

• 检验技术与方法 •

人乳头瘤病毒整合检测方法的建立^{*}

余 南¹, 辜为为², 刘红娥²

(1. 广州市萝岗区妇幼保健所, 广东广州 511356; 2. 广州开发区医院妇产科, 广东广州 510730)

摘要:目的 研究受感染宫颈上皮细胞中人乳头瘤病毒整合的检测方法与应用。方法 构建串联单拷贝基因重组质粒, 用于对经反向斑点杂交法基因检测为16型人乳头瘤病毒感染的宫颈脱落细胞样本进行病毒的早基因分析, 通过串联单拷贝基因标准化方法, 对采用荧光定量PCR技术分析得到的样本中HBB、病毒早基因E2与E6的检测数据分析, 计算HPV病毒整合参数与平均病毒拷贝数, 推断E2基因完整性及病毒整合发生、病毒拷贝数与已知的病变进程的相关性。结果 构建的重组质粒可有效用于标准化同批次荧光定量PCR检测E2基因、E6基因和HBB基因的数据。37例16型人乳头瘤病毒阳性宫颈细胞样本中, 15例样本结果为E2基因已破坏, 包括10例高度病变组样本及5例正常组样本。不同组E2基因完整性差异有统计学意义($P < 0.05$)。E2基因被破坏的样本平均病毒拷贝数比E2基因完整样本显著减少($P < 0.05$)。结论 本研究建立的串联单拷贝基因标准化法用于检测16型HPV感染的宫颈细胞样本中病毒整合导致的E2基因破坏有效可行。

关键词:人乳头瘤病毒; 病毒整合; 质粒

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.039

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2014)17-2356-03

Establish a method for detecting HPV integrity^{*}

Yu Nan¹, Gu Weiwei², Liu Hong'e²

(1. Guangzhou Luogang Women & Children Healthcare Institute, Guangzhou, Guangdong 511356, China;

2. Gynecologic Department, Guangzhou Development District Hospital, Guangzhou, Guangdong 510730, China)

Abstract: Objective To establish a method to detect viral integrity of human papillomavirus in women cervical HPV infection.

Methods We amplified E6/E7 gene and E2 gene of HPV16, then inserted them into a plasmid containing single copy HBB gene. HPV16 infected cervical epithelium samples were screened out by genotyping with RDB of flow-through hybridization assay. Fluorescence quantitative PCR data of HBB, viral E2 gene and viral E6 gene of all samples were standardized by compared with respective parameters of the plasmid. The ratio I_{HPV} and C_{HPV} were calculated to find out E2 gene disruption and viral copies per cell in the cervical samples, respectively. **Results** The plasmid constructed for standardization was proved effective to make the FQ-PCR data of E2 gene, E6 gene and HBB gene comparable. Thirty-seven HPV16 positive cervical epithelium samples included 22 cases from women whose TCT were normal, and 15 cases from women who confirmed HIL/CIN 2–3 or above through colposcopic examination plus biopsy. Fifteen samples were detected E2 gene disruption, including 10 HIL/CIN 2–3 or above samples and 5 TCT normal samples. E2 gene integrity in different groups were statistically significant different ($P < 0.05$). The average viral copies per cell displayed a significant decline along with E2 gene disruption ($P < 0.05$). **Conclusion** The tandem single copy gene plasmid standardized method for the detection of E2 gene disruption caused by viral integration in HPV16 infected cervical cells is feasible and effective.

Key words: human papillomavirus; viral integration; plasmid

高危型人乳头瘤病毒(HPV)是导致妇女宫颈上皮细胞恶变的重要原因, 99.7%的宫颈癌组织中可以检测到HPV DNA^[1]。病毒整合是癌变过程一个重要环节, 可导致病毒早基因的破坏^[2-3]。HPV基因分析正成为人们检测病毒整合发生的方法。本研究扩增了HPV早基因E6/E7和E2序列并将其克隆到连接有看家基因的质粒, 制备成串联单拷贝序列, 用于实时荧光定量PCR对样本E6/E7和E2基因的定量检测, 建立了检测E2基因完整性的方法并应用于宫颈上皮细胞样本的HPV整合分析, 旨在进一步了解病毒整合在宫颈组织癌变进程中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究的临床标本来源于宫颈专科就诊妇女, 年龄范围34~45岁。经反向斑点杂交流芯片法检测确

认为16型HPV感染者37例, 根据宫颈刮片、液基细胞学检测、阴道镜结合活检结果对临床标本进行分组。正常组为宫颈细胞液基细胞学检测未见异常者的标本, 共22例; 高度病变组为经阴道镜结合活检确认为宫颈上皮内瘤变(CIN)2、CIN3及原位癌病变者的标本, 共15例。

