

编号: 590

硕士研究生学位论文

新疆大学

论文题目 (中文): 新疆株 HPV16 的全基因组序列分析以及病毒颗粒
在 293T 细胞中包装的初步研究

论文题目 (英文): **Genomic Sequence Analysis of a Human
Papinomavirus Type 16 Isolated from Uygur
Cervical Cancer Patient in Xinjiang, China and
HPV16 Particles are Assembled in 293T Cells**

研究生姓名: 刘立鸿

学 科 、 专 业: 生物化学与分子生物学

研 究 方 向: 肿瘤病毒学

导师姓名职称: 张富春 教授

论文答辩日期: 2008 年 5 月 21 日

学位授予日期: 2008 年 7 月 日

Magisterial Thesis

**Genomic sequence analysis of a Human Papinomavirus Type 16
isolated from Uygur cervical cancer patients in Xinjiang, China
and HPV16 Particles are assembled in 293T cells**

Master Degree Candidate: LIU lihong

Supervisor: Prof. ZHANG Fuchun

Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering
College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

May, 2008

摘要

人乳头瘤病毒(HPV, human papillomavirus)是一种常见的小 DNA 双链病毒,其基因组大小约为 8kb,主要感染上皮黏膜细胞,可引起良性乳头瘤病变和恶性肿瘤,高危型 HPV 在子宫颈癌组织中的检出率可高达 90%以上。大量研究资料证明,50%的宫颈癌与 HPV16 感染相关。目前在世界不同各地和种族已鉴定出多种 HPV16 变异株,并发现不同的变异株与其致病力等方面有关。新疆南部维吾尔族聚居区是宫颈癌高发区,高危型人乳头状瘤病毒 16 和 18 是宫颈癌主要病因之一,尤其以 HPV16 最为常见。本论文主要包括对新疆 HPV16 全基因组序列分析及其病毒颗粒在 293T 细胞包装,目的为探讨新疆 HPV16 变异与该地区宫颈癌高发的关系、新疆当地的宫颈癌疫苗开发和相关致癌机理研究奠定良好基础。

本论文工作主要包括五部分:1、新疆维吾尔族宫颈癌患者的 HPV16 基因组克隆及序列分析;2、新疆株 HPV16 *E1* 多态型分析、*E1* 核心片段的克隆及原核表达;3、新疆株 HPV16 *L1* 在真核细胞中表达水平的初探;4、密码子优化 HPV16 衣壳基因单价、真核共表达载体的构建及细胞转染;5、探索新疆株 HPV16 病毒颗粒在 293T 细胞中的包装。

1、新疆维吾尔族宫颈癌患者的 HPV16 基因组克隆及序列分析

根据 GenBank 中发表的 HPV16 基因的保守序列设计引物,利用 LA-PCR 扩增的方法,获得新疆 HPV16 基因组,命名为 XJHPV16。测序结果表明,序列长为 7963bp,其包含 2606 个腺嘌呤、1392 个胞嘧啶、1537 个鸟嘌呤、2428 个胸腺嘧啶,GC 含量为 36.8%,是世界上已报道的最长的 HPV16。新疆 HPV16*E1* 基因内部存在 63 个核苷酸重复。

2、新疆株 HPV16 *E1* 多态型分析、*E1* 核心片段的克隆及原核表达

从 41 份中国新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌活检组织标本中提取 DNA,其中有 32 份可以扩增出 HPV16*E1* 基因,HPV16 *E1* 阳性率为 78%(32/41)。*E1* 基因测序和序列分析表明 *E1* 基因核苷酸多处发生变异,并引起编码氨基酸的变异;*E1* 基因在核苷酸水平上形成 11 种突变模式,各模式与 HPV16 原型比较,同源性在 96.67%~99.95%之间;在氨基酸水平上形成 5 种突变模式,各模式与 HPV16 原型比较,同源性在 99.7%~100%之间,其中 *E1* 基因内部 63 个重复突变在世界未见报道。

根据 GenBank 已公布 *E1*,克隆新疆 HPV16 *E1* 核心片段,核心大小 1011 bp,将核心分别

构建到原核表达载体 pMAL-p2x 、 pGEX-4T-1 上, 利用大肠杆菌原核表达系统进行蛋白表达, 结果在大肠杆菌中成功诱导融合蛋白表达。

3、密码子优化 HPV16 衣壳基因真核共表达载体的构建及细胞转染;

用 PCR 技术从 988 载体中获得密码子优化 *L1, L1-IRES-L2* 片段, 将片段克隆到 pcDNA3.1(+) 真核表达载体中, 从而构建真核共表达载体 pcDNA3.1-*L1*、pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*; 水动力转染技术(hydrodynamics-based transfection)和脂质体细胞转染法(liposome-mediated transfection of cells), 检测衣壳基因的体内、外发生转录情况; pcDNA3.1-*L1*、pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* 重组质粒转染后 293T 细胞后发生 CPE (cytopathic effect) 现象, Western blot 方法检测到 *L1* 衣壳基因在 293T 细胞中蛋白表达。

4、新疆株 HPV16 *L1* 在真核细胞中表达水平的初探

新疆株 HPV16 *L1* 基因发生了多位点变异, 为探索新疆株 HPV16 *L1* 在真核细胞中表达水平, 构建 pcDNA3.1-xj-*L1*, 转染 293T 细胞, Western blot 无法检测到相应蛋白的表达, 说明新疆株 HPV16 *L1* 与其它已报道的 HPV16 野生型的 *L1* 一样在真核细胞中的表达量仍然很低, 这将为新疆当地的宫颈癌疫苗和相关致癌机理研究奠定良好基础。

5、探索新疆株 HPV16 病毒颗粒在 293T 细胞中的包装

将线性或者环化的 XJHPV16 单独转染 293T 细胞, 或者与衣壳基因共同转染 293T 细胞, RT-PCR(reverse transcription PCR)均能够检测到病毒 *E2* 基因和 *E5* 基因的转录, Southern blot 结果表明线性的 XJHPV16 在 293T 细胞重新成环, 但是只有在病毒基因组(线性或环化)与衣壳基因共同转染的实验组中检测到 *L1* 蛋白的表达。实验结果表明单独转染线性或者环化的 XJHPV16, 在 293T 细胞无法形成病毒样颗粒, 密码子优化 HPV16 衣壳基因是病毒颗粒形成所必需。

关键词 人乳头瘤病毒; 新疆维吾尔族宫颈癌患者; 全基因组序列分析; 多态型分析; 真核共表达载体; 病毒颗粒包装

ABSTRACT

Human papillomavirus(HPV) is a common small DNA tumor virus,whose genome size is about 8kb. It specifically infects squamous epithelial cells and causes benign or malignant epithelial lesions such as genital warts and cervical cancer.High risk HPV is detected in specimens of more than 90% of cervical cancer.High risk human papillomaviruses Numerous variants of HPV16 have been identified in different geographic locations and ethnic groups,which are different in pathogenicity.There is a very high incidence of CC in southern Xinjiang,High risk HPV ,such as HPV16 and HPV18,are major causes of cervical cancer (CC),and HPV16 was found most frequently in CC patients.This dissertation predominantly included genomic Sequence Analysis of a Human Papinomavirus Type 16 Isolated from Uygur Cervical Cancer Patient in Xinjiang, China and HPV16 Particles are Assembled in 293T Cells .The aim was to investigate the relationship of Xinjiang HPV16 mutation with high frequency of cervical cancer in this area, so as to lay a good foundation of development of Xinjiang cervical cancer vaccine and research on mechanism of carcinogenesis, respectively.

This dissertation included five parts:(1) Cloning and Sequencing Analysis Human Papinomavirus Type 16 Isolated from Uygur Cervical Cancer Patient in Xinjiang;(2) Polymorphism of HPV16 type *E1* genes from cervical carcinoma biopsies in Xinjiang Uygur women and cloning as well as expression of core fragment of *E1* gene; (3) Construction of codon-optimized HPV16 capsid genes in the eukaryotic co-expression vector and transfection of cells;(4) Research of the Expression Level of XinJiang Strain HPV16 Gene *L1* in Eukaryotic Cells; (5) HPV16 Particles are assembled in 293T cells

1.Cloning and Sequencing Analysis Human Papinomavirus Type 16 Isolated from Uygur Cervical Cancer Patient in Xinjiang

The primers were designed to clone Xinjiang HPV16 ,which were based on HPV16 sequences published in GenBank. Xinjiang HPV16 from Uygur cervical cancer Patient was isolated LA-PCR technique. Sequencing result showed that the Xinjiang HPV16 consists of 7963 base pairs (bp) and has a base composition of 2606 adenine (32.7%), 1392 cytosine (17.5%), 1537 guanine (19.3%), 2428 thymine (30.5%), and a GC content of 36.8 %. The nucleotide sequence comparison showed that there

was insertion in the Xinjiang HPV16 *E1* gene, which is reason that genome of Xinjiang HPV16 is longer than other HPV16.

2. Polymorphism of HPV16 type *E1* genes from cervical carcinoma biopsies in Xinjiang Uygur women and cloning as well as expression of core fragment of *E1* gene

The 41 tissues DNA were extracted from cervical carcinoma biopsies. HPV16 *E1* genes were amplified by PCR, HPV16 type *E1* genes were sequenced and analyzed. The positive rate of HPV16 *E1* was 78%(32/41). We sequenced DNA found some mutations in comparison with the previously published sequence of prototype HPV16 *E1*. Some of the mutations changed the triplet codes, subsequently led to changes of amino acids. The mutations of all eleven HPV16 *E1* fragments formed eleven patterns at nucleic acid level. Compare to HPV16 prototype, their homology was 96.67%~99.95%. The mutations of all eleven HPV16 *E1* fragments formed five patterns at amino acid level, the mutations of 63 repetition in *E1* gene among mutations was not reported before.

The core fragment of HPV16 *E1* was cloned into the multiple cloning site of pMAL-p2x, pGEX-4T-1 vectors, whose size is 1011bp, and successfully expressed in *Escherichia coli* BL2 (DE3).

3. Construction of codon-optimized HPV16 capsid genes in the eukaryotic co-expression vector and transfection of cells

The amplified codon-optimized HPV16 capsid genes from 988 plasmid by PCR were cloned into eukaryotic expressing vector pcDNA3.1(+). Thus, eukaryotic co-expression vector pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* capable of expressing HPV *L1* gene and *L2* gene was constructed. The transcription of capsid genes was observed in vivo and in vitro by hydrodynamics-based transfection and liposome-mediated transfection. Cytopathic effect (CPE) occurred after the transfected with pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* into 293T cells. Western blot detection showed the recombinant plasmid *L1* protein was expressed in 293T cells.

4. Research of the Expression Level of XinJiang HPV16 Gene *L1* in Eukaryotic Cells

Studying on the expression level of Xinjiang HPV16 *L1* gene, because there are many mutations in Xinjiang *L1* gene. The eukaryotic expression vector of pcDNA3.1-xj-*L1* was constructed and transferred

into 293T cells Recombinant plasmid pcDNA3.1-Human-*L1* could express in 293T cells by Western blot, but pcDNA3.1-xj-*L1* not. It draw that the Xinjiang wild type HPV16 capsid gene had an low expression level in 293T cells. The result makes the helpful exploration in studying the new Xinjiang local vaccine of HPV 16 and the in-depth research of correlated mechanisms.

5、 HPV16 Particles are assembled in 293T cells

Linear or recircularized XJHPV16 was lonely transfected into 293T cell,or company with codon-optimized HPV16 capsid genes,*E2* gene and *E5* gene were detected by RT-PCR. Southern blot analysis of linear genomes revealed that genomes were circular regardless of the state of input viral DNA.L1 protein was detected in co-transfected groups, butlonely transfected not.The experiment showed that HPV16 particles are successfully assembled in 293T cells and codon-optimized HPV16 capsid genes were necessary.

Key word Human papillomavirus(HPV);Xinjiang Uygur cervical cancer patients;

Genomic Sequence Analysis;Polymorphism;eukaryotic co-expression vector;Virus particles assembled

目 录

英文缩略语.....	1
第一部分 文献综述.....	3
第一章 人乳头瘤病毒（HPV）致癌机制研究进展.....	4
第二章 密码子使用偏性研究进展.....	8
第二部分 实验内容.....	15
第一章 新疆维吾尔族宫颈癌患者的 HPV16 基因组克隆及序列分析.....	15
第二章 新疆株 HPV16 E1 多态型分析、E1 核心片段的克隆及原核表达.....	30
第三章 新疆株 HPV16 L1 在真核细胞中表达水平的初探.....	38
第四章 密码子优化 HPV16 衣壳基因真核共表达载体 的构建及细胞转染.....	47
第五章 探索新疆株 HPV16 病毒颗粒在 293T 细胞中的包装.....	57
结论与展望.....	65
致 谢.....	66
个人简历.....	67
硕士及本科期间已发表和待发表的论文.....	68
原创性声明.....	69
知识产权权属声明.....	69

英文缩略语

HPV: human papillomavirus	人乳头瘤病毒
VLPs: virus like particles	病毒样颗粒
L1	主要衣壳蛋白
L2	次衣壳蛋白
EB (ethidium bromide)	溴化乙锭
PCR (polymerase chain reaction)	聚合酶链式反应
ORF(open reading frame)	开放阅读框
RACE(rapid amplification of cDNA end): cDNA	末端快速扩增
RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)	反转录 PCR
DEPC (Diethyl Pyrocarbonate)	焦碳酸二乙脂
EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid)	乙二氨四乙酸
OD(optical density)	光密度值
SDS(Sodium Dodecyl Sulfate)	十二烷基硫酸钠
SDS-PAGE	SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳
Western blot	蛋白印迹试验
Southern blot	DNA 核酸印迹
DEPC: Diethylprocarbonate	焦碳酸二乙脂
DAB: Diaminobezidin	二氨基联苯胺
PBS: Phosphate buffered saline	磷酸缓冲液
LB: Luria-Bertani culture medium	LB 培养基

实验主要仪器

仪器名称	型号	产地
气浴恒温振荡器	THZ-82 型	江苏金坛市医疗仪器厂
电子天平	1/10000	Sartorius (德国)
电子天平	GB1302 型	Mettler Toledo (瑞士)
微波炉	W700A	亚美公司(日本)
超纯水仪	EASY Pure UV	Barnstead (美国)
超净工作台	W—CJ—IFD	苏净集团
恒温培养箱	PYX-DHS-40X50	上海跃进
热空气消毒柜	UT12 型	Heraeus (德国)
高压灭菌锅	SM510 型	Yamato (日本)
水浴箱	F10	julabo UC (德国)
台式离心机	Pico	德国 Heraeus
台式冷冻离心机	Fresco	德国 Heraeus
台式冷冻离心机	AvantiTmJ-25	美国 Beckman
台式冷冻离心机	AvantiTmJ-30	美国 Beckman
PCR 仪	PE2400	美国 PE
水平电泳槽,	DYYIII 型	中国北京
电泳仪	1000/500	美国 Bio Rad
凝胶成像仪,	TM-26	美国 Alpha
层析柜	CS33SDF	美国 NUAIRE
超低温冰箱	NU-6511E	美国 NUAIRE™
蛋白转移印记仪	Mini Trans-BlotR	美国 Bio-Rad

第一部分 文献综述

人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)能引起皮肤和黏膜的异常增生,某些型的感染与生殖道恶性病变关系密切。HPV的主要传播方式是性接触和非性接触。非性传播方式包括密切接触传播、母婴传播和自体接种传播^[1]。迄今为止大约有100多种HPV病毒得到确认,其中至少42种能够感染人类生殖道^[2]。

HPV可以分为高危型和低危型,高危型中的16、18型与宫颈癌发生密切相关。宫颈癌是全世界仅次于乳腺癌致妇女死亡的第二大恶性肿瘤,据报道每年全球大约有50万新发宫颈癌病例,约25万人死于宫颈癌^[3]。目前有两种宫颈癌疫苗,一种由默克公司生产的四价疫苗(HPV6、11、16、18),另一种是葛兰素史克生产的双价疫苗(HPV16、18),临床实践证明二者都是安全地、高效地、特异性地预防宫颈癌的发生^[4]。但疫苗在接种方面对年龄有一定的要求,一般在11-12岁接种效果较好(没有性接触之前)^[5],但只能起预防作用,而对患宫颈癌或宫颈癌前病变的病人起不到治疗作用。HPV有多种型别,除了几种高危型,其它的型别也可对人体造成一定的损害,且在人群中非常普遍,但其致病机制还不是很清楚。所以对HPV致癌机制的探究是相当必要的,可在更好预防HPV感染、治疗宫颈癌及其引起的相关疾病和HPV理论研究方面发挥重用的作用。目前,人乳头瘤病毒感染有日益增多的趋势^[6],有关HPV的致癌机制研究正在逐渐深入。

