key words: skin; human papillomavirus; polymerase chain reaction assay

目前, 临床虽已有市售试剂盒用于人乳头瘤病毒核酸 (HPV DNA) 的检测, 但是, 该类产品所能检测的 HPV 型别基本为高危 13 型与低危 6 型, 它们多属于 HPV 黏膜型 (多为妇科宫颈型)^[1]。然而, 到目前为止, 确定的 HPV 基因型已达到 120 多种, 根据其致癌性的高低分为高危型与低危型; 而根据其易感染的部位不仅有黏膜型, 还有皮肤型^[2-3]。所以, 目前现有的试剂盒根本无法满足临床与科研的需要, 而国外报道的 degenerate PCR 方法虽然可以检测广谱人乳头瘤病毒 (HPV 1~80 型), 但是需要进行琼脂糖凝胶电泳, 临床检测操作性较差。为此, 本组沿用 degenerate PCR 引物 (兼并 PCR 引物), 并尝试与非特异的 SYBR Green 染料相结合来检测 HPV 1~80 型, 并与临床使用的市售试剂盒进行比较。

1 资料与方法

1.1 一般资料 黏膜型 HPV 标本取自上海中医药大学附属曙光医院妇科就诊患者的宫颈上皮细胞; 皮肤型 HPV 标本取自上海中医药大学附属曙光医院皮肤科就诊患者的寻常疣

组织。

1.2 仪器与试剂 Mastercycler realplex 4 荧光定量 PCR 仪购自 Eppendorf 公司, QIAamp DNA Mini Kit 购自 Qiagen 公司。2×Taq PCR Master Mix 试剂盒与 Real Master Mix (SYBR Green) 试剂盒购自天根公司; 人乳头瘤病毒 (HPV) 核酸扩增 (PCR) 荧光检测试剂盒 (高危型、低危型) 购自港龙公司; degenerate PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 方法 黏膜型标本采集和 DNA 提取: 按市售试剂盒说明书采取标本, 直接溶解于细胞裂解液中, 100℃干浴 10 min 后直接使用; 寻常疣组织标本采集和 DNA 提取: 将寻常疣组织按 Qiagen 公司 DNA 提取试剂盒说明书抽提 DNA, 并溶解于 TE 缓冲液。degenerate PCR 引物的设计: 按照参考文献 [4], 利用 HPV 8 的 L1 开放性阅读框 (ORF) 设计兼并引物, FAP59: 5'-TAA CWG TIG GIC AYC CWT ATT-3'; FAP64: 5'-CCW ATA TCW VHC ATI TCI CCA TC-3'。FAP59 含两

* 基金项目: 上海市科学技术委员会科技人才计划资助项目 (08PJ1409200)。△ 通讯作者, E-mail: zhangxy_10@126.com。

个肌昔,有 3 处兼并碱基,共有 8 条引物;FAP64 同样含两个肌昔,但有 4 处兼并碱基,共有 36 条引物。HPV58、HPV40 的扩增产物分别为 260 bp 与 700 bp 外,其余产物大小均为 500 bp 左右。(HPV 1~80 错配碱基表略,详见参考文献[3])。

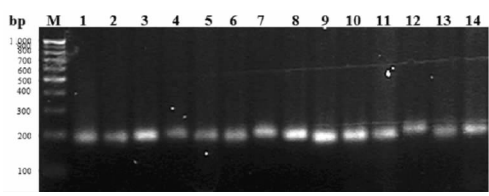
1.4 SYBR Green-degenerate 实时荧光 PCR Real Master Mix(SYBR Green)9 μ L(含 dNTP、Taq 酶、SYBR Green 等),10 μ M 的上游引物与下游引物各 1.0 μ L(终浓度为 350 nM),DNA 模板 2 μ L(含 DNA 0.1 μ g),补充水 7 μ L 至总体积为 20 μ L。标本先经 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,1 个循环;95 $^{\circ}$ C 变性 20 s,52 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s,共 40 个循环。最后,升温至 95 $^{\circ}$ C,再降温至 60 $^{\circ}$ C,随后缓慢逐渐升温至 95 $^{\circ}$ C,作熔解曲线分析。为确认实时荧光 PCR 扩增的有效性,未作熔解曲线的取 PCR 扩增产物 10 μ L 经 2% 琼脂糖凝胶电泳 45 min,在凝胶成像系统中观察结果,特异性条带为 500 bp 左右。

