

广东地区宫颈癌组织 HPV18*L1* 基因的克隆及序列分析

罗京资¹, 宇 丽¹, 周羽竝¹, 刘 红¹, 刘 萍²,
李发涛³, 李冬艳¹, 马 团¹

(1. 暨南大学医学院 生物化学教研室, 广东 广州 510632; 2. 广州市番禺妇幼保健院, 广东 广州 511400;
3. 广州市妇婴医院, 广东 广州 510180)

[摘 要] 目的: 了解广东地区地方株 HPV18*L1* 基因结构特点, 为 HPV 感染的检测和基因工程疫苗的研制提供实验基础。方法: 采用 PCR 技术从广东地区宫颈癌组织中扩增 HPV18*L1* 基因, 克隆入毕赤酵母表达载体 *pPICZαB*, 测序并对 HPV18*L1* 基因进行序列分析。结果: 广东地区分离株与德国标准株在核苷酸序列上有 4 处不同, 其中 3 处由于核苷酸的改变, 其编码的氨基酸也发生相应变化, 与标准株的同源性为 99.8%。与中国西安地区分离株比较有两处突变点相同。结论: 广东地区 HPV18*L1* 分离株与德国标准株、中国其他地区分离株之间均存在差异。

[关键词] 人乳头瘤状病毒 18 型; 广东; *L1* 基因; 序列分析

[中图分类号] R373 [文献标识码] A [文章编号] 1000-9965(2009)02-0162-04

Cloning and sequencing of human papillomavirus type 18*L1* gene from cervical cancer tissue in Guangdong area

LUO Jing-zi¹, YU Li¹, ZHOU Yu-bing¹, LIU Hong¹, LIU Ping², LI Fa-tao³, LI Dong-yan¹, MA Tuan¹

(1. Department of Biochemistry, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Panyu Maternal and Child Care Service Centre, Guangzhou 511400, China;

3. Guangzhou Women and Children's Hospital, Guangzhou 510180, China)

[Abstract] Aim: To clone and analyze the whole sequence of HPV18*L1* gene from Guangdong specimen of cervical cancer. Methods: The HPV18*L1* gene were amplified from human cervical carcinoma tissues in Guangdong province by PCR, and cloned into Pichia pastories expression vector *pPICZαB*. The HPV18*L1* gene were sequenced and analyzed. Results: The HPV18*L1* gene sequence were obtained, and the HPV18*L1* Pichia pastories expression vector were constructed. Compare to the standard strain (German), there were 4 nucleotide mutations. The further amino acid analysis demonstrated that 3 nucleotide mutations induce the changes of amino acid, the sequences of Guangdong strain were 99.8% homology with Germanic standard strain. Compare to the XiAn strain got by Gao, there were 2 same nucleotide mutations. Conclusion: There are nucleotide differences of the HPV18*L1* gene among Germanic standard strain, Guangdong strain and other Chinese strain. Amino acids of Guangdong strain differ from those of Chinese strain.

[Key words] human papillomavirus (HPV) type 18; Guangdong; *L1* gene; analysis of sequence

[收稿日期] 2008-12-27

[基金项目] 教育部科学技术研究重点项目(02190); 广东省卫生厅医学科研基金项目(A2001305)

[作者简介] 罗京资(1979-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 分子生物学

通讯作者: 宇 丽, 女, 教授, 硕士生导师, Tel: 020-85220256; E-mail: doctoryuli@yahoo.com.cn

在我国,宫颈癌发病率在女性恶性肿瘤中居第2位,每年约有 1.315×10^5 女性患上这种疾病,死亡约 5×10^4 人,占到世界新发病例总数的五分之一。

人乳头瘤病毒 (human papillomaviruses, HPV) 是子宫颈癌发生的主要病因。目前已发现近 200 种 HPV 基因型,高危型 HPV 感染是子宫颈癌发生的重要因素。有资料表明在世界大部分地区,子宫颈癌组织中 HPV 的检出率高达 99%, HPV16 和 HPV18 是宫颈癌发生的高危因素^[1],而 HPV18 是仅次于 HPV16 的高危型 HPV,比 HPV16 具有更强的恶性转化能力。HPV 晚期基因 *L1* 编码的病毒主要为衣壳蛋白,是高度保守的糖蛋白^[2],糖基化作用对其折叠和行使其功能有一定作用,并能刺激机体产生保护性抗体,是目前制备预防性疫苗的理想抗原。HPV 不能在体外经组织培养增殖,因而 *L1* 基因的克隆和表达对基因工程疫苗及诊断试剂的研制具有重要意义。

美国食品与药品管理局 (FDA) 正式批准美国默克公司生产的预防性宫颈癌疫苗是针对其本国国民所感染的人乳头瘤状病毒研制的,但 HPV 病毒存在着地域变异性,研究针对本地区的 HPV 流行株的疫苗很有必要^[3]。本实验对来自广东地区的 7 例宫颈癌患者手术标本中的 HPV18L1 基因进行了克隆及一级结构分析。

1 材料和方法

1.1 材料

(1) 组织来源 7 例宫颈癌组织均取自暨南大学第一附属医院和番禺妇幼保健院 (何贤纪念医院) 妇科住院手术患者。7 例患者年龄 38 ~ 69 岁,平均年龄 47 岁。患者均为广东籍,出生并长期生活在广东,均否认长期外地居住史。所取组织均经病理学确诊,取手术切除的病变组织,液氮速冻。

(2) 质粒与宿主菌 *pPICZαB*, 大肠杆菌菌株 TOP10F 均购自 invitrogen 公司。

(3) 试剂与仪器 蛋白酶 K, RNase 购自 invitrogen 公司; TagDNA 聚合酶为天根公司产品; PCR 产物纯化试剂盒,质粒提取试剂盒为 Omega 公司产品;限制性内切酶 *EcoR* I, *Sac* II, *T₄* 连接酶购自 promega 公司。酵母提取物、胰蛋白胨、蛋白胨、生物素和山梨醇均购于华美生物技术公司; Zeocin 为

invitrogen 公司产品;其他试剂为分析纯以上试剂。DL-2 型台式低速离心机为中国北京医用离心机厂产品; DYY-III 型电泳槽为中国北京六一仪器厂生产; UVB 凝胶成像仪为美国 Bio-rad 公司产品。

1.2 方法

(1) 癌组织 DNA 提取 参考文献[4]方法提取。

(2) 引物设计 根据 GenBank 发表的 HPV18L1 跨 HPV18L1 编码基因,设计 HPV18L1 基因上下游引物。并在上、下游引物 5' 端分别引入 *EcoR* I 及 *Sac* II 酶切位点 (下划线标出), 外加保护碱基。

上游引物: HPV18L1 5' AGGAATTCTTGGGATGTGCCTG 3'

下游引物: HPV18L1 5' TACCGCGGGGGGATAT-TGTCTA 3' 由上海生工合成。

(3) 目的基因 HPV18L1 的扩增与纯化 以广东地区宫颈癌组织提取的 DNA 为模板, HPV18L1 上下游引物进行 PCR 反应。反应参数: 95 °C 5 min, 94 °C 30 s, 51 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 35 个循环, 末次循环后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物经体积分数为 1% 凝胶电泳检测, 将目的条带切下后, 用 DNA 回收试剂盒回收纯化。

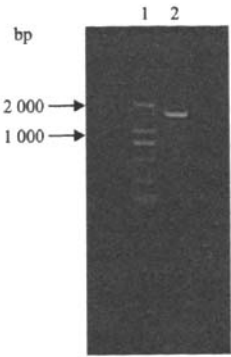
(4) 真核表达载体的构建与鉴定 将纯化的 HPV18L1 片段与 *pPICZαB* 载体同时用限制性内切酶 *EcoR* I 及 *Sac* II 进行酶切, HPV18L1 基因与载体按照 Omega 公司 DNA 回收试剂盒操作, 回收后 *T₄* 连接酶连接。将连接产物转化入 TOP10F, 感受态细胞, 在低盐 LB, Zeocin 抗性培养基中筛选培养。挑取阳性克隆扩大培养, 培养后小量提取质粒, 采用 *EcoR* I 及 *Sac* II 双位点单、双酶切鉴定。挑取两个重组子测序。

(5) DNA 序列测定由上海英俊生物技术有限公司完成。运用 DNAMAN version 5.2.2 软件对进行测序的 *L1* 基因进行分析。

2 结果

2.1 HPV18L1 基因片段 PCR 结果

采用 HPV18L1 基因的特异性引物, 以广东地区宫颈癌组织提取的 DNA 为模板扩增 HPV18L1 片段, 7 份标本中扩增出 1 份标本为 HPV18L1 阳性。PCR 产物在体积分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳, 其结果可见长约 1 600 bp 的扩增条带, 见图 1。



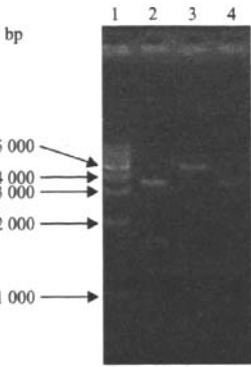
1: D 2000 DNA Marker
2: PCR 产物 HPV18L1 基因扩增片段
图 1 HPV18L1 基因 PCR 扩增产物

