

尖锐湿疣组织中 HPV 型别检测及 HPV11 型 L1 基因的克隆与测序

庄敏¹, 谷鸿喜^{1*}, 魏兰兰¹, 刘希君¹, 李迪¹, 崔洪波¹, 孔卫兰²

[摘要] 目的 分析黑龙江地区尖锐湿疣组织感染的 HPV 型别分布情况, 并对 HPV11 型流行株 L1 基因进行克隆和测序, 检测序列变异情况。方法 提取 30 例尖锐湿疣组织标本中的 DNA, 用 HPV L1 区通用引物及特异性 HPV6b, 11, 16, 18 型引物进行 PCR 扩增, 分析尖锐湿疣组织中感染的 HPV 型别分布。对其中 4 株 HPV11 型阳性标本 L1 基因, 经酶切、连接, 分别构建 pSP73-HPV11L1 重组质粒, 并对其 L1 片段进行测序。结果 30 例标本中, HPV 6b 和 11 型感染数分别为 11 例, 各占 36.7%; 有 2 例合并 HPV6 b/11/16 型的混合感染, 占总病例数的 6.7%; 1 例 HPV16 型单独感染, 未鉴定出 HPV18 型感染, 其他型别 5 例。pSP73-HPV11L1 重组质粒测序后, 4 株 HPV11L1 基因序列完全一致, 可认为是黑龙江省流行株。其序列与原始株序列相比, 仅发现了两处同义点突变。结论 黑龙江地区尖锐湿疣组织中 HPV DNA 检出率为 100%, 以 6b 和 11 型为主, 偶见高危型别 16 型感染。克隆测序表明黑龙江省流行株 HPV11 型 L1 基因高度保守。

[关键词] 尖锐湿疣; 人乳头瘤病毒; L1 基因

[中图分类号] R 752.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-7089(2005)09-0519-03

Analysis of HPV Types and Cloning and Sequencing of HPV 11 L1 Gene in Acuminate Condyloma

ZHUANG Min, GU Hong-xi, WEI Lan-lan, et al

(Department of Microbiology, Haerbin Medical University, Haerbin 150086, China)

Abstract: **Objective** To analyze the viral types of human papillomavirus (HPV) in acuminate condyloma biopsy specimens in Heilongjiang province and sequencing of HPV 11 L1 gene. **Methods** The tissue DNA was extracted from 30 biopsy specimens of acuminate condyloma, respectively. The L1 gene of HPV was amplified with common primers followed by 6b, 11, 16 and 18 type-specific primers PCR. Four positive L1 fragments of HPV 11 were identified by cloning into plasmid pSP73 and sequencing. **Results** HPV 6b and HPV 11 were the two most common types, no differences were found between them. Two biopsy specimens were multi-types of HPV 6 b/11/16, amount for 6.7%. In comparison, only one of the 30 biopsy specimens was type 16 (3.3%) and no type 18 was found. And five specimens, 16.6% for other HPV types. Sequencing analysis showed the same homology in four clones of HPV type 11 L1 gene, only two synonymous mutations were found compared with the original one in GeneBank. It indicated this local type of HPV 11 represented the epidemic strain in Heilongjiang province. **Conclusion** The positive rate of HPV infection in all acuminate condyloma biopsy specimens was 100%. The most common types in acuminate condyloma were type 6b and 11, whereas the high-risk type 16 or 18 was very low. High conserved L1 sequence of HPV 11 could represente the epidemic strain in Heilongjiang province.

