

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

刘翠华¹、袁文丽¹、袁石嵘¹、袁阳谦¹、袁翼飞¹、袁文岭¹、渊第一军医大学分子生物学研究所袁广东广州 510515
² 广州军区广州总医院分子肿瘤学研究所袁广东广州 510010

摘要 探讨 Agilent2100Bioanalyzer 芯片分析系统简称 Bioanalyzer 在人乳头瘤病毒 HPV 的 PCR 检测和分型中的应用。方法 先分别进行通用引物介导 PCR 和 P-PCR 和型特异性引物介导 PCR 扩增 HPV 高保守区 L1 区 的共同序列和各型 (包括 HPV6、11、16 和 18 型) 的特异性序列。然后分别用常规的琼脂糖凝胶电泳技术和 Bioanalyzer 对 PCR 产物进行检测。比较两种检测方法的准确度、重复性和灵敏度。结果 Bioanalyzer 在确定片段长度时的准确度和重复性比琼脂糖凝胶电泳高。前者的准确度在 95% 以上,后者仅为 85%。Bioanalyzer 的检测灵敏度比琼脂糖凝胶电泳高 100 倍。结论 Bioanalyzer 芯片分析系统结合 PCR 方法可对 HPV 进行特异、准确、灵敏的检测和型别鉴定。具有重要的推广价值。

关键词 芯片分析系统; Agilent2100Bioanalyzer; 琼脂糖凝胶电泳; 乳头瘤病毒

中图分类号: R373; Q939.4 文献标识码: 文章编号: 000-2588(2003)03-213-03

Application of Agilent 2100 Bioanalyzer in detection of human papilloma virus

LIU Cui-hua¹, MA Wen-li¹, SHIRong¹, PENG Yi-fei¹, OUYANG Qian¹, ZHENG Wen-ling²

¹Institute of Molecular Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Institute of Molecular Oncology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China

Abstract: Objective To explore the feasibility of using Agilent 2100 bioanalyzer in the detection and genotyping of human papillomavirus (HPV). Methods The consensus sequence of highly conserved region (L1) and genotype-specific gene fragments of all HPV genotypes (including HPV 6, 11, 16 and 18) were amplified by PCR technique using general and type-specific primers respectively. Agilent 2100 Bioanalyzer and routine agarose gel electrophoresis were then employed respectively to examine the PCR products, and the accuracy, reproducibility and sensitivity of these 2 detection techniques were compared. Results Agilent 2100 Bioanalyzers showed better accuracy in determining the length of the gene fragments than agarose gel electrophoresis, the accuracy of the former reaching above 95% while the latter was only 85%. Bioanalyzer was also 100 times more sensitive than agarose electrophoresis. Conclusion Agilent 2100 Bioanalyzer combined with PCR is specific, accurate and sensitive for HPV detection and genotyping.

Key words: chip analysis system, Agilent 2100 Bioanalyzer; agarose gel electrophoresis; papillomavirus, human

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。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。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。500 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: 通用引物根据文献暂时在 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'。L1=A+C, A=A+G, V=A+T, C=C+T。预期扩增片段为 450 bp。型特异性引物选用 Pao 等设计的各型

收稿日期: 002-11-05

基金项目: 国家自然科学基金(39880032)广州市重点科技攻关项目(99-Z-022-01)

Supported by Natural Science Foundation of China (39880032); Key Sci-Tech Research Project of Guangzhou (99-Z-022-01)

作者简介: 刘翠华 (1976-), 女, 湖南长沙人, 在读博士研究生, 研究方向: DNA 芯片技术及应用研究。电话: 20-61648114-89098

通讯作者: 袁文丽。电话: 20-61648210

HPV6 区的特异序列扩增产物 HPV6 为 263bp HPV11 为 144bp HPV16 为 577bp HPV18 为 356bp 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 Agilent2100Bioanalyzer 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 反应条件为 94 益 30s 然后 94 益 30s 2 益 1min 5 次循环 72 益 8min

1.4 琼脂糖凝胶电泳分析

取上述 PCR 产物 1 滋进行 2% 琼脂糖凝胶电泳 0 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 DNA7500LabChip 试剂盒所提供的说明进行凝胶-染料混合物的准备将 400 滋凝胶基质与 20 滋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 5 滋 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 滋分别加入 12 个样品孔中 将 1 滋 ladder 加入指定的 ladder 孔中最后将芯片涡旋混匀后放入 Agilent2100Bioanalyzer 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 1 6 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

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 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

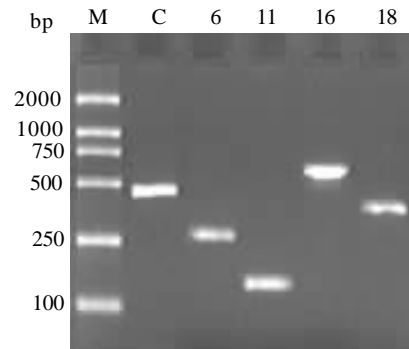


图 1 HPV DNA 经 GP-PCR 和型特异性 PCR 扩增片段的 2% 琼脂糖凝胶电泳图

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 HPV 6, 11, 16, 18 using type-specific primers

