

2.1 引物 HP₁、HP₂ 对模板的特异性

分别以 HPV-16 DNA、HPV-18 DNA、pBR322 作为模板,在引物 HP₁、HP₂ 介导下进行 PCR 扩增,结果显示只有在以 HPV-18 DNA 作为模板时,出现扩增带,而以 HPV-16 DNA、pBR322 为模板的反应均无此扩增带出现,也未出现其它非特异性 DNA 带型(图 3),说明 PCR 扩增特异性良好。

2.2 PCR 反应体系重要成分对照实验

如表 1 所示的反应体系中缺少某一种重要成分,如模板、引物或 Taq 酶。

图 4 电泳结果表明:A 管反应成分完全,有阳性扩增带,B 管因缺少与 HP₁、HP₂ 配对的 HPV-18 模板,C、D 管因分别缺少引物或酶而均呈阴性结果,无扩增带。

上述两组对照实验结果均表明,本实验所用反应系统性能良好,结果均为特异性扩增。

3 PCR 缓冲系统中 Mg²⁺ 浓度对 PCR 特异性扩增的影响

本实验对可能影响以 HPV-18/HP₁、HP₂ 为材料的 PCR 产物特异性的因素、缓冲系统中 Mg²⁺ 浓度、退火温度、酶量大小

等进行研究发现,其中缓冲液中 Mg²⁺ 浓度对产物特异性影响最为明显。有报道认为,当反应体系中 dNTP 浓度为每种 200 μmol/L 时,最适 Mg²⁺ 浓度为 1.5 mmol/L^[11]。从本实验结果看,使用 5×buffer I 时,只有一条明显的特异性带(图 5.1),而使用 10×buffer II 时有 4 条明显的带(图 5.2),有 3 条与 1 分子量不同的非特异性扩增带,这表明当缓冲液中 Mg²⁺ 的浓度从 1.5 mmol/L 增至 4.5 mmol/L 时,PCR 扩增的特异性明显降低,这是由于过高浓度的 Mg²⁺ 使 Mg²⁺ 依赖性酶特异性聚合受到抑制和损害的缘故。

4 PCR 扩增检测宫颈癌组织 DNA 中可能存在的 HPV-18(URR)F 序列

17 例经临床病理确诊的宫颈癌组织 DNA,在 HP₁、HP₂ 介导下进行 PCR 扩增反应。电泳分析发现,其中 9 例宫颈癌组织 DNA 中均存在 HPV-18 病毒相关序列(包括 URR F 片段),从而为研究 HPV-18 病毒与宫颈癌相关性提供证据。图 6 为部分 PCR 扩增样品的电泳结果,7 例宫颈癌样品 DNA 通过 PCR 扩增,其中 5 例出现阳性结果。

另外,图 6 中以 Hind III、EcoR I 酶切后电泳回收的线性 HPV-18 DNA 作为模板扩增效果最佳(图 6.4 和 6.6),而用未经线性化步骤处理的 pHPV-18 为模板的扩增产物量则明显少于前者(图 6.5),此结果与某些报道^[12]一致。

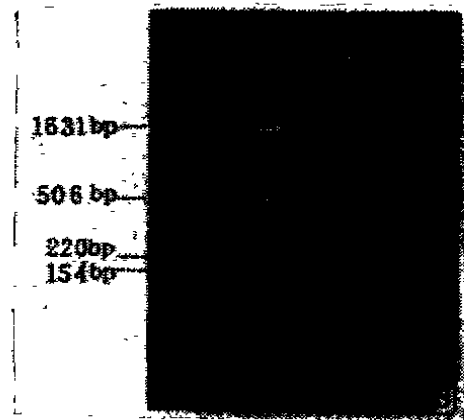


图 3 PCR 特异性电泳分析

Fig. 3 Electrophoretic analysis of PCR specificity

1. pHPV-18; 2. pBR322/HindIII;
3. pHPV-16; 4. pBR322

表 1 PCR 主要组分对照实验设计

Table 1 Control experiments of main components of PCR

样品 Sample	A	B	C	D
模板 Template pHPV-18	+	-	+	+
引物 Primers(HP _{1,2})	+	+	-	+
Taq 酶 Taq polymerase	+	+	+	-

