

暨南大学硕士学位论文

题名（中英对照）：

复发性尖锐湿疣HPV6 L1基因原核表达质粒构建及序列分析*

Constructing Prokaryotic Expression Plasmid and Sequence

Analysis of L1 Major Capsid Protein Gene of Human

Papillomavirus in Relapse Condyloma Acuminata Patients

作者姓名：**胡云峰**

指导教师姓名**邓列华**

及学位、职称**硕士、硕士生导师、教授**

学科、专业名称：**皮肤病与性病学**

论文提交日期：**2005 年 4 月 28 日**

论文答辩日期：**2005 年 6 月**

答辩委员会主席：

论文评阅人：

学位授予单位和日期：**暨南大学、2005 年 7 月**

* 广东省自然科学基金资助项目（编号：04021019）及暨南大学
自然科学基金资助项目（编号：620026）子课题

目

录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
前言.....	4
一 HPV 分子生物学特性	5
二 HPV 疫苗研究	7
三 研究目的和方法.....	12
实验材料和方法.....	13
第一部分 实验材料.....	13
第二部分 实验方法.....	18
实验结果.....	28
讨论.....	36
结论.....	42
参考文献.....	43
附录.....	50
致谢.....	56

摘要

目的 构建广州地区尖锐湿疣复发患者病变组织分离的乳头瘤病毒晚期基因—L1原核表达质粒，为后续L1蛋白表达及研究复发患者感染乳头瘤病毒L1蛋白生物学特性提供依据；复发患者感染乳头瘤病毒晚期基因测序，与原始序列比对，分析其序列变异情况。

方法 扩增复发尖锐湿疣患者病变组织中乳头瘤病毒早期基因E6、E7之间一段保守序列，经Rsa I 内切酶酶切分型鉴定，选取一例感染HPV6型患者皮损，采用PCR技术扩增乳头瘤病毒晚期基因—L1，经酶切、纯化后与经过相同酶切的原核表达载体pQE40质粒连接，热冲击入感受态大肠杆菌DH5 α ，经扩增后酶切鉴定，阳性克隆进行测序，获得基因组晚期区L1序列。

结果 四例复发患者感染 HPV 酶切分型结果显示，有三例临床标本感染 HPV6 型，一例感染 HPV11 型。这提示复发患者仍然以 6/11 感染为主。选取的 HPV6 型 L1 基因测序，发现其组织来源与 HPV6b 型更相近。与 GenBank 收录的原型相比，L1 基因有 7 处碱基发生突变，推导其编码的氨基酸序列有 3 处发生变化。原始序列 6062 处的 A 突变为 G，其编码的氨基酸由苏氨酸变为丙氨酸；6681 处的核苷酸 A 突变为 T，其编码的氨基酸由谷氨酸变为缬氨酸；6945 处的核苷酸 T 突变为 C，其编码的氨基酸由异亮氨酸变为苏氨酸；其余四处为：6598 处的 A→T，7081 处的 A→G，7099 处的 G→A，7243 处的 C→A，均为同义突变。

结论 成功构建了 pQE40 HPV6b L1 重组质粒；复发尖锐湿疣患者病变处 HPV6 L1 基因结构有一定变异，下游序列变异程度更大。序列变异主要集中和接近在 Wanderly 的 R3 和林少洪的 SR4 区间即：6945 位点、7081 位点、7099 位点和 7243 位点。这提示上述区间可能是更易发生突变的区域，这些改变与病毒致病性可能存在一定关系。R1 和 R2 易突变区间虽然较短，仅 100bp 左右，但本研究发现集中在此区间的突变都出现了编码氨基酸的改变，其可能存在更加重要的生物学意义。

关键词 尖锐湿疣； 复发； 人乳头瘤病毒； L1 基因； 重组质粒； 序列分析

Abstract

Objectives To construct prokaryotic expression plasmid of late gene L1 in relapse condyloma acuminata patients and establish the foundation for gene expression of L1 by providing useful dates in studying the biology characteristic of HPV L1 protein . In addition, we want to analyze the structural specificity of L1 major capsid protein gene of human papillomavirus in relapse condyloma acuminata patients by sequence analysis and comparing with the original sequence.

Methods DNA templates were purified from genital warts lesions of four patients. A conservative 233bp long sequence between E6 and E7 was amplified by PCR and digested by restriction enzymes Rsa I in order to typing . Then we picked DNA sample from the patient infected with HPV6 as templates to amplify full coding L1 sequences by PCR. Having been digested by restriction enzymes Bam H I and Hand III, HPV6 fragment and linearized expression vector pQE40 were ligated to construct recombinant prokaryotic expression vector which it were transformed into coli DH α . then. The recombinant vector was identified by Bam H I and Hand III digestion. The positive vector was sequenced to get late gene L1 sequence.

Results There were three cases infected with HPV 6 and one case infected with HPV11. It showed that HPV 6/11 are the main causes of genital warts. HPV L1 gene was successfully cloned. Compared with the prototype accepted by GenBank, mutations were found in 7 bases of L1 gene which resulted in 3 changes of corresponding coding amino acids. The 6062 base of L1 gene changed from A to G which leading to the change from Threonine to Alanine. The 6684 base of L1 gene changed from A to T which leading to the change from Glutamic acid to Valine. The 6945 base of L1 gene changed from T to C which leading to the change from Isoleucine to Threonine. The rest four were all same-sense mutations: A $\rightarrow$ T at nt 6598, A $\rightarrow$ G at nt 7081, G $\rightarrow$ A at nt 7099 and G $\rightarrow$ A at nt 7243.

Conclusions The construction of prokaryotic expression plasmid of HPV6b L1 was achieved. Variations take place in the nucleotide sequence of HPV6 L1 gene from the relapse condyloma acuminate patients especially the lower sequence. The most

frequent substitutions from HPV6b L1 ORF sequence of relapse condyloma acuminata appeared to accumulate within one discrete region: R3 (nt 7070–7230) and SR4, which reported by Wanderly and Lin Shaohong respectively. It suggested that this region is easy to appear substitutions in spite of the region of R1 and R2 is just as long as 100bp.

Key words condyloma acuminata; relapse; Human papillomaviruse (HPV);
L1 gene; recombine plasmid; sequence analysis

前 言

尖锐湿疣(condyloma acuminatum, CA) 又称生殖器疣(anogenital wart), 是因感染人类乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV) 而引起, 为临床最常见的性传播疾病(sexually transmitted disease, STD)^[1, 2]。2003年调查发现全球女性HPV感染率是2%~44%^[3]。在美国CA是最流行的一类性传播疾病, 统计显示每年约550万新发的HPV感染者^[4]。其中育龄期人群中调查发现高危型HPV感染率为27.4%^[5]。英国一份最新的调查显示, 在应用PCR检测技术进行妇女宫颈癌普查时发现约有20.5%的受检人群感染HPV, 有15.7%的受检人群携带有HPV病毒, 在就诊的STD患者中, 每四个人就有一个是尖锐湿疣患者, 其中20~24岁年龄组发病率最高, 男女性别比为1;1.3, 但女性实际的发病率可能比男性更高^[6]。其实这仅仅是冰山的一角, 人群中无症状HPV感染的检出率更高, 有资料显示女性人群的亚临床感染率达7%, 这部分人则是主要的传染源^[7]。在我国解放初期尖锐湿疣非常少见, 20世纪80年代后期随着梅毒、淋病的再度流行而开始增多, 并以较快的速度上升。据统计, 1998年的病例数为141510例, 报告发病率是11.34/10万, 占全年新发STD的22.4%, 是发病率列第二位的STD。1996年~2000年广东地区调查资料显示尖锐湿疣在性病中的构成比逐年升高, 到2000年为止已经跃居第二位^[8]。这引起了有关部门及各级政府的高度重视。

目前CA有效的治疗方法主要分为四大类^[9]: 1. 药物治疗: 应用抗病毒药物、免疫调节剂、抗癌药物及中药来清除病毒, 以达到治疗目的; 2. 物理疗法: 应用激光照射、液氮冷冻、高频电刀、微波B-射线清除疣体; 3. 手术治疗: 切除法、刮除法、结扎法清除疣体; 4. 联合治疗: CO₂激光加化学药物治疗、中西药结合治疗、电灼联合化学药物治疗。具体选择哪种治疗方法要考虑患者意愿、费用、疗效、方便性和副作用等多种因素。有很多因素(如病变部位和程度、性别、治疗方案、护理情况、个体差异等)会影响CA的实际治疗效果, 并且疗效评估与跟踪检查时间有关。各方法中提及的有关清除率、复发率等数据是根据已有报道总结出, 存在较大差异。但总体来讲高复发率还是目前治疗的难点之一。

近年来随着医学分子病理学、医学分子生物学及医学病毒学等各学科的发展和相应实验技术的完善, 人们对HPV病毒的认识从病毒生物学特性、致病机理及

免疫学机制方面都有了深入的了解。这为更有效、更特异的预防和治疗HPV感染及相关疾病提供了依据。

一、 HPV分子生物学特性

HPV 是乳多空病毒科多瘤病毒亚科的一个双链环状DNA 病毒,其感染靶组织主要为上皮组织,显示高度的宿主特异性,对人体特异部位的上皮细胞具亲和力^[10-12]。目前已鉴定出120 余种基因型,至少有85 种基因序列已完全测序^[13]。根据与宫颈癌的关系可分为高危型、中间型和低危型,高危型包括HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73和82型,中间型包括HPV26、53和66型,低危型包括HPV6、11、40、42、43、44、54、61、72和81型。HPV 34、57和83尚未确定其危险度^[14]。

HPV 病毒体为直径约50~60nm的球形颗粒,核壳是由72 个壳粒构成的20 面体立体对称结构,完整病毒颗粒的密度约为1.34g/cm³,不含核酸的病毒衣壳密度约为1.29g/cm³。壳内包裹长度约为7.5kb~8.0kb双股环状DNA。遗传信息携带于其中的一条DNA链上。基因组含有8个开放读码框架(open reading frames, ORFs),基因组分三个功能区:①早期区(E),约4.5kb,含E1、E2、E4~E7 六个亚区,占基因总长度的50%。E1 编码蛋白具ATP 依赖性解旋酶性,在病毒复制起始过程起关键作用;E2是一种反式激活蛋白,涉及病毒DNA 转录的反式激活^[15,16]; E4 编码晚期胞质蛋白,与病毒成熟有关^[17,18];E5 基因正好位于E2 的下游,编码一种小蛋白,如HPV-16 的E5 为84 氨基酸(aa)长,而BPV-1 只有44aa。E5 蛋白的主要生物学功能是通过细胞生长因子受体激活上向调控。来自人和动物的E5 蛋白均可不同程度地转化哺乳类细胞^[19,20];E6、E7 主要与细胞转化及致瘤性有关。E6 称多功能蛋白,至少能与两种细胞蛋白(即E6 相关蛋白—E6AP 和E6 结合蛋白—E6BP)结合。高危病毒的E6 蛋白可持久存在于人类乳房原始细胞中,与E7 作用可持久存在于人类原始角质细胞中。HPV-16 的E6 为151aa 长,在体外结合Zn²⁺,含2 个Zn 指(Zn fingers)。E6BP 尚有Ca²⁺ 结合蛋白潜能^[21,22]。体内细胞中E6 蛋白产量极少,因检出困难而难以研究。HPV 持久存在于人类原始包皮角质细胞并发挥致癌潜能,与E7 基因关系甚为密切。HPV-16 的E7 由98aa 组成,其标志分子大小为11kda。HPV-6 和 11 的E7 分子量分别为14kda 和17kda。HPV-16 与HPV-6 相比,其N 末端10aa 中有一定数量的

变异。致癌性HPV-16、18和31可持久存在于角质细胞中,而低危型病毒HPV-6和11则否。HPV-16全长基因组持久存在于角质细胞中时,E7和E6基因一起可呈低水平持续存在。在原位癌中病毒转录常限于E6和E7基因,造成其整合入宿主染色体。HPV E6能结合p53,而E7能与成视网膜细胞瘤抑制蛋白结合^[23]。②晚期区(L)约2.5kb,含L1、L2两个亚区:编码病毒主要衣壳蛋白(L1)和次要衣壳蛋白(L2)。L1相对分子量(M_r)约为 55×10^3 ,是主要的种特异性抗原,L2 M_r 约为 75×10^3 ,是型特异性抗原^[21, 25]。长调控区(LCR),位于L区末端,占基因总长度的7%~11%,不编码任何ORFs,内含复制起始点、启动子、增强子、沉默子等基因转录复制所需的调控元件^[13, 26]。病毒侵入上皮后,DNA在基底层细胞中复制,随着基底细胞的分化成熟向表层移动,细胞内病毒衣壳蛋白表达并包装病毒DNA形成完整的病毒颗粒,修饰后可释放到上皮表面,经密切接触可传与他人或从角化层表面脱落播散到周围环境中。病毒感染和持续时间与HPV类型及机体因素有关^[27-29]。HPV如何进入上皮细胞尚无定论,最近有人提出基底细胞 $\alpha 6 \beta 4$ 整合素是HPV候选的受体分子,该受体可与不同的HPV作用而不呈现种属特异性^[10]。Roberts等^[31]发现HPV16E1/E4可破坏培养细胞中的角质蛋白网络,认为它可能参与病毒感染的扩散。

HPV复制过程大致分三期:建立期:单个或少量病毒颗粒进入细胞,其基因组很快复制50~100拷贝/细胞;持续期:病毒的游离基因随分化基底细胞染色体同步复制,其复制拷贝数仍恒定在50~100拷贝/细胞水平上;第三期:感染细胞离开基底并分化,上皮细胞的最上层生产性复制病毒或扩增,造成每个细胞合成数千个病毒拷贝。

近些年来对HPV基因表达及生活周期调控机制的研究为抗HPV药物开发提供了特异的潜在作用靶点。例如E1蛋白具有腺苷三磷酸酶、鸟苷三磷酸酶活性和解旋酶活性。E1蛋白与其它病毒的或细胞的腺苷三磷酸酶在序列上有很大差别,可以用于干扰HPV复制的药物筛选。E2蛋白在HPV生活周期中具有枢纽作用,协调RNA转录和DNA复制。寻找E2蛋白抑制剂可望抑制早期基因转录和DNA复制。以HPV转化蛋白E5、E6、E7为药靶筛选,被认为是获得抑制HPV引起的良性或恶性增生药物的有效途径。LCR虽然不编码任何蛋白,但含有很多调控转录、复制的元件,以LCR为靶点的反义核酸药物可能用于抑制HPV^[32-34]。

二、 HPV疫苗研究

早在1925年, Bibersteir 就提出用免疫学方法治疗生殖道疣的设想。但当时所采用的自体疫苗与安慰剂组并无明显差别。随着分子生物学技术的进展, 利用疫苗治疗HPV 相关疾病已成为一个极有前景的领域。从设计目的上讲, HPV 疫苗可以概括为以下三类: 预防性疫苗; 治疗性疫苗; 兼具预防及治疗功效的双重疫苗。

(一) 预防性疫苗:

预防性疫苗的主要原则是要先于病毒感染就可以激活机体免疫系统产生足量的中和抗体, 对于HPV预防性疫苗应该具备以下特性: (1) 产生针对HPV抗原表位的中和性抗体; (2) 诱导机体产生足量的抗体, 而且能持续较长的时间; (3) 疫苗能诱导机体局部产生足量的防御性抗体; (4) 疫苗必须有交叉反应, 能抵御所有或绝大部分HPV感染。

中和抗体必须结合病毒的抗原表位, 以此阻止病毒入侵宿主细胞。HPV衣壳蛋白是此类抗体的理想靶位。早期试用L1蛋白片断、变性的L1蛋白及L1多肽均未获得成功, 进一步研究发现L1蛋白必须形成完整的空间结构才能诱导机体产生保护性抗体^[35]。1991年zhou等人^[41]首次发现在哺乳动物细胞中表达L1蛋白能自行装配成形态与野生型病毒颗粒极为相似的病毒样颗粒(virus like particles, VLPs), 其含特异性构象依赖性抗原表位, 并可诱发高滴度抗体产生。HPV保护性疫苗出现了划时代的局面。以后陆续有研究者在昆虫细胞、酵母、和大肠杆菌表达体系中实现了VLPs的表达^[37-40]。VLPs 在形态上与真正的病毒颗粒没有差别, 并且与HPV 病毒颗粒的构象相似, 因此在预防性疫苗中VLPs 成为具有吸引力的候选者。它具有作为预防性疫苗应该具备的几个条件: 没有病毒DNA 的存在, 故不能在体内引发感染及引起其他危险, 如致癌等; 有天然的构象依赖性抗原表位存在; 热稳定性好, 不易失活; 可在生殖道诱发有意义的、一定浓度的中和抗体^[41]。

