



## Agilent 2100 Bioanalyzer在人乳头瘤病毒检测中的应用

近年来,人乳头瘤病毒(HPV)感染十分普遍。HPV可引起多种人类疾病,其致病性与型别密切相关。低危HPV型别如6型和11型等可引起尖锐湿疣等良性病变,而高危HPV型别如16型和18型等则可引发宫颈癌等恶性肿瘤。因此,对HPV进行早期、快速检测和型别鉴定具有重要的临床意义。Agilent 2100 Bioanalyzer是最近出现的、基于生物芯片实验室技术的核酸分析系统,它能快速、简便、灵敏和准确地进行DNA样品的分离、检测与分析[1][2][3]。我们应用此芯片分析系统对HPV的4个型别即HPV6、11、16和18型进行PCR检测与分型,并与常规的琼脂糖凝胶电泳方法进行比较,以探索这一新的核酸分析系统在HPV的检测和分型中的应用。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料与试剂

含HPV全长基因组的4种质粒(HPV6、11、16和18)由德国海德堡癌症研究中心de Villier博士赠送。溴化乙锭、琼脂糖等试剂购自上海生物工程有限公司。7500 Lab Chip 试剂盒由Agilent Technologies提供,每一试剂盒含有25块芯片和以下试剂:凝胶基质、染料浓缩物、DNA 相对分子质量标准(markers)、DNA长度测定梯度标准品、注射器以及旋转过滤器,每块芯片可检测12个样品。PCR引物:通用引物根据文献[4]从HPV L1区中选择保守序列设计,上游引物MY11为5' GCMCAGGGWCATAAYAATGG3',下游引物MY09为5' CGTCCMARRGGAWACTGATC3' (M=A+C, R=A+G, W=A+T, Y=C+T),预期扩增片段为450 bp;型特异性引物选用Pao等[5]设计的各型HPV E6区的特异序列,扩增产物HPV6为263 bp, HPV11为144 bp, HPV16为577 bp, HPV18为356 bp,引物均由上海博亚生物技术有限公司合成。

#### 1.2 主要仪器

Agilent 2100 Bioanalyzer仪器和软件购自Agilent Technologies,所有基于芯片的分离过程均在Agilent 2100 Bioanalyzer上进行。它是通过微流体技术对样品进行分离,当给芯片加上电压时,样品便在芯片上的显微蚀刻管道中进行毛细管电泳,在样品流动过程中,不同DNA片段根据其大小被分离。凝胶-染料基质中的荧光染料可对样品进行染色,从而使其可被检测。有一PC机与Bioanalyzer相连,以便于对样品的分离进行控制、对片段大小和浓度信息进行记录,以及对数据进行实时的自动化分析和处理。数据既可以凝胶样图像和/或电泳图的方式显示,也可以表格形式显示,并且易于输出至不同的电子数字表格程序中。基因扩增仪9700购自美国PE公司,凝胶图像分析仪UVP购自美国UVP公司。

#### 1.3 聚合酶链反应

以各型标准HPV质粒作为模板进行GP-PCR和型特异性PCR。PCR反应条件为:94 °C 预变性5 min,然后94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35次循环;72 °C 8 min。

#### 1.4 琼脂糖凝胶电泳分析

取上述PCR产物1 μl进行2%琼脂糖凝胶电泳,60 V 1 h,然后用凝胶图像分析仪UVP扫描成像并观察和分析相应长度的扩增条带。

## 1.5 芯片检测和分析

1.5.1 芯片的准备 按照DNA 7500 LabChip 试剂盒所提供的说明进行。凝胶-染料混合物的准备：将400  $\mu\text{l}$  凝胶基质与20  $\mu\text{l}$  染料浓缩物混合后，用一离心过滤器过滤。将凝胶-染料混合物注入分离芯片中，将5  $\mu\text{l}$  markers加入各样品孔中。

1.5.2 PCR产物的芯片分离分析 取上述PCR产物各1  $\mu\text{l}$ 分别加入12个样品孔中，将1  $\mu\text{l}$  ladder加入指定的ladder孔中，最后将芯片涡旋混匀后放入Agilent 2100 Bioanalyzer中进行自动检测分析。

## 2 结果

### 2.1 聚合酶链反应的特异性

将HPV6、11、16和18共4种HPV质粒模板混合在一起，分别用各型特异性引物进行PCR，结果只在相应处出现1条特异条带。再分别以大肠杆菌DNA、人白细胞DNA和人免疫缺陷病毒DNA作为模板，以各型HPV特异引物进行PCR，结果均无扩增条带，表明PCR扩增特异性强。进一步对扩增产物进行测序，结果序列与文献报道一致[4][5] (结果略)，因而更加证明了PCR扩增产物的特异性。