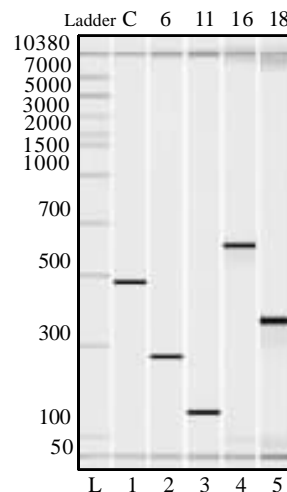


图 2 HPV DNA 经 GP-PCR 和型特异性 PCR 扩增片段在 Agilent2100 Bioanalyzer 系统中的凝胶样图

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 HPV 6, 11, 16, 18 using type-specific primers

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 10 系列稀释成 3ng 300pg 30pg 3pg 300fg 和 30fg 6 个浓度后作为模板分别进行 PCR 扩增然后同时取 1 滋 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 10-4 且最少模板量可至 3pg 而后者为 10-2 相当于 300pg 的模板量表明前者的灵敏度比后者高 100 倍左右

3 讨论

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		Agaroseresults			
		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

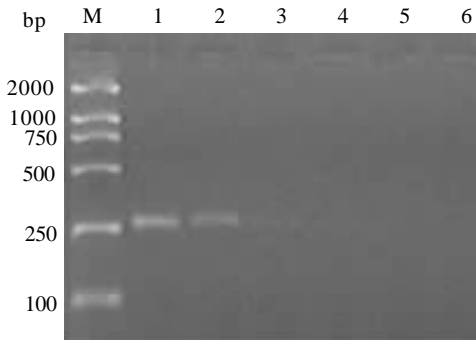


图3 HPV6 型特异性 PCR 扩增片段的琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.3 Electrophoresis on 2% agarose gel of the HPV6 DNA fragments amplified by PCR using type-specific primers M:DNAMarkerDL2000;Lanes 1-6:PCRproductsamplifiedusing dilutedplasmidtemplaterrangingfrom3ngto30fg

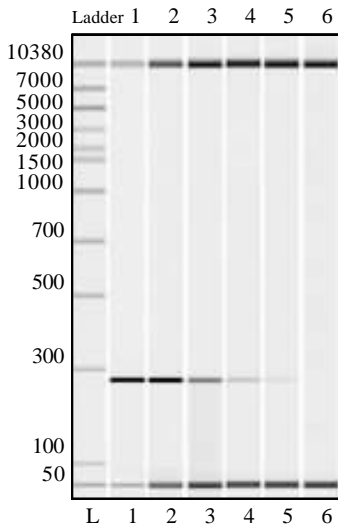


图 4 HPV6 型特异性 PCR 扩增片段在 Agilent 2100 Bioanalyzer 上的检测结果

Fig.4 Gel image of HPV6 PCR products using type-specific primers by Agilent 2100 bioanalyzer 1-6:PCRproductsamplified usingdilutedplasmid templaterranging from3ngto30fg

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。经通用引物介导 PCR 后出现 450bp 的扩增片段表明有 HPV 感染。而在型特异引物介导 PCR 时所扩出相应片段的长度在 HPV6 为 263 bp、HPV11 为 144bp、HPV16 为 577bp、HPV18 为 356bp。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 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。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，而在人体内引起宫颈癌等恶性肿瘤。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。此外，它还有以下优点：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 30min 内完成对 12 个样品的连续自动化分析。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。无需实现数据分析的自动化。由于采用微流体技术，核酸样品和试剂用量少，减少与危险物质 EB 的接触，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。

参考文献

咱暂 LirvingN,NicholasJP,MingLI, et al. Agilent2100Bioanalyzerfor restrictionfragmentlengthpolymorphismanalysisoftheCampylobacterjejuni flagellin gene. 咱暂 Clin Microbiol, 2001, 39(2): 754-7.

咱暂 LuCY,TsoDJ,YangT, et al. Detection of DNA mutations associated with mitochondrial diseases by Agilent 2100 bioanalyzer. 咱暂 Clin Chim Acta, 2002, 318(1-2): 97-105.

咱暂 刘翠华, 马文丽, 石 嵘, 等. Agilent2100Bioanalyzer 在基因差异表达研究中的应用. 咱暂 第一军医大学学报, 2002, 22(12): 1066-9.

LiuCH, MaWL, ShiR, et al. Application of Agilent 2100 Bioanalyzer in the study of differential gene expression. 咱暂 J First Mil Med Univ, 2002, 22(12): 1066-9.

咱暂 MonosM, TingY. PCR Protocols: a guide to methods and application. 咱暂 San Diego: Academic Press, 1990. 365-7.

咱暂 PaoCC, LinCY, MaJS, et al. Detection of human papillomaviruses in cervicovaginal cells using polymerase chain reaction. 咱暂 Infect Dis, 1990, 161(1): 113-5.

咱暂 McFaddenSE, SchumannL. The role of human papillomavirus screening for cervical cancer. 咱暂 J Am Acad Nurse Pract, 2001, 13(3): 116-25.