HPV 目前尚无动物模型, 这给VLPs预防性疫苗的疗效评价带来一定困难, 目前多用动物的乳头瘤病毒及其相应的VLPs免疫原评估乳头瘤病毒VLPs 疫苗的预防效果。在对鼠、猴动物实验中显示, 经肠道外免疫VLPs 后, 产生的抗体能较好的保护机体抵抗相应高剂量病毒的实验性攻击^[42-45]。令人满意的动物实验结果

推动了HPV16L1VLPs经肠道外免疫的早期临床实验。I期疫苗试验已经取得了较好的结果。Harro等人^[16]用杆状病毒系统产生HPV16L1VLPs疫苗进行了随机双盲对照实验,以评价该疫苗的安全性和免疫原性。研究表明单用VLPs或VLPs+MF59产生抗体的滴度是VLPs剂量依赖性,而VLPs+铝剂免疫后,产生抗体的滴度与VLPs剂量无关,所有VLPs免疫的个体无论有无佐剂,抗体平均滴度比天然感染获得的滴度高40倍。主要产生的是IgG1类抗体,且可中和HPV16型假性病毒颗粒。HPV11VLPs(酵母细胞产生)疫苗的免疫原性检测也是通过随机双盲对照试验进行的(剂量为10、20、50或100 μ gVLPs)。受试者为PCR检测HPV6/11阴性的女大学生。所有疫苗受试者均表现为血清IgG类中和性抗体滴度的增高,给予安慰剂的个体血清抗体均无变化^[17]。2002年一项双盲、对照试验证实注射HPV16-VLPs疫苗能有效的减少HPV16乳头瘤病毒感染^[18]。这些试验都证实了HPV-VLPs疫苗在预防病毒感染过程中的巨大潜力。

尽管VLPs是预防性疫苗的良好代表,但仍有几点需要探讨:(1)仍不清楚HPV的传播是由游离的还是封闭在脱落的鳞状上皮细胞内的病毒引起的,而且性接触本身就可以接种大量的病毒,提示暴发感染能逃逸抗体介导的中和反应。因此如何使中和性抗体在粘膜层达到有效的滴度并维持较长的时间是一个棘手的问题;(2)HPV VLPs疫苗具有型特异性,除了高度同源的型别有部分交叉反应外,其它型别的VLPs血清学实验均无交叉反应;(3)基于已有的研究发现,似乎HPV特异性抗体不足以清除已有的HPV感染^[19];(4)HPV的感染在人群中十分普遍,这也是发病率高的原因,因此必须重视治疗措施。

(二) 治疗性疫苗

治疗性疫苗应引起特异性的细胞免疫,藉此阻止损害的发展,清除病灶甚至恶性肿瘤。从理论上讲,特异性细胞免疫的靶抗原应是HPV产物、HPV感染的细胞产物或是二者的联合。然而因目前仍不清楚哪种细胞产物可作为特异性细胞免疫的靶抗原,因此大多数实验性疫苗体系主要以HPV的癌蛋白为靶抗原。由于高危型HPV E6、E7蛋白是公认的转化蛋白及肿瘤排斥抗原,在高危型CIN及宫颈癌组织中有较高的表达,故成为研究最多的靶抗原^[50]。由于在感染早期病毒存在于基底层细胞中,复制需要表达E1、E2蛋白,因此也有人设想用E1、E2来设计治疗性疫苗。但研究者更注重E7,因为它表达量更多且具有更好的免疫学特征,

而且E7序列比E6基因更保守^[51]。治疗性疫苗因为其在防治宫颈癌方面,存在巨大的应用前景,因此各国研究者投入大量的精力。其研究也突飞猛进。根据疫苗制备工艺,可分为以下类型:

1. 病毒载体疫苗

痘病毒(Vv)的特点是感染的高效性和重组基因高水平表达,能插入较大基因。多项研究表明E6和/或E7重组痘苗接种,能产生很强的抗原特异性细胞毒T淋巴细胞(CTL)反应和抗肿瘤效应^[52-57]。有临床试验证实在高分化宫颈癌、CIN3期及早期浸润癌患者应用编码HPV16和18E6/E7痘病毒疫苗可以引起机体的T细胞免疫反应^[58, 59]。

腺病毒(AdV)宿主范围广,能插入较大的基因,获得高产量融合蛋白,病毒基因不整合到宿主基因组的优点。多项研究表明,表达肿瘤特异性抗原如P815A或 β -gal或gp100的重组AdV载体,诱导出了CTL反应和抗肿瘤效应^[60-62]。一项在鼠科动物进行的实验显示,改良的HPV腺病毒疫苗(E1基因被删除)可以诱导机体CD8⁺/CD4⁺T细胞免疫反应和抗肿瘤反应^[61]。

2. 细菌载体疫苗

单核细胞增生李斯特氏菌是一种G⁺细胞内菌,常感染巨噬细胞,它能分泌一种李斯特溶素,破坏吞噬体膜,进入巨噬细胞胞质,由于它能同时在溶酶体和内体出现,就可将它的抗原或所携带的异体蛋白质同时传递给MHC-I和MHC-II两条途径,从而诱导出很强烈的CD8⁺和CD4⁺细胞免疫反应,且能表达肿瘤模拟抗原,诱导肿瘤消退,近年来成为很有希望治疗人类肿瘤的重组疫苗。重组分泌HPV-16E7的李斯特菌,可使表达该抗原的小鼠肿瘤消退^[61]。减毒的沙门氏菌突变株也可作为细菌载体。它能将质粒编码的目标基因传递给抗原呈递细胞(APCs)。最后导致抗原表达和激发免疫反应。另外还有志贺菌属、卡介苗菌均可以作为细菌载体。

3. 多肽和蛋白疫苗

多肽疫苗 HPV T细胞表位的研究促进了多肽疫苗的发展,其包括天然多肽和合成多肽。含肿瘤特异性抗原肽的疫苗,其T细胞表位可激活抗原特异的杀伤性淋巴细胞,其中和表位可刺激机体产生保护性抗体。随着HPV 16抗原表位结

构研究的深入, HPV 高危型E6、E7 来源的多肽疫苗已成为治疗性疫苗的研究热点, 并取得了一些可喜的成绩。用小鼠进行的研究表明, HPV 16E7 衍生的多肽与MHC 分子有高度亲和性, 可以保护小鼠抵抗HPV 16 转化的同系肿瘤细胞的致死性攻击^[65]。临床试验发现应用HPV16-E7和HPV18-E6多肽疫苗可以观察到HPV相关癌症患者T细胞免疫反应^[66, 67]。但多肽疫苗受 MHC 的限制, 并需确定 CTL 特殊表位。这极大的限制了多肽疫苗的应用。

蛋白疫苗 具有某种蛋白质的所有免疫表位可越过 MHC 的限制。不必担心像应用重组病毒和 DNA 疫苗时发生插入基因的活化和转化。目前治疗性抗原主要是外源性蛋白, 包括 HPV 的 E7 蛋白, 能产生MHC I 类分子限制性 CTL 反应。HPV E7可以与免疫佐剂共用, 以提高 E7 特异性 CTL 活性。研究表明, 可通过注射热聚合的 HPV16 E7抗原激活 CTL^[68]。而且HPV 6 L2 与 E7 的融合性蛋白, 作为生殖器疣治疗性抗原, 已在临床上试用^[69]。

4. DNA 疫苗

将编码抗原性蛋白的DNA 直接注入动物体内, 可表达目的蛋白, 与自然感染途径表达的蛋白一样加工处理, 由MHC I 及MHC II 分子呈递, 启动针对该抗原的体液及细胞免疫, 并可维持相当时间。这种方法无须用多肽、自我复制的载体、减毒的病原体或任何佐剂, 制备简单、迅速、成本低、易储存、相对安全, 因此具有独到的优越性。疫苗效果仅仅与DNA 本身和导入途径有关^[70]。因此人们对 HPV DNA疫苗寄予厚望。在棉尾兔乳头瘤病毒(CRPV) 感染模型中, 注入含CRPVL 1 的裸DNA 疫苗可产生针对L 1的抗体。用基因枪将CRPV E6 的DNA 疫苗皮下接种小鼠, 可使外周血单个核细胞(PMBC) 产生E6 特异的增殖反应, 并对乳头瘤病毒介导的病变产生部分保护性。含HPV 16 L1 的DNA 疫苗免疫小鼠可诱导特异的体液及细胞免疫。目前DNA疫苗已应用于临床前期实验, 在人体内的安全性及远期效果仍在观察中。因为疫苗中DNA 有可能整合在宿主的基因组上, 潜在地灭活抑癌基因而活化癌基因, 转化宿主细胞, 诱发恶性肿瘤。另外E7 蛋白是一种瘤蛋白, 它可以结合一种细胞核内的肿瘤抑制蛋白Rb, 破坏细胞周期的调节。E7 在细胞核内的存在, 可致基因畸变累积, 最终使宿主细胞转化为恶性肿瘤细胞^[71]。这些都是DNA 疫苗期待解决的难题。

5. RNA疫苗

RNA疫苗是疫苗研究方向之一,但其存在稳定性差和转换效率低的缺点,曾一度被研究者冷落。近年来RNA自我复制子受体的应用,使RNA疫苗具有广阔的应用前景。自我复制使目标抗原能高滴度长时间表达,尽可能完全地发挥疫苗的效能。RNA启动的RNA复制子,最终会导致转染细胞溶解,这对于开发以E6和E7为靶抗原的疫苗非常重要。通过HPV-16E7和HSP70的嵌合融合,能进一步提高自我复制的RNA疫苗效能^[72]。采用LAMP-1方案创造出的Sig/E7/LAMP-1 RNA复制子,也能进一步提高其效能^[73]。RNA复制子核酸疫苗也可用DNA, DNA启动的RNA复制子,也称“自杀型”DNA,具有裸DNA疫苗和RNA复制子两者的优点。它不仅具有常规裸DNA疫苗的稳定性和易于制备的优点,还具有比常规裸DNA疫苗更强的效能。用DNA启动的RNA复制子,转染细胞最终溶解,无需担心DNA疫苗相关的恶变。

6. 细胞疫苗

细胞疫苗主要分两大类:树突状细胞(dendritic cell, DC)疫苗和细胞因子转化的肿瘤细胞疫苗。与E6或E7结合的DC疫苗作为专业的APC,在体内可激活辅助和杀伤性T细胞,引起细胞介导的免疫反应以杀伤感染或肿瘤细胞。肿瘤细胞疫苗不适于早期癌和癌前期病变的病人,因为接种改造的肿瘤细胞有致癌的危险并引起伦理上的争议。动物试验已经证实,经细胞因子转化的肿瘤细胞可以诱导E7特异性CTL活性及保护性免疫^[19]。

(三) 兼有预防和治疗作用的疫苗

嵌合性VLPs疫苗。将E7蛋白或多肽与VLPs(L1)嵌合,既可激活CTL又可产生L1特异性的体液免疫。因此对HPV感染和相关疾病可起到预防和治疗兼顾的作用^[71,75]。目前HPV16L1/L2 E2 E7嵌合疫苗正准备进入临床试验阶段^[19]。另一种具有预防和治疗作用的疫苗—假病毒颗粒疫苗,即将裸DNA装入没有扩增能力的假病毒颗粒。动物实验发现含有HPV16 E7的假病毒颗粒疫苗能刺激机体产生中和抗体和E7特异性的T细胞反应^[76]。

在过去10多年中,HPV疫苗的研究取得了明显的进展。虽然目前HPV的疫苗已进入II~III期临床试验阶段,但是尚未筛选出一种疗效最强、副作用最低的疫苗。这与我们对HPV病毒认识还不足及对各种疫苗的特性还未完全把握有关。疫苗的应用仍面临挑战,但相信在未来几十年对HPV相关疾病的治疗一定会有

变革性的影响。

三、 研究目的和方法

尖锐湿疣治疗后复发,一方面增加患者医疗费用,另一方面增加了患者的痛苦。尖锐湿疣复发是多因素作用的结果。尖锐湿疣患者感染的 HPV 亚型及复合感染程度直接影响其病情和复发的发生。近几年尖锐湿疣患者免疫学方面的研究发现其存在外周血 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞异常、单核-巨噬细胞功能障碍以及细胞因子产生失衡引起的一系列细胞免疫反应抑制效益,这与 HPV 感染长期存在或多次复发有关。除次之外疾病的复发是否与病毒本身的变异而逃避机体免疫监视有关,目前这一方面的研究尚不多。本研究通过 PCR 及酶切方法对临床收集得四例复发尖锐湿疣患者进行感染 HPV 分型。选取一例感染 HPV6 型患者皮损,应用 PCR 方法扩增 L1 基因,通过定向克隆方法构建 pQE40-HPV6 L1 原核表达质粒。然后进行测序分析。与标准型 HPV6 L1 基因进行对比。以期望发现 L1 的变异情况,分析其是否与复发有关及为后续蛋白表达做准备。

实验材料及方法

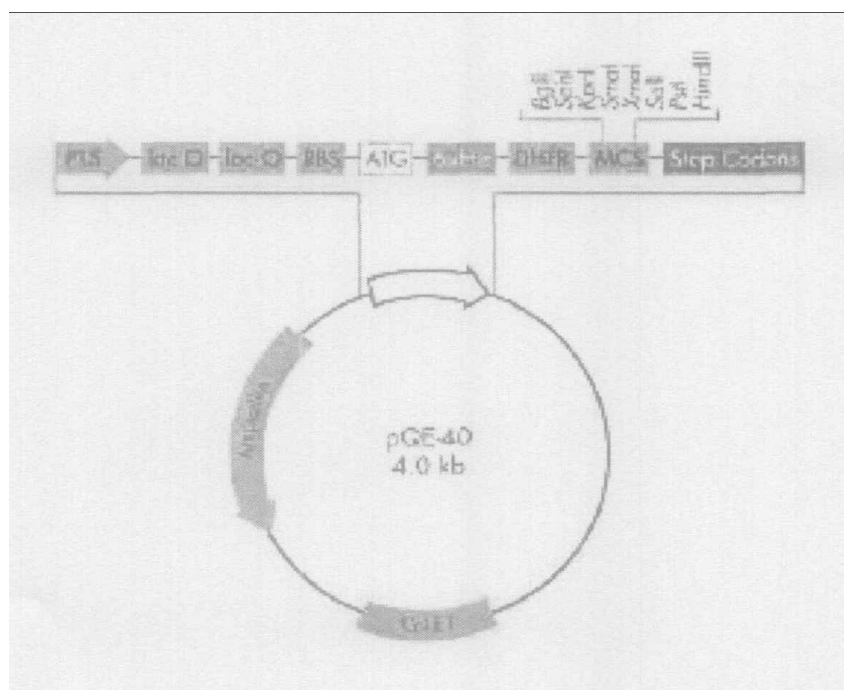
第一部分 实验材料

一、标本

选择广州暨南大学附属第一医院皮肤科冷冻治疗后复发患者 4 例。其中男 3 例，女 1 例，年龄在 20~30 岁。手术切取肛周、外阴或冠状沟周围病变组织。经灭菌的 PBS 冲洗后放入 -20℃ 冰箱保存备用。

二、菌种和质粒

菌种：大肠杆菌 DH5 α 菌株由暨南大学生殖免疫中心实验室提供，含 pQE40 质粒 DH5 α 大肠杆菌菌株由暨南大学药学院实验室提供。pQE40 质粒图谱如下图：



三、主要实验仪器和设备

超净工作台	上海手术器械厂	中国
TGL-16G 型台式高速离心机	上海安亭科学仪器厂	中国
80-2 型台式低速离心机	上海离心机厂	中国
28RS 型冷冻离心机	Heraeus	德国
Lambda 45 型紫外分光光度计	PerkinElmer	美国
SHA-B 型多功能恒温水浴振荡器	广州富城科学仪器厂	中国
HY-2 型自动旋转式混匀仪	江苏兴化分析仪器厂	中国
QL-901 型旋涡混合器	江苏海门市麒麟医用仪器厂	中国
DS 型电热三用恒温水浴箱	北京医疗设备厂	中国
MA260S 型电子分析天平	上海第二天平仪器厂	中国
Galanz 微波炉	顺德格兰仕电器厂有限公司	中国
9600 PCR 扩增仪	PE 公司	美国
DY-W2 型电泳仪	北京生化仪器厂	中国
ZF 型紫外透射反射分析仪	上海嘉定康华升华仪器厂	中国
PAL 3000 电源 (带温度探头)	BIO-RAD 公司	美国
Multi Tem BII 多用恒温循环仪	BIO-RAD 公司	美国
PROTEAN nxi 电泳槽	Pharmacia 公司	瑞典
Tiger Gel 凝胶分析仪	重庆大学 SCI 研究所	中国
pHS-3C 精密酸度计	北京医疗设备厂	中国
SLT-13V-85℃超低温冰箱	HARRIS	美国
Kelon 冰箱	科龙	中国
超纯水仪	SG 水处理及再生技术公司	德国
制冰机	SCOTSMAN	意大利
电热手提式压力蒸汽灭菌器	上海医用核子仪器厂	中国
电热恒温鼓风干燥箱	上海跃进医疗器械厂	中国
微量加样器 (2ul、20ul、200ul、1000ul)	Gilson	法国
针头式过滤器 (2L)		德国
量筒、烧杯、锥形瓶		