分析HPV16基因组序列,了解HPV16基因组突变,对研究HPV16基因功能、致病、药物设计方面有重要作用。因为乳头瘤病毒的增殖与上皮细胞的分化紧密相连,所以一直以来感染性乳头瘤病毒只能通过烦琐的器官培养(organotypic cultures)和小鼠异种移植(mouse xenografts)途径获得,而用这两种方法很难获得足量的野生型或突变型人乳头瘤病毒(HPV)颗粒,这大大限制了乳头瘤病毒生物学许多方面的研究^[7-9]。最近Pyeon D^[10]、Culp TD^[11]采用假病毒技术建立了用于病毒培养的瞬时转染系统,该系统中每个细胞能产生大量有感染性的病毒,病毒产生量是常规器官培养的1000倍之多。Pyeon D的研究表明,该瞬时转染系统要求密码子优化的L1与L2基因必须同时转染细胞,而单独L1基因或L2基因都不会使该系统发挥作用。同义密码子的偏好使用普遍存在于从原核生物到真核生物的编码基因中。密码子偏好对基因表达有着显著的影响。如在大肠杆菌中高表达和低表达的基因使用的偏好密码子在tRNA的丰度和密码子-反密码子间的作用强度方面就存在明显的不同,这直接导致了基因表达水平的差异^[12]。

本部分对HPV致癌机制和密码子使用偏性两方面做一综述。

第一章 人乳头瘤病毒(HPV)致癌机制研究进展

1 HPV的分子生物学特征

HPV是一种小型无包膜的病毒颗粒，呈球形，二十面体对称，直径约45~55 nm。其基因组为双链闭环DNA，包括3个区域：非编码的上游调节区、早期开放阅读框和晚期编码区。其早期区基因包括*E1*~*E7*，负责编码病毒复制相关蛋白；晚期区包括*L1*和*L2*，编码病毒结构蛋白^[13-14]。

2 HPV 分型与所致疾病

HPV不能用常规方法培养，也不能通过免疫方法进行血清分型。因此，目前主要是通过HPV *L1*基因的DNA杂交及酶谱分析方法对HPV进行分型，将核苷酸同源性少于50%的HPV定为新型别，目前已鉴定出100多种型别。每种HPV型在体内都有特定的感染部位并引起相应的病变。HPV各型之间有共同抗原，存在于L1蛋白保守区域，这些抗原具有属特异性，与牛乳头病毒（BPV）有交叉反应^[15]。

另外，根据HPV的组织嗜异性，可将其分为嗜皮肤类和嗜粘膜类两大类。HPV能引起人类皮肤和粘膜的多种良性乳头状瘤或疣的形成，某些HPV感染还具潜在的致癌性。在临床上，有些学者根据HPV致癌危险性大小不同又将HPV分为低危型和高危型两大类。低危型HPV主要引起肛门皮肤和外生殖器疣类病变，其亚型主要包括HPV6、11、30、39、42、43、44型。高危型HPV主要包括HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58型，主要引起宫颈癌、外阴癌、肛门癌等恶性肿瘤发生，其中HPV16和HPV18是引起宫颈癌的最常见的两种亚型， HPV16与宫颈鳞癌关系最为密切，HPV18最易导致宫颈腺癌^[16]。

3 HPV 的致癌机理

人乳头瘤病毒(HPV)是自然界中广泛存在的一类DNA病毒，在人群中具有很高的感染率。HPV感染与年龄、性别、身体状况、遗传等多种因素有关。很多种HPV可以引起肿瘤，其中高危型中的16、18型与宫颈癌的发生密切相关，又以HPV16型最为常见。宫颈癌是全世界仅次于乳腺癌导致妇女死亡的第二大癌症，因此受到广泛关注。下面将讨论HPV16的致宫颈癌机理，目前有关其机理还没有完全被揭示，但普遍认为的HPV16致癌机制如图1所示。

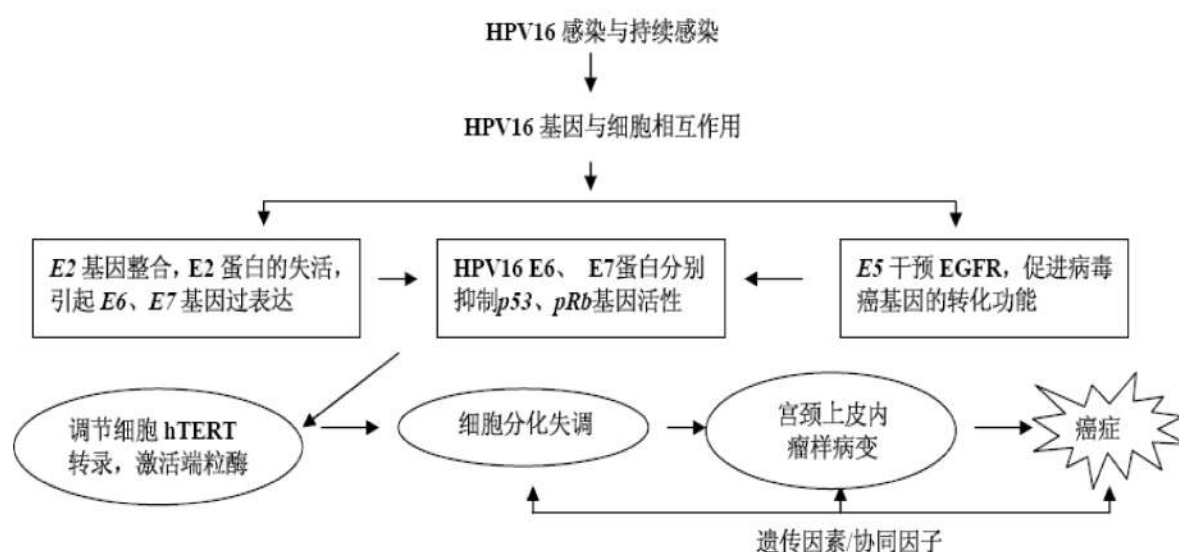


图1 HPV16 致癌模式

3.1 HPV基因与宿主染色体整合, 促进端粒酶活性

HPV DNA在宫颈良性病变中主要以游离状态存在, 在恶性病变中以整合状态为主, 整合通常导致E2基因中断从而使E6、E7表达增强。多数研究者认为HPV DNA可能整合在基因不稳定区和转录活跃区, 如FRA3B 3p14. 2和13q14^[17], 而13q14恰好是pRB抑癌基因所在位点, 整合可使pRB基因功能失活而致癌。HPV整合到宿主染色体是宫颈病变快速转化为宫颈癌的标志之一^[18]。高危型HPV感染是导致宫颈癌的主要原因, HPV E2通过整合到宿主细胞, 可调节hTERT的转录, 激活端粒酶^[19]。Rahat等研究发现生殖道感染HPV后, 组织端粒酶活性较正常组织明显升高^[20]。

3.2 HPV16 蛋白与癌症的关系

3.2.1 HPV16 E2蛋白

E2蛋白约50 kDa, N端含有转录激活结构域, C端含有DNA结合区。完整的E2蛋白具有病毒DNA复制和调节转录的双重功能。在HPV整合过程中, 许多基因被破坏或缺失, 其中E2基因受到的破坏最为严重。E2基因所编码的E2蛋白失活会引起E6、E7基因过表达, 使得细胞癌化能力增强^[21]。Goodwin等^[22]用表达牛乳头瘤病毒E2蛋白的重组病毒感染HPV18阳性的HeLa细胞发现, E2蛋白过表达明显降低HPV18 E6和E7基因的活性, 分别通过抑制P53和pRb途径, 致使宿主DNA合成减少, 从而抑制细胞的生长。另外E2蛋白还能通过诱导凋亡途径抑制细胞增生^[23]。

3.2.2 HPV16 E5蛋白

E5蛋白是一种由84个氨基酸组成的疏水膜蛋白，主要分布在内质网及高尔基体中。E5蛋白单独不能使人的原代角质细胞无限增殖，但能与E6和E7协同作用抑制 $p53$ 和 pRb 表达，从而发挥重要的补充作用^[24]。E5蛋白主要通过增强表皮生长因子受体（EGFR）的活性来实现致癌能力，其主要生物活性是通过与溶酶体ATP酶中的分子量大小为16kD的脂蛋白结合来抑制EGFR的降解，EGFR得到积累，从而使EGF与EGFR作用后所激活的各种信号通路兴奋时间延长。如表达HPV16 E5的细胞在添加EGF后，发现MAP激酶活性增强，c-Fos和c-Jun表达水平提高。这表明E5可能通过MAP激酶途径发挥其致癌作用^[25]。

3.2.3 HPV16 E6蛋白

E6蛋白是一种含151个氨基酸的蛋白，包括2个锌指状结构。研究发现，E6蛋白能有效使人乳腺上皮细胞永生化，与E7协同作用还能使人包皮角质细胞(HFK)永生化。E6主要通过一种泛素连接酶形成复合物 $E6 \cdot AP$ ，使 $p53$ 泛素化分解失活来发挥作用。E6还能通过将 $p53$ 带留在胞浆内来阻止 $p53$ 功能的实现。E6对 $p53$ 的抑制作用在HPV感染过程中非常重要，HPV E6能诱导 $p53$ 依赖性凋亡途径。病毒复制之前，E6的表达降低了 $p53$ 的水平从而阻断 $p53$ 凋亡途径以阻止细胞死亡，使病毒后续基因发挥作用。因此，E6对 $p53$ 的作用是HPV增殖感染的关键环节，它的这一功能使基因异常的细胞得以持续增殖^[26]。

Shai A和Snijders PJ研究表明，HPV16E6蛋白能通过抑制 $p53$ 的联合兴奋因子CBP/p300来抑制 $p53$ 的作用，是HPV感染的免疫抑制机制之一^[27-28]。E6同样也能绕过多种细胞周期相关因子的负向调控，如 $p16$ 和 $p27$ 所致的G期细胞周期停滞，使细胞进入DNA合成期(S期)。

3.2.4 HPV16 E7蛋白

E7蛋白是含有98个氨基酸的磷酸化核蛋白，共有CR1，CR2，CR3等3个功能区。E7蛋白通过位于C末端的锌指状结构形成二聚体；N末端的CR1和CR2区对E7蛋白的体外转化起重要作用。E7蛋白是HPV主要的致癌蛋白，高危型HPV(16、18、31)E7单独就能使人角质细胞(HFK)永生化。E7蛋白通过CR2区的LXCXE结构与Rb第649~772位氨基酸的口袋结构特异性结合，释放核转录因子E2F，使细胞进入DNA合成期^[29, 30]。

E7蛋白基因的表达导致多种细胞周期负向调控信号失效，如 pRb 介导的生长停滞，TGF- β 介导的生长抑制、 $p16$ 介导的细胞周期停滞、 $p21$ 和 $p27$ 介导的G/S转换阻滞等。体外实验表明，HPV E7

能与*p21* 结合从而使*p21*失活, 解除*p21*对CyclinE和CyclinA相关激酶CDK2的抑制, 还能消除*p21*对增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 依赖性DNA复制的抑制功能, 从而弱化*p21*的双重抑制作用。由于*p21*也可通过*pRb*非依赖性方式抑制E2F活性, 这样就会进一步削弱*p21*的抑制作用。尽管E7能使细胞免受*p53*介导的细胞周期阻滞, 但表达E7的细胞凋亡水平却表现出上升趋势, 这可能与DNA复制晚期E7直接与CyclinA作用, 致使CyclinA依赖性的E2F失活过程的失效有关^[31-32]。

3.3 协同因素

癌症的发生和发展是一个相当复杂的生物学过程, 它往往受到多种因素的影响, 具有多步骤、长时性等特点。体外细胞转化研究发现, HPV只能诱导正常上皮细胞永生化而不能使之彻底恶化, 表明HPV并非是癌症发生发展的唯一因素。近年来HPV与其它病原微生物, 如单纯疱疹病毒-2 (HSV-2)、沙眼衣原体(CT)、人巨细胞病毒(HCMV)在宫颈癌发生发展中的表现出的协同作用已引起广泛关注。

肿瘤对某些激素具有依赖性。De Villiers, Delvenne P等人发现, 在妇女中HPV感染率随怀孕次数和时间的增加而增加。他们的调查结果显示, 孕妇组比非孕妇组的HPV感染率至少高2倍, 孕晚期是孕初期的1.6倍, 孕妇组中感染率最高的是第五次妊娠(66.7%), 最低的是首次妊娠(31.1%)。研究者认为这可能与孕激素的影响有关, 宫颈癌的分子生物学研究也揭示了孕激素和糖皮质激素在宫颈癌形成中的作用。在HPV11、16、18亚型上有孕激素反应因子(PRE)和糖皮质激素反应因子(GRE), 现认为PRE/GRE是HPV基因调节的重要组成部分, 参与病毒基因的复制, 在排卵周期中反复强化HPV表达, 并在妊娠过程中进一步被激化, 从而加速受感染细胞的癌变。同时, 口服避孕药也能增强HPV病毒感染的能力^[33-34]。

4 结论与展望

人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)在人群中广泛传播, 能引起皮肤和黏膜的异常增生, 某些型的感染与生殖道恶性病变关系密切。HPV在致癌过程中, *E2*基因通常整合到宿主细胞基因组内, *E2*基因的失活和*E5*基因对EGFR的干预都能引起*E6*、*E7*基因过表达, *E6*、*E7*蛋白分别通过抑制*p53*、*pRb*基因的活性从而激活人细胞端粒酶基因(hTERT)的转录, 引起细胞分化异常, 导致正常细胞癌化。HPV致癌是一个多因素、多步骤的渐进过程, 其中协同因素也发挥重要作用。随着研究的深入, HPV的致癌机制越来越受到国内外研究者的重视, 对HPV致癌机制的探索也逐渐

成为研究热点。

随着近几年对HPV研究的深入，人们已初步揭示了HPV致癌的分子机制，如*E6*基因、*E7*基因干扰细胞周期检验点、抗细胞凋亡和诱导端粒酶活化，以及病毒自身逃避宿主控制因素等。*E6*、*E7*基因可作为重要的靶基因，采用RNAi等技术，或者开发一些针对*E6*、*E7*基因的药物，抑制*E6*、*E7*基因表达，以达到治疗癌症的目的。

第二章 密码子使用偏性研究进展

生物体遗传信息的传递，经历了“中心法则”所描述的从DNA到mRNA，终至具有生物功能的蛋白质这一渐进过程，其间重要的一个环节是以三联体密码的形式编码蛋白质的结构单元——氨基酸。每种氨基酸至少对应一个密码子，最多的有6种对应的密码子，编码同一种氨基酸的密码子称为同义密码子。研究表明，生物体内普遍存在同义密码子非均衡使用的现象，例如：某一物种或某一基因通常倾向于使用一种或几种特定的同义密码子，这些密码子被称为最优密码子(optimal codon)，此现象被称为密码子偏性(codon bias)。早在20世纪70年代，人们在研究基因的异源表达时，就已经意识到密码子偏性的重要性^[35]，随着不同生物基因组数据的获得和各种数据库的构建，更多的研究者对于密码子偏性的研究产生了浓厚的兴趣，尤其在分子进化、翻译调控等研究领域，通过对不同物种的密码子使用偏性的大量研究^[36-38]，发现不同物种的基因在密码子使用上存在着明显的偏性。近年来，人们又发现不同功能的基因，其密码子使用偏性也存在较大的差异^[39]。

1 密码子使用偏性普遍性

从原核生物到真核生物，其基因组中同义密码子使用偏性的现象广泛存在，这一现象的产生与诸多因素有关，如基因的表达水平^[40-41]、翻译起始效应^[42-43]、基因的碱基组分^[44]、某些二核苷酸的出现频率^[45-46]、G+C含量^[47-48]、基因的长度^[49]、tRNA的丰富度^[50-51]、蛋白质的结构^[52]以及密码子-反密码子间结合能的大小^[53]等。在不同物种或细胞器^[54]基因中，其偏性程度因作用的因素数量以及各因素在同义密码子偏性产生过程中所占决定系数的大小而不同。