Key words: Human Papillomavirus, HPV; Acuminate condyloma; L1 gene

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是引起人类皮肤、黏膜乳头瘤或疣的一类肿瘤相关病毒。目前, HPV 已分离出 100 多个型别, 包括高危型别和低危型别。其中, 高危型别以 HPV16 型为主, 与宫颈癌等皮肤和黏膜的恶性肿瘤发生密切相关; 低危型别以 HPV6 型和 11 型为主, 主要引起良性瘤或疣, 如尖

锐湿疣和扁平疣, 偶也可引起细胞恶性转化^[1]。分子流行病学研究表明, 宫颈癌组织中 HPV DNA 的检出率为 99.7%, 其中 HPV16 型占 50% 左右。尖锐湿疣组织中 HPV 的检出率为 100%, 以 6b/11 型为主, 少部分由高危型别 16, 18 型感染引起。HPV 基因组主要包括 3 个部分: 早期区、晚期区、调控区。其中晚期区基因 L1 编码主要衣壳蛋白, 免疫原性稳定, 是制备基因工程疫苗较理想的候选基因^[2]。本研究以尖锐湿疣组织 DNA 为模板, 分别用通用引物和 HPV6b, 11, 16, 18 型特异引物进行 PCR 鉴定, 又将 4 株 HPV11 型 L1 基因分别进行克隆测序, 以了解本地区尖锐湿疣组织中 HPV 感染情况, 并分析 HPV11 型 L1 基因序列变异特点。

[基金项目] 黑龙江省攻关项目基金 (GB02C111), 黑龙江省青年基金 (QC03C04)

[作者单位] 1 哈尔滨医科大学微生物学教研室, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2 哈尔滨医科大学附属第一医院皮肤科, 黑龙江 哈尔滨 150086

[作者简介] 庄敏 (1972-), 女, 黑龙江省哈尔滨市人, 医学博士, 副教授, 从事人乳头瘤病毒研究。

[通讯作者] 谷鸿喜, E-mail: hxgu2432@163.com

1 材料和方法

1.1 标本 尖锐湿疣组织标本采自哈尔滨医科大学附属第一、第二临床医院皮肤科和妇科、沈阳军区第 211 医院妇科门诊临床诊断为尖锐湿疣的患者,共 30 例。活检标本存入小离心管中,立即 -20℃ 冻存待用。

1.2 主要试剂 pSP73 克隆质粒 (Promega); E. Coli JM109 菌株 (本室保存); Pfu DNA 聚合酶 (华美公司), TaqDNA 聚合酶 (Takara), Xho I, kpn I (promega) 内切酶, T4DNA 连接酶 (Invitrogen); λDNA/Hind III DNA 和 200bp Maker (华美公司); DNA 回收试剂盒

(上海申能博彩公司); 组织、细胞 DNA 提取试剂盒 (华舜公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本组织 DNA 提取及 PCR 引物设计 按试剂盒说明书提取尖锐湿疣组织标本 DNA。PCR 扩增所用通用引物根据文献^[3]从 HPV L1 区中选取保守序列设计,并加以修改。HPV 6b 型、11 型、16 型和 18 型特异引物分别根据 GeneBank 中所查 L1 基因序列数据,比较后设计横跨 L1 完整开放读码框 (ORF)。并分别在各引物对的 5' 端加入相应的酶切位点。引物设计列表如下。

表 1 PCR 所用 HPV L1 区通用引物及型特异引物

引物号	扩增 HPV 型别	序列 (5' ~ 3')	所加酶切位点	扩增片段大小
P1	HPV 上游通用引物	5'-gcacagggtcataataatgg-3'		L1 区部分序列 453 bp
P2	HPV 下游通用引物	5'-cgacccaaggaaactgate-3'		
P3	HPV6b 型上游引物	5'-attctcgagtttcagatgtggcgctagcg-3'		HPV6b L1 全长 1503bp
P4	HPV6b 型下游引物	5'-cggcggtaaccattaccttttagtttggcg-3'		
P5	HPV11 型上游引物	5'-attctcgagttacagatgtggcgctagcg-3'	Xho I	HPV11 L1 全长 1506bp
P6	HPV11 型下游引物	5'-cggcggtaaccatacaacaacacactgacacac-3'	Kpn I	
P7	HPV16 型上游引物	5'-attggtcgacatgtctctttgtgctagtg-3'		HPV16 L1 全长 1518bp
P8	HPV16 型下游引物	5'-cgggtctagaacttacagcttactgttttggcg-3'		
P9	HPV18 型上游引物	5'-agagtcgacacgggtctgatattac-3'		HPV18 L1 全长 1718bp
P10	HPV18 型下游引物	5'-acaagcttacttctgctgacgtacac-3'		