盖玻片、试管、吸管、离心管、PCR 薄壁管

酒精灯、记数器、镊子

手术取材器械一套

各种大小橡皮塞、吸球

吸水纸、纱布、封口膜

一次性注射器（1ml、5ml、10ml、20ml、50ml）

四、主要试剂

Tris	上海生物工程技术服务有限公司	中国
硼酸（优质纯）	开原化学试剂厂	中国
氯仿（分析纯）	广州化学试剂厂	中国
异丙醇（分析纯）	广州化学试剂厂	中国
1%溴化乙锭（EB）	上海生物工程技术服务有限公司	中国
琼脂糖	Promega 公司	美国
溴酚蓝	上海试剂三厂	中国
乙二胺四乙酸二钠（分析纯）	广州化学试剂厂	中国
无水乙醇（分析纯）	广州化学试剂厂	中国
100bp DNA Ladder	上海中能博彩公司	中国
λ -EcoT14 I digest DNA Marker	Takara	日本
Rsa I 限制性内切酶	Takara	日本
Bam H I 限制性内切酶	Takara	日本
Hind III 限制性内切酶	Takara	日本
T4 DNA 连接酶	Takara	日本
高保真 Taq DNA 聚合酶	Takara	日本
基因组 DNA 快速抽提试剂盒	华舜生物工程有限公司	中国
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN 公司	德国

五、主要溶液的配制：

1. 0.01 mol / L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.2) (清洁组织用)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.55g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.6g
NaCl	8.775g
H_2O	1000ml
调 pH 到 7.2。	

2. 配制 10x TBE 溶液：

Tris	54 g
Boric Acid	27.5g
EDTA-2Na	3.72g
H_2O	
总量 1000ml，磁力搅拌器搅拌溶解	

3. LB 培养基：

蛋白胨	10g
酵母提取物	5g
氯化钠	10g
如果需要用 1N NaOH (~1ml) 调整 pH 至 7.0，再补足水至 1L。	
注：琼脂平板需添加琼脂粉 12g/L	

4. 常用抗生素：

氨苄青霉素 (Ampicillin) (50mg/ml)

溶解 0.5g 氨苄青霉素钠盐于足量的水中，最后定容至 10ml。

分装成小份于 -20℃ 贮存。常以 25ug/ml ~ 50ug/ml 的终浓度添加于生长培养基

5. STE 组成：

0.1M NaCl	
10mM Tris-HCl (PH8.0)	
1mM EDTA	(PH8.0)

6. 溶液 I：

50mmol/L	葡萄糖
5 mmol/L	三羟甲基氨基甲烷 (Tris) Tris • HCl
10mmol/L	乙二胺四乙酸 (EDTA) (pH8.0)

7. 溶液 II:

0.4mol/L NaOH , 2% SDS , 用前等体积混合

8. 溶液 III:

5mol/L 乙酸钾	60mL
冰乙酸	11.5mL
水	28.5mL

9. TE 缓冲液:

10mmol/L Tris • HCl
1mmol/L EDTA (pH8.0)

10. RNA 酶A 母液:

将 RNA 酶 A 溶于 10mmol/L Tris • Cl (pH7.5), 15mmol/L NaCl 中, 配成 10mg/ml 的溶液, 于 100℃加热 15 分钟, 使混有的 DNA 酶失活。冷却后用 1.5ml eppendorf 管分装成小份保存于-20℃。

11. 引物设计及合成:

型鉴别引物 上游: TTCGTTGTTACCTGTGTCAC

下游: ACCTCATCTTCTGAGCTGTC

L1 扩增引物 上游: CGGGATCCATGTGGCGGCCTAGCGACA

下游: CCGAAGCTTGATTACCTTTTAGTTTTGGCGCG

第二部分 实验方法

一、实验思路

1. 收集临床尖锐湿疣复发患者标本。
2. 提取组织基因组 DNA。
3. 自行设计引物扩增 HPV 病毒 E6、E7 之间一段保守序列。
4. 核酸内切酶鉴定组织感染 HPV 类型。
5. 自行设计引物扩增 HPV L1 基因。
6. 将 L1 基因定向克隆至原核表达载体 pQE40 中。
7. 酶切鉴定重组质粒后进行测序。
8. 分析测序结果并与标准 L1 基因进行比对。

二、实验流程

1. 从尖锐湿疣组织中提取基因组 DNA

- (1) 将组织放入 1.5ml 离心管中,用组织捣碎棒将组织彻底捣碎,加入 400ulDL 液,振荡悬浮后,置 65℃温浴 15 分钟使小组织消失。再加入 200ulDT 液、20ulProteinase K,迅速振荡混匀。置 65℃温浴 15 分钟,期间来回颠倒离心管数次。离心 3 分钟,将上清转移到另一个离心管中
- (2) 加入 200ul 异丙醇,剧烈颠倒离心管使溶液混匀后,取 600ul 至吸附柱中,离心 30 秒。弃去管中液体,将吸附柱放在同一个收集管中,将剩余的全部移至吸附柱中,离心 30 秒,弃去管中液体将吸附柱放于同一个收集管中
- (3) 加入 500ulW1 液,静置 1 分钟后离心 30 秒
- (4) 将吸附柱移入另一个新的收集管中,加入 500ulW1 液离心 15 秒
- (5) 弃去收集管中液体,再将吸附柱放入同一收集管中离心 1 分钟
- (6) 将吸附柱移入一个干净的 1.5ml 离心管中,在吸附柱中央加入 100ulT1 液,65℃静置 5 分钟,离心 1 分钟,将 1.5ml 离心管-20℃保存

注：离心速度为：12000rpm

2. PCR 及酶切鉴定 HPV 感染类型

(1) PCR 反应体系如下

基因组 DNA 模板	10 μ l
dNTP	4 μ l
T4 DNA Taq 聚合酶	0.25 μ l
10xTaq 酶缓冲液	5 μ l
5' 端引物 (20uM)	1 μ l
3' 端引物 (20uM)	1 μ l
双蒸水	28.75 μ l

每管总量 50 μ l, 加入到 PCR 专用管里面, 各反应 1 管, 共 4 管。由于采用 9600 PCR 扩增仪, 故无须向反应体系里面加甘油。

(2) 反应的程序设计如下

- 94℃ 4 分钟
 - 94℃ 30 秒
 - 53℃ 45 秒
 - 72℃ 1 分钟
 - 72℃ 5 分钟
 - 4℃ 保存
- } 共 30 循环

PCR 反应结束后, 取 5 μ l 反应产物, 向其中加入 DNA 电泳缓冲液 0.5 μ l, 混和后加样于 2 %琼脂糖凝胶中, 同时加入 Marker, 在 100V 电压下电泳 20 分钟, 用 1 μ g/ml 溴乙啶染色 20 分钟后, 置紫外线下拍照, 将 PCR 产物带与 Marker 做比较, 以检测产物是否正确。

(3) PCR 产物纯化、酶切和电泳

由于 PCR 反应体系中有很多其它基因以及未用完的反应原料, 影响酶切反应, 因此需要用酚和氯仿对其进行纯化, 取上一步剩下的 50 μ l PCR 反应产物, 加入

TE	100 μ l
酚	50 μ l
氯仿	50 μ l

共 250 μ l, 充分混和, 4℃下 12000rpm 离心 5 分钟

- ① 将上清转移到另外一个 Eppendorf 管中, 向上清中加入 400 μ lNaAC/乙醇, 混和充分
- ② 4℃下 12000rpm 离心 5 分钟, 去除上清
- ③ 用 70%乙醇 200 μ l 轻轻洗涤沉淀
- ④ 置真空干燥器中干燥沉淀, 得到纯化的 PCR 产物
- ⑤ 加入

双蒸水	260 μ l
10x 缓冲液 B	30 μ l
Rsa I	5 μ l

- ⑥ 总量 300 μ l, 37℃水 4 h
- ⑦ 将 30 μ lDNA 电泳缓冲液加入到上述水浴后的 300 μ l 酶切后的 PCR 产物中, 混和后加样于 2 %琼脂糖凝胶中, 同时加入 Marker, 在 100V 电压下电泳 20 分钟

用 1 μ g/ml 溴乙啶染色 20 分钟后, 置紫外线下拍照, 将 PCR 产物带与 Marker 做比较, 判断酶切产物大小。

3. L1 基因的 PCR 扩增及酶切

(1) PCR 反应体系如下

基因组 DNA 模板	10 μ l
dNTP	4 μ l
T4 DNA Taq 聚合酶	0.25 μ l
10xTaq 酶缓冲液	5 μ l
5' 端引物 (20 μ M)	1 μ l
3' 端引物 (20 μ M)	1 μ l
双蒸水	28.75 μ l

每管总量 50 μ l, 加入到 PCR 专用管里面, 共反应 2 管。反应的程序设计如下

- 94℃ 4 分钟
 - 94℃ 30 秒
 - 64℃ 45 秒
 - 72℃ 1 分钟
 - 72℃ 5 分钟
 - 4℃ 保存
- } 共 30 循环

(2) L1 基因要想插入到 pQE40 载体中, 还需要将该扩增片段进行酶切以创造连接的结合点。由于 PCR 反应体系中有很多其它基因以及未用完的反应原料, 影响酶切反应, 因此需要用酚和氯仿对其进行纯化。

① 取上一步剩下的 100 μ l PCR 反应产物, 加入

TE	155 μ l
酚	100 μ l
氯仿	100 μ l

共 450 μ l, 充分混和, 4℃ 下 12000rpm 离心 5 分钟

② 将上清转移到另外一个 Eppendorf 管中, 向上清中加入 600 μ l NaAC/乙醇, 混和充分

③ 4℃ 下 12000rpm 离心 5 分钟, 去除上清

④ 用 70%乙醇 300 μ l 轻轻洗涤沉淀

⑤ 置真空干燥器中干燥沉淀, 得到纯化的 PCR 产物

(3) 酶切反应

① 反应体系如下:

双蒸水	260 μ l
10x 缓冲液 K	30 μ l
Bam H I	5 μ l
HindIII	5 μ l

总量 300 μ l, 37℃ 水 4 h

② 将 30 μ l DNA 电泳缓冲液加入到上述水浴后的 300 μ l 酶切后的 PCR 产物中, 混和后加样于 0.8 %琼脂糖凝胶中, 同时加入 Marker, 在 100V 电压下电泳 20 分钟用 1 μ g/ml 溴乙啶染色 20 分钟后, 置紫外线下拍照, 将 PCR 产物带与 Marker 做比较, 以检测产物是否正确; 并切取目的条带, 应用琼脂糖凝胶回收试剂盒, 回收目的条带 (步骤参考 7)。

4. 质粒 DNA 的大量制备

此步的目的是得到大量的 pQE40 质粒, 以进行酶切和连接反应

- (1) 挑取一个含 pQE40 质粒新鲜菌落接种于含相应抗生素的 400ml LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 12-16 小时
- (2) 用 500ml 离心筒收集菌液, 5000rpm 离心 10 分钟, 弃上清, 将离心管倒置使上清液全部流尽, 将细菌沉淀重新悬浮于 50ml 用冰预冷的 STE 中
- (3) 同步骤 2 方法离心以收集细菌细胞
- (4) 将细菌沉淀物重新悬浮于 5ml 溶液 I 中, 充分悬浮菌体细胞
- (5) 加入 12ml 新配制的溶液 II, 盖紧瓶盖, 缓缓地颠倒离心管数次, 以充分混匀内容物, 冰浴 10 分钟
- (6) 加 9ml 用冰预冷的溶液 III, 摇动离心管数次以混匀内容物, 冰上放置 15 分钟, 此时应形成白色絮状沉淀
- (7) 4 $^{\circ}$ C 下 5000g 离心 15 分钟
- (8) 取上清液, 加入 50ml RNA 酶 A (10mg/ml), 37 $^{\circ}$ C 水浴 20 分钟
- (9) 加入等体积的饱和酚/氯仿, 振荡混匀, 4 $^{\circ}$ C 下 12000g 离心 10 分钟
- (10) 取上层水相, 加入等体积氯仿, 振荡混匀, 4 $^{\circ}$ C 下 12000g 离心 10 分钟
- (11) 取上层水相, 加入 1/5 体积的 4mol/L NaCl 和 10% PEG (聚乙二醇), 冰上放置 60 分钟
- (12) 4 $^{\circ}$ C 下 12000g 离心 15 分钟, 沉淀用数 ml 70% 冰冷乙醇洗涤, 4 $^{\circ}$ C 下 12000g 离心 5 分钟
- (13) 真空抽干沉淀, 溶于 500ml TE 或水中。

5. 制备的质粒 DNA 的电泳检验

粗制的质粒 DNA 是否是预期的质粒 DNA 需要通过电泳进行检验。

- (1) 向管加入 10 μ l 质粒 DNA 和 1 μ l DNA 电泳缓冲液, 此时每管总量 11 μ l,

加样于 1.2%琼脂糖凝胶中

- (2) 在 100V 电压下电泳 25 分钟
- (3) 用 1μg/ml 溴乙啶染色 20 分钟
- (4) 观察目的条带是否规整，是否存在基因组 DNA 的污染。

6. pQE40 质粒酶切

此步的目的是用核酸内切酶酶切 pQE40 质粒，使之成为线性片断，为插入 DNA 片段做准备。

- (1) 取 4℃保存的 pQE40 质粒，按下面所列加入内切酶和缓冲液

pQE40 质粒	60μl
Bam HI	5 μl
Hind III	5 μl
10x 缓冲液 K	40μl
H ₂ O	290μl

总量 400μl，37℃水浴 4 小时进行酶切

- (2) 将 40μlDNA 电泳缓冲液加入到上述水浴后的 400μl 质粒酶切的产物中，混和后加样于 0.8 %琼脂糖凝胶中，同时加入 Marker，在 100V 电压下电泳 20 分钟用 1 μ g/ml 溴乙啶染色 20 分钟后，置紫外线下拍照，将 PCR 产物带与 Marker 做比较，以检测产物是否正确；并切取目的条带，应用琼脂糖凝胶回收试剂盒，回收目的条带（步骤参考 7）。

7. 从琼脂糖凝胶中提取 DNA（GENECLEAN）

PCR 酶切产物中含有内切酶、反应 Buffer 及酶切下的小片断，影响连接反应，因此必须清除，而 pQE40 酶切产物除含有以上产物外，其酶切废用片断长度为 600bp 左右，必须采用琼脂糖凝胶电泳方式区分并清除，而且连接反应需要 DNA 纯度较高，所以本研究采用 QIAquick Gel Extraction Kit 试剂盒从琼脂糖凝胶中提取回收 DNA。

- (1) 取 2 支 Eppendorf 管，称重
- (2) 在紫外线照射台上切取第 3 步 PCR 产物酶切电泳后 DNA 所在的胶块及第 6 步 pQE40 质粒酶切后目的条带所在胶块，将 2-3 个胶块放入到 1 个 Eppendorf 管中，称取总重量，减去 Eppendorf 管本身的重量，得到胶

块的重量(mg)

- (3) 加入 3 倍体积的 Buffer QG, 其微升数等于胶块 mg 数 (例如上一步中胶块重量为 400mg, 则加入 Buffer QG 的量为 1200 μ l)
- (4) 混和后置于 50℃水浴直至胶完全溶解(约需 5-10 分钟)
- (5) 胶溶解后检查混合液的颜色是否为黄色 (与未加入胶的颜色基本相同), 如果混合液颜色变为橙色或紫色, 加入 10 μ l 3M 的醋酸钠 (PH 5.0) 使混合液颜色变为黄色
- (6) 加入 1 倍胶体积的异丙醇, 振荡混匀
- (7) 把 QIA 吸附柱放入 2ml 的收集管, 吸取 800 μ l 混合液
- (8) 离心 1 分钟, 让混合液通过吸附柱结合 DNA, 倒掉液体再加入剩余的混合液离心。
- (9) 倒掉离心液体, 将吸附柱放在同一个收集管
- (10) 加入 750 μ l Buffer PF 到吸附柱中, 静置 3 分钟, 离心一分钟
- (11) 倒掉滤过液, 然后离心 1 分钟
- (12) 将吸附柱放在一个干净的离心管中, 加入 50 μ l Buffer EB, 静置 1 分钟, 然后离心 1 分钟
- (13) 将离心所得的 DNA -20℃保存备用。