1.2 仪器与试剂 HPV基因分型检测采用反向斑点杂交法, 检测试剂盒为凯普公司产品; 寡核苷酸引物合成由上海生工和Invitrogen公司完成; 染料法荧光定量试剂盒、Taq酶及pMD18-T载体采用TaKaRa公司产品; DNA胶纯化试剂盒为Qiagen公司生产; 大肠埃希菌JM109感受态细胞为本实验室自行制备。

1.3 方法

1.3.1 制备DNA模板及基因分型检测 制备DNA模板的

* 基金项目: 广州市医药卫生科技基金资助项目(2009-YB-195); 广州经济技术开发区科技项目(2010Q)。作者简介: 余南, 女, 高级实验师, 主要从事病原生物学与临床检验的相关研究。

步骤主要如下:宫颈细胞保存液 $18\ 000 \times g$ 离心, 收集细胞沉淀于 $100\ ^\circ C$ 裂解, 沉淀核酸, 晾干 $10\ min$ 后用超纯水或 TE 缓冲液溶解, 于 $-20\ ^\circ C$ 保存备用。基因分型检测如下:按每管 $23.25\ \mu L$ Premix、 $0.75\ \mu L$ Taq 酶、 $1\ \mu L$ 模板溶液进行扩增。扩增产物经变性后进行导流杂交、酶标、显色, 显色结果根据判读模式图判读。

1.3.2 目的基因扩增与串联质粒构建 设计 E2、E6/E7 基因和看家基因的引物和扩增反应条件, 用扩增产物构建串联单拷贝质粒。通过 TA 克隆技术将 HBB 片段连到 T 载体上, 分步双酶切依次将 E6/E7 基因片段和 E2 基因片段克隆到质粒多克隆位点上, 见图 1。分步构建的质粒转化到大肠埃希菌 JM109 感受态细胞中($42\ ^\circ C$ 热激)并通过双酶切电泳和质粒测序进行鉴定。

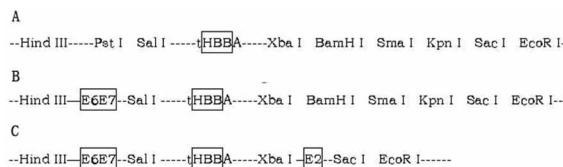


图 1 串联单拷贝质粒的分步构建

1.3.3 基因定量分析 对样品中的 E2 基因、E6/E7 基因和 HBB 基因的定量分析使用 SYBR Green 3 步荧光定量 PCR 法;每个反应管加 $7.2\ \mu L$ ddH₂O、 $10\ \mu L$ SYBR Premix Ex, 正、反向引物各 $0.4\ \mu L$ 及 $2.0\ \mu L$ DNA 模板。扩增条件: $95\ ^\circ C$ 预变性 $45\ s$;进行 40 个扩增循环($95\ ^\circ C\ 5\ s, 55\ ^\circ C\ 15\ s, 72\ ^\circ C\ 8\ s$);熔解曲线反应($65\ ^\circ C$ 至 $95\ ^\circ C, 0.1\ ^\circ C/s$, CONT)。熔解曲线合格者才能作为有效数据用于定量分析。

1.3.4 平均病毒拷贝数及病毒整合参数的测定 取质粒溶液按 10 倍倍比稀释成 5 个浓度的样本, 及 7 例宫颈脱落细胞所提取核酸样本, 每个样本分别检测 3 次, 通过 Excel 软件按公式计算: $CV = \text{SQRT}\{\text{SSQ}/[u \times (n-1)]\}/X$, 其中 SSQ 为组内离均差平方和, u 为标本数, n 为重复测定次数, X 为全部测定值均值。质粒标准化扩增后取 HBB Ct 值与 E6 Ct 值的差值 ΔCt_1 为指数, 该样本 HPV 平均病毒拷贝数(C_{HPV}) = $2^{\Delta Ct_1}$ 。取 E6 的 Ct 值与 E2 的 Ct 值之差值 ΔCt_2 为指数, 该样本的 HPV 病毒整合参数(I_{HPV}) = $2^{\Delta Ct_2}$ 。当 I_{HPV} 为 $0.8 \sim 1.0$ 时, 提示未检测到 E2 基因破坏; 当 $I_{HPV} < 0.8$ 时, 提示存在 E2 基因不完整, 病毒的状态为整合态和游离态共存; 当 $I_{HPV} = 0.0$ 时, 提示 E2 基因被完全破坏, 病毒仅以整合态存在, 无游离态病毒。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 进行数据分析, 组间率的比较采用 χ^2 检验; 计量资料呈偏态分布, 组间比较采用秩和检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