2 密码子优化的设计方法

进行密码子优化的最根本原则是去除稀有密码子。至于将基因全部优化并不是非常有益的做法。因为无论原核还是真核，外源蛋白的大量表达都会对宿主本身产生影响。一些高表达的原核

表达载体可能会在一定程度上避免这种影响，那么可以适当考虑全面优化。此外，密码子优化和表达效率的提高只是呈正相关的关系，而不是线性的关系，所以高度的密码子优化可能并不会最终获得很理想的优化效果。目前认为密码子优化提高表达水平的机制主要包括：1，稀有密码子的去除；2，提高了mRNA的稳定性；3，提高了转录效率和翻译效率。目前密码子优化最常用的领域是蛋白表达。最近在核酸疫苗领域也有很多研究有所涉及。由于采用了哺乳动物或者人的偏好密码子，核酸疫苗在宿主体内的表达效率的提高增强了免疫应答的效果。

在 GenBank上可以获得不同基因核普酸序列的资料，可以按照生物体的名称查得不同基因密码的使用情况。比较异源基因与宿主基因表达相同的氨基酸所使用的同义密码的不同使用频率，找出不同基因间各自偏爱密码的差异，结合生物物种基因进化资料，通过计算机的辅助设计，可构建优化的合成基因。

3 密码子偏性在生物学领域中的应用

DNA 是生物体遗传信息的载体，蛋白质是发挥生物功能的主要分子，因此联系二者的密码子使用情况必然具有重要的生物学意义，所以密码子偏性现象在许多生物学领域中受到关注。

3.1 基因异源表达

通过对已知基因密码子偏性模式和不同物种密码子偏性的分析，预测外源基因的最适宿主及在宿主中的表达水平，或者通过基因工程手段采用最优密码子以提高基因表达水平，从而提高其在宿主中的表达水平。

3.2 与某些物种的蛋白表达水平相关

早在1989 年， Bonekamp 等^[55]就发现了不同的密码子有不同的翻译速率，但在大肠杆菌 (*Escherichia coli* K-12)的全基因组密码子偏性和基因表达水平相关性分析中，Dos 等^[56]将其基因分成3组(高偏性、中等偏性、富含AT 的低偏性)，并分别作相关性分析，其中第一组为正相关，第三组为负相关，第二组的平均表达水平最低。另外密码子偏性的分析还有助于更好的了解转录和翻译进程中的调控机制。

3.3 揭示有关物种间或某一物种的基因家族间的基因进化规律

例如：对果蝇和线虫的常染色体基因与X 连锁基因的密码子偏性分析表明，与X 连锁基因的密码子偏性更高些，推测可能是由于受到更大的自然选择压力的原因^[57]。

3.4 基因的翻译调控

蛋白质合成的速率受翻译起始速率和肽链延伸速率的影响，而翻译起始速率是由核糖体和 mRNA 的相结合的速率所决定的，因而二者的浓度成为主要影响因素之一，密码子使用会直接影响到转录的效率，从而决定 mRNA 的浓度^[58]；另外，在酵母中进行的密码子偏性与 mRNA 浓度及蛋白长度的相关性分析也表明，密码子偏性可能与增加转录及翻译的效率(如提高准确性)及减少翻译过程中消耗有关^[59]。

3.5 其他应用

密码子偏性的分析也常对许多实验操作起指导和辅助作用，如：鉴定编码区，制备基因克隆的寡核苷酸探针，基因芯片设计^[60]等

4 展望

自1966 年全部64 个三联体密码子被破译以来，围绕遗传密码子的研究开展的如火如荼，并取得重要进展。无义密码子的再定义及遗传密码的扩张在一定程度上丰富和发展了遗传密码固有的科学内涵，推动了生物研究的进程。遗传密码子的另一研究热点即其起源和进化问题，至今尚未取得令人满意的答案。不过，随着遗传密码多态性等研究的不断深入、新的密码子研究方法的不断出现、完善和发展以及更多基因组测序工程的展开或完成，相信这一问题将会在不久的将来得到合理解决。重要的是，随着遗传密码研究信息的不断积累，其在基因组学、医学等研究领域的应用价值将会越来越明朗。例如，许多用于疾病治疗的蛋白质需要对其进行诸如添加聚合体、交联剂和细胞毒分子等修饰，而利用遗传密码子扩张的研究方法人工合成特定的氨基酸就可轻松实现上述目标。另外，Zhang 等发现糖基化氨基酸(glycosylated amino acids) 可结合到特定位点合成糖基化蛋白，而这一过程是制备某些药物的重要步骤^[61]。

参考文献

- [1]Robertson C, Jayasuriya A, Allan PS. Sexually transmitted infections: where are we now? [J]. J R Soc Med, 2007, 100(9): 414-417
- [2]Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology[J].Gynecologic Oncology, 2007,107: S2-S5
- [3]Newall AT, Beutels P, Wood JG, Edmunds WJ, MacIntyre CR. Cost-effectiveness analyses of human papillomavirus vaccination[J]. Lancet Infect Dis, 2007, 7(4): 289-296

- [4]Stanley M.Prevention strategies against the human papillomavirus:The effectiveness of vaccination[J].Gynecologic Oncology, 2007, 107: S19-S23
- [5]Zimmerman RK.Ethical analysis of HPV vaccine policy options[J].Vaccine,2006,24(22): 4812-4820
- [6]Weller SC, Stanberry LR. Estimating the Population Prevalence of HPV[J].JAMA, 2007, 297(8): 876-878
- [7]Dollard SC, Wilson JL, Demeter LM, Bonnez W, Reichman RC, Broker TR, Chow LT.Production of human papillomavirus and modulation of the infectious program in epithelial raft cultures[J]. Genes Dev, 1992, 6 (7):1131-1142
- [8]Meyers C, Frattini MG, Hudson JB. Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation[J]. Science, 1992, 257 (5072): 971-973
- [9]McLaughlin-Drubin ME, Christensen ND, Meyers C. Propagation, infection, and neutralization of authentic HPV16 virus[J].Virology,2004,322 (2): 213-219
- [10]Pyeon D, Lambert PF, Ahlquist P. Production of infectious human papillomavirus independently of viral replication and epithelial cell differentiation[J].Proc Natl Acad Sci USA. 2005, 102 (26): 9311-9316
- [11]Culp TD, Cladel NM, Balogh KK, Budgeon LR, Mejia AF, Christensen ND. Papillomavirus particles assembled in 293TT cells are infectious in vivo[J]. J Virol, 2006, 80 (22):11381-11384
- [12]Shpaer E G Constraints on codon context in Escherichia coli genes. Their possible role in modulating the efficiency of translation [J].J Mol Biol,1986,188:555 - 564
- [13]Markowitz LE, Dunne EF, Saraiya M, Lawson HW, Chesson H, Unger ER..Quadrivalent human papillomavirus vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) [J].MMWR Recommendations and Reports, 2007, 56(RR-2): 1-24
- [14]Wang Q, Griffin N, Southern S, Jackson D, Martin A, McIntosh P, Davy C, Masterson PJ, Walker PA, Laskey P, Omary MB, Doorbar J. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1-E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization[J]. J Virol, 2004, 78(2): 821-833
- [15]Gravitt PE, van Doorn LJ, Quint W, Schiffman M, Hildesheim A, Glass AG, Rush BB, Hellman J, Sherman ME, Burk RD, Wang SS. Human Papillomavirus (HPV) Genotyping Using Paired Exfoliated Cervicovaginal Cells and Paraffin-Embedded Tissues To Highlight Difficulties in Attributing HPV Types to Specific Lesions[J]. JCM, 2007, 45(10): 3245-3250
- [16] Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, Rush BB, Glass AG, Schiffman M.. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(14): 1072-1079
- [17] Butler D, Mabruk M, Mabruk M.Deletion of the FHIT gene in neoplastic and invasive cervical lesions is related to

high-risk HPV infection but is independent of histopathological features[J]. J Pathol, 2000, 192: 502-510

[18]Hopman A H,Smedts F.Transition of highgrade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by chromosome abnormalities[J].J Pathol, 2004, 202(1): 23-33.

[19]Horikawa I, Barrett JC. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms[J]. Carcinogenesis, 2003, 24(7): 1167-1176

[20]Rahat MA, Lahat N, Sharon A,Gazawi H, Abramovici H, Bornstein J. Increased telomerase activity and decreased telomere length in genital condylomata acuminata[J]. Int J STD AIDS , 1999, 10: 699-702

[21]Parish JL, Kowalczyk A, Chen HT, Roeder GE, Sessions R, Buckle M, Gaston K. E2 proteins from high and low risk human papillomavirus types differ in their ability to bind p53 and induce apoptotic cell death[J]. J Virol, 2006, 80(9): 4580-4590

[22]Goodwin EC,DiMaio D.Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways[J].PNAS, 2000, 97(23): 12513-12518

[23]Demeret C, Garcia Carranca A, Thierry F. Transcription independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein[J].Oncogene, 2003, 22(2): 168-175

[24]Disbrow GL, Hanover JA, Schlegel R.Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 protein alters endosomal pH but not trans-Golgi pH [J]. J Virol, 2005,79(9): 5839-5846

[25]Maufort JP, Williams SM, Pitot HC, Lambert PF.. Human papillomavirus 16 E5 oncogene contributes to two stages of skin carcinogenesis [J]. Cancer Res, 2007, 67(13): 6106-6112

[26]Zhang Y , Dasgupta J, Ma RZ, Banks L, Thomas M, Chen XS. Structures Of A HPV-E6 Polypeptide Bound To MAGUK Proteins: Mechanisms Of Targeting Tumor Suppressors By A High-Risk HPV Oncoprotein[J]. J Virol, 2007, 81(7): 3618-3626

[27]Shai A, Brake T, Somoza C, Lambert PF.The human papillomavirus E6 oncogene dysregulates the cell cycle and contributes to cervical carcinogenesis through two independent activities[J]. Cancer Res, 2007, 67(4):1626-1635

[28]Snijders PJ, van Duin M, Walboomers JM, Steenbergen RD, Risse EK, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Meijer CJ. Telomerase activity exclusively in cervical carcinomas and a subset of cervical intraepithelial neoplasia grade III lesions: strong association with elevated messenger RNA levels of its catalytic subunit and high-risk human papillomavirus DNA[J]. Cancer Res, 1998, 58 (17): 3812-3818

[29] Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39: 2006-2011

[30] Liu X, Clements A, Zhao K, Marmorstein R.. Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its

mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(1): 578-586

[31]Tamura G, Yin J, Wang S, Fleisher AS, Zou T, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Wilson KT, James SP, Silverberg SG, Nishizuka S, Terashima M, Motoyama T, Meltzer SJ. SJE-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92: 569-573

[32]Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. Papillomaviridae: the viruses and their replication[M]. *Fields virology*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers, 1996: 947-948

[33]De Villiers. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2003, 103(6): 705-708

[34]Delvenne P, Herman L, Kholod N, Caberg JH, Herfs M, Boniver J, Jacobs N, Hubert P. Role of hormone cofactors in the human papillomavirus induced carcinogenesis of the uterine cervix[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2007, 264(1-2): 1-5

[35]Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression[J]. *Trends Biotechnol*, 2004, 22(7): 346-353

[36]Chiapello H, Lisacek F, Caboche M, Hénaut A. Codon usage and gene function are related in sequences of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Gene*, 1998, 209(1-2): GC1-GC38

[37]Powell JR, Sezzi E, Moriyama EN, Gleason JM, Caccone A. Caccone A Analysis of a shift in codon usage in *Drosophila*[J]. *J Mol Evol*, 2003, 57(Suppl.1): S214-S225

[38]Powell JR, Moriyama EN. Evolution of codon usage bias in *Drosophila*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(15): 7784-7790

[39]Liu Q, Dou S, Ji Z, Xue Q. Synonymous codon usage and gene function are strongly related in *Oryza sativa*. *Biosystems*[J], 2005, 80(2): 123-131

[40]Duret L, Mouchiroud D. Expression pattern and surprisingly gene length shape codon usage in *Caenorhabditis*, *Drosophila* and *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(8): 4482-4487

[41]Carlini DB, Chen Y, Stephan W. The relationship between third codon position nucleotide content, codon bias, mRNA secondary structure and gene expression in the *Drosophila* alcohol dehydrogenase genes *Adh* and *Adhr*[J]. *Genetics*, 2001, 159(2): 623-633

[42]Sajau H, Washio T, Saito R. Correlation between sequence conservation of the 5'untranslated region and codon usage bias in *Mus musculus* genes [J]. *Gene*, 2001, 276(1-2): 101-105

[43]Stenstrom CM, Jin HN, Major LL. Codon bias at the 3' side of the initiation codon is correlated with translation initiation efficiency in *Escherichia coli* [J]. *Gene*, 2001, 263(1-2): 273-284

[44]Fedorov A, Saxonov S, Gilbert W. Regularities of context dependent codon bias in eukaryotic genes[J]. *Nucleic Acids*

Res, 2002, 30 (5) :1192-1197

[45]Ohno S. Universal rule for coding sequence construction: TA/GC deficiency2TG/CT excess[J]. P roc Natl Acad Sci U SA, 1988, 85 (24) : 9630- 9634

[46]Karlin S, Campbell A M ,M razek J.Comparative DNA analysis acro ss diverse genomes[J]. A nnu Rev Genetics, 1998, 32: 185- 225

[47]石秀凡, 黄京飞, 柳树群, 刘次. 全人类基因同义密码子偏好的特征以及与基因GC含量的关系[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29 (3) : 411-414

[48] Rodriguez-T relles F, Tarrio R,A yala F J. Switch in codon bias and increased rates of Am ino Acid substitution in the D rosop h ila saltans species group [J]. Genetics, 1999, 153 (1) : 339- 350

[49]Mo riyama E N , Powell J R. Gene length and codon usage bias in Drosop h ila m elanog aster, S accharomy ces cerevisiae and E scherich ia coli[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26 (13) : 3188- 3193

[50]Mo riyama E N , Powell J R. Codon usage bias and tRNA abundance in Drosophila [J]. J Mo l Evol, 1997, 45 (5) : 514- 523

[51]Moszer I, Rocha E P C, Danch in A. Codon usage and lateral gene transfer in B acillus subtilis[J]. Current Op inion in M icrobiology, 1999, 2 (5) : 524- 528

[52]顾万君, 马建民, 周童, 孙啸, 陆祖宏. 不同结构的蛋白编码基因的密码子偏性研究[J]. 生物物理学报, 2002, 18 (1): 81- 86

[53]石秀凡, 黄京飞, 梁宠荣, 柳树群, 谢君, 刘次. 全人类基因中同义密码子的偏好与密码子2反密码子间的结合强度密切相关吗? [J]. 科学通报, 2000, 45 (23): 2520- 2525

[54]Morton B R.Selection on the codon bias of chlorop last and cyanelle genes in different plant and algal lineages[J]. J Mo l Evo l, 1998, 46(4) : 449- 459

[55]Bonekamp F, Dalboge H, Christensen T, Jensen KF.Translation rates of individual codons are not correlated with tRNA abundances or with frequencies of utilization in Escherichia coli. [J].J Bacteriol, 1989, 171(11): 5812-5816

[56] Dos RM, Wernisch L, Savva R. Unexpected correlations between gene expression and codon usage bias from microarray data for the whole Escherichia coli K-12 genome[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(23): 6976-6985

[57] Singh ND, Davis JC, Petrov DA. X-linked genes evolve higher codon bias in Drosophila and Caenorhabditis. Genetics[J], 2005, 171(1): 145-155

[58]Xia X.Maximizing transcription efficiency causes codon usage bias. Genetics[J], 1996, 144(3): 1309-1320

[59]Coghlan A, Wolfe KH. Relationship of codon bias to mRNA concentration and protein length in Saccharomyces

cerevisiae[J]. Yeast, 2000, 16(12): 1131-1145

[60] MA Jian-Min, GU Wan-Jun, ZHOU Tong . Method for the design of mRNA detecting genechip based on codon usage bias. Journal of Southeast University (Natural Science Edition) [J], 2002,32(4): 581-585

[61]Zhang Z ,Gildersleeve J, Yang Y Y . A new strategy for the synthesis of glycoproteins[J] . Science , 2004 ,303(5636) : 371-373

