

- [7] Swan DC , Tucker RA , Holloway BP, *et al*. A sensitive, type-specific, fluorogenic probe assay for detection of human papillomavirus DNA. J Clin Microbiol, 1997, 35(4): 886-891 .
- [8] Mast EE, Alter MJ, Holland PV, *et al*. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. Hepatology, 1998, 27 (3): 857-861.
- [9] 庄辉, 毕胜利, 王佑春等. 我国戊型肝炎研究. 北京大学学报(医学版), 2002, 34(5): 434-439.

温州地区人乳头瘤病毒(HPV)6 和

11 型结构蛋白 L1 基因多态性及蛋白特性分析

朱珊丽 欧 琴 王鹏飞 石朝辉 陈 俊 张丽芳

温州医学院分子病毒与免疫研究所, 微生物学与免疫学教研室 (325053)

【摘要】 目的:调查温州地区尖锐湿疣组织 HPV6 和 11 型感染情况,分析其 L1 基因多态性及蛋白特性变化,为基因工程重组 L1 蛋白疫苗的应用提供理论依据。**方法:**采用 HPV6b 和 11 型 L1 基因特异性引物对 31 份温州地区尖锐湿疣组织标本进行 PCR 扩增鉴定,并各取 7 份阳性 PCR 产物直接测序,用 Vector NTI 8.0 和 DNASTar 软件分析 HPV6b 和 11 型 L1 基因多态性及蛋白特性变化。**结果:**31 份标本中, HPV6b 和 11 型阳性率分别为 35.5%和 45.2%。与标准基因序列比较, HPV6b 型 L1 基因分别形成 5 种突变模式, 同源率为 99.8%~99.9%; HPV 11 型 L1 基因形成 6 种突变模式, 同源率为 99.7%~99.9%。 HPV6b 型 L1 基因第 5929(1/7)、6256(1/7)、6598(7/7)、7099(4/7)和 7250(1/7) 位发生突变; HPV11 型 L1 基因第 6028(7/7)、6214(1/7)、6514(2/7)、6589(1/7)、6607(7/7)和 7045(2/7) 位发生突变。 HPV6b 型 L1 基因中仅第 7250 位碱基突变引起所编码氨基酸的变异(S→P),但其编码蛋白在亲水性、表面可及性及抗原性上与标准株氨基酸序列无明显变化; HPV11 型 L1 基因的碱基突变均为无义突变,所编码氨基酸与标准株完全一致。**结论:** HPV6b 和 11 型是温州地区尖锐湿疣的主要感染型别; HPV6b 和 11 型 L1 基因序列高度保守。

【关键词】 人乳头瘤病毒; 尖锐湿疣; L1 基因; 突变; 基因多态性

Analysis of L1 Gene Polymorphism and L1 Protein Property of HPV 6b and 11 Types in Condyloma Acuminate in Wenzhou

*Zhu shan-li, i Ou Qin, Wang Peng-fei, Shi Zhao-hui, , Chen Jun, Zhang li-fang**

【Abstract】 Objective: To study the viral types of Human Papillomavirus (HPV) in condylomata acuminate from Wenzhou area, and analyze changes of L1 gene polymorphism and protein property.
Methods: The tissue DNA was extracted from 31 biopsy specimens of condylomata acuminate. The L1 gene of HPV was amplified with PCR by 6b and 11 type specific primers, respectively. and seven positive

L1 PCR products of each type were identified by sequencing. At last, it was L1 gene polymorphism and protein property that were analysed by bio-software of Vector NTI 8.0 and DNASTar. **Results:** The result of PCR showed that the positive rate of HPV6 L1 was 35.5 % and the positive rate of HPV11 L1 was 45.2%. Compared with standard L1 gene sequence, five mutations were found including 5929(1/7)、6256(1/7)、6598(7/7)、7099(4/7) and 7250(1/7), and gene homology were 99.8% ~ 99.9% in HPV6b type; six mutations were found including 6028(7/7)、6214(1/7)、6514(2/7)、6589(1/7)、6607(7/7) and 7045(2/7), and gene homology were 99.7% ~ 99.9% in HPV11 type. Only one mutation produced protein variation in HPV6b type, but its protein was not found difference in hydrophilicity、surface probability and antigenic index compared with the standard L1 protein sequence; mutation all belong to nonsense mutation in HPV11 type. **Conclusion:** HPV6 and 11 type are predominant infected form in condylomata acuminata from Wenzhou area; and L1 gene are highly conserved sequence.

