

第四军医大学
硕士学位论文
HPV分型及恶变相关点突变TDI-FP检测系统的建立与应用
姓名：陈中灿
申请学位级别：硕士
专业：生物化学与分子生物学
指导教师：阎小君
20040501

独 创 性 声 明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：陈中灿 日期：2004.5.30

保 护 知 识 产 权 声 明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位属第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文或使用论文工作成果时署各单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文。学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。

论文作者签名：陈中灿 导师签名：陈中灿 日期：2004.5.30

缩略语表

缩略语	英文全称	中文全称
A	Adenosine	腺嘌呤核苷
Amp	Ampicillin	氨卡青霉素
ASC	Atypical squamous cells	不典型鳞状细胞
ASC-H	Atypical squamous cells, cannot exclude HSIL	不典型鳞状细胞, 不排除 HSIL
Asn	Asparagine	天门冬酰胺
ATP	Adenosine triphosphate	腺苷三磷酸
bp	Base pair	碱基对
BLAST	Basic local alignment search tool	基本的相似性检索 工具
cDNA	Complementary deoxynucleic acid	互补 DNA
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia	宫颈上皮内瘤变
DNA	Deoxyadenosine triphosphate	脱氧核糖核酸
DNase I	Deoxyribonuclease I	DNA 酶 I
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
dsDNA	Double-stranded DNA	双链 DNA
E6-AP	E6-associated protein	E6 结合蛋白
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	大肠杆菌
EDTA	Ethylenediamine tetra-acetic acid	乙二胺四乙酸
EIA	Enzyme immunoassay	酶免疫测定
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FP	Fluorescence polarization	荧光偏振

G	Guanosine	鸟嘌呤核苷
HC II	Hybrid Capture II	杂交捕获 II 代
HPV	Human papillomavirus	人乳头瘤病毒
HSILs	High-grade squamous Intraepithelial Lesions	高度鳞状上皮 内病变
ICC	Invasive cervical cancer	浸润性宫颈癌
IPTG	Isopropylthio- β -D-galactoside	异丙基 β -D-半乳糖苷
ORF	Open reading frame	开放读码框
kb	Kilobase	千碱基
kD	Kilodalton	千道尔顿
LB	Luria-Bertani medium	培养基
LCR	Long control region	长控制区
LSIL	Low-grade squamous Intraepithelial lesions	轻度鳞状上皮内病变
mRNA	message RNA	信使 RNA
MW	Molecular weight	分子量
NCR	Non-coding region	非编码区
nt	Nucleotide	核苷酸
OD	Optical density	光密度值
OR	Odds ratios	风险机会比值
ORF	Open-reading frame	开放读框
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸缓冲盐溶液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RFLP	Restriction fragment length Polymorphism	限制性片段长度 多态性
Rnase	Ribonuclease	核糖核酸酶
Ser	serine	丝氨酸
SNP	Single Nucleotide Polymorphism	单核苷酸多态性
T	Thymidine	胸腺嘧啶脱氧核苷
Taq	Thermos aquatius	嗜热菌
TDI	Template-directed dye-terminator incorporation assay	模板指导的终止子 掺入反应
Tm	Melting temperature	解链温度

HPV 分型及恶变相关点突变 TDI-FP 检测系统的 建立与应用

硕士研究生： 陈中灿

导 师： 阎小君 教 授

辅导老师： 张 菊 副教授

第四军医大学全军基因诊断技术应用研究所，西安 710032

中 文 摘 要

目的：人乳头瘤病毒(HPV)是一种在人群中极易传播的病毒，近年来其感染急剧增多；它不仅能够通过性接触传播，而且还可以依靠其他直接或间接的途径交叉传染，对公众健康危害较大。HPV感染和多种皮肤粘膜增生、息肉、癌前及癌性病变发生发展关系密切。HPV 型别众多，不同型别的致病危害性不同，HPV6、11、16、18、31、33、35、38、58 等型与多种头颈部、消化、呼吸、泌尿及生殖系统的良恶性病变相关，而且某些位点突变能增强其致癌能力。最新研究显示 99% 以上的女性生殖系统最常见的恶性肿瘤宫颈癌患者存在 HPV 感染。宫颈癌恶性程度高，我国是宫颈癌高发区，每年的新增患者达十几万，严重威胁着妇女的健康。宫颈癌的发生发展与 HPV 感染及基因突变密切相关。HPV 不仅危害极大而且其感染不易早期发现，目前尚无经济、有效、易推广的检测方法，因此建立一种实用的基因检测方法对于 HPV 相关恶变疾病的防治有着十分重大的意义。本课题旨在基于模板指

导的染料终止子掺入-荧光偏振检测技术(TDI-FP)建立一种快速、高通量、自动化及低成本的技术平台用于 HPV 感染及相关良恶性病变的临床筛查、早期诊断及预后判断,为 HPV 相关疾病的预警、防治原则的制定提供必须的生物学信息及有临床应用前景的检测技术。

方法: TDI-FP 技术是一种在聚合酶链反应的基础上具备液相探针杂交和碱基掺入三重特异反应的检测新方法,具有极高的特异性和敏感性。在 TDI-FP 技术的基础上分别建立和优化了 HPV 分型检测系统和 HPV16E7 基因 647 位点(第 29 位密码子)突变和人 H-ras 基因 1698 位点(第 12 位密码子)突变检测系统; HPV 分型检测主要针对常见的 HPV6、11、16、18 和 58 型,先用通用引物 GP5+/6+扩增 HPV6、11、16、18 和 58 的 L1 基因区域,然后以 HPV6、11、16、18、58 的型特异性引物,进行探针杂交和荧光素终止子掺入反应,通过荧光偏振检测对扩增产物进行 HPV 分型,同时对 182 例宫颈病变组织临床标本进行了检测应用与验证。在 TDI-FP 分型系统建立优化的基础上于 HPV16 阳性人群标本中用 TDI-FP 点突变检测系统对 HPV16E7 647 位点和人 H-ras 1698 位点突变进行了检测应用,初步验证了基因突变检测对协助进一步确定癌变超高危人群的作用与意义。

结果: 本研究成功建立了具有重复性好、广阔临床应用前景的常见 HPV 分型检测系统和恶变相关基因点突变检测系统。对组织标本能检测出常见的 6、11、16、18 和 58 型 5 种 HPV 的 DNA,能准确地检测出 HPV16E7 647 位和 H-ras 1698 位的点突变。经测序验证一致率达 100%。本研究结果显示 HPV16 和 HPV18 是宫颈癌中的主要型别, HPV16E7 647 位点突变和 H-ras 1698 位突变在不同性质病变中的突变率有明显不同。

结论: 本研究建立的 HPV TDI-FP 分型检测系统和恶变相关点突变检测系统能够运用于对 HPV 感染相关良恶性增生病变高危人群的

筛查，对恶性病变危险度的进一步预警分析，是一种高灵敏度、高特异性、高通量及实用性强的检测系统。本研究结果提示 HPV16E7 基因 647 位点突变可能是恶变的高危因子；同时合并 H-ras 基因第 1698 位点突变可能提示肿瘤的发生；利用该变异检测系统进一步扩大标本量和地区及更多相关基因研究将会为 HPV 感染相关疾病的防治提供更加丰富的信息，为生物治疗、疫苗的研制奠定基础，为相关疾病的早期发现及预警提供高效的技术平台。

关键词 **HPV 分型；基因突变；荧光偏振；预警**

Establishment and Application of HPV Genotyping and Malignant point mutation detection system with TDI-FP

Candidate for master: Chen Zhongcan

Supervisor: Yan Xiaojun

Mentor: Zhang ju

The Institute of Genetic Diagnosis, Fourth Military Medical University

Xi'an 710032, China

Abstract

Objective: Human Papillomavirus(HPV)is a kind of virus apt to spreading in people and its infection rate increases quickly in rescent years.This virus not only can spread through sexual contact but also by direct or indirect ways. HPV infection is closely related with many kinds of skin hyperplasia, polypi, precancerous and cancerous lesions. HPVs are divided into a lot of subtypes. Different HPVs have different risk for diseases. Benign and malignant lesions in head and neck, digestant, respiratory and genital systems have very close relationship with HPV such as HPV6,11,16,18,31,33,35,38 and 58. At the same time certain gene point mutation of HPV can enforce their ability of causing cancer. The latest study indicated that more than 99% female with cervical cancer were infected with HPV. Cervical cancer is a common and high malignant disease among women.The occurrence of cervical cancer is very high in China and about ten thousands new cases of cervical cancer were diagnosed in women, which is a serious risk to women's health. The process of cervical cancer is closely related with HPV and gene mutation. HPV is a heavy risk to people, but not easy to be found in early stage. Therefor,

establishing a practical gene detecting assay is very significant for preventing and therapy of HPV. This study aims to establish a fast, highthroughput, automated and low price technical platform on the base of TDI-FP technology to clinical screening, early diagnosis and provide more biomolecular information and excellent methods.

Methods: TDI-FP technology is a compounded reaction including PCR, probe hybridization and base incorporation with high speciality and sentivity. We estabilished and optimizeed the HPV genotyping and point mutation detecting system of HPV16E7 nt 647(29th codon) and H-ras nt1698(12th codon). The objectives of genotyping are the common HPV6,11,16,18 and 58. Firstly, the L1 gene of HPV6,11,16,18 and 58 were amplified by PCR with consensus GP5+/GP6+ system. And then the PCR product was added with type-specific probe to have a hybridization reaction and terminator incorporation. The special type of HPVs were detected by FP detection. The genotyping system was applied in 182 cervical samples to investigate its characteristic. The samples with HPV16 infection were detected point mutation of HPV16E7 and H-ras genes by the point mutation detecting system on the base of HPV genotyping. We primarily verified the role of gene mutation detection for helping determine super-risk people apt to cancer.

Results: This study sussessfully established the HPV genotyping and malignant point mutation detecting system with good repeatability and large market. The systems can detect common HPV6,11,16,18 and 58 types, and can find the point mutation of HPV16E7 nt647 and H-ras nt 1698. The results were completely coordinate to that of sequencing. The study indicated HPV16 and18 are the prominent types in cervical cancer. The mutation rate of HPV16E7 and H-ras are obviously distinguished from different

lesions.

Conclusion: The detecting system established in the study can be used for screening the high risk people apt to HPV infection and also can be used to predict the risk to malignant lesions, which is considered as a high sensitive, special and high throughput system. This research inferred that HPV16E7 point mutation may be a high risk for malignance. Attching with the H-ras mutation at 1698 would indicate the occurrence of cancer.

With more specimen and area and important genes detected, this detecting system will inform us more influent knowledge related to diseases of HPV.

Keywords: HPV genotyping ; Gene mutation ; FP ; Prediction

前 言

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是一种寄生于鳞状上皮的双链环状小 DNA 病毒, 有严格的嗜上皮性。其感染在一般人群中非常普遍, 除可引起主要性病尖锐湿疣外, 在数种癌症如宫颈癌、肛门及肛周癌、外阴癌、阴茎癌、头颈癌及食道癌等的成因中起重要作用。

目前已发现 100 多型 HPV, 根据其与癌的相关性被分为高危型和低危型。其中 HPV6、11 等常在良性病变如生殖器疣中检出而属低危型。HPV16、18、31、33、35 和 58 因在宫颈癌等恶性病变中多见而属高危型, 由于 HPV 各型在基因序列水平与其生物学行为存在着高度相关性, 不同型别有不同的致病性。因此, 对多种型别 HPV 存在的检测、判断机体感染病毒型别对了解病情、判断预后及指导治疗有重要价值。

事实上最终只有少数 HPV 感染者发展到癌变阶段。原因主要是不同的 HPV 病毒的致病能力存在差异以及不同个体的肿瘤易感性也不同。所以仅有 HPV 感染不足以致癌。不仅不同型别 HPV 感染致病性有差异, 同型病毒内存在的基因变异也会影响其致癌能力。HPV16 是感染率最高的类型, 它存在许多种基因变异 (突变、插入、颠换等形式)。这些变异分别影响其调控、表达, 进而涉及到癌蛋白永生、转化能力和免疫反应、耐药性等方面。研究表明 HPV16E7 癌蛋白质主要作用是影响人视网膜肿瘤抑制蛋白 Rb 而达到转化的目的。其中 HPV16E7 基因的第 647 位碱基 (第 29 位密码子 A→G, Asn→Ser, 天门冬酰胺→丝氨酸) 的突变在亚洲某些国家具有较强的致病性。另一方面人体自身的癌基因和抑癌基因在宫颈癌的发生发展过程中也起着关键的作用。癌基因的激

活和抑癌基因的失活会促进细胞向着肿瘤的方向发展。癌基因中 H-ras 基因突变如最常见的第 1698 位突变(第 12 位密码子 G→T, GGC→GTC, Gly→Val, 甘氨酸→缬氨酸), 存在此突变提示患者易感或可能预示着癌变发生。这些基因变异对于从基因水平早期预测癌变的发生及疾病的预后有重要作用。

宫颈癌是女性生殖系统中最多见的恶性肿瘤之一, 是世界范围内仅次于乳腺癌的第二大妇女杀手, 在一些发展中国家其发病率居妇科肿瘤的第一位。世界上每年新确诊的宫颈癌病例约 50 万。我国每年新确诊的宫颈癌病例数达十几万, 而且呈年轻化的趋势。虽然宫颈癌危害性强, 但若能早期发现, 大部分都可以取得相对满意的治疗效果。因此宫颈癌的早期预警、诊断对于及时发现癌变、进行相应的预防和治疗将提供有价值的信息, 能尽可能地减少疾病给患者和社会带来的痛苦和损失。宫颈癌与 HPV 感染关系十分密切, 目前几乎 100% 的宫颈癌组织中能检测到 HPV 病毒的感染。因此高低危 HPV 病毒的检测可做为宫颈癌早期高危人群筛检的指标。

目前对 HPV 分型方法主要有杂交捕获、Southern 杂交、斑点杂交、狭线杂交、特异型探针、特异引物等, 但由于只能检测到有限数量的基因型、需多重杂交反应、对同一样本中多种基因型检测敏感性不高、需应用多重 PCR、涉及大量 PCR 产物分离及对每例临床标本的多次分析, 故不易常规应用。基因点突变检测方法如 PCR/SSCP、ASO、OLA 和 DNA 芯片技术的敏感性和可靠性也很高, 但这些方法存在着引物设计和反应体系方面要求高或通量低或成本高等限制, 还不能满足现阶段大量临床应用的需

要。

TDI-FP(Template-directed Dye-terminator Incorporation with Fluorescence Polarization detection)即模板指导的染料终止子掺入-荧光偏振检测技术, 是一种在 DNA 模板引导下的引物末端延

伸终止反应，利用荧光偏振检测技术确定特异引物或探针与靶 DNA 的杂交及在靶 DNA 中特定位置的掺入的硷基，从而判断基因型别。反应包含靶序列的 DNA 样品为模板的预扩增，剩余引物和 ddNTP 的消化。然后以此 DNA 扩增产物为模板，以未经特殊修饰的 3' 端紧邻待测位点上游的 20-40 个硷基的特殊引物或寡核苷酸探针及不同荧光标记的 ddNTP 为底物，再次在高严谨性条件下以高保真性 DNA 聚合酶行 PCR 反应，如模板中含有与引物互补序列，则两者之间互相识别而互补杂交，存在相应的 ddNTP 时则进一步延伸，游离的荧光标记 ddNTP 掺入，FP 值增加；反之，无引物与模板中序列互补杂交，更无延伸反应及 FP 值增加。TDI-FP 技术具有高灵敏度、高特异性及高通量等优点。

本研究课题拟建立高通量、快速、低成本的常见 HPV 分型和基因点突变检测系统，通过 TDI-FP HPV 分型系统对 HPV 感染进行分型，在此基础上再用点突变检测系统对 HPV16 阳性标本中的 E7 647 位点、H-ras 1698 位点突变进行检测，进一步确定高危人群，并初步探讨了 HPV16E7、H-ras 基因突变作为分子标记对于恶性病变预警、辅助诊断、防治原则的制定、判断疗效及预后的临床价值。为进一步确定超高危人群，及时采取防治措施提供分子水平依据。

文献回顾

— HPV 的研究进展

1 HPV 的分子生物学特性

1.1 HPV 基因组结构与功能

HPV 基因组结构: HPV 为乳多空病毒科 A 属成员, 无包膜, 体积小, 直径约 50~55nm, 呈 20 面体对称, 具有 72 个壳体, 包括主要衣壳蛋白 L1 与次要衣壳蛋白 L2, 每个壳体由 L1 5 聚体构成^[1]。病毒组成中 L1 蛋白占病毒粒衣壳蛋白总量的 80%以上, 而 L2 蛋白约仅有 12 拷贝^[2]。HPV 基因组是一个双链共价闭环 DNA, 长约 7.9kb。所有开放读框 (open reading frame, ORF) 由一条 DNA 链编码^[3], 且几个基因的读框有部分重叠。根据 HPV 基因组的功能可分为三个部分 (图 1): (1) 非编码区 (non-coding region, NCR), 又叫长控制区 (long control region, LCR) 或上游调节区 (upper regulatory region, URR), 其全长约 400bp~1000bp, 含有 p97 核心启动子、增强子和静息子序列, 以及 E2 结合位点等, 通过控制 ORF 的转录来调节 DNA 的复制^[4]。将不同型 HPV (如 HPV1、6b、7、11、18、16)、牛乳头瘤病毒和兔乳头瘤病毒的 NCR 插入到增强子检测质粒中, 发现有增强子活性。将 HPV6b 基因组上游 NCR 540bp 的 Sau 3A-NarI 片段插入 β -干扰素 (IFN) 表达载体 Trp 启动子上游可使 β -IFN 表达明显增强。NCR 的变异较大, 甚至在密切相关的型别之间也存在差异^[5]。(2) 早期区 (early region, ER) 全长约 4kb, 编码 E1、E2、E4、E5、E6、E7 等 ORF, 主要在感染早期表达, 功能主要与 DNA 复制、转录调节和细胞转化相关。只是 E4 基因与转化并无直接联系, 而是在病毒感染的晚期才表达。(3) 晚期区也称 L (late region, LR) 区, 约 3kb, 含两个主要 ORF, 称为 L1、L2, 编码病毒自身结构

蛋白，在病毒感染的晚期表达，主要参与病毒衣壳的形成。

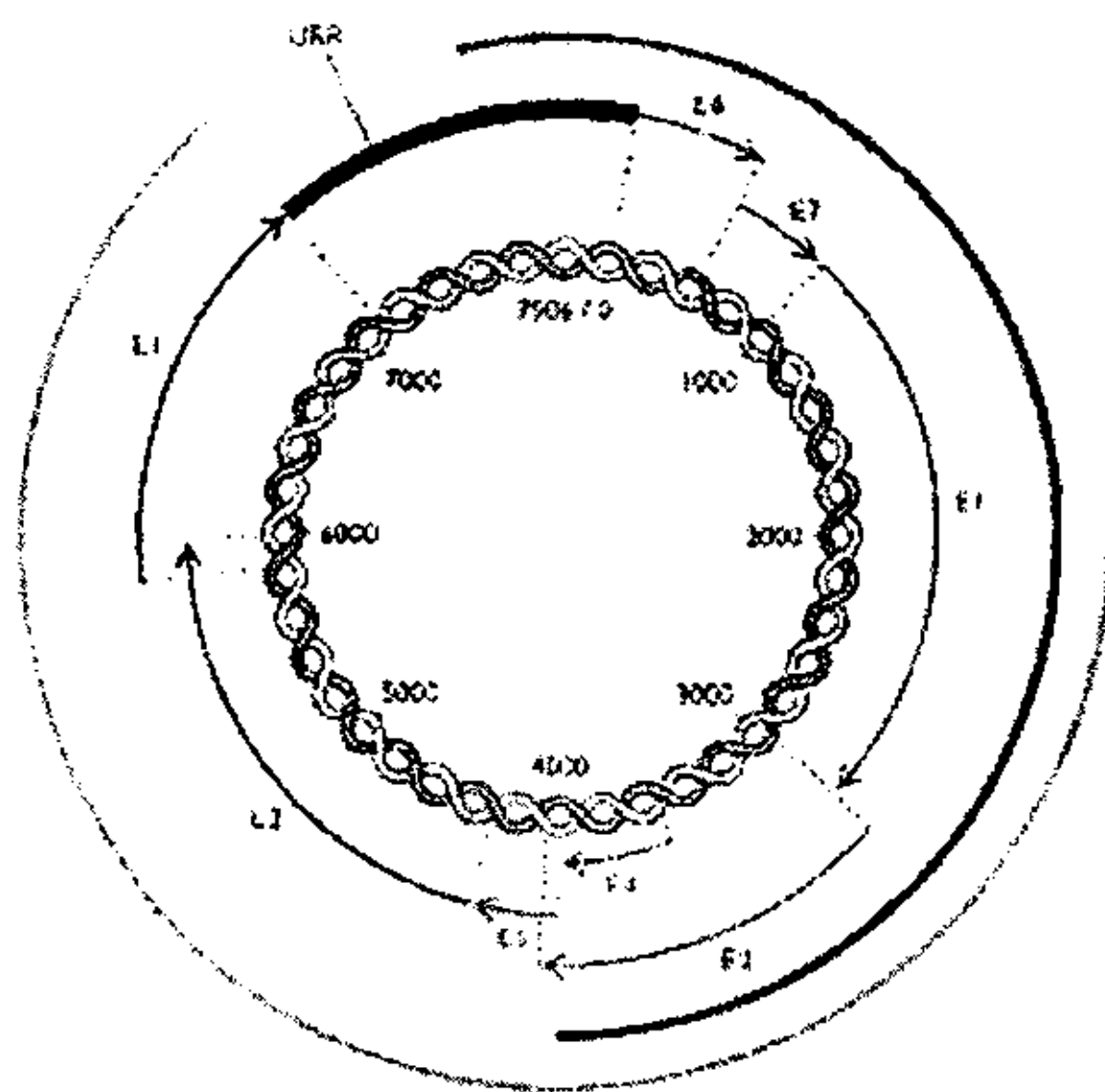


图1 HPV基因组结构示意图

HPV 基因组功能：

E1和E2基因编码HPV的重要调节蛋白：E1和E2蛋白，这两种蛋白对病毒DNA的复制和病毒的感染很重要。E1是一70 ~ 80 kD的蛋白，完整的E1蛋白是磷酸化的核蛋白，具有DNA依赖的ATP酶和DNA螺旋酶活性，并含有DNA结合域、E2蛋白结合域和催化结构域^[6]，可以与ATP、DNA复制起始点富含AT序列的部位结合，并能结合完整的E2蛋白，增强病毒转录，同时E1与E2的结合还增强了E1与DNA复制起始点的亲和力^[7]。E1蛋白可促进E2蛋白与LCR的结合，而E2蛋白则通过与NCR的E2结合位点结合来抑制病毒转录。

E2与NCR结合可以抑制E6和E7转录，而E6、E7蛋白对宿主DNA合成有重要作用。E2蛋白是磷酸化蛋白，包括3个功能域：具有反式激活作用的N端长约220氨基酸，二聚体时具有DNA结合功能的C端约含90个氨基酸，二者之间为铰链区。在NCR内存在

多个回文顺序^[8]，侧翼有E6、E7主要启动子的TATA盒和剪接子。E2蛋白与NCR回文结构结合可阻碍转录因子IID或RNA聚合酶II与TATA盒的结合，从而抑制E6、E7的转录。某些情况下，还可启动早期mRNA合成向晚期mRNA合成转化，导致衣壳蛋白的大量合成^[9]。恶变的细胞中病毒常整合入宿主细胞染色体，使E1/E2基因断裂或缺失，使E1/E2蛋白不表达，从而失去对E6、E7基因转录的抑制^[10]。

E4蛋白主要与病毒颗粒的成熟和释放有关。E4 ORF全部位于E2 ORF内，常缺少起始密码子，通过转录产物的拼接得以表达。E4蛋白大量存在于细胞胞质，因此最初是在表皮角质形成细胞胞质中发现的E4蛋白。HPV1中E4基因是由晚期启动子启动表达的^[11]。因此有人认为E4并不是一个真正的“早期”基因，而属“晚期”基因。

高危型HPV的E5、E6、E7可以引起细胞转化。对很多肿瘤标本及HPV阳性细胞株研究都发现有E6、E7 ORF的转录产物，E6、E7 ORF在诱导肿瘤发生及持续发展中起重要作用，其编码的蛋白是病毒的主要转化蛋白。

E5 ORF编码一种细胞转化蛋白，在乳头瘤病毒的ORF中保守性很强，但常缺少起始密码子。它是迄今为止发现的最小的转化蛋白，通过与表皮生长因子受体、 β 血小板生长因子受体及集落刺激因子受体I形成复合体而刺激细胞生长^[12]。最近发现，E5还可阻止DNA损伤后细胞的凋亡。E6 ORF编码一种16~19kD的细胞转化蛋白。高危型HPV中，如HPV16，E6和E7蛋白是宿主一鳞状上皮细胞一永生化所必需的^[13]。现已证明高危型HPV E6基因产物可与P53结合形成复合物并促使P53降解^[14]。E7 ORF编码一10~14kD的细胞转化蛋白，是一个与锌结合的核磷蛋白，能与pRb、p107和p130结合^[15]，导致这些蛋白质的灭活。

晚期区L1、L2 ORF编码主要壳蛋白L1和次要壳蛋白L2。

L1 具有属特异性, L2 具有型特异性。在真核细胞内表达的 L1-L2 或 L1 结构蛋白能够自我组装成病毒样颗粒 (Virus-like particle, VLP)^[16]。VLPs 在立体结构以及抗原性方面都与乳头瘤病毒相似, 并具备诱导高浓度和高亲和力中和抗体的表位。和病毒不同的是, VLPs 不包含 HPV 的致癌 DNA, 所以它的安全性有保障。大量动物模型表明由乳头瘤病毒结构蛋白 L1 和 (或) L2 组成的预防性疫苗能够独立地保护接种动物免受病毒的感染, 如 Breitburd 等^[17]用来自美洲棉尾兔乳头瘤病毒的 VLPs 作为疫苗接种家兔, 结果使家兔免受乳头瘤病毒的皮肤感染, VLPs 同样也能有效地防止粘膜的乳头瘤病毒感染^[18]。