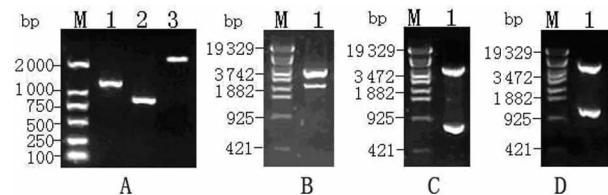
2 结 果

2.1 构建串联单拷贝质粒 经特异性 PCR 反应获得了目的序列 HBB、E6/E7 和 E2 的扩增条带, 电泳检测可见相对分子质量大小与设计相符, 见图 2A。分步构建串联质粒, 3 步的产物进行双酶切后电泳结果分别见图 2B、2C 和 2D。克隆的目的序列 HBB、E6/E7 和 E2 均经测序确认。

2.2 标准化质粒 DNA 和宫颈细胞 DNA 的扩增 标准化质粒 DNA 为模板, HBB、E2 和 E6 3 个基因重复性检测数据均达到平均 $CV (< 0.07)$ 。7 份宫颈细胞 DNA 模板同样分别进行 3 个基因的扩增, 每个反应重复 3 次, HBB、E2 和 E6 3 个基因的重复性检测数据均达到平均 $CV (< 0.20)$, 见表 1。

2.3 平均病毒拷贝数及整合分析 正常组 E2 基因不完整发

生率为 $22.7\% (5/22)$, 高度病变组基因不完整发生率为 $66.7\% (10/15)$, 两组差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.143, P < 0.01$)。见表 2。



A: 构建质粒的特异性 PCR 反应产物的电泳图, 其中 M 为 DNA 标准带, 1~3 泳道分别为 E2、E6E7 和 HBB 扩增产物; B~D: 分步克隆质粒双酶切电泳图, 图中 M 泳道为 DNA 相对分子质量标准 λ -EcoT14 I, 1 泳道为分步克隆质粒双酶切电泳结果。

图 2 PCR 产物及质粒双酶切产物的电泳鉴定

表 1 3 个基因扩增检测的 CV 值

样本	HBB	E2	E6
质粒	0.07	0.06	0.06
宫颈细胞	0.14	0.19	0.17

表 2 宫颈脱落细胞样本整合分析结果(n)

样本	n	$I_{HPV} = 0.8 \sim 1.0$	$I_{HPV} < 0.8$	$I_{HPV} = 0.0$
正常组	22	17	5	0
病变组	15	5	10	0
合计	37	22	15	0

2.4 37 例 HPV-16 阳性样本 CHPV 的检测 正常组($0.01 \sim 71.51$)和高度病变组($0.05 \sim 2.57$)比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); E2 基因完整组($0.20 \sim 71.51$)和 E2 基因不完整组($0.01 \sim 0.94$)比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨 论

宫颈癌发生分子机制与 HPV 的基因相关联^[1], HPV 的 E6/E7 基因的产物可促进宫颈上皮细胞转化, 是癌变的重要因子, 并与病毒整合紧密关联^[2-4]。绝大多数 CIN1 及轻度病变的情况下病毒以游离形式存在, 但在宫颈癌和来自宫颈癌的细胞系中 HPV 却总是以整合到宿主基因组的形式存在。病毒整合发生伴随癌变过程^[5]。整合的发生使癌基因 E6/E7 的 mRNA 更加稳定, 并使细胞获得选择性生长优势。研究可能与癌变进程关系更密切的标志物及其检测方法十分必要。

人们先后研究开发了多种检测人乳头瘤病毒整合的方法^[6-9], 包括活检组织核酸 Southern Blot、连接酶 PCR 法、荧光原位杂交(FISH), 均缺乏临床实用性。基于 FRET 原理的实时荧光定量 PCR 是应用较广的临床核酸定量技术, 利用病毒整合过程 E2 基因受到破坏, 可进行 HPV 的病毒整合分析^[10]。本研究为更有效、准确、方便地进行病毒拷贝数和病毒整合状态分析, 构建串联单拷贝基因重组质粒用于临床样本的检测。通过标准化 3 个基因的定量数据, 同时进行细胞病毒拷贝数分析和病毒整合分析结果更为可靠。对亚美型和非洲型 HPV 基因拷贝数进行检测时需使用简并引物防不同株系病毒序列的差异导致的检测失误^[11]。本地 HPV 种系发生相关分子研究^[12]显示广州地区样本多为亚洲型, 与欧洲型接近, 在此基础上设计的引物及反应体系使用效果较好^[12]。本方法用于检测

HPV16 感染宫颈脱落细胞或其他人类细胞样本中病毒整合所致 E2 基因破坏的发生有效可行。本方法仅限于检出 E2 基因破坏的病毒整合,5 例病变组样本未能分析到 E2/E6 基因拷贝数比值的下降,并不能排除病毒整合。整合而导致的基因破坏发生在其他位置的可能,需进一步设计新的方法加以分析。由于国内外 HPV 病毒整合位点的研究数据尚不够充分,目前适用于临床检出各种位点发生的 HPV 病毒整合的方法还有待研究。此外本研究所检测的样本量不大,未检测到 $I_{HPV} = 0.0$ 即完全整合型的样本,要阐明致癌分子机制尚需更多的相关样本检测数据作支持。

参考文献

- [1] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical Cancer worldwide [J]. J Pathol, 1999, 189(1): 12-19.
- [2] Kulmala SM, Syrjänen SM, Gyllensten UB, et al. Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology [J]. J Clin Pathol, 2006, 59(5): 513-517.
- [3] Collins SI, Constantinou-Williams C, Wen K, et al. Disruption of the E2 gene is a common and early event in the natural history of cervical human papillomavirus infection: a longitudinal cohort study [J]. Cancer Res, 2009, 69(9): 3828-3832.
- [4] Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical Cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(3): 886-891.
- [5] Dall KL, Scarpini CG, Roberts I, et al. Characterization of natural-

(上接第 2355 页)

别,DI 值为 0.916 4,熔解曲线分型体系的分型能力高于 PFGE。从表 1 可以看出,单独使用位点 VNTR 61-01 已能获得较好的分型能力,而随着位点的逐渐增加,分型能力缓慢上升。这主要是因为 VNTR 61-01 的重复单位为 60 bp 且具有多变性,比其他位点的分型能力强。所以,选择位点进行组合时,既要考虑分型能力,也要考虑操作成本,当位点增加到一定程度对提高分型能力作用不大时,则不再增加分析位点。

本研究能够将来自统一克隆的菌株分为同一型别,即能够较准确的将来自不同食物中毒的菌株分为同一克隆,与流行病学资料较为吻合。同时该方法操作简便、分析便捷、成本较低,具有很好地在基层推广应用前景。

参考文献

- [1] Sergeev N, Volokhov D, Chizhikov V, et al. Simultaneous analysis of multiple staphylococcal enterotoxin genes by an oligonucleotide microarray assay [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5): 2134-2143.
- [2] Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Schlievert exotoxins of staphylococcus aureus [J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(1): 16-34.
- [3] 刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(1): 3-9.
- [4] 吴平芳,石晓路,扈庆华,等. 深圳市细菌性食物中毒病原菌的调查与预防 [J]. 职业与健康, 2006, 22(19): 1563-1564.
- [5] Murchison S, Kaufmann ME, Deplano A, et al. Harmonization of

ly occurring HPV16 integration sites isolated from cervical keratinocytes under noncompetitive conditions [J]. Cancer Res, 2008, 68(20): 8249-8259.

- [6] Annunziata C, Buonaguro L, Buonaguro FM, et al. Characterization of the human papillomavirus (HPV) integration sites into genital cancers [J]. Pathol Oncol Res, 2012, 18(4): 803-808.
- [7] Ho CM, Chien TY, Huang SH, et al. Integrated human papillomavirus types 52 and 58 are infrequently found in cervical Cancer, and high viral loads predict risk of cervical Cancer [J]. Gynecol Oncol, 2006, 102(1): 54-60.
- [8] Cheung JL, Cheung TH, Tang JW, et al. Increase of integration events and infection loads of human papillomavirus type 52 with lesion severity from low-grade cervical lesion to invasive Cancer [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(4): 1356-1362.
- [9] Das P, Thomas A, Mahantshetty U, et al. HPV genotyping and site of viral integration in cervical cancers in Indian women [J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41012.
- [10] 张帅,蔡红兵,丁晓华. 应用 E2 基因缺失的检测评价宫颈病变中 HPV16 感染状态 [J]. 武汉大学学报: 医学版, 2011, 32(2): 207-210.
- [11] Jiang M, Baseman JG, Koutsoky LA, et al. Sequence variation of human papillomavirus type 16 and measurement of viral integration by quantitative PCR [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(3): 521-526.
- [12] 余南,辜为为,刘红娥,等. 广州地区人乳头瘤病毒主要基因型及其种系发生分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(11): 816-819.

(收稿日期:2014-03-08)

pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(4): 1574-1585.

- [6] Chiou CS, Wei HL, Yang LC. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus* [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(6): 2186-2190.
- [7] Sabat A, Krzyszton-Russjan J, Strzalka W, et al. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(4): 1801-1804.
- [8] Malachowa N, Sabat A, Gniadkowski M, et al. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(7): 3095-3100.
- [9] Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, et al. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data [J]. J Bacteriol, 2004, 186(5): 1518-1530.

(收稿日期:2014-05-18)