【Key words】 Human Papillomavirus ; Condylomata Acuminata ; L1 Genes ; Mutation ; Gene polymorphism

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是一类肿瘤相关病毒。HPV低危型别常常以6和11型为主, 主要引起良性瘤或疣, 如尖锐湿疣 (CA) 和扁平疣, 偶也可引起细胞恶性转化^[1]。L1基因是乳头瘤病毒重要的晚期基因, 可在杆状病毒-昆虫细胞表达系统中表达, 并能自发折叠成具有天然病毒立体结构的病毒样颗粒 (VLPs), 具有较强的抗原性和免疫原性, 可刺激B细胞产生中和抗体, 从而阻断病毒感染, 因而L1蛋白成为了基因工程疫苗研究的重要靶抗原。2006年6月, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 宣布, 世界上首个由HPV6、11、16和18型VLPs组成的四价HPV基因工程疫苗, 即Gardasil疫苗已获批准在美国上市, 可用于预防HPV 6、11、16和18型所引起的生殖器疣、癌前病变及宫颈癌^[2]。但在目前已分离的100多个型别中, 其感染型别往往存在地区差异^[3], 本研究对温州地区CA组织标本进行了HPV6和11型的型别鉴定及其L1基因序列全长测定, 对其基因多态性及蛋白特性进行分析, 为基因工程重组HPV L1蛋白疫苗的应用提供理论依据。

材料和方法

1. 标本 : 31份CA组织标本来源于温州医学院附属二院皮肤科就诊的患者, 均经临床和病理诊断确诊为CA。每份标本均无菌切取病变组织, -80℃保存备用。

2. 主要试剂 : PCR试剂、λDNA /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。

3. 方法

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 CA 组织标本 DNA。以GENEBANK 中报道的 HPV6b (收录号为 NC 001355) 和 HPV11 (收录号为 M 14119) L1 基因序列为标准序列, 共设计 8 条引物 (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

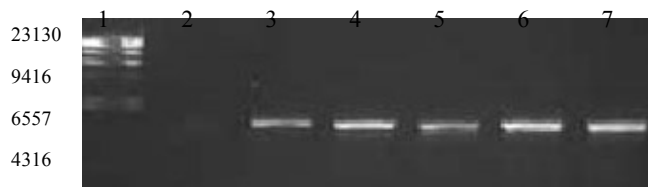
引物号	扩增HPV型别	序列 (5' ~ 3')	用途
P1	HPV6b 型	5'CGGGGATCCATGTGGCGGCCTAGCGACAGCAC3'	PCR 扩增，测序
P2	HPV6b型	5'CCCAAGCTTCCTTTTAGTTTTGGCGCG3'	PCR扩增，测序
P3	HPV6b型	5'GACACCTTTGGCACAACAG3'	测序
P4	HPV6b型	5'CCATTACCTGTCAAAAGCC3'	测序
P5	HPV11型	5'CCGGAATTCATGTGGCGGCCTAGCGAC3'	PCR扩增，测序
P6	HPV11型	5'CCCAAGCTTGCTTACTTTTTGGTTTTGGTACG3'	PCR扩增，测序
P7	HPV11型	5'CCTACCTCCAACCCTGTGC3'	测序
P8	HPV11 型	5'GAACCTGTGCCTGATGACCTG3'	测序

3.2 HPV L1基因扩增及型别鉴定：以所提标本DNA为模板，分别用HPV6b和11型特异性引物行PCR扩增。扩增参数为:95 5min；95 30s，55 30s，72 1min30s，30个循环；72 10min。PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

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，由北京三博远志生物技术有限公司用特异性引物进行L1基因全长序列测定。用Vector NTI 8.0和DNASTar软件对测序结果进行序列分析。