1.2 HPV 感染的流行病学

因为大部分患者的 HPV 感染无临床症状或为亚临床感染, 所以其感染很难作为一个普通临床疾病通过调查而被发现, 因此要准确估计 HPV 感染率还较为困难。但 HPV 感染流行病学资料表明其感染相当普遍, 一半以上的性活跃人群可能存在一型或多型 HPV 感染, 且感染率呈明显上升趋势。在欧洲 HPV 引起的生殖器疣的发生率在 0.6%~3.0% 之间^[19,20]。

HPV 类型的分布虽然有地区差异性, 但世界各国宫颈癌组织中 HPV16 型感染占绝对优势, 大约在 50%^[21]。低危型 HPV 感染, 以 HPV6 和 11 为主, 主要引起尖锐湿疣等皮肤粘膜的良性增生; 高危型 HPV 感染以 HPV16 和 HPV18 为主, 主要与人头颈部、消化、呼吸、泌尿及生殖系统的恶性肿瘤的发生密切相关。

生殖道部位的 HPV 感染主要是通过性接触传播; 生殖器以外的 HPV 感染可以通过很小的皮肤破损和病变部位的直接接触或者与污染物的间接接触而传染。John Cason 等^[22]通过连续观察发现人乳头瘤病毒还可以通过母婴垂直传播。

1.3 HPV 的型别与致病性

人类是 HPV 的特异宿主, 据 HPV DNA 序列的差异, 已鉴定出 100 多型 HPV^[23]。新 HPV 型别命名的原则是: HPV DNA 与其它任何已知 HPV 的 E6、E7、L1 开放读框区基因序列的同源性小于 90%^[24]; 如果与某一已知 HPV 的同源性在 90%~98%, 则被命名为相应 HPV 的亚型; 若同源性大于 98%, 则称为该型的变异株(variant)。

HPV 主要感染皮肤基底细胞和空腔脏器粘膜细胞, 分为皮肤型和粘膜型。皮肤型具有嗜表皮性, 主要感染手足皮肤; 粘膜型可感染口咽、呼吸道粘膜及肛门生殖器的上皮。根据 HPV 的致病性, 分为高危型和低危型。高危型包括 HPV16、18、31、33、34、35、39、45、51、52、56、58、59 和 66 等, 主要存在于宫颈癌、头颈癌和其它的肛门生殖癌; 低危型主要包括 HPV6、11、42、43 等, 多见于生殖器疣等良性增生病变^[23]。

多数 HPV 感染是无症状的潜伏感染。临床上 HPV 感染的明显病变常发生于感染后的 3 周至 8 月内, 而发生恶性转化则一般需数年至数十年。HPV 与人类多种疾病相关, 病变与其型别有密切关系^[23]。

虽然 HPV 感染在一般人群也很普遍, 但大约 80% 的妇女的高危型 HPV 感染是暂时的, 病毒可在 6~8 月内被清除, 尽管有少部分妇女可发生 CIN, 但也会随着病毒的清除而病变消失^[25]。只有 20% 高危型 HPV 感染可持续存在, 约经过 10~15 年的时间才会导致宫颈癌的发生^[26]。HPV 感染的高峰年龄在 18~30 岁, 宫颈癌在 35 岁以上的妇女中多见^[23]。近年来有逐步年轻化趋势。尽管 90%~98% 宫颈癌可归于 HPV 感染^[27], 但高危型 HPV 感染后, 少部分人经过相当长的时间才发生宫颈癌提示除了宫颈癌的发生还需其它的作用因素。

高危型 HPV E6 和 E7 蛋白通过结合和失活肿瘤抑制蛋白、细胞

周期素、CDK等一系列细胞蛋白，导致细胞周期调节紊乱。E6能结合p53并加速细胞经泛素介导的p53降解。E7蛋白能够与Rb家族成员结合，解离pRb与细胞转录因子E2F-1形成的复合体，释放E2F-1因子，而E2F-1能够诱导细胞进入S期所需的基因的转录。最终导致细胞DNA合成，细胞增生。E5蛋白可增强有丝分裂原活化蛋白激酶的活性，增加细胞对生长和分化因子的反应。总之，高危型HPV的转化蛋白作用于宿主细胞，使宿主DNA损伤不能正常修复，使突变累积，激活端粒酶活性等导致宿主细胞的癌变^[23]。E6与E7作用的细胞蛋白和引发的细胞变化见表1^[28]。

表1 高危型HPV E6、E7蛋白的主要作用

病毒癌蛋白	所结合的细胞蛋白	对细胞的作用
E6	p53	细胞永生化
	E6相关蛋白(E6-AP)	与E6-AP结合导致特异性宿主细胞蛋白的降解（如p53）
	ERC55	抗凋亡
	hDLG	染色体不稳定性
	Paxillin	增强外源DNA的整合和致突变作用
	干扰素调节因子3	作用
	Bak	激活端粒酶
	E6TP1	阻断干扰素的功能
E7	Rb	细胞永生化
	Rb相关 pocket蛋白	活化周期素E、A
	E2F/周期素A复合体	失活Rb相关 pocket蛋白
	组蛋白H1激酶	诱导凋亡
	TATA盒结合蛋白	抑制CDK抑制蛋白
	周期素E	增强外源DNA的整合和致突变作用
	ATP S4亚单位	作用
	c-jun	降解酪氨酸激酶Btk
	hTid-1	
	Mi2	
	M2丙酮酸激酶	
	p48	

1.4 HPV 检测方法

目前 HPV 无法体外培养,血清学也只能检测病毒抗体,无法确定病毒及其型别。对 HPV 感染的诊断主要依赖分子生物学手段对病毒进行检测。杂交捕获 II 代方法(Hybrid Capture II, HC II)是目前唯一获 FDA 批准用于检测 HPV DNA 的方法,已用于临床诊断实验室中。PCR 方法因具有高敏感性和特异性,也被许多实验室用于 HPV 研究之中。

1.4.1 HC II

HC II 方法是抗体捕获-液体杂交-信号放大的过程,采用化学发光定性检测 HPV DNA。首先获取标本细胞,置于溶液中使其释放 DNA,将 DNA 变性后与特异的 RNA 探针在缓冲液中杂交。RNA 探针分两组,一组识别低危型 HPV: 6、11、42、43 和 44,另一组识别高危型 HPV: 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 和 68。标本中的 HPV DNA 与 RNA 探针杂交形成 DNA-RNA 复合物被单克隆抗体结合固定于微孔板内,再被偶联有碱性磷酸酶的抗 DNA-RNA 抗体识别,洗脱后加入化学发光底物,在碱性磷酸酶的作用下产生发光反应,发出的光可被测光仪检测^[23]。但该方法不能区分同组中具体的 HPV 型别。有些低危型 HPV 如 6、42 可以与高危型探针杂交,对于 HPV6 和 42 含量较高的标本(>4ng/ml),两组探针检测都可以出现阳性结果;两组探针之间及与宫颈标本中可能存在的细菌质粒存在一定的交叉反应,可导致假阳性结果。其假阴性率在 1.1%~7.5%,病毒含量低、取样不当或标本中存在干扰因素时易出现假阴性^[3]。

1.4.2 型特异性 PCR

型特异性 PCR 方法的基础是各型 HPV 在 E6、E7 基因序列中的差异。针对 14 种高危型 HPV (HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、6 和 68) 的型特异性 PCR 扩增的靶基因是 E7 基因,约 100bp^[61],由于需要在每一份标本中将

HPV 常见基因型逐个筛选才能最后确定感染 HPV 的型别，须进行较多的 PCR 反应，因此主要用于研究领域。

1.4.3 通用引物 PCR

因为通用引物能够通过一次 PCR 即可检测到多型 HPV，而且通过对扩增产物中目的片段的测序、RFLP 分析^[29]和型特异性探针杂交，如斑点杂交^[30]、ELISA^[31]、EIA^[32]、狭线杂交^[33]等方法进行 HPV 基因分型检测，因此具有更广泛用途。

多数通用引物是针对 L1 基因内保守性序列设计的，至今应用最多的三套系统是 MY09/11、GP5+/6+ 和 SPF1/2。其中引物 GP5+/6+ 的目的片段位于 MY09/11 目的片段之内，三种通用引物系统的目的片段的长度及其在 HPV L1 基因内的位置如图 2 所示。

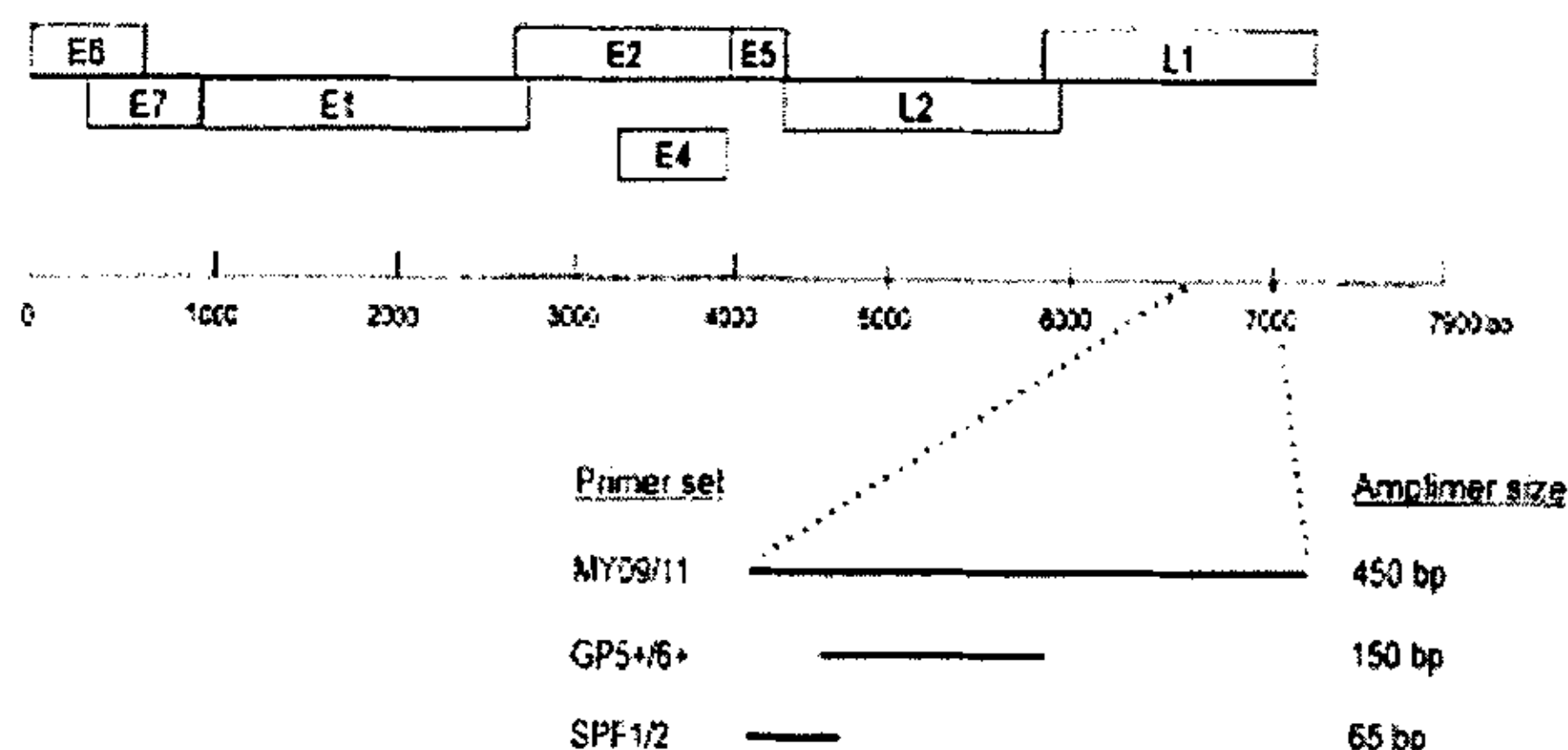


图2 MY09/11、GP5+/6+ 和 SPF1/2 通用引物 PCR 目的片段在 HPV L1 基因内的位置及长度

1.4.5 原位杂交

原位杂交 (in situ hybridization) 是用 DNA 或 RNA 探针来检测另一条互补链在细菌或其它真核细胞中的位置。该方法分辨率强、灵敏度及特异性高，用标记探针或染色体的荧光显色，直接观察细胞中或染色体上的 DNA 序列的有无或相互位置关系。

原位杂交方法可以在细胞内将 HPV 的 DNA 序列定位，同时仍保留了组织细胞的形态学特征，所以可以同时检测和疾病相关

的形态学改变。原位杂交的靶序列可以是未经扩增的,也可以是经过扩增或信号放大的。检测 HPV 的探针多采用非同位素标记,酶学的方法因结果易于判断而优于荧光检测方法。原位杂交检测根据信号的特点,可以判断 HPV DNA 是游离形式还是整合形式,信号强度则可反映病毒的拷贝数量。靶序列扩增或信号放大的酶联免疫原位杂交,用亮视野显微镜可以高灵敏地检测到低拷贝的 HPV 序列。法国 Dako 生产的 GenPiont 是一种自动化、催化信号放大系统,探针由生物素标记,使用免疫组化方法在福尔马林、石蜡包埋的组织切片中检测 HPV,烤片、脱蜡及复染等可自动化,能检测到每个细胞少至 1~2 拷贝的靶序列,临床应用较广^[34]。

1.4.6 生物芯片技术

近年来生物芯片技术的发展为检测 HPV 提供了技术支持,TS Hwang 等用可以检测 15 种高危型 HPV(HPV 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 和 69)和 7 种低危型 HPV(HPV 6、11、34、40、42、43 和 44)的寡核苷酸芯片与可以检测 7 种高危型 HPV(HPV 16、18、31、33、35、52 和 58)的 PCR-RFLP 方法比较,发现二者具有良好的可比性,这无疑为 HPV DNA 的检测提供了新的策略^[35]。

总之, HPV 在标本中的确认,取决于所用的方法。上述的各种系统能够检测 HPV,但由于各方法的局限性和特殊要求,不同系统对不同临床标本、不同型 HPV 有不同的敏感性,无法满足在临床检测中短时间内、高通量地获得 HPV 病毒与机体反应的大量相关信息。由于方法上的限制,无法早期明确诊断,导致目前对该类病毒感染相关疾病的诊断、预后判断和治疗的应用均存在相当的滞后和盲目。因此迫切需要开发一种快速、可靠、敏感、特异和低成本的检测方法,以明确患者感染 HPV 型别及机体反应,获得更全面、准确的信息,用于指导患者治疗,监测、预警患者的病情发展。

二 宫颈癌的研究进展

1 宫颈癌的危害性

宫颈癌是全球妇女中仅次于乳腺癌的第二位最常见的恶性肿瘤，占有所有妇女恶性肿瘤的12%^[36]。每年全世界新增宫颈癌约50万例，所有患者的5年生存率为44%~66%^[37]。在许多发展中国家其发病率居第一位^[23]。我国每年新发病例近15万，占发展中国家的1/3，而且发病趋向显著年轻化。

2 宫颈癌病因学研究

宫颈管的粘膜为高柱状上皮，阴道内的子宫颈表面为复层鳞状上皮。多数宫颈癌发生于鳞状上皮和柱状上皮交界的移行区，该处的上皮未完全成熟，随女性激素水平的变化而移行，此时对病毒感染等外界侵害更敏感而易发生癌前病变或癌变。

宫颈癌的致病相关因素包括性生活开始早、性病史、性伴侣数和 HPV 感染等有关；接受免疫抑制剂和 HIV 阳性患者也是患宫颈癌的高危人群。吸烟则是一个独立的危险因素^[38]。

遗传背景对宫颈癌发生也有影响，有研究提示 HPV16 或 18 阳性的宫颈癌与人类白细胞抗原 (HLA) 具有相关性，如 HLA-DQB1*03(DQ3)的妇女患宫颈癌或癌前病变的风险增高^[39]，HLA-B7 患者的宫颈癌更具侵袭性，预后更差。对 HPV16 阳性的宫颈癌患者的研究发现，HLA-B7 和 HLA-DQB1*0302 与宫颈癌成正相关，而 HLA-DRB1*1501、DQB1*0602 和 DRB1*13 则与宫颈癌成负相关^[40]。p53 第 72 位密码子具有多态性，许多研究认为宫颈癌中该处为精氨酸纯合子时的 p53 更易被 HPV16 E6 降解，但其它的研究结果并不完全支持此结论^[41,42]。

国内外研究都表明 HPV 感染尤其是高危 HPV 感染是宫颈癌发生发展关系最密切的致病因子。1995 年 WHO 国际癌症研究中心

将HPV16和18确定为人类的致癌原^[43]。因此HPV作为宫颈癌的病因之一其作用是直接和确定的。

3 宫颈癌的诊断学

3.1 传统的细胞学普查方法

1941年Papanicolaou与Traut创立了宫颈脱落细胞学检查方法, 又称巴氏涂片(Pap smear)检查, 主要用来检查宫颈鳞、柱状上皮交界处的宫颈移行区细胞变化。长期临床实践证明该方法具有简便易行、经济有效和重复性好等特点, 至今仍是妇科常规检查和宫颈癌普查中的首选初筛方法和必查项目。应用以来宫颈癌的发生率和死亡率减少了1/2~2/3^[44]。

但长期应用发现巴氏涂片有一定的局限性。主要是假阴性率高达20%~30%。准确率易受取材、涂片制作质量、血液、细菌、真菌污染及阅片技术等因素影响。

近年来采用单层细胞学检查(Monolayer cytology)新技术降低了巴氏涂片的假阴性率。脱落细胞收集方法上的改进, 使细胞量几乎是原采集方法的两倍; 采用细胞学实验室自动化制片, 避免了人工涂片的不稳定性。

细胞学检查分级报告形式也在不断的变化中。长期以来国内外大多沿用1954年Papanicolaou建立的五级分类法(巴氏分类法), 将细胞异常度分为五级: 轻、中、重度不典型增生、原位癌和癌^[45]。随着细胞病理学的进展已逐渐不适应疾病诊断和临床要求。

1973年Richard建立了CIN分类方法, 将宫颈不典型增生统称为宫颈上皮内瘤变(CIN), 分为I~III级, 认为宫颈癌的发生顺序是由CIN I 逐渐进展至原位癌^[46]。但随着对宫颈不典型增生研究的深入, 发现1%的CIN I 与5%的CIN II 可直接进展为宫颈癌, 未治疗的CIN III进展为宫颈浸润癌的危险性>12%。

1988年美国国立癌症研究所提出了Bethesda系统TBS报告方式, 并于1991、1999和2001年三次修订完善^[47]。该法主要强

调图片质量、统一的描述性诊断及临床与病理的相互联系，并引进了鳞状上皮内病变(squamous intraepithelial lesion, SIL)的概念。2001年版的 Bethesda 系统把细胞异常分为4类：ASC(不典型鳞状细胞)、LSIL(低度鳞状上皮内病变)、HSIL(重度鳞状上皮内病变)和鳞癌。ASC 又分为两类：ASC-US(重要性未定的不典型鳞状细胞)和 ASC-H(不典型鳞状细胞，不排除 HSIL)。HSIL 包括低、重度宫颈上皮不典型增生和原位癌。有些 HSIL 病例怀疑有癌浸润，但又不能确定，则报告为 HSIL, 细胞特征疑有癌浸润。

3.2 宫颈癌普查与 HPV DNA 检测

虽然应用巴氏脱落细胞普查使宫颈癌的发病率有所下降，但细胞学改变的患者50%已存在浸润性宫颈癌，而且50%的浸润癌发生于定期接受细胞学涂片筛查的妇女^[48]。宫颈癌的发生要经过不典型增生→原位癌→早期浸润癌→浸润癌一系列渐进的病理变化，约需10~15年。一般认为患者在较为年轻的时候发生高危型HPV感染，病毒未被机体清除转为持续感染，与其它协同因子一同启动细胞转化，导致病变向癌症方向缓慢进展。因此宫颈癌是可通过早期诊断，早期治疗高危型HPV感染来预防的一种特殊癌症。HPV DNA的检测在临床上具有重要作用：

(1)帮助确定涂片结果意义不甚明确如重要性未定的不典型腺细胞妇女的危险性，鉴定潜在的CIN II 和CIN III^[49,50]，指导临床处理。大多数妇女的 ASCUS 为良性的反应性变化，只有10%~20%ASCUS可能有潜在的LSIL和HSIL。高危型HPV DNA检测可帮助判断ASCUS的危险性，避免不必要的阴道镜检查。如果 HPV DNA 阳性，则行阴道镜检查，如果阴性，则6~12个月复查巴氏涂片，仍为阴性，则可转入常规的定期普查。帮助确定巴氏涂片临界或轻度异常，半年后可复查来预判这种临界或轻度异常的妇女进一步发展的危险性^[25,51]。

(2) 帮助检出残存或复发的 CIN 病变^[52]。

(3) 作为宫颈癌普查的有效补充手段, 提高现有细胞学筛查的敏感性和有效性。Petry 等对数千德国妇女普查发现, HPV HC II 检测的灵敏度明大大高于常规细胞学检测^[53]。若 HPV 阴性, 即巴氏涂片结果阳性, 也可排除潜在高度宫颈上皮内病变的危险, 涂片阴性却不能排除这种危险。Witt 等^[54]的研究中细胞学检查与 HPV DNA 相结合, 检测病变的灵敏度达 99.0%。

(4) 提前预警宫颈恶变的发生。HPV 检测较传统的细胞学等形态学检查的优点是其对细胞学正常或轻度损害患者未来发展的预言、预警作用, 并可能使得临床对 HPV 阴性而细胞学低度损害妇女的检查次数减少或延长检查间隔期。一项历时 36 个月的研究发现^[55], 持续携带 HPV 强烈指示感染者处于继发癌前病变的高度危险中。瑞士 Wallin 在细胞学正常的涂片中发现高危型 HPV DNA, 提前 26 年预警了同样病毒感染的浸润性宫颈癌的发生^[56]。HPV 感染的追踪调查对确定延长 HPV 感染阴性妇女的普查间期, 取消 60 岁以上 HPV 阴性的老年妇女筛查的可能性极为重要。

如上所述 HPV 检测用于宫颈癌初筛有许多优点: 灵敏度比巴氏涂片高; 阴性预测值更高; 判断 LSIL 或临界异常妇女预后并指导处理; 预警癌和癌前病变; 技术要求比细胞学方法低等。所以有理由相信 HPV 检测可补充或替代传统细胞学检查。

但细胞学普查时如果再行 HPV 检测, 无疑会增加医疗费用。所以开发成本低的 HPV 病毒检测方法对于宫颈癌普查非常必要。

总之, HPV 检测对于建立全面、经济的筛查及防治策略是必要的。美国 FDA 已于 2003 年 3 月宣布, 批准将 HPV DNA 检测与巴氏涂片联合用于 30 岁以上妇女宫颈癌常规筛查。

目前由于在我国人们对 HPV 感染的知识了解有限, 尚未充分认识到 HPV 感染的危险性。并且许多人对 HPV 相关疾病存在着偏见, 使某些妇女不愿参加筛查。因此大众的接受与否, 是开展 HPV 常规检测的重要因素。

三 基因变异与宫颈癌

1 HPV 变异与宫颈癌

HPV 感染对于宫颈病变的形成是必要的, 但只有一部分病变发展为癌变。除了 HPV 型别的致癌能力不同之外, 其它因素可能提高了恶变的机会。型内基因变异已被报导与病毒持续和许多宫颈疾病有关^[57,58]。因为高危型 HPV 感染与宫颈癌的密切关系, 所以目前研究较多的是 HPV16、18、58 等的变异。

2.1.1 HPV16 的基因变异

HPV16 的变异主要位于 E6、E7, 其次是 E2、LCR 部位。目前研究认为 E6 和 E7 都与转化相关, E6 蛋白降解抑癌蛋白 p53, E7 主要是破坏 Rb 蛋白。一些研究结果表明 HPV16E6 第 350T/G 突变(L83V)单独或与其它突变联合似乎不仅预示着 CIN I 向 CIN III 发展还提示 CIN III 向 ICC 的转变。氨基酸改变不仅使 E6 的生物学活性改变而且使其更容易逃脱免疫监视。HPV16E6 350T/G 突变在欧洲最常见, 而在亚洲很少发生。Londesborough 等 1996 研究发现该突变与病毒持续感染和癌前病变的有关, 但后一现象却存在人群差异性, 在瑞典人中 350G 变异体代表宫颈癌的一种高危因子, 而意大利人中则却表现为低危因子, 德国人中也与高危无关, 这可能与人种之间的差异有关^[59,60]。另外如果将癌症的病例与人白细胞抗原 (HLA) 单体型联系起来和早期的研究共同考虑, HPV16E6 变异在不同人群的 CIN 与 ICC 中的分布是不同的。这些资料表明宿主遗传因素, 比如 HLA 多态性, 可能决定了 HPV16E6 L83V 变异的潜在致癌性。

HPV16E7 基因的变异也是研究的热点。以前的研究表明在肾细胞系中 HPV16E7 基因编码产物主要有转化活性。在这项研究中得到了一系列的影响 HPV16E7 区的点突变, 这些突变和腺病毒 E1a 保守区 (CD)1 有同源性。细胞系转化必需的 E7 基因独立区域一个在和 E1a CD2 与 LT 相似的 E7 区, 负责 Rb 结合和 DNA 合成。

另一个重要区域, 在 E7 蛋白的 N 端。最近的研究表明, E7 通过 26S 蛋白酶体途径降解 Rb。韩国一项评估突变与宫颈癌关系的研究中用巢式 PCR 及 PCR 定向测序的方法发现 60% 的 HPV16E7 阳性标本存在 647 位 (A→G, Asn→Ser) 的单核苷酸改变。第二种最常见的变异体有三个沉默突变 732 (T→C), 789 (T→C) 和 795 (T→G)。韩国人中这种最常见的 647 位 (A→G, Asn→Ser) 改变影响与强抗原性有关的氨基酸及结合 Rb 蛋白质的氨基酸序列。统计学上显示该突变在癌变中比非癌变中更常见。研究提示自然发生的 HPV16E7 的序列变异可能有不同的致癌特性^[61,62]。

HPV 的 LCR 和 E2 蛋白是调控病毒癌基因 E6 与 E7 转录的最重要的病毒序列。其基因改变可能会影响病毒的致癌能力^[63]。

HPV16E2 变异: 一些实验显示 E2 表达水平与 E7 癌蛋白表达水平之间存在相反的关系, 体外实验表明调控 E6/E7 癌基因转录的 HPV16, 18 启动子 (分别是 P97 和 P105) 自身被病毒 E2 蛋白来调控^[64]。但是, 经分析 HPV16E2 区明显在高度病变中更常见, E2 DNA 结合结构域的 3684C/A 突变明显和高度癌变组织有关。说明该 HPV16E2 变异在向高度上皮内病变的发展中有重要作用^[65]。