第二部分 实验内容

第一章

新疆维吾尔族宫颈癌患者的HPV16基因组克隆及序列分析

摘要 高危型人乳头瘤病毒与宫颈癌的发生密切相关，在宫颈癌组织中常检测到的高危型是 16 型和 18 型，新疆维吾尔族族的宫颈癌发生主要与 HPV16 的感染相关。为了更好了解新疆 HPV16 与宫颈癌的关系，本研究根据 HPV16 L2 基因保守序列设计引物，采用 LA-PCR 扩增的方法，从新疆维吾尔族宫颈癌患者宫颈组织中克隆获得 HPV16 基因组并用 Southern 杂交分析 LA-PCR 产物，实验结果表明 LA-PCR 产物是 HPV16 片段，不是 HPV18 片段。将 LA-PCR 产物克隆到 pCR®-XL-TOPO® 载体，测序结果表明新疆 HPV16 大小为 7963bp，是世界上已报道的最长的 HPV16，其包含 2606 个腺嘌呤、1392 个胞嘧啶、1537 个鸟嘌呤、2428 个胸腺嘧啶，GC 含量为 36.8%。与 GenBank 已发表的 HPV16 同源比对，与新疆 HPV16 同源关系较近是基因序列号是 af125673、ay686580、ay686583、eu118173。新疆 HPV16 E1 基因内部存在 63 个核苷酸重复，是导致新疆 HPV16 长度大于其它已公布的原因。本研究是中国新疆第一次有关于 HPV16 全基因组序列分析的报道。

关键词 16 型人乳头状瘤病毒，序列分析，最长的 HPV6 基因组，进化树分析，E1 基因重复

Cloning and Genomic Sequence Analysis of a HPV16 Isolated from Uygur Cervical Cancer Patients in Xinjiang, China

Abstract The development of cervical cancer is highly associated with human papillomavirus (HPV) infection. HPV16 and HPV18 are the prototypical high-risk HPV types and are found in the majority of cervical tumors. HPV16 is the most prevalent human papillomavirus enotype found in Uygur cervical cancer patients of Xinjiang, China. To a better understanding of the Xinjiang HPV16 association with a potentially greater oncogenicity. The Xinjiang HPV16 was isolated from an Uygur cervical cancer

patients from southern Xinjiang autonomy region, China. The Xinjiang HPV16 was amplified by LA-PCR using HPV L2 consensus primers. Typing of HPV was performed by Southern hybridization analysis of the LA- PCR products using HPV16 specific oligonucleotide probes(E1 gene of HPV16). Southern hybridization experiments revealed LA-PCR product was HPV16 not HPV18.The LA-PCR product of Xinjiang HPV16 was cloned into pCR®-XL-TOPO® vector and sequenced. The Xinjiang HPV16 consists of 7963 base pairs (bp) and has a base composition of 2606 adenine (32.7%), 1392 cytosine (17.5%), 1537 guanine (19.3%), 2428 thymine (30.5%), and a GC content of 36.8 %.Sequence comparison with other HPV16 strains selected from GenBank revealed that The Xinjiang HPV16 has a high sequence homology to those of other PEDV isolates,Which were af125673, ay686580 , ay686583 , eu118173 and was the largest HPV16 genome sequenced to date. There was insertion in the Xinjiang HPV16 *E1* gene,which is reason that genome of XinjaingHPV16 is longer than other HPV16. This study is the first description of the full-length genomic sequences of HPV16 isolated from Xinjiang, China for the first time.

Keywords Human papillomavirus16;nucleotide sequence;The largest HPV16 genome;Phylogenetic analysis;*E1* gene repeats

宫颈癌是第二大的女性恶性肿瘤^[1], 世界各地宫颈癌的发病率变化与地域、民族有关^[2-3], 几乎所有宫颈癌的发生与感染 HPV 有关^[4-7]。在宫颈癌患者宫颈组织 HPV 的检出率高于 93%, 其中 HPV16 是最常见的, 大约占 50%^[8]。

新疆是宫颈癌高发区, 宫颈癌发病率 459-590/10 000, 居全国少数民族的第一^[9]。新疆维吾尔族妇女宫颈癌主要和感染 HPV16 相关, HPV16 的检出率大约为 80%^[10-12]。研究发现近年来新疆宫颈癌的发病率呈现上升趋势^[13], 目前为止有关新疆 HPV16 全基因组序列没有报道, 对其基因组的分析, 有利于了解新疆病毒变异, 并预测结构的变化与功能关系。

1 材料与方法

1.1 宫颈癌组织

宫颈癌组织采于 2007 年 3 月新疆医科大学附属第三医院 1 例宫颈癌手术标本(经病理检查确诊), 患者为维吾尔族, 年龄 45 岁, 术前未进行放化疗。

1.2 主要试剂及材料

Taq、LA Taq DNA 聚合酶和反转录试剂盒（购自 fermentas 公司）；质粒提取和胶回收试剂盒（购自 qiagen 公司公司）；TOPO® XL PCR® 克隆试剂盒（购自 Invitrogen 公司）；电转化感受态 Top10 菌（购自 TaKaRa 公司）；Southern 试剂盒（购自 Roche 公司）；核酸内切酶（购自 TaKaRa 公司）；DNA marker （购自 TaKaRa 公司）

1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 中发表的 HPV16 基因组的保守序列设计引物, 利用 DNAMAN 软件设计扩增新疆 HPV16 的引物 HPV16FP。HPV16FP1 的序列为：5'-ATAGGGCCCTTCTGATCCTTCTATAGTTTCTTTAGTG-3'； HPV16FP2 的序列为：5'-ATAGGGCCCACAGGATCTACTGTTAAAGG-3'。引物由大连宝生物工程有限公司合成。同时设计引物用于测定新疆 HPV16 序列，引物见表 1。

表 1 用于测定新疆 HPV16 序列的引物

引物名称	引物序列
L2Ap2	5'-GCAGGTGTGGTATCAGTTGAAGTAGTAA-3'
L2Bp1	5'-CTTCCATTCCCCCAGATGTATC-3'
L2Cp1	5'-TTTACATAGGCCAGCATTAAACCTCT-3'
L1Ap1	5'-ATTCTTATAGTTCCAGGGTCTCCA-3'
L1Bp1	5'-TTTAATTGGTTGCAAACCACCTATAG-3'
L1Cp1	5'-CAAATATGTCATTATGTGCTGCCA-3'
URRFP1	5'-ATAGGGCCCCGCTGTAAAGTATTGTATGTATGTTG-3'
URRFP2	5'-ATAGGGCCCCATTGCAGTTCTCTTTTGG-3'
E6P1	5'-CAATGTTTCAGGACCCACAGG-3'
E6P2	5'-TGCATGATTACAGCTGGGTTTC-3'
E7p1	5'-CACGTAGAGAAACCCAGCTGTAA-3'
E7p2	5'-GCAGGATCAGCCATGGTAGATT-3'
E1Ap1	5'-TTGTGTGCCCCATCTGTTCTC-3'
E1Bp1	5'-AGATGTTACAGGTAGAAGGGCGC-3'
E1Cp1	5'-TGTATGATGATAGAGCCTCCAAAATT-3'

E1Dp2	5'-TGGTCACGTAGGTCTGTACTATCATTT-3'
E2Ap1	5'-TAAGTTTGCACGAGGACGAGG-3'
E2Bp1	5'-AGTATGGGAAGTTCATGCGGG-3'
E5P1	5'-GATACTGCATCCACAACATTACTGG-3'
L2Ap1	5'-TTAATACATACACATGCACGCTTTTTA-3'

1.4 宫颈癌组织DNA的提取及LA-PCR扩增新疆HPV16

以按AxyPrep™ mutiprep genomic DNA maxiprep kit (Axygen, USA) 说明书提取的宫颈癌组织DNA作为模板, 加HPV16 FP引物, 按fermentas公司提供LA Taq DNA聚合酶说明书扩增HPV16E6基因片段。扩增参数: 95℃ 5 min; 94℃ 30 S, 55℃ 30 S, 68℃ 7 min, 35个循环; 68℃ 10min。取5 ul LA-PCR产物在1%琼脂糖、1 × TAE中电泳, EB染色, 紫外灯下观察结果。

1.5 Southern blot 分析LA-PCR产物

按照 DIG High Primer DNA Labeling and Detection Starter Kit II instructions, 用地高辛-11dUTP(Boehringer—Mannheim)标记HPV16E1全长做为探针。按Boehringer Mannheim说明书程序, 用HPV16E1探针对经1.0% 琼脂糖凝胶电泳后转移至Nylon膜(Amershan)上的DNA进行Southern blot分析。分析的DNA包括0.2ug不酶切或经过*Bam*H1, *Pma*C1, *Kpn*I 酶切LA-PCR 产物。

1.6 pCR®-XL-TOPO®-XJHPV16重组质粒的构建与新疆HPV16全长序列分析

按照pCR®-XL-TOPO®说明书将LA-PCR 产物回收的片段与克隆载体pCR®-XL-TOPO®进行连接, 并电转化到大肠杆菌TOP10中, 37 °C摇床孵育1 h后涂布含50mg/LKana的LB选择平板, 37 °C培养过夜。次日随机挑取阳性菌落, 碱裂解法小量提取质粒。*Xho* I、*Apa* I及*Bam*H1单酶切, 琼脂糖电泳鉴定正确后, 将重组质粒分别送往上海生工、北京天根生物公司测序。

1.7 序列分析

应用DNAMAN生物软件分析序列并与GenBank中发表的HPV16基因组序列进行BLAST比较。MEGA3.1 软件构建Neighbor-Joining系统进化树, Bootstrap次数设置为1000。

2.结果与分析

2.1 宫颈癌组织中新疆HPV16全长的扩增结果 LA-PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果, 可见一清晰

扩增条带， 大小约为8kb， 预期HPV16大小基本一致（图1）。

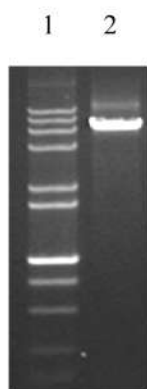


图1 LA-PCR 扩增新疆 HPV16 全长

Fig.1.LA-PCR product of Xinjiang HPV16 gene on 1% gel.

Lane 1, Marker DL15000 and Marker DL2000 ; Lane 2, LA- PCR product of Xinjiang HPV16

2.2 Southern blot 鉴定LA-PCR产物

HPV16 E1 探针与不酶切LA-PCR产物杂交印记大小约为8kb， 与经过*Bam*HI 酶切LA-PCR产物杂交印记大小约为6kb， 与经过*Pma*CI 酶切LA-PCR产物杂交印记大小约为5kb， 与经过*Kpn*I 酶切LA-PCR产物杂交印记大小约为3.5kb。从上述Southern blot 印记结果表明LA-PCR 产物为HPV16， 而不是HPV18（图2）。

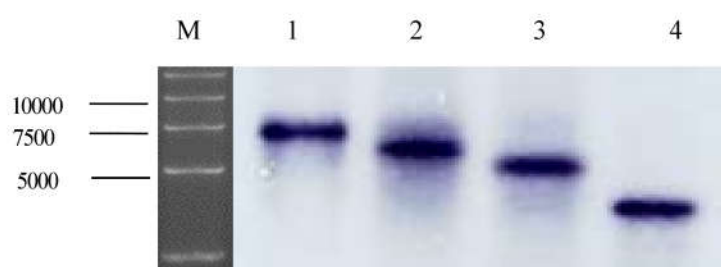


图2 Southern blot 鉴定LA-PCR产物

Fig.2 Southern bolt analysis of LA-PCR product with probe HPV16 E1 gene

M:DL15000;Lane1, undigested LA- PCR product of Xinjiang HPV16 ; Lane2, LA- PCR product of

Xinjiang HPV16 digested with *Bam*HI; Lane3, LA- PCR product of Xinjiang HPV16 digested with *Pmac* I;

2.3 pCR®-XL-TOPO®-XJHPV16重组质粒的构建并测序

用限制性内切酶*Xho*I、*Apa*I及*Bam*HI 酶切pCR®-XL-TOPO®-XJHPV16，琼脂糖凝胶电泳检测结果表明重组质粒pCR®-XL-TOPO®-XJHPV16构建成功（图3）。测序结果表明新疆HPV16大小为7963bp，是世界上已报道的最长的HPV16，其包含2606个腺嘌呤、1392个胞嘧啶、1537个鸟嘌呤、2428个胸腺嘧啶，GC的含量为36.8%（新疆HPV16全长附在本章参考文献之后）。新疆HPV16E1基因内部存在63个核苷酸重复序列，其为：CGCCATGAGACTGAAACACCATGTAGTCAGTATAGTGGTGGGAAGTGGGGGTGGTTGCAGTCAG。

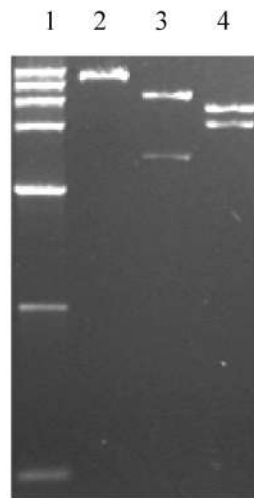


图3 pCR®-XL-TOPO®-XJHPV16重组质粒

Fig.3 Restriction enzyme analysis of the recombinant plasmid pCR®-XL-TOPO®-XJHPV16

Lane 1 , Marker DL 15000; Lane2, pCR®-XL-TOPO®-XJHPV16 digested by *Xho* I;

Lane3, pCR®-XL-TOPO®-XJHPV16 digested by *Apa* I ; Lane4, pCR®-XL-TOPO®-XJHPV16 digested by *Bam*HI

2.4 同源比对及核苷酸序列系统发生树分析

将新疆HPV16核酸序列GenBank中发表的HPV16基因组序列进行相似性分析，结果新疆HPV16与世界上已公布的HPV16基因组的同源性在97.9–99.8%（表2）。并根据核酸序列应用MEGA3.1 软件构建Neighbor-Joining系统进化树,从进化树结果可以表明，与新疆HPV16同源关系较近其它HPV16基因序列号是af125673、ay686580 、ay686583 、eu118173（图4）。

组变异会影响其生物学功能^[20,21,22]，其中包括致癌能力^[23,24,25,26]。新疆是宫颈癌高发区，HPV16在维吾尔族妇女宫颈癌患者检出率很高^[9-12]。研究新疆HPV16基因组变异与新疆高发病率关系是非常必要、有价值。本研究克隆了新疆维吾尔族宫颈癌患者的HPV16基因组并对其进行序列分析，有利了解新疆HPV16基因组变异与致癌能力变化的关系。

本研究克隆新疆HPV16并对其序列进行测定，这是第一次有关HPV16全长序列的报道。测序结果表明新疆HPV16全长大小为7963bp，与GenBank中已有的HPV16比较，发现新疆HPV16是世界上已报道最长的HPV16，与新疆HPV16同源关系较近其它HPV16基因序列号是af125673、ay686580、ay686583、eu118173。新疆HPV16 E1内部存在63个碱基重复，这是导致新疆HPV16基因组比世界上其它HPV16长的主要原因。

HPV16 E1蛋白是病毒复制必须的^[27]，63个碱基重复影响E1功能有待于深入探讨。

参考文献(References)

- [1] Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000[J]. Lancet Oncol, 2001, 2(9): 533-543
- [2] Parkin DM, Whelan SK, Ferlay J. Cancer incidence in five continents[M]. Vol. VII. IARC, Scientific Publications, 1997
- [3] Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990[J]. Int J Cancer, 1999, 83:18-29
- [4] H. zur. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers[J]. Cancer Res, 1989, 49:4677 - 4681
- [5] Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer[J]. J Clin Pathol, 2002, 55:244-65
- [6] Burd EM. Human Papillomavirus and cervical cancer[J]. Clin Microbiol Rev, 2003, 16(1):1-17
- [7] zur Hausen H. Papillomavirus infections—a major cause of human cancers[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1288(2): F55-78
- [8] Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group[J]. J Natl Cancer Inst. 1995, 87(11):796-802
- [9] 拉莱·苏祖克. 不同民族妇女中 2727 例子宫颈癌的统计学分析[J]. 新疆医学院学报, 1990, 9: 48
- [10] 古扎丽努尔·阿布力孜, 林卫, 彭芝兰. 宫颈癌高发区新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中HPV DNA的测定[J].