结果

1. HPV6b、11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，可见一约为1500bp的扩增条带,其大小与预计相符。31份标本中HPV6b、11型DNA阳性率为74.2%（21/31），其中HPV6b L1 DNA阳性率为35.5%（9/31），HPV11 L1阳性率为45.2%（12/31），HPV6b L1 +HPV11 L1阳性率为6.5%（2/31）。



1. DNA 分子标准物；2~7. 部分标本中HPV6bL1基因PCR产物

图1 PCR扩增CA组织中HPV6bL1基因

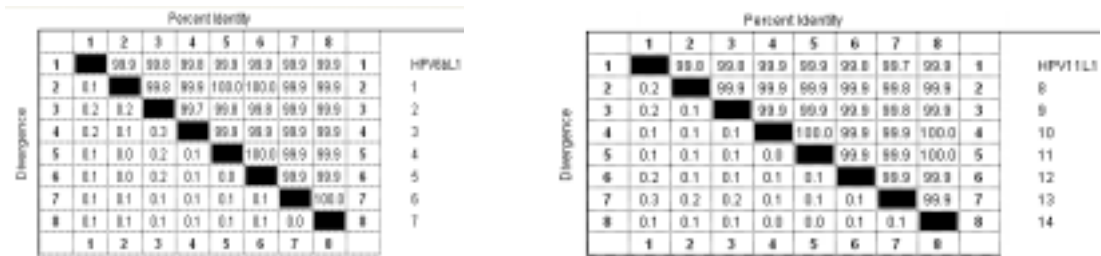
2 .HPV6b和11 L1基因全长序列测定及同源性分析 分别取7份HPV6b和11L1 PCR产物纯化后行全序列测定。与标准基因序列比较，用Vector NTI 8.0软件分析基因多态性（表2，3）；用DNASTar软件进行同源性分析（图2）。

表2 湿疣组织HPV6b 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	7	
5929	T	G	-	-	-	-	-	-	1/7(14.3)
6256	A	-	C	-	-	-	-	-	1/7(14.3)
6598	A	T	T	T	T	T	T	T	7/7(100)
7099	G	-	A	A	A	-	-	A	4/7(57.1)
7250	T	C	-	-	-	-	-	-	1/7(14.3)

表3 湿疣组织HPV11 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	7	
6028	C	T	T	T	T	T	T	T	7/7(100)
6214	T	-	-	-	-	C	-	-	1/7(14.3)
6514	A	-	G	-	T	-	-	-	2/7(28.6)
6589	G	A	-	-	-	-	-	-	1/7(14.3)
6607	C	T	T	T	T	T	T	T	7/7(100)
7045	G	-	-	-	A	A	-	-	2/7(28.6)



1-7: 7份HPV6b L1PCR产物测序标本；8-14: 7份HPV6b L1PCR产物测序标本

图2 14份HPV临床分离L1基因序列的同源性列表

3．HPV6b和11 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，仅一例标本的HPV6b L1基因其第7250处碱基发生突变，其编码的氨基酸由S→P，称为地方株；而HPV11 L1蛋白氨基酸均未发生变异。

4．地方株HPV6b 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HPV6b 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488～500肽段出现了一个表面可及性增强区，第52～66肽段、256～282肽段、391～400肽段和466～500肽段抗原性增强，第143～151肽段和445～464肽段抗原性减弱（图3）。