HPV16 的晚期基因 L 的上游调控区部分有一 78bp 的启动子 (nt 4118-4196) 对于晚期蛋白的表达很重要。实验表明该部位的突变比其它部位常见, 而且可能和癌症进展有关^[66]。在韩国妇女中 HPV16 URR 区的突变 G→A 在 nt7520, A→C 在 nt7729, 和 G→A 在 nt7841。这些在韩国宫颈癌病人中游离 HPV16 URR YY1 点部位的突变在宫颈癌进展中起相应的整合作用^[67]。

2.1.2 HPV18 与 58 的变异

HPV18 基因结构经常发生改变, 特别是 E1 或 E2 基因的删除, 可能和 HPV18 阳性宫颈癌的侵袭性有关。但明确的突变位点很少。

HPV58 是近来研究相对较多的高危型。香港人中高危 HPV58

型的 E7 632C→T(T20I)和 760G→A(G63S)两突变与 CIN 程度正相关,伴有 HPV58(T20I/G63S)的 CIN III 或 ICC 病人明显较其它人群年轻。提示伴有 HPV58(T20I/G63S)的病人患宫颈癌的危险性较高^[68]。

2.2 癌基因变异与宫颈癌

由于宫颈癌中发生癌基因与抑癌基因突变的事件相对其它种类的肿瘤来说不是很常见,因此目前大多数还处于研究阶段。已确定的点突变主要有 ras 基因、p53 基因等,其次还有 FITH 基因的变异^[69]。细胞原癌基因在细胞增殖调控中起着核心作用,发生改变的癌基因活性主要与许多恶性及恶变前病变相关^[70]。这里主要介绍 ras 基因。

癌基因 ras 家族活化是某些肿瘤发生的分子基础。ras 家族包括 Harvey(H)-ras, Kirsten(K)-ras 和 Neuroblastoma(N)-ras 基因,分别定位在人的第 11、12 和 1 号染色体上^[71]。这些 ras 基因因有类似的结构而可能来源于一个共同的祖先基因。ras 基因包括 4 个外显子编码区,编码一 21kDa 的 p21 蛋白,定位于细胞内膜,参与鸟嘌呤三磷酸(GTP)的结合,并具有 GTP 酶活性^[72]。ras 蛋白与 G-蛋白功能与结构相似性提示其正常蛋白参与细胞外信号转导及细胞分化。当机体发生肿瘤时,编码 p21 蛋白的第 12、13 及 61 位氨基酸的核苷酸可以发生点突变,突变型的 p21 蛋白不具有 GTP 酶活化,失去了降解 GTP 的功能,从而使磷酸脂酶 C 持续活化,产生大量 IP3 和 DG,引细胞过度增殖,最终发生癌变。ras 癌基因广泛参与的人类癌症包括结肠、前列腺、胰腺、肺、膀胱、乳腺和卵巢等组织^[73]。因此对肿瘤细胞 ras 基因点突变的检测一直是人们所研究的热点。

国内外很多研究都提示 ras 基因突变与肿瘤密切相关。我国一项关于胃癌的研究发现肿瘤侵及浆膜者的 H-ras 基因突变率显著高于未侵及浆膜者;有淋巴结转移者的突变率明显高于无淋巴

结转移者；III、IV期胃癌患者显著高于I、II期患者，与国际上关于肿瘤浸润和转移的分子机制研究结果相一致。胃癌患者随访观察发现无H-ras突变组术后5年存活率明显高于H-ras基因有突变者。检测胃癌组织H-ras点突变不仅有助于了解胃癌某些分子生物学行为还有可能成为判断胃癌患者预后的有用指标^[74]。

目前有关ras基因突变在宫颈肿瘤形成中的作用研究结果不尽一致。Wong等^[75]发现鳞状细胞癌中ras基因突变发生率为35%，而且大部分是12位密码子(96%)。Lee等^[76]注意到宫颈腺癌中ras突变的频率高于鳞状细胞癌。Sagae等^[77]研究提示ras p21蛋白过表达的宫颈癌患者预后较差。一项实验对ras基因家族的三个基因H-ras、K-ras和N-ras的12、13、61密码子分别进行了研究，在33例宫颈癌中发现了8例ras突变，而且都是61位密码子突变。这项研究结果与其它宫颈癌标本中的ras结果相一致。认为ras点突变在宫颈癌中起一定的作用^[78]。而其他的研究却是相反的结论，Le^[79]等检测了72例不同宫颈上皮内瘤变没有发现H-ras 12位密码子基因突变。Koulos等^[80]发现只有12%的肿瘤中发生K-ras突变，提示在腺癌与鳞状细胞癌中H与K-ras基因的突变情况不同。但总体研究结果倾向于支持ras基因突变在肿瘤发生发展中的作用。

目前ras基因的突变正作为肿瘤筛查、预警及预后的分子标记物而广泛用于研究和临床之中。

四 荧光偏振技术在基因变异检测中的应用

1 基因变异检测的意义与检测方法

1.1 基因变异检测的意义

人和自然界中的其它物种在进化过程中都存在遗传基因的变异。最常见的变异形式是基因突变，其中一部分基因突变直接与疾病相关。

研究表明自然界中病原体如HPV、HBV、HIV等病毒及人类在

基因组 DNA 序列水平都存在多态性, 各基因型间有存在着差异, 并和其生物学行为存在着高度的相关性。不同 DNA 序列、不同基因型别可导致人体的不同反应、有不同的致病性及对药物的不同的敏感性、反应性^[81]。因此对病原体与人类 DNA 序列、基因型的检测, 对于了解致病因子的特性、确定病情、判断预后及指导治疗有重要意义。

1.2 主要的检测方法

基因突变的研究已成为当今生命科学研究的热点之一, 检测方法也随之迅速发展。多聚酶链反应(PCR)技术是突变研究中的最重大进展, 使基因突变检测技术有了长足的发展, 目前几乎所有的基因突变检测的分子诊断技术都是建立于 PCR 的基础之上, 并且由 PCR 衍生出的新方法不断出现, 目前已达二十余种, 自动化程度也愈来愈高。

1.2.1 PCR-SSCP 法

PCR-单链构象多态性(Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP)法是在非变性聚丙烯酰胺凝胶上, 短的单链 DNA 和 RNA 分子依其碱基序列不同而形成不同构象。其基本原理为单链 DNA 在中性条件下会形成二级结构, 这种二级结构依赖于其碱基组成, 即使一个碱基的不同, 也会形成不同的二级结构而出现不同的迁移率。由于该法简单快速, 因而被广泛用于未知基因突变的检测。但该方法电泳条件要求较严格, 不能准确测定突变的位点, 随着 PCR 产物片段的增加突变检出率会下降, 准确度有待提高。

1.2.2 PCR-RFLP

PCR-限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)是发展最早的分子标记技术。基本原理是检测扩增后 DNA 在限制性内切酶酶切后形成的特定 DNA 片段的大小。凡是可引起酶切位点变异的突变如点突变和一段 DNA 的重

新组织（如插入和缺失造成酶切位点间的长度发生变化）等均可导致 RFLP 的产生。方法操作比较繁琐，通量低，局限性较大。

1.2.3 等位基因特异的寡核苷酸探针^[82](allele-specific oligonucleotide, ASO)

当基因的突变部位和性质已经明确时，可以合成等位基因特异的寡核苷酸探针用同位素或非同位素标记进行诊断，探针通常为 20bp 左右的核苷酸。探测点突变时一般需要合成两种探针，一种与正常基因序列完全一致，能与之稳定地杂交，但不能与突变基因序列杂交；另一种与突变基因序列一致，能与突变基因序列稳定杂交，但不能与正常基因序列稳定杂交，就能把只有一个碱基发生了突变的基因区别开来。PCR 可结合 ASO，即 PCR-ASO 技术，先将含有突变点的基因有关片段进行体外扩增，再与探针作点杂交，这样节约了时间，而且只要极少量的基因组 DNA 就可进行。不足之处是 ASO 需严格控制杂交条件和设置标准对照避免假阳性和假阴性。

1.2.4 变性梯度凝胶电泳法 (denaturing gradient electrophoresis, DGGE)

DGGE 法基本原理是基于当双链 DNA 在变性梯度凝胶中进行到与 DNA 变性梯度一致的凝胶位置时，DNA 发生部分解链，电泳迁移率下降，当解链的 DNA 链中有一个碱基改变时，会在不同的时间发生解链，因影响电泳速度变化的程度而被分离。由于本法是利用温度和梯度凝胶迁移率来检测，需要一套专用的电泳装置，合成的 PCR 引物最好在 5' 末端加一段 40bp-50bp 的 GC 夹，以利于检测发生于高熔点区的突变。在 DGGE 的基础上，又发展了用温度梯度代替化学变性剂的 TGGE 法（温度梯度凝胶电泳 temperature gradient gelelectrophoresis, TGGE）。该法操作相对简便，但无法确定突变在 DNA 片段中的位置，DNA 片段的大小受限制。

1.2.5 等位基因特异性扩增法 (Allele-specific amplification, ASA)

ASA 于 1989 年建立, 是 PCR 技术应用的发展, 也称扩增阻碍突变系统 (amplification refractory mutation system, ARMS)、等位基因特性 PCR (allele-specific PCR, ASPCR) 等, 用于对已知突变基因进行检测。该法通过设计两个 5' 端引物, 一个与正常 DNA 互补, 一个与突变 DNA 互补, 对于纯合性突变, 分别加入这两种引物及 3' 端引物进行两个平行 PCR, 只有与突变 DNA 完全互补的引物才可延伸并得到 PCR 扩增产物。如果错配位于引物的 3' 端则导致 PCR 不能延伸, 则称为 ARMS。ASA 法的检出率依赖于反应条件的优化和可能发生的引物与靶 DNA 的错配延伸, 缺点是步骤复杂伴有非特异性扩增。

1.2.6 DNA 芯片技术^[83] (DNA chip)

DNA 芯片技术是 90 年代后发展的一项 DNA 分析新技术, 它集合了集成电路计算机、激光共聚焦扫描、荧光标记探针和 DNA 合成等先进技术。可用于基因定位、DNA 测序、物理图谱和遗传图谱的构建等。在基因突变检测方面 DNA 芯片也有广阔的前景, 其基本原理为将许多已知序列的寡核苷酸 DNA 排列在 1 块集成电路上, 彼此之间重叠一个碱基, 并覆盖全部所需检测的基因, 将荧光标记的正常 DNA 和突变 DNA 分别与 2 块 DNA 芯片杂交, 由于至少存在 1 个碱基的差异, 正常和突变的 DNA 将会得到不同的杂交图谱, 经过共聚焦显微镜分别检测两种 DNA 分子产生的荧光信号, 即可确定是否存在突变, 该方法快速、自动化程度高, 具有很大的发展潜力, 但目前成本太高而难以推广应用。

2 荧光偏振检测技术

荧光偏振 (Fluorescence Polarization, FP) 检测技术是一种利用荧光标记物来检测分子的方法。它是将荧光物质标记在特定物质分子上, 当荧光素分子被平面偏振光 (plane-polarized light) 激发时, 如果该分子在激发和发射期间保持固定, 就会向固定的

平面发射偏振荧光 (Polarized Fluorescence), 这种现象称为荧光偏振 (FP) [84], 偏振光强度可被光路上的检测器测出。由于荧光素分子在空间中处于不断的运动之中, FP 不能完全被外部的检测器检测到。分子 FP 值的大小与其旋转弛豫时间 (旋转 68.5 度角需要的时间) 成正比, 而弛豫时间又与溶剂粘度、绝对温度、分子体积和气体常数有关。因此当溶剂粘度和温度保持不变时, FP 值直接与荧光素分子体积成正比, 而体积又直接与其分子量成正比。如果荧光素分子质量较大, 它在空间中旋转的速度较慢, 特定时间内向同一方向发出发射光 FP 得以保持。相反, 分子质量较小, 旋转速度就会变快, FP 大量消失。依靠分子量的差异, 可以将溶液中游离与结合的荧光分子进行区别。见图 3。

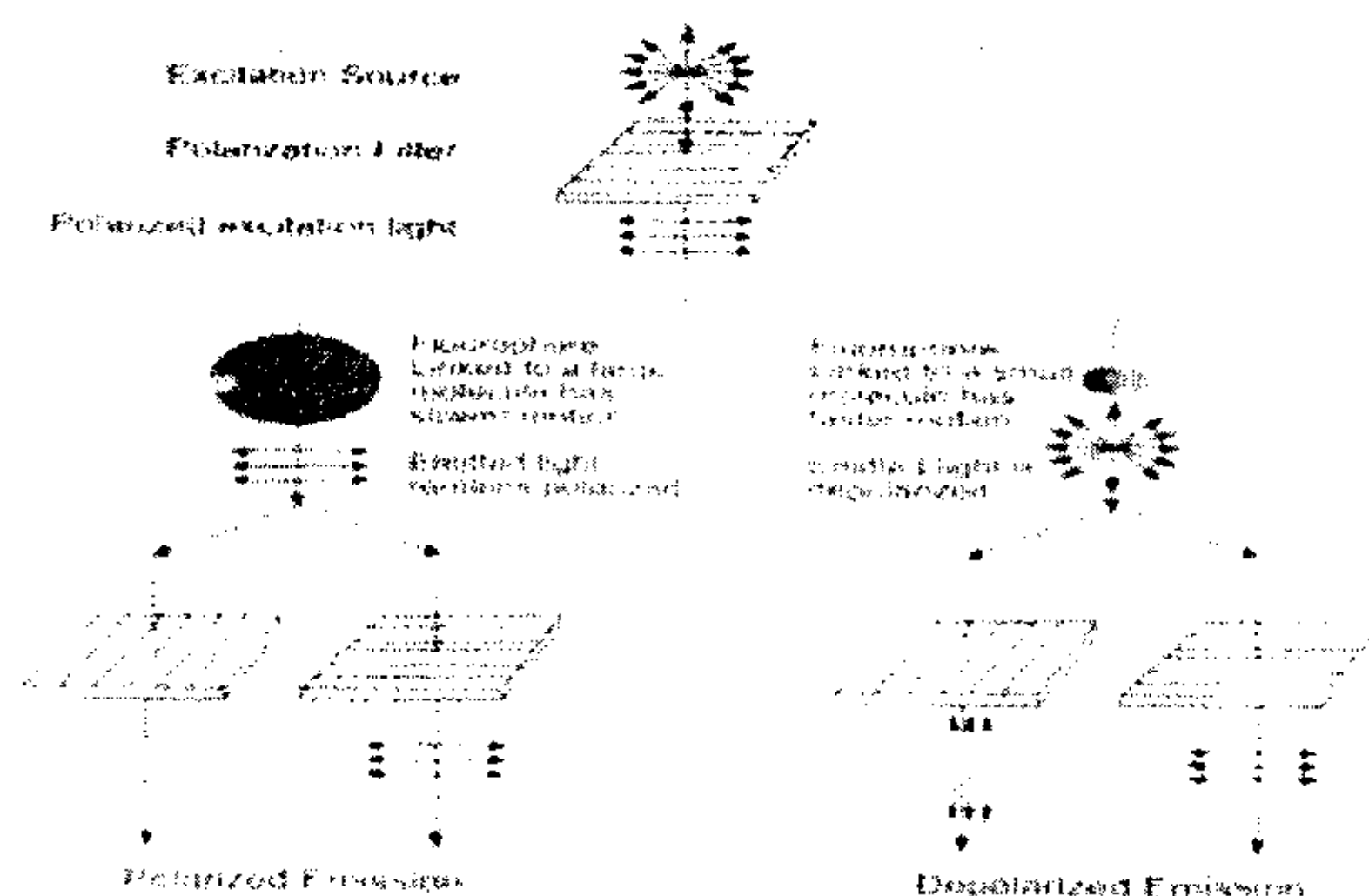


图 3 荧光偏振示意图

荧光偏振值是用垂直和水平方向上检测的荧光的比值来表示, 因此荧光强度大小无关, 这是一个优于其它荧光检测方法的明显特点。另外, 该方法不需分离游离和结合的示踪物, 所有检测都在溶液环境中进行, 因而具有快速、简便和准确等特点 [85]。

荧光偏振已被用来研究蛋白质-DNA 和蛋白质-蛋白质间的相互作用 [86,87]、链替换扩增的 DNA 检测 [88]、核酸杂交的基因分

型研究^[89]及其它种类的分子间相互作用等。单核苷酸多态性分型方面，FP 方法也得到了广泛应用^[90]，如 FP-TDI、FP-Taqman 和 FP-Invasion 技术等。

3 TDI-FP 检测方法

TDI-FP(Template-directed dye-terminator incorporation with fluorescence polarization detection)是模板指导下的碱基掺入终止反应，是双脱氧终止核苷酸(图 4)DNA 测序与荧光偏振结合形成的一种基因变异分析技术，主要用于 SNP 与点突变的检测。反应时在 DNA 聚合酶的作用下，紧邻检测的多态性位点的 TDI 引物 3'末端在 DNA 模板指导下延伸一个核苷酸，通过添加的核苷酸确定变异位点的基因型。

TDI-FP 的全部反应可在同一个反应体系（如 MJ Research V2.0 384 微孔板）内完成：1、首先 PCR 扩增含有突变位点的靶 DNA 片段；2、去除 PCR 反应中剩余的游离引物和 dNTPs，加热失活消化酶；3、加入特殊的 DNA 聚合酶、3' 端紧邻待测位点的突变检测引物和荧光素标记的 ddNTP，热循环仪上进行 TDI 反应。4、微孔板置于荧光偏振分析仪上检测反应体系的 FP^[138]。

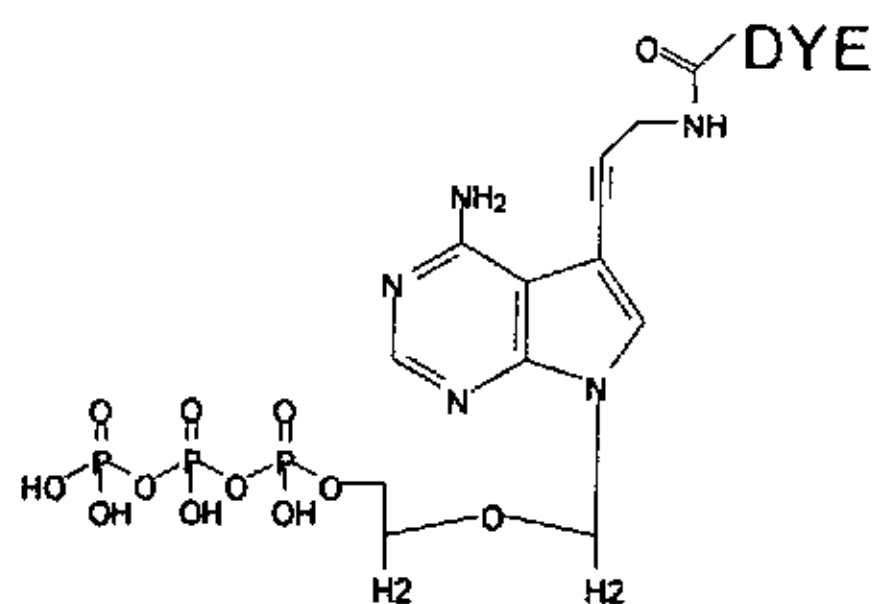


图 4 Acyclo Terminators[™]的分子结构示意图

如模板中含有与相应的 ddNTP 互补的位点时则有 ddNTP 掺入到突变检测引物 3' 端，荧光素分子激发后的 FP 值增加；相反，则 FP 值不增加。荧光标记物的分子量在 0~10,000Da 时，FP 值与其分子量基本成正比关系。结合一个荧光素分子的单个核苷

酸的分子量大约为 1000Da, 结合一个荧光素分子的 25~30 寡核苷酸的分子量接近 10,000Da。因此本方法适合检测一个荧光标记的 ddNTP 的掺入情况, FP 值呈线性增加, 所以能够准确地反映引物延伸的过程。从荧光偏振的变化来推断靶 DNA 中的基因变异情况, 确定目的 DNA 的基因型 (genotype) (图 5)。

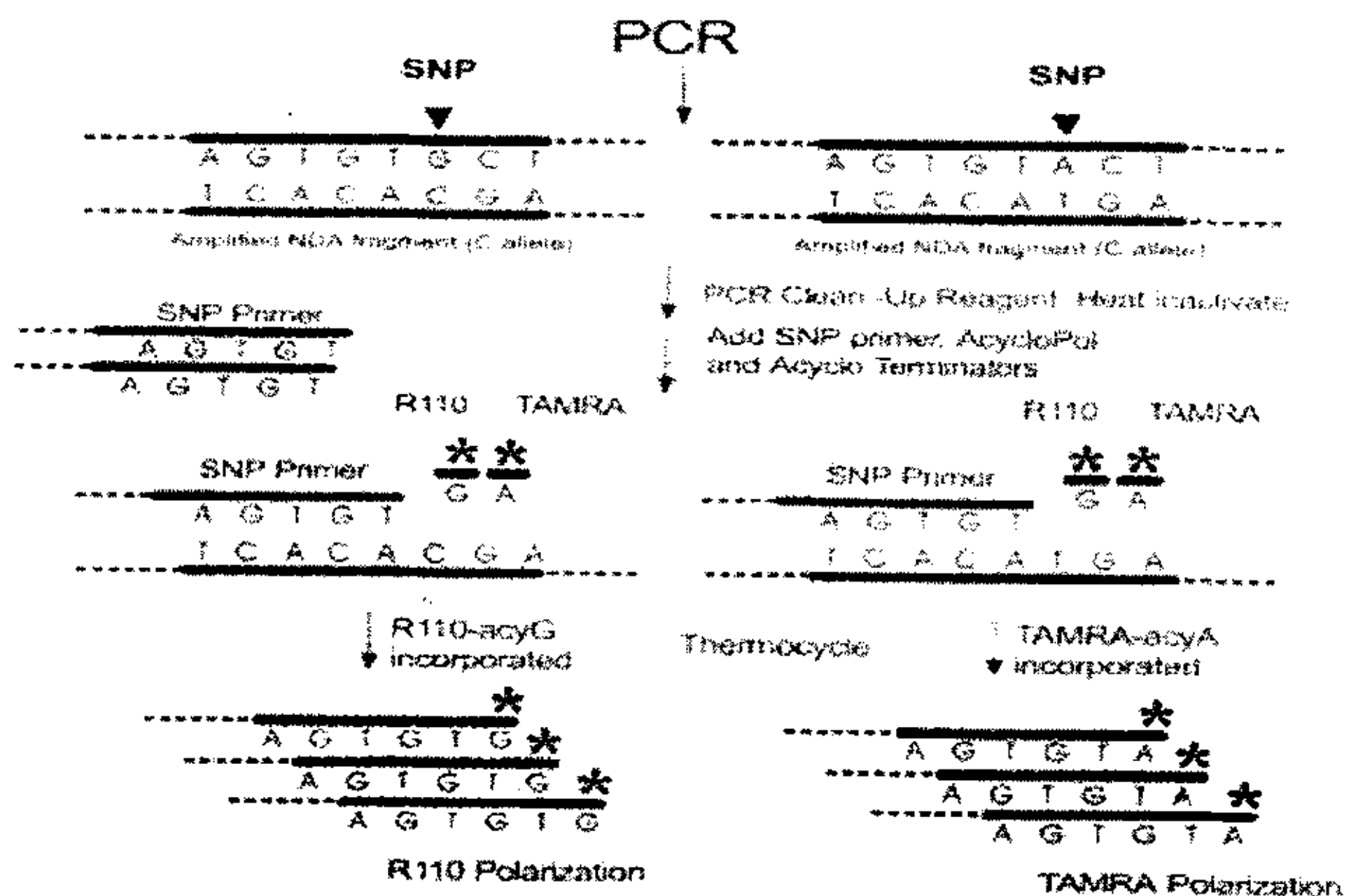


图 5 TDI-FP 反应过程

综上所述, TDI-FP 技术将荧光偏振与特异的引物杂交延伸反应联合起来, 引物退火和双脱氧核苷酸的掺入反应都具有很高的特异性, 是一种高敏感性、特异性的变异检测方法。虽然以分子杂交为基础的 DNA 序列检测方法如 ASO、OLA 和 DNA 芯片技术的敏感性和可靠性也很高, 但这些方法在进行引物设计和反应体系建立优化方面要求较高, 相比之下 TDI-FP 技术的应用更广泛, 更易于优化。它不需要对引物进行修饰, 因此成本要比利用荧光素标记探针的检测方法低得多, 且不存在辐射等环境污染。还保留了反应的高敏感性、特异性。另外供选择的荧光染料种类多, 如 BFL、TMR 和 POX、BTR 可供不同的应用所需^[91]。

正文

第一部分

常见 HPV TDI-FP 分型方法的建立与临床应用

引言

HPV 病毒可通过性接触或其它直接或间接的接触在人群中传播扩散, 其感染部位隐蔽, 存在一定的潜伏期, 早期不易发现。人体多种皮肤粘膜的增生、息肉、癌前性及癌性病变都与其密切相关。目前已鉴定出的 100 多型 HPV 分别属于不同的高、低危型别, 致病危害性也不同。研究表明, 90% 以上的宫颈癌组织中都存在 HPV 的持续感染, 早期发现高危 HPV 感染并进行治疗对于预警和治疗宫颈癌等 HPV 相关恶性肿瘤及其预后的重要性已形成了共识^[92]。所以对 HPV 分型的研究不仅有助于弄清 HPV 分布的特点, 早期发现和控制传染源, 而且对于 HPV 感染的高危人群筛查、HPV 的诊治及疫苗的开发有重要的意义。

HPV 分型检测一直是国内外研究的热点。由于 HPV 尚不能体外培养, 血清学方法也还处于实验阶段, 因此目前 HPV 感染的诊断主要是利用分子生物学的手段从组织标本中检测 HPV 的 DNA。世界上目前唯一获得美国 FDA 许可的 HPV 诊断方法是 HC-II (杂交捕获二代) 检测技术, 该试剂已经商品化^[3], 但是此技术还存在相当的局限性, 即它只能对感染的 HPV 进行高、低危群的区分^[93], 而不能对 HPV 的具体型别进行特异性检测, 甚至高、低危群探针组间也有交叉反应的可能, 不能检出 HPV 混合感染, 且技术复杂、对操作人员要求高及试剂昂贵, 常规用于临床困难较大。