### 2.2 Bioanalyzer与琼脂糖凝胶电泳法的片长测定准确度和重复性比较

从凝胶图像上，我们可以看到两种检测方法均能检测到相应的HPV通用引物扩增片段和各型特异性片段(图1、2)。通过比较两者所测定的片段长度，总体来说Bioanalyzer产生的结果比琼脂糖凝胶电泳的结果显示出较低的百分误差(前者的准确度在95%以上，后者仅为85%)，且前者的重复性也比后者稍高(表1)。

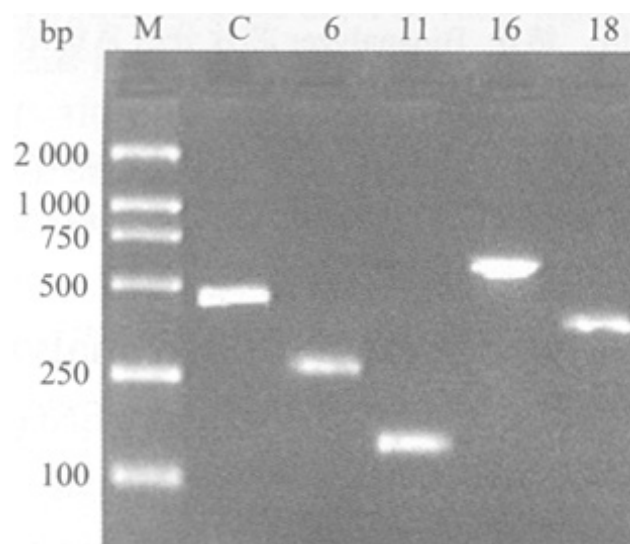


图1 HPV DNA经GP-PCR和型特异性PCR扩增片段的2%琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Electrophoretic analysis on 2% agarose gel of the HPV DNA fragments amplified by PCR using general and type-specific primers

M: DNA marker DL2000; C: PCR product using general primer; 6, 11, 16, 18: PCR product of HPV6, 11, 16, 18 using type-specific primers

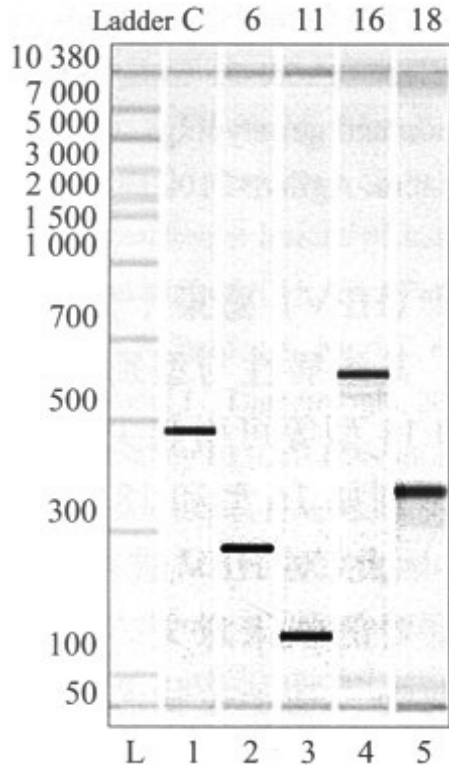


图2 HPV DNA经GP-PCR和型特异性PCR扩增片段在Agilent 2100 Bioanalyzer系统中的凝胶样图  
 Fig.2 Gel image of HPV PCR products using general and type-specific primers by Agilent 2100 Bioanalyzer  
 C: PCR product using general primer; 6, 11, 16, 18: PCR product of HPV6, 11, 16, 18 using type-specific primers

表 1 Agilent2100Bioanalyzer 与琼脂糖凝胶电泳片长测定  
 准确度和重复性比较

**Tab.1 Comparison of the accuracy and reproducibility of Agilent 2100 Bioanalyzer and agarose electrophoresis in determining the length of the PCR products of HPV6, 11, 16, 18 with type-specific primers**

HPVtype	Actual size(bp)	Chipresult			Agarose results		
		Size(bp)	%error	%CV	Size(bp)	%error	%CV
HPV6	263	272	3.4	4.1	278	5.7	5.2
HPV11	144	146	1.3	0.3	165	14.6	3.0
HPV16	577	580	0.5	2.5	600	4.0	4.5
HPV18	365	373	4.7	1.8	396	11.2	2.8