实用癌症杂志, 2001, 16(3): 271-274

[11]拉莱·苏祖克, 古丽娜·库尔班。维吾尔族妇女子宫颈癌中p53基因的表达和HPVDNA检测研究[J]。新疆医学院学报, 1997, 20(2): 77-81

[12]李庭芳, 古丽娜·库尔班, 王 涛。新疆伽师县夏普桃勒乡妇女子宫颈癌防治研究[J]。新疆医学院学报, 1996, 19(3): 199-203

[13]拉莱·苏祖克, 彭玉华, 周康。新疆不同民族子宫颈鳞癌发病趋势分析[J]。新疆医科大学报, 2006, 29(7): 569-571

[14] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment[J]. Brief Bioinform., 2004, 5(2): 150-163

[15] Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis[J]. Br J Cancer, 2003, 89(1): 101-105

[16] Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis[J]. Br J Cancer, 2003, 88(1): 63-73

[17] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses[J]. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum., 1995, 64: 1-378

[18] Munoz, N., F. X. Bosch, S. de Sanjose, R. Herrero, X. Castellsague, K. V. Shah, P. J. Snijders, and C. J. Meijer. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 348: 518-527

[19] Bosch, F. X., M. M. Manos, N. Munoz, M. Sherman, A. Jansen, J. Peto, M. Schiffman, V. Moreno, R. Kurman, K. Shah, and I. S. Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective[J]. J. Natl. Cancer Inst, 1995, 87: 796-802

[20] Villa, L. L., L. Sichero, P. Rahal, O. Caballero, A. Ferenczy, T. Rohan, and E. L. Franco. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia[J]. J Gen. Virol, 2000, 81: 2959-2968

[21] Xi, L. F., L. A. Koutsky, D. A. Galloway, J. Kuypers, J. P. Hughes, C. M. Wheeler, K. K. Holmes, and N. B. Kiviat. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia[J]. J Natl. Cancer Inst, 1997, 89: 796-802

[22] Zehbe, I., R. Tachezy, J. Mytilineos, G. Voglino, I. Mikyskova, H. Delius, A. Marongiu, L. Gissmann, E. Wilander, and

M. Tommasino. Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes[J]. *Int J Cancer*, 2001,94:711–716

[23] Berumen, J., R. M. Ordonez, E. Lazcano, J. Salmeron, S. C. Galvan, R. A. Estrada, E. Yunes, A. Garcia-Carranca, G. Gonzalez-Lira, and A. Madrigal- de la Campa. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study[J]. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001,93:1325–1330

[24] Hildesheim, A., M. Schiffman, C. Bromley, S. Wacholder, R. Herrero, A. Rodriguez, M. C. Bratti, M. E. Sherman, U. Scarpidis, Q. Q. Lin, M. Terai, R. L. Bromley, K. Buetow, R. J. Apple, and R. D. Burk. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer[J]. *J Natl. Cancer Inst*, 2001,93:315–318

[25] Xi, LF., LA. Koutsky, DA. Galloway, J. Kuypers, J. P. Hughes, C. M. Wheeler, K. K. Holmes, and N. B. Kiviat.. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia[J]. *J Natl. Cancer Inst*, 1997,89:796–802

[26] Villa, L L, L. Sichero, P Rahal, O Caballero, A. Ferenczy, T. Rohan, and E. L. Franco. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia[J]. *J Gen. Virol*, 2000, 81:2959–2968

[27] Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features[J]. *Virus Genes*, 2002,24(3):275-290

新疆HPV16全长序列

```
ACTACAATAA TTCATGTATAAACTAAGGG CGTAACCGAAATCGGTTGAA CCGAAACCG
GTTAGTATAAAAGCGGACATT TTATGCACCAAAAGAGAACT GCAATGTTTC AGGACCCA
CAGGAGCGACCC AGAAAGTTAC CACAGTTATG CACAGAGCTG CAAACAATA TACATG
ATAT AATATTAGAA TGTGTGTACT GCAAGCAACA GTTACTGCGA CGTGAGGTAT ATGACT
TTGC TTTTCGGGAT TTATGCATAG TATATAGAGA TGGGAATCCA TATGCTGTAT GTGATAA
ATGTTTAAAGTTT TATTCTAAAA TTAGTGAGTA TAGACATTAT TGTTATAGTG TGTATGGA
ACAACATTAGAA CAGCAATACA ACAAACCGTT GTGTGATTG TTAATTAGGT GTATTAAC
TGTCAAAAGCCA CTGTGTCCTG AAGAAAAGCAAAGACATCTG GACAAAAGC AAAGAT
TCCATAATATAAGG GGTCGGTGGA CCGGTCGATG TATGTCTTGT TGCAGATCAT CAAGAA
CACGTAGAGAAACC CAGCTGTAAT CATGCATGGA GATACACCTA CATTGCATGA ATATAT
GTTAGATTTGCAAC CAGAGACAAC TGATCTCTAC TGTTATGAGC AATTAAATGA CAGCTC
```

AGAGGAGGAGGATG AAATAGATGG TCCAGCTGGA CAAGCAGAAC CGGACAGAGCCC
ATTACAATATTGTAACCT TTTGTTGCAA GTGTGACTCT ACGCTTCGGT TGTGCGTACAA
AGCACACACGTAGACATTC GTACTTTGGA AGACCTGTTA ATGGGCACAC TAGGAATTG
TGTGCCCCATCTGTTCTCAGAA ACCATAATC TACCATGGCT GATCCTGCAG GTACCAAT
GG GGAAGAGGGTACGGGATGTA ATGGATGGTT TTATGTAGAG GCTGTAGTGG AAAAA
AAAAC AGGGGATGCTATATCAGATG ACGAGAACGAAAATGACAGT GATACAGGTG AA
GATTTGGT AGATTTTATAGTAAATGATA ATGATTATTT AACACAGGCA GACACAGAGA C
AGCACATGC GTTGTTTACT GCACAGGAAG CAAAACAACA TAGAGATGCA GTACAGGT
TC TAAAACGAAA GTATTTGGGTAGTCCACTTA GTGATATTAG TGGATGTGTAGACAATA
ATATTAGTCCTAG ATTAAAAGCTATATGTATAG AAAAACAAAG TAGAGCTGCAAAAAGG
AGAT TATTTGAAAA CGAAGACAGCGGGTATGGCAATACTGAAGT GGAAACTCAG CAG
ATGTTAC AGGTAGAAGG GCGCCATGAGACTGAAACAC CATGTAGTCA GTATAGTGGTG
GAAGTGGGG GTGGTTGCAG TCAGCGCCATGAGACTGAAA CACCATGTAG TCAGTATAG
TGGTGGAAGTG GGGGTGGTTG CAGTCAGTACAGTAGTGGAA GTGGGGGAGA GGGTGT
TAGT GAAAGACACA CTATATGCCA AACACCACTTACAAATATTT TAAATGTACT AAAAA
CTAGT AATGCAAAGG CAGCAATGTT AGCAAAATTTAAAGAGTTAT ACGGGGTGAG TTTT
TCAGAA TTAGTAAGAC CATTAAAAG TAATAAATCAACGTGTTGCG ATTGGTGTAT TGCT
GCATTT GGACTTACAC CCAGTATAGC TGACAGTATAAAAACACTAT TACAACAATA TTGT
TTATAT TTACACATTC AAAGTTTAGC ATGTTTATGGGGAATGGTTG TGTTACTATT AGTAA
GATAT AAATGTGGAA AAAATAGAGAAACAATTGAAAAATTGCTGT CTAAACTATT ATGTG
TGTCT CCAATGTGTA TGATGATAGA GCCTCCAAAATTGCGTAGTA CAGCAGCAGC GTTA
TATTGG TATAAACAG GTATATCAAA TATTAGTGAAGTGTATGGAG ACACGCCAGA ATG
GATACAA AGACAAACAG TATTACAACA TAGTTTTAATGATTGTACAT TTGAATTATC ACA
GATGGTA CAATGGGCCT ACGATAATGA CATAGTAGACGATAGTGAAA TTGCATATAAATG
TGCACAA TTGGCAGACA CTAATAGTAA TGCAAGTGCCTTTCTAAAAA GTAATTCACA GG
CAAAAATT GTAAAGGATT GTGCAACAAT GTGTAGACATTATAAACGAG CAGAAAAAAA

ACAAATGAGT ATGAGTCAAT GGATAAAATA TAGATGTGATAGGGTAGATG ATGGAGGTG
A TTGGAAGCAA ATTGTTATGT TTTTAAGGTA TCAAGGTGTAGAGTTTATGT CATTTTTAA
C TGCATTAAAA AGATTTTTGC AAGGCATACC TAAAAAAATTGCATATTAC TATATGGTG
C AGCTAACACA GGTAATCAT TATTTGGTAT GAGTTTAATGAAATTTCTGC AAGGGTCT
GT AATATGTTTT GTAAATTCTA AAAGCCATTT TTGGTTACAACCATTAGCAGATGCCAAA
ATAGGTATGTTA GATGATGCTA CAGTGCCCTG TTGGAAC TACATAGATGACA ATTTAAGA
AA TGCATTGGAT GGAAATTTAG TTTCTATGGA TGTAAGCATAGACCATTGG TACAAC TA
AAATGCCCTCCA TTATTAATTA CATCTAGCAT TAATGCTGGTACAGATTCTA GGTGGCCTT
A TTTACATAAT AGATTGGTGG TGTTTACATT TCCTAATGAGTTTCCATTG ACGAAAACGG
AAATCCAGTG TATGAGCTTA ATGATAAGAA CTGGAAATCCTTTTTCTCAA GGACGTGGTC
CAGATTAAAGT TTGCACGAGG ACGAGGACAA GGAAAACGATGGAGACTCTT TGCCAACG
TT TAAATGTGTG TCAGGACAAAATACTAACAC ATTATGAAAATGATAGTACA GACCTACG
TGACCATATAGA CTATTGGAAA CACATGCGCC TAGAATGTGCTATTTATTAC AAGGCCAG
AG AAATGGGATT TAAACATATT AACCACCAGG TGGTGCCAACACTGGCTGTA TCAAAG
AATAAAGCATTACA AGCAATTGAA CTGCAACTAA CGTTAGAAACAATATATAAC TCACA
ATATA GTAATGAAAA GTGGACATTA CAAGACGTTA GCCTTGAAGTGTATTIAACT GCAC
CAACAG GATGTATAAAAAACATGGA TATACAGTGG AAGTGCAGTTTGATGGAGAC ATA
TGCAATA CAATGCATTA TACAACTGG ACACATATAT ATATTTGTGAAGAAGCATCA GTA
ACTGTGG TAGAGGGTCA AGTTGACTAT TATGGTTTAT ATTATGTTTCATGAAGGAATA CGA
ACATATT TTGTGCAGTT TAAAGATGAT GCAGAAAAAT ATAGTAAAAATAAAGTATGG GA
AGTTCATG CGGGTGGTCA GGTAATATTA TGTCTACAT CTGTGTTTAGCAGCAACGAA G
TATCCTCTC CTGAAATTAT TAGGCAGCAC TTGGCCAACC ACTCCGCCGCGACCCATACC
AAAGCCGTCG CCTTGGGCAC CGAAGAAACA CAGACGACTA TCCAGCGACCAAGATCA
GAG CCAGACACCG GAAACCCCTG CCACACCACT AAGTTGTTGC ACAGAGACTCAGT
GGACAGT GCTCCAATCC TCACTGCATT TAACAGCTCA CACAAAGGAC GGATTAAC TG
TAATAGTAAC ACTACACCCA TAGTACATTT AAAAGGTGAT GCTAATACTT TAAAATGTT

TAAGATATAGA TTAAAAAGC ATTGTACATT GTATACTGCA GTGTCGTCTA CATGGCAT
TGGACAGGACAT AATGTAAAC ATAAAAGTGC AATTGTTACA CTTACATATG ATAGTG
AATGGCAACGTGAC CAATTTTTGT CTCAAGTTAA AATACCAAAA ACTATTACAG TGTC
TACTGGATTTATGTCT ATATGACAAA TCTTGATACT GCATCCACAA CATTACTGGC GTG
CTTTTTGCTTTGCTTTT GTGTGCTTTT GTGTGTCTGC CTATTAATAC GTCCGCTGCT TTT
GTCTGTGTCTACATACA CATCATTAAT ACTATTGGTA TTACTATTGT GGATAACAGC AGC
CTCTGCGTTTAGGTGTT TTATTGTATA TATTGTATTT GTTTATATAC CATTATTTTT AATAC
ATACACATGCACGCT TTAAATTACA TAATGTATAT GTACATAATG TAATTGTTAC ATATAAT
TGTTGTATACCAT AACTTACTAT TTTTCTTTT TTATTTTCAT ATATAATTT TTTTTTGTTT
GTTTGTTTTT TAATAAACTG TTATCACTTA ACAATGCGAC ACAAACGTTT TGCAAAACG
CACAAAACGTG CATCGGCTAC CCAACTTTAT AAAACATGCA AACAGGCAGG TACATG
TCCACCTGACATTA TACCTAAGGT TGAAGGCAAA ACTATTGCTG ATCAAATATT ACAAT
ATGGAAGTATGGGTG TATTTTTTGG TGGGTTAGGA ATTGGAACAG GGTCGGGTAC AGG
CGGACGCACTGGGTATA TTCCATTGGG AACAAGGCCT CCCACAGCTA CAGATACACT T
GCTCCTGTAAGACCCCCTT TAACAGTAGA TCCTGTGGGC CCTTCTGATC CTTCTATAGT T
TCTTTAGTTGAAGAACTA GTTTTATTGA TGCTGGTGCA CCAACATCTG TACCTTCCAT T
CCCCCAGATGTATCAGGAT TTAGTATTAC TACTTCAACT GATACCACAC CTGCTATATT AG
ATATTAATAATACTGTTA CTACTGTTAC TACACATAAT AATCCCACTT TCACTGACCC ATCT
GTATTGCAGCCTCCAA CACCTGCAGAACTGGAGGG CATTTTACAC TTTCATCATC CACT
ATTAGTACACATAATT ATGAAGAAAT TCCTATGGAT ACATTTATTG TTAGCACAAA CCCTA
ACACAGTAACTAGTA GCACACCCAT ACCAGGGTCT CGCCCAGTGG CACGCCTAGG ATT
ATATAGTCGCACAACAC AACAAGTTAA AGTTGTAGAC CCTGCTTTTG TAACCACTCC CA
CTAAACTTATTACATATG ATAATCCTGC ATATGAAGGT ATAGATGTGG ATAATACATT ATAT
TTTTCTAGTAATGATA ATAGTATTAA TATAGCTCCA GATCCTGACT TTTTGGATAT AGTTGC
TTTACATAGGCCAG CATTAAACCTC TAGGCGTACT GGCATTAGGT ACAGTAGAAT TGGTA
ATAAACAAACACTAC GTACTCGTAG TGGAAAATCT ATAGGTGCTA AGGTACATTA TTAT