本研究采用的 TDI-FP 技术, 是美国 PerkinElmer 公司推出的

基因变异检测技术，已经用于检测单核苷酸多态性（SNP）及点突变等基因变异^[91,94]研究。全称为模板指导的染料终止子掺入-荧光偏振检测技术。其基本原理和过程如下：先用适当的 PCR 引物扩增待检测基因和基因变异位点所在的区域。扩增后用消化酶对 PCR 产物进行消化，除去剩余的引物和 dNTPs，消化完成后再用热处理灭活消化酶活性。然后用一条 3' 末端和待检测的基因变异位点紧邻的引物与处理后的 PCR 产物反应，最后根据掺入引物 3' 末端荧光染料的情况，在荧光偏振检测仪中确定该位点碱基的变化情况。

通过引物扩增、探针杂交及杂交后特异碱基掺入三重把关，从而确保反应有比普通杂交反应更高的特异性和准确性：以保证真性 DNA 聚合酶行延伸反应，如扩增产物中含有与探针互补序列，则两者之间相互识别而互补杂交，并在模板指导下，存在相应的 ddNTP 时进一步延伸，游离的荧光标记 ddNTP 掺入到探针末端，相应波长的 FP 值增加；反之，无探针与扩增产物中序列互补杂交，更无延伸反应及 FP 值增加。它检测偏振光强度而非荧光强度，大大增加了检测的灵敏度，所有测定在溶液中进行可达到真正的平衡，因而具有简便、快捷和准确等特点。

本部分依据 TDI-FP 的基本检测原理建立了一种新的快速、高通量、低成本的 HPV 分型系统，不仅能够区分高低危型别而且可以进一步进行 HPV(包括 HPV6、11、16、18 和 58)的分型。并对部分临床标本进行了分型检测应用和验证。

一 实验材料和方法

1 实验材料

1.1 主要实验仪器

DU®640 型核酸蛋白检测仪	美国 BECKMAN 公司
DY-300 型低压电泳仪	北京六一仪器厂
Galanz 中型微波炉	河北顺德格兰仕电器有限公司
GH3600B 型隔水培养箱	天津市泰斯特仪器有限公司
HUANGPING FA1104 型精密电子天平	上海天平仪器厂
HW-8C 型微量恒温器	浙江绍兴市卫星医疗设备制造有限公司
Legaci™ Refrigeration System	美国 Revco Technologies 公司
LX-100 手掌型离心机	江苏海门市麒麟医用仪器厂
Milli-Q 纯水仪	上海生仪分析技术有限公司
MJ Research 384 孔板	美国 MJ Research 公司
PH211 PH 计	日本 HANNA 公司
TechGene PCR 扩增仪	英国 Techne 公司
TGR16-1.2 高速冷冻离心机	湖南天创仪器制造公司
THZ-82 型水浴恒温振荡器	江苏金坛市大中仪器厂
WP-1 型紫外透射反射分析仪	浙江永嘉上塘教学仪器厂
WZ-I 微型台式真空泵	绍兴市卫星医疗设备制造有限公司
XW-80A 旋涡混合器	上海精科实业有限公司
Victor ² Multilabel Counter	美国 PerkinElmer 公司
752 紫外分光光度计	上海分析仪器总厂
78-1 型磁力搅拌器	杭州仪表电机厂
超净工作台	西安富康空气净化工程公司
电热恒温水浴锅	余姚江南仪器仪表厂

1.2 分子生物学试剂

1.2.1 主要工具酶及生化试剂

Taq DNA 聚合酶、蛋白酶 K、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG)、5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷 (X-gal)、DL2000 DNA marker、dNTPs、均为大连 TaKaRa 产品。T4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司。

Tris·Cl 平衡酚 (pH8.0)、氯仿、异戊醇、无水乙醇、Tris·Cl 碱、SDS、EDTA、Trypton、Yeast extract、琼脂糖、溴化乙锭等购自华美生物工程有限公司。其它试剂均为国产分析纯试剂。

PBS : 137mmol/L NaCl , 2.7mmol/L KCl , 10mmol/L Na_2HPO_4 , 2mmol/L KH_2PO_4 。TE (pH 8.0): 10mmol/L Tris·Cl (pH 8.0), 1mmol/L EDTA (pH 8.0)。1×TAE: 40mmol/L Tris-乙酸, 1.0mmol/L EDTA。

LB 液体培养基: 950ml 三蒸水中溶解 tryptone10g、yeast extract 5g、NaCl 10g, 5mol/L NaOH 调 pH 值至 7.0, 定容至 1L, 高压灭菌后保存于 4℃。

LB 固体培养基: 按每 15g/L 向 LB 液体培养基中加入琼脂配制, 灭菌后铺制平板。

1.2.2 菌株和质粒

质粒: pGEM-T Easy 第四军医大学基因诊断技术研究所保存。

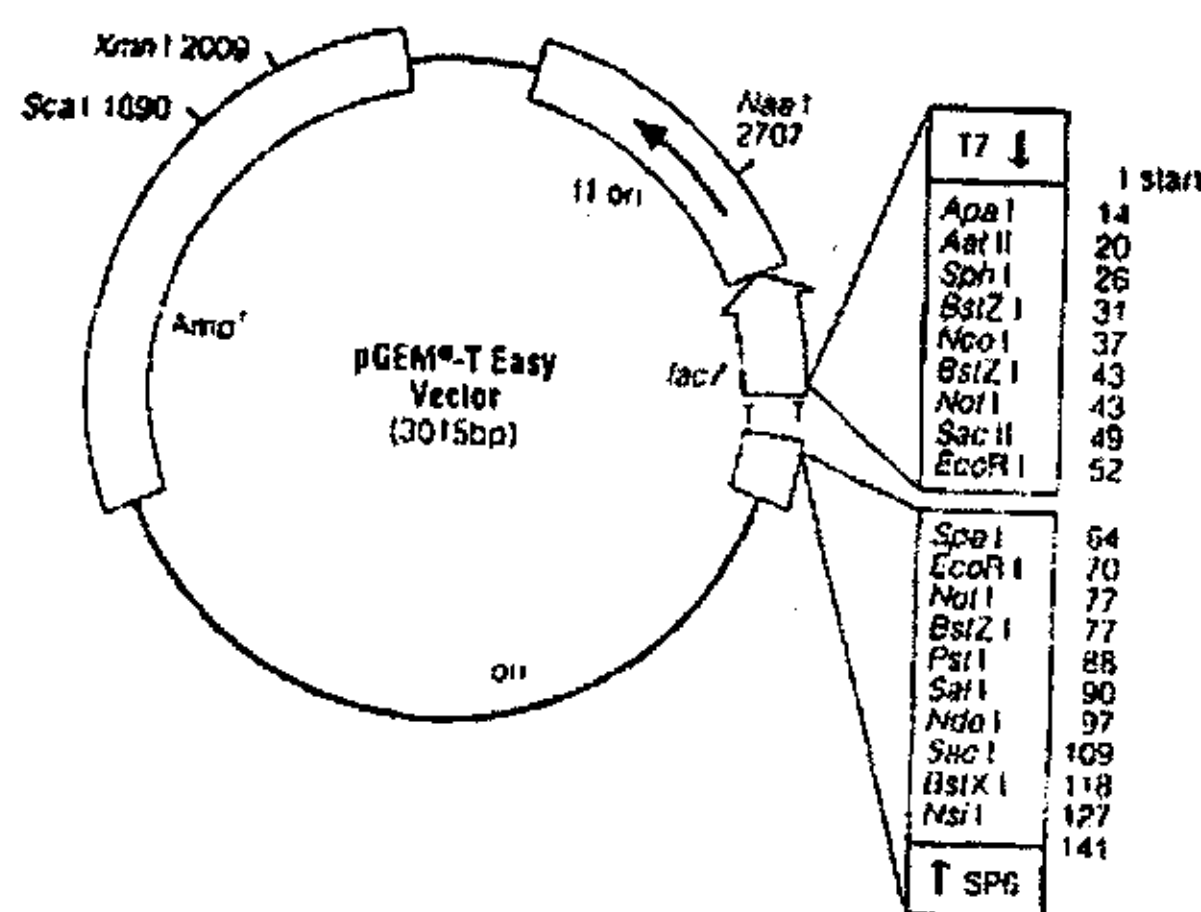


图6 pGEM-T Easy 载体结构示意图

菌株: DH5 α 基因型: supE44, Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, recA1, 第四军医大学全军基因诊断技术研究所保存。

1.2.3 试剂盒

(1) 质粒提取试剂盒: Wizard[®] PCR Preps DNA Purification System, 美国 Promega 公司。

(2) 核酸凝胶片段回收试剂盒: MARLIGEN BIOSCIENCE Rapid Gel Extraction System 50 Reactions, 美国 MARLIGEN BIOSCIENCE 公司。

(3) 克隆载体试剂盒: pGEM[®]-T Easy Vector System I, 美国 Promega 公司。

(4) 荧光偏振试剂盒: AcycloPrime[™]-FP SNP Detection Kit G/T, 美国 PerkinElmer 公司。

1.3 分析软件

PCR 引物设计软件: DNASTar: Primer 5.0

序列相似性检索软件 BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

1.4 研究标本来源

选取 2001 年初至 2003 年底在第四军医大学第一医院和西安交通大学第二医院妇科门诊检查和住院手术的宫颈癌患者为研究对象。标本共 182 例, 其中慢性宫颈炎 73 例, 癌前病变 68 例, 浸润癌 41 例, 所有标本经病理学确诊。

2. 实验方法

2.1 标本 DNA 的提取

取重约 100mg 的标本, 反复冻融 3 次, 用灭菌小剪剪碎后加入 PBS 缓冲液 (137mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl, 10mmol/L Na₂HPO₄, 2mmol/L KH₂PO₄, pH 7.4) 400μL, 用匀浆器研磨直至组织块消失; 将匀浆液移入另一 1.5 mL 微量离心管中, 用 100μL PBS 缓冲液冲洗匀浆器一起移入离心管中; 再向悬液中加入 20% SDS 至终浓度 1%, 混匀后加蛋白酶 K 到终浓度为 100~200 μg/mL, 混匀; 37℃ 温育 20h, 其间振摇数次。然后加入 500μL Tris-平衡酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 颠倒混匀, 以 5000 r/min 的速度离心 10min, 小心取上层水相重复抽提一次; 吸取的水相以氯仿/异

戊醇(24:1)混合物抽提一次; 5000 r/min 离心 10min, 移出上清, 加入 1/10 体积 3mol/L 的乙酸钠与 2 倍体积预冷的无水乙醇(-20℃), 14000 r/min 离心 5min, 弃上清, 70%乙醇洗涤一次, 自然风干; 用 100μL 去离子水溶解沉淀, 最后测量 OD 值, 计算 DNA 浓度, -20℃保存。

2.2 HPV 6、11、16、18 和 58 L1 基因的克隆

2.2.1 PCR 引物设计

根据已知 GenBank 收录的 HPV 原型序列, 通过软件 DNASTar 分别设计 HPV6^[95]、11^[96] L1、HPV16^[97]、18^[98]和 58^[99] L1 基因的特异 PCR 引物, 共 5 对, 引物序列、位置及 PCR 产物长度见表 2。

表 2 HPV 6、11、16、18、58 L1 基因引物序列、位置及产物长度

HPV	引物	序列 (5'→3')	引物位置(nt)	产物长度(bp)
6L1	F	<i>tgcacgtgcacgtatattg</i>	5760—5780	1533
	R	<i>cataccagtagcagacacacgc</i>	7292—7272	
11L1	F	<i>atgtggcggcctagcgacagc</i>	5771—5791	1515
	R	<i>ctgacagacaattattacttttgg</i>	7286—7263	
16L1	F	<i>atgcaggtagacttttatttaca</i>	5553—5576	1602
	R	<i>tgtagcatgactgagtagtact</i>	7154—7134	
18L1	F	<i>atgtgcctgtatacacgggtcc</i>	5430—5451	1707
	R	<i>ttactacgtggcacgtacac</i>	7136—7116	
58L1	F	<i>atgggtgctgattttatgttgca</i>	5565—5585	1575
	R	<i>atagtcctatgtaccacaacgcc</i>	7139—7117	

2.2.2 PCR 扩增各基因

HPV6、11 基因的 PCR 反应用本实验室保存的尖锐湿疣组织提取的 DNA 为模板, HPV16、18、58 以宫颈癌组织的 DNA 为模板。分别用 HPV6、11、16、18、58 L1 基因的 PCR 引物, 从组织 DNA 标本中进行 PCR 扩增, PCR 反应的总体系均为 25μL, 内含模板 DNA 1~2μL, dNTP 0.25mmol/L, 引物各 0.25μmol/L,

MgCl₂ 2.5mmol/L, *Taq* 酶 1.5u。各基因 PCR 热循环参数见表 3。

表 3 HPV 6、11、16、18、58 L1 基因的 PCR 参数

HPV	预变性	循环		延伸反应
		循环数	条件	
6L1	94℃5min	35 个	94℃40s,56℃60s,72℃1min	72℃10min
11L1	94℃5min	35 个	94℃40s,54℃40s,72℃1min	72℃10min
16L1	94℃5min	35 个	94℃40s,53℃40s,72℃1min	72℃7min
18L1	94℃5min	35 个	94℃40s,56℃40s,72℃2min	72℃7min
58L1	94℃5min	35 个	94℃40s,54℃40s,72℃2min	72℃7min

2.2.3 扩增结果的观察与鉴定

各 PCR 反应结束后取 10μL 反应产物与 1/10 体积上样缓冲液混合, 进行 1.0%琼脂糖凝胶电泳: 1×TAE 电泳缓冲液 (40 mmol/L Tris-乙酸, 1.0 mmol/L EDTA), 0.5 mg/mL 溴化乙锭染色, 以 5V/cm 的电压电泳 30min 后紫外灯下观察拍照。

2.2.4 PCR 产物的回收

PCR 产物电泳后, 紫外灯下将含目的片段的凝胶切出, 称重后放入 1.5mL 微量离心管中, 按 MARLIGEN BIOSCIENCE Rapid Extraction System 50 Reactions 核酸纯化试剂盒说明书回收 DNA 片段: 按每 10mg 凝胶加入 L1 液 30μL 的比例溶化凝胶, 50℃水浴 15min, 每 2~3min 摇动一次, 再保温 10min; 将溶化的凝胶液转移至分离柱中, 12000 r/min 离心 1min, 弃滤出液; 加 700 μL L2 液 12000r/min 离心 1min 洗涤分离柱, 弃滤出液; 最后加 30μL 65~70℃的 TE 缓冲液, 12000 r/min 离心 2min, 洗脱 DNA, -20℃保存。

2.2.5 回收片段与载体的连接反应

参照 pGEM[®]-T Easy Vector System I 试剂盒说明书进行连接反应: 取 3μL 回收的目的片段与 1μL pGEM-T Easy 载体, 再加入 T4 DNA 连接酶 1μL 和 2×T4 连接酶缓冲液 5μL 于 0.5mL 的微量离

心管中，混匀后 16℃ 温育 4h，4℃ 过夜。

2.2.6 CaCl_2 法制备 DH5 α 感受态细胞

用无菌接种环将甘油冻存的 DH5 α 菌液画线接种于不含 Amp 的 LB 平板（按每 15g/L 的比例向 LB 液体培养基加入琼脂配制，高压灭菌后铺制平板）上；37℃ 恒温箱培养 16h；挑取生长良好的单菌落，接种于 5mL 不含 Amp 的 LB 液体培养基（1000mL 三蒸水中溶解 trypton 10g、yeast extract 5g、NaCl 10g，用 5mol/L NaOH 调 pH 值至 7.0），37℃ 水浴振荡过夜培养；第二天按 1% 的比例转接于 20mL 不含 Amp 的 LB 液体培养基中，37℃ 振荡培养 2~3h，待细菌至对数期生长期（ $\text{OD}_{600}=0.4$ ），将菌液冰浴 15min；分装于 1.5mL 离心管中，4℃ 4000r/min 离心 5min；倒置离心管，用真空泵吸净上清；加入 1mL 预冷的 0.1mol/L CaCl_2 悬浮菌体，冰浴 30 分钟；4℃ 4000 r/min 离心 5min 后，弃上清；再用 100 μL 预冷的 0.1 mol/L CaCl_2 重悬菌体，放入 4℃ 冰箱，7d 内使用，或每管加入 20 μL 无菌甘油，混匀，-70℃ 长期保存。

2.2.7 转化

取 5 μL 各片段的连接产物分别加到冰水混合物预冷的感受态细胞中，轻轻混匀；同时将 5 μL pGEM-7Zf 空载体质粒加入到一管感受态细胞中，混匀作为阳性对照（生成蓝色克隆），未经转化的另一管感受态细胞作为阴性对照（无克隆生成）。各管感受态细胞冰水浴中静置 30min；42℃ 水浴热休克 90s（注：不要摇动管）后迅速移回冰水浴中 1~2min；每管加入 37℃ 预热的不含 Amp 的 LB 液体培养基 800 μL ，在 37℃ 摇床中低速振荡（<225r/min）培养 45~90min；4℃ 4000 r/min 离心 5min，吸出上清留至 100 μL ；轻轻混匀剩余上清与细胞沉淀，加入 20% X-gal 4 μL 与 0.1mol/L IPTG 20 μL ，混匀后铺于含 Amp（100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的 LB 琼脂平板上，待水分吸收完全后倒置在 37℃ 培养箱过夜培养。

2.2.8 重组质粒的筛选与鉴定

(1) 重组质粒的提取：将过夜培养的平板在 4℃ 放置 30min 左右待蓝色充分显现后，挑取平板上的生长良好白色单菌落，接种于 10mL 的 LB 液体培养基（100μg/mL Amp）中，37℃ 快速振荡(>225 r/min)过夜；保存菌种后，用 1.5mL 离心管 12000 r/min 离心 1min(每次约 1mL)收集 10mL 菌液的菌体，用 Wizard® PCR Preps DNA Purification System 试剂盒提取质粒 DNA，操作方法参照试剂盒说明书。

(2) 重组质粒的鉴定：

1) PCR 方法初步鉴定：扩增体系和条件见 2.2.2。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，紫外灯下观察，有预期片段者为阳性重组克隆。

2) 测序鉴定：取 PCR 鉴定为阳性克隆的冻存菌液 1mL，由上海生工生物技术有限公司 PE ABI 377 自动测序仪完成测序。所获序列经 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> 进行分析。

最终获得的各型 HPV L1 基因的重组克隆，分别命名为 HPV6 L1-pGEM-T、HPV11L1-pGEM-T、HPV16L1-pGEM-T、HPV18L1-pGEM-T 和 HPV58L1-pGEM-T。

2.3 HPV TDI-FP 荧光偏振分型检测系统的建立

通用引物 GP5+/6+ PCR 扩增 HPV L1 基因序列片段的长度为 150bp^[149]，扩增区域内的序列变异具有型特异性。基于 HPV 的这种特点针对性地设计了能够区别 GP5+/6+ PCR 扩增区域中 HPV6、11、16、18 和 58 的型特异单链荧光掺入引物（特异寡核苷酸探针）并选择了掺入的荧光素标记碱基；通过检测特异寡核苷酸探针杂交后掺入的特异荧光素标记碱基的不同来确定病毒的类型。该分型检测方法的建立及优化是将 HPV6、11、16、18 和 58 L1 基因作为相应型别 HPV 的标识基因，用上述 2.2 已获得的各型 L1 片段的克隆重组质粒为实验对象进行研究。

2.3.1 HPV GP5+/6+通用引物 PCR

GP5+/6+通用引物序列来自参考文献^[100], 序列为

GP5+: 5' -*tttgtaactgtg(t)gta(g)gatact(c)ac*-3' ,

GP6+: 3' -*ctt(c)at(a)actaaatgtc(t)aaat(c)aa(c)aaag*-5' 。

以各型 HPV L1 克隆重组质粒为模板用 GP5+/6+通用引物进行 PCR。扩增总体积 25 μ L, 内含引物各 0.15 μ mol/L, dNTPs 0.25mmol/L, MgCl₂ 2.5mmol/L, 模板 2 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 1u, 补充水至 25 μ L。循环条件为 95 $^{\circ}$ C 变性 3min 后, 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。空白对照采用无菌去离子水代替质粒 DNA。产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2.3.2 扩增产物纯化

按照荧光偏振试剂盒说明书进行。每 5 μ L PCR 产物中加入 2 μ L 10 $\times$ 消化酶(核酸外切酶 I 和虾碱性磷酸酶), 37 $^{\circ}$ C 温育 1h, 消除剩余的引物和 dNTPs, 80 $^{\circ}$ C 加热 20min 灭活消化酶。

2.3.3 TDI 掺入反应

向每管消化后的 PCR 产物中加入 13 μ L 由 0.05 μ L *AcycloPol* 聚合酶、2.0 μ L 10 $\times$ reaction buffer、0.5 μ L 10 μ mol/L TDI 引物、1.0 μ L R110-ddGTP /TAMRA-ddTTP 终止子及 9.45 μ L 去离子水组成的混合物。95 $^{\circ}$ C 预变性 2min 后, 94 $^{\circ}$ C 30sec, 45 $^{\circ}$ C 40sec, 共 30 个循环, 最后 15 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 4 $^{\circ}$ C 保存。5 型 HPV 特异性寡核苷酸探针序列及相对应的 3' 端掺入荧光素标记碱基 (R110-ddGTP/TAMRA-ddTTP) 列于表 4。

表 4 5 型 HPV GP5+/6+区域内型特异性探针及其末端掺入的荧光素标记碱基

HPV type	Probe sequence (5' $\rightarrow$ 3')	Dye-terminator
6	<i>atccgtauctacatctccacatcacca</i>	TAMRA-ddTTP
11	<i>atctgtgtctaaatctgtacatacacta</i>	TAMRA-ddTTP
16	<i>atcattatctgatgccatgttccataga</i>	TAMRA-ddTTP
18	<i>cgttctaggtgtccgtacatgggccgcc</i>	TAMRA-ddTTP
58	<i>gttatgcattgtaactaagcaaggtacaac</i>	R110-ddGTP

2.3.4 荧光偏振检测

将反应产物加入 384 微孔板中用 wallac1420 Victor² 仪器检测样品的荧光偏振值(FP), 测得的原始数据调入 EXCEL 由专用相关软件“SNP macroVICTOR 384v 4.0”分析基因型。根据荧光偏振检测仪检测的 R110、TAMRA FP 值的升高, 来判断 R110-ddGTP/TAMRA-ddTTP 的掺入, 判断 HPV 基因相应型别。

2.3.5 HPV TDI-FP 分型的特异性实验

2.3.5.1 将 PCR 产物分别与自身及其它 4 型 HPV 的特异引物的荧光掺入反应: 采取同 2.3.1~2.3.4 中的方法, 分别取以 HPV6、11、16、18 和 58 克隆质粒为模板、GP5+/6+为引物的 PCR 产物, 消化其中剩余的引物及 dNTPs 后, 每一型的 PCR 产物分别与自身及另 4 型的特异探针及荧光素标记碱基进行杂交延伸反应, 检测 FP 值, 确定各型之间有无交叉反应。

2.3.5.2 将其中两型 PCR 产物按不同比例混合后, 分别与相应的两型特异探针的荧光掺入反应: 取常见型别 HPV, 如 11 与 16、16 与 18、16 与 58 的 PCR 产物, 各按 4:1、3:2、2:3、1:4 的比例俩俩混合, 分别与相应型别的特异探针及荧光素标记碱基进行杂交延伸反应, 检测 FP 值, 判断 HPV 型别, 即判断 TDI-FP HPV 分型方法对 HPV 混合感染的检测情况。

2.4 HPV TDI-FP 分型检测方法在临床标本的应用及验证

2.4.1 HPV GP5+/GP6+引物 PCR 扩增临床标本

以上述提取的 182 例宫颈病变组织 DNA 为模板, 每个反应 2 μ L, 用 GP5+/GP6+通用引物扩增。扩增体系及条件同 2.3.1。空白对照中采用无菌三蒸水代替模板 DNA, 相应型别 HPV 的阳性对照用前面建立的各种 L1 质粒为模板。PCR 产物均经 2.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 扩增后有 150bp 条带者为 HPV 阳性, 无 150bp 条带者为 HPV 阴性。

2.4.2 HPV GP5+/GP6+扩增阴性标本的 DNA 质量鉴定

由于 β -球蛋白普遍存在于生物体内, 因此采用 β -球蛋白的 PC04 和 PH20 引物^[31,101] 扩增 GP5+/GP6+ PCR 结果阴性的标本, 上游引物: 5'-caacttcacccaacgttcacc-3'

下游引物: 5'-gaagagccaaggacaggtac-3'。

根据有无 268bp 扩增产物来判断 GP5+/GP6+ PCR 扩增阴性标本是否由 DNA 质量不佳所致。如果 PC04 和 PH20 引物扩增后无条带产生, 则说明 DNA 质量不良, GP5+/GP6+ 引物 PCR 扩增阴性的原因可能与此有关, 此类标本将不纳入本研究。

该 PCR 反应的总体系为 25 μ L, 含样品 DNA 2 μ L, dNTPs 0.25mmol/L, PC04 引物和 PH20 引物各 0.25 μ mol/L, MgCl₂ 2.5mmol/L, Taq 酶 1.0u。扩增参数设定为: 94℃ 变性 5min 后, 94℃ 60s, 55℃ 90s, 72℃ 1min, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 5min。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果。

2.4.3 标本 PCR 产物的 TDI 反应、FP 检测及 HPV 分型

PCR 产物的消化及 HPV 型特异性探针杂交和荧光标记碱基的末端掺入反应及 FP 检测同 2.3.2~2.3.4。

2.4.4 标本 HPV TDI-FP 分型结果的测序验证

从 HPV TDI-FP 分型检测阳性的标本中随机挑选包含有 5 型 HPV 的 PCR 产物共 20 例, 操作同实验方法 2.2.2~2.2.8。将扩增片段电泳分离、回收克隆入 pGEM-T easy 载体中, 每份挑选 2 个经氨苄青霉素抗性和蓝白筛选并经 PCR 扩增鉴定的阳性克隆, 由上海博亚生物技术有限公司进行测序。所获序列通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> 确定 DNA 类型, 并与 TDI-FP 检测结果相比较。

2.4.5 统计学处理

宫颈病变组织中各型 HPV DNA 的阳性率用百分数表示, 组间差异作 χ^2 检验, $P < 0.05$ 时差异有显著意义。

二 实验结果

1 HPV 各型 L1 基因的克隆

1.1 HPV 6、11、16、18 和 58 L1 基因的 PCR 结果

分别以尖锐湿疣和宫颈癌组织 DNA 为模板,设计的特异引物扩增 5 型 HPV L1 基因,取 10 μ L PCR 产物用 1.0%的琼脂糖凝胶进行电泳,见图 7。片段大小与预期相符。

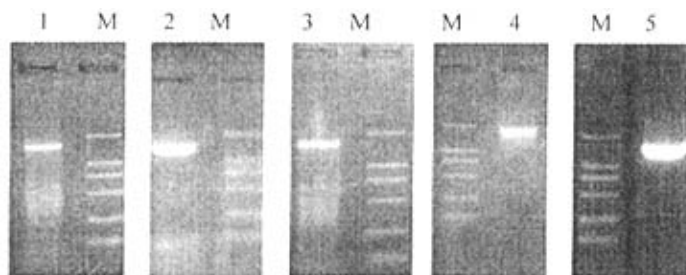


图 7 HPV L1 基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

M: DL 2000 DNA Marker 由上至下: 2000、1000、750、500、250、100bp(下同)

1: HPV 6 L1 PCR 结果(片段长 1533 bp); 2: HPV11 L1 PCR 结果(片段长 1515 bp);
3: HPV16 L1 PCR 结果(片段长 1602 bp); 4: HPV18 L1 PCR 结果(片段长 1707 bp);
5: HPV58 L1 PCR 结果(片段长 1575 bp).