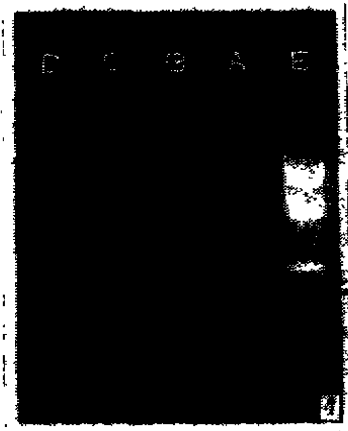


图4 PCR 主要组分对照实验分析
Fig. 4 Control analysis of main components of PCR
A. pHPV-18, B. Template pHPV-18(-), C. Primers HP1, HP2(-), D. Taq polymerase (-), E. pBR322/BstNI



图5 不同 Mg²⁺浓度影响 PCR 特异性电泳分析
Fig. 5 Electrophoretic analysis of PCR with different concentration of Mg²⁺ in buffer
1. [Mg²⁺] is 1.5mmol/L, 2. [Mg²⁺] is 4.5mmol/L

5 聚合酶链反应扩增产物的 Southern 印迹杂交

从图 7.1 可以看出,PCR 扩增为阳性的宫颈癌组织 DNA,其扩增片段与 HPV-18 探针杂交仍为阳性,有明显杂交带,扩增阴性产物(图 7.3)与 HPV-18 探针杂交仍为阴性。这些结果表明:PCR 扩增阳性的宫颈癌组织 DNA 中确实含 HPV-18 URR 相关序列,所扩增的片段正是 HPV-18 特定序列 URR F 片段,实验进一步证明了 PCR 扩增的准确性。



图6 宫颈癌组织 DNA PCR 检测电泳分析
Fig. 6 Electrophoretic analysis of PCR products of CCT DNA
1,2,3,7,8,9,10. CCT DNA,
1,3,7,8,10. PCR(+),2,9. PCR(-);
4. pHPV-18/EcoRI,5. pHPV-18,6. Linear pHPV-18

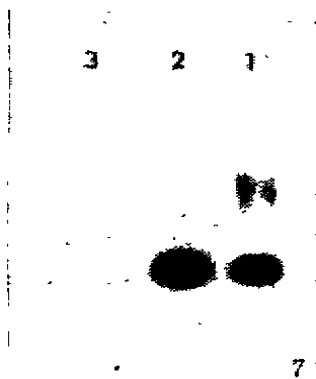


图7 PCR 产物 Southern 印迹杂交
Fig. 7 Southern blot of PCR products
1. PCR(+) products of CCT DNA, 2. PCR(+) products of pHPV-18, 3. PCR(-) products of CCT DNA

讨 论

1 在 PCR 实验中,经常会出现引物二聚体。形成引物二聚体的原因很多,但对其确切的形成机制尚不十分清楚^[11]。在合理设计引物的前提下,凝胶电泳中出现二聚体,可能主要是因为加入的靶 DNA 量较少、引物浓度或酶量较大、循环次数较多或/和退火温度较低引起 Taq 酶非模板指导的聚合作用^[13]增强所致(图1、图6)。从本实验的某些探索得到启示,通过改善其中某些条件,如提高退火温度、减少酶量等方法,则可以得到较理想的结果(图2.2,图3.1,图5.1)。

2 本实验在宫颈癌组织 DNA 中检测出 HPV-18URR 相关序列(F)的阳性率为53%,远高于国内报道用核酸杂交法检测 HPV-18的阳性率^[14],而与国外一些学者用 PCR 检测的阳性率结果比较接近,如 Molchers^[8]及 Pao^[9]等用 PCR 法检出 HPV-18阳性率达到或超过50%,均高于杂交法的结果。实验中由于宫颈癌标本有限,未能进行大量标本的检测,所获得的阳性率数据可能存在一定局限性。为进一步研究宫颈癌与 HPV-18的关系,尚需进行临床上大量标本的 PCR 检测及其他相关的和更直接的研究如 HPV-18的感染性试验等。