TATGATTTTAGTACTA TTGATCCTGC AGAAGAAATA GAATTACAAA CTATAACACC TT
CTACATATACTACCACTT CACATGCAGC CTCACCTACT TCTATTAAATA ATGGATTATA TG
ATATTTATGCAGATGACT TTATTACAGA TACTTCTACA ACCCCGGTAC CATCTGTACC CT
CTACATCTTTATCAGGTT ATATTCCTGC AAATACAACA ATTCCTTTTG GTGGTGCATA CA
ATATTCCTTTAGTATCAG GTCCTGATAT ACCCATTAAT ATA ACTGACC AAGCTCCTTC AT
TAATTCCTATAGTTCCAG GGTCTCCACA ATATACAATT ATTGCTGATG CAGGTGACTT TT
ATTTACATCCTAGTTATT ACATGTTACG AAAACGACGT AAACGTTTAC CATATTTTTT TT
CAGATGTCTCTTTGGCTG CCTAGTGAGG CCACTGTCTA CTTGCCTCCT GTCCCAGTAT C
TAAGGTTGTAAGCACGGAT GGATATGTTG CACGCACAAA CATATATTAT CATGCAGGAA
CATCCAGACTACTTGCAGTT GGACATCCCT ATTTTCCTAT TAAAAAACCT AACATAACA
AAATATTAGTTCCTAAAGTA TCAGGATTAC AATACAGGGT ATTTAGAATA CATTTACCTG A
CCCCAATAAGTTTGGTTTT CCTGACACCT CATTTTATAA TCCAGATACA CAGCGGCTGGT
TTGGGCCTGTGTAGGTGTT GAGGTAGGTC GTGGTCAGCC ATTAGGTGTG GGCATTAGTG
GCCATCCTTTATTAAATAAA TTGGATGACA CAGAAAATGC TAGTGCTTAT GCAGCAAATG
CAGGTGTGGATAATAGAGAA TGTATATCTA TGGATTACAA ACAAACACAA TTGTGTTTAA
TTGGTTGCAAACCACCTATA GGGGAACACT GGGGCAAAGG ATCCCCATGT ACCAATGTT
G CAGTAAATCCAGGTGATTGT CCACCATTAG AGTTAATAAA CACAGTTATT CAGGATGGT
G ATATGGTTCATACTGGCTTT GGTGCTATGG ACTTTACTAC ATTACAGGCT AACAAAAGT
G AAGTTCCACTGGATATTTGT ACATCTATTT GCAAATATCC AGATTATATT AAAATGGTGT
CAGAACCATATGGCGACAGC TTATTTTTTT ATTTACGAAG GGAACAAATG TTTGTTAGAC
ATTTATTTAATAGGGCTGGT GCTGTTGGTG AAAATGTACC AGACGATTTA TACATTAAAGG
CTCTGGGTCTACTGCAAAT TTAGCCAGTT CAAATTATTT TCCTACACCT AGTGGTTCTA TG
GTTACCTCTGATGCCCAAATATTCAATA AACCTTATTG GTTACAACGA GCACAGGGCC AC
AATAATGGCATTGTGTTGG GGTAACCAAC TATTTGTTAC TGTTGTTGAT ACTACACGCAGTA
CAAATATGTCATTATGT GCTGCCATAT CTACTTCAGAACTACATAT AAAAATACTAACT
TAAGGAGTACCTACGA CATGGGGAGG AATATGATTT ACAGTTTATT TTTCAACTGT GCA

AAATAACCTTAACTGCA GACGTTATGA CATACATACA TTCTATGAAT TCCACTATTT G
GAGGACTGGAATTTTGGT CTACAACCTC CCCCAGGAGG CACACTAGAA GATACTTA
TA GGTTTGTAACATCCCAGGCAATTGCTTGTC AAAAACATAC ACCTCCAGCACCTAA
AGAAG ATCCCCTTAAAAAATACACT TTTTGGAAG TAAATTAAA GGAAAAGTTTT
CTGCAGACC TAGATCAGTTTCCTTTAGGA CGCAAATTTT TACTACAAGC AGGATTGAA
G GCCAAACCAA AATTTACATTAGGAAAACGAAAAGCTACAC CCACCACCTC ATCTA
CCTCT ACAACTGCTAAACGCAAAAAACGTAAGCTG TAAGTATTGT ATGTATGTTG AATT
AGTGTT GTTTGTTGTT TATGTGTTTGTATGTGCTTG TATGTGCTTG TAAATATTAA GTTGTA
TGTG TGTTTGTA TG TATGGTATAATAAACACGTG TGTATGTGTT TTAAATGCT TGTGTAA
CTA TTGTGTCATG CAACATAAATAAACTTATTG TTTCAACACC TACTAATTGT GTTGTGG
TTA TTCATTGTAT ATAACTATATTTGCTACAT CCTGTTTTTG TTTTATATAT ACTATATTTT G
TAGCGCCAG CGGCCATTTTGTAGCTCCAA CCGAATTCGG TTGCATGCTT TTTGGCACAAA
ATGTGTTTT TTAAATAGTTCTATGTCAG CAACTATAGT TTAACTTGT ACGTTTCCTG CT
TGCCATGC GTGCCAAATCCCTGTTTTCC TGACCTGCAC TGCTTGCCAA CCATTCCATT GT
TTTTTACA CTGCACTATGTGCAACTACT GAATCACCAT GTACATTGTG TCATATAAAA TAA
ATCACTA TGCGCCAACGCCTTACATAC CGCTGTTAGG CACATATTTT TGGCTTGTTT TAAC
TAACCT AATTGCATATTTGGCATAAG GTTTAAACTT CTAAGGCCAA CTAAATGTCACCCTA
GTTCA TACATGAACTGTGTAAAGGT TAGTCATACA TTGTTCAATT GTAAAACTGC ACATG
GGTGT GTGCAAACCGTTTTGGGTTA CACATTTACA AGCAACTTAT ATAATAATAC TAA

第二章

新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中HPV16 *E1* 多态型分析、*E1*核心片段的克隆及原核表达

摘要 目的 探讨新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中人乳头瘤病毒 16 型(human papillomavirus 16,HPV16)*E1* 基因的变异,分析新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织HPV16 DNA *E1* 多态性,同时克隆新疆 HPV16 *E1* 核心片段并行原核表达。方法 从41份中国新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌活检组织标本中提取 DNA,以此 DNA 为模板,PCR 扩增 HPV16 *E1* 全长基因,PCR 产物直接测序,分析新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织 HPV16 *E1* 基因多态性,同时将新疆 HPV16 *E1* 核心片段构建到原核表达载体 pMAL-p2x、pGEX-4T-1。结果 PCR 检测结果显示宫颈癌组织中 HPV16 *E1* 阳性率为 78%(32/41);测序和序列分析表明 *E1* 基因核苷酸多处发生变异,并引起编码氨基酸的变异;*E1* 基因在核苷酸水平上形成 11 种突变模式,各模式与 HPV16 原型比较,同源性在 96.67%~99.95%之间;在氨基酸水平上形成 5 种突变模式,各模式与 HPV16 原型比较,同源性在 99.7%~100%之间,其中 63 个重复突变在世界未见报道。利用大肠杆菌原核表达产物经过 SDS-PAGE 分析,结果表明在大肠杆菌中成功诱导融合蛋白表达。结论 中国新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中 HPV16 *E1* 基因发生多位点变异,并形成多种突变模式和突变主流模式;这些突变可能与 HPV16 的致癌能力和新疆宫颈癌高发存在一定的关系。

Polymorphism of HPV16 type *E1* genes from cervical carcinoma biopsies in Xinjiang Uygur women and cloning as well as expression of core fragment of *E1* gene

[Abstract] **Objective** To study the mutations of HPV16 type *E1* genes of cervical carcinoma biopsies from Uygur women in southern Xinjiang, and to analyze the changes of *E1* protein function. **Methods** The tissue DNA was extracted from cervical carcinoma biopsies. HPV16 *E1* genes were amplified by PCR, HPV16 type *E1* genes were sequenced and analyzed. **Results** The positive rate of HPV16 *E1* was 78%(32/41). We sequenced DNA found some mutations in comparison with the previously published sequence of prototype HPV16 *E1*. Some of the mutations changed the triplet codes, subsequently led to changes of amino acids. The mutations of all eleven HPV16 *E1* fragments formed eleven patterns at nucleic acid level. Compare to HPV16 prototype, their homology was 96.67%~99.95%. The mutations

of all eleven HPV16 *E1* fragments formed five patterns at amino acid level. **Conclusion** HPV16 type *E1* genes from cervical carcinoma biopsies had some mutations in Uygur women from southern Xinjiang , and formed eleven patterns as well as mainstream pattern. The research suggested that the mutations of HPV16 type *E1* genes can explain HPV16 phylogenesis and the high incidence of cervical cancer in southern Xinjiang.

[Key words] Human papillomavirus 16 ; Cervical carcinoma ;*E1* gene ; Sequence polymorphism

人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是一种致瘤DNA病毒,可引起人生殖道和肛门皮肤、粘膜发生良性和恶性肿瘤,其中与宫颈癌发病密切相关的有HPV16、HPV18等^[1-2]。HPV16基因组主要由早期基因区(E区)、晚期基因区(L区)和长控制区(long control region, LCR)组成, E区有6个开放读码框架(open reading—frame, ORF),即*E1*、*E2*、*E4*、*E5*、*E6*、*E7*^[3],其中HPV *E1*蛋白为病毒DNA复制起关键作用,通过与宿主多种蛋白作用而诱导病毒DNA合成^[4]。

HPV16 存在型内变异并导致HPV16的多态性, HPV16 变异谱系分布有着明显的地域差别,并依此将HPV16 分为欧洲型(E)、亚洲型(As)、亚裔美洲型(AA)、非洲1型(Af1)、非洲2型(Af2) 5个主要的种系发生群^[5-7]。病毒基因组中碱基突变可造成病毒生物学特性的改变,并继而影响该病毒的感染和转归^[8-10]。

新疆南部维吾尔族聚居区是宫颈癌高发区,患病率高达459~590/10万,已有的调查表明,新疆南部维吾尔族妇女高发宫颈癌与HPV16感染密切相关,其宫颈癌组织中HPV16检出率达77.6%~82.61%^[11-12]。我们已报道了新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中HPV16 *E6*基因^[13]和*L1*基因^[14], *L2*基因^[15], *URR*基因^[16]的变异情况。本文对新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中乳头状瘤病毒16型*E1*基因多肽性进行分析,以探讨该区宫颈癌组织中HPV16 *E1*基因突变的规律及其突变与该地区宫颈癌高发的可能关系。

1. 材料和方法

1.1 宫颈癌组织标本:采取2005年11月~2007年3月新疆医科大学肿瘤医院41宫颈癌手术或活检标本(经病理检查确诊为宫颈癌),患者均为新疆维吾尔族妇女,年龄30岁~66岁,中位年龄50岁,术前未进行放化疗。标本-80℃保存。

1.2 主要试剂 基因组提取试剂盒(购自Axygen公司)、Pfu DNA聚合酶(购自fermentas公司)、DNA

marker（购自TaKaRa公司）、PCR 片段回收试剂盒均购（购自北京天根生化科技有限公司）。

1.3 宫颈癌组织DNA的提取 按AxyPrep™ mutiprep genomic DNA maxiprep kit说明书进行。

1.4 引物设计 设计两对引物HPV16E1P1/2,HPV16core-E1p1/p2,分别用来扩增E1全长和核心片段。

HPV16E1P1: 5'-TTGTGTGCCCCATCTGTTCTC-3', HPV16E1P2: 5'-TGGTCACGTAGGTCTGT
ACTATCATTT-3'; HPV16core-E1p1: 5'-CCGGAATTCATGTTACAGGTAGAAGGG-3',

HPV16core-E1p2: 5'-GCGTCGACCTATAATGCAGTTAAAAATGACAT-3'。

1.4 HPV16 E1 基因PCR扩增 以宫颈癌组织DNA为模板, HPV16 E1 P1 和P2为引物扩增HPV16 E1 基因片段。扩增参数: 95℃ 5min ; 5℃ 1min , 55℃ 45s , 72℃2 min , 35个循环;72 °C7 min。

1.5 HPV16 E1 基因序列测定及分析 用PCR片段回收试剂盒从琼脂糖凝胶中回收HPV16 E1 PCR 产物, 送上海生工测序, 用DNAMAN version 5.2.2 软件对序列进行分析。

1.6 E1 核心片段的克隆及原核表达 用 HPV16core-E1p1/p2 克隆新疆 HPV16 E1 核心片段, 核心大小 1011bp, 将核心分别构建到原核表达载体 pMAL-p2x 、pGEX-4T-1 上, 利用大肠杆菌 BL21(DE3)原核表达系统进行蛋白表达。

2 结果

2.1 宫颈癌组织中HPV16 E1基因的扩增

琼脂糖凝胶电泳结果发现不同病料的基因组扩增的E1基因大小存在一定差异, 图1所示为2份样品PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果, 均可见约为2000bp大小的扩增条带, 其大小与预计相符。

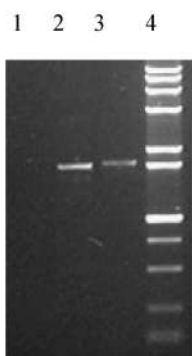


图1 PCR扩增HPV-16E1基因

Fig.1 Amplification of *E1* gene by PCR.

Lane 1: negative control; Lane 2: PCR product (2014 bp); Lane 3: PCR product (2077 bp) containing 63 nucleotides repeats in E1 gene; Lane 4: Marker DL15000 and Marker DL2000

2.2 41份宫颈癌组织HPV16 E1阳性率及E1基因重复率的统计

41份病料有32份病料扩增出HPV16 E1 基因, 32份PCR产物测序结果表明有16病料扩增出来的E1基因内部存在63个核苷酸重复(图2), 重复序列为: CGCCATGAGACTGAAACACCATGTAGTCAGTATAGTGGTGGGAAGTGGGGGTGGTTGCAGTCAG。

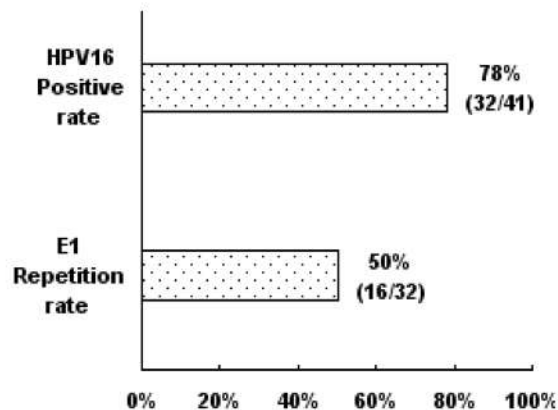


图2 41 病料 HPV-16E1 扩增阳性率和样品中 E1 重复率

Fig. 2 HPV16 E1 positive rate and E1 repetition rate in 41 samples

In the study, HPV16 positive rate is 78%(32/41), 32 samples of Uyгур cervical cancer patients tissues DNA in were amplified with HPV16E1 full gene. HPV16 E1 Repetition rate is 50% (16/32), There were 16 samples with 63 nucleotides repeats in E1 gene.

2.3 HPV16E1 基因序列测定及变异分析

32 个 E1 片段测序结果与德国标准株进行比较, 结果显示各分离株 E1 基因核苷酸多处发生变异(表 1)。32 个分离株 E1 基因在核苷酸水平形成 11 种突变模式, BLAST 和 DNAMAN version 5.2.2 分析表明, 各模式与 HPV16 原型比较, 同源性在 96.67%~99.95%之间, 在核酸序列的 189 位置、448-510 位置、660 位置发生突变的频率较高, 分别占 50%, 50%, 62.5%;在氨基酸水平上形成 5 种突变模式(表 2), 各模式与 HPV16 原型比较, 同源性在 99.7%~100%之间, 在蛋白质序列的 63 位置、150-170 位置突变频率较高, 均为 50%, 其中 150-170 位置的突变在世界未见报道。

表1 宫颈癌组织中HPV16 E1基因序列的变异分析

Table 1. Mutation analysis of HPV16 E1 gene sequence in cervical carcinoma tissue

	Variation positions at nuclear acid position of HPV16 E1 gene										
	117	189	256	391	429	448-510	556	651	660	1500	1698
REF	A	A	C	G	G	-	T	G	C	T	T
XJE01-XJE04	C	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-
XJE05-XJE020	-	C	-	-	-	63	-	-	T	-	-
XJE021-XJE024	-	-	T	A	A	-	C	A	-	-	G
XJE025-XJE028	-	-	T	-	-	-	C	A	-	-	G
XJE029-XJE032	-	-	-	-	-	-	C	A	-	G	-
Frequency of mutation (%)	4/32	16/32	8/32	4/32	4/32	16/32	12/32	12/32	20/32	4/32	8/32
	12.5	50	25	12.5	12.5	50	37.5	37.5	62.5	12.5	25

Note: frequency of the mutation stand for the number of each site mutation in all 32 HPV16 E1 fragments

Gene ID of REF in GenBank (NCBI) is 1489075.

表2 HPV16 E1 蛋白的变异

Table 2. Amino acid sequence variations among HPV16 E1 protein

	Variation positions at amino acid position of HPV16 E1 protein				
	39	63	150-170	186	220
REF	E	E	-	I	S
XJE01-XJE04	D	-	-	-	L
XJE05-XJE020	-	D	21	-	-
XJE021-XJE024	-	-	-	T	-
XJE025-XJE028	-	-	-	T	-
XJE029-XJE032	-	-	-	T	-
Frequency of mutation (%)	4/32	16/32	16/32	12/32	4/32
	12.5	50	50	37.5	12.5

Note: frequency of the mutation stand for the number of each site mutation in all 32 HPV16 E1 fragments

Gene ID of REF in GenBank (NCBI) is 1489075.