1.5 统计学处理 计算敏感性公式:敏感性(%)=实际阳性检出例数/真阳性例数 $\times$ 100%;运用 SPSS 16.0 软件对 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法与 degenerate PCR 方法检测所得数据进行 Kappa 检验。

2 结 果

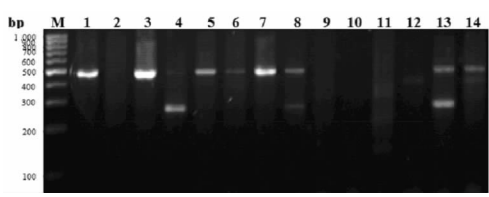
2.1 黏膜型标本 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法与人乳头瘤病毒核酸扩增荧光检测试剂盒(高危型、低危型)比较,对于人乳头瘤病毒核酸扩增荧光检测试剂盒(高危型、低危型)检测的 100 例妇科黏膜型 HPV 阳性标本,用 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法检出的阳性数为 69 例。人乳头瘤病毒核酸扩增荧光检测试剂盒检测的阳性标本均经 2% 琼脂糖凝胶电泳 45 min,在凝胶成像系统中能观察到特异性条带,因此可以作为真阳性样品,由此计算 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法的敏感性为 69%。由于本方法可以检测广谱人乳头瘤病毒(HPV 1~80 型),而人乳头瘤病毒核酸扩增荧光检测试剂盒只能检测高危 13 型与低危 6 型,故不能以试剂盒检测的阴性标本作为真阴性,因此,两者之间未进行特异性比较。

人乳头瘤病毒核酸扩增荧光检测试剂盒及 SYBR Green 实时荧光方法(未作熔解曲线)PCR 产物,见图 1~2。



M 为 DNA 标准条带;1~14 号为人乳头瘤病毒核酸扩增荧光检测试剂盒阳性样本电泳结果,在 200 bp 左右均可见到阳性条带。

图 1 人乳头瘤病毒核酸扩增荧光检测试剂盒阳性样本 PCR 产物电泳图



M 为 DNA 标准条带;1~14 号为 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法电泳结果,其中 1、3、4、5、6、7、8、12、13、14 号样本均可见到阳性条带;2、9、10、11 号样本均未见阳性条带;4、8、13 号样本由阳性条带的长度可判断为 HPV 58 型。

图 2 SYBR Green 实时荧光 PCR 产物电泳图(未做熔解曲线)

2.2 皮肤型标本 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法与人乳头瘤病毒核酸扩增荧光检测试剂盒(高危型、低危型)比较,对于用 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法检测的 40 例皮肤型 HPV 阳性标本用人乳头瘤病毒核酸扩增荧光检测试剂盒(高危型、低危型)的阳性检出数为 0 例,提示寻常疣的 HPV 型别均不在高危 13 型与低危 6 型范围中,并由此可见,与临床检测试剂盒相比,SYBR Green 实时荧光 PCR 方法可以覆盖更广谱的 HPV 型别,尤其在皮肤型 HPV 检测方面更具优势。

2.3 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法与 degenerate PCR 方法比较 检测发现在 90 例黏膜型 HPV 标本、60 例皮肤型 HPV 标本中,SYBR Green 实时荧光 PCR 方法阳性检出数分别是 58、48 例;degenerate PCR 方法则为 56、44 例;Kappa 值为 0.907,提示了两者检测结果的高度一致性。

3 讨 论

目前,临床常用的 HPV DNA 的检测方法大致为:(1)多重 PCR 方法,可同时检测高危 13 型(HPV 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68)和低危 6 型(HPV 6、11、40、42、43、44);(2)基因芯片方法(快速分子杂交技术),可同时检测高危 13 型、低危 5 型、3 种中国人群常见型(HPV 53、66、CP8304)。但是,到目前为止,确定的 HPV 基因型已达到 120 多种^[2],许多研究也纷纷报道了与人类各种疾病相关的 HPV 型别^[5-7]。就皮肤病而言,同样与 HPV 的感染有着密切关系,有研究报道称寻常疣(如发于手足部的称跖疣)主要是由 HPV 1、2、4、7、27、57、65 引起^[8-10]。因此,仅凭现有的检测方法,只能针对小范围型别的 HPV,既不能满足临床 HPV 筛选工作的需要,更不能有助于研究新的与疾病相关的 HPV 型别。所以,广谱 HPV(包括黏膜型与皮肤型)检测方法的建立无论对临床还是对科研都有重要意义。