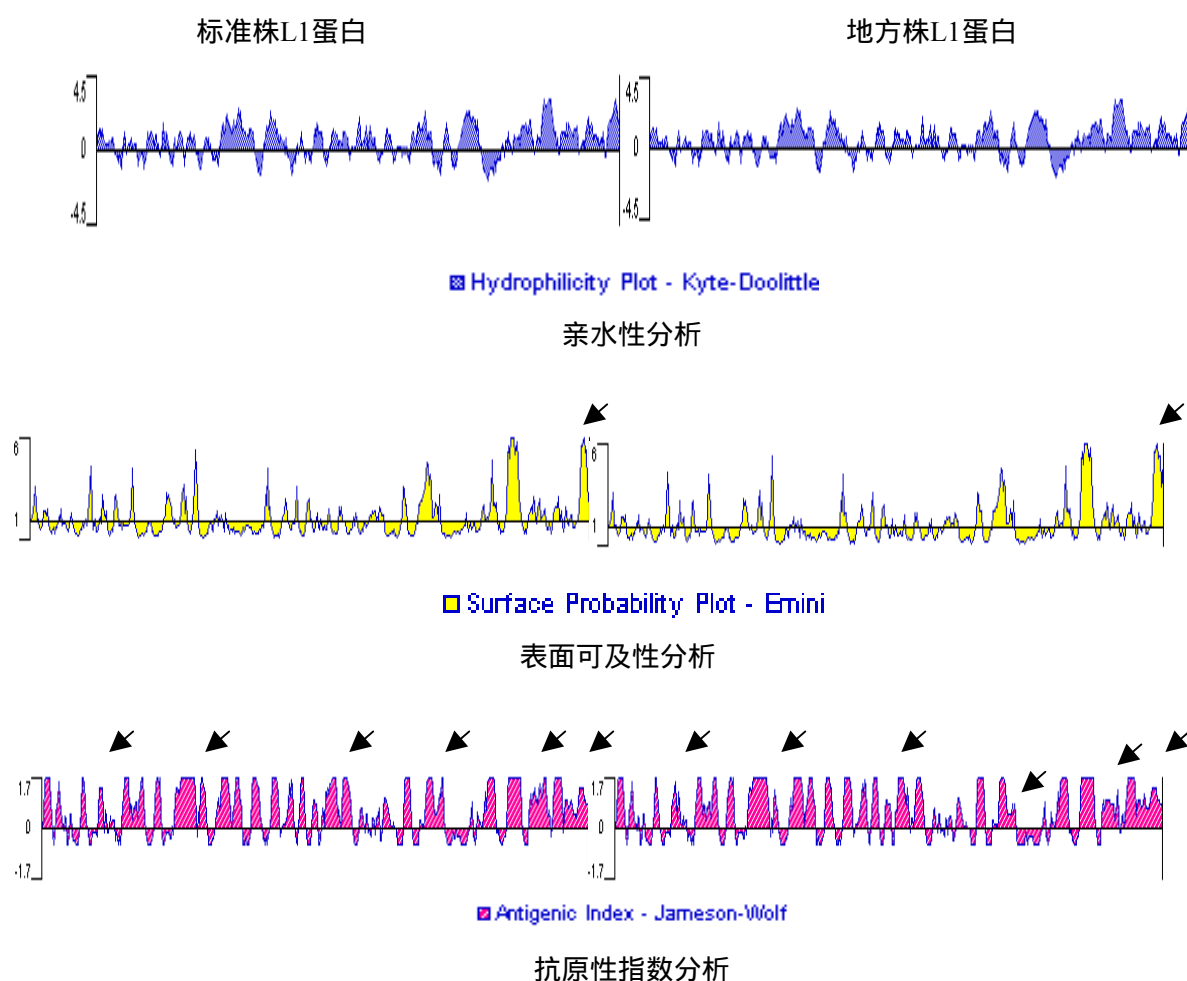


图3 HPV6b 标准株与突变 L1 蛋白亲水性、表面可及性和抗原性指数分析

讨论

CA 为我国目前主要的性传播疾病之一,流行范围广,危害性较大。Christensen^[4]等检测 65 例 CA 标本中有 63 例是 HPV6b 和 11 型 DNA 阳性。Abba^[5]等检测 100 份 CA 标本中,HPV 的阳性率为 86%,其中 HPV6 和 11 为主要型别。Grce^[6]等报道的 168 份 CA 标本中以 HPV6b 型感染为主。国内有关 CA 的 HPV 感染型别研究报道较多。洪少林^[7]等检测的北京地区 110 份 CA 标本中,HPV6 的阳性率为 60%,HPV11 的阳性率为 24.5%,两者的混合阳性率 10%,其它型别的阳性率 5.5%。蒋明军^[8]等报道 201 份 CA 标本中 HPV6 和 11 的阳性率分别为 45.8%和 56.2%。史庭燕^[9]等报道 50 份 CA 标本中,HPV6 型阳性率为 40%,HPV11 型阳性率为 48%,HPV6 和 HPV11 型混合阳性率为 6%。孙爱华^[10]等检测的 107 份杭州地区 CA 标本中,HPV6 型阳性率为 70.1%,HPV11 型阳性率为 23.4%,HPV6 和 HPV11 型混合阳性率为 6.5%。本研究检测的 31 份 CA 标本中,HPV6b、11 的阳性率为 74.2%,分别为 35.5%、45.2%;HPV6b、11 的混合阳性率为 6.5%。表明,温州地区 CA 的 HPV 感染以 HPV6b 和 11 型为主。以上 CA 中 HPV 主要感染型别不同,可能是地区、人群差异所致^[3],但均以 HPV6 和 11 型感染为主。

洪少林^[7]等人报道 CA 患者感染的 HPV6b L1 多态性分析,发现 26 处变异,多为同义突变,其第 6598 和 7099 位碱基突变为主要的突变模式;Icenogle^[11]等人曾报道对美国 and 菲律宾两地分离的 HPV6 L1 的