2.4 E1 核心片段的克隆及原核表达

将表达载体pMAL-p2x-E1、pGEX-4T-1-E1的转化菌BL21(DE3)通过IPTG诱导37℃诱导3h后进行SDS-PAGE检测，诱导菌液泳道分别可见一分子量约为77kDa、59 kDa的目的条带，以预期的结果相符（图3，图4）。

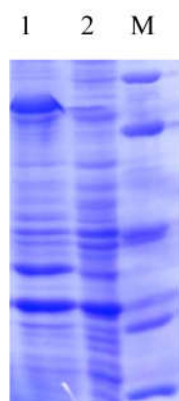


图 3 MBP-E1蛋白的表达

Fig 3 SDS-PAGE analysis of the expression of MBP-E1 in *E.coli*.

M: Protein molecular standard marker; 1: induced with 0.4 mM IPTG ; 2: protein expression without IPTG;

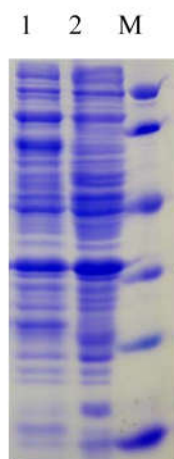


图 4 GST-E1蛋白的表达

Fig 4 SDS-PAGE analysis of the expression of pGEX-4T -E1 in *E.coli*.

M: Protein molecular standard marker; 1: induced with 0.4 mM IPTG ; 2: protein expression without IPTG;

3 讨论

宫颈癌是一类严重威胁妇女生命健康的疾病, 宫颈癌的发病率和死亡率高, 并有逐年上升的趋势。高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus , HPV) 与宫颈癌发病关系密切, 在80 %~90 % 的宫颈癌组织中可检测到HPV16 和HPV18 的存在, HPV16和HPV18 被认为是妇女宫颈癌的主要病原^[1-2]。然而, HPV 的存在并不是引发妇女宫颈癌的充分条件, 在一些正常的或轻微异常的宫颈组织中也可检测到HPV16 、 HPV18 的存在, 很多感染者无临床症状^[9], 病毒在体内呈潜伏状态, 已有的研究表明病毒的变异、病毒的持续性感染和反复感染、病毒DNA 拷贝数以及机体的免疫状态等因

素与高危型HPV 感染者发展为宫颈癌相关, 其中病毒的持续性感染和反复感染以及病毒DNA 在宫颈组织中的高拷贝数可由高危型HPV 的型内变异引起^[9,10]。

新疆南部维吾尔族聚居区是宫颈癌高发区。据资料显示, 新疆维吾尔族妇女宫颈癌的患病率高, 患病年龄较其他民族低, 宫颈癌以HPV16 感染为主^[11,12]。我们根据HPV16 德国标准株DNA 序列设计了一对引物, PCR 检测了41例宫颈癌组织, 其中32例扩增出HPV16 *E1* 基因, 进一步证明新疆维吾尔族妇女患宫颈癌以HPV16 感染为主。

基因序列分析表明, 32 个*E1* PCR 回收片段测序结果与德国标准株相比发生了不同程度的变异(表1、表2), 部分核苷酸突变引起编码氨基酸的变异, 另一些为同义突变。各分离株*E1*基因与HPV16 原型*E1*基因比较, 同源性在96.67%~99.95%之间; 各分离株*E1* 基因推导的氨基酸序列与HPV16 原型的*E1*蛋白氨基酸序列比较, 同源性在99.7 %~100 %之间, 以上结果表明HPV16 *E1*基因序列及其编码蛋白的氨基酸序列在新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中比较保守, 但仍然有多处发生突变, 各分离株*E1* 基因及其编码蛋白的氨基酸序列形成多种突变模式, 说明在新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中, HPV16 *E1* 基因和蛋白序列存在多态性, 并形成突变的主流模式。

本研究发现新疆HPV16*E1* 发生多位点突变, 其中448-510位置增加63个核苷酸重复, 该突变为世界上首次报道, 该突变是否影响*E1*蛋白功能有待于进一步研究。HPV *E1*蛋白在病毒DNA复制方面起关键作用, 通过与宿主多种蛋白作用而诱导病毒DNA合成^[4]。HPV *E1*蛋白由三个重要的结构域组成: (1) N末端结构域; (2) 解旋酶结构域; (3) DNA结合结构域。N末端结构域在病毒复制方面的具体作用不是很清楚, 但是该区域含有介导蛋白质由细胞质向细胞核内转运的核定位信号(nuclear localization signal, NLS)。解旋酶结构域含有齐聚和解旋能力。DNA结合结构域非常复杂, 其重要功能是寻找病毒的ori (复制起始序列)^[17]。新疆HPV16*E1*内部63个核苷酸重复位于DNA结合结构域, 研究该重复对*E1*蛋白功能的影响是很有必要。

参考文献(References)

- [1]Clifford GM, Smith JS,Plummer M,Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical worldwide:a meta-analysis[J].Br J Cancer,2003,88:63-73
- [2]Hwang TS,Jening JK,Park M,Han HS, Choi HK, Park TS. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray[J].Gynecol Oncol,2003,90:51-56

- [3] 闻正梅, 现代医学微生物学[M], 上海医科大学出版社, 1999, 957-970
- [4] Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features[J]. *Virus Genes*, 2002, 24(3): 275-290
- [5] Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. Papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers : a worldwide perspective[J]. *J Virol*, 1997, 71 : 2463-2472
- [6] Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations[J]. *J Virol*, 1993, 67: 6413-6423
- [7] Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart AC, Hildesheim A, Jenison SA. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments[J]. *J Virol*, 1995, 69: 7743-7753
- [8] Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 2959-2968
- [9] Mayrand MH, Coutlee F, Hankins C, Lapointe N, Forest P, de Ladurantaye M, Roger M. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis[J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38: 3388-3393
- [10] Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, Holmes KK, Kiviat NB. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1997, 89: 796-802
- [11] 李庭芳, 古丽娜·库尔班, 王涛. 新疆伽师县夏普桃勒乡妇女子宫颈癌防治的研究[J]. *新疆医学院学报*, 1996, 19(3): 199-203
- [12] 拉莱·苏祖克, 古丽娜·库尔班, Amy E Noffersinger. 维吾尔妇女子宫颈癌中 *p53* 基因的表达和 HPV DNA 检测研究[J]. *新疆医学院学报*, 1997, 20(2): 77-81
- [13] 马正海, 钱东, 马纪. 中国新疆维吾尔妇女宫颈癌组织中乳头状瘤病毒 16 型 *E6* 基因的克隆和序列分析[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 38(3): 399-404
- [14] 马正海, 张富春, 梅新娣. 新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中乳头状瘤病毒 16 型 *L1* 基因突变谱

分析[J], 中华医学杂志, 2004, 84(12):987-991

[15] 马正海, 梅新娣, 张富春. 新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中乳头状瘤病毒16 型L2 基因突变谱分析[J], 中华微生物和免疫杂志, 2004, 24(12):968-972

[16] 余勐, 马正海, 王艳萍, 热西旦 张富春. 新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中乳头状瘤病毒16 型上游调控区DNA多肽型分析[J], 中华微生物和免疫杂志, 2006, 26 (11): 1000-1004

[17] Robert L, Garcea. Daniel DaMaio. The papillomavirus[M], Springer, 2007

第三章

新疆株HPV16 L1在真核细胞中表达水平的初探

摘 要 以密码子优化的德国标准株 Human Papiloma Virus 16(HPV16)衣壳基因 *L1* 作为对照研究新疆株 HPV16 *L1* 基因在真核细胞中的表达水平。通过水动力转染技术与脂质体细胞转染法检测新疆株 HPV16 *L1* 和密码子优化的 HPV16 *L1* 在体内、外转录情况; Western blot 检测 HPV16 L1 蛋白的表达情况。结果显示新疆野生株及密码子优化株 HPV16 衣壳基因在真核细胞中均发生转录,但新疆株相对优化株的蛋白表达水平很低。通过密码子优化提高新疆野生株 HPV16 *L1* 在真核细胞中的蛋白表达水平, 这将为新疆当地的宫颈癌疫苗和相关致癌机理研究奠定良好基础。

关键词 HPV16; 新疆株; 表达水平; 衣壳基因; 密码子优化

Research of the Expression Level of XinJiang Strain HPV16 Gene L1 in Eukaryotic Cells

[Abstract] We studied the expression level of Xinjiang HPV16 *L1* gene, while L1 Codon-Optimized eukaryotic expression vector of pcDNA3.1-Human-*L1* was constructed as a control. The plasmids were infused quickly into the rat through tail vein and transferred into 293T cells to determine capsid gene in vivo and vitro. Results comes that recombinant plasmid *L1* gene could both transcript in liver of rat and 293T cells. Recombinant plasmid pcDNA3.1-Human-*L1* could express in 293T cells by Western blot, but pcDNA3.1-xj-*L1* not. It draw that the Xinjiang wild type HPV16 capsid gene had an low expression level in 293T cells, but the Codon-Optimized eukaryotic expression vector had a relative high expression level. To optimize the codon makes the helpful exploration in studying the new Xinjiang local vaccine of HPV 16 and the in-depth research of correlated mechanisms.

Key words HPV16; Xinjiang strain; expressing level; capsid gene *L1*; codon optimization

宫颈癌是最常见的女性生殖系统恶性肿瘤，与人乳头瘤病毒密切相关。目前研究发现人乳头瘤病毒，特别是 HPV16、18 等高危型别的感染是引起宫颈癌变的首要因素，其中又以 HPV16 型感染最为常见^[1]。新疆南部地区是宫颈癌高发区，研究证实维吾尔族妇女的宫颈病变与 HPV16 的感染密切相关^[2,3,4]。由于 HPV16 的感染具有高度的组织特异性及分化依赖性，长期以来 HPV16 较难在体外培养体系中复制扩增^[5]。近年 Pyeon D^[6]、Culp TD^[7] 等采用假病毒技术建立了培养 HPV16 的瞬时转染系统，这种系统能够产生出大量有感染性的病毒，是普通器官培养的 1000 多倍。而该瞬时转染系统能够发挥作用与 HPV16 *L1* 表达水平密切相关。本实验克隆了新疆株 HPV16 型 *L1* 并构建到 pcDNA3.1 真核表达载体，*L1* 基因测序结果显示新疆维吾尔族妇女宫颈癌患者组织中 HPV16 *L1* 基因发生了多位点变异^[8]，这些变异是否会影响其在宫颈组织中的表达有待探讨。因此本研究对新疆株 HPV16 *L1* 衣壳基因在 293T 细胞中的表达水平进行了探讨。同时本文构建密码子优化 pcDNA3.1-Human-*L1*，用于与新疆 HPV16 *L1* 的表达进行比较。

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 质粒：988质粒（德国科学家Martin Mueller惠赠），pcDNA3.1(+)载体（本实验室库存）；
(2) 细胞株：293T细胞（中国农业科学院哈尔滨兽研所惠赠）；(3) 试剂：Taq DNA聚合酶和反转录试剂盒（购自fermentas公司）；基因组，质粒提取和胶回收试剂盒（购自AXYGEN公司）；小鼠抗HPV16 *L1*单克隆抗体（购自Saco, Maine USA）；辣根过氧化物(HRP)标记的羊抗鼠IgG（购自sigma公司）；其他试剂均为国产分析纯；(4) 试验动物：昆明白雌性小鼠，6~8 周龄，质量18~22 g（购自新疆医科大学动物实验中心）。

1.2 方法

1.2.1 pcDNA3.1-xj-*L1*及密码子优化型pcDNA3.1-Human-*L1*重组质粒的构建

(1)引物设计 根据pcDNA3.1(+)载体和HPV16 *L1*基因保守序列及德国科学家Martin Mueller提供的988质粒基因序列（含有密码子优化的HPV 16 *L1*）设计4条引物（表1）。

表1. 引物设计

Table 1. Primer design

Primer name	Oligonucleotides
HPV16-xj-L1-P1	5'-ATTCCTATAGTTCCAGGGTCTCCA-3'
HPV16-xj-L1-P2	5'-ACTTACAGCTTACGTTTTTTGCGTT-3'
HPV16-O-L1-P1	5'-CCGGAATTCAAATGAGCCTGTGGCTGCCC-3'
HPV16-O-L1-P2	5'-CCCTCGAGTCACAGCTTCCTCTTCTCCTCTTG-3'

(2)目的基因的获取 将从新疆医科大学肿瘤附属医院获得的新疆妇女宫颈癌病料组织按照AXYGEN公司的基因组提取试剂盒说明书提取组织中的基因组,以该基因组做模板,加入HPV16-xj-L1-P1/HPV16-xj-L1-P2引物,DNA聚合酶作用下,95℃预变性5 min,95℃变性45 S,54.5℃退火45 S,72℃延伸1 min 30 S,共30个循环,72℃延伸7 min合成新疆株L1基因。用988质粒做模板,加入HPV-H-L1-P1/HPV-H-L1-P2引物,DNA聚合酶作用下,95℃预变性5 min,95℃变性45 S,61℃退火45 S,72℃延伸1 min 30 S,共30个循环,72℃延伸7 min合成优化株L1基因。

(3)pMD18-T-xj-L1和pMD18-T-Human-L1的构建 PCR产物琼脂糖电泳检测,切胶分别回收新疆株和优化株L1片段。按照TaKaRa公司pMD18-T Vector试剂盒说明书,构建pMD18-T-xj-L1和pMD18-T-Human-L1,电泳鉴定EcoR I及Xho I双酶切产物。

(4) pcDNA3.1-xj-L1和pcDNA3.1-Human-L1重组质粒构建与鉴定 EcoR I及Xho I双酶切载体质粒pMD18-T-xj-L1, pMD18-T-Human-L1,分别回收纯化新疆株和优化株L1片段。T4 DNA连接酶连接L1基因片段与双酶切后的pcDNA3.1载体,16℃连接过夜。化学转化法转化到DH5α,37℃摇床孵育1 h后涂布含氨苄青霉素的LB选择平板,37℃过夜。次日随机挑取阳性菌落,碱裂解法小量提取质粒。EcoR I及Xho I双酶切,琼脂糖电泳鉴定正确后送往上海生工测序。

1.2.2 小鼠肝脏中pcDNA3.1-xj-L1, pcDNA3.1-Human-L1重组质粒表达情况的检测 将等量的空pcDNA3.1载体和pcDNA3.1-xj-L1, pcDNA3.1-Human-L1重组质粒(均为10 ug)分别溶于2.5 ml灭菌生理盐水中。采用以流体力学为基础的大容量快速尾静脉注射法(Hydrodynamics-based transfection method, HD法)在7 s内注入小鼠尾静脉^[9]。8 h后处死,取肝脏,按照Invitrogen trizol说明书提取总RNA,按照fermentas公司反转录试剂盒要求合成cDNA。利用L1基因特异性引物检

测基因在小鼠肝脏中的转录情况。

1.2.3 293T细胞中pcDNA3.1-xj-*L1*, pcDNA3.1-Human-*L1*重组质粒表达情况的检测 选取对数生长期的293T细胞进行转染实验,转染步骤按Invitrogen公司提供的293T转染细胞的实验流程操作。空pCDNA3.1载体作为对照组,pcDNA3.1-xj-*L1*, pcDNA3.1-Human-*L1*重组质粒为实验组。培养48 h后,按照步骤1.2.2的方法提取RNA,检测重组质粒中*L1*基因的转录情况。同时按照Invitrogen trizol说明书用trizol法提取细胞总蛋白后进行Western blot检测,将细胞总蛋白进行SDS-PAGE电泳后湿法转膜,经过封闭、一抗反应(一抗为小鼠抗HPV16 *L1*单克隆抗体)、二抗反应(二抗为山羊抗小鼠HRP)后用DAB显色。

2 结果与分析

2.1 对照组密码子优化型pcDNA3.1-Human-*L1*重组质粒的构建

2.1.1 目的基因的克隆 对PCR扩增产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,约1500 bp 处出现清晰的条带(图1)。与预计目的片段大小(新疆株1601bp, 优化株1517 bp)一致。

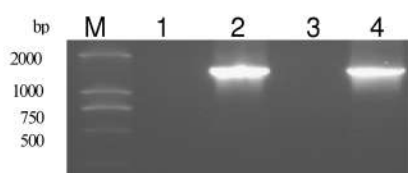


图 1 *L1* PCR 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 Agrose gel electrophoresis assay of PCR fragment of *L1* gene