2.2 真核表达载体的构建及鉴定

回收 HPV18L1 片段与 *pPICZαB* 载体连接, 获得重组表达质粒 *pPICZαB* - HPV18L1, 经 *EcoR* I 及 *Sac* II 双酶切在 1 600 bp 及 3 500 bp 处各见一条清晰条带, 经 *EcoR* I 单酶切在 5 100 bp 处见一条清晰条带, 空质粒 *pPICZαB* 经 *EcoR* I 单酶切对照在 3 500 bp 处见一条清晰条带, 见图 2。

2.3 HPV18L1 基因的序列分析

本实验获得的 1 例 HPV18L1 核苷酸序列运用 DNAMAN 等软件进行序列分析, 并与 GenBank 收录的德国标准株 L1 基因序列进行比较, 结果显示本研究中克隆出的 HPV18L1 在核苷酸水平上与德国标准株有 99.8% 的同源性。克隆出的 HPV18L1 与德国标准株在核苷酸序列上有 4 处不同, 但起始



1: 1 kb DNA Marker; 2: *pPICZαB* - HPV18L1 *EcoR* I 与 *Sac* II 双酶切结果(3 500 bp 1 600 bp); 3: *pPICZαB* - HPV18L1 *EcoR* I (5 100 bp) 单酶切结果; 4: *pPICZαB* *EcoR* I 酶切结果(3 500 bp)

图 2 重组质粒 *pPICZαB* - HPV18L1 酶切鉴定结果

序列未发生改变, 读码框正确, 其中 3 处由于核苷酸的改变, 其编码的氨基酸也发生了变化。即标准株序列 5 504 处的 G 变为 A, 核苷酸三联密码 CGG 变为 CAG, 编码氨基酸由精氨酸(R) 变为谷氨酰胺(Q); 在 5 701 处 C 变为 G, 核苷酸三联密码 CCC 变为 CGC, 编码氨基酸由脯氨酸(P) 变为精氨酸(R); 在 6 625 处 C 变为 G, 核苷酸三联密码 CCC 变为 CGC, 编码氨基酸由脯氨酸(P) 变为精氨酸(R); 在 6 842 处 C 变为 G, 核苷酸三联密码 CCC 变为 CCG, 该处突变为同义突变, 其编码的氨基酸序列并未发生改变。见图 3 和表 1。另外广东地区克隆出的 HPV18L1 与 GAO 从西安地区克隆出的 1 例 HPV18L1 也有异同^[5]。

1) 5491	TTGTATCACCCACGGCCCCT	5691	TATGTGACTCCCACAAGCAT	5710
2)	TTGTATCACCCACAGCCCCT		TATGTGACTCGCACAAGCAT	
3) 6612	GTAGATACCACTCCCAGTACC	6831	GTTCCCCCCCCCCTAACTAC	6850
4)	GTAGATACCACTCGCAGTACC		GTTCCCCCCCCCGCCAATAC	

1) 基因库中德国标准株 HPV18L1 基因第 5 491 位到 5 710 位的部分碱基序列; 2) 克隆的 HPV18L1 基因点突变后第 5 491 位到 5 710 位的部分碱基序列; 3) 德国标准株 HPV18L1 基因第 6 612 位到 6 850 位的部分碱基序列; 4) 克隆的 HPV18L1 基因点突变后第 6 612 位到 6 850 位的部分碱基序列。

图 3 点突变前后 HPV18L1 基因部分碱基序列的比较

表 1 HPV18L1 广东分离株与德国标准株序列及
对应氨基酸的比较

核苷酸变 化的位置	核苷酸的变化		氨基酸的变化	
	标准株	广东地区 分离株	标准株	广东地区 分离株
5 504	C GG	C AG	R	Q
5 701	C CC	C GC	P	R
6 625	C CC	C GC	P	R
6 842	C CC	CC G	P	P

3 讨论

人乳头瘤病毒(HPV)颗粒呈球形, 其二十面体对称, 直径约 45 ~ 55 nm。HPV 的分子长度约 7.8 ~ 8 kb。HPV 基因组按功能分 2 个编码区, 早期 E 编码区有早期基因 E1 ~ E7, 包含病毒复制和细胞转化必需的信息; 晚期 L 编码区含晚期基因 L1 和 L2, 仅在分化的角化细胞中表达, 编码病毒颗粒的结构