1.3.2 PCR 法 HPV L1 基因扩增及型别鉴定 分别以提取的尖锐湿疣组织 DNA 为模板进行 PCR 扩增。每标本均首先用通用引物扩增,再分别以型特异引物进行扩增。型特异引物扩增反应参数为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 2.5 min,35 个循环;末次循环后 72℃ 延伸 7min。通用引物扩增时,改变退火温度为 40℃ 1 min,延伸时间为 72℃ 1 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.3 pSP73-HPV11 L1 重组质粒的构建鉴定 HPV11 型阳性标本的 PCR 扩增产物经回收纯化(按试剂盒说明书操作),得到其 DNAL1 片段用以构建重组质粒的基因。分别用 Xho I 和 kpn I 进行双酶切 HPV11 L1 基因及载体 pSP73,酶切产物分别用 DNA 凝胶回收试剂盒回收。载体质粒与 L1DNA 按摩尔数为 1: 3 的比例 16℃ 连接 4 h。连接产物转化至感受态 JM109 大肠菌中,氨苄青霉素筛选重组阳性克隆。再小量提取阳性克隆质粒,用 Xho I 和 kpn 单酶切电泳鉴定。

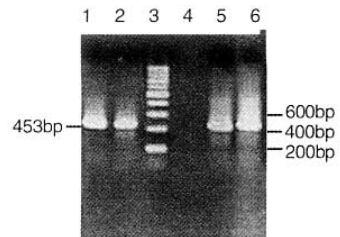
1.3.4 pSP73-HPV11 L1 重组质粒的测序分析 共克隆了 4 例标本中 HPV11 L1 基因,分别取阳性重组质粒进行测序(上海博雅公司)。结果用 GeneRunner 和 BLAST 软件进行比较分析。

万方数据

2 结果

2.1 尖锐湿疣组织提取 DNA 结果 将提取的 DNA 经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳及 EB 染色,30 例标本在紫外灯下均观察到 DNA 条带,在 23 kb 和 9.4 kb 之间。

2.2 通用引物 PCR 扩增结果 用 HPV 通用引物扩增后,30 例标本均在 453 bp 处出现特异条带,电泳结果见图 1。

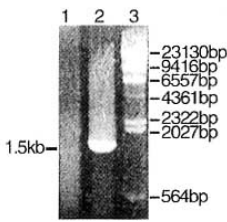


泳道 1,2,5,6:尖锐湿疣组织的 PCR 产物;泳道 3: 标准分子量;泳道 4: 阴性对照

图 1 通用引物扩增鉴定尖锐湿疣组织中 HPV 感染

2.3 型特异引物 PCR 扩增结果 将 30 例尖锐湿疣组织提取的 DNA,分别用 6b,11,16,18 型特异引物扩增,扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,在 1500bp 处出现特异条带为阳性。电泳结果见图 2。

2.4 30 例标本中 HPV 型别检测结果 见表 2。



泳道 1: 阴性对照;泳道 2:PCR 产物;泳道 3:λ DNA/HindIII

图 2 HPV L1 全长 PCR 扩增结果

表 1 30 例尖锐湿疣组织中 HPV 型别的检测结果

HPV 型别	阳性例数	阳性率(%)
6b	11	36.7
11	11	36.7
16	1	3.3
18	0	0
6b + 11 + 16	2	6.7
其他型别	5	16.6

2.5 pSP73-HPV11 L1 克隆质粒的酶切鉴定结果

pSP73-HPV11 L1 重组质粒分别用 XhoI 和 KpnI 进行单酶切,酶切后所得片段都为 4.0kb。SP73 质粒分别用 XhoI 和 KpnI 进行单酶切,酶切后所得片段都为 2.46kb,酶切结果与预期相符。