国外文献曾报道,用 degenerate PCR 可同时检测 HPV 1~80 型^[4],但考虑到 degenerate PCR 在操作程序上必须进行琼脂糖凝胶电泳,较为繁琐。为此,本组考虑对此方法进行改良,以提高检测的工作效率。由于 degenerate PCR 至少可同时检测 1~80 型的 HPV,设计一一对应的特异性探针可操作性较差,因此,本组尝试用非特异性的双链 DNA 染料 SYBR Green 替代特异性探针,建立 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法来检测广谱人乳头瘤病毒,并严格把握引物浓度与退火温度,减少非特异性荧光信号,达到检测的最佳效果,最后通过熔解曲线分析来区别特异性与非特异性扩增。通过对黏膜型和皮肤型 HPV 标本检测结果的分析,表明两种方法检出率相当并有高度一致性。因此,SYBR Green 实时荧光 PCR 方法不仅具有与 degenerate PCR 方法相当的检出率和广谱性,而且在操作程序上大大优化,更加有利于临床 HPV 筛选及科研工作地开展。

尽管 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法检出敏感性低于市售试剂盒,但是其能够检测皮肤来源的 HPV,在高通量检测广谱 HPV 方面具有相当优势,仍可以作为临床检测广谱 HPV 的良好方法。对于其检测效率低于现有试剂盒的原因分析,本组认为最大的因素可能与 degenerate 引物有关,因为该引物属兼并引物,与每一型 HPV 均有不同程度(1~4 个碱基)的错配,由此影响了检出效率。

综上所述,经改良的 SYBR Green 实时荧光 PCR 方法既保持了 degenerate PCR 高通量、广谱的优点,又简化了操作步骤,在工作效率方面得以大大提高,使其更具临床与科研应用价值。由于此改良的实时荧光 PCR 方法国内(下转第 738 页)

则会聚集而失去结合能力。静电排斥和范德华引力的相互作用的平衡使纳米金溶液保持稳定的胶体状态。然而,当额外的离子物质使范德华引力大于静电排斥力时,纳米金发生聚沉,颜色由红色($\lambda_{\max}\approx 520\text{ nm}$, A520)变为蓝色($\lambda_{\max}\approx 580\text{ nm}$, A580)^[6]。纳米金表面包被蛋白质分子,如抗体能阻止这种不稳定。金标抗体的最适 pH 值和最适抗体量可以通过比较(A520—A580)值确定。本实验 pH 值在 8.5 时出现拐点,因此 8.5 是最适标记 pH 值。60 mg/mL 纳米金时抗体曲线图出现拐点,则最小抗体稳定量为 60 mg/mL 纳米金,最适抗体标记量是 60 mg/mL 纳米金 $\times 130\% = 78\text{ mg/mL}$ 纳米金。

虽然点加了抗体的硝酸纤维素膜和结合垫冷冻干燥条件下组装的试纸免疫金的释放速度和程度最好,但膜和垫很容易在室温下潮解,而且在工业化生产时成本增加。26℃和 37℃、湿度 26%条件下干燥,免疫金的释放程度和速度,前者较后者好,从温度对抗体活性的影响及工业生产成本等角度考虑,选择 26℃、湿度 26%的干燥条件较为合理。

本法与 ELISA 法同时检测,用化学发光法测定了 AFP 含量的血清标本的阳性符合率结果显示,AFP<10 ng/mL 时两者阳性率差异有统计学意义($P<0.01$),当 AFP $\geq 10\text{ ng/mL}$ 时,两者的阳性符合率为 100%。当血清中 AFP=2 912 ng/mL 时,只出现了检测线未出现质控线,即出现明显的后带现象,与理论相符。临床上用化学发光法检测 AFP 含量时,通常将 AFP $\geq 20\text{ ng/mL}$ 作为临床阳性筛检的标准,表明本法研制的 AFP 侧流免疫快速检测试纸,在检测 10 ng/mL 以上的 AFP 含量时是可信的,其检测结果能满足临床筛检的需要。有学者也认为免疫层析法是一种简便、快速的检测分析法,而且无需特殊仪器设备,值得在各级医院推广,因此建立这样的研究平台对于开发病原微生物感染及肿瘤特异标志物的快速检测有重要意义^[7-9]。但纳米金试纸的关键就是要解决灵敏度低的问题,这方面可以考虑选择特异性好的抗体及优化试纸研制的各项工艺参数^[10-12]。