蛋白^[6]。HPV LI 为人乳头瘤状病毒的主要衣壳蛋白,具有自我组装成病毒样颗粒(Virus-like particle, VLP)的特性,且高度保守。病毒样颗粒能刺激机体产生高滴度的中和抗体^[7],其结构与天然完整病毒的构型十分相似,易被巨噬细胞摄取。在树突状细胞中通过 cross-presentation 与 MHC-I 类分子(MHC class I molecule)结合呈递抗原决定簇,引起 CTL (cytotoxic T lymphocytes) 反应^[8]。病毒样颗粒不含病毒基因组 DNA,在宿主细胞中不能复制,没有感染性。HPV LI 的这些特性使其成为一个理想的预防性疫苗的靶抗原。因此在设计引物时,针对 LI 片段的全长序列,设计引物扩增了约 1 600 bp 片段。

现阶段已确认的 16、18、31、33、35、58 等为 HPV 病毒常见型别。HPV 型别分布与地域有一定关系,在我国 HPV58 型多见,而 HPV 18 型在东南亚地区检出率很高^[9],HPV18 的恶性转化及细胞永生化的能力更强^[10]。有研究证实 HPV 存在多种变种,即 HPV 基因呈高度多态性,与地理位置有关,且因人群遗传背景差异而与疾病的相关关系不同^[11]。

了解广东地区 HPV18/LI 的基本情况,从 7 例广东地区 HPV 阳性病人标本中鉴定出 1 例 HPV18/LI 阳性 DNA,克隆出 HPV18/LI 基因,构建了重组质粒 pPICZαB-HPV18/LI,并减少测序误差采用了正反两个方向对目的基因正链、负链测序及测通。

本实验克隆出的 HPV18/LI 基因序列与 GenBank 收录的德国标准株比较有 4 处碱基发生了变化,其中 3 处碱基的变化导致了氨基酸的改变,另外一处未引起氨基酸的改变。而 GAO^[5]克隆出的西安地区 HPV18/LI 较 GenBank 收录的原型比较有 12 处突变点,其在基因组中的位置分别为:5 603、5 701、5 875、5 920、6 157、6 312、6 357、6 382、6 401、6 430、6 460、6 625 与本实验克隆出的 HPV18/LI 相比有两处突变点相同,即 5 701 和 6 625 位点,均是由 C 突变为 G,核苷酸三联密码 CCC 突变为 CGC,编码氨基酸由脯氨酸(P)突变为精氨酸(R);而其它 10 处突变点在本实验结果中均未出现。这些区域性的突变差异值得关注,因为 LI 蛋白结构的改变可能会造成 HPV18/LI 蛋白免疫原性的差异。

综上,本实验从广东地区 1 例宫颈癌组织中成

功克隆 HPV18/LI 基因,为 HPV18 型预防性疫苗的进一步研制提供实验基础。

[参考文献]

- [1] SZAREWSKI A. Prophylactic HPV vaccines - an update [J]. *Cytopathology*, 2007, 18(1): 4-5.
- [2] MAJA G, IVONNE R, NADJA C A, et al. Prophylactic DNA immunization against multiple papillomavirus types [J]. *Vaccine*, 2007, 25(23): 4540-4553.
- [3] ICENOGIE J P, SATHYA P, MILLER D L, et al. Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and type 16 [J]. *Virology*, 1991, 184(1): 101-107.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992: 463-469.
- [5] 高艳娥, 杨会平, 张菊, 等. 宫颈癌组织高危 HPV18/LI 基因的克隆及序列分析 [J]. *肿瘤防治研究*, 2006, 33(3): 159-161.
- [6] LAIMINS L A. Regulation of transcription and replication by human papillomavirus [M] // MCCANCE D J. *Viruses*. Washington: ASM Press, 1998: 201-205.
- [7] 张学军, 刘维达, 秦建中. 现代皮肤性病学进展 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1997: 163.
- [8] PAIKER T J, MONTERO J M, MARTIN M M, et al. Antibody, cytokine and cytotoxic T lymphocyte responses in chimpanzees immunized with human papillomavirus virus like particles [J]. *Vaccine*, 2001, 19(27): 3733-3743.
- [9] FRANCO E L, DUARTEFRANCO E, FERENCZY A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection [J]. *CMAJ*, 2001, 164(7): 1017-1025.
- [10] 邓金桂, 李体远. 深圳地区人乳头瘤病毒 18 型 E6/E7 基因的克隆、序列分析及 E6/E7 融合基因的构建 [J]. *广东医学*, 2008, 29(3): 433-436.
- [11] YAMADA T, MANOS M M, PETO J, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective [J]. *J Virol*, 1997, 71(3): 2463-2472.

[责任编辑:朱颖娜]