参 考 文 献

- 1 Zur H H. Papillomaviruses in Human Cancer. *Cancer*, 1987; 59(10):1692—1696
- 2 周健,陈全录,沈琼,等.食管癌标本中人乳头瘤病毒(HPV)DNA 序列的检测. *河南医科大学学报*, 1987; 22(1):1—3
- 3 Ostraw R S, Manias DA, Fong W J, et al. A Survey of Human Cancers for Human Papillomavirus DNA by filter Hybridization. *Cancer*, 1987; 59:429—434
- 4 Reid R, Crum C P, Herchman B R, et al. Subclinical Papillomaviral Infection and Cervical Neoplasia are Linked by a Spectrum of Continuous Morphologic and Biologic Change. *Cancer*, 1984; 53:943—953
- 5 Watts S L, Phelps W C, Ostrow R S, et al. Cellular Transformation by Human Papillomavirus DNA in Vitro. *Science*, 1984; 225:634—636
- 6 Seedorf D, Oltersdorf T, Krammer G, et al. Identification of early proteins of the human papilloma viruses type 16(HPV-16) and type 18(HPV-18) in cervical carcinoma cells. *EMBO J*, 1987; 6:139—144
- 7 Mullis K B, Faloona F A. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Meth. Enzymol.*, 1987; 155:335—350
- 8 Molchers W, van den Brule A, Walboomers J, et al. Increased Detection Rate of Human Papillomavirus in Cervical Scrapes by the Polymerase Chain Reaction as Compared to Modified FISH and Southern-Blot Analysis. *J Med Virol*, 1989; 27:329—335
- 9 Pao C C, Lin C Y, Maa J S, et al. Detection of Human Papillomaviruses in Cervicovaginal Cells Using Polymerase Chain Reaction. *J Infect Dis*, 1990; 161(1):113—115
- 10 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning*. 1st ed. New York, USA; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982; 250—251, 368—369
- 11 H A 艾利希主编(田丁等译). PCR 技术——DNA 扩增的原理与应用. 第一版,北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社,1991,10—11
- 12 黄培堂,俞炜源编译. PCR 技术原理及应用. 第一版,北京:中国科学技术出版社,1990,5
- 13 Clark J M. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucl Acid Res*, 1988; 16:9677—9686
- 14 孟祥金,孙瑜,李昆,等.斑点核酸杂交检测同一组宫颈疾患标本中人乳头瘤病毒和人巨细胞病毒核酸,癌症,1990; 9(1):19—21

Detection of HPV-18 DNA with PCR

Jiang Hong Ke Lihua

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

The DNA fragment (F) on the Upstream Regulatory Region (URR) of HPV-18 DNA was amplified with PCR. Two control experiments here confirmed the PCR specificity. The concentration of Mg^{++} in PCR buffer affected mostly the specificity of PCR, the higher the concentration of Mg^{++} , the lower the specificity. Moreover, nine out of seventeen (53%) DNA samples of cervical carcinoma tissues were detected with PCR for the presence of HPV-18 URR F sequences. It's implied that the result may be an evidence of the relationship between HPV-18 and cervical carcinoma.

Key words HPV-18, PCR, Cervical carcinoma, Specificity, Detection

学术会议消息

中华医学会继续教育部与湖北兴科新技术推广研究所拟于1994年7月在宜昌市共同举办“全国病毒性疾病预防专题学术会议”，征文内容：病毒性疾病的基础研究、发病机制探讨，病毒感染的分子机理与致病特点；呼吸道、胃肠道、母婴传播、性传播、输血与血制品传播病毒性疾病的防治经验及临床病毒快速检测新技术、新方法；抗病毒药物及新疫苗的开发应用等。全文和摘要(500字)各一份经单位审阅盖章后于1994年6月30日前寄武汉市航空路同济医科大学基础医学院病毒研究室陈秀珠，邮编430030，并汇审稿费10元，注明“全国病毒会征文”字样。

中华医学会继续教育部

一九九四年元月