### 2.3 Bioanalyzer与琼脂糖凝胶电泳法的灵敏度比较

将一HPV6型质粒样品以1:10系列稀释成3 ng、300 pg、30 pg、3 pg、300 fg和30 fg 6个浓度后作为模板分别进行PCR扩增，然后同时取1 μl PCR产物分别进行Bioanalyzer和琼脂糖凝胶电泳检测，结果前者可清楚地检测到10<sup>-4</sup>(即最少模板量可至3 pg)，而后者为10<sup>-2</sup>(相当于300 pg的模板量)，表明前者的灵敏度比后者高100倍左右(图3、4)。

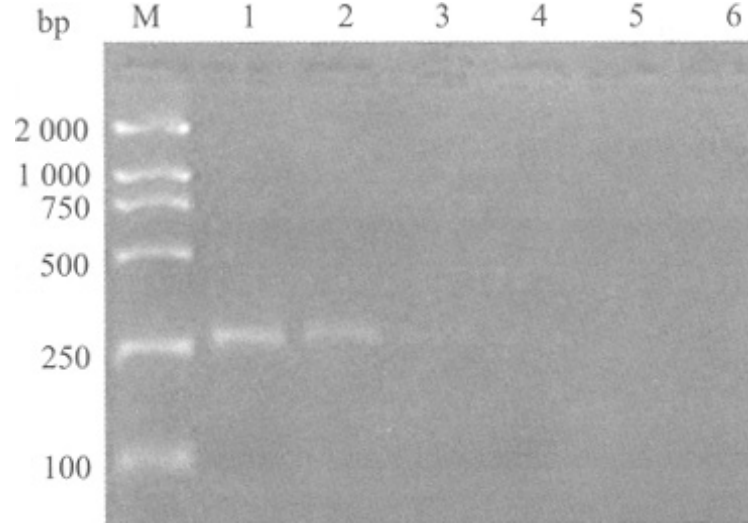


图3 HPV6型特异性PCR扩增片段的琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.3 Electrophoresis on 2% agarose gel of the HPV6 DNA fragments amplified by PCR using type-specific primers

M: DNA marker DL2000; Lanes 1-6: PCR products amplified using diluted plasmid template ranging from 3 ng to 30 fg

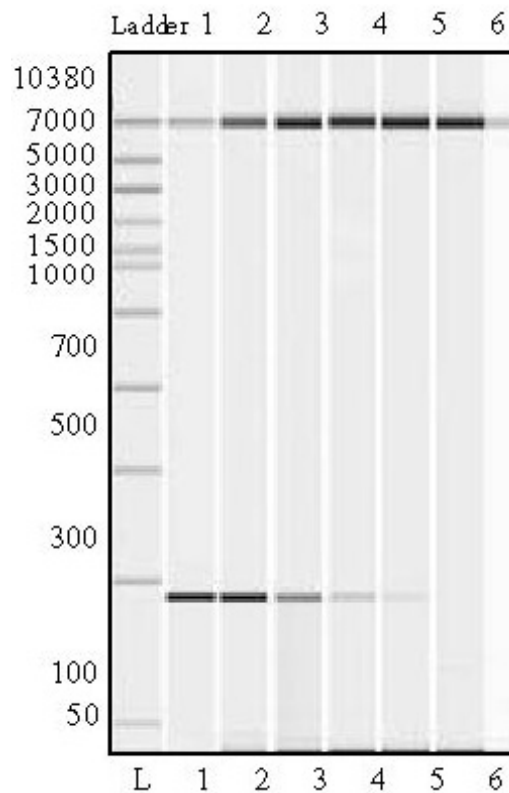


图4 HPV6 型特异性PCR 扩增片段在Agilent 2100 Bioanalyzer上的检测结果

Fig.4 Gel image of HPV6 PCR products using type-specific primers by Agilent 2100 bioanalyzer

1-6: PCR products amplified using diluted plasmid template ranging from 3 ng to 30 fg