2.6 HPV11L1 基因核苷酸序列测定结果

利用测序引物对 4 株 pSP73- HPV11 L1 重组质粒中 HPV11 L1 基因序列进行测定。测序结果用 GeneRunner 和 BLAST 软件进行分析。结果克隆出的 4 株 HPV11 型 L1 基因的核苷酸序列均相同,与标准株原始序列^[4]相比,发现有两处不同,分别是第 258 位的碱基为 T,而原始序列为 C;第 837 位碱基为 T,而原始序列为 C。但这两处并没有影响到所编码的氨基酸,均为无意义突变。

3 讨论

HPV 感染可引起宫颈癌和尖锐湿疣等多种疾病,主要通过性接触传播。HPV16 和 18 型属高危型别,70% 宫颈癌与此两型病毒感染有关;HPV6 型和 11 型属低危型别,主要引起尖锐湿疣。尖锐湿疣作为目前主要的性传播疾病,流行范围较广,危害性较大。Christensen 等^[5]报道 65 例尖锐湿疣标本中只有 2 例没有鉴定出 HPV 6b 和 11 型,国内外其他报道也证实尖锐湿疣组织 HPV 6 b 和 11 型检出率都很高。本组检测的 30 例标本中,HPV 6 b 和 11 型共占 80%,其中 6b 型和 11 型感染例数相等,包括重叠感染各占 43.3%,与 Grce 等^[6]报道的 HPV6b 型占多数不太一致,可能有地域之差。在不同人群中感染率也不相同,在普通人群中尖锐湿疣组织感染以 HPV6b 型占优势,

而在免疫抑制人群中 11 型占优势,其机理不十分清楚。国内外的相关调查中尖锐湿疣组织 HPV 高危型别的感染率差异较大。少数报道没有鉴定出 HPV16, 18 型感染^[7],而大部分报道尖锐湿疣组织中有 HPV 高危型别的感染,但感染率不同,在 1% ~ 20% 之间。本组检测的 30 例标本中有 2 例是 HPV6b, 11, 16 三个型别混合感染,占总病例数的 6.7%,但未检出 HPV18 型感染。混合感染的存在提示 HPV 具有型特异性,各型别之间无交叉保护。至于 6b, 11, 16, 18 型特异引物扩增阴性而通用引物扩增阳性的 5 例标本,可能是 31, 33, 35 等其他型别感染,有待于今后进一步研究。

为了解 HPV11 型流行株突变情况,本研究对其中 4 株 HPV11L1 基因进行重组质粒构建,得到 HPV11 L1 全基因片段,并分别进行了克隆测序。测序结果为 4 株基因序列完全一致,且阅读框架正确,认为 HPV11 是黑龙江地区流行株。其序列与 1986 年 Dartmann^[4]发表的 HPV11 L1 序列相比,仅发现了两处点突变,一是在第 258 位的碱基为 T,而原始序列为 C;二是第 837 位碱基为 T,而原始序列为 C,且均为氨基酸的第 3 位密码子,没有影响到蛋白序列,属同义突变。这说明同型 HPV 不同分离株之间只有少数点突变造成差异,而且经常出现在密码子的第 3 位。在 GeneBank 上的 HPV11 L1 基因数据较少,符合其高度保守的特点。该结果为进一步构建基因工程疫苗提供了实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990[J]. *Int J Cancer*, 1999, 80(6):827-841.
- [2] Lehtinen M, Kibur M, Luostarinen T, et al. Prospects for phase III-IV HPV vaccination trials in the Nordic countries and in Estonia[J]. *J Clin Virol*, 2000, 19(1-2):113-122.
- [3] Monos M, Ting Y. PCR Protocols: A Guide to Methods and Application [M]. San Diego: Academic Press, 1990. 365-367.
- [4] Dartmann K, Schwarz E, Gissmann L, et al. The nucleotide sequence and genome organization of human papillomavirus type 11 [J]. *Virology*, 1986, 151:124-130.
- [5] Christensen ND, Reed CA, Cladel NM, et al. Monoclonal antibodies to HPV-6 L1 virus-like particles identify conformational and linear neutralizing epitopes on HPV-11 in addition to type-specific epitopes on HPV-6 [J]. *Virology*, 1996, 224(2):477-486.
- [6] Grce M, Husnjak K, Skerlev M, et al. Detection and typing of human papillomaviruses by means of polymerase chain reaction and fragment length polymorphism in male genital lesions[J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(3B):2097-2102.
- [7] De Marco F, Di Carlo A, Poggiali F, et al. Detection of HPV in genital condylomata: correlation between viral load and clinical outcome[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2001, 20(3):377-383.