8. 连接反应

当目的基因两端和载体应用不同的内切酶酶切后, 其两端分别产生了不同的粘性末端, 所以目的基因只能以一种方式插入载体, 此种连接方式称定向克隆, 研究发现当目的基因量是载体量的 3 倍时连接效率最高。

- (1) 分别用紫外分光光度计, 测量 7 步骤中目的基因和载体浓度
- (2) 根据测量浓度, 按目的基因和载体量 3: 1 方式加入反应管, 反应体系如下

pQE40 质粒酶切产物	12 μ l
PCR 酶切产物	4 μ l
T4 连接酶	1 μ l
10x 缓冲液	2 μ l
H ₂ O	1 μ l

16℃过夜。

9. 感受态细胞制备

所谓感受态是指细菌培养物在某一特定的阶段作为转化的受体，能接受外源 DNA 而不降解的生理状态。为了把外源性 DNA 引入大肠杆菌进行扩增，就必须先制备能够吸收外来 DNA 分子的感受态细胞。用 CaCl_2 对受体菌进行处理，可以提高膜的通透性，使转化效率提高几十倍。下面是制备感受态细胞的具体步骤：

- (1) 取出已经预先接种大肠杆菌 DH5 α 菌株的琼脂 LB 培养皿，挑选一个单菌落到含有 4ml LB 培养液的试管中，37℃ 120rpm 摇床培养过夜
- (2) 次日取 250 μl 过夜培养液加入到含有 25ml LB 培养基的试管中
- (3) 37℃ 120rpm 摇床培养 2.5h(或者 140rpm 培养 2h)
- (4) 3500rpm 室温离心 10 分钟，去除上清
- (5) 用 7.5ml 水+1M CaCl_2 375 μl 溶解沉淀细胞，置冰浴 30 分钟
- (6) 3500rpm 4℃ 离心 10 分钟，去除上清
- (7) 重新溶解沉淀细胞于 2.5ml TE+1M CaCl_2 175 μl 中，即制得感受态细胞

10. 重组 DNA 的转化

质粒 pQE40 携带一个抗氨苄青霉素基因，编码一种能水解 β -内酰胺环从而破坏氨苄青霉素的酶，当 pQE40 转化入大肠杆菌后放入含氨苄青霉素的培养基中，能长出的细菌就都是含有 pQE40 质粒。

- (1) 将 200 μl 感受态细胞分别加到第 8 步的实验管中和对照管（只含 L1 基因）中
- (2) 冰浴 30 分钟
- (3) 42℃ 热休克 2 分钟
- (4) 返回冰浴 1 分钟
- (5) 两管各加入 500 μl LB 培养基，37℃ 水浴 1h
- (6) 3000rpm 离心 2 分钟，去除 600 μl 的上清
- (7) 用余下的 115 μl 上清溶解沉淀
- (8) 在超净工作台上吸取上述溶解液于含氨苄西林 50mg/ml 的琼脂 LB 培养基表面用消毒过的三角耳环均匀涂布培养基表面，直至表面看不见液体
- (9) 在 37℃ 温箱中孵育过夜。

11. 重组 DNA 鉴定

(1) 小量制备质粒 DNA 及质粒纯化

本步的目的是将含连接成功的质粒 DNA 的大肠杆菌经 LB 培养基培养扩增后再从培养液中提取出重组 pQE40 质粒。用 SDS 使大肠杆菌细胞破裂,并使膜蛋白变性沉淀,经苯酚、氯仿抽提除去其他蛋白质成分,用乙醇沉淀得到粗制的质粒 DNA。

- ① 取 10 支含 4ml LB 培养基的 25ml 试管,编号,向每管中加入 4 μ l 浓度为 50mg/ml 的氨苄西林溶液,用消毒过的牙签从 37 $^{\circ}$ C 温箱过夜生长的培养皿中挑取 10 个菌落,放入到上述各管中的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 摇床 140rpm 培养 6-7h 或 120rpm 过夜吸取 1.5ml 培养液到 10 支 Eppendorf 管中,与试管一一对应编号
- ② 4 $^{\circ}$ C 下 12000rpm 离心 5 分钟,去除上清
- ③ 再加入 1.5ml 培养液,4 $^{\circ}$ C 下 12000rpm 再次离心,完全去除上清
- ④ 用 0.5ml STE 溶液重新溶解沉淀,4 $^{\circ}$ C 下 12000rpm 离心,完全去除上清
- ⑤ 加入 100 μ l 冰冷的“溶液 1”,振荡混匀
- ⑥ 加入 200 μ l 新鲜配制的“溶液 2”(室温),快速颠倒 4-5 次(不要振荡!)
- ⑦ 加入 150 μ l 冰冷的 3M PH5.2 醋酸钠,轻轻颠倒 4-5 次,冰浴 3-5 分钟 4 $^{\circ}$ C 下 12000rpm 离心 5 分钟,上清转移到 10 支新的 Eppendorf 管
- ⑧ 加入 900 μ l 冰冷的 100%乙醇,振荡混匀,室温放置 2 分钟
- ⑨ 4 $^{\circ}$ C 下 12000rpm 离心 5 分钟,完全去除上清用 1ml 冰冷的 70%乙醇洗涤沉淀
- ⑩ 在室温下置真空干燥器中干燥沉淀(约需 10-15 分钟),加入 50 μ l TE,轻轻振荡溶解,4 $^{\circ}$ C 储存

(2) 重组质粒酶切

取纯化的重组质粒质粒,按下面所列加入内切酶和缓冲液

质粒	15 μ l
Bam HI	1 μ l
Hind III	1 μ l
10x 缓冲液 K	2 μ l
H ₂ O	1 μ l

37℃ 4 小时,终止反应,将 2 μ lDNA 电泳缓冲液加入到上述水浴后的 20 μ l 酶切的产物中,混和后加样于 0.8 %琼脂糖凝胶中,同时加入 Marker,在 100V 电压下电泳 20 分钟用 1 μ g/ml 溴乙啶染色 20 分钟后,置紫外线下拍照,以检测产物是否正确。

12. 重组质粒测序, 由上海博亚基因公司完成

实验结果

一、 HPV 型鉴别结果

四例临床标本采用分型引物，均扩增出了目的基因，产物为 HPV 基因组 E6、E7 之间的保守序列，长度为 233bp（见图 1），文献报道此序列比较保守不易发生突变，是理想的型别鉴别区域，模拟图可以看出此序列经 Rsa I 酶切后 HPV6 型可得到 144bp 和 96bp 大小的片断，HPV11 可得到 161bp 和 74bp 大小的片断（见图 2）。



图 1 PCR 扩增 HPV E6 与 E7 之间保守基因 2%琼脂糖凝胶电泳
M: 100bp Marker; 1、2、3、4 为目的条带大小 233b

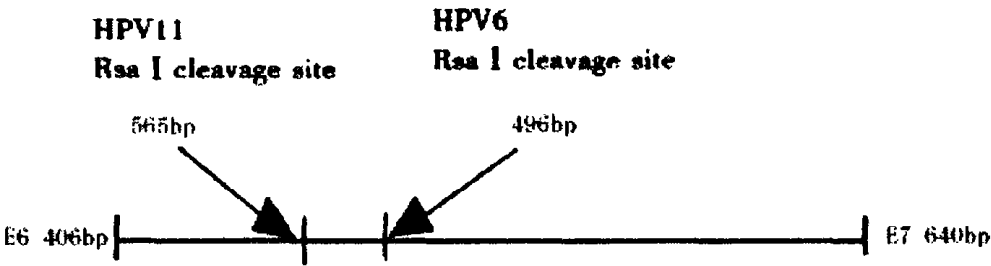


图 2 酶切实验模拟图
HPV 6、11 PCR 位置及 Rsa I 酶切位点

我们对上述扩增的 PCR 产物经过纯化后，应用 Rsa I 内切酶酶切后，电泳发现有三例得到 144bp 和 96bp 大小片断，鉴定为 HPV6 型；有一例得到 161bp 和 74bp 大小的片断，鉴定为 HPV11 型（见图 3）。

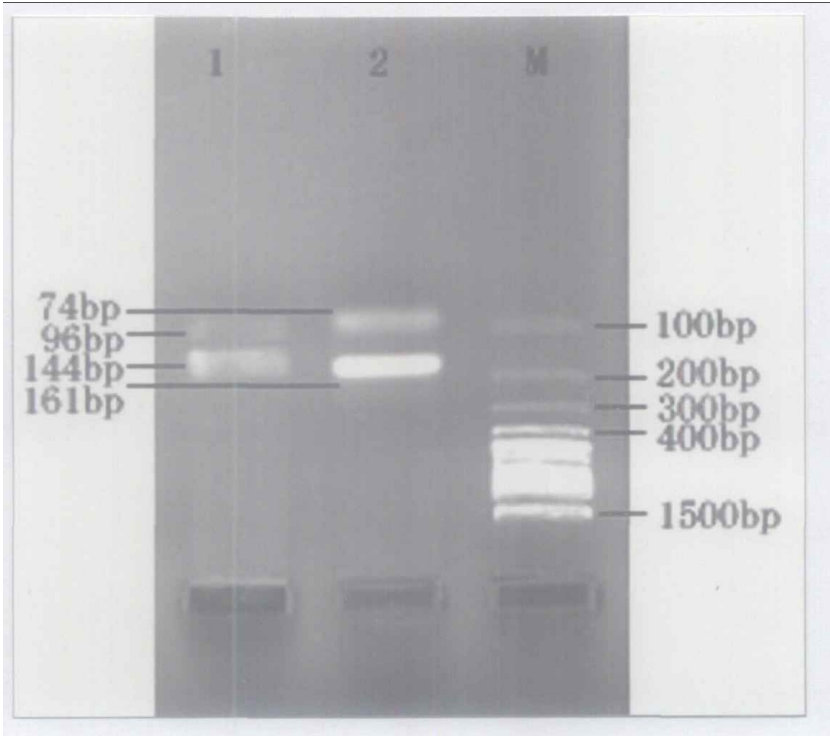


图 3 E6、E7 之间保守序列酶切后 2%琼脂糖凝胶电泳
M: 100bp Marker; 1 为 HPV6 型酶切结果; 2 为 HPV11 酶切结果

二、 HPV L1 扩增结果

L1基因是乳头瘤病毒主要晚期基因，长度约为1500bp，是HPV分型的主要依据，也是本实验的目的基因。一般来讲在PCR过程中，经过30个循环，每400~4000bp的序列就会出现一个碱基的误配^[77]，这种由于Taq 酶误配而致扩增序列发生碱基替换是影响序列分析和分型的主要原因，本实验目的基因是1500bp，因此我们选择高保真Taq酶进行扩增，以提高实验数据的可信度。取一例鉴定型别为HPV6型的DNA标本为模板，进行PCR扩增，然后在0.8%的琼脂糖凝胶中电泳。结果显示，在1500bp处有明亮的DNA条带。未见杂带。初步提示扩增L1基因成功（见图4）。



图4 高保真Taq酶扩增L1基因0.8%琼脂糖凝胶电泳

M: λ -EcoT14 I digest DNA Marker; 1、2、3、4 为目的条带, 大小为 1500bp

三、重组质粒的构建

如构建重组质粒示意图(见图 5)所示, 设计在质粒中插入目的基因, 首先要使质粒变为线性载体。为了使目的基因能单方向插入载体, 而且防止载体自连, 线性载体的两个粘性末端必须不同。所以我们选择不同的内切酶进行酶切。

pQE40 质粒大小为 4031bp, 含有编码 6 个连续组氨酸的序列, 使外源蛋白 N 一端带有 6 个组氨酸, 便于目的蛋白应用 Ni-NTA 基质纯化。本质粒尚含有 DHFR 是编码二氢叶酸还原酶的基因, 此基因的作用, 一方面可作为对照表达, 另一方面此融合蛋白可以防止菌体对小片段目的蛋白的自身消化, 有利于小片段基因表达。本研究表达基因长度为 1500bp, 属较大片段。为后续纯化蛋白方便, 必须切除 DHFR 基因, 因此 Bam H I 和 Hand III 是最佳的酶切位点。一方面其可以使 pQE40 质粒成为存在不同粘性末端的线性载体, 另一方面切除了 DHFR 废用基因。由于 Bam H I 和 Hand III 都存在 Star 活化, 特别是存在 Mn^{2+} 情况下更易发生, 因此应用 Bam H I 和 Hand III 双酶切后的 pQE40 必须电泳进行鉴定, 以排除 Star 活化的可能性, 而且切除的 DHFR 基因长度为 600bp 左右, 也必须应用电泳技术进行分离。pQE40 酶切反应 4h 后, 取 10 μ l 反应液进行电泳。结果示可以得到 3500bp 大小的线性载体和大小为 600bp 的 DHFR 基因, 未出现 Star 活化(见图 6)。

目的基因 L1 经 Bam H I 和 Hand III 双酶切后产生了与线性 pQE40 相同的粘

性末端。将两者按 3: 1 的浓度混合后在 T4 连接酶的作用下, 能重新连接成为环状质粒—重组质粒。将连接反应液与感受态的大肠杆菌 DH5 α 混合后, 通过热冲击方法, 环状质粒会被吸附到大肠杆菌的细胞壁, 从而进入大肠杆菌 DH5 α 菌体。pQE40 质粒含有氨苄抗性基因, 使大肠杆菌 DH5 α 出现抗氨苄抗生素的特性, 从而能在氨苄青霉素选择性 LB 培养基上生长。

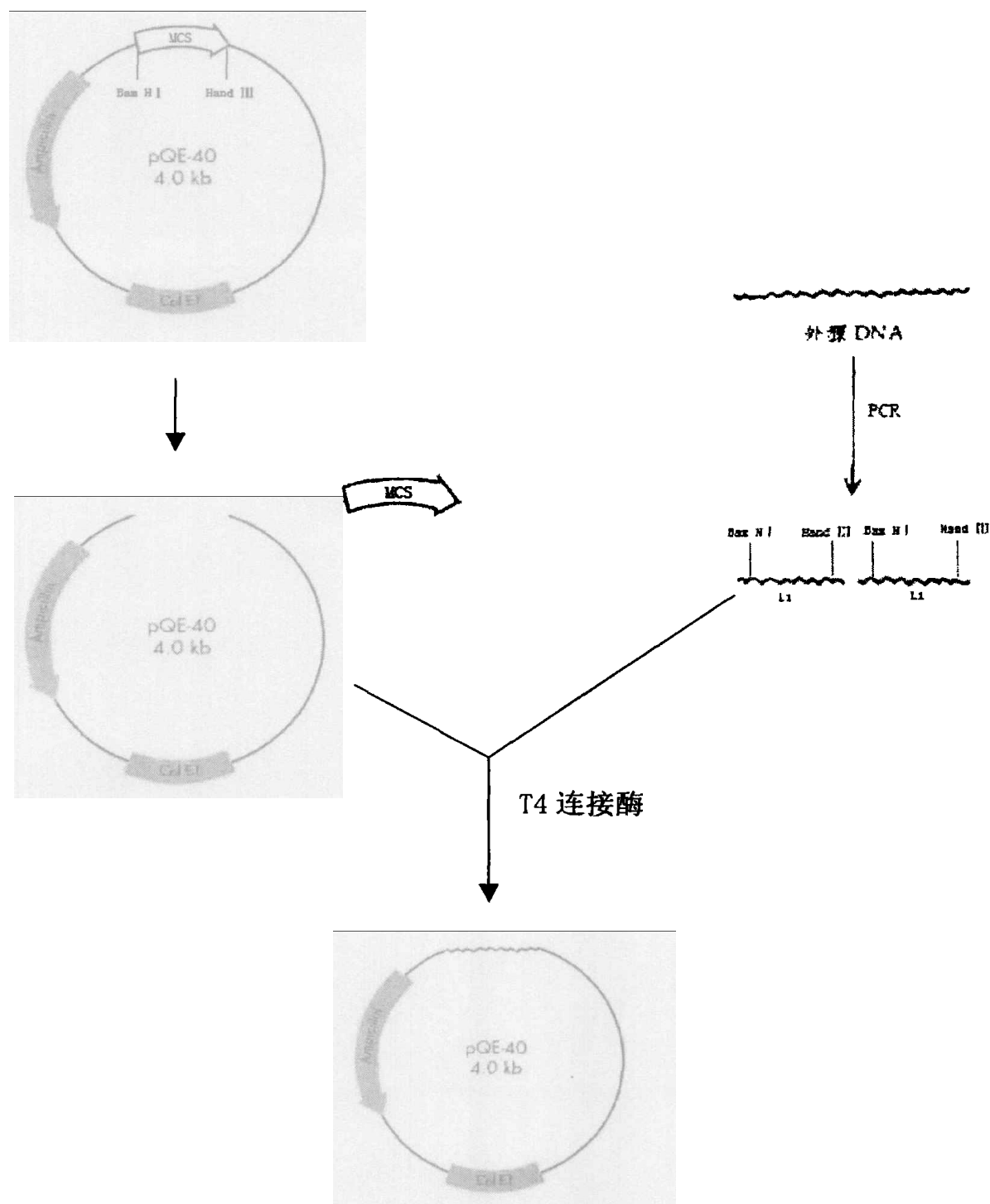


图 5 重组质粒构建示意图

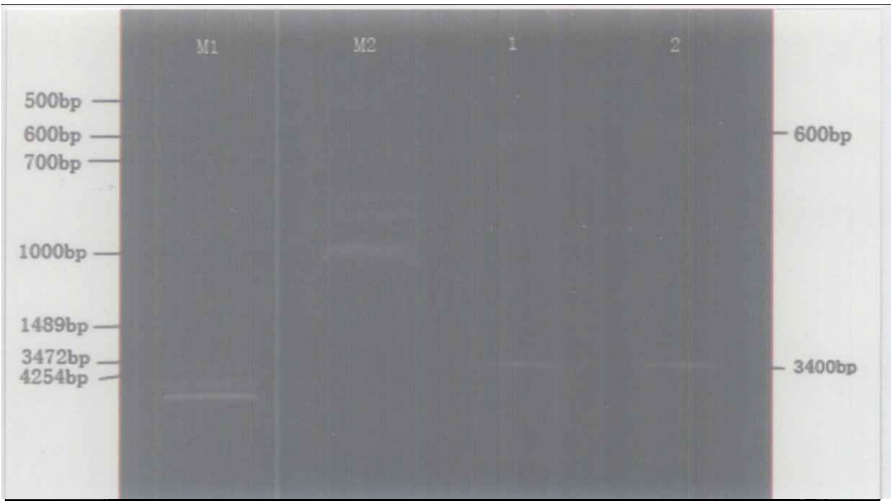


图 6 pQE40 Bam H I 和 Hand III酶切电泳图
M1: λ -EcoT14 I digest DNA Marker; M2: 100bp Marker
1、2 pQE40 酶切后线形载体及 DHFR 基因

四、重组质粒酶切电泳鉴定

氨苄抗性选择性 LB 平皿上生长的菌落扩增后，抽提质粒进行酶切鉴定，如果重组成功，则酶切后应该含有 1500bp 目的基因，挑选 10 个克隆扩增并鉴定，阳性重组子为 6 个，余为阴性克隆（见图 7）。

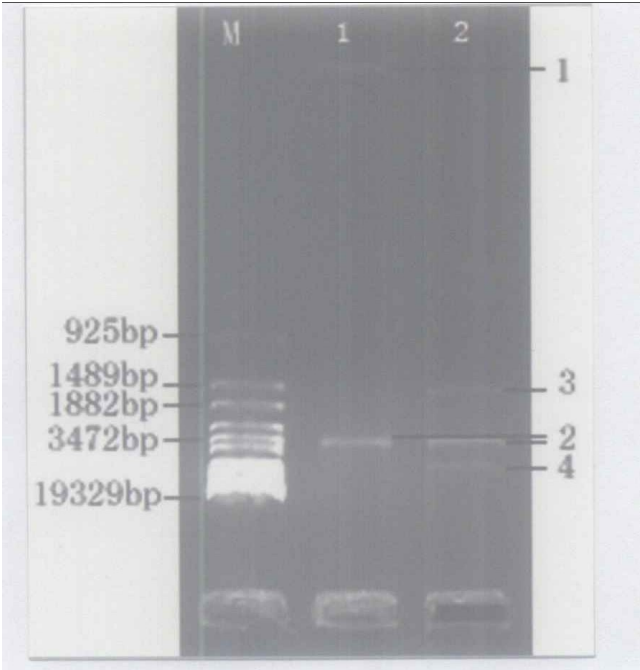


图 7 重组质粒酶切电泳鉴定图
M: λ -EcoT14 I digest DNA Marker
---: 阴性克隆; 二: 阳性克隆
1: DHFR 基因; 2: 线性载体; 3: 目的基因; 4: 酶切不完全的重组子

五、重组质粒 L1 测序结果

含重组质粒的阳性克隆送上海博亚生物技术有限公司采用自动测序仪行正、反双向测定, 拼接出完整序列(见图8), 结果应用 DNAssist 软件与 GenBank 收录的原型 HPV6b (GeneID:1489370) 进行比较(见图9), 本样品中有 7 处碱基发生变异, 使对应编码的氨基酸发生变化。原始序列 6062 处的 A→G, 核苷酸三联密码由 ACA→GCA, 其编码的氨基酸由苏氨酸→丙氨酸; 6684 处的核苷酸 A→T, 核苷酸三联密码由 GAG→GTG, 其编码的氨基酸由谷氨酸→缬氨酸; 6945 处的核苷酸 T 变为 C, 核苷酸三联密码由 ATT→ACT, 其编码的氨基酸由异亮氨酸→苏氨酸; 其余四处为: 6598 处的 A→T, 7081 处的 A→G, 7099 处的 G→A, 7243 处的 C→A, 均为同义突变。

Bam H I

```

1      GGATCGCATC ACCATCACCA TCACGGATCC ATGTGGCGGC CTAGCGACAG CACAGTATAT GTGCTCCTC
71     CTAACCCTGT ATCCAAAGTT GTTGCCACGG ATGCTTATGT TACTCGCACC AACATATTTT ATCATGCCAG
141    CAGTTCTAGA CTTCTTGCAG TGGGACATCC TTATTTTTC ATAAAACGGG CTAACAAAAC TGTGTGCCA
211    AAGGTGTCAG GATATCAATA CAGGGTATTT AAGGTGGTGT TACCAGATCC TAACAAATTT GCATTGCCTG
281    ACTCGTCTCT TTTGATCCC ACAGCACAAAC GTTTAGTATG GGCAATGCACA GGCCTAGAGG TGGGCAGGGG
351    ACAGCCATTA GGTGTGGGTG TAAGTGGACA TCCTTTCCTA AATAAATATG ATGATGTGA AAATTGAGG
421    AGTGGTGGTA ACCCTGGACA GGATAACAGG GTTAATGTAG GTATGGATTA TAAACAAACA CAATTATGCA
491    TGGTGGATG TGCCCCCCT TTGGGCGAGC ATTGGGGTAA AGGTAAACAG TGTACTAATA CACCTGTACA
561    GGCTGGTGAC TGCCCCCCT TAGAAGTTAT TACCAGTGT ATACAGGATG GCGATATGGT TGACACAGGC
631    TTTGGTGTCT TGAATTTTGC TGATTGTGAG ACCAATAAAT CAGATGTTCC TATTGACATA TGTGGCACTA
701    CATGTAAATA TCCAGATTAT TTACAAATGG CTGCAGACCC ATATGGTGTAT AGATTATTTT TTTTCTACG
771    GAAGGAACAA ATGTTTGCCA GACATTTTTT TAACAGGGCT GCGAGGTGG GGGAAACCTGT GCCTGATACT
841    CTTATAATTA AGGGTAGTGG AAATCGCACG ICTGTAGGGA GTAGTATATA TGTTAACACC CCGAGCGGCT
911    CTTTGGTGTCT CTCTGTGGCA CAATTGTTTA ATAAGCCATA TTGGCTACAA AAAGCCAGG GACATAACAA
981    TGGTATTTGT TGGGGTAAAT AACTGTTTGT TACTGTGGTA GATACCACAC GCAGTACCAA CATGACATTA
1051   TGTGCATCCG TAACTACATC TTCCACATAC ACCAATTCIG ATTATAAAGA GTACATGCGT CATGTGGAAG
1121   AGTATGATTT ACAATTTAT TTTCAATTAT GTAGCATTAC ATTGTCTGCT GAAGTAAATGG CCTATACTCA
1191   CACAATGAAT CCCTCTGTTT TGGAAAGACTG GAACTTTGGG TTATCGCCTC CCCCAGATGG TACATTAGAA
1261   GATACCTATA GGTATGTGCA GTCACAGGCC ATTACCTGTC AAAAGCCCAC TCCTGAAAAG GAGAAGCCAG
1331   ATCCCTATAA AAACCTTAGT TTTTGGGAGG TTAATTTAAA AGAAAAGTTT TCTAGTGAAT TGGATCAGTA
1401   TCCTTTGGGA CGCAAGTTTT TGTACAAAG TGGATATAGG GGACGGTCCT CTATTCGTAC AGGTGTTAAG
1471   CGCCCTGCTG TTTCAAAGC CTCTGCTGCC CCTAAACGTA AGCGCGCCAA AACTAAAAGG TAATCAAGCT
1541   TAATT

```

Hand III

图 8 pQE40-HPV6L1 连接序列测序图

			Run H1			
Sequence 0	1		GGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCC	ATGTGGCGGCCTAGCGACAGCACAGTATAT	60	
Sequence 1	1			ATGTGGCGGCCTAGCGACAGCACAGTATAT	30	
Sequence 0	61		GTGCCTCCTCCTAACCCCTGTATCCAAAGTTGTTGCCACGGATGCTTATGTTACTCGCACC		120	
Sequence 1	31		GTGCCTCCTCCTAACCCCTGTATCCAAAGTTGTTGCCACGGATGCTTATGTTACTCGCACC		90	
Sequence 0	121		AACATATTTTATCATGCCAGCAGTTCTAGACTTCTTGACAGTGGGACATCCTTATTTTTC		180	
Sequence 1	91		AACATATTTTATCATGCCAGCAGTTCTAGACTTCTTGACAGTGGGACATCCTTATTTTTC		150	
Sequence 0	181		ATAAAACGGGCTAACAAAACCTGTTGTGCCAAAGGTGTCAGGATATCAATACAGGGTATTT		240	
Sequence 1	151		ATAAAACGGGCTAACAAAACCTGTTGTGCCAAAGGTGTCAGGATATCAATACAGGGTATTT		210	
Sequence 0	241		AAGGTGGTGTGTACCAGATCCTAACAAATTTGCATTGCCTGACTCGTCTCTTTTCGATCCC		300	
Sequence 1	211		AAGGTGGTGTGTACCAGATCCTAACAAATTTGCATTGCCTGACTCGTCTCTTTTCGATCCC		270	
Sequence 0	301		ACAGCACAACGTTTAGTATGGGCATGCACAGGCCCTAGAGGTGGGCAGGGGACAGCCATTA		360	
Sequence 1	271		ACAACACAACGTTTAGTATGGGCATGCACAGGCCCTAGAGGTGGGCAGGGGACAGCCATTA		330	
Sequence 0	361		GGTGTGGGTGTAAGTGGACATCCTTTCTAAATAAATATGATGATGTTGAAAATTCAGGG		420	
Sequence 1	331		GGTGTGGGTGTAAGTGGACATCCTTTCTAAATAAATATGATGATGTTGAAAATTCAGGG		290	
Sequence 0	421		AGTGGTGGTAAACCTGGACAGGATAACAGGGTTAATGTAGGTATGGATTATAAACAAACA		480	
Sequence 1	391		AGTGGTGGTAAACCTGGACAGGATAACAGGGTTAATGTAGGTATGGATTATAAACAAACA		450	
Sequence 0	481		CAATTATGCATGGTTGGATGTGCCCCCCTTTGGGCGAGCATTGGGGTAAAGGTAAACAG		540	
Sequence 1	451		CAATTATGCATGGTTGGATGTGCCCCCCTTTGGGCGAGCATTGGGGTAAAGGTAAACAG		510	
Sequence 0	541		TGTACTAATACACCTGTACAGGCTGGTGACTGCCCGCCCTTAGAACTTATTACCAGTGT		600	
Sequence 1	511		TGTACTAATACACCTGTACAGGCTGGTGACTGCCCGCCCTTAGAACTTATTACCAGTGT		570	
Sequence 0	601		ATACAGGATGGCGATATGGTTGACACAGGCTTTGGTGCTATGAATTTTGCTGATTTCAG		660	
Sequence 1	571		ATACAGGATGGCGATATGGTTGACACAGGCTTTGGTGCTATGAATTTTGCTGATTTCAG		630	
Sequence 0	661		ACCAATAAATCAGATGTTCTTATTGACATATGTGGCACTACATGTAAATATCCAGATTAT		720	
Sequence 1	631		ACCAATAAATCAGATGTTCTTATTGACATATGTGGCACTACATGTAAATATCCAGATTAT		690	
Sequence 0	721		TTACAAATGGCTGCAGACCCATATGGTGATAGATTATTTTTTTTCTACGGAAGGAACAA		780	
Sequence 1	691		TTACAAATGGCTGCAGACCCATATGGTGATAGATTATTTTTTTTCTACGGAAGGAACAA		750	
Sequence 0	781		ATGTTTGCCAGACATTTTTTTAAACAGGGCTGGCGAGGTGGGGGAACCTGTGCCTGATACT		840	
Sequence 1	751		ATGTTTGCCAGACATTTTTTTAAACAGGGCTGGCGAGGTGGGGGAACCTGTGCCTGATACT		810	
Sequence 0	841		CTTATAATTAAGGGTAGTGGAATCGCACGCTCTGTAGGGAGTAGTATATATGTTAACACC		900	
Sequence 1	811		CTTATAATTAAGGGTAGTGGAATCGCACGCTCTGTAGGGAGTAGTATATATGTTAACACC		870	
Sequence 0	901		CCGAGCGGCTCTTTGGTGCTCTGTGGCACAATGTTTAATAAGCCATATTGGCTACAA		960	
Sequence 1	871		CCGAGCGGCTCTTTGGTGCTCTGTGGCACAATGTTTAATAAGCCATATTGGCTACAA		930	
Sequence 0	961		AAAGCCCAGGGACATAACAATGGTATTGTTGGGGTAATCAACTGTTTGTACTGTGGTA		1021	
Sequence 1	931		AAAGCCCAGGGACATAACAATGGTATTGTTGGGGTAATCAACTGTTTGTACTGTGGTA		990	
Sequence 0	1021		GATACCACACGCAGTACCAACATGACATTATGTGCATCCGTAACTACATCTTCCACATAC		1080	
Sequence 1	991		GATACCACACGCAGTACCAACATGACATTATGTGCATCCGTAACTACATCTTCCACATAC		1050	
Sequence 0	1081		ACCAATTCTGATTATAAAGAGTACATGCGTCATGTGGAAGAGTATGATTACAATTTATT		1140	
Sequence 1	1051		ACCAATTCTGATTATAAAGAGTACATGCGTCATGTGGAAGAGTATGATTACAATTTATT		1110	
Sequence 0	1141		TTCAATTATGTAGCATTACATTGCTGCTGAAGTAATGGCCTATATTCACACAATGAAT		1200	
Sequence 1	1111		TTCAATTATGTAGCATTACATTGCTGCTGAAGTAATGGCCTATATTCACACAATGAAT		1170	
Sequence 0	1201		CCCTCTGTTTTGGAAGACTGGAACCTTGGGTTATCGCCTCCCCCAATGGTACATTAGAA		1260	
Sequence 1	1171		CCCTCTGTTTTGGAAGACTGGAACCTTGGGTTATCGCCTCCCCCAATGGTACATTAGAA		1230	
Sequence 0	1261		GATACCTATAGGTATGTGCAGTCACAGGCCATTACCTGTCAAAGCCCACTCCTGAAAAG		1320	
Sequence 1	1231		GATACCTATAGGTATGTGCAGTCACAGGCCATTACCTGTCAAAGCCCACTCCTGAAAAG		1290	



图 9 pQE40-HPV6L1 连接序列与
GenBank 收录的原型 HPV6b (GeneID: 1489370) 序列比对图

讨 论

一、HPV分型及意义

HPV病毒属于乳多空病毒科，HPV按基因组的不同可分为若干病毒型。目前已经发现的病毒型达120余种。根据HPV感染靶细胞不同分为嗜粘膜组和嗜皮肤组，感染分为潜伏感染、亚临床感染和临床感染。特定型别的HPV与相应的疾病有一定的关联性，例如，寻常疣多为2型感染，扁平疣多为3型或相近型感染，口腔局灶上皮增生与13和32型感染有关，在疣状表皮发育不良症的皮损中有20余种HPV型别存在。嗜粘膜组有30多型，主要感染泌尿生殖道，根据与宫颈癌的关系可分为高危型、中间型和低危型，高危型包括HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73和82型，中间型包括HPV26、53和66型，低危型包括HPV6、11、40、42、43、44、54、61、72和81型，低危型中的HPV6和HPV11是引起尖锐湿疣的主要病原体。欧美及非洲调查资料显示引起尖锐湿疣的主要是HPV6型特别以HPV6a居多^[78, 79]。我国尚缺乏大规模的流行病学资料。已有的资料显示我国尖锐湿疣主要致病型也是HPV6和11型。但各地报道的比率不同，这与HPV感染的地区性差异有关。

人类对HPV的认识首先从检测病毒的研究开始。已有的检测方法主要有以下几种。细胞病理学检查：凹空细胞是感染的主要形态学改变，但由于其他病毒感染及人为因素均有可能造成细胞内出现空泡或凹空样变。而且此种方法受取材、染色及病理医生的主观判断等因素的影响，存在灵敏度低、特异性差、假阴性率和假阳性率高和不能对HPV进行分型等缺点，因此仅仅适用于临床诊断；血清学检查：主要有ELISA法检测HPV衣壳抗体、放射免疫沉淀测定法检测HPV—E6、E7癌蛋白抗体等。由于HPV至今尚不能在体外培养，且其免疫原性较弱，故血清学方法检测灵敏度较低；印迹法：该方法灵敏度及特异性均高，适用于HPV分型、HPV—DNA分子质量鉴定、基因组酶切图谱建立及物理状态研究等。但其操作麻烦、耗时、费用高，且必须应用新鲜组织标本，故不宜大规模临床使用；聚合酶链反应（PCR）是目前最常用的HPV检测方法之一，该方法灵敏度高，缺点是容易发生样品间的交叉污染，从而导致假阳性率高^[80]。随着PCR新技术的不断产生，以及人们对本技术认识的不断深入。PCR技术在HPV研究中的作用越来越大。PCR技术不仅用于HPV病毒的检测，而且适用于HPV的分型。越来越多的

分型引物被研究者设计出来。HPV的分型在分子流行病学及疾病病因学的研究中存在重要的意义。因此研究者应用PCR技术在对HPV检测的同时也进行了HPV的PCR分型研究。目前已经有多种的方法进行分型。1. 型特异引物扩增, 就是根据已知的HPV基因序列, 设计用于只扩增某一亚型的引物^[81]。但HPV病毒型别众多, 如根据每一型都设计引物则存在高费用的问题, 而且对于新的型别在不知道序列的情况下无法设计引物扩增。2. 目前应用最多的是采用兼并引物PCR技术分型。其原理是采用矩阵比较法对HPV的基因序列进行分析, 发现HPV基因序列最保守的区域, 根据此序列设计引物进行扩增。然后对扩增产物进行分子杂交或应用限制性内切酶进行酶切。应用酶切进行分型因为没有放射性同位素污染, 而且操作相对简单, 结果稳定而被广泛采用。目前此种方法已经可以用于HPV6、11、16、18、33、42、52及58的分型^[82, 83]。本研究即采用的此种方法对复发CA患者感染HPV进行分型。据文献报道E6、E7之间存在一段保守序列^[84]。自行设计引物扩增E6、E7基因之间一段233bp长度的保守序列, 然后经Rsa I 限制性内切酶酶切, 理论上分析HPV6型可得到144bp和96bp大小的片断, HPV11可得到161bp和74bp大小的片断。试验结果显示收集的4例复发性尖锐湿疣患者感染的HPV型别也是HPV6和HPV11, 其中三例感染6型, 一例感染11型, 基本符合HPV分子流行病学情况。

L1 基因是乳头瘤病毒主要晚期基因, 是病毒分型的主要依据之一, 当分离病毒株其 L1 基因 ORF 与已知序列病毒株同源性少于 90%时, 方可定为新的型别, 同源性在 90%~98%之间定为亚型, 超过 98%相同又不完全相同者为型内变异^[13, 85]。本研究重组质粒 L1 基因序列测序后发现其组织来源与 HPV6b 型更接近。L1 基因编码的蛋白是病毒主要衣壳蛋白, 占衣壳蛋白的 90%, 此蛋白通过黏附作用与宿主细胞结合, 在病毒感染过程中起到重要作用。由于 L1 蛋白很重要因此其编码基因也显得十分重要, 成为目前研究热点之一。

二、HPV6 L1 原核表达质粒的构建及意义

HPV L1 蛋白只有在成熟的角质形成细胞中才表达, 而且含量很低, 并且尚未建立有效的 HPV 动物感染模型, 这给研究 L1 蛋白的特性带来一定困难, 其研究一直进展缓慢。自 1991 年 Zhou Jian 首次在痘病毒表达系统中成功表达 HPV16 L1 蛋白以来, 人们应用基因工程的方法实现了体外表达此 L1 蛋白。L1

蛋白的生物学特性也逐渐被认识。研究发现 L1 蛋白自身可以正确折叠形成高级结构并最后形成 VLPs, 其与病毒颗粒具有相似的空间结构、免疫特征和生物学活性。VLPs 的制备成功对研究 HPV 有关生物学特性有重要意义。首先其有可能最终成为应用性的预防性疫苗, 从而达到控制相应疾病的目的。其次其可以代替病毒体分析病毒的免疫原性。

目前 L1 蛋白的表达体系主要有四种: 原核表达体系; 痘病毒表达体系; 杆状病毒表达体系; 酵母表达体系。各表达体系均有其优缺点。痘病毒表达体系是以痘苗病毒为表达载体, 以哺乳动物细胞为表达宿主, 是最早用于表达 VLPs 的表达体系。其表达的产物与天然病毒增殖过程最为相近, 因此 VLPs 更具有天然病毒的生物学特性。但其存在生产费用高、产量低、过程复杂、不易纯化的缺点, 因此在大量制备和应用上受到限制; 酵母表达体系虽然易于大规模培养, 适合于工业化生产, 但纯化困难而且表达蛋白存在翻译后的加工和膜蛋白的糖基化修饰等缺陷; 杆状病毒表达体系是以杆状病毒为载体, 昆虫细胞为宿主, 它具备以下特点: 属于真核表达系统, 获得目的蛋白与天然蛋白基本一致, 拷贝数量较高, 目的蛋白产量高, 适合工业化生产, 其相对于哺乳动物细胞而言, 培养条件和成本低。但相对于原核表达体系来讲有培养复杂、成本高、纯化困难的缺点; 原核表达体系是最常用的工业化制备蛋白体系, 它具有成本低、产量高、易于制备、纯化方便等众多优点, 是其他表达体系无法比拟的。但早期的研究却发现当以大肠杆菌为宿主表达多瘤病毒晚期基因时, 菌体中只有 VP1 的壳粒形成, 而未见 VLPs^[86]。在乳头瘤病毒 L1 基因的研究中也出现了同样的问题, 这极大的限制了此表达系统在 HPV 研究中的应用。众多的研究者将目光投向了其他表达体系。自 1997 年 Nardelli-Haeffliger D^[10]首次实现在沙门氏菌中表达的 HPV16 L1 蛋白自发组装成病毒样颗粒以来, 揭开了应用原核表达体系获得 VLPs 的序幕。1999 年我国学者郭淑元在大肠杆菌中成功的表达了 HPV16 L1 蛋白^[87]。近年来有研究者发现在大肠杆菌中表达的 L1 蛋白在经过适当的纯化和复性处理后仍能有效的组装成 VLPs。原核表达体系因为其无法替代的优点又受到了研究者的重视。

本课题利用原核质粒构建 L1 表达载体是因为原核表达系统有成本低、工艺简单、产量高的优点。虽然其表达的 L1 蛋白不能自发组装成 VLPs, 但经过提纯和复性仍可以实现有效的组装。而且载体 pQE40 含有 6 个组氨酸编码基因,

其翻译的目的蛋白含有6个组氨酸标签,其可以应用Ni-NTA为基质的纯化柱进行纯化,以方便的对表达的L1蛋白进行纯化。本课题构建的L1基因来源于CA冷冻治疗复发患者,其表达的蛋白活性可能与原型表达的L1蛋白存在差异,为分析复发患者HPV L1蛋白生物学特性提供依据。

三、HPV6 L1 基因序列分析及意义

目前对L1基因特性研究主要集中在HPV16、18等高危型的HPV。研究发现L1基因不同,其蛋白的表达和组装效率存在很大的差异。Kirnbauer^[88]应用重组杆状病毒表达体系比较两株HPV16野生型L1基因和原型L1基因发现,尽管两者表达L1蛋白的效率相似,但野生型VLPs组装效率明显高于原型。Touze^[89]选取源于世界不同地区的6个HPV16病毒株,与原型相比,发现L1蛋白的氨基酸变异多达15处,其在杆状病毒表达体系中VLPs的产量是1~79倍不等,作者认为第83~97位氨基酸的变异影响L1蛋白的表达。另有研究显示HPV16 ORF 6240处碱基G→C,导致编码蛋白202位非保守氨基酸Asp→His改变,可使VLPs形成降低14~68倍^[89]。宫颈癌等HPV16阳性的恶性病变组织中罕见完整病毒体,而良性病变组织中或终端分化的角质组织中可见完整病毒体存在,其原因可能与基因序列差异导致L1蛋白表达和自我形成高级结构的差异密切相关。虽然L1基因序列差异导致蛋白组装效率存在很大的差别,但免疫原性分析却发现它们之间并没有差别。这提示对于高危型的HPV寻找高效表达和组装的L1变异株是提高基因工程产品效率的重要途径。

目前对于低危型的HPV L1基因研究尚不多,但已有的研究发现高危型HPV L1基因生物学特性并不等同于低危型L1基因。HPV16变异株的研究结果似乎未在HPV6 L1中重现。Wanderley^[90]对伦敦地区17例HPV6型临床分离株的L1 ORF做了序列分析,发现L1基因有3个型内变异高发区,它们是R1(nt5 920~nt6 075)、R2(nt6 590~nt6 670)、R3(nt7 070~nt7 230),并发现主要变异株的变异是第7079位碱基G→C替换,L1蛋白则是第431位氨基酸发生Glu→Gln替换,但这一变异与原型L1基因在酵母表达体系中的L1蛋白产率和VLPs的组装效率是相同的。对于HPV11型研究发现基因3'端11个氨基酸缺失,大肠杆菌表达产物L1蛋白不能形成VLPs,而5'端缺失11~32个氨基酸时,L1蛋白仍能在体外复性自装成VLPs。国内学者林少洪^[91]等人观测了8例临床标本,发现有6例在系

统发生上与HPV6b型更接近, 两例与HPV6a相近, 8例临床分离株L1基因序列与HPV6b相比, 碱基替换数为3~11个, 但无碱基的增加和缺失, 发生碱基替换的区域主要有4个区, 即SR1 (5 911~6 104)、SR2 (6 217~6 273)、SR3 (6 540~6 661) 和SR4 (7 062~7 250)。8例临床分离株中有2例未发生氨基酸的变异, 3例出现一个氨基酸的改变, 2例有两个氨基酸的改变, 1例有3个氨基酸发生改变。发生氨基酸变异的区域则分布较为平均, 与发生碱基替换的位置并不相关。抗原性分析(Jameson - Wolf 抗原指数) 表明, 各分离株与原型HPV6bVLPs 抗原性强弱基本一致。

本研究构建的重组质粒送上海博亚生物技术有限公司采用自动测序仪行正、反双向测定, 拼接出完整序列。结果发现其组织来源更接近HPV6b型。应用DNAssist软件与GenBank收录的原型HPV6b(GeneID:1489370) 进行比较, 本样品中有7处碱基发生变异, 使3处对应编码的氨基酸发生变化。原始序列6062处的A突变为G, 核苷酸三联密码由ACA→GCA, 其编码的氨基酸由苏氨酸变为丙氨酸; 6684处的核苷酸A突变为T, 核苷酸三联密码由GAG→GTG, 其编码的氨基酸由谷氨酸变为缬氨酸; 6945处的核苷酸T突变为C, 核苷酸三联密码由ATT→ACT, 其编码的氨基酸由异亮氨酸变为苏氨酸; 其余四处为: 6598处的A突变为T, 7081处的A突变为G, 7099处的G突变为A, 7243处的C突变为A, 均为同义突变。根据Wanderly和林少洪分析的易突变区间, 我们发现本研究序列变异主要集中和接近在Wanderly的R3和林少洪的SR4区间即: 6945位点、7081位点、7099位点和7243位点。这提示可能上述区间是更易发生突变的区域, 这些改变可能与病毒致病性存在一定关系。R1和R2易突变区间虽然较短, 仅100bp左右, 但本研究发现集中在此区间的突变都出现了编码氨基酸的改变, 其可能存在更加重要的生物学意义。林少洪^[91]对北京地区HPV6 L1基因序列分析后发现在6 598、7 081 和7 099位点发生碱基替换的占一半以上, 但均为同义突变, 王淼、张明策^[92]对取自锦州和新乡的女性患者感染的HPV6 L1基因序列分析后发现也同样存在此三位点的突变, 而且均为同义突变。我们对广州地区复发尖锐湿疣患者HPV6 L1基因序列分析后也发现了此三位点的同义突变。因此此三位点的突变有可能是中国地区HPV6型的共同特点, 此发现对于研究我国HPV6型生物学特性有至关重要的意义。

目前CA治疗的难点之一仍是复发。大量研究表明CA患者存在外周血T淋

巴细胞亚群和NK细胞异常及细胞因子产生失衡所引起的一系列细胞免疫反应抑制效应,同时CA患者存在着全身和局部单核-巨噬细胞功能障碍,而这种功能下降是导致CA患者淋巴细胞功能缺陷的重要原因。CA患者的细胞免疫功能抑制与长期感染HPV或多次复发有关。潜伏感染灶的存在也是复发的重要原因。众多的研究发现HPV的多态性造成致病的多样性,HPV基因序列变异是否与复发有关仍存在疑问。HPV的品系多,各种型的基因序列又易变异,这更增加了其致病的复杂性。Choo等^[93]在对17例台北宫颈癌病例中分离出的HPV-16E6基因变异情况分析后发现,HPV16E6基因变异与CIN分化程度有关。对于HPV6L1基因的研究也表现了相似的结果,日本学者Suzuki^[94]发现2例致复发性喉部乳头瘤的HPV6在L1ORF有大片段的基因缺失,并发现缺失片段影响了病毒L1区的核定位信号(NLS),而后者是协助L1蛋白和L2蛋白在核内组装成完整病毒颗粒的重要因素。因此作者认为不稳定的病毒颗粒可能会逃避机体的免疫反应,导致乳头瘤的复发。有研究者采用实时荧光定量PCR仪进行HPV6/11和HPV16/18DNA的扩增,计算HPVDNA含量。研究发现复发性CA患者的人乳头瘤病毒DNA载量显著高于初发性CA患者。这进一步提示了CA复发可能与病毒逃避免疫监视有关。我们测序结果显示复发患者L1基因并没有发生大片的缺失。却有7处碱基的突变导致了3处编码氨基酸的改变,有研究者通过重叠多肽法检测L1蛋白的抗原表位发现其抗原表位主要位于111~130、174~185、261~280氨基酸处,而362~381为L1/L2所共有的抗原表位。本研究发现此复发患者HPVL1基因碱基突变仅6598处变异落在261~291区域,而且本处的变异为同义突变。这提示病毒L1基因序列突变导致的编码氨基酸改变并未出现在抗原表位。复发患者HPVL1基因序列改变引起的编码氨基酸改变,在L1蛋白生物学方面的影响仍需进一步研究证实。这些改变在疾病的复发中扮演角色仍需进一步研究确定。

结 论

1. 原核表达体系是目前最常用的工业化制备蛋白体系，具有成本低、产量高、易于制备和纯化等众多优点。本实验成功构建了原核重组质粒—pQE40 HPV6b L1，为在原核表达体系中表达 HPV6b L1 蛋白奠定了基础。
2. 本研究通过对广州地区一例尖锐湿疣复发患者感染 HPV6 病毒 L1 基因测序，发现其组织来源与 HPV6b 型更相近。
3. 对复发尖锐湿疣患者病变处 HPV L1 基因变异情况分析发现，下游基因序列变异程度更大。序列变异主要集中和接近在 Wanderly 的 R3 和林少洪的 SR4 区间。
4. 复发尖锐湿疣患者病变处 HPV 病毒 L1 基因改变并未导致 L1 蛋白出现抗原表位的改变，序列变异在疾病复发中发挥作用仍需进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Hoang P, Li L, Sibille C, Dalton H, Marbaix E, Kartheuser A, Geubel A, Vanheuverzwyn R. Perianal condylomata acuminata. *Acta Gastroenterol Belg*, 1996, 59 (3): 214-216.
- [2] 邵长庚, 符玉良. 妊娠妇女的性传播疾病. *中华皮肤科杂志*, 1997, 30(3): 149-152.
- [3] Bosch FX, de Sanjosé S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2003, (31): 3-13.
- [4] Cates W Jr. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. American Social Health Association Panel, *Sex Transm Dis*, 1999, 26 (4 Suppl): S2-7.
- [5] Kulasingam SL, Hughes JP, Kiviat NB, Mao C, Weiss NS, Kuypers JM, Koutsky LA. Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *JAMA*, 2002, 288 (14): 1749-1757.
- [6] Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Seagar AL, Arends MJ, Moore C, Gilkisson G, McGoogan E. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol*, 2004, 57(1): 68-72.
- [7] Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis*, 1994, 170(5): 1077-1085.
- [8] 郑道城, 陈永锋, 刁臻兴, 阮伟雄. 广东省1996~2000年性病流行病学分析. *岭南皮肤性病学杂志*, 2002, 9(1): 51-52.
- [9] 吴晓庆. 尖锐湿疣的治疗. *第一军医大学分校学报*, 2001, 24 (1): 51-53.
- [10] Lowy DR, Howley PM. Papillomaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*, 4th edn. New York: Lippincott Williams and Wilkins, 2001: 2231-2264.
- [11] Galloway DA. Biology of genital human papillomaviruses. In: Holmes KK, Sparling PF, Mardh PA, et al, eds. *Sexually transmitted diseases*, 3rd edn. New York: McGraw Hill, 1999: 335 - 346.
- [12] Koutsky LA, Kiviat NB. Genital human papillomaviruses. In: Holmes KK, Sparling PF, Mardh PA, et al, eds. *Sexually transmitted diseases*, 3rd edn. New York: McGraw Hill, 1999: 347 - 360.
- [13] Zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1288 (2): F55-78.
- [14] Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 2003, 348(6): 518-527.
- [15] Lusk M, Fontane E. Formulation of the complex of bovine papillomavirus E1 and E2 proteins is modulated by E2 phosphorylation and depends upon sequences within the carboxyl terminus of E1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(14): 6363-6367.
- [16] Berg M, Stenlund A. Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins. *J Virol*, 1997, 71(5): 3853-3863.
- [17] Doorbar J, Evans HS, Coneror I, Crawford LV, Gallimore PH. Analysis of HPV-1 E4 gene expression using epitope-defined antibodies. *EMBO J*, 1988, 7 (3): 825-833.

- [18] Roberts S, Ashmole I, Rookes SM, Gallimore PH. Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1--E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *J Virol*, 1997, 71 (5): 3554-3562.
- [19] Crusius K, Auvinen E, Alonso A. Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene*, 1997, 15(12): 1437-1444.
- [20] Hwang ES, Nottoli T, Dimaio D. The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology*, 1995, 211 (1):227-233.
- [21] Sherman L, Itzhaki H, Jackman A, Chen JJ, Koval D, Schlegel R. Inhibition of serum-and calcium-induced terminal differentiation of human keratinocytes by HPV 16 E6: study of the association with p53 degradation, inhibition of p53 transactivation, and binding to E6BP. *Virology*, 2002, 292 (2):309-320.
- [22] Beer-Romero P, Glass S, Rolfe M. Antisense targeting of E6AP elevates p53 in HPV-infected cells but not in normal cells. *Oncogene*, 1997, 14 (5):595-602.
- [23] Syrjänen SM, Syrjänen KJ. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann Med*, 1999, 31 (3):175-187.
- [24] Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J*, 1991, 60 (6):1445-1456.
- [25] Sapp M, Volpers C, Müller M, Streeck RE. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J Gen Virol*, 1995, 76 (Pt 9):2407-2412.
- [26] Stünkel W; Bernard HU. The chromatin structure of the long control region of human papillomavirus type 16 represses viral oncoprotein expression. *J Virol*, 1999, 73(3):1918-1930
- [27] Laimins LA. Regulation of transcription and replication by human papillomavirus. In McCance DJ (ed.) . *Human Tumor Viruses*. ASM press, Washington, 1998, 201--223.
- [28] Nead MA and McCance DJ. Activities of the Transforming proteins of human papillomaviruses. In McCance DJ (ed.) , *Human Tumor Viruses*. ASM press , Washington, 1998, 225--251.
- [29] 郝飞, 叶庆份. 人类乳头瘤病毒感染局部细胞免疫缺陷的形成机制. 国外医学皮肤性病学分册, 2001, 27 (3):163--165.
- [30] Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA . Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*, 1997, 71 (3):2449-2456.
- [31] Roberts S, Ashmole I, Gibson LJ, Rookes SM, Barton GJ, Gallimore PH. Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells. *J Virol*, 1994, 68(10):6432-6445.
- [32] Phelps WC, Alexander KA. Antiviral therapy for human papillomaviruses: rational and prospects. *Ann Intern Med*, 1995, 123(5):368-382.
- [33] Sterlinko Grm H, Banks L. HPV proteins as targets for therapeutic intervention. *Antivir*

- Ther. 2004, 9 (5):665-678.
- [34] Wilson VG, Rosas-Acosta G. Molecular targets for papillomavirus therapy. *Curr Drug Targets Infect Disord*, 2003, 3 (3):221-239.
- [35] Lin YL, Borenstein LA, Ahmed R, Wettstein FO. Cottontail rabbit papillomavirus L1 protein based vaccines: protection is achieved only with a full-length, nondenatured product. *J Virol*, 1993, 67 (7): 4154-4162.
- [36] Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, Frazer IH. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*, 1991, 185 (1):251-257
- [37] Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*, 1993, 67 (1):315-322.
- [38] Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Dürst M, Gissmann L, Lowy DR, Schiller JT. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol*, 1993, 67 (12):6929-6936.
- [39] Sasagawa T, Pushko P, Steers G, Gschmeissner SE, Hajibagheri MA, Finch J, Crawford L, Tommasino M. Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6 and type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology*, 1995, 206 (1): 126-135.
- [40] Nardelli-Haeffliger D, Roden RB, Benyacoub J, Sahli R, Kraehenbuhl JP, Schiller JT, Lachat P, Potts A, De Grandi P. Human papillomavirus type 16 virus-like particles expressed in attenuated *Salmonella typhimurium* elicit mucosal and systemic neutralizing antibodies in mice. *Infect Immun*, 1997, 65 (8):3328-3336.
- [41] Rose RC, Lane C, Wilson S, Suzich JA, Rybicki E, Williamson AL. Oral vaccination of mice with human papillomavirus virus-like particles induces systemic virus-neutralizing antibodies. *Vaccine* 1999, 17 (17):2129-2135.
- [42] Russell MW, Moldoveanu Z, White PL, Sibert GJ, Mestecky J, Michalek S M. Salivary, nasal, genital, and systemic antibody responses in monkeys immunized intranasally with a bacterial protein antigen and the cholera toxin β subunit. *Infect Immun*, 1996, 64 (4):1272-1283.
- [43] Balmelli C, Roden R, Potts A, Schiller J, De Grandi P, Nardelli-Haeffliger D. Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 virus-like particles elicits neutralizing antibodies in mucosal secretions. *J Virol*, 1998, 72 (10):8220-8229.
- [44] Hagensee ME, Carter JJ, Wipf GC, Galloway DA. Immunization of mice with HPV vaccinia virus recombinants generates serum IgG, IgM, and mucosal IgA antibodies. *Virology*, 1995, 206 (1):174-182.
- [45] Lowe RS, Brown DR, Bryan JT, Cook JC, George HA, Hofmann KJ, Hurni WM, Joyce JG, Lehman ED, Markus HZ, Neeper MP, Schultz LD, Shaw AR, Jansen KU. Human papillomavirus type 11 (HPV-11) neutralizing antibodies in the serum and genital mucosal secretions of African green monkeys immunized with HPV-11 virus-like particles expressed in yeast. *J Infect Dis*, 1997, 176 (5): 1141-1145.
- [46] Harro CD, Pang YY, Roden RB, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, Mast TC, Robinson R, Murphy BR, Karron RA, Dillner J, Schiller JT, Lowy DR. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl*

- Cancer Inst, 2001, 93 (4):284-292.
- [47] Brown DR, Bryan JT, Schroeder JM, Robinson TS, Fife KH, Wheeler CM, Barr E, Smith PR, Chiacchierini L, DiCello A, Jansen KU. Neutralization of human papillomavirus type 11 (HPV-11) by serum from women vaccinated with yeast-derived HPV-11 L1 virus-like particles: correlation with competitive radioimmunoassay titer. *J Infect Dis*, 2001, 184 (9): 1183-1186.
- [48] Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM, Jansen KU. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med*, 2002, 347 (21):1645-1651.
- [49] Ling M, Kanayama M, Roden R, Wu TC. Preventive and therapeutic vaccines for human papillomavirus-associated cervical cancers. *J Biomed Sci*, 2000, 7 (5):341-356.
- [50] Campo MS, Grindlay GJ, O'Neil BW, Chandrachud LM, McGarvie GM, Jarrett WF. Prophylactic and therapeutic vaccination against a mucosal papillomavirus. *J Gen Virol*, 1993, 74 (Pt 6): 945-953.
- [51] Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res*, 1998, 58 (4):829-833.
- [52] Gao L, Chain B, Sinclair C, Crawford L, Zhou J, Morris J, Zhu X, Stauss H. Immune response to human papillomavirus type 16 E6 gene in a live vaccinia vector. *J Gen Virol*, 1994, 75 (Pt 1): 157-164.
- [53] Bournsnel ME, Rutherford E, Hickling JK, Rollinson EA, Munro AJ, Rolley N, McLean CS, Borysiewicz LK, Vousden K, Inglis SC. Construction and characterisation of a recombinant vaccinia virus expressing human papillomavirus proteins for immunotherapy of cervical cancer. *Vaccine*, 1996, 14 (16):1485-1494.
- [54] Meneguzzi G, Cerni C, Kieny MP, Lathe R. Immunization against human papillomavirus type 16 tumor cells with recombinant vaccinia viruses expressing E6 and E7. *Virology*, 1991, 181 (1):62-69.
- [55] Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, Wu TC. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res*, 1996, 56 (1):21-26.
- [56] Ji H, Chang EY, Lin KY, Kurman RJ, Pardoll DM, Wu TC. Antigen-specific immunotherapy for murine lung metastatic tumors expressing human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Int J Cancer*, 1998, 78 (1):41-45.
- [57] Chen CH, Suh KW, Ji H, Choti MA, Pardoll DM, Wu TC. Antigen-specific immunotherapy for HPV-16 E7-expressing tumors grown in liver. *J Hepatol*, 2000, 33 (1): 91-98.
- [58] Borysiewicz LK, Fiander A, Nimako M, Man S, Wilkinson GW, Westmoreland D, Evans AS, Adams M, Stacey SN, Bournsnel ME, Rutherford E, Hickling JK, Inglis SC. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet*, 1996, 347 (9014):1523-1527.
- [59] Adams M, Borysiewicz L, Fiander A, Man S, Jasani B, Navabi H, Lipetz C, Evans AS, Mason M. Clinical studies of human papilloma vaccines in pre-invasive and invasive cancer. *Vaccine*, 2001, 19 (17-19):2549-2556.
- [60] Warnier G, Duffour MT, Uyttenhove C, Gajewski TF, Lurquin C, Haddada H, Perricaudet M, Boon T. Induction of a cytolytic T-cell response in mice with a recombinant adenovirus

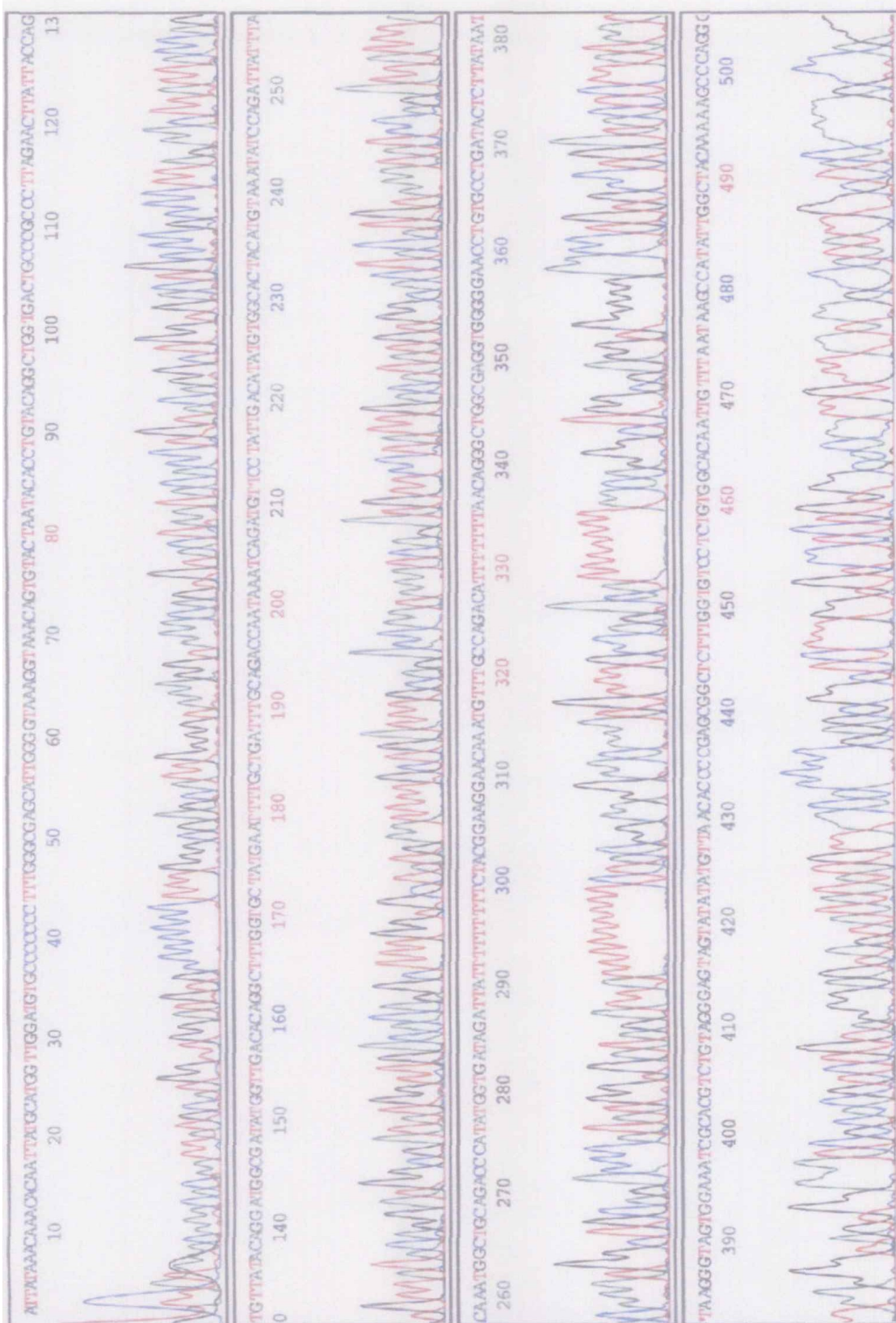
- coding for tumor antigen P815A. *Int J Cancer*, 1996, 67 (2):303-310.
- [61] Chen PW, Wang M, Bronte V, Zhai Y, Rosenberg SA, Restifo NP. Therapeutic antitumor response after immunization with a recombinant adenovirus encoding a model tumor-associated antigen. *J Immunol*, 1996, 156 (1):224-231.
- [62] Zhai Y, Yang JC, Kawakami Y, Spiess P, Wadsworth SC, Cardoza LM, Couture LA, Smith AE, Rosenberg SA. Antigen-specific tumor vaccines. Development and characterization of recombinant adenoviruses encoding MART1 or gp100 for cancer therapy. *J Immunol*, 1996, 156 (2):700-710.
- [63] He Z, Wlazlo AP, Kowalczyk DW, Cheng J, Xiang ZQ, Giles-Davis W, Ertl HC. Viral recombinant vaccines to the E6 and E7 antigens of HPV-16. *Virology*, 2000, 270 (1):146-161.
- [64] Gunn GR, Zubair A, Peters C, Pan ZK, Wu TC, Paterson Y. Two *Listeria monocytogenes* vaccine vectors that express different molecular forms of human papilloma virus-16 (HPV-16) E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by HPV-16. *J Immunol*, 2001, 167 (11):6471-6479.
- [65] Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP, Minnaar RP, de Jongh BM, Drijfhout JW, ter Schegget J, Melief CJ, Kast WM. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol*, 1993, 23 (9):2242-2249.
- [66] Steller MA, Gurski KJ, Murakami M, Daniel RW, Shah KV, Celis E, Sette A, Trimble EL, Park RC, Marincola FM. Cell-mediated immunological responses in cervical and vaginal cancer patients immunized with a lipidated epitope of human papillomavirus type 16 E7. *Clin Cancer Res*, 1998, 4 (9):2103-2109.
- [67] Yoon H, Chung MK, Min SS, Lee HG, Yoo WD, Chung KT, Jung NP, Park SN. Synthetic peptides of human papillomavirus type 18 E6 harboring HLA-A2.1 motif can induce peptide-specific cytotoxic T-cells from peripheral blood mononuclear cells of healthy donors. *Virus Res*, 1998, 54 (1):23-29.
- [68] Schirmbeck R, Böhm W, Melber K, Reimann J. Processing of exogenous heat-aggregated (denatured) and particulate (native) hepatitis B surface antigen for class I-restricted epitope presentation. *J Immunol*, 1995, 155 (10): 4676-4684.
- [69] Thompson HS, Davies ML, Holding FP, Fallon RE, Mann AE, O'Neill T, Roberts JS. Phase I safety and antigenicity of TA-GW: a recombinant HPV6 L2E7 vaccine for the treatment of genital warts. *Vaccine*, 1999, 17 (1):40-49.
- [70] Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol*, 1997, 15:617-648.
- [71] Lukas J, Müller H, Bartkova J, Spitkovsky D, Kjerulff AA, Jansen-Dürr P, Strauss M, Bartek J. DNA tumor virus oncoproteins and retinoblastoma gene mutations share the ability to relieve the cell's requirement for cyclin D1 function in G1. *J Cell Biol*, 1994, 125 (3): 625-638.
- [72] Hsu KF, Hung CF, Cheng WF, He L, Slater LA, Ling M, Wu TC. Enhancement of Sindbis virus self-replicating RNA vaccine potency by linkage of *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 gene to an antigen gene. *Gene Ther*, 2001, 8 (5):376-383.
- [73] Hsu KF, Hung CF, Cheng WF, He L, Slater LA, Ling M, Wu TC. Enhancement of suicidal