### 3 讨论

在用PCR进行HPV的检测和分型时，主要是通过扩增片段的长度来确定HPV的存在及其型别，如经通用引物

介导PCR后出现450 bp的扩增片段,表明有HPV感染。而在型特异引物介导PCR时,则所扩出相应片段的长度在HPV6为263 bp, HPV11为144 bp, HPV16为577 bp, HPV18为356 bp,因而需要一种能准确测定片段长度的检测手段。与常规的琼脂糖凝胶电泳方法相比, Bioanalyzer具有更高的准确度和重复性。这是因为: (1)在 Bioanalyzer芯片分析系统中,不仅应用了常规的外标准,还在每一泳道中加入了内标准,可进行各样品带大小和浓度的校正,这就减少了各个样品顺序流经分离管道的过程中产生的轻微变异; (2) Bioanalyzer有配套的试剂盒和标准化的操作方法,提高了结果的重复性和准确性。此外,在琼脂糖电泳时, DNA的迁移速率受到多种因素的影响,如电泳缓冲液的组成及离子强度、荧光染料EB的嵌入以及电场强度等, Bioanalyzer无需进行电泳及EB染色等步骤,因而不受这些因素的影响。

HPV的致病性与其型别密切相关,尤其是高危型别如HPV16和18等的持续存在及其整合可导致细胞异常病变,从而在人体内引起宫颈癌等恶性肿瘤[6]。在HPV感染早期,临床样本中所含的HPV DNA量很少,因而检测系统的灵敏度显得非常重要。Bioanalyzer通过一个高度灵敏的荧光检测系统对样品进行检测,与常规的琼脂糖电泳分析方法相比,其准确度高、重复性好和灵敏度好,另外,它还有以下优点: (1)由于分离管道的缩短和高电场强度的应用,使得分析速度显著加快,可在30 min内完成对12个样品的连续自动化分析; (2)无需进行凝胶制备、电泳、染色和脱色、成像及结果分析等步骤,因而操作更为简便、省力; (3)可实现数据分析的自动化; (4)由于采用微流体技术,核酸样品和试剂用量少; (5)可减少与危险物质(如EB)的接触,并减少废物量。鉴于以上优点, Bioanalyzer芯片分析系统结合PCR方法在HPV的早期检测和分型中具有重要的应用价值,值得推广。

(责任编辑: 杨金星)

#### 参考文献:

- [1] Lirving N, Nicholas JP, Ming LI, et al. Agilent 2100 Bioanalyzer for restriction fragment length polymorphism analysis of the Campylo- bacter jejuni flagellin gene[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(2): 754-7.
- [2] Lu CY, Tso DJ, Yang T, et al. Detection of DNA mutations associated with mitochondrial diseases by Agilent 2100 bioanalyzer[J]. Clin Chim Acta, 2002, 318(1-2): 97-105.
- [3] 刘翠华, 马文丽, 石 嵘, 等. Agilent 2100 Bioanalyzer在基因差异表达研究中的应用[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(12): 1 066-9.
- Liu CH, Ma WL, Shi R, et al. Application of Agilent 2100 Bioa- nalyzer in the study of differential gene expression[J]. J First Mil Med Univ, 2002, 22(12): 1066-9.
- [4] Monos M, Ting Y. PCR Protocols: a guide to methods and application[M]. San Diego: Academic Press, 1990. 365-7.
- [5] Pao CC, Lin CY, Ma JS, et al. Detection of human papillomaviruses in cervicovaginal cells using polymerase chain reaction[J]. J Infect Dis, 1990, 161(1): 113-5.
- [6] McFadden SE, Schumann L. The role of human papillomavirus in screening for cervical cancer[J]. J Am Acad Nurse Pract, 2001, 13(3): 116-25.

#### 参考文献:

- [1] Lirving N, Nicholas JP, Ming LI, et al. Agilent 2100 Bioanalyzer for restriction fragment length polymorphism analysis of the Campylo- bacter jejuni flagellin gene[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(2): 754-7.
- [2] Lu CY, Tso DJ, Yang T, et al. Detection of DNA mutations associated with mitochondrial diseases by Agilent 2100 bioanalyzer[J]. Clin Chim Acta, 2002, 318(1-2): 97-105.

[3] 刘翠华, 马文丽, 石 嵘, 等. Agilent 2100 Bioanalyzer在基因差异表达研究中的应用[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(12):1 066-9.

Liu CH, Ma WL, Shi R, et al. Application of Agilent 2100 Bioanalyzer in the study of differential gene expression[J]. J First Mil Med Univ, 2002, 22(12): 1066-9.

[4] Monos M, Ting Y. PCR Protocols: a guide to methods and application[M]. San Diego: Academic Press, 1990. 365-7.

[5] Pao CC, Lin CY, Ma JS, et al. Detection of human papillomaviruses in cervicovaginal cells using polymerase chain reaction[J]. J Infect Dis, 1990, 161(1): 113-5.

[6] McFadden SE, Schumann L. The role of human papillomavirus in screening for cervical cancer[J]. J Am Acad Nurse Pract, 2001, 13(3): 116-25.

---

[回结果列表](#)