1.2 HPV L1 基因的克隆和 PCR 鉴定

将上述各基因 PCR 产物回收克隆入 pGEM-T Easy 载体, 蓝白筛选后提取质粒, 分别用 PCR 扩增, 电泳, 挑选重组克隆(图 8)。

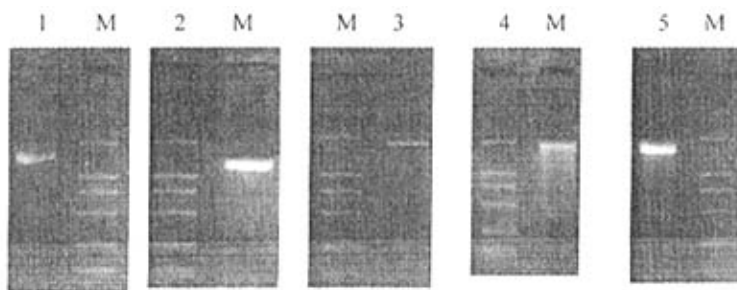


图 8 HPV 各基因克隆重组体的 PCR 鉴定

M: DL2000 DNA Marker; 1: HPV6L1-pGEM-T (插入片段长 1533 bp);

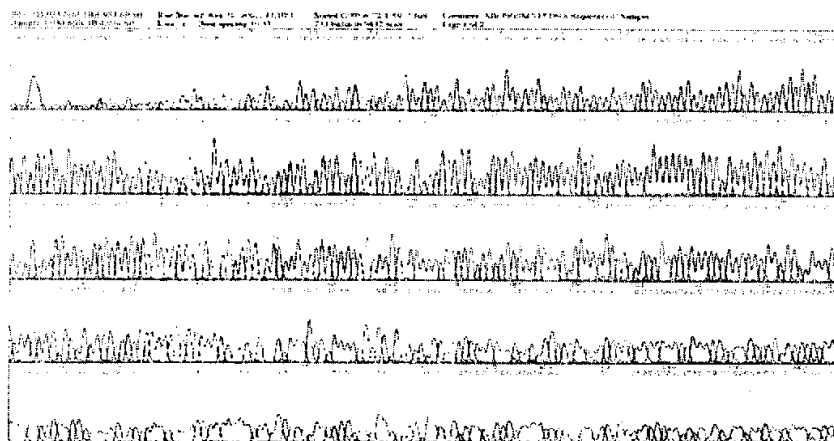
2: HPV11L1-pGEM-T(插入片段长 1515 bp); 3: HPV16L1-pGEM-T(插入片段长 1602 bp);

4: HPV18L1-pGEM-T(插入片段长 1707 bp); 5: HPV58L1-pGEM-T(插入片段长 1575 bp).

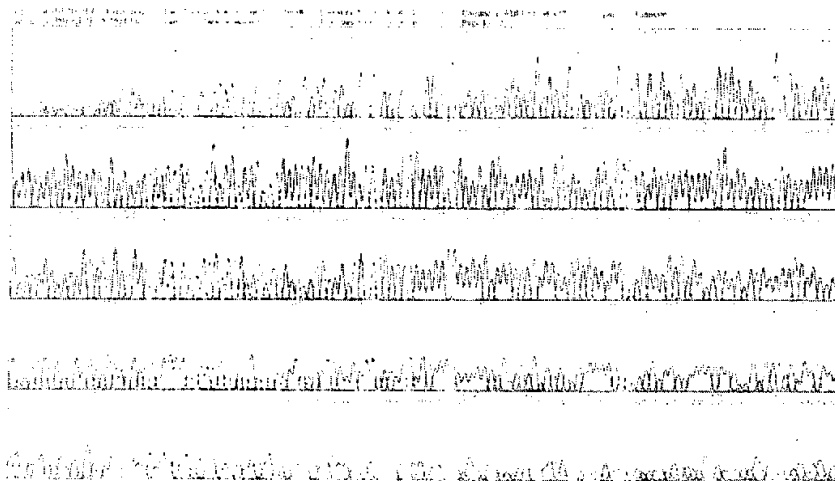
1.3 HPV L1 克隆基因的序列测定

测序结果显示, HPV 各型 L1 基因的克隆重组质粒中插入有其各自完整的全长基因, 基因的长度分别是: HPV6 L1: 1533bp; HPV11 L1: 1515bp; HPV16L1: 1602bp; HPV18L1: 1707bp; HPV58L1: 1575bp。基因序列虽有一定变异, 但与已知相应 HPV 标准株的同源性达 99% (图 9)。

HPV 6 L1:



HPV11 L1:



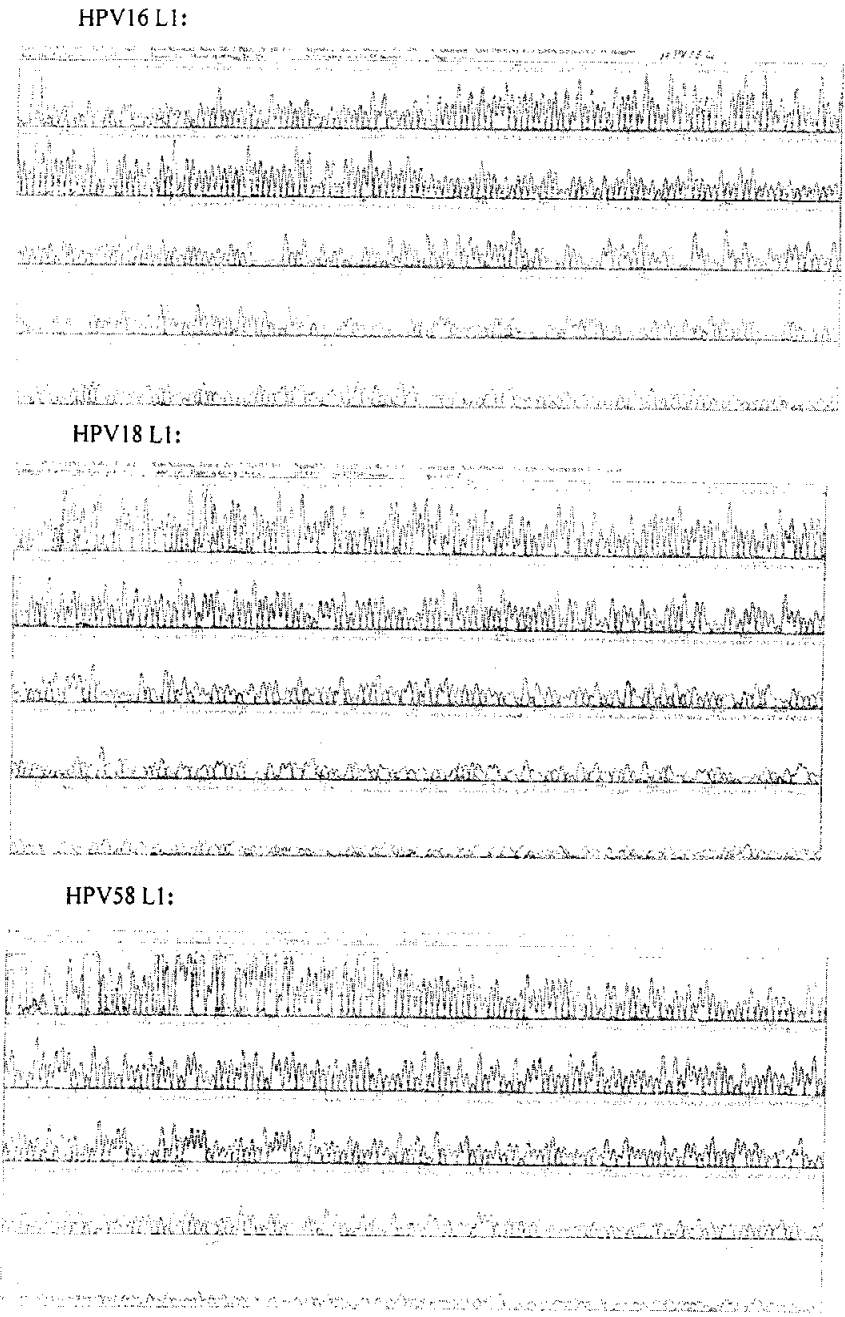


图9 HPV 各基因克隆的序列测定

2 HPV 荧光偏振分型检测方法的建立

2.1 HPV GP5+/GP6+ PCR

以上述构建的各型 HPV L1 重组质粒为模板的 HPV GP5+/GP6+ 通用引物 PCR 的 2.0%琼脂糖凝胶电泳结果如图 10。PCR 片段长度为 150bp。

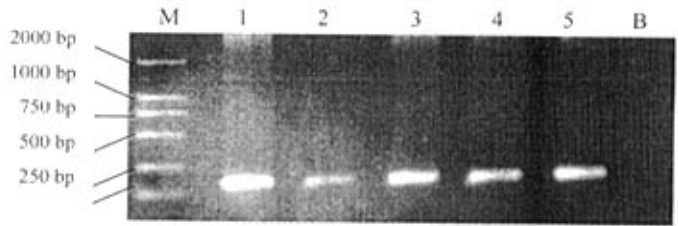


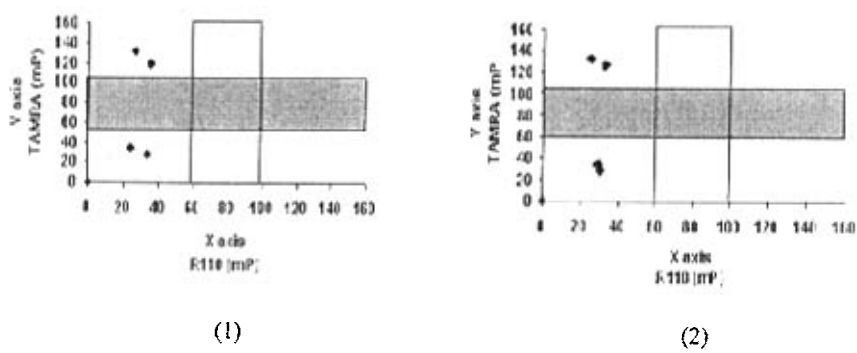
图 10 5 型 HPV 重组质粒 GP5+/GP6+ PCR 结果

M: DL2000 DNA Marker ; B: 空白对照。

1~5: HPV6、11、16、18 和 58 L1 重组质粒 GP5+/GP6+ PCR 结果 (150bp)

2.2 HPV TDI-FP 分型检测

将上述 5 型 HPV L1 克隆质粒 GP5+/GP6+PCR 产物消化后，每一型 PCR 产物分别与相应的特异性探针及荧光标记碱基反应，用 Victor² Multilabel Counter 进行 FP 检测。同预期的一样，各型发生了特异的探针杂交反应和相应的特异碱基延伸反应，R110 或 TAMRA FP 值升高，空白对照则 R110 与 TAMRA FP 值均未升高，表明未发生特异的杂交反应和特异碱基掺入反应，据此判断 HPV 型别。结果如图 11 所示(每份标本重复两次)。



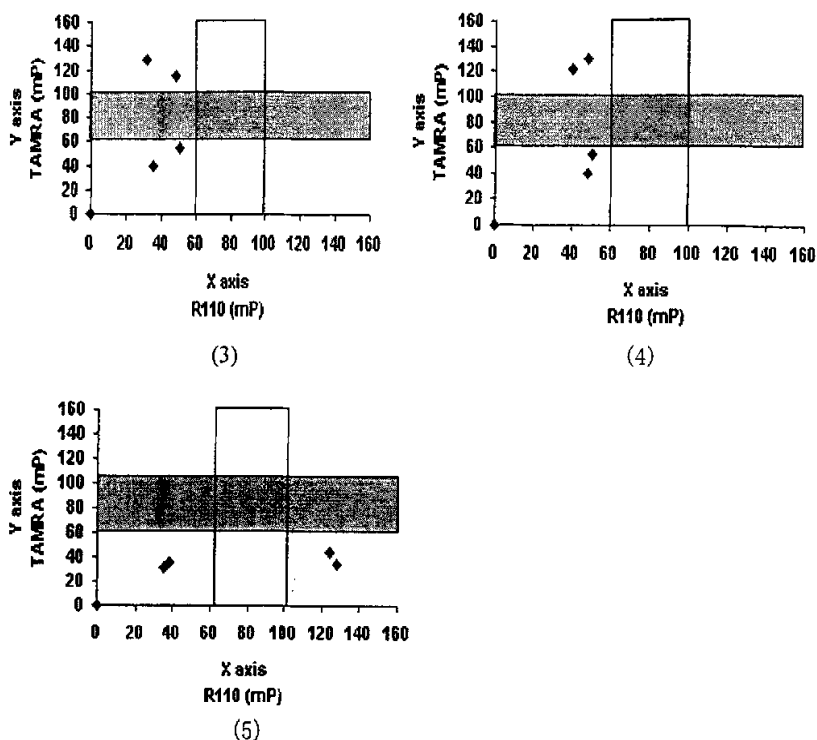


图 11 HPV TDI-FP 分型检测结果

- (1) HPV6 型与空白对照 FP 检测结果; (2) HPV11 型与空白对照 FP 检测结果;
 (3) HPV16 型与空白对照 FP 检测结果; (4) HPV18 型与空白对照 FP 检测结果;
 (5) HPV58 型与空白对照 FP 检测结果.

2.3 HPV TDI-FP 基因分型方法的特异性实验

2.3.1 5 型 HPV PCR 产物分别与自身及其它 4 型 HPV 的特异探针的荧光掺入反应

HPV6、11、16、18 和 58L1 克隆质粒 GP5+/GP6+ PCR 产物消化后, 分别与自身及另外 4 型的探针及标记碱基进行杂交延伸反应, 荧光偏振分型检测结果如图 12(每份标本重复两次)。各型 PCR 产物只与相应的特异探针发生杂交反应及特异的碱基掺入延伸反应, 而不与其它 4 型探针和相应掺入碱基发生杂交延伸反应, 说明各型之间有无交叉反应。

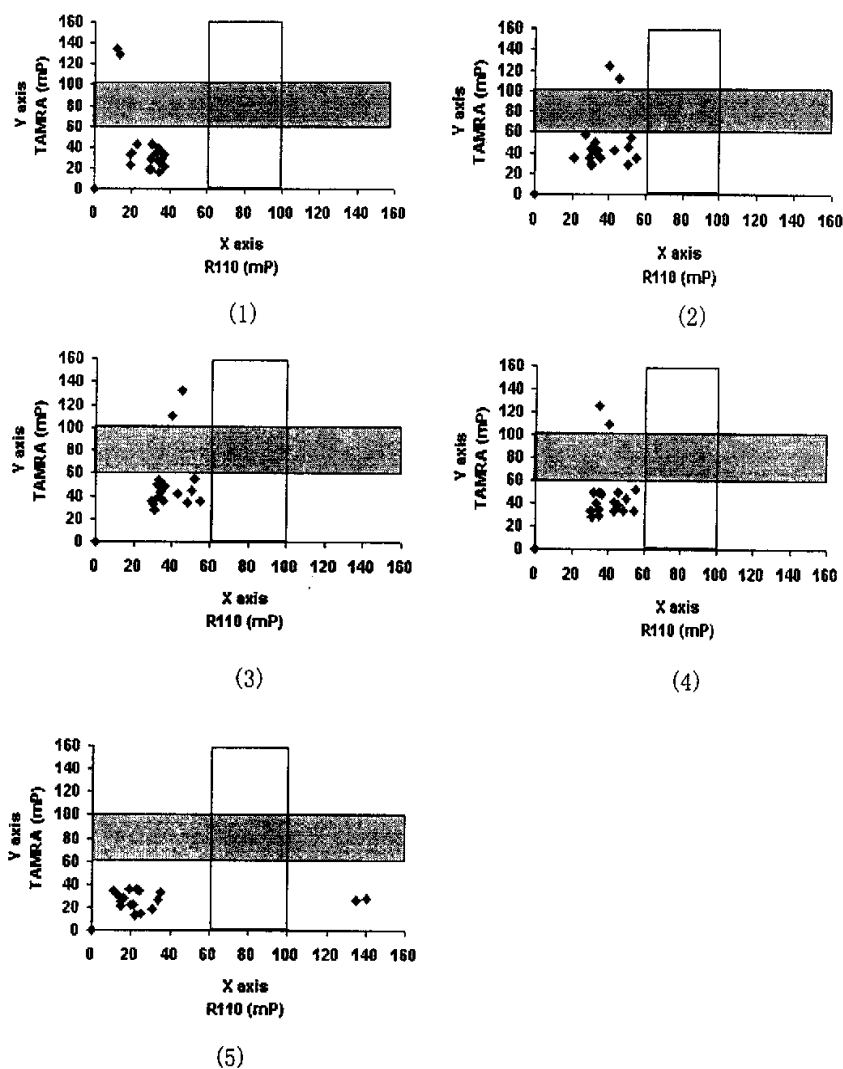


图 12 每型 HPV PCR 产物分别与自身及其它 4 型 HPV 特异探针的荧光掺入反应
 (1) HPV6 型 PCR 产物分别与自身及其它 4 型 HPV 的特异探针的荧光掺入反应;
 (2) HPV11 型 PCR 产物分别与自身及其它 4 型 HPV 的特异探针的荧光掺入反应;
 (3) HPV16 型 PCR 产物分别与自身及其它 4 型 HPV 的特异探针的荧光掺入反应;
 (4) HPV18 型 PCR 产物分别与自身及其它 4 型 HPV 的特异探针的荧光掺入反应;
 (5) HPV58 型 PCR 产物分别与自身及其它 4 型 HPV 的特异探针的荧光掺入反应。

2.3.2 两型 PCR 产物按不同比例混合后与两型特异探针的荧光掺入反应

取 11 与 16、16 与 18、16 与 58 的 PCR 产物，各按四种比例俩俩混合，与对应的探针进行分型检测，如图 13A~C。两型 PCR 产物不同比例混合后均可与相应的特异探针发生杂交和延伸反应，进一步表明此分型检测方法效率高，可检测出 HPV 混合感染。

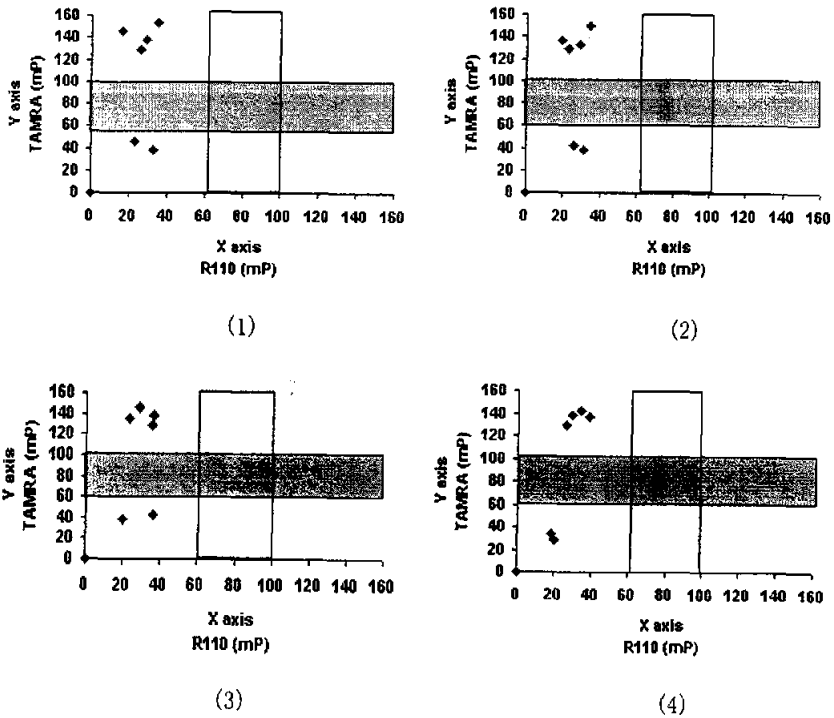
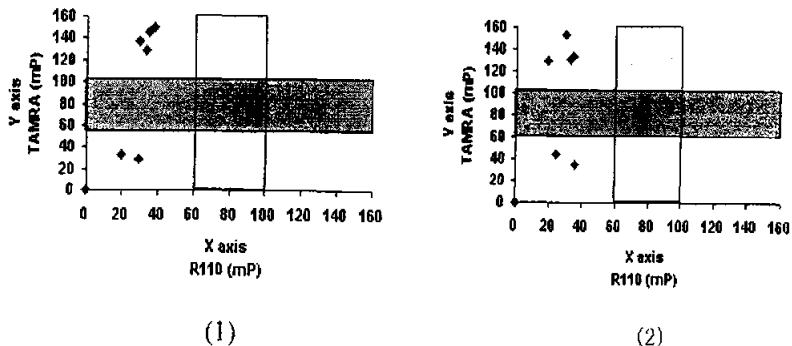
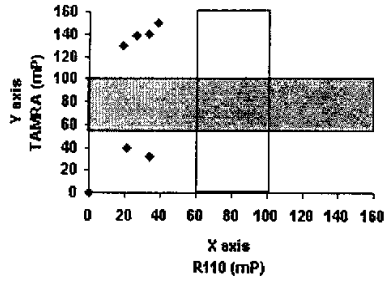


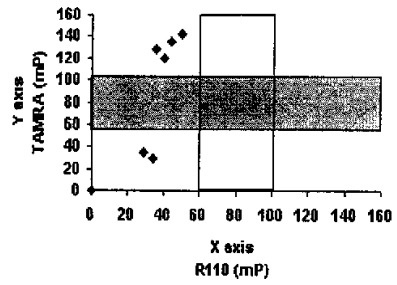
图 12A HPV11 与 16 PCR 产物混合后与相应两型特异探针的荧光掺入反应

(1) 4(11):1(16); (2) 3(11):2(16); (3) 2(11):3(16); (4) 1(11):4(16)



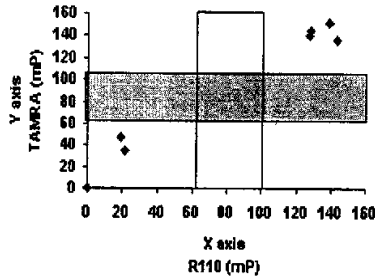


(3)

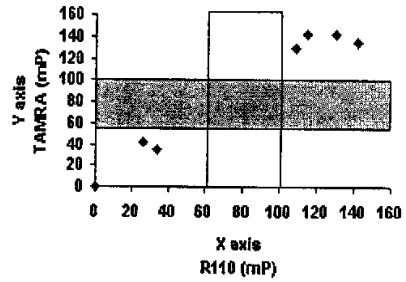


(4)

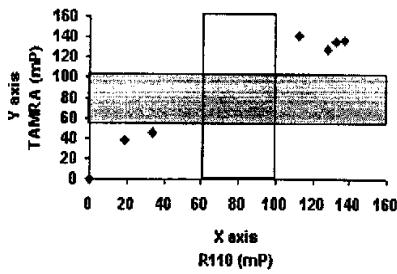
图 12B HPV16 与 18 PCR 产物混合后与相应两型特异探针的荧光掺入反应
(1) 4(16):1(18); (2) 3(16):2(18); (3) 2(16):3(18); (4) 1(16):4(18)



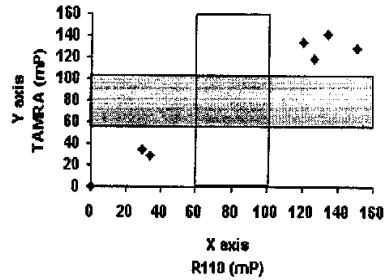
(1)



(2)



(3)



(4)

图 13C HPV16 与 58 PCR 产物混合后与相应两型特异探针的荧光掺入反应
(1) 4(16):1(58); (2) 3(16):2(58); (3) 2(16):3(58); (4) 1(16):4(58)

3 HPV TDI-FP 分型检测方法的应用及验证

3.1 标本组织 HPV DNA GP5+/GP6+ PCR 结果

182 例宫颈病变组织 DNA 经 GP5+/GP6+通用引物扩增后, 所得产物经 2.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 显示 HPV DNA 扩增片段长度为 150bp(图 14), 与预期的相符。182 例宫颈病变组织标本中 HPV 检出 115 例, 阳性为率 63.2%。

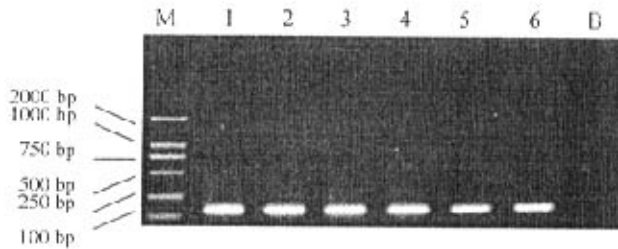


图 14 临床标本 GP5+/GP6+通用引物 PCR 扩增结果

M: DL2000 DNA Marker; B: 空白对照。

1~6: 宫颈病变组织;

3.2 HPV GP5+/GP6+ PCR 阴性标本的 DNA 质量鉴定

用 β -球蛋白的 PC04 和 PH20 引物扩增临床标本中 HPV GP5+/GP6+ PCR 阴性标本的 DNA, 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳观察, 均可见长度为 268bp 的扩增片段(图 15), 说明提取的这些标本 DNA 质量良好, GP5+/GP6+ PCR 阴性并非因标本 DNA 质量问题, 确属 HPV 阴性。