基因序列进行分析,发现基因突变位点位于其基因的第6598、6625、6661位,且所有标本的第6598位均发生了突变,表明在第6598位基因突变发生较为广泛;Wanderley等^[12]对伦敦地区17例HPV6b临床检测的L1序列分析,报道的变异高发区第5920~6075位、第6590~6670位、第7070~7230位。本研究检测的HPV6b L1与HPV6b标准株(NC 001355)比较,在基因水平上形成5种突变模式,分别位于第5929(1/7)、6256(1/7)、6598(7/7)、7099(4/7)和7250(1/7)位,与上述研究报道基本一致,且在第6598位均发生突变,是突变的主流型,除第7250位突变(S→P)外,均为同义突变。表明来自不同标本的HPV6b型L1基因点突变发生较为广泛,但多位于密码子第3位,未影响氨基酸的改变。而地方株HPV6b L1的第488位氨基酸虽由丝氨酸变为脯氨酸,即羟基类氨基酸变为亚氨基酸,但其亲水性无任何改变,表面可及性及抗原性强弱也基本一致。

本研究HPV11 L1基因序列与标准株HPV11(M 14119)比较,在基因水平形成了6种突变模式,分别位于第6028(7/7)、6214(1/7)、6514(2/7)、6589(1/7)、6607(7/7)和7045(2/7)位,同源率为99.7%~99.9%,但6种突变模式并没有影响到氨基酸序列改变,均属同义突变,与国内2005年报道的东北地区HPV11 L1基因突变模式一致^[13]。表明,HPV11 L1基因具有其高度保守的特点。

Gardasil疫苗的成功上市为预防CA带来了希望,但HPV感染型别存在一定的地域差异,给HPV基因工程疫苗的研究和应用提出了较高的要求。L1基因是制备基因工程疫苗较理想的候选基因,当其氨基酸序列发生改变时,可能会引起B细胞表位的变化,从而改变其抗原性。因此,分析HPV6和11型L1基因序列变异和氨基酸序列改变,掌握代表型抗原性基因的变化是发展基因工程疫苗的重要环节,本研究分别对温州地区的HPV型别进行检测,并对其L1基因突变情况进行分析,以了解本地区CA感染的主要型别及其变异情况,为基因工程疫苗的进一步研制和应用提供理论依据。