[收稿日期] 2005-01-27 [修回日期] 2005-07-05

作者: [庄敏](#), [谷鸿喜](#), [魏兰兰](#), [刘希君](#), [李迪](#), [崔洪波](#), [孔卫兰](#)
作者单位: [庄敏, 谷鸿喜, 魏兰兰, 刘希君, 李迪, 崔洪波 \(哈尔滨医科大学微生物学教研室, 黑龙江, 哈尔滨, 150086\)](#), [孔卫兰 \(哈尔滨医科大学附属第一医院皮肤科, 黑龙江, 哈尔滨, 150086\)](#)
刊名: [中国皮肤性病学杂志](#) **ISTIC PKU**
英文刊名: [THE CHINESE JOURNAL OF DERMATOVENERELOGY](#)
年, 卷(期): 2005, 19(9)
被引用次数: 7次

参考文献(7条)

1. [Parkin DM;Pisani P;Ferlay J](#) [Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990 1999\(06\)](#)
2. [Lehtinen M;Kibur M;Luostarinen T](#) [Prospects for phase III-IV HPV vaccination trials in the Nordic countries and in Estonia](#)[外文期刊] 2000(1-2)
3. [Monos M;Ting Y](#) [PCR Protocols: A Guide to Methods and Application](#) 1990
4. [Dartmann K;Schwarz E;Gissmann L](#) [The nucleotide sequence and genome organization of human papillomavirus type 11](#)[外文期刊] 1986
5. [Christensen ND;Reed CA;Cladel NM](#) [Monoclonal antibodies to HPV-6 L1 virus-like particles identify conformational and linear neutralizing epitopes on HPV-11 in addition to type-specific epitopes on HPV-6](#)[外文期刊] 1996(02)
6. [Grce M;Husnjak K;Skerlev M](#) [Detection and typing of human papillomaviruses by means of polymerase chain reaction and fragment length polymorphism in male genital lesions](#)[外文期刊] 2000(3B)
7. [De Marco F;Di Carlo A;Poggiali F](#) [Detection of HPV in genital condylomata: correlation between viral load and clinical outcome](#) 2001(03)

本文读者也读过(9条)

1. [韩立群](#), [任皎](#), [梁雨](#), [田厚文](#), [职慧军](#), [骆卫锋](#), [陆振华](#), [魏兰兰](#), [阮力](#) [表达 HPV 16 型结构蛋白的非复制型重组痘苗病毒的构建与鉴定](#)[期刊论文]-[中华实验和临床病毒学杂志](#)2002, 16(3)
2. [贾咏存](#), [樊杨](#), [纳文霞](#), [JIA Yong-cun](#), [FAN Yang](#), [NA Wen-xia](#) [HPV L1 检测在宫颈乳头状瘤病毒感染预后判定中的作用](#)[期刊论文]-[宁夏医学杂志](#)2010, 32(8)
3. [庄敏](#), [谷鸿喜](#), [李迪](#), [崔洪波](#), [刘希君](#), [魏兰兰](#), [凌虹](#), [ZHUANG Min](#), [GU Hong-xi](#), [LI Di](#), [CUI Hong-bo](#), [LIU Xi-jun](#), [WEI Lan-lan](#), [LING Hong](#) [HPV-16-11 L1 双价重组杆状病毒的构建及 VLP 形成](#)[期刊论文]-[中华微生物学和免疫学杂志](#) 2006, 26(9)
4. [包广宇](#), [陆奎英](#), [丁秀芝](#), [谷鸿喜](#), [王静](#), [BAO Guang-yu](#), [LU Kui-ying](#), [DING Xiu-zhi](#), [GU Hong-xi](#), [WANG Jing](#) [基于 L1 蛋白的 HPV 血清学实验研究](#)[期刊论文]-[现代检验医学杂志](#)2010, 25(6)
5. [李迪](#), [谷鸿喜](#), [庄敏](#), [张凤民](#) [人乳头瘤病毒重组质粒的构建及蛋白表达](#)[期刊论文]-[中国公共卫生](#)2004, 20(4)
6. [姜波玲](#) [HPV L1 共同保守序列多肽多价性的 HPV 阳性临床标本的检测](#)[学位论文]2007
7. [司马妮](#), [王薇](#), [田训](#), [罗爱月](#), [李春晓](#), [王娟](#), [卢运萍](#), [王世宣](#), [马丁](#), [SIMA Ni](#), [WANG Wei](#), [TIAN Xun](#), [LUO Ai-yue](#), [LI Chun-xiao](#), [WANG Juan](#), [LU Yun-ping](#), [WANG Shi-xuan](#), [MA Ding](#) [HPV18 E6E7 反义荧光真核表达载体的构建及其在宫颈癌 HeLa 细胞中的表达](#)[期刊论文]-[肿瘤防治研究](#)2007, 34(6)
8. [张佳立](#), [郝红艺](#), [张江宇](#), [吴坤河](#), [郭玉娟](#), [李辉斌](#), [ZHANG Jia-li](#), [GAO Hong-yi](#), [ZHANG Jiang-yu](#), [WU Kun-he](#), [GUO Yu-juan](#), [Li Hui-bin](#) [宫颈液基细胞 HPV L1 壳蛋白表达的临床意义](#)[期刊论文]-[诊断病理学杂志](#)2010, 17(6)
9. [黄斌](#), [李瑞珍](#), [刘志红](#), [乌兰娜](#), [李鹃](#), [王纯](#), [周艳秋](#), [翁立明](#), [吴瑞芳](#), [Huang Bin](#), [Li Ruizhen](#), [Liu Zhihong](#), [Wu](#)

引证文献(7条)

1. [李荣敏, 潘靖华, 罗建文, 莫巧云](#) 3种方法取材检测HPV-DNA结果比较及诊断尖锐湿疣的价值[期刊论文]-[广西医学](#) 2010(2)
2. [唐勇, 唐孝亮](#) 尖锐湿疣患者及高危人群HPV DNA分型检测结果分析[期刊论文]-[检验医学与临床](#) 2009(17)
3. [杨琳, 刘文力, 金宁, 梁金珠, 韩莹](#) 微创活检术在尖锐湿疣诊断中的应用[期刊论文]-[中国中西医结合皮肤性病学杂志](#) 2007(3)
4. [金宁, 刘文力, 杨琳, 梁金珠, 韩莹](#) 性病高危人群HPV DNA分型检测结果分析[期刊论文]-[中国皮肤性病学杂志](#) 2007(8)
5. [梁金珠, 刘文力, 白英华, 金宁, 杨琳, 韩莹](#) 尖锐湿疣高危人群分泌物人乳头瘤病毒基因分型检测结果及临床分析[期刊论文]-[中国中西医结合皮肤性病学杂志](#) 2007(1)
6. [欧琴, 石朝辉, 朱珊珊, 张丽芳](#) 尖锐湿疣组织HPV6b和11型L1基因多态性及蛋白特性分析[期刊论文]-[温州医学院学报](#) 2008(5)
7. [李娟, 宋守荣, 魏羽佳, 左丽, 廖跃, 李家峰](#) 尖锐湿疣66例HPV检测及基因分型分析[期刊论文]-[中国皮肤性病学杂志](#) 2010(2)

引用本文格式: [庄敏, 谷鸿喜, 魏兰兰, 刘希君, 李迪, 崔洪波, 孔卫兰](#) 尖锐湿疣组织中HPV型别检测及HPV11型L1基因的克隆与测序[期刊论文]-[中国皮肤性病学杂志](#) 2005(9)