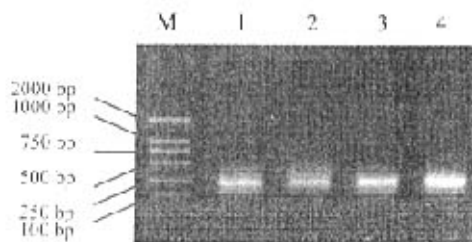


图 15 β -球蛋白引物扩增 HPV PCR 阴性标本 DNA

M: DL2000 DNA Marker; 1~4: GP5+/GP6+ PCR 阴性标本扩增结果(268bp)

3.3 标本 DNA TDI-FP 方法 HPV 分型结果

采用 HPV TDI-FP 分型方法完成了 182 例标本中 5 型 HPV 的检测。通用引物扩增标本 DNA 得到 PCR 产物后, 分别与 HPV6、11、16、18、58 型特异探针及荧光标记碱基反应。TAMRA FP 值增高, 表明发生了特异的探针杂交反应和预期的碱基 TAMRA-ddTTP 掺入, 分别对应 HPV6、11、16 和 18 型; R110 FP 值增高, 表明碱基 R110-ddGTP 掺入, 对应 HPV58 型; 两者的 FP 值均未增高, 则表明没有发生特异的探针杂交反应及特异碱基掺入延伸反应, 为空白对照或表示标本中无此 5 型 HPV 感染; 如果相应型别 FP 值均增高, 则表明 HPV 混合感染 (图 16)。

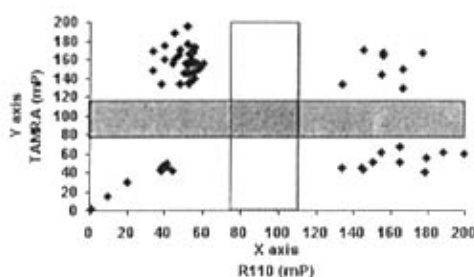


图 16 标本 DNA HPV TDI-FP 分型结果

图中左上象限内表示 HPV6、11、16 和 18; 右下象限表示 HPV58;
右上象限表示混合感染; 左下象限空白对照及 R110/TAMRA 均未增高者。

表 5 宫颈病变组织 HPV 基因分型*

病 变	HPV6	HPV11	HPV16	HPV18	HPV58	混合型	未知型
慢性宫颈 29/73 例	8 27.6%	9 31.0%	9 31.0%	3 10.3%	2 6.9%	4 13.8%	4 13.8%
癌前病变 51/68 例	4 7.8%	5 9.8%	26 51.0%	11 21.6%	7 13.7%	5 9.8%	4 7.8%
浸润癌 35/41 例	2 5.7%	1 2.9%	24 68.6%	8 22.9%	5 14.3%	4 11.4%	1 2.9%

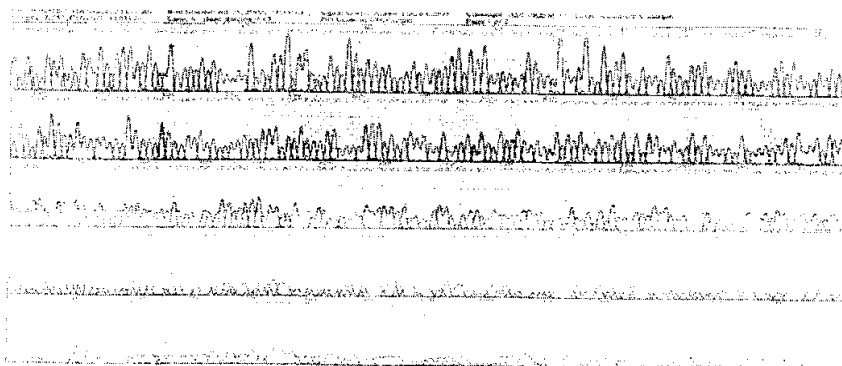
*1 由于存在混合感染, 各型 HPV 的百分率之和可大于 100%;

2 未知型指在本 5 型探针可检测范围之外的 HPV。

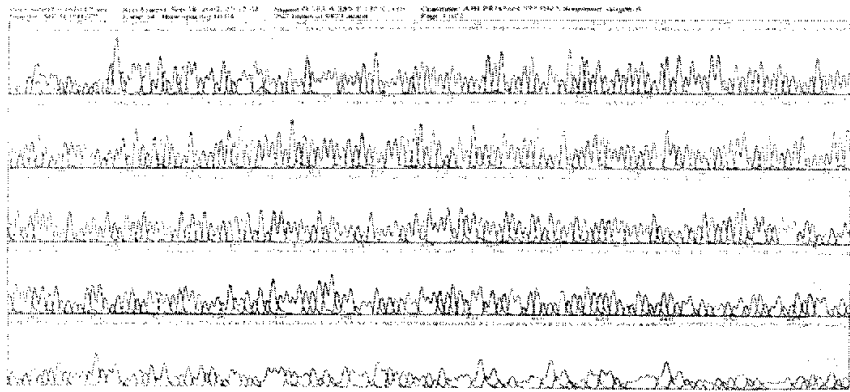
从图 16 可见, FP 值集中在 4 个区域: 空白对照和 5 型之外的 HPV 感染 (记录为 HPV X), 因无此 5 型 HPV 型特异性探针杂交反应发生, R110 和 TAMRA 值均未增高, 位于图的左下象限; HPV6、11、16 和 18 型位于左上象限, TAMRA 值增高, HPV58 型位于右下象限, R110 值增高; 而位于右上象限的标本, R110 和 TAMRA 值均增高, 则表明存在 HPV 混合感染。HPV 分型结果见上表 5。HPV 16 是三组病例中单纯或混合感染中最常见的型别, HPV58 是宫颈癌中第三种常见型别。HPV16、18 和 58 三者共占癌前病变和宫颈癌中所检出的 HPV 的 83.1% 与 92.3%, 明显高于慢性宫颈炎中的比例 45.2%, 差异有显著性 ($p < 0.01$)。HPV16 感染共 59 例, 其中单纯 HPV16 感染 53 例, 包括慢性宫颈炎 7 例, 癌前病变 23 例及浸润癌 23 例。

3.4 标本 TDI-FP HPV 分型结果的测序验证

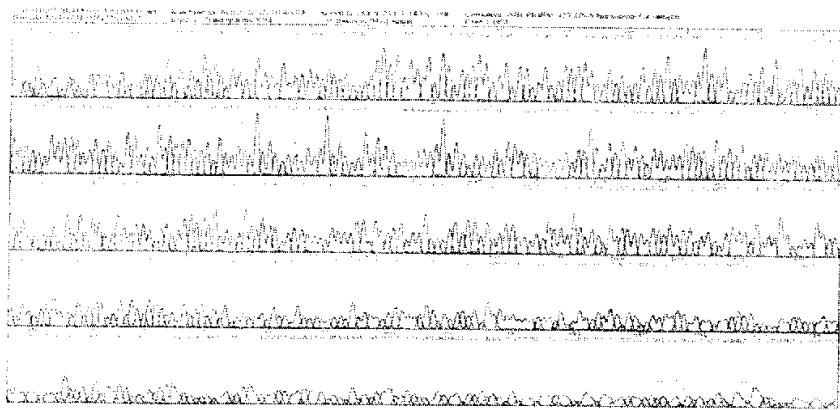
从 HPV TDI-FP 分型检测结果阳性的标本中随机选择 20 例标本, 经 GP5+/GP6+ PCR 扩增后产物克隆入 pGEM-T easy 载体, 每份挑选 2 个经鉴定的阳性克隆, 由上海博亚生物技术有限公司进行测序, 和 TDI-FP 检测结果相比较, 两者的符合率为 100%。但是由于每份标本仅挑取了两个克隆测序, 不易覆盖所有可能的基因型, 因此测序不适于对混合感染的检测, 本测序标本中未检出 1 例混合感染患者。部分标本测序结果见图 17。



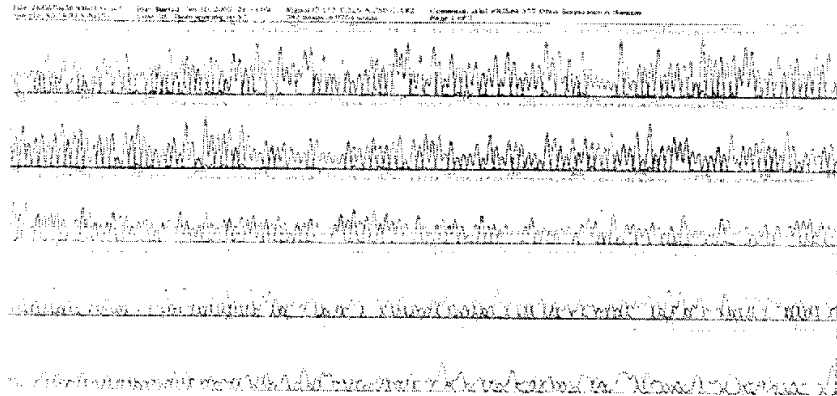
HPV 6 阳性标本测序结果



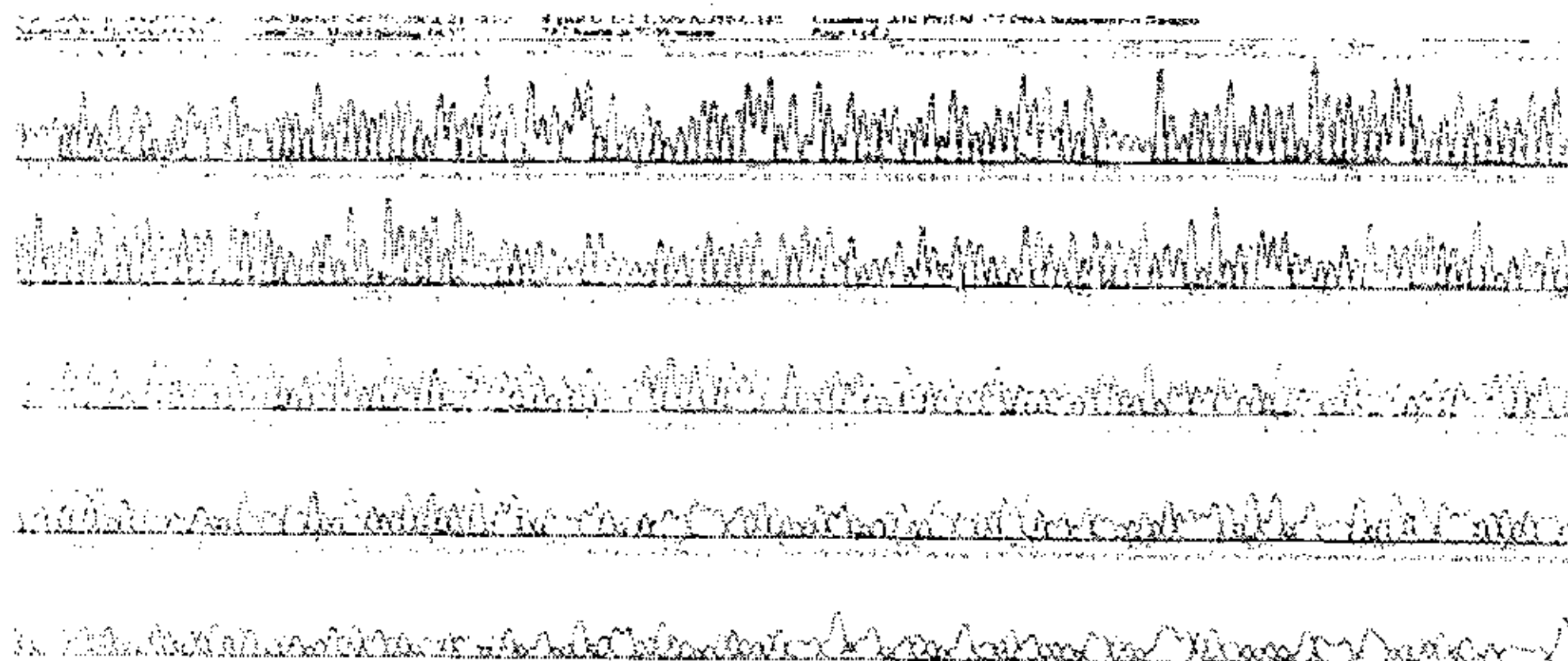
HPV 11 阳性标本测序结果



HPV 16 阳性标本测序结果



HPV 18 阳性标本测序结果



HPV 58 阳性标本测序结果

图 17 部分 HPV TDI-FP 分型标本测序结果

三 讨论

HPV 型别众多, 对 HPV DNA 的检测, 既需广谱又要求具有型特异性。杂交捕获、Southern 杂交、斑点杂交、狭线杂交、特异型探针及特异引物已广泛应用于 HPV 研究, 但由于只能检测到有限数量型别, 需多重杂交反应、对同一样本中多种基因型检测敏感性不高、需多重 PCR, 不能常规应用^[102]。通用引物系统因可检测广谱 HPV 型, 应用更为广泛。

目前常用的通用引物系统针对的是各型 HPV L1 基因内的序列^[100,103,104], 通用引物可以和多型 HPV 具有多态性区域两侧的高度同源序列结合, 既可检测广谱的 HPV 又能通过扩增区内的多态性序列而确定 HPV 型别。最常用的通用 PCR 系统是 MY09/11、GP5+/6+和 SPF1/2^[25]。

(1) MY09/11 PCR 系统: 1989 年 Manos 等^[105]通过对各型 HPV 序列的分析, 设计了 HPV 通用引物 MY09/11, 它能扩增多型 HPV 基因, 长度为 450bp, 用于检测广谱 HPV。但对临床标本的检出效率、敏感性偏低, 因此在临床诊断中的应用受到限制, 但为其它敏感度更高、扩增片段更短的通用引物系统的发展奠定了基础。(2) GP5/6 PCR 和 GP5+/6+ PCR 系统: 1990 年 Snijders 等^[106]

依据对各型 HPV 开放读框序列设计出两套通用引物：GP5/6 和 GP11/12、两对 20 个 bp 的引物；两套引物能特异扩增各型 HPV 的 140~150bp 片段。这两套引物成功地用于对宫颈癌细胞系和临床标本广谱 HPV 的检测，并具有较强的特异性，与载体 DNA 无交叉反应，敏感度达亚 pg 水平。1995 年 de Rode Husman 等^[100]在 GP5/6 引物 3' 端加上高度保守的 3 个碱基，建立了 GP5+/6+ PCR 系统，对 HPV 的检测更广谱、敏感性增加了 10~100 倍，HPV 阳性率从 39% 增加到 43%。(3) SPF1/2 PCR 系统：由于 PCR 酶促反应利于短小片段，为提高敏感度，1998 年 Kleter 等^[103]设计了另一套引物，仅扩增 65bp 短片段，与以上两 PCR 系统扩增的大片段相比，敏感性更高。该系统可用于细胞刮片、石蜡切片等多种标本类型，检测至少 43 个 HPV 基因型。但由于 PCR 片段过短，不适于根据其扩增区内的多态性设计分型检测的特异探针。

通用引物扩增后，可通过测序^[93]、Southern 点杂交^[100]、EIA^[107]、型特异性 PCR^[108]及探针杂交^[109]或狭线杂交^[110]进一步区分 HPV 型别，但这些方法都各具优缺点^[93]，仍需要更适用的 HPV 检测及分型新方法。

本研究 HPV 荧光偏振分型检测方法是基于 TDI-FP 原理设计的。TDI-FP 的适宜 PCR 片段大小在 80~1000bp 之间，最佳为 80~200 bp，研究证明 TDI-FP 方法具有以下优点：(1)通过引物扩增、探针杂交及荧光标记碱基掺入三重把关，能够确保反应较普通杂交更准确、特异；(2)不需要任何标记的引物，成本低；(3)单碱基掺入反应 (TDI) 条件容易优化；(4)用荧光偏振做为检测方式，FP 值大小与荧光强度无关；(5)偏振值检测直接在溶液中进行，不需要分离未结合的标记 ddNTPs，测定在溶液中进行可达到真正的平衡；(6)能满足从小规模的实验研究到全自动高通量的大规模检测需要^[111]。因而具有简便、快捷、准确及高

通量等特点。

由于该方法具有很高的特异性和敏感性，而且操作简单，可以实现自动化和高通量检测，同时在实验过程中没有用放射性同位素等对人体有害的试剂，已被广泛用于人类 SNPs 的检测^[91,94]。其在研究病原微生物基因突变、药物基因组学等方面都具有广阔的应用前景。

本研究中 GP5+/6+PCR 产物长 150bp，是应用 TDI-FP 原理进行 HPV 分型的理想片段，其两引物之间的序列在各型 HPV 中具有的多态性，又有利于型特异性探针设计和便于优化、提高 TDI-FP 实验的特异性。

本研究结合中国人群中 HPV 的感染特点，选择了常见的 HPV6、11、16、18 和 58 型作为分型研究对象。首先以 5 型 HPV L1 克隆重组质粒为模板，确立优化了各种最佳条件，然后在临床标本 HPV 分型检测中，将这些测序证实的重组质粒作为阳性对照，并加用空白对照从而确保实验的准确性和严密性。对本分型系统中的 PCR 体系与条件、消化时 PCR 产物的浓度、探针杂交及延伸反应条件等均进行了优化。

将已知型别 HPV 的 PCR 产物与其它型别的特异探针和标记碱基进行反应，均无 FP 值的增高，说明检测特异性高，各型之间无交叉反应。而且通过将各型 PCR 产物混合后的检测，发现该方法在病毒含量存在一定差异时也可检出混合感染，进一步证实了其特异性。

对宫颈病变组织应用此方法进行 HPV 分型检测后，随机对 20 例 PCR 产物进行测序分析验证 TDI-FP 结果。两种检测结果符合率为 100%。支持了其它学者的 TDI-FP 研究的验证结果^[94]。

本研究基于 TDI-FP 这一新兴的高通量基因检测技术建立的 HPV 分型新方法，只需一次扩增，即可检测 5 个常见的、覆盖 95%以上 HPV 感染患者的高、低危型 HPV，并能检测多重感染，

集快速、可靠、敏感、特异于一体，从而更适用于大规模临床筛选和临床上广泛应用。而且，如欲通过本方法增加检测的 HPV 型别，只需依据 GP5+/6+ PCR 产物内的多态性增加 HPV 型特异探针与相应荧光素标记碱基即可。

高危 HPV 持续性感染发生于宫颈癌癌前病变 CIN 之前，是 CIN 发生和进展的必要条件^[112]。低危型 HPV 导致的部分 CIN I 和 CIN II 极少发展到 CINIII 或浸润癌。因此高危型 HPV 感染强烈预示 CIN 的存在。高危型 HPV 感染进一步分型，有利于掌握更多的疾病相关信息，对宫颈癌诊断、预防及治疗的研究有重要价值。

通过该 HPV 分型系统在宫颈病变标本中的应用发现 HPV 在我国陕西地区宫颈癌的感染率为 85.4%，其中高危型 HPV 占有所有检出的 HPV 型别 83.7%，同其它人群一样，我国宫颈癌妇女 HPV 感染以 16 型为主，感染率 50% 左右，与其它报道类似^[45]。本组慢性宫颈炎患者中的感染率为 37.0% (27/73)，但其中的 HPV 48.1% (13/27) 为高危型 HPV，提示这些妇女存在患宫颈癌的危险，须加强对这些妇女的监测。本研究还发现高危型 HPV58 在两组宫颈病变中都不少见，仅次于 HPV16 和 HPV18。HPV58 型也在我国台湾、上海和香港^[113] 的妇女中，尤其宫颈癌患者中的感染率也相对较高，今后的我国 HPV 研究中值得关注。

用该 HPV 分型检测系统筛查补充传统的细胞学普查，对确定高危人群、预警 HPV 相关的细胞癌变，及时发现和预防、治疗早期癌变都十分关键。

第二部分

HPV16E7 和 H-ras 基因点突变检测系统的建立和应用

引言

HPV16 属于高危型病毒, 在 HPV 相关恶性病变中感染率最高, 宫颈癌组织中的检出率达 50%, 在宫颈癌等疾病的发生中起着重要作用。HPV16 E7 蛋白是肿瘤细胞转化的主要癌蛋白, 通过失活肿瘤抑制蛋白 Rb 而发挥转化作用。HPV16E7 蛋白 N 端区具有强抗原性, 其中 21~29 位氨基酸介导 pRb 抑癌蛋白的结合, 是与 pRb 结合的最关键位点。E7 基因第 647 位 A→G 突变导致表达产物第 29 位氨基酸由天门冬酰胺变为丝氨酸, 将影响 HPV 的转化作用和免疫原性等生物学特性。

H-ras 12、13 和 61 位密码子在癌组织中明显高于正常组织中的突变率。ras 基因中最常见的突变是 H-ras 第 1698 位核苷酸(第 12 位密码子)的 G→T(Gly→Val, 甘氨酸→缬氨酸)点突变。研究提示发生此位点突变的个体倾向于癌变或处于易感状态。

目前研究认为以上两突变的出现有助于进一步确定倾向癌变的超高危人群, 如宫颈组织检测到 HPV16 感染又有 E7 及 H-ras 的突变则提示患者有恶变的可能应早期采取干预措施。但目前大多数基因突变检测方法不同程度地存在通量低、成本高等不足。

本部分研究建立和验证了快速、高通量、敏感的基因突变检测新方法, 并应用其分析了本研究样本中我国陕西省宫颈病变中两突变的发生情况, 旨在高危 HPV 分型的基础上检测恶变相关基因点突变以进一步确定可能发展至癌变的危险程度。结果表明该点突变系统对于 HPV 相关恶变疾病的筛查预警、指导治疗提供了有效的检测技术平台。

一 实验材料和方法

1 实验材料

1.1 主要实验仪器 同第一部分。

1.2 分子生物学试剂

1.2.1 主要工具酶及生化试剂 同第一部分。

1.2.2 试剂盒

荧光偏振试剂盒: AcycloPrime™-FP SNP Detection Kit G/T 和 C/T, 美国 PerkinElmer 公司。余同第一部分。

1.2.3 菌株和质粒 同第一部分。

1.3 分析软件 同第一部分。

1.4 研究对象

选取第一部分实验确定的单纯 HPV16 阳性的浸润癌 53 例, 其中慢性宫颈炎 7 例, 低度鳞状上皮内病变 (LG-SIL) 13 例, 高度鳞状上皮内病变 (HG-SIL) 10 例, 浸润癌 (ICC) 23 例。

2 实验方法

2.1 HPV16E7 和 H-ras 基因点突变的系统的建立和应用

2.1 HPV16E7 和 H-ras TDI-FP 点突变方法的建立及优化

2.1.1 HPV16E7 和 H-ras 基因的克隆

2.1.1.1 HPV16E7 和 H-ras 基因扩增引物设计

根据 GenBank 中 HPV16 序列 (NC-001526) 和 H-ras 序列 (J00277) 由软件 DNASTar 设计了两基因 PCR 扩增区域中上下游引物和特异的单链荧光掺入引物。由北京赛百盛公司合成。引物序列、位置及 PCR 产物长度见表 6。

表 6 HPV16E7 和 H-ras 基因引物序列、位置及产物长度

名称	引物	序列 (5'→3')	引物位置(nt)	产物长度 (bp)
16E7	F	<i>ttagatttgcaaccagagaca</i>	598—618	168
	R	<i>actctacgcttcgggtgtgc</i>	765—746	
	TDI	<i>tgacagctcagaggaggag</i>	666—648	
H-ras	F	<i>ctgaggagcgaatgacggaata</i>	1654—1674	237
	R	<i>gagacagggccacagcaccat</i>	1890—1870	
	TDI	<i>tggtgggtgggtgggcgccg</i>	1680—1697	

2.1.1.2 PCR 扩增标本中 HPV16E7 和 H-ras 基因

扩增总体系均为 25 μ L, 其中上下游引物各 0.25 μ mol/L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L, MgCl₂ 3.0mmol/L, dNTPs 150 μ mol/L, 模板 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 1.0u。HPV16E7 基因扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 5min, 然后 94 $^{\circ}$ C 40sec, 53 $^{\circ}$ C 30sec, 72 $^{\circ}$ C 40sec, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。空白对照中采用无菌去离子水代替标本 DNA。共扩增 HPV16 阳性标本 7 例。H-ras 基因扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 5min, 然后 94 $^{\circ}$ C 40sec, 62 $^{\circ}$ C 30sec, 72 $^{\circ}$ C 40sec, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。取 10 例宫颈癌标本为模板。

2.1.1.3 扩增产物的观察与鉴定、回收、与载体连接、转化及鉴定过程除 PCR 条件外同第一部分 2.2.3~2.2.8。

2.1.2 HPV16E7 和 H-ras 突变检测体系的优化

影响 TDI-FP 方法检测结果的主要因素是 PCR 产物的浓度, 参照分型实验部分的实验结果确立了最佳的 PCR 条件, 用上述的重组质粒建立了系统对照。(每个反应重复两次)。

具体实验过程如下:

2.1.2.1 扩增 HPV16E7 和 H-ras 基因

用含 HPV16E7 和 H-ras 未突变与突变基因的重组质粒模板 1 μ L(原液 100 倍稀释)。扩增条件同上 2.1.1.2。

2.1.2.2 扩增产物的消化 同第一部分 2.3.2。

2.1.2.3 TDI 掺入反应

HPV16E7: 所用终止子为 R110-ddCTP/TAMRA-ddTTP。反应条件: 95℃ 预变性 2min 后, 30 个循环: 94℃ 15sec, 54℃ 30sec, 最后 15℃ 延伸 10min。

H-ras: 所用终止子为 R110-ddGTP/TAMRA-ddTTP。反应条件: 95℃ 预变性 2min 后, 30 个循环: 94℃ 15sec, 58℃ 30sec, 最后 15℃ 延伸 10min。其它反应条件同第一部分 2.3.3。

2.1.2.4 荧光偏振检测 检测方法同第一部分 2.3.4。

2.2 HPV16E7 和 H-ras 突变检测系统在临床标本的应用及验证

2.2.1 PCR 扩增标本中 HPV16E7 基因和 H-ras 基因

分别取标本 DNA 5μL 为模板, 空白对照中采用无菌三蒸水代替 DNA, 相应型 HPV16 和 H-ras 对照用前面建立的质粒为模板。其余 PCR 条件同前 2.1.1.2。