参考文献

[1] 孙大治,徐云庆,史蕾,等. 新型免疫标记技术研究进展及在免疫

(上接第 735 页)
外均未见报道,故本组考虑作为介绍和报道,以为临床提供一个新的检测方法。

参考文献

[1] 张莉,李小捷. HPV 基因分型检测在女性生殖道感染中的应用[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(5):452.
[2] de Villier EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomaviruses[J]. Virology, 2004, 324(63):17-27.
[3] 江川清文. いぼ(疣贅)の生涯[J]. The 69 Annual Meeting of the Tokyo Division of JDA, 2009, 14(6):142-146.
[4] Ola F, Annika A, Peter N, et al. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin[J]. Journal of General Virology, 1999, 80(26):2473-2443.
[5] Smith EM, Ritchie JM, Summersgil KF, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers[J]. Int J Cancer, 2004, 108(5):766-772.

检测中的应用[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2010, 33(4):276-278.
[2] 熊勇华,陈雪岚,陈媛. 甲基苯丙胺的胶体金免疫层析检测卡的研制[J]. 卫生研究, 2010, 39(1):120-122.
[3] Xiulan S, Xiaolian Z, Jian T, et al. Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B1[J]. Int J Food Microbiol, 2005, 99(2):185-194.
[4] Thobhani S, Attree S, Boyd R, et al. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins[J]. Journal of Immunological Methods, 2010, 356(2):60-69.
[5] Oku Y, Kamiya K, Kamiya H, et al. Development of oligonucleotide lateral-flow immunoassay for multi-parameter detection[J]. J Immunol Methods, 2001, 258(2):73-84.
[6] Hermanson GT, Mallia AK, Smith PK. Immobilized Affinity Ligand Techniques[M]. San Diego, USA: Academic Press, 1992.
[7] 李光迪,陈淑萍. 胶体金免疫层析法初筛乙型肝炎表面抗原[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(9):849-851.
[8] 邱忠平,吴丽娟. 胶体金试纸条快速检测结核抗体的临床意义探讨[J]. 国外医学·临床生物化学与检验学分册, 2004, 25(3):209-210.
[9] 宋鹏,刘陶,杨浩,韩锋产,等. CMV 抗体免疫金快速检测试剂盒的开发与初步应用[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(20):1871-1873.
[10] Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of chlamydia trachomatis infection[J]. Clin Microbiol Rev, 1997, 10(21):160-184.
[11] 刘仁沿,梁玉波,陈媛,等. 胶体金免疫层析法快速检测腹泻性中毒软海绵酸的研究[J]. 分析科学学报, 2010, 26(1):31-34.
[12] 郝建秀,张春明,王沂,等. 人心肌钙蛋白 I 胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 生物医学工程与临床, 2010, 14(6):546-549.

(收稿日期:2011-03-10)

[6] Syanen KJ. HPV infections and esophageal cancer[J]. J Clin Pathol, 2002, 55(10):721-728.
[7] 王瑜敏,陶志华. 人乳头瘤病毒和前列腺癌的关系研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(1):49-50.
[8] Iftner A, Klug SJ, Garbe C, et al. The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancers of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors[J]. Cancer Res, 2003, 63(12):7515-7519.
[9] Hagiwara K, Uezato H, Arakaki H, et al. A genotype distribution of human papillomaviruses detected by polymerase chain reaction and direct sequencing analysis in a large sample of common warts in Japan[J]. J Med Virol, 2005, 77(2):107-112.
[10] Porro AM, Alchorne MM, Mota GR, et al. Detection and typing of human papillomavirus in cutaneous warts of patients infected with human immunodeficiency virus type 1[J]. Bri J Dermatol, 2003, 149(22):1192-1199.

(收稿日期:2011-02-06)