参考文献

- [1] Pisani P, Parkin DM, Bray F, et al. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990 [J]. *Int J Cancer*, 1999, 83(1):18-29.
- [2] Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004 [J]. *Ann Oncol*, 2005, 16(3):481-488.
- [3] Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, et al. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 14(5):1157-1164.
- [4] 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.
- [5] Abba MC, Gomez MA, Golijow CD. Human papillomavirus genotype distribution in cervical infections among women in La Plata, Argentina [J]. *Rev Argent Microbiol*, 2003, 35(2):74-79.
- [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] 洪少林, 王家璧, 李平川, 等. 尖锐湿疣病变的人乳头瘤病毒6型L1序列多态性分析 [J]. *病毒学报*, 2002, 18(2): 102-107.
- [8] 蒋明军, 王书崎, 龚向东, 等. 尖锐湿疣皮损中人乳头瘤病毒基因分型研究 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2005, 38(5): 262-264.
- [9] 史庭燕, 赵秀丽, 施燕峰, 等. 应用树突状DNA杂交(DDH)对生殖道尖锐湿疣中HPV DNA的分型和检测. *病毒学报*, 2004, 20:12-16.
- [10] 孙爱华, 徐莹, 冯燕, 等. 尖锐湿疣组织中乳头瘤病毒6和11型的感染率及其L1基因的表达. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(2):150-153.
- [11] 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.
- [12] Caparros-Wanderley W, Savage N, Hill-Perkins M, et al. 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
- [13] 庄敏, 谷鸿喜, 魏兰兰, 等. 尖锐湿疣组织中 HPV 型别检测及 HPV11 型 L1 基因的克隆与测序[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2005, 19(9): 519-521

猩红热爆发病例中 A 群链球菌基因型别和毒力基因研究

董红军 宋启发 林 晖 金春光 许国章 徐景野

宁波市疾病预防控制中心 (315010)

【摘要】 目的：分析从一起成人猩红热暴发疫情病例中分离的 A 群链球菌的 emm 基因型和致热外毒素基因 speA、speB 和 speC。**方法：**采用血琼脂平板对猩红热患者咽拭子标本分离培养 A 群链球菌，PCR 扩增 emm 基因片段，DdeI 酶切，对不同酶切图谱产物进行测序分析，通过比对获得 emm 基因型。采用 PCR 扩增链球菌致热外毒素基因 speA、speB 和 speC。**结果：**从患者中分离的 5 株 A 群链球菌内切酶图谱均相同，对其中 2 株进行测序分析基因型为 emm75。5 株 A 群链球菌均扩增出 speA 和 speB 致热外毒素基因。**结论：**具有 speA 和 speB 致热外毒素基因的 emm75 基因型 A 群链球菌可以引起成人猩红热爆发疫情。

【关键词】 A 群链球菌；猩红热；外毒素毒力基因；基因型

Study of Genotypic Characteristics and Virulent Genes of Group A Streptococcus

Isolates Recovered during a Scarlet Fever Outbreak

Centre for Disease Control and Prevention, Ningbo 315010, China

【Abstract】 Objective: To study the genotypes through emm genotyping method and pyrogenic exotoxin-related genes (speA, speB and speC) in group A streptococcus (GAS) isolates recovered during a scarlet fever outbreak. **Methods:** GAS strains were isolated from throat swabs of patients and related persons during a scarlet fever outbreak. The emm gene were amplified by PCR. Strains were grouped based on their DdeI restriction profiles from emm amplicons. emm amplicons with different DdeI restriction profiles were sequenced and blasted to get their emm genotypes. Genes of speA, speB and speC. **Results** Five isolates of GAS with same DdeI restriction profile were recovered and proved to be emm75 genotype. Exotoxin genes of speA and speB were detected in these strains. **Conclusion:** GAS of genotype emm75 with exotoxin genes of speA and speB was the cause of this scarlet outbreak.

【Key words】 group A streptococcus; scarlet fever; exotoxin gene; genotype

分析

作者: [朱珊丽](#), [欧琴](#), [王鹏飞](#), [石朝辉](#), [陈俊](#), [张丽芳](#)

作者单位: [温州医学院 分子病毒与免疫研究所, 微生物学与免疫学教研室, 325053](#)

引用本文格式: [朱珊丽](#). [欧琴](#). [王鹏飞](#). [石朝辉](#). [陈俊](#). [张丽芳](#) [温州地区人乳头瘤病毒\(HPV\)6和11型结构蛋白L1基因多态性及蛋白特性分析](#)

[会议论文] 2007