2.2.2 标本 PCR 产物的 TDI 反应和 FP 检测

PCR 产物的消化及特异性探针杂交和荧光标记碱基的末端掺入反应及 FP 检测同上 2.1.2.1~2.1.2.4。

2.2.3 TDI-FP 方法检测标本突变结果的测序验证

随机挑选 HPV16E7 突变与未突变标本各 5 例, 因 H-ras 突变的标本中存在正常的 H-ras, 因此需挑取多个克隆才能获得突变克隆, 故只随机择挑选了 5 例未突变进行测序, 同上 2.1.1 操作, 将其电泳分离、回收克隆入 pGEM-T easy 载体中, 每份挑选 2 个经氨苄青霉素抗性、蓝白筛选, 以及 PCR 扩增鉴定的阳性克隆, 由上海博亚生物技术有限公司 PE ABI377 自动测序仪测序。

2.3.4 结果的统计学处理

采用 χ^2 检验比较对照和病例组基因突变的差别, 用比数比 (OR) 和 95% 可信区间 (95%CI) 来估计组间相关程度。所有数据均由 SPSS10.0 统计分析软件包处理。P<0.05 差异有显著意义。

二 实验结果

1 HPV16E7 和 H-ras TDI-FP 突变检测系统的建立及优化

1.1 HPV16E7 和 H-ras 基因的克隆

1.1.1 HPV16E7 基因的克隆结果

1.1.1.1 PCR 扩增标本中 HPV16E7 基因

以 HPV16 阳性标本为模板 PCR 产物 10 μ L 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果如图 18。PCR 片段长度为 168bp。

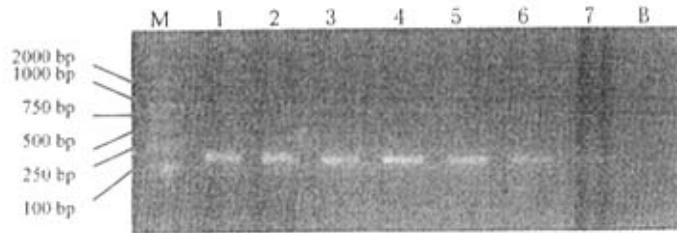


图 18 标本中 HPV16 PCR 结果

M: DL2000 DNA Marker B: 空白对照

1~7: 标本 HPV16 PCR 结果

1.1.1.2 HPV16E7 T-easy 重组质粒为模板的 PCR 产物电泳结果如图 19

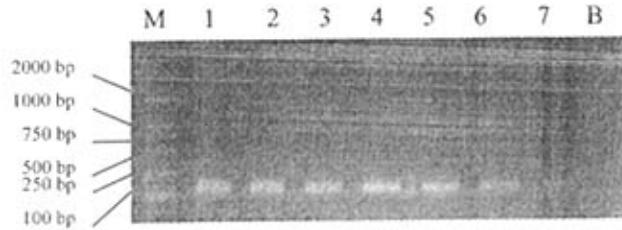


图 19 HPV16E7 基因克隆重组质粒 PCR 鉴定结果

M: DL2000 DNA Marker B: 空白对照 1~7: HPV16E7 重组质粒 PCR 结果

1.1.1.3 HPV16E7 克隆基因的测序结果

挑取的 7 个克隆测序结果显示, 克隆重组质粒中插入基因的

长度是 168bp。其中有 2 个标本的 HPV16E7 基因 647 位点发生了 A→T 的点突变，其余 5 个未突变。（如图 20,21）

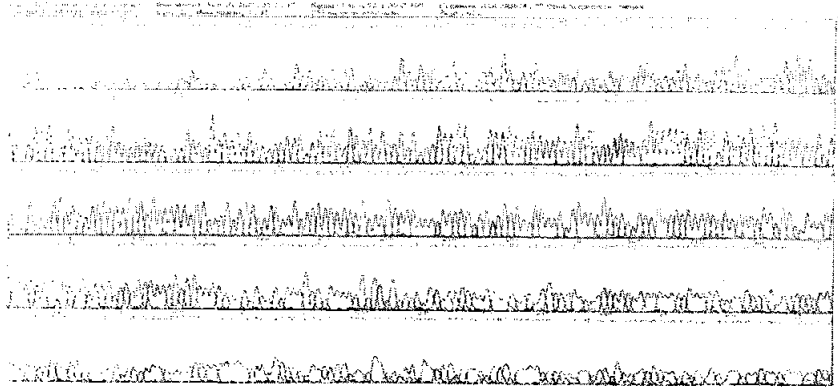


图 20 HPV16E7 基因克隆的序列测定(未突变)

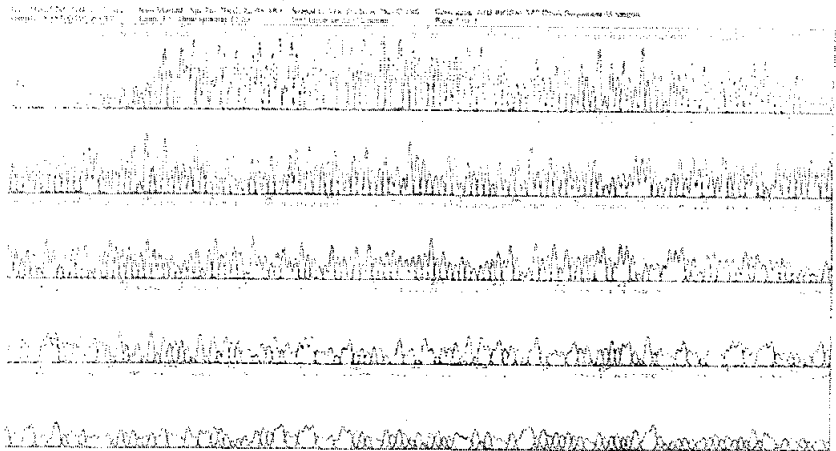


图 21 HPV16E7 基因克隆的序列测定(突变)

1.1.2 H-ras 基因的克隆结果

1.1.2.1 PCR 扩增标本中 H-ras 基因

用 PCR 产物 10 μ L 进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳，结果如图 22。PCR 片段长度为 237bp。

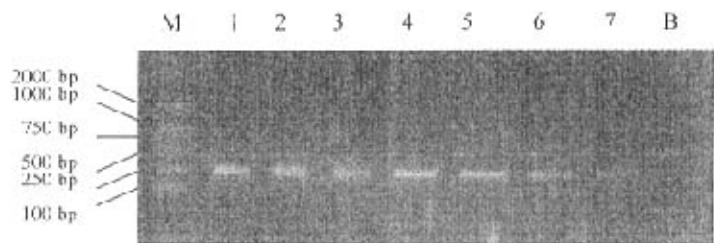


图 22 标本中 H-ras PCR 结果

M: DL2000 DNA Marker B:空白对照

1~7: 标本 H-ras PCR 结果

1.1.2.2 H-ras 基因的克隆鉴定

H-ras T-easy 重组质粒的 PCR 产物电泳结果 237bp 长 如图 23

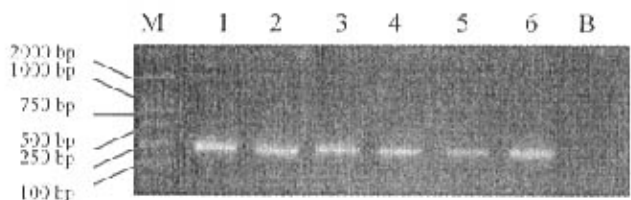


图 23 H-ras 基因克隆重组质粒 PCR 鉴定结果

M: DL2000 DNA Marker B: 空白对照

1~6: H-ras 重组质粒 PCR 结果

1.1.2.3 H-ras 克隆基因的测序结果

结果显示，克隆重组质粒中插入基因长度是 237bp。标本中有 3 例发生了 G→T 突变，其它为未发生突变。测序结果见（如图 24, 25）。

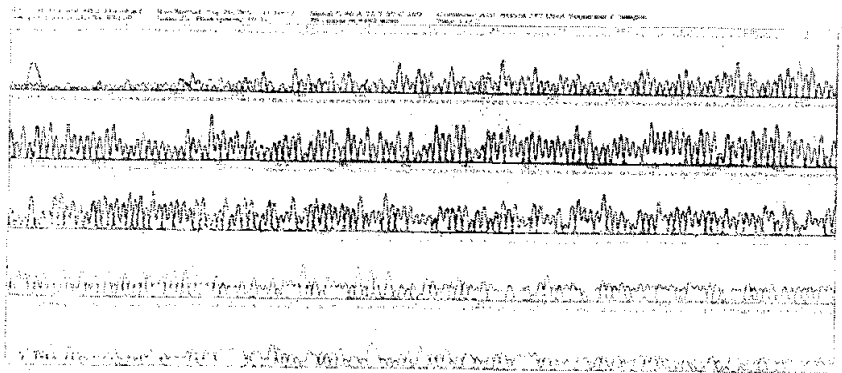


图 24 H-ras 基因克隆的序列测定(未突变)

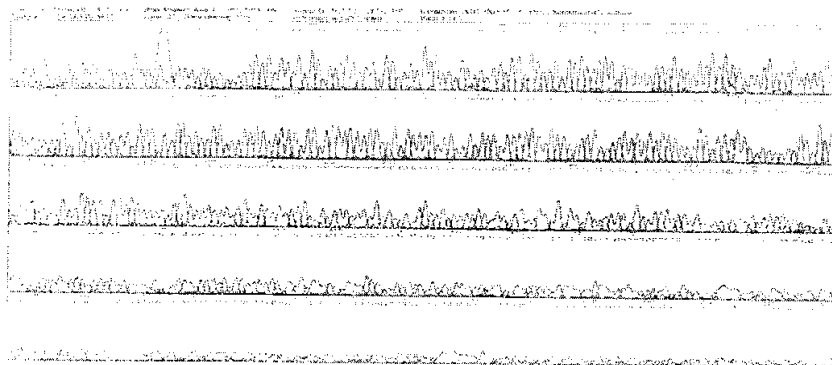


图 25 H-ras 基因克隆的序列测定(突变)

1.2 点突变检测体系对照的优化结果

将上述 HPV16E7 和 H-ras 突变与未突变克隆质粒为模板 PCR 产物中余留的引物及 dNTPs 消化后, 分别与特异性探针及荧光标记碱基混合反应, Victor2 Multilabel Counter 进行 FP 检测。发生了相应的特异碱基掺入延伸反应, R110 或 TAMRA FP 值升高, 空白对照则 R110 及 TAMRA FP 值均未升高, 表明未发生特异的杂交反应及继之的特异碱基掺入延伸反应, 从而判断是否突变。结果如图 26 所示(每份标本重复两次)。

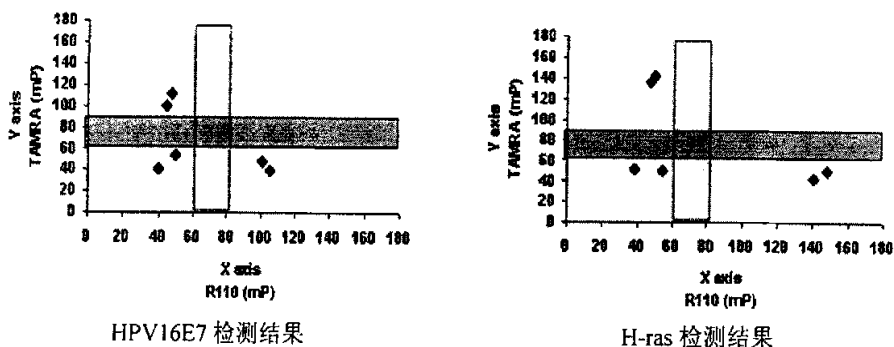


图 26 HPV16E7 与 H-ras 系统优化结果

从上图结果可见, 无错误掺入, 与预期结果相一致。

2 临床标本中 HPV16E7 和 H-ras 突变检测结果

2.1 标本 DNA TDI-FP 方法 HPV16E7 突变检测结果

2.1.1 HPV16E7 突变检测结果

应用 HPV TDI-FP 突变检测方法完成了 53 例标本 HPV16E7 突变的检测。HPV16E7 特异性引物扩增标本 DNA 得到 PCR 产物后，分别与特异探针及荧光标记碱基混合反应。根据 TDI-FP 原理，R110-ddCTP 和 TAMRA-ddTTP 掺入时其各代表的偏振值 (FP) 将增高。经检测有 15 例标本的结果位于散点图右下象限，表示 ddCTP-R110 掺入，即 A→G 突变；38 例标本结果位于左上象限表示有 ddTTP-TAMRA 掺入，无突变；空白对照结果位于左下象限，表示无终止子掺入。如图 27

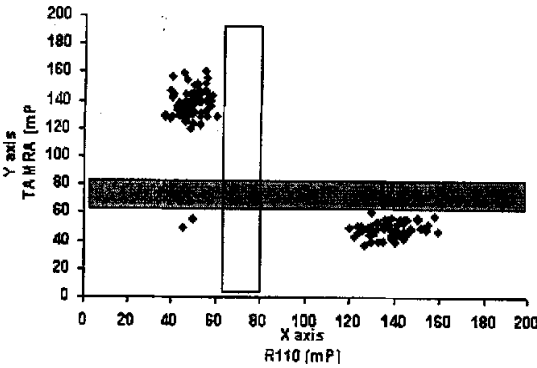


图 27 标本中 HPV16E7 基因突变检测结果的散点图

2.1.2 突变检测结果统计分析

表 7 标本中 HPV16E7 基因 647 点突变的分析

Sample	Control		Case		P*值	OR	95%CI
	Benign	LG-SIL	HG-SIL	ICC			
E7 647	n=7	n=13	n=10	n=23	0.021	5.85	1.16~29.54
A→G	0	2	3	10			

Note: * $\chi^2=5.302$

2.1.3 标本 TDI-FP HPV 检测结果的测序验证

随机选择 10 例 HPV TDI-FP 分型检测出的 HPV16 感染阳性标本, 将其 PCR 扩增产物克隆入 pGEM-T easy 载体中进行测序, 确定 HPV16E7 647 位点突变情况, 与 TDI-FP 检测结果比较, 两者的符合率为 100%。部分标本测序结果见图 28,29。

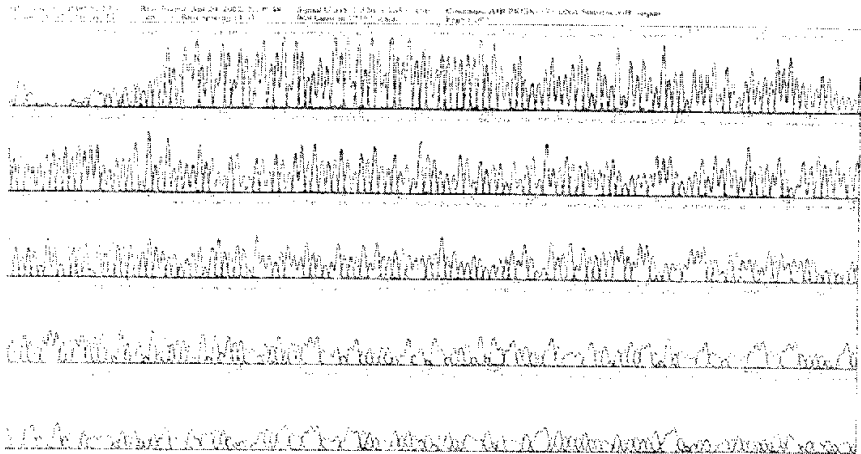


图 28 HPV16E7 TDI-FP 检测标本的测序结果(未突变)

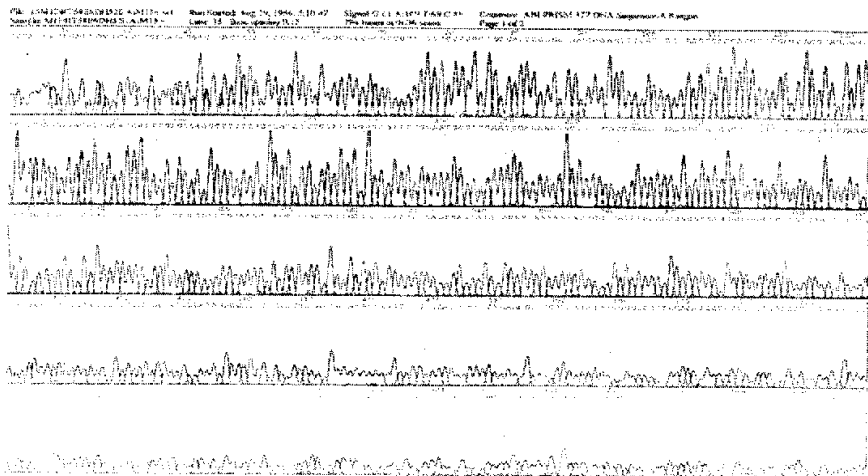


图 29 HPV16E7 TDI-FP 检测标本的测序结果(突变)

2.2 H-ras 突变检测系统在临床标本中的应用

2.2.1 H-ras 突变检测结果

应用 H-ras TDI-FP 突变检测系统完成了 53 例标本 H-ras 突变的检测。根据 TDI-FP 原理，R110-ddGTP 和 TAMRA-ddTTP 掺入时其各代表的偏振值 (FP) 将增高。图 30，由于标本中同时有 H-ras 正常和突变两种基因，位于散点图右下象限的 45 例标本表示 ddGTP-R110 掺入，无突变；8 例标本结果位于右上象限，ddGTP-R110 掺入的同时又有 ddTTP-TAMRA 掺入，表示内含 G→T 突变的细胞；空白对照结果位于左下象限，表示无终止子掺入。

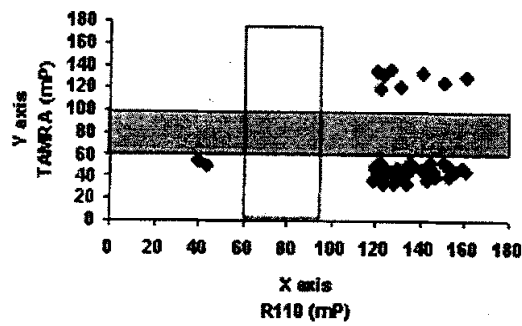


图 30 标本中 H-ras 基因突变检测结果的散点图

2.2.2 突变检测结果统计分析

表 8 标本中 H-ras 基因 1698 点突变的分析

Sample	Control		Case		P*值	OR	95%CI
	Benign	LG-SIL	HG-SIL	ICC			
nt1698	n=7	n=13	n=10	n=23	0.229	5.12	0.58~45.13
G→T	0	1	1	6			

Note: $\chi^2=1.446$

从表 8 可见对照与病例组 H-ras 1698 位的突变统计学差异不显著，但宫颈癌中突变率明显高于癌前病变 (26.09%~8.70%) 和慢性宫颈炎组织。

2.2.3 标本 TDI-FP H-ras 检测结果的测序验证

随机选择 5 例 H-ras TDI-FP 检测突变的标本, 将其 PCR 扩增产物克隆, 测序后结果与 TDI-FP 检测结果比较, 两者的符合率为 100%。部分标本测序结果见图 31,32。

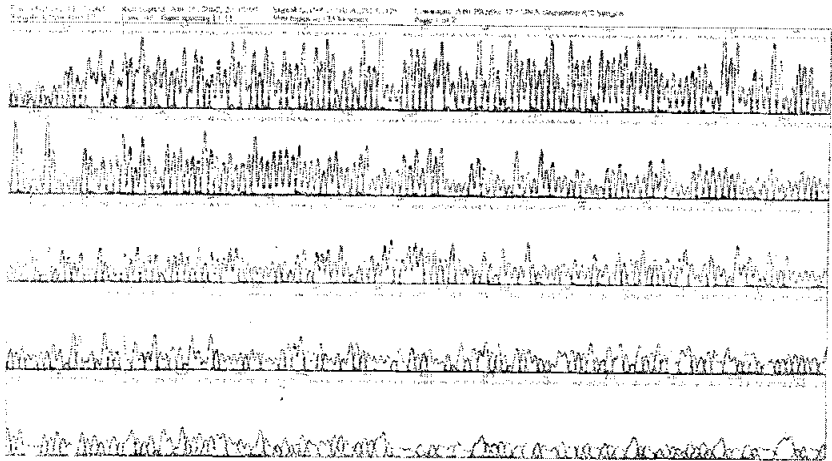


图 31 H-ras TDI-FP 检测标本的测序结果(未突变)

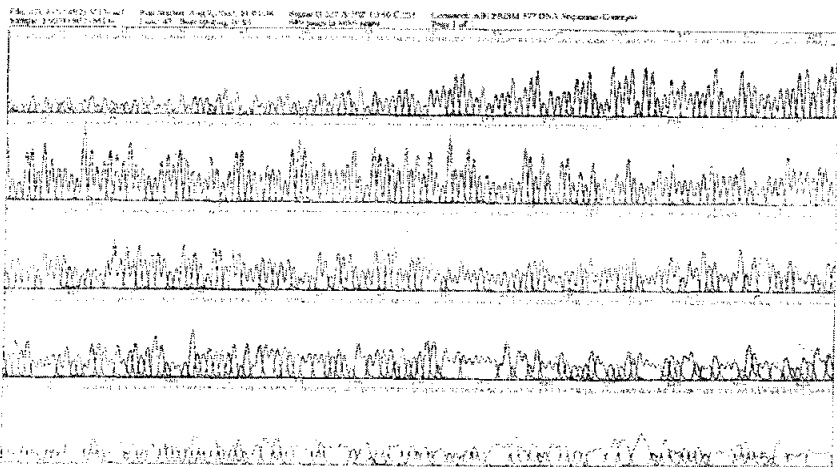


图 32 H-ras TDI-FP 检测标本的测序结果(突变)

三 讨 论

本研究部分在 TDI-FP 技术的基础上建立了 HPV16E7 647 位和 H-ras 1698 位点突变检测系统,它是 PCR 技术与荧光偏振技术的有机结合而形成的一种新的基因变异分析方法。在 PCR 高特异性的基础上荧光偏振检测方法又极大地提高了 TDI 方法的敏感性。荧光偏振方法适用于 DNA 与 DNA、蛋白质与 DNA、蛋白质与多肽、蛋白质与蛋白质等生物分子之间的相互作用。目前 TDI-FP 已经用于基因组单核苷酸多态性(SNP)和单体型等研究领域。

随着人类基因图谱草图的公布和各种病原体基因序列的揭示,这都将极大的促进疾病相关基因的结构和功能研究,特别是基因缺失、错位、突变(有义突变)等与疾病的关系。PCR 扩增技术问世以来,建立于扩增基础上的突变检测技术使检测靶 DNA(目的 DNA)含量和/或突变靶序列比例过低、检测灵敏度不足等难题得以克服,使得分子诊断技术进入了新阶段。在过去十多年中,出现了诸如经典的 PCR-RFLP、ASO 以及 OLA、COP、PEX 等点突变的检测方法及近年来的反向限制性位点突变分析(iRSM)、荧光 PCR(SYBR Green I 结合熔解曲线分析技术、荧光共振能量转移结合探针熔解曲线分析技术)、基因芯片、等位基因特异性扩增技术(ASPCR)等检测手段。

TDI-FP 技术是一种全新的基因突变分析技术,用于基因点突变的检测有突出的优点,首先它的特异性和敏感高:引物扩增、探针杂交及荧光标记碱基掺入三重把关保证了其高特异性与敏感性。其次是检测系统容易建立和优化,检测快速且通量高,一天之内可以完成数千个位点分析。另外引物不需要特殊修饰,操作简便,所以成本低廉。因而具有简便、快捷、准确及高通量等特点。

我国人群高危 HPV 感染型别中也以 HPV16 为主,各早晚期

基因均存在不同形式的突变。其中 HPV16E7 蛋白 N 端区的 21~29 位氨基酸介导 pRb 抑癌蛋白的结合,是与 pRb 结合的最关键位点。E7 和 Rb 蛋白之间的相互作用是恶性转化的最重要机制。HPV16 E7 基因第 647 位 A→G 突变将改变其生物学功能如结合 pRb 的能力,影响 HPV 的转化作用和免疫原性等生物学特性。在韩国的一项研究中发现该突变与对照组相比有差异,本研究发现其在宫颈癌中突变率为 43.48%,和国外及香港均有差别,而且突变率随病变程度的升高而增加,提示该突变可能是 HPV 致癌的一个高危因素。

国内外很多研究都提示 ras 基因突变与肿瘤密切相关。ras 家族基因第 12 位、13 位及 61 位密码子的点突变可使其获得转化细胞的能力。在人类肿瘤中 ras 基因激活是 12、13、61 位密码子单核苷酸替代的结果。它们能通过质量(突变)和数量(蛋白过表达)的改变机制获得转化能力。ras 癌基因广泛参与的人类癌症包括结肠、前列腺、胰腺、肺、膀胱、乳腺和卵巢等组织。目前有关 ras 基因突变在宫颈肿瘤形成中的作用研究结果不尽一致。本研究发现对照与病例组 H-ras 1698 位突变统计学差异不显著,但宫颈癌中突变率明显高于癌前病变(26.09%~8.70%)和慢性宫颈炎组织,实验结果提示两种突变合并出现进一步预警患者癌变的危险性,需要给予密切关注。统计学结果与样本量大小及分组方法直接相关,本研究因 HPV16 阳性标本数量有限,未作进一步的统计分析,只是初步进行了突变检测方法的应用和验证,利用该方法扩大恶变相关标记基因的数量和研究的人群将为疾病的筛查、预警提供更可靠的依据。

为了进一步准确地对宫颈癌高危人群进行确认和指导防治措施,在 HPV 分型的基础上利用 TDI-FP 技术对与宫颈癌进展有关的癌变相关点突变进行监测,以期获得更多的疾病相关信息。在系统建立过程中通过突变与未突变的质粒对点突变检测系统

进行优化，使系统能够有效稳定地工作。

本研究利用建立的突变检测系统对 53 例 HPV16 阳性的标本的 E7 基因进行检测发现突变 15 例，未突变 38 例。53 例 H-ras 基因进行检测发现突变 8 例，未突变 45 例，随机抽检经测序证明与点突变检测系统的结果相一致。

因此 TDI-FP 方法的特点是简单、准确、快速、自动化程度高，易于推广；操作过程中无污染。具有很大的应用和发展潜力，该方法在突变检测中将会发挥越来越重要的作用。

小 结

1 本研究在 TDI-FP 技术平台的基础上构建了快速、高通量的常见 HPV 荧光偏振分型检测系统,能够检测出 HPV6、11、16、18、58 型。以各型 L1 基因为模板,用 HPV 通用引物 GP5+/6+ 进行扩增,将模板介导的染料标记终止子掺入反应与荧光偏振检测技术相结合,应用探针杂交延伸反应对扩增产物进行 HPV 分型。并将该方法应用于 182 例宫颈病变标本进行 HPV DNA 分型,与 DNA 测序比较,二者对单一型 HPV 检出符合率为 100%,而对于 HPV 混合型感染,本方法优于测序。

2 在 TDI-FP 技术的基础上建立和优化了 HPV16E7 647 位与 H-ras 1698 位核苷酸点突变检测系统,并应用它们分别进行了 53 例 HPV16 阳性宫颈病变标本中两位点突变的检测。宫颈癌中 HPV16E7 647 位突变率为 43.48%,而且突变率随病变程度的升高而增加,提示该突变可能是 HPV 致癌的一个高危因素。H-ras 1698 位突变是提示癌变的高危信号,可作为 HPV 相关疾病恶变的辅助诊断分子标记。荧光偏振突变检测方法与测序相比检出符合率为 100%。高危 HPV16 感染患者进一步检测癌变相关基因的突变可以更早、更准确地预警癌变的发生。

3 以 TDI-FP 为基础的常见 HPV 分型和癌相关基因突变检测系统能够用于对 HPV 感染相关病变的筛查及相关恶变疾病的研究如对宫颈癌高危人群的筛查及确定超高危人群,是一种具有临床应用前景的高通量、快速、准确的基因检测分析方法,将为 HPV 相关疾病的研究与防治提供方便、实用的技术平台。

参 考 文 献

- [1] Scheffner M, Romanczuk H, Munger K, Huibregtse JM, Mietz JA, Howley PM. Functions of human papillomavirus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1994, 186: 83-99.
- [2] Sapp M, Volpers C, Muller M, Streeck RE. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J Gen Virol*, 1995, 76 (Pt 9): 2407-2412.
- [3] Chow LT, Broker TR. Papillomavirus DNA replication. *Interviol*, 1994, 37(3-4): 150-158.
- [4] Apt D, Watts RM, Suske G, Bernard HU. High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transformation correlate with the activation of the HPV-16 promoter. *Virol*, 1996, 224(1): 281-291.
- [5] Kurvinen K, Yliskoski M, Saarikoski S, Syrjanen K, Syrjanen S. Variants of the long control region of human papillomavirus type 16. *Eur J Cancer*, 2000, 36(11): 1402-1410.
- [6] Mohr IJ, Clark R, Sun S. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science*, 1990, 250: 1694-1699.
- [7] Yasugi T, Benson JD, Sakai H, Vidal M, Howley PM. Mapping and characterization of the interaction domains of human papillomavirus type 16 E1 and E2 proteins. *J Virol*, 1997, 71(2): 891-899.
- [8] Ustav E, Ustav M, Szymanski P, Stenlund A. The bovine papillomavirus origin of replication requires a binding site for the E2 transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1993, 90: 898-902.
- [9] Hudson JB, Bedell MA, McCance DJ, Laiminis LA. Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. *J Virol*, 1990, 64: 519-526.
- [10] Yoshinouchi M, Hongo A, Nakamura K, Kodama J, Itoh S, Sakai H, Kudo T. Analysis by multiplex PCR of the physical status of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers. *J Clin Microbiol*, 1999,

37: 3514-3517.

- [11] DooRbar J, Medcalf E, Naphine S. Analysis of HPV1 E4 complexes and their association with keratins in vivo. *Virol*, 1996, 218(1): 114-126.
- [12] Hwang ES, Nottoli T, Dimaio D. The HPV 16 E5 protein expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virol*, 1995, 211: 227-233.
- [13] Loignon M, Drobetsky EA. The initiation of UV-induced G (1) arrest in human cells is independent of the p53/p21/pRb pathway but can be attenuated through expression of the HPV E7 oncoprotein. *Carcinogenesis*, 2002, 23(1): 35-45.
- [14] Liu Y, McKalip A, Herman B. Human papillomavirus type 16 E6 and HPV-16 E6/E7 sensitize human keratinocytes to apoptosis induced by chemotherapeutic agents: roles of p53 and caspase activation. *J Cell Biochem*, 2000, 78(2): 334-349.
- [15] Crishi JF, Bone F, Balasubramanian S, et al. Suprabasal expression of the human papillomavirus type 16 oncoproteins in mouse epidermis alters expression of cell regulatory proteins. *Carcinogenesis*, 2000, 21 (5): 1031-1037.
- [16] Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, et al. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virol*, 1991, 185: 251-257.
- [17] Breitburd F, Kimbauer R, Hubbert NL, et al. Immunization with virus-like particles from cottontail papillomavirus can protect against experimental CRPV infection. *J Virol*, 1995, 69: 3959-3963.
- [18] Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill F, et al. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papilomas. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, 92:11553-11557.
- [19] Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med*, 1997, 102: 3-8.
- [20] Persson G, Andersson K, Krantz I. Symptomatic genital papillomavirus infection in a community – incidence and clinical picture. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1996, 75: 287-290.
- [21] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*,

- 1999, 189(1): 12-19.
- [22] John Cason, Jeremy N, Kaye, et al. Perinatal Infection and Persistence of Human Papillomavirus Types 16 and 18 in Infants. *J Med Virol*, 1995, 47: 209-218.
- [23] Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*, 2003, 16(1): 1-17.
- [24] Goodman A. Role of routine human papillomavirus subtyping in cervical screening. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2000, 12(1): 11-14.
- [25] Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet*, 1999, 354(9172): 20-25.
- [26] Meijer CJ, Snijders PJ, van den Brule AJ. Screening for cervical cancer: should we test for infection with high-risk HPV. *CMAJ*, 2000, 163(5): 535-538.
- [27] Bosch FX, De Sanjose S. Chapter 1: human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2003, 2003(31): 3-13.
- [28] zur Hausen H. Papillomavirus causing cervical cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(9): 690-698.
- [29] Cortes-Gutierrez EI, Cerda-Flores RM, Leal-Klevezas DS, Validating polymerase chain reaction for detecting HPV in cervical intraepithelial neoplasia. *Anal Quant Cytol Histol*, 2003, 25(2): 115-118.
- [30] Heldesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis*, 1994, 169: 235-240.
- [31] Kornegay JR, Shepard AP, Hankins C, et al. Nonisotopic detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens using a consensus PCR and a generic probe mix in an enzyme-linked immunosorbent assay format. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 3530-3536.
- [32] Clavel C, Rihet S, Masure M, et al. DNA-EIA to detect high and low risk HPV genotypes in cervical lesions with E6/E7 primer mediated multiply PCR. *J Clin Pathol*, 1998, 51: 38-45.

- [33] van den Brule AJC, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, et al. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 779-787.
- [34] Lizard G, Demares-Poulet MJ, Roignot P, et al. In situ hybridization detection of single-copy human papillomavirus on isolated cells, using a catalyzed signal amplification system: GenPoint. *Diagn Cytopathol*, 2001, 24(2): 112-116.
- [35] Hwang TS, Jeong JK, Park M, et al. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray. *Gynecol Oncol.*, 2003, 90(1): 51-56.
- [36] Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the worldwide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer*, 2002, 97: 72-81.
- [37] Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer*, 1999, 80(6): 827-841.
- [38] Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, et al. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer*, 2000;82:1332-1338.
- [39] Gregoire L, Lawrence WD, Kukuruga Det al. Association between HLA-DQB1 alleles and risk for cervical cancer in African-American women. *Int J Cancer*, 1994, 57(4): 504-507.
- [40] Hildesheim A, Schiffman M, Scott DR, et al. Human leukocyte antigen class I/II alleles and development of human papillomavirus-related cervical neoplasia: results from a case-control study conducted in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1998, 7(11): 1035-1041.
- [41] Ngan HY, Liu VW, Liu SS. Risk of cervical cancer is not increased in Chinese carrying homozygous arginine at codon 72 of p53. *Br J Cancer*, 1999, 80(11): 1828-1829.
- [42] Abba MC, Villaverde LM, Gomez MA, et al. p53 codon 72 genotypes in HPV infection and cervical disease. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003, 109(1): 63-66.
- [43] Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and

- p cervical neoplasia.
- Lancet Oncol*
- , 2002, 3(1):11-16.
- [44] Kurman RJ, Henson DE, Herbst AL, et al. Interim guidelines for management of abnormal cervical cytology. The 1992 National Cancer Institute Workshop. *JAMA*, 1994, 271(23): 1866-1869.
 - [45] Jastreboff AM, Cymet T. Role of the human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Med J*, 2002, 78(918): 225-228.
 - [46] Richart RM. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu*, 1973, 8: 301-328.
 - [47] Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*, 2002, 287(16): 2114-2119.
 - [48] Patnick J. Cervical cancer control in Europe. *CME J Gynec Oncol*, 2000, 5: 8-11.
 - [49] Ronnett BM, Manos MM, Ransley JE, et al. Atypical glandular cells of undetermined significance (AGUS): cytopathologic features, histopathologic results, and human papillomavirus DNA detection. *Hum Pathol*, 1999, 30(7): 816-825.
 - [50] Solomon D, Schiffman M, Tarone R, ALTS Study group. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(4): 293-299.
 - [51] Pisal N, Sindos M, Chow C, et al. Triage by HPV-DNA testing: is it useful in women with persistent minor smear abnormalities. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2003, 82(6): 575-577.
 - [52] Bollen LJ, Tjong-A-Hung SP, van der Velden J, et al. Prediction of recurrent and residual cervical dysplasia by human papillomavirus detection among patients with abnormal cytology. *Gynecol Oncol*, 1999, 72(2): 199-201.
 - [53] Petry KU, Menton S, Menton M, et al. Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients. *Br J Cancer*, 2003, 88(10): 1570-1577.
 - [54] Witt A, Hudelist G, Gregor H, et al. The detection of HPV DNA improves the recognition of cervical intraepithelial lesions. *Arch Gynecol*

- Obstet*, 2003, 268(1): 29-34.
- [55] Denise Zielinski G, Snijders PJ, Rozendaal L, et al. High-risk HPV testing in women with borderline and mild dyskaryosis: long-term follow-up data and clinical relevance. *J Pathol*, 2001;195(3):300-306
- [56] Wallin KL, Wiklung F, Angstrom T, et al. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N Engl J Med*, 1999;341:1633-1638.
- [57] Zehbe I, Tachezy R, Mytilineos J, Voglino G, Mikyskova I, Delius H, Marongiu A, Gissmann L, Wilander E, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes. *Int J Cancer*, 2001 Dec 1;94(5):711-6
- [58] Xin CY, Matsumoto K, Yoshikawa H, Yasugi T, Onda T, Nakagawa S, Yamada M, Nozawa S, Sekiya S, Hirai Y, Shiromizu K, Fujii T, Taketani Y. Analysis of E6 variants of human papillomavirus type 33, 52 and 58 in Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia/cervical cancer in relation to their oncogenic potential. *Cancer Lett*, 2001, Sep 10;170(1):19-24
- [59] Nindl I, Rindfleisch K, Lotz B, Schneider A, Durst M. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer*, 1999 Jul 19;82(2):203-7
- [60] Mark van Duin, Peter J.F. Snijders, Mireille T.M. Vossen, Erik Klaassen. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *Journal of General Virology*. 2000 (81):317-325.
- [61] Song YS, Kee SH, Kim JW, Park NH, Kang SB, Chang WH, Lee HP. Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women. *Gynecol Oncol*, 1997, Aug;66(2):275-81
- [62] Youk EG, Ku JL, Park JG. Detection and typing of human papillomavirus in anal epidermoid carcinomas: sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus Type 16. *Dis Colon Rectum*, 2001, Feb;44(2):236-42

- [63] Casas L, Galvan SC, Ordonez RM, Lopez N, Guido M, Berumen J. Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer*, 1999, Nov 12;83(4):449-55
- [64] Terry G, Ho L, Cuzick J. Analysis of E2 amino acid variations of human papillomavirus types 16 and 18 and their associations with lesion grade and HLA DR/DQ type. *Int J Cancer*. 1997, Nov 27; 73(5): 651-5
- [65] Giannoudis A, Duin M, Snijders PJ, Herrington CS. Variation in the E2-binding domain of HPV 16 is associated with high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Br J Cancer*. 2001, Apr 20;84(8):1058-63
- [66] Pang T, Hu X, Ponten J. Sequence variations of the late upstream region of HPV16 in cervical intraepithelial neoplasm and invasive carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*, 2002, Jan-Feb;12(1):99-104
- [67] Park JS, Hwang ES, Lee CJ, Kim CJ, Rha JG, Kim SJ, Namkoong SE, Um SJ. Mutational and functional analysis of HPV-16 URR derived from Korean cervical neoplasia. *Gynecol Oncol*, 1999, Jul;74(1):23-9
- [68] Chan PK, Lam CW, Cheung TH, Li WW, Lo KW, Chan MY, Cheung JL, Cheng AF. Association of human papillomavirus type 58 variant with the risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2002, Aug 21;94(16):1249-53
- [69] Yoshino K, Enomoto T, Nakamura T, Sun H, Ozaki K, Nakashima R, Wada H, Saitoh J, Watanabe Y, Noda K, Murata Y. FHIT alterations in cancerous and non-cancerous cervical epithelium. *Int J Cancer*, 2000, Jan 1;85(1):6-13
- [70] Todd R, Wong D. Oncogenes. *Anticancer Res*, 1999; 19:4729-46
- [71] Donzeli M, Bernardi R, Negri C et al. Apoptosis-prone phenotype of human colon carcinoma cells with a high level amplification of the c-myc gene. *Oncogene*, 1999; 18:439-48.
- [72] McGrath JP, Capon DJ, Goeddel DV, Levinson AD. Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p21 protein. *Nature*, 1984, Aug 23-29;310(5979):644-9.
- [73] Koskinen PJ, Alitalo K. Role of myc amplification and overexpression in cell growth, differentiation and death. *Semin Cancer Biol*, 1993;4:3-12.
- [74] 房殿春, 罗元辉, 鲁荣, 门荣甫, 晋华源. 新消化病学杂志, 1994 年 6

月 20 日;2(2):80-81

- [75] Wong YF, Chung TK, Cheung TH, Lam SK, Xu YG, Chang AM. Frequent ras gene mutations in squamous cell cervical cancer. *Cancer Lett*. 1995, Aug 16;95(1-2):29-32.
- [76] Lee J, Lee S, Yang M, Ahmed M, Mohiuddin M, Lee E: Expression and mutation of H-ras in uterine cervical cancer. *CA Lett*, 95:49-54, 1995
- [77] Sagae S, Kuzumake N, Hisada T, Mugikura Y, Kudo R, Hashimoto M: Ras oncogene expression and prognosis of invasive squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *CA*, 1989, 63:1577-1582.
- [78] Grendys EC Jr, Barnes WA, Weitzel J, Sparkowski J, Schlegel R. Identification of H, K, and N-ras point mutations in stage IB cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*, 1997, May;65(2):343-7.
- [79] Le L, Stoerker J, Rinehatr C, Fowler W: H-ras codon 12 mutation in cervical dysplasia. *Gynecol Oncol*, 1993, 49:181-184.
- [80] Willis G, Jennings B, Ball R, et al. Analysis of ras point mutations and human papillomavirus 16 and 18 in cervical carcinomata and their metastase. *Gynecol Oncol*, 1992, 49:359-364
- [81] van Doorn LJ, Kleter B, Quint WG. Molecular detection and genotyping of human papillomavirus. *Expert Rev Mol Diagn*, 2001, 1(4): 394-402.
- [82] Delahunty C, Ankener W, Deng Q, Eng J, Nickerson DA. Testing the feasibility of DNA typing for human identification by PCR and oligonucleotide ligation assay. *Am J Hum Genet*, 1996, 58(6):1239-1246.
- [83] Ronald J. Sapolsky, Linda Hsie, et al. High-throughput Polymorphism Screening and Genotyping with High-density Oligonucleotide Arrays. Genetic Analysis. *Biomolecular Engineering*, 1999(14):187-192.
- [84] Kwok PY. SNP genotyping with fluorescence polarization detection. *Hum Mutat*, 2002, 19 (4): 315-323.
- [85] Latif S, Bauer-Sardina I, Ranade K, et al. Fluorescence polarization in homogeneous nucleic acid analysis II: 5'-nuclease assay. *Genome Res*, 2001, 11(3): 436-440.
- [86] Checovich WJ, Bolger RE, Burke T. Fluorescence polarization--a new tool for cell and molecular biology. *Nature*, 1995, May 18;375(6528):254-6.
- [87] Heyduk T, Ma Y, Tang H, Ebright RH. Fluorescence anisotropy: rapid,

- quantitative assay for protein-DNA and protein-protein interaction. *Methods Enzymol*, 1996;274:492-503.
- [88] Walker GT, Linn CP, Nadeau JG. DNA detection by strand displacement amplification and fluorescence polarization with signal enhancement using a DNA binding protein. *Nucleic Acids Res*, 1996, Jan 15;24(2):348-53.
- [89] Gibson NJ, Gillard HL, Whitcombe D, Ferrie RM, Newton CR, Little S. A homogeneous method for genotyping with fluorescence polarization. *Clin Chem*, 1997, Aug;43(8 Pt 1):1336-41.
- [90] Kricka LJ. Stains, labels and detection strategies for nucleic acids assays. *Ann Clin Biochem*, 2002, 39 (Pt 2): 114-129.
- [91] Chen X, Levine L, Kwok P-Y. Fluorescence polarization in homogeneous nucleic acid analysis. *Genome Res*, 1999, 9: 492-496.
- [92] Youk EG, Ku JL, Park JG. Detection and typing of human papillomavirus in anal epidermoid carcinomas: sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus Type 16. *Dis Colon Rectum*, 2001 Feb;44(2):236-42
- [92] Kulasingam SL, Hughes JP, Kiviat NB, et al. Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *JAMA*, 2002, 288: 1749-1757.
- [93] Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus is resistant to desiccation. *J Infect Dis*, 1997, 176(4): 1076-1079.
- [94] Hsu TM, Chen X, Duan S, et al. Universal SNP genotyping assay with fluorescence polarization detection. *Biotechniques*, 2001, 31: 560-568.
- [95] Schwarz E, Dürst M, Demankowski C, et al. DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b. *EMBO J*, 1983, 2: 2341-2348.
- [96] Dartmann K, Schwarz E, Gissmann L et al. The nucleotide sequence and genome organization of human papilloma virus type 11. *J Virol*, 1986, 151: 124-130.
- [97] Seedorf K, Krammer G, Durst M, et al. Human papillomavirus type 16 DNA sequence[J]. *Virol*, 1985, 145 (1): 181-185.
- [98] Cole ST, Danos O. Nucleotide sequence and comparative analysis of the

- human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J Mol Biol*, 1987, 193(4): 599-608.
- [99] Kirii Y, Iwamoto S, Matsukura T. Human papillomavirus type 58 DNA sequence. *Viol*, 1991, 185 (1): 424-427.
- [100] de Roda Husman AM, Walboomers JMM, van den Brule AJC, et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by polymerase chain reaction. *J Gen Virol*, 1995, 76:1057-1062.
- [101] Husnjak K, Grce M, Magdic L, et al. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods*, 2000, 88:125-134.
- [102] Kulasingam SL, Hughes JP, Kiviat NB, et al. Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *JAMA*, 2002, 288: 1749-1758.
- [103] Kleter B, van Doorn LJ, ter Schegget J, et al. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol*, 1998, 153: 1371-1739.
- [104] Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(1): 357-361.
- [105] Manos MM, Ting Y, Wright DK, et al. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells*, 1989, 7: 209-214.
- [106] Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, et al. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol*, 1990, 71 (Pt 1): 173-181.
- [107] Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJC, et al. A general primerGP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(3): 791-795.

- [108] van den Brule AJC, Meijer CJLM, Bakels V, et al. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1990, 28:2739-2743.
- [109] Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJC, et al. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(4): 901-905.
- [110] van Doorn LJ, Quint W, Kleter B, et al. Genotyping of human papillomavirus in liquid cytology cervical specimens by the PGMY line blot assay and the SPF(10) line probe assay. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(3): 979-983.
- [111] Kwok PY, Chen X. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr Issues Mol Biol*, 2003,5:43-60.
- [112] Ho GY, Burk RD, Klein S, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87(18): 1365-1371.
- [113] Chan PK, Li WH, Chan MY, et al. High prevalence of human papillomavirus type 58 in Chinese women with cervical cancer and precancerous lesions. *J Med Virol*, 1999, 59: 232-238.

研究成果

一 论著

- 1 陈中灿 张菊 高艳娥 夏琳 白玉杰 阎小君. 荧光偏振方法快速检测 HPV E7 第 29 位密码子点突变 第四军医大学学报 2004; 25(15) (已录用)
- 2 陈中灿 张菊 薛晓萍 何玉宪 白玉杰 阎小君 宫颈癌患者人乳头瘤病毒 16 型 E7 基因的克隆及鉴定 肿瘤防治杂志 2003 10 10(Suppl):40-42
- 3 张菊 陈中灿 白玉杰 高艳娥 何玉宪 阎小君 高危人乳头瘤病毒 58 型 E6 基因的克隆及表达 第四军医大学学报 (J Fourth Mil Med Univ) 2004;25(3):201-203
- 4 ZHANG Ju, YAN Xiaojun, SONG jianzhon, CHEN Zhongcan, GAO Yan-e, et al. Development of a high throughput assay for human papillomavirus genotypes with fluorescence polarization. Chin Med J, 2003, 116(8): 1137-1140.
- 5 Gao YE, Zhang J, Wu J, Chen ZC, Yan XJ. Detection and genotyping of human papillomavirus DNA in cervical cancer tissues with fluorescence polarization. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai). 2003 Nov; 35(11):1029-34.

二 综述

陈中灿 张菊 阎小君 高危人乳头瘤病毒基因变异与宫颈癌的关系 国外医学临床生物化学与检验学分册 2004 年 1 月第 25 卷第 1 期:59-61

致 谢

本研究课题是在我的导师阎小君教授和辅导老师张菊副教授的精心指导下完成的。衷心感谢阎小君教授三年来对我的关怀和厚爱，他无私的人格、渊博的学识、活跃的思维和富于开拓创新的精神是我永远学习的榜样；他的深刻教诲和对思维的启发将使我受益终生。

衷心感谢我的辅导老师张菊副教授两年来对我学习和生活上无微不至的关心和帮助。她治学严谨、一丝不苟、兢兢业业的宝贵精神，值得我永远学习和钦佩。

特别感谢副所长白玉杰副教授自始至终的热情指导和大力支持。他的广博知识和敏捷的头脑使我受益匪浅。他勤奋努力的工作态度将时刻鞭策我努力上进。

衷心感谢生物化学与分子生物学教研室药立波主任、刘新平教授和免疫学教研室杨安钢主任曾经给予我的帮助。

感谢西安交通大学高艳娥博士在实验中对我的大量帮助和支持。

感谢基因所韩锋产副教授、刘智广高级实验师、郭晏海讲师、张文红博士、赵锦荣博士、李丁博士、李旭君博士各位老师的帮助。

感谢王琰硕士、吕贯廷硕士、夏琳硕士、朱文伟硕士、杨浩硕士、罗进硕士、江华硕士、杨芳硕士等在学习与实验上给我的帮助和鼓励，我将永远珍藏我们之间的友谊。

感谢第四军医大学西京医院妇产科刘淑娟博士及医护人员和西安交通大学第二医院医护人员在获取临床标本方面给予的鼎力支持。

感谢基因所何玉宪、蔡传勇、田真、吴雪雁、杨瑾、张庆华及白炎等工作人员在实验过程中给予我的支持与帮助。

在此对全军基因诊断技术研究所全体人员表示诚挚的感谢。

衷心感谢远在新疆边陲的夏勇勤院长三年来对我一如既往的关心和激励。

感谢肖利军、刘杰、李志全、与刘鹏几位同窗三年来对我的关心和帮助。

最后要特别感谢我的家人，感谢他们对我的理解、不懈的支持和无私的付出，同时也向他们表达我深深的歉意和内疚！正是他们的绵绵亲情给了我战胜一切困难的希望与信心！

本文读者也读过(10条)

1. [刘娜](#) [抑癌候选基因NDRG2在某些肿瘤细胞系与乳腺肿瘤组织中表达降低的原因分析](#)[学位论文]2004
2. [腾增辉](#) [重组人骨形成蛋白成熟肽-2对辐射小鼠骨髓造血功能的促进作用及其机制研究](#)[学位论文]2004
3. [李杰](#),[张颖](#),[李增彦](#),[李岩](#),[张秀玲](#),[LI Jie](#),[ZHANG Ying](#),[LI Zeng-yan](#),[LI Yan](#),[ZHANG Xiu-ling](#) [应用FQ-PCR检测宫颈病变中HPV 16/18亚型DNA](#)[期刊论文]-[天津医科大学学报](#)2008, 14(4)
4. [王玉健](#),[李澎](#),[李雪](#),[朱巍](#),[杨智](#),[匡金枝](#) [衣帽上脱落细胞微量DNA检测方案初探](#)[期刊论文]-[刑事技术](#)2007(2)
5. [鲍炜](#) [针对HER2的RNA干涉对人乳腺癌细胞生长的影响](#)[学位论文]2004
6. [刘杰](#) [BlaR1信号通路阻断策略逆转MRSA耐药性的研究](#)[学位论文]2004
7. [李宏力](#) [甲磺酸加替沙星胶囊的人体药代动力学及生物等效性评价](#)[学位论文]2004
8. [李蕾](#) [PKR在宫颈病变中的表达及其与高危型HPV感染的相关性](#)[学位论文]2008
9. [陈颢](#) [血微量DNA的检测在转移性肝癌中的应用及中药干预的研究](#)[学位论文]2004
10. [张瑞](#),[李荣成](#),[李艳萍](#),[王升启](#),[梁争论](#),[李河民](#),[庄辉](#),[ZHANG Rui](#),[LI Rong-cheng](#),[LI Yan-ping](#),[WANG Sheng-qi](#),[LIANG Zheng-lun](#),[LI He-min](#),[ZHUANG Hui](#) [检测乙型肝炎病毒“a”决定簇热点突变基因芯片的制备和初步应用](#)[期刊论文]-[中华肝病杂志](#)2007, 15(2)

引用本文格式：[陈中灿](#) [HPV分型及恶变相关点突变TDI-FP检测系统的建立与应用](#)[学位论文]硕士 2004