

温州地方株 HPV16 型 L1 基因多态性及蛋白特性分析

陈俊, 董海艳, 朱珊丽, 欧琴, 张丽芳

(温州医学院 微生物学与免疫学教研室, 浙江 温州 325035)

[摘要] 目的: 了解温州地方株 HPV16 L1 基因结构特点, 分析其结构蛋白 L1 基因多态性及蛋白特性变化, 为基于 L1 基因工程疫苗的设计和应提供理论依据。方法: 设计 HPV16 型 L1 基因特异性引物, 从宫颈癌组织标本提取 DNA, 进行 PCR 扩增鉴定, PCR 产物直接测序; 进一步用 Vector NTI 8.0 和 DNASTar 软件分析 HPV16 型 L1 基因多态性及蛋白特性变化情况。结果: 测定的序列与标准基因序列(NC 001526)比较, 温州地区宫颈癌感染的 HPV16 型 L1 基因同源性为 99.1%~99.8%, 分别形成 8 种突变模式, 其中 3 处由于核苷酸的改变, 翻译的氨基酸也相应发生变化, 但其编码蛋白在亲水性、表面可及性及抗原性上与标准株相比较无明显变化。结论: 温州地方株 HPV16 L1 核酸有一定程度的变异。

[关键词] 人乳头瘤病毒; 宫颈癌; L1 基因; 突变; 基因多态性

[中图分类号] R373.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2138 (2009) 06-0538-04

Analysis of L1 gene polymorphism and L1 protein property of HPV16 types in cervical carcinoma in Wenzhou CHEN Jun, DONG Hai-yan, ZHU Shan-li, OU Qing, ZHANG Li-fang. Department of Microbiology and Immunology, Wenzhou Medical College, Wenzhou, 325035

Abstract: **Objective:** To study the character of HPV L1 gene from Wenzhou area, and analyze changes of its polymorphism and protein property. **Methods:** The tissue DNA was extracted from cervical carcinoma. The L1 gene of HPV was amplified with PCR by 16 type specific primers, respectively. And L1 PCR products were identified by sequencing. At last, L1 gene polymorphism and protein property were analyzed with bio-soft of Vector NTI 8.0 and DNASTar. **Results:** Compared with standard L1 gene sequence (NC 001526), gene homology was 99.1%~99.8% and eight mutations were found in HPV16 type, three of these mutations produced protein variations because of amino acids changed, but differences of their proteins were not found in hydrophilicity, surface probability and antigenic index compared with the standard L1 protein property. **Conclusion:** The results show that some mutation had taken place in the nucleotide sequence of L1 gene of HPV 16 obtained from the cervical carcinoma tissues in Wenzhou area.

Key words: human papillomavirus; cervical carcinoma; L1 gene; mutation; gene polymorphism

人乳头瘤病毒 (HPV) 16 型是高危型 HPV 之一, 与宫颈癌的发生有关^[1], 约 50% 的宫颈癌患者肿瘤组织的 DNA 中检测到该型别^[2], 因此, 预防 HPV 感染对防治宫颈癌有重大意义。但 HPV16 在与不同遗传背景的宿主相互作用往往会引起病毒的变异, 影响 HPV 感染和转归, 了解 HPV16 多

态性将为明确宫颈癌的发生和运用免疫学策略预防 HPV16 相关疾病提供新的思路。为了解温州地区宫颈癌患者 HPV16 L1 基因结构特点和变异规律, 我们从宫颈癌组织 DNA 中扩增 L1 基因片段, 并进行克隆和测序分析, 为疫苗研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 标本 11 份宫颈癌组织标本来源于温州医学院附属第二医院妇产科就诊的患者, 均经临床和病理诊断确诊为宫颈癌。每份标本均无菌切取病变组织 (约 2 cm × 2 cm), -80 °C 保存备用。

收稿日期: 2008-10-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30671882); 温州市科技局科研基金资助项目 (Y20060081)。

作者简介: 陈俊 (1977-), 男, 浙江温州人, 助教。

通讯作者: 张丽芳, 教授, Email: zlf@wzmc.net。

1.2 主要试剂 PCR 试剂、λ DNA/Hind III DNA marker 购于上海晶美生物工程有限公司, 动物组织 DNA 提取浓缩试剂盒购于大连 TaKaRa 公司, PCR 清洁试剂盒购于杭州维特洁生化技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标本 DNA 的提取及 PCR 引物的设计: 按试剂盒说明书操作提取宫颈癌组织标本 DNA。以 GENE BANK 中报道的 HPV16 (收录号为 NC 001526) L1 基因序列为标准序列, 共设计 4 条引物 (见表 1), 分别用于 PCR 扩增 L1 完整开放读码框和基因序列测定。由北京三博生物技术有限公司合成。

表 1 HPV6b 和 11 型 L1 基因 PCR 所用特异性引物及测序引物

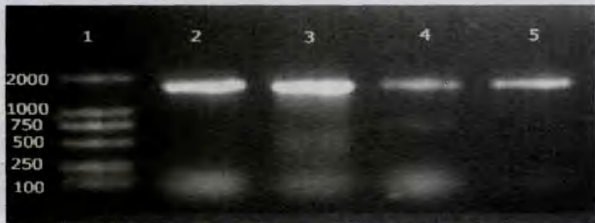
引物号	扩增 HPV 型别	序列	用途
P1	HPV16 型	5'-CCTTTAGTATCAGGTCCTG-3'	PCR 扩增, 测序
P2	HPV16 型	5'-CCTGACCCCAATAAGTTTGG-3'	PCR 扩增, 测序
P3	HPV16 型	5'-GGACTTTACTACATTACAGGC-3'	测序
P4	HPV16 型	5'-AAGCACAACAAGCACATAC-3'	测序

1.3.2 HPV L1 基因扩增及型别鉴定: 以标本 DNA 为模板, 用 HPV16 型特异性引物行 PCR 扩增。扩增参数为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.3 HPV L1 基因序列测定及蛋白特性分析: PCR 产物经 PCR 清洁试剂盒纯化, 由杭州华大基因研究中心用特异性引物进行 L1 基因全长序列测定。与 GENE BANK 中的 HPV16 序列 (NC 001526) 进行比较, 用 Vector NTI 8.0 和 DNASTar 软件对测序结果进行序列分析。

2 结果

2.1 HPV16 型特异性引物 PCR 扩增检测结果 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示, 可见一约 1 600 bp 的扩增条带。11 份标本中 HPV16 L1 型 DNA 阳性率为 54.5% (6/11)。



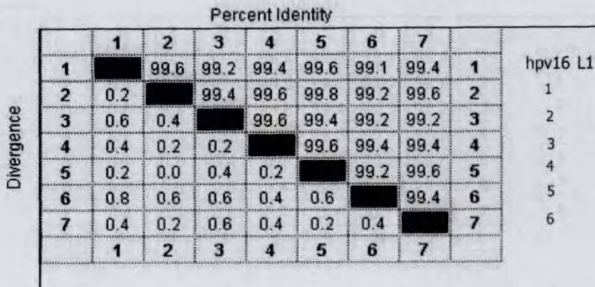
1. DNA 分子标准物; 2~5 部分标本中 HPV16 L1 基因 PCR 产物
图 1 PCR 扩增宫颈癌组织中 HPV16 L1 基因

2.2 HPV16 L1 基因全长序列测定及同源性分析

组织标本中分离的 6 株 HPV16 L1 核苷酸序列经测序后, 用 DNASTar 进行同源性分析 (见图 2), 显示其与标准株有 99.1%~99.8% 的同源性。用 Vector NTI 8.0 软件分析基因多态性 (见表 2), HPV16 型 L1 基因分别形成 8 种突变模式, HPV16 型 L1 基因第 5786 (1/6)、5957 (2/6)、6343 (1/6)、6432 (6/6)、7061 (5/6) 和 7115 (1/6) 位发生点突变。在第 6432 位发生的突变, 是突变的主流型。此外, 在第 6901 与 6903 之间, 所有标本的 L1 序列中均插入了 ATC3 个核苷酸, 而标准株 (NC 001526) 中第 6954 至 6956 之间的 3 个核苷酸 GAT, 在所有标本的 L1 中缺失。

表 2 宫颈癌组织 HPV16 L1 基因多态性分析

核苷酸位点	标准株	测序标本						突变频率 (%)
		1	2	3	4	5	6	
5786	T	-	-	-	C	-	-	1/6 (16.7)
5957	A	-	-	-	-	C	C	2/6 (33.3)
6343	A	-	C	-	-	-	-	1/6 (16.7)
6432	A	G	G	G	G	G	G	6/6 (100)
6902-6904	---	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	6/6 (100)
6954-6956	GAT	---	---	---	---	---	---	6/6 (100)
7061	G	-	A	A	A	A	A	5/6 (83.3)
7115	A	-	C	-	-	-	-	1/6 (16.7)



1~6: 6 份 HPV16 L1 PCR 产物测序标本
图 2 HPV 临床分离 L1 基因序列的同源性列表

2.3 HPV16 L1 蛋白氨基酸一级结构分析 与标准氨基酸序列比较, 用 DNASTar 软件进行 L1 蛋白氨基酸变异分析。结果显示, 各标本分别存在 1~3 处点突变现象, 其中所有的标本 L1 基因在第 6432 处碱基均发生突变, 其编码的氨基酸由 T→A, 称为地方株, 其余为同义突变。此外所有组织标本的 L1 在第 6901 与 6903 之间, 因为插入了 CAT 3 个核苷酸而出现丝氨酸 (S), 标准株 (NC 001526) L1 第 6954 至 6956 之间的 GAT 编码天门冬氨酸 (D), 在组织标本的 L1 中缺失。

2.4 地方株 HPV16 L1 蛋白亲水性、表面可及性和抗原性分析 用 DNASTar 软件对地方株 HPV16

L1 蛋白进行分析, 并与标准株比对进行分析。地方株 L1 蛋白在亲水性上无任何改变, 氨基酸序列

第 295~300 肽段抗原性减弱, 第 470~475 肽段抗原性和表面可及性均减弱 (见图 3)。

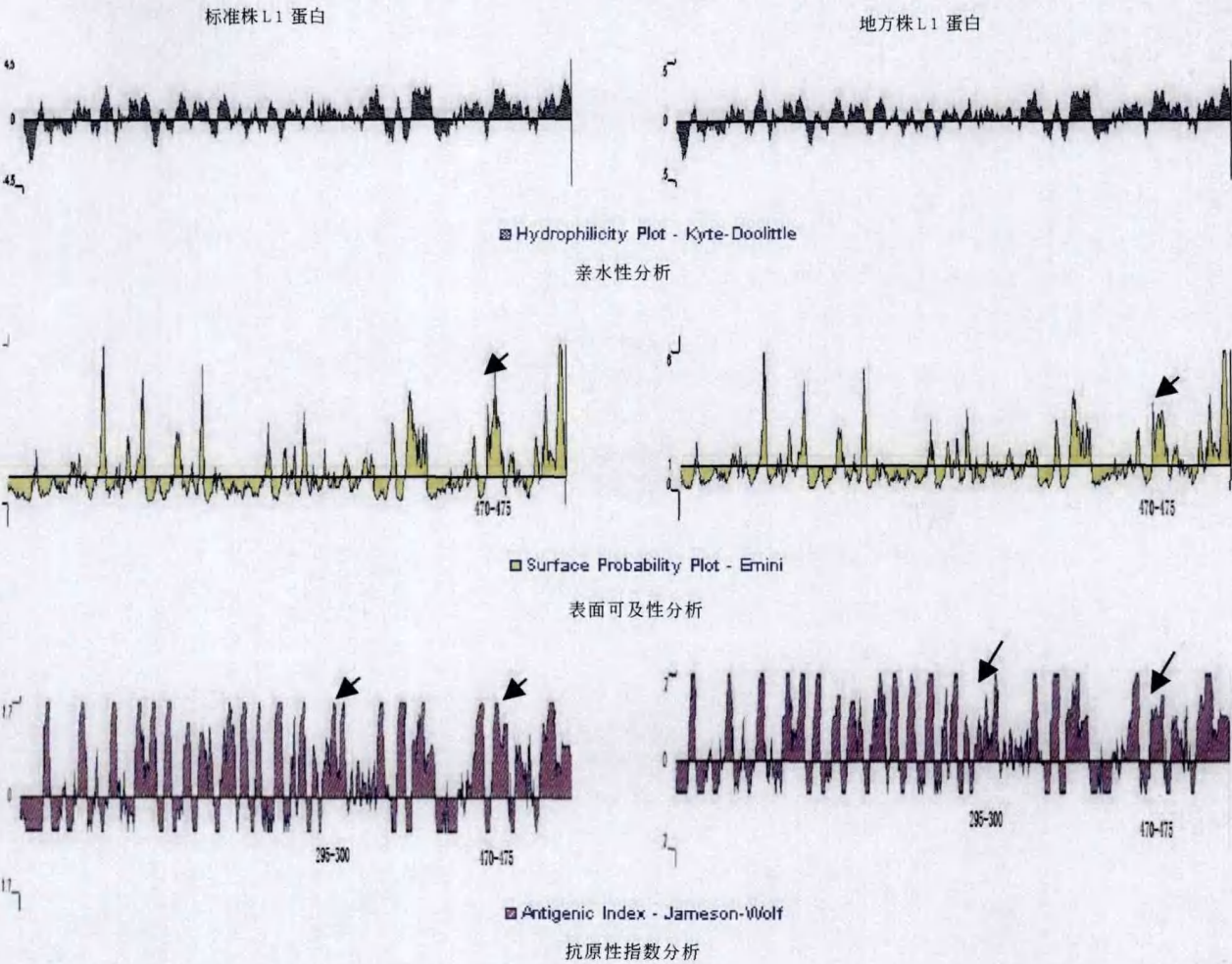


图 3 HPV16 标准株与突变 L1 蛋白亲水性、表面可及性和抗原性指数分析

3 讨论

L1 基因是乳头瘤病毒晚期结构蛋白基因, 在杆状病毒-昆虫细胞表达系统中自发组装形成病毒样颗粒 (VLPs), 其折叠形成的结构与天然病毒颗粒结构相同, 具有较强的抗原性和免疫原性, 可刺激机体 B 细胞产生中和抗体, 从而阻断病毒感染, 因而 L1 蛋白是防治 HPV 感染基因工程疫苗研究的重要靶抗原。

研究证实, 不同地域间 HPV L1 基因存在变异现象^[3], Ortiz 等人报道了西班牙宫颈癌组织 HPV16 L1 基因存在 8 处变异, 其中只在 6695 因为核苷酸的突变导致氨基酸由 T→P, 其余均为同义变异^[4]。Pande 等^[5]人发现了印度北部地区宫颈癌组织 HPV16 L1 基因存在多处变异, 其中有 4 处新变异, 其中

第 6906 和第 6924 处因核苷酸变异使得氨基酸分别从 S→P 以及 G→P。国内研究发现扬州地区宫颈癌组织检测的 HPV16 L1 基因存在 7 处变异, 与德国标准株比较在 6903 与 6905 间, 地方株插入了 CAT 3 个核苷酸 (丝氨酸, S), 而在 6954 至 6956 间缺失了 GAT (天门冬氨酸, D)^[6]; 与本文研究结果相一致。新疆地区宫颈癌患者以 HPV16 感染为主 (占 84.21%), 其 L1 基因序列存在 6 种突变, 在 6901 与 6903 间也插入了 CAT (S), 6949~6951 处缺失了 GAT (D)^[7]; 北京地区的鲍温氏病组织分离的 HPV16, 同样在其 L1 碱基序列中, 第 6901~6903 处插入一个 CAT, 而在 6949~6951 处缺失了 GAT^[8]。

(下转第 545 页)

本实验从细菌中克隆的脂肪酶基因经过BLAST比对后无完全相同基因型,极可能是该微生物在高油脂环境的压力下,其脂肪酶基因发生突变导致其脂肪酶活力的提高,以便于更好利用这一营养物质而能生存下来。后续的研究中我们将进一步在原核表达系统中验证所分离的脂肪酶基因具有高活力,从而获得具有较高热稳定性及其活力的脂肪酶用作各种产品的添加剂及其催化剂。

参考文献:

- [1] 汪小锋,闫云君. 固态发酵生产微生物脂肪酶[J]. 中国生物工程杂志. 2009, 29(1): 105-110.
- [2] 肖春玲. 微生物脂肪酶的研究与应用[J]. 微生物学杂志. 1997, 17(4): 56-59.
- [3] 谈重芳,王雁萍,陈林海. 等. 微生物脂肪酶在工业中的应用及研究进展[J]. 食品工业. 2006, 07(27): 193-195.
- [4] 王海燕,李富伟,高秀华. 脂肪酶的研究进展及其在饲料中的应用[J]. 饲料工业. 2008, 8(6): 14-17.
- [5] 王小芬,张艳红,王俊华. 等. 微生物脂肪酶的研究进展[J]. 科技导报. 2006, 2(24): 10-12.
- [6] 闫云君,舒正玉,杨江科. 等. 细菌脂肪酶的结构和功能研究进展[J]. 食品与生物技术学报. 2006, 4(25): 122-126.
- [7] Kim EY, Oh KH, Lee MH, et al. Novel cold-adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal for a new family of bacterial lipases[J]. Appl Environ Microbiol. 2009, 75(1): 257-260.
- [8] Mosbah H, Sayari A, Mejdoub H, et al. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase[J]. Biochim Biophys Acta. 2005, 1723(1-3): 282-291.
- [9] 董明奇,史岩,姜春雷. 等. 脂肪酶菌株的筛选及酶学特性研究[J]. 四川大学学报. 2008, 45(4): 985-990.
- [10] 夏涵,府伟灵,陈鸣. 等. 快速提取细菌DNA方法的研究[J]. 现代预防医学. 2005, 32(5): 571-573.
- [11] 奥期伯 FM, 金斯顿 RE, 塞德曼 JG. 等. 马学军, 舒越龙, 译. 4版. 北京: 科学出版社. 2005: 13-24.
- [12] 杨啸林, 张正国. 蛋白质分析中生物信息学的应用[J]. 医学研究通讯. 2002, 31(9): 26-29.

(本文编辑: 毛文明)

(上接第540页)

为了解温州地区 HPV16 L1 的基本情况, 我们设计了跨越 HPV16 L1 全长基因的一对特异引物, 从宫颈癌组织中提取的 DNA 中克隆出 HPV16 L1 基因, 经过序列测定, 与网上公布的标准株 (NC 001526) 进行比对, 发现温州地方株 L1 基因序列变异存在 8 处, 其中 3 处由于核苷酸的改变, 其编码氨基酸也发生相应变化, 另 5 处核苷酸的改变多位于密码子第 3 位, 且为同义突变, 故未影响氨基酸的改变。

结果提示温州地方株 HPV16 L1 基因与标准株之间的差异, 特别是氨基酸的改变, 可能会造成 HPV16 L1 蛋白免疫原性的差异。实验结果为研制适应本地区的基于 HPV16 L1 的基因工程疫苗提供理论依据。

参考文献:

- [1] Das BC, Sharma JK, Gopalakrishna V, et al. A Frequency of human papillomavirus DNA sequences in cervical carcinomas of Indian women as revealed by southern blot hybridization and polymerase chain reaction[J]. Med Virol. 1992, 36(4): 239-245.
- [2] Bosch FX, Manos MM, Munoz N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide prospective[J]. Natl Cancer Inst. 1995, 87(1): 796-802.
- [3] Icenogle JP, Sathya P, Miller DL, 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] Ortiz M, Torres M, Munoz L, et al. Oncogenic Human Papillomavirus (HPV) Type Distribution and HPV Type 16 E6 Variants in Two Spanish Population Groups with Different Levels of HPV Infection Risk [J]. J Clin Microbiol. 2006, 44(4): 1428-1434.
- [5] Pande S, Jain N, Prusty BK, et al. Human Papillomavirus Type 16 Variant Analysis of E6, E7, and L1 Genes and Long Control Region in Biopsy Samples from Cervical Cancer Patients in North India[J]. J Clin Microbiol. 2008, 46(3): 1060-1066.
- [6] 高慧, 黄正芳, 徐向明. 等. 扬州地方株 HPV16 L1 基因的克隆及序列分析[J]. 东南大学学报: 医学版. 2005, 24(1): 17-20.
- [7] 马正海, 张富春, 梅新娣. 等. 新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中人乳头状瘤病毒 16 型 L1 基因突变谱分析[J]. 中华医学杂志. 2004, 84(12): 987-991.
- [8] 王立良, 宋国兴, 陈莲凤. 等. 鲍温氏病组织人乳头瘤病毒 16 型结构基因 L1 的克隆及其序列分析[J]. 基础医学与临床. 2000, 20(2): 17-21.

(本文编辑: 毛文明)