

采用基因分型质控品评价荧光 PCR 法人 乳头瘤病毒核酸检测试剂盒

徐任^{1,2}, 曲守方², 杜娟¹, 高尚先^{2*}, 于源华^{1*}

(1. 长春理工大学, 长春 130022 2. 中国药品生物制品检定所体外诊断试剂与培养基室, 北京 100050)

摘要 目的: 使用人乳头瘤病毒(HPV) L1 基因分型质控品对荧光 PCR 法人乳头瘤病毒核酸检测试剂盒进行评价。方法: 以中国药品生物制品检定所体外诊断试剂与培养基室建立的含有 30 种不同型别 HPV 基因分型质控品盘为样本, 按照各个试剂盒的要求进行检测。结果: 使用含有 30 种不同型别 HPV 基因分型质控品盘为模板进行试剂盒评价时, A 试剂检测有 23 种型别检测结果符合, 7 种型别不符合, HPV 59 型漏检, HPV 53, 54, 61, 66, 72, 81 型有交叉现象。B 试剂检测有 29 种型别检测结果符合, 1 种型别不符合, HPV 58 型漏检。C 试剂检测有 26 种型别检测结果符合, 4 种型别不符合, HPV 43, 66, 81, CP 8304 型有交叉现象。D 试剂有 29 种型别检测结果符合, 1 种型别不符合, HPV 68 型漏检。对照检测 E 试剂 30 种型别的检测结果全部符合。4 家公司的试剂基本能正确区分质控品中 HPV 基因型, 但有部分的 HPV 基因型有漏检现象和交叉反应。对照试剂无漏检交叉现象。结论: 含有 30 种不同型别的 HPV-L1 基因分型质控品能准确地评价 4 家公司的 HPV 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)和高危型人乳头瘤病毒 DNA 检测试剂盒(酶切信号放大法)的性能; 在 HPV 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)的研发中应在通过质控盘的考核情况下加大临床样本的验证, 从而对其产品进行进一步的验证和考核。

关键词: 人乳头状瘤病毒; 基因分型; 质控品; 荧光 PCR; 酶切信号放大

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)01-0079-05

Genotyping quality control evaluation of fluorescent PCR products of human papillomavirus DNA detection kit

XU Ren^{1,2}, QU Shou-fang², DU Juan¹, GAO Shang-xian^{2*}, YU Yuan-hua^{1*}

(1. Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022, China

2. Department of In Vitro Diagnostic Reagents & Medium, National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract Objective To evaluate the PCR-fluorescent human papillomavirus (HPV) kit by the HPV-L1 gene genotyping control materials **Methods** Department of In Vitro Diagnostic Reagents & Medium, National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products set up with 30 different type HPV genotyping quality control materials which were detected as samples according to the kit instructions **Results** 30 different types with HPV genotyping plate as a template for control materials evaluation kit A kit test results are 23 species of the correct type and 7 types were wrong which HPV type 59 was missed and HPV types 53, 54, 61, 66, 72, 81 were cross-reaction. B kit test results are 29 species of the correct type, and 1 type was wrong which HPV type 58 was missed. C kit test results are 26 species of the correct type and 4 types were wrong which HPV types 43, 66, 81, CP8304 were cross-reaction. D kit test results are 29 species of the correct type, and 1 type was wrong which HPV type 68 was missed. E test kits were the correct model test results are 30 species. Four companies kits can correctly distinguish between quality control products in the HPV genotypes but some of the HPV genotypes have missed the phenomenon, and cross-reaction. Control agent without miss crossover phenomenon **Conclusion** Containing 30 kinds of HPV-L1 genotyping quality control materials can accurately evaluate the four companies HPV DNA test kit (fluorescent PCR method) and the Cervista™ HPV HR test kit (enzyme signal amplification) performance. The kit (fluorescence PCR

* 通讯作者 于源华 Tel 13596050433 E-mail yuyuanhua8888@126.com
高尚先 Tel (010) 67095647 E-mail gaoshangxian@126.com

method) development should be verified by large scale clinical samples after HPV genotyping control materials evaluation, to further validate and assessment their products

Key words human papillomavirus(HPV); genotyping control material fluorescence-PCR; enzyme signal amplification

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是一种不具备外膜的环状双链结构的 DNA 病毒, 病毒颗粒直径约为 45~55 nm, 由 7800~7900 碱基对组成。目前已鉴定的 HPV 达 100 多种型别^[1]。依据 HPV 与癌症的相关性, HPV 可以分为低度危险型 (6, 11, 42, 43, 44 等型) 和高度危险型 (16, 18, 31, 33, 35 等型)^[2,3]。大量的研究发现宫颈癌的发生与 HPV 的关系非常密切, 在 99.7% 的宫颈癌标本中可检出不同型别的 HPV^[4]。考虑到 HPV 的型别多样性以及分布的地域差异性^[5], 临床 HPV 基因的准确分型, 对于发现宫颈癌高危病人及早期防治有着十分重要意义。

大多数 HPV 基因型的检测都是通过对其病毒核酸进行检测来实现的, 特别是 DNA。HPV 基因型检测的方法可大致分为以靶序列扩增为基础的检测方法和以信号放大为基础的检测方法^[6]。而 HPV 荧光 PCR 分型检测方法正是基于靶序列扩增基础上的一种 PCR 技术, 与常规 PCR 技术相比它具有特异性更强, 有效解决 PCR 污染问题, 自动化程度高等特点。酶切信号放大法是一种新型的信号放大技术, 与液相信号放大技术-杂交捕获 2 代 (hybrid capture 2, HC2) 检测技术同为美国 FDA 认证的 HPV 分型的检测技术^[7]。目前市面上已有使用酶切信号方法和荧光 PCR 技术检测 HPV 分型的产品, 但尚未有统一的国家评价标准对其性能进行评估的研究。本研究拟采用中国药品生物制品检定所体外诊断试剂与培养基室建立的 HPV-L1 基因分型质控品^[8]对荧光 PCR 法和酶切信号放大法的 HPV 基因检测试剂进行检测, 从而对其性能质量进行初步的评估。

1 材料

HPV 基因分型质控品盘, 含有 14 种高危型 HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73), 3 种中等危险型 (26, 53, 66) 和 13 种低危型 HPV (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 (CP8304), 83 (CP8304)), 由中国药品生物制品检定所提供。人乳头瘤病毒 (HPV) 核酸扩增 (PCR) 荧光检测试剂盒, 检测 13 种高危型 HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68), 由 A 公司提

供。人乳头瘤病毒核酸检测试剂盒 (PCR-荧光探针法), 检测 10 种高危型 HPV (16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 53, 56, 58), 由 B 公司提供。人乳头瘤病毒 (HPV) DNA 检测试剂盒 (荧光-PCR 法), 检测 13 种高危型 HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68), 由 C 公司提供。Abbott 实时高危 HPV 检测试剂盒, 检测 14 种高危型 HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), 由 D 公司提供。高危型人乳头瘤病毒 DNA 检测试剂盒 (酶切信号放大法), 检测 14 种高危型 HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), 由 E 公司提供。

2 方法

2.1 HPV 基因分型质控品盘 由中国药品生物制品检定所体外诊断试剂与培养基室通过对不同型别 HPV 样本收集、样本型别检测后, 根据 GenBank 中参考序列设计各型别 L1 基因扩增引物, 通过 PCR 扩增、连接转化构建包含不同型别 L1 基因重组质粒, 通过对 30 个重组质粒序列测定, 测定序列进行 BLAST 比对, 成功建立了 HPV-L1 基因分型质控品。该质控品盘共包括 30 种 HPV 基因型别, 其 DNA 浓度均为为 $10^8 \sim 10^9$ 拷贝 \cdot mL^{-1} 左右。

2.2 荧光 PCR 法检验 将中国药品生物制品检定所体外诊断试剂与培养基室提供的 30 种 HPV 质粒 (原始浓度为 $10^8 \sim 10^9$ 拷贝 \cdot mL^{-1}), 分别以 10 倍梯度稀释, 一直稀释到 10^5 拷贝 \cdot mL^{-1} 左右。稀释液为人类全基因组溶液, 浓度为 $3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。根据不同的试剂盒的说明书进行扩增, 使用 ABI 7500 Real-Time PCR 仪进行分析。

2.3 酶切放大信号法检测 使用样本同荧光 PCR 法试剂所用样本, 根据试剂盒说明书进行操作, 使用配套仪器进行检验。

3 结果

试剂 A 分型结果: HPV 基因分型质控品盘 30 种不同型别 HPV 质粒中有 23 种型别检测结果符合, 7 种型别不符合, HPV 59 型漏检, HPV 53, 54, 61, 66, 72, 81 型有交叉反应见表 1、表 2 及图 1。

表 1 HPV 质粒的检测结果

Tab 1 The detection of HPV plasmids

HPV 型 (HPV type)	试剂 A (reagent A)	试剂 B (reagent B)	试剂 C (reagent C)	试剂 D (reagent D)	对照试剂 E (control reagent E)
6	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)
11	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)
16	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)
18	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)
26	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)
31	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)
33	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)
35	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)
39	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	-, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)
40	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)
42	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)
43	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	+, 不符合 (cross)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)
44	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)
45	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)
51	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	-, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)
52	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)
53	+, 不符合 (cross)	-, 符合 (right)	+, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)
54	+, 不符合 (cross)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)
56	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	-, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)
58	+, 符合 (right)	-, 不符合 (missed)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)
59	-, 不符合 (missed)	+, 符合 (right)	-, 符合 (right)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)
61	+, 不符合 (cross)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)
66	+, 不符合 (cross)	-, 符合 (right)	+, 不符合 (cross)	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)
68	+, 符合 (right)	+, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 不符合 (missed)	+, 符合 (right)
70	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)
72	+, 不符合 (cross)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)
73	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)
81	+, 不符合 (cross)	-, 符合 (right)	+, 不符合 (cross)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)
83	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)
CP8304	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)	+, 不符合 (cross)	-, 符合 (right)	-, 符合 (right)

注 (notes): “+”表示检出 (detected); “-”表示未检出 (not detected); 符合 (right) 表示与预期结果相符, 不符合 (missed) 表示与预期结果不符有漏检现象, 不符合 (cross) 表示与预期结果不相符有交叉现象 [“+” Indicates the detection (detected); “-” that were not detected (not detected); consistent with (right) said that with the expected results do not meet (missed) that does not match with the expected results have missed the phenomenon, do not meet (cross) that does not match the expected result have a crossover phenomenon]

表 2 5种试剂检测结果统计表

Tab 2 Five reagents for the test results tables

质控品 (control material)	试剂 A (reagent A)	试剂 B (reagent B)	试剂 C (reagent C)	试剂 D (reagent D)	对照试剂 E (control reagent E)
符合 (right)	23	29	26	29	30
不符合 (missed/cross)	7	1	4	1	0

注 (notes): 符合 (right) 表示与预期结果相符, 不符合 (missed/cross) 表示与预期结果不相符 [Consistent with (right) said that with the expected results do not meet the (missed/cross) represents the expected results do not match]

试剂 B 分型结果: 试剂 B 检测 HPV 基因分型质控品盘 30 种不同型别 HPV 质粒结果中有 29 种型别检测结果符合, 1 种型别不符合, HPV 58 型漏检, 见表 1 表 2。

试剂 C 分型结果: 试剂 C 检测 HPV 基因分型质控品盘 30 种不同型别 HPV 质粒结果中有 26 种型别检测结果符合, 4 种型别不符合, HPV 43 66 81, CP8304 型有交叉反应, 见表 1、表 2。

试剂 D 分型结果: 试剂 D 检测 HPV 基因分型质控品盘 30 种不同型别 HPV 质粒结果中有 29 种型别检测结果符合, 1 种型别不符合, HPV 68 型漏检, 见表 1 表 2。