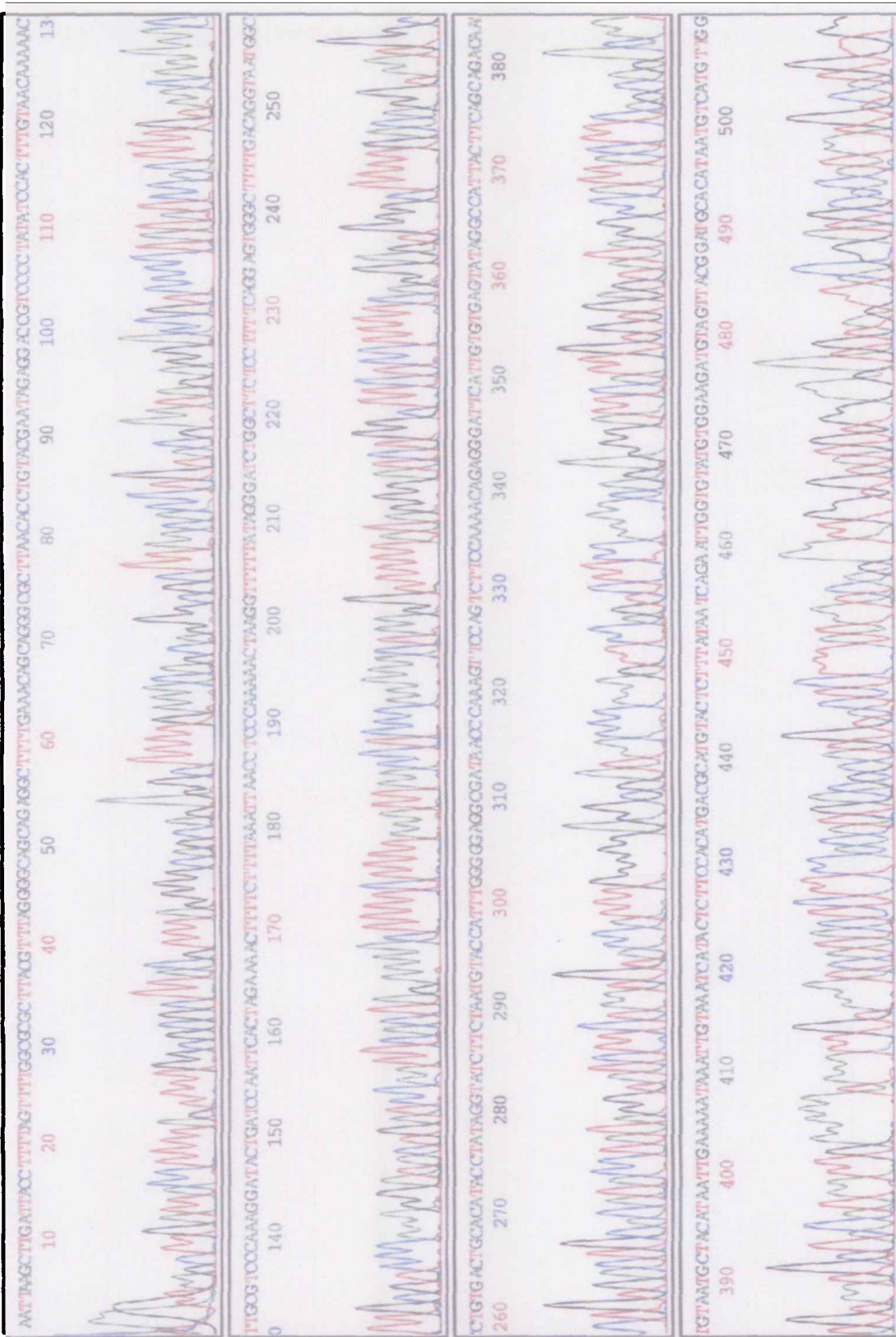
- DNA vaccine potency by linking *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 to an antigen. *Gene Ther*, 2001, 8 (5): 376-383.
- [74] Greenstone HL, Nieland JD, de Visser KE, De Bruijn ML, Kirnbauer R, Roden RB, Lowy DR, Kast WM, Schiller JT. Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95 (4):1800-1805.
- [75] Rudolf MP, Fausch SC, Da Silva DM, Kast WM. Human dendritic cells are activated by chimeric human papillomavirus type-16 virus-like particles and induce epitope-specific human T cell responses in vitro. *J Immunol*, 2001, 166 (10):5917-5924.
- [76] Shi W, Bu P, Liu J, Polack A, Fisher S, Qiao L. Human papillomavirus type 16 E7 DNA vaccine: mutation in the open reading frame of E7 enhances specific cytotoxic T-lymphocyte induction and antitumor activity. *J Virol*, 1999, 73 (9):7877-7881.
- [77] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, 239 (4839):487 - 491.
- [78] Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnürch HG, zur Hausen H: Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80 (2):560-563.
- [79] Brown DR, Bryan JT, Cramer H, Fife KH. Analysis of human papillomavirus types in exophytic condylomata acuminata by hybrid capture and Southern blot techniques. *J Clin Microbiol*, 1993, 31 (10):2667-2673.
- [80] 赵虎, 郑英, 刘玉玲. 人乳头瘤病毒基因芯片研究现状. 国外医学妇产科学分册, 2004, 31 (6) : 350-352
- [81] Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med*, 1988, 167 (1):225-230.
- [82] Rodu B, Christian C, Synder RC, Ray R, Miller DM . Simplified PCR-based detection and typing strategy for human papillomaviruses utilizing a single oligonucleotide primer set. *Biotechniques*, 1991, 10 (5):632-637.
- [83] Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A. Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res*, 1991, 82 (5):524-531.
- [84] Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 1991, 72 (Pt 5): 1039-1044.
- [85] de Villiers EM. Papillomavirus and HPV typing. *Clin Dermatol*, 1997, 15(2):199-206
- [86] Salunke DM, Caspar DL, Garcea RL. Self-assembly of purified polynavirus capsid protein VP1. *Cell*, 1986, 46(6):895-904
- [87] Guo Shuyuan, Zhao Zhonghua, Ling Hong, Guo Cailing, Zhang Fengmin, Lin Daohong, Huang Jianlin, Gu Hongxi. Construction of Human Papillomavirus Type 16 Late Gene L1 Inducible Expression System for *E. coli*. *Journal of HARBIN medical university*, 1999, 33(1):17-21

- [88] Touze A, El Mehdaoui S, Sizaret PY, Mouglin C, Muñoz N, Coursaget P. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 16 variants affects yield of virus-like particles produced in an insect cell expression system. *J Clin Microbiol*, 1998, 36 (7):2046-2051.
- [89] Jochmus I, Schäfer K, Faath S, Müller M, Gissmann L. Chimeric virus-like particles of the human papillomavirus type 16 (HPV 16) as a prophylactic and therapeutic vaccine. *Arch Med Res*, 1999, 30 (4):269-274
- [90] Caparrós-Wanderley W, Savage N, Hill-Perkins M, Layton G, Weber J, Davies DH. Intratype sequence variation among clinical isolates of the human papillomavirus type 6 L1 ORF: clustering of mutations and identification of a frequent amino acid sequence variant. *J Gen Virol*, 1999, 80 (Pt 4):1025-1033.
- [91] 洪少林, 王家璧, 李平川, 周玲, 司静懿, 许雪梅, 郭秀婵, 曾毅. 尖锐湿疣病变的人乳头瘤病毒6 型L1 序列多态性分析. *病毒学报* 2002, 18 (2) 102—107
- [92] 王淼, 张明策, 许雪梅, 陈连凤, 宋国人. 乳头瘤病毒6 型基因组晚期区序列分析. *中国医学科学院学报*, 2001, 23 (6): 568—572
- [93] Choo KB, Wang TS, Huang CJ. Analysis of relative binding affinity of E7-pRB of human papillomavirus 16 clinical variants using the yeast two-hybrid system.. *J Med Virol*, 2000, 61 (3):298-302.
- [94] Suzuki T, Tomita Y, Nakano K, Shirasawa H, Simizu B. Deletion in the L1 open reading frame of human papillomavirus type 6a genomes associated with recurrent laryngeal papilloma. *J Med Virol*, 1995, 47 (3):191-197.

附录一 缩略词表

CA	condyloma acuminatum	尖锐湿疣
HPV	human papillomavirus	人类乳头状瘤病毒
STD	sexually transmitted disease	性传播疾病
ORFs	open reading frames	开放读码框架
VLPs	virus like particles	病毒样颗粒
CRPV	cottontail rabbit papillomavirus	棉尾兔乳头瘤病毒
vV	Vaccinia viruses	痘病毒
AdV	adenoviruses	腺病毒
DC	dendritic cell	树突状细胞
APCs	antigen-presenting cells	抗原呈递细胞
Tris	Tris(hydroxymethyl) aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
PBS	phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
LB medium	Luria-Broth medium	LB 培养基
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RE	restriction endonucleases	限制性核酸内切酶





附录三 氨基酸缩写及遗传密码表

中文名称	英文名称	符号与缩写	分子量	类 型
丙氨酸	Alanine	A 或 Ala	89.079	脂肪族类
精氨酸	Arginine	R 或 Arg	174.188	碱性氨基酸类
天冬酰胺	Asparagine	N 或 Asn	132.104	酰胺类
天冬氨酸	Aspartic acid	D 或 Asp	133.089	酸性氨基酸类
半胱氨酸	Cysteine	C 或 Cys	121.145	含硫类
谷氨酰胺	Glutamine	Q 或 Gln	146.131	酰胺类
谷氨酸	Glutamic acid	E 或 Glu	147.116	酸性氨基酸类
甘氨酸	Glycine	G 或 Gly	75.052	脂肪族类
组氨酸	Histidine	H 或 His	155.141	碱性氨基酸类
异亮氨酸	Isoleucine	I 或 Ile	131.160	脂肪族类
亮氨酸	Leucine	L 或 Leu	131.160	脂肪族类
赖氨酸	Lysine	K 或 Lys	146.17	碱性氨基酸类
蛋氨酸	Methionine	M 或 Met	149.199	含硫类
苯丙氨酸	Phenylalanine	F 或 Phe	165.177	芳香族类
脯氨酸	Proline	P 或 Pro	115.117	亚氨基酸
丝氨酸	Serine	S 或 Ser	105.078	羟基类
苏氨酸	Threonine	T 或 Thr	119.105	羟基类
色氨酸	Tryptophan	W 或 Trp	204.213	芳香族类
酪氨酸	Tyrosine	Y 或 Tyr	181.176	芳香族类
缬氨酸	Valine	V 或 Val	117.133	脂肪族类

附录四 参加学术活动及在学期间发表论文

学术活动:

1. 广东省医学会皮肤科分会主办“皮肤病与性传播疾病诊疗新进展学习班” (广州) 2003年11月
2. 中华医学会皮肤科分会和日本皮肤病学会主办“第七届中日皮肤病学术会议” (广州) 2002年12月
3. 广东省医学会皮肤科分会主办“第十次广东省皮肤性病学术会议” (广州) 2003年11月
4. “第四届中韩皮肤病会议, 第二届中英皮肤病会议, 暨2004年全国中西医结合皮肤性病学术会议” (广州) 2004年11月

研究生期间发表的论文:

1. 益康唑 / 曲安奈德霜治疗特应性皮炎临床疗效观察, 广东医学 2003, 24 (9): 915-916
2. 特应性皮炎自身免疫的研究进展。国外医学皮肤性病学分册, 2004, 30(5): 29-31。
3. 卡介菌多糖核酸注射液治疗慢性荨麻疹 31 例临床疗效观察。中国现代医药 2004, 3 (12): 15-17。
4. 广州地区复发尖锐湿疣患者 HPV L1 基因原核表达质粒的构建及鉴定, 广东医学, 2005, 26 (5): 33-34

致 谢

时光抹不去永恒的记忆，回首三年来在暨南园的点点滴滴，留下的尽是美好的回忆，心中充满感激之情！至此，深深感谢恩师邓列华教授，三年来对我的学业和生活给予了无尽的关怀，导师的引导使我走上科研的道路，他严谨的学术作风、活跃的科研思维和孜孜不倦的敬业精神促使我不断向前，不敢有丝毫懒惰。三年来我取的点滴进步都凝聚了导师大量的心血。导师广博的知识、开拓创新的精神给我留下了深刻的印象，将使我受益终身。

衷心感谢广东省自然科学基金委员会及暨南大学自然科学基金委员会对本课题的大力资助。

衷心感谢林泽、赵永铿、郭秀枝、蔡小嫦、张宏教授，谢明、金泓副主任医师、易敏、陶玫主治医师，他们丰富的学识和造诣，严谨的治学态度，言传身教地影响着我，也必将使我在日后的工作中受益匪浅。

衷心感谢赵刚师兄、徐爱莉师姐对我实验和临床工作的帮助。

衷心感谢在学习、工作和生活中关心、帮助我，给予我莫大支持的李姝师姐和同窗李垣君。

感谢医学院中心实验室廖继东主任、赵忻老师、马秀君老师，是他们在整个实验过程中给我提供优越的实验条件，以及力所能及的帮助，感谢李克俭、林幼娜、徐莹技师对我工作和实验的支持，感谢师弟、师妹给予的支持和帮助。

感谢父母在我读硕期间，一直为我灌输生活上爱的血液，叮嘱饮食起居，团结人，干好事，支持我一路走好，在此叩首盈泪而谢！

衷心感谢我的女友，为我的排版打印，不惜劳累，与我分忧共享快乐！

再回首，纵有千言万语，难表我心。谨祝关心我的老师、同学和家人们健康无恙，事事顺心如意！

胡云峰

2005年初夏于暨南园

复发性尖锐湿疣HPV6 L1基因原核表达质粒构建及序列分析

作者: [胡云峰](#)
学位授予单位: [暨南大学](#)

引用本文格式: [胡云峰](#) [复发性尖锐湿疣HPV6 L1基因原核表达质粒构建及序列分析](#)[学位论文]硕士 2005