M: DL2000 Marker;1: Negative control of *L1* of Xinjiang strain;2: PCR fragment of *L1* of

Xinjiang strain;3: Negative control of *L1* of human strain; 4: PCR fragment of *L1* of human strain

2.1.2 pMD18-T-Human-*L1*的构建 琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,切胶回收并纯化*L1*片段。按照TaKaRa公司pMD18-T Vector试剂盒说明书,构建pMD18-T-Human-*L1*。电泳检测*Eco*RI、*Xho*I酶切产物。(图2)

2.1.3 pcDNA3.1-Human-*L1*重组质粒构建与鉴定 *Eco*RI及*Xho*I双酶切pMD18-T-Human-*L1*质粒得到*L1*基因片段,定向亚克隆至同样双酶切的pcDNA3.1载体,得到pcDNA3.1-Human-*L1*重组载体,

*EcoR*I和*Xho*I双酶切鉴定并测序，结果证实重组质粒构建正确。（图2）

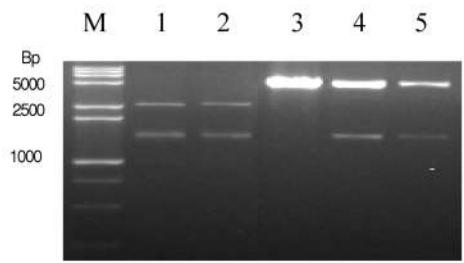


图 2 pcDNA3.1-xj-*L1* , pcDNA3.1-Human-*L1* 质粒*EcoR*I, *Xho*I双酶切鉴定

FIG2. pcDNA3.1-xj-*L1* , pcDNA3.1-Human-*L1* plasmid Identified by *EcoR*I and *Xho*I

M: DL15000+2000 Marker; 1: PMD18-T-xj-*L1*; 2: pMD18-T-Human-*L1*; 3: pcDNA3 vector;

4: pcDNA3-xj-*L1*; 5: pcDNA3-Human-*L1*

2.2 重组质粒在小鼠脏器中的瞬时表达 RT-PCR结果表明，尾静脉注射pcDNA3.1-xj-*L1*，pcDNA3.1-Human-*L1*重组质粒后，新疆株HPV16 *L1*基因和密码子优化HPV16 *L1*基因均在小鼠肝脏中表达，尾静脉注射pcDNA3.1质粒的小鼠肝脏中未检测到*L1*基因的表达。（图3、4）

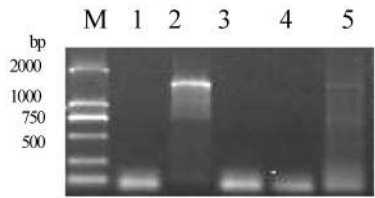


图 3 注射pcDNA3.1-xj-*L1*质粒后小鼠肝脏中*L1*基因的表达检测

FIG3. Results of *L1* expressed in liver after injected the pcDNA3.1-xj-*L1*

M. DL 2000 marker; 1.Negative control; 2. Positive control; 3. cDNA of

pcDNA3.1-vector; 4.RNA of pcDNA3.1-xj-*L1*; 5.cDNA of pcDNA3.1-xj-*L1*.

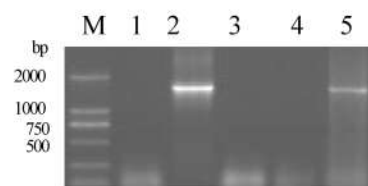


图 4 注射pcDNA3.1-Human-*L1*质粒后小鼠肝脏中*L1*基因的表达检测

FIG4. Results of *L1* expressed in liver after injected the pcDNA3.1-Human-*L1*

M: DL 2000 Marker; 1.Negative control; 2. Positive control; 3. cDNA of pcDNA3.1-vector; 4.RNA of pcDNA3.1-*Human-L1*; 5.cDNA of pcDNA3.1-Human-*L1*.

2.3 转染293T细胞后pcDNA3.1-Human-*L1*和pcDNA3.1-xj-*L1*重组质粒表达检测

2.3.1 重组质粒转录情况的检测 RT-PCR结果表明, pcDNA3.1-xj-*L1*, pcDNA3.1-Human-*L1*重组质粒转染293T细胞后, 密码子优化及新疆株的HPV 16 *L1*基因均在293T细胞中转录, 而 pcDNA3.1(+)空质粒未检测到*L1*基因转录(图5、6)。

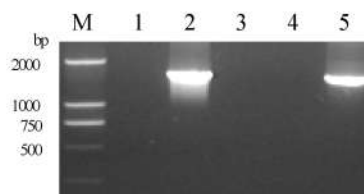


图 5 pcDNA3.1-xj-*L1*质粒转染293T细胞后48 h *L1*基因转录检测

FIG5. Results of *L1* transcription in the thanscripted 293T cells with pcDNA3.1-Human-*L1* after 48 h

M. DL 2000 marker; 1.Negative control; 2. Positive control; 3. cDNA of pcDNA3.1-vector; 4.RNA of pcDNA3.1-xj -*L1*; 5.cDNA of pcDNA3.1-xj -*L1*.

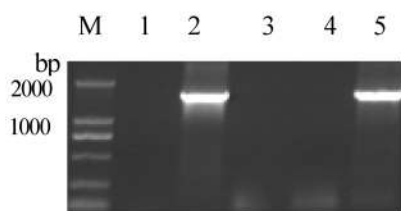


图 6 pcDNA3.1-Human-*L1*质粒转染293T细胞后48 h *L1*基因转录检测

FIG6. Results of *L1* transcription in the transcribed 293T cells with pcDNA3.1-Human-*L1* after 48 h

M: DL 2000 Marker; 1.Negative control; 2. Positive control; 3. cDNA of pcDNA3.1-vector; 4.RNA of pcDNA3.1-Human-*L1*; 5.cDNA of pcDNA3.1-Human-*L1*.

2.3.2 重组质粒蛋白的检测 用Trizol提取细胞总蛋白后，通过Western blot检测重组质粒中*L1*基因的表达情况，印迹中pcDNA3.1-xj-*L1*组没有出现条带，pcDNA3.1-Human-*L1*组出现出现约55kD的清晰的条带，与预计大小相符（图7）。

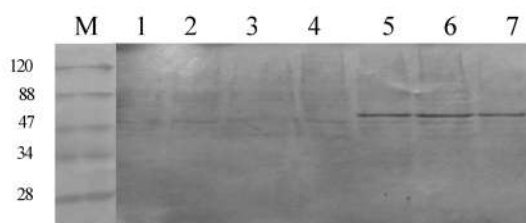


图 7 pcDNA3.1-xj-*L1*，pcDNA3.1-Human-*L1*质粒转染293T细胞后48h *L1*蛋白表达检测

FIG7.Western blot for expression of *L1* protein in the transfected 293T cells with pcDNA3.1-xj-*L1* or pcDNA3.1-Human-*L1* plasmid after 48h

M: Protein marker; 1: 293T cells transfected with pcDNA3.1(+) vector; 2,3,4:293T cells transfected with pcDNA3.1-xi-*L1*; 5,6,7:293T cells transfected with pcDNA3.1-Human-*L1*.

3 讨论

宫颈癌是居世界第二位的妇女常见恶性肿瘤^[10]。研究发现新疆维吾尔自治区南部维吾尔族妇女宫颈癌发病率相当高（459-590/10 000 人），位于中国少数民族宫颈癌发病率之首^[11]。相关研究证实维吾尔族妇女的宫颈病变与HPV16的感染密切相关，患宫颈癌的维吾尔族妇女HPV16阳性检出率在

80%左右, 并且发病趋势逐年上升^[2,3,4,12], 所以研究新疆维吾尔族妇女宫颈癌发病机制和开发相应疫苗具有重要的临床应用价值。

HPV16 *L1* 是人类乳头状病毒16型的主要晚期结构蛋白之一, 大约由531个氨基酸构成。HPV *L1* VLPs (virus-like particles) 具有极强的免疫原性, 可以有效地激发机体产生抗体, 从而起到免疫保护作用。目前上市的两种宫颈癌疫苗(默克公司, 葛兰素史克)就是基于*L1*的免疫原性生产的^[13]。Petra Lenz等在实验中发现, HPV *L1* VLPs表现出极强的免疫原性, 能迅速、高效地被树突状细胞(DCs)捕获、内化^[14]。Diane M.通过实验证实, HPV *L1* VLP易于与表达MHC II类分子、CD80、CD86等标志的抗原呈递细胞(含DCs、巨噬细胞、B细胞等)结合并被摄取, 从而产生抗体^[15]。

我们此前的研究结果表明, 新疆维吾尔族妇女宫颈癌患者组织中, HPV16 *L1* 基因发生了多位点变异, 从而导致HPV16 *L1* 蛋白疏水性和抗原性的改变^[8], 这可能与HPV16 逃避机体免疫识别有关, 因此用新疆本地分离的HPV16 *L1*基因研制宫颈癌预防性疫苗, 将能更有效地保护当地妇女免受HPV16的感染。在本研究中我们对新疆HPV16 *L1*在293T细胞中的表达量做初步探索研究。结果表明虽然新疆HPV16 *L1*存在较大变异, 但是与其它已报道的HPV16野生型的*L1*一样在293T细胞中的表达量仍然很低, Western blot无法检测到相应蛋白的表达。这也将成为我们在进行开发疫苗和机理研究时需要注意的问题, 在制备疫苗的研究中需要对其进行一些方面的改造比如通过密码子优化来提高*L1*蛋白的表达量从而获得更好的免疫效果。

近年来, 众多研究者为提高衣壳基因在真核细胞中的表达量进行了大量探索性研究, 现有对HPV *L1* 进行密码子优化后成功提高其表达水平的报道^[16,17]。本研究发现新疆野生型HPV16 *L1*基因在293T细胞中的表达水平极低, Western blot无法检测到相应蛋白的表达。这与国内、外学者研究结果一致。同时为了提供HPV16 *L1*表达的对照, 我们构建了密码子优化pcDNA3.1-Human-*L1*, Western blot 结果显示优化基因HPV16 *L1*在哺乳动物细胞中的表达较新疆野生型基因有十分显著的提高, 这为HPV预防性疫苗的进一步研究打下了基础。另外, pcDNA3.1(+)载体由于含有抗G418的抗性基因(即新霉素抗性基因, NeoR), 所以可以用G418筛选出成功转染重组质粒的稳定细胞株, 这是Leder C构建的988重组质粒^[16]所不具备的。

新疆HPV16 *L1* 存在较大变异且在真核细胞中表达量较低, 在今后的工作中对其进行密码子优化, 提高表达量, 对于新疆宫颈癌的HPV16疫苗和其它相关方面的研究具有良好的推动作用。

参考文献(References)

- [1]Altekruze SF, Lacey JV Jr, Brinton LA, Gravitt PE, Silverberg SG, Barnes WA Jr, Greenberg MD, Hadjimichael OC, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Hildesheim A.. Comparison of human papillomavirus genotypes, sexual, and reproductive risk factors of cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: Northeastern United States[J]. Am J Obstet Gynecol, 2003, 188 (3): 657-663
- [2]古扎丽努尔·阿布力孜, 林卫, 彭芝兰. 宫颈癌高发区新疆维吾尔族妇女宫颈癌组织中HPVDNA的测定[J], 实用癌症杂志, 2001, 16(3): 271-274
- [3]拉莱·苏祖克, 古丽娜·库尔班, Amy E N. 维吾尔族妇女宫颈癌中p53基因的表达和HPVDNA检测研究[J], 新疆医学院学报, 1997, 20(2): 77-81
- [4]李庭芳, 古丽娜·库尔班, 王 涛. 新疆伽师县夏普桃勒乡妇女宫颈癌防治研究[J], 新疆医学院学报, 1996, 19(3): 199-203
- [5]Bedell MA, Hudson JB, Golub TR.. Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation[J]. Virol, 1991, 65: 2254-2260
- [6]Pyeon D, Lambert PF, Ahlquist P. Production of infectious human papillomavirus independently of viral replication and epithelial cell differentiation[J]. Proc Natl Acad Sci USA., 2005, 102 (26): 9311-9316
- [7]Culp TD, Cladel NM, Balogh KK, Budgeon LR, Mejia AF, Christensen ND. Papillomavirus Particles Assembled in 293TT Cells Are Infectious In Vivo[J]. J Virol, 2006, 80 (22): 11381-11384
- [8]马正海, 张富春, 梅新娣. 新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中乳头状瘤病毒(HPV) 16型L1基因突变谱分析[J]. 中华医学杂志, 2004, 84 (12) : 987 - 991
- [9]Kobayashi N, Hirata K, Chen S, Kawase A, Nishikawa M, Takakura Y.. Hepatic delivery of particulates in the submicron range by a hydrodynamics based procedure: Implications for particulate gene delivery systems[J]. J Gene Med, 2004, 6 (4): 455-463
- [10]Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000[J]. Lancet Oncol 2001, 2 (9): 533-543
- [11]拉莱·苏祖克. 不同民族妇女中2727例子宫颈癌的统计学分析[J], 新疆医学院学报, 1990, 9: 48
- [12]拉莱·苏祖克, 彭玉华, 周康, 房新志, 王莉. 新疆不同民族子宫颈癌发病趋势分析[J], 新疆医科大学学报, 2006, 29(7): 569-571
- [13]Stanley M.Prevention strategies against the human papillomavirus:The effectiveness of vaccination[J]. Gynecologic

Oncology, 2007,107: S19-S23

[14]Petra Lenz,Patricia M Day. Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells [J]. J Immunol, 2001, 166: 5346-5355

[15]Diane M, Da Salva. Physical interaction of human papillomavirus virus-like particles with immune cell [J]. Int Immunol, 2001, 11(5): 633-641

[16]Leder C, Kleinschmidt JA, Wiethe C, Müller M.Enhancement of Capsid Gene Expression: Preparing the Human Papillomavirus Type 16 Major Structural Gene L1 for DNA Vaccination Purposes [J]. J Virol, 2001, 75 (19): 9201-9209

[17]Mossadegh N, Gissmann L, Muller M, Zentgraf H, Alonso A, Tomakidi P.Codon optimization of the human papillomavirus 11 (HPV 11) L1 gene leads to increased gene expression and formation of virus-like particles in mammalian epithelial cells[J]. Virology, 2004. 326(1): 57-66

第四章

密码子优化HPV16衣壳基因真核共表达载体的构建及细胞转染

摘要 目的 构建密码子优化的 HPV16 衣壳基因真核共表达载体 pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*。方法 用 PCR 技术从 988 载体中获得 *L1-IRES-L2* 片段, 将该片段克隆到 pCR®-XL-TOPO®载体, 然后定向亚克隆到 pcDNA3.1(+)真核表达载体中, 从而构建真核共表达载体 pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*; 通过水动力转染技术(hydrodynamics-based transfection)和脂质体细胞转染法(liposome-mediated transfection of cells), 检测衣壳基因的体内、外转录情况; 重组质粒转染后 293T 细胞后观察其形态变化, 用 Western blot 方法检测 293T 细胞中 L1 衣壳蛋白的表达。结果 酶切和测序结果表明真核共表达载体 pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* 构建正确。重组质粒中的 L1 和 L2 基因在小鼠肝脏、293T 细胞中均发生转录。重组质粒转染 293T 细胞后出现 CPE (cytopathic effect) 现象, 表明衣壳基因在细胞中已表达。免疫印迹方法检测发现 L1 蛋白在 293T 细胞中表达。结论 成功地构建了 pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* 共表达真核载体, 为进一步研究 HPV16 感染机制奠定基础。

关键词 密码子优化; HPV16衣壳基因; 共表达真核载体; 细胞转染

Construction of codon-optimized HPV16 capsid genes in the eukaryotic co-expression vector and transfection of cells

[Abstract] **AIM** To construct the eukaryotic co-expression vector pcDNA3.1-L1-IRES-L2 for harvesting sufficient amounts of infectious HPV16. **Methods** The amplified codon-optimized HPV16 capsid genes from 988 plasmid by PCR were cloned into pCR®-XL-TOPO® vector and then subcloned into eukaryotic expressing vector pcDNA3.1(+). Thus, eukaryotic co-expression vector pcDNA3.1-L1-IRES-L2 capable of expressing HPV *L1* gