

文章编号： 1005-8982(2012)27-0032-04

·临床论著·

宫颈癌患者 HPV16 型 L1 基因克隆及序列分析

王长奇¹,王 康²,陈燕萍¹,杨志华¹,罗 娜¹,周开良¹,程 利¹,罗艳香²,谢龙旭³
(1.湘雅萍矿合作医院 检验科,江西 萍矿 337000 2. 南昌大学第二附属医院,
江西 南昌 330000 3.广州中山大学生物工程研究中心 广东 广州 510275)

摘要 :目的 了解萍乡地方株 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,从宫颈脱落上皮细胞中提取 DNA,进行 PCR 扩增鉴定,将扩增的片段同 T- 载体连接,然后导入到大肠杆菌 DH-5α 中培养,提取质粒 DNA 进行测序。**结果** 测定的序列与标准基因序列(NC Sbjct 496)比较,萍乡地区宫颈癌感染的 HPV16 型 L1 基因同源性为 98.9%~99.6%,分别形成 5 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,但有 1 处由于核苷酸的丢失造成翻译的氨基酸也相应发生变化。**结论** 萍乡地方株 HPV16 L1 核酸有一定程度的变异,可能会造成 HPV16 L1 蛋白免疫原性的差异。此株改变也可能是本地区导致宫颈癌的主要原因。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了可靠实验依据。

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 : R737.33 **文献标识码** : A

The Cloning and Sequencing of HPV 16 L1 Gene of Cervical Cancer Patients

WANG Chang-qi¹, WANG Kang², CHEN Yan-ping¹, YANG Zhi-hua¹, LUO Na¹,
ZHOU Kai-liang¹, CHENG Li¹, LUO Yan-xiang², XIE Long-xu³
(1.Xiangya Pingkuang Cooperation Hospital, Pingkuang, Jiangxi 337000, P.R.China; 2.The Second
Affiliated Hospital To Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330000, P.R.China; 3.The Life
Sciences Center of SUN YAT-SEN University, Guangzhou, Guangdong 510275, P.R.China)

Abstract: [Objective] To study the character of HPV L1 gene from 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 DNA Star. **[Results]** Compared with standard L1 gene sequence (NC 001526), gene homology was 98.9%~99.6% 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 L 1 gene of HPV 16 obtained from the cervical carcinoma tissues in PINGXIANG 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。为了解萍乡地区宫颈癌患者

收稿日期 2011- 11- 02

HPV16 L1 基因结构特点和变异规律, 该院从宫颈分泌物标本 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 研究对象

采用本院体检和门诊住院患者, 共 9 人, 年龄在 35~75 岁之间, 平均年龄 58 岁。所有病例来自萍乡市内和萍乡周边地区。

1.2 样本采集和测定

妇产科医生对 9 人进行脱落细胞的取样, 样本集中送到湘雅萍矿合作医院 PCR 基因实验室。

1.3 仪器

人乳头瘤病毒核酸扩增检测试剂盒由潮州凯普生物化学有限公司提供, PCR 仪采用 ABI 公司 9700 型号。

1.4 标本采集及处理

暴露宫颈, 用棉拭子擦去宫颈口多余分泌物, 用取样刷置于宫颈口顺时针方向旋转 5~6 周以获取

足量的宫颈脱落上皮细胞。将取样后的宫颈刷放入含有细胞脱洗保存液的加盖微量离心管 (1.5 mL) 中, 22.0℃ 保存 <3 个月。标本处理时充分洗脱宫颈刷上样本, 留取含脱落宫颈细胞的洗脱液。

1.5 参照试剂盒说明书

取上述液体 0.5 mL, 14 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 利用试剂盒提取标本 DNA, 并在 24μ L 反应体系中行 PCR 扩增。PCR 反应条件为 20℃ 10 min, 95℃ 预变性 9 min, 95℃ 20 s→55℃ 30 s→72℃ 30 s 共 40 个循环, 72℃ 延伸 5 min。

1.6 将扩增的片段同 T- 载体连接, 然后导入到大肠杆菌 DH- 5α 中培养, 提取质粒 DNA, 寄到 TAKARA 公司进行测序。

2 结果

从本文发现在 11 例浸润宫颈癌, 发现感染 HPV- 16 型有 7 例, 感染 HPV- 33 型 3 例 (混合型感染 2 例, 单一感染 1 例)。在 11 例 CIN 级中 HPV- 16 型有 10 例 (混合型感染 3 例单一感染 7

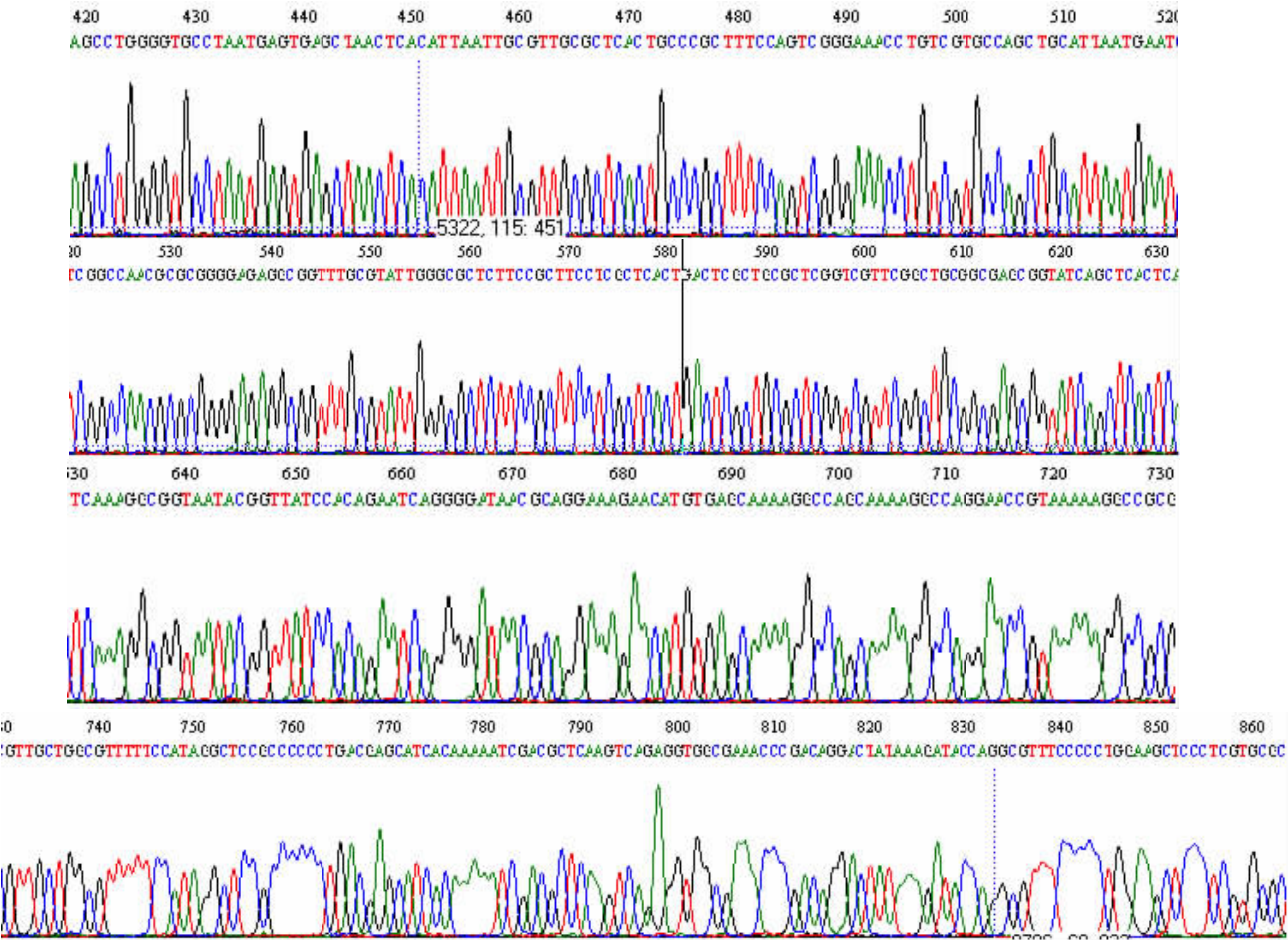


图 1 HPV 16 基因测序结果
• 33 •

例) 感染 HPV- 33 型 2 例 (混合型感染)。感染 HPV- 31 型 1 例 (单一感染)。作者取浸润宫颈癌 7 例 ,CIN 级中 2 例的宫颈分泌物标本 ,进行 DNA 中扩增 L1 基因片段 ,并进行克隆和测序分析 ,根据 NCBI 网站上公布的 GENBANK 数据库 ,利用 BLAST 工具将 9 个样本的序列同相应的标准株序列进行比对 ,9 个 HPV16 样本同标准株的同源性分别为 :①99.3% ;②98.9% ;③99.4% ;④99.6% ;⑤98.8% ;⑥99.5% ;⑦99.1% ;⑧98.5% ;⑨99.6% ,测序分析结果见图 1。

宫颈分泌物标本中分离的 9 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 98.9%~99.6%的同源性

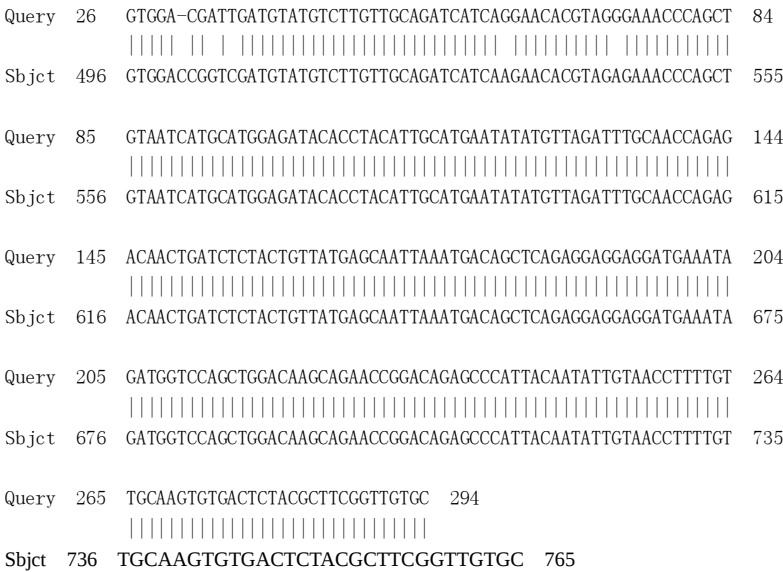


图 2 HPV16 江西株 DNA 与 Sbjct HPV16 株序列比较

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^[4]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 6 695 因为核苷酸的突变导致氨基酸由 T→P ,其余均为同义变异。PANDE 等^[5]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

HPV16 型 L1 基因分别形成 5 种突变模式 ,HPV16 型 L1 基因第 6 412(1/5) 、6 415(1/5) 、6 417(1/5) 、6 444(1/5) 、和 6 455(1/5) 位发生点突变。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 5 处点突变现象 ,其中所有的标本 L1 基因在第 6 417(其编码的氨基酸由 s→l) 6 444(其编码的氨基酸由 k→R) 6 455 (其编码的氨基酸由 T→A) 处碱基均发生突变 ,其编码的氨基酸发生改变。L1 基因在 6 412 核苷酸丢失造成翻译的氨基酸也相应发生丢失变化称为地方株(jx 株) ,L1 基因在第 6 415(其编码的氨基酸由 R→R) 发生改变为同义突变。

6 906 和第 6 924 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 6 903 与 6 905 间 ,地方株插入了 CAT 3 个核苷酸 (丝氨酸 ,S) ,而在 6 954 至 6 956 间缺失了 GAT(天门冬氨酸 ,D)^[6] ,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 6 901 与 6 903 间也插入了 CAT(S) ,6 949~6 951 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 6 901~6 903 处插入一个 CAT ,而在 6 949~6 951 处缺失了 GAT^[8]。温州地区^[9]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 ,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。

为了解萍乡地区 HPV16 L1 的基本情况 ,实验人员设计了跨越 HPV16 L1 基因的一对特异引物 ,从宫颈分泌物标本提取的 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 Sbjct)进行比对 ,发现萍乡地方株 L1 基因序列变异存在 5 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 1 处核苷酸的改变位于密码子第 3 位 ,且为同义突变 ,故未影响氨基酸的改变。还有一处 L1 基因在 6 412 核苷酸丢失造成翻译的氨基酸也相应发生丢失变化 ,称为萍乡株 (PX 株)。此株改变可能是本地区导致宫颈癌的主要原因。

该研究中发现 ,11 例浸润宫颈癌发现感染 HPV- 16 型有 7 例 ,在 11 例 CIN 级中 HPV- 16 型有 10 例 (混合型感染 3 例 ,单一感染 7 例 ,) 感染 HPV- 16 型占 77.3%。高于 50% 的宫颈癌患者肿瘤组织的 DNA 中检测到该型别的报道^[2]说明 HPV- 16 是本地区引起宫颈癌的主要病因。在 HPV16 9 株中 , HPV16 同标准株相比 ,变异都在 2% 之内 ,也就是说同源性在 98% 以上。

结果提示我省地方株 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了理论依据。

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]. 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]. 中国麻风皮肤杂志, 2005, 6(21): 445- 447.

[6] GAO H, HUANG ZF, XU XM, et al. The cloning and sequencing of human papillomavirus 16 E7 gene in Yangzhou city [J]. China Journal of Leprosy and Skin Diseases, 2005, 6 (21): 445- 447. Chinese

[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.

[7] MA ZH, ZHANG FC, MEI XD, et al. Mutations of human papillomavirus (HPV) 16 type L1 genes from cervical carcinoma biopsies in Southern Xinjiang Uygur women [J]. Nat Med J China, 2004, 84(12): 987- 991. Chinese

[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.

[8] WANG LL, SONG GX, CHEN LF, et al. Cloning of human papillomavirus type 16 L1 gene from Bowen's disease and its sequence analysis [J]. Basic Medical and Clinics, 2000, 20 (2): 17- 21. Chinese

[9] 陈 俊, 董海艳, 朱珊丽, 等. 温州地方株 HPV16 型 L1 基因多态性及蛋白特性分析 [J]. 温州医学院学报, 2009, 39(6): 538- 545.

[9] CHEN J, DONG HY, ZHU SL, et al. Analysis of L1 gene polymorphism and L1 protein property of HPV16 types in cervical carcinoma in Wenzhou [J]. Journal of Wenzhou Medical College, 2009, 39(6): 538- 545. Chinese