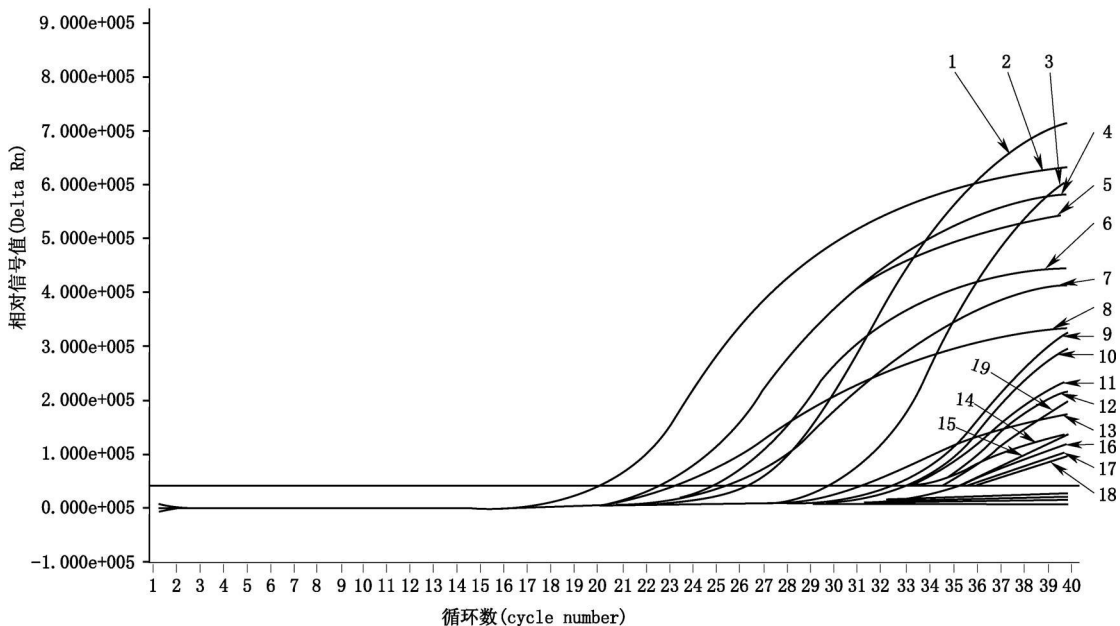


图 1 试剂盒 A 30 种 HPV 基因型检测结果扩增曲线图

Fig 1 A kit for HPV genotype test results of 30 kinds of amplification curve

1~ 19. 分别为试剂盒阳性质控品 (positive control materials for the kit), HPV 18 HPV 16 HPV 72 HPV 52 HPV 68 HPV 81 HPV 39 HPV 66 HPV 58 HPV 45, HPV 31, HPV 54, HPV 35 HPV 53, HPV 33 HPV 51, HPV 56 HPV 61

对照试剂 E 分型结果: HPV 基因分型质控品盘 30 种不同型别 HPV 质粒中有 30 种型别检测结果符合, 无漏检现象, 见表 1、表 2。其中 28 种不同型

别的检测结果见图 2 (HPV 基因型 81, 83 结果为阴性, 并未在图 2 中显示)。

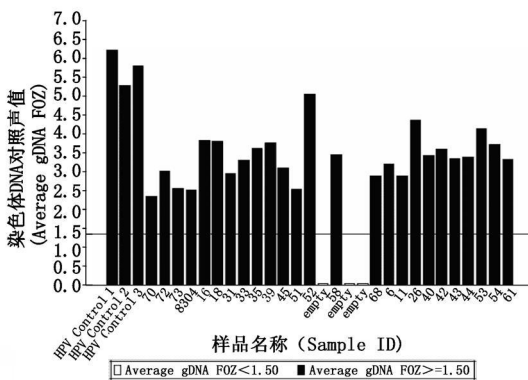
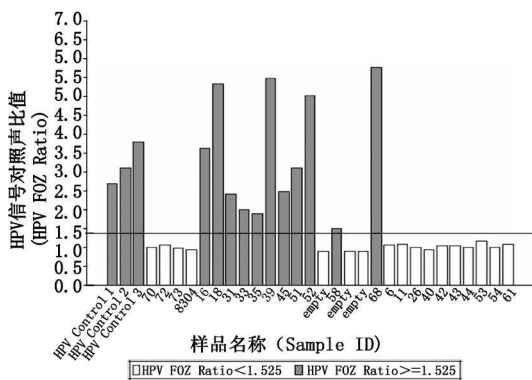


图 2 试剂盒 E 28 种 HPV 基因型检测结果图

Fig 2 E kit for HPV genotype test results of 28 specie

结果比较: 4 种试剂中 A 试剂出现交叉反应及漏检现象最为严重; C 试剂交叉现象严重, 无漏检现象; B 和 D 试剂均有漏检现象; E 试剂能够准确地区分开 HPV 基因分型质控品盘中的 30 种不同型别 HPV 质粒。

4 讨论

中国药品生物制品检定所体外诊断试剂与培养基室建立的含有 30 种不同型别的 HPV - L1 基因分型质控品几乎涵盖了临床所能常见的 HPV 的型别,

能评价绝大多数 HPV 基因分型试剂盒。对目前市面上的 4 家公司的 HPV 检测试剂盒 (荧光 - PCR 法) 和高危型人乳头瘤病毒 DNA 检测试剂盒 (酶切信号放大法) 产品进行检测评价。结果表明这些试剂盒基本能正确区分质控品中 HPV 基因型, 但有荧光 PCR 检测试剂盒对于部分的 HPV 基因型有漏检和交叉现象。

HPV 检测试剂盒 (荧光 PCR 法) 的原理是根据不同基因型 HPV 已知核酸序列设计引物探针, 在

PCR 反应体系中加入荧光元素 (荧光染料、荧光标记探针、荧光标记引物等), 荧光元素在光刺激下释放的荧光能量的变化直接反映出 PCR 扩增产物量的变化, 荧光信号变量与扩增产物变量成正比, 并通过足够灵敏的自动化仪器实现对荧光的采集和分析以达到对模板 DNA 进行分析的目的。而其中最关键的部分在于根据不同基因型 HPV 的核酸序列设计与其相匹配的引物探针。但由于 HPV 基因具有多态性^[9], 而引物探针是根据不同基因型中的一致序列进行设计的, 所以当设计的引物探针与所检 HPV 基因型中的序列不相匹配时引物探针将无法识别该基因型从而导致漏检; 同时, 各个 HPV 基因型本身具有一定的变异度^[10]也可能导致引物探针无法识别出该基因型的不同突变体造成漏检。如探针设计时所选用的序列与所检的多个 HPV 基因型的序列出现不同程度匹配时则可能出现交叉反应。酶切放大法为最近通过美国 FDA 认证的一种新型的 HPV 分型检测方法, 它的原理为使用一种 Cleavase 酶切割由 2 种特定序列的寡核苷酸与目标 DNA 结合形成重叠时, 在目标 DNA 识别位点上形成的特定结构。该结构可被 Cleavase 酶识别为底物。Cleavase 酶使荧光团与抑制分子之间的 FRET 寡核苷酸断开, 并产生荧光信号, 作为断开的片段反复断开、结合的标记^[7]。通过本研究发现酶切放大法较荧光 PCR 法其检测结果更为准确。因此, 在 HPV 核酸测试剂盒 (荧光 PCR 法) 的研发中应在通过质控盘的考核情况下加大临床样本的验证, 从而对其产品进行进一步的验证和考核。

参考文献

- 1 Murray H, Nguyen D, Westbrook T, *et al* Biology of human papillomaviruses *Int J Exp Pathol*, 2001, 82(1): 15
- 2 Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer *Clin Microbiol Rev*, 2003, 16(1): 1
- 3 Khan M J, Castle PE, Lorincz AT, *et al* The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice *J Natl Cancer Inst* 2005, 97(14): 1072
- 4 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
- 5 World Health Organization International Agency for Research on Cancer IARC Handbooks of Cancer Prevention. Cervix Cancer Screening Lyon 2005. 10
- 6 Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ HPV detection methods *Dis Mark*, 2007, 23(4): 273
- 7 Snijders PJ, Heideman DA, Meijer CJ Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens *APMIS*, 2010, 118(6-7): 520
- 8 HUANG Jie(黄杰), QU Shou-fang(曲守方), XU Ren(徐任), *et al* The establishment of quality control materials for human papillomavirus genotyping (人乳头瘤病毒基因分型质控品的建立). *Chin J Lab Med* (中华检验医学杂志), 2010, 33(6): 559
- 9 Stewart AC, Eriksson AM, Manos MM, *et al* Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective *J Gen Virol* 1996, 70(5): 3127
- 10 Maclean J, Koekemoer M, Olivier AJ *et al* Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *J Gen Virol*, 2007, 88: 1460

(本文于 2010 年 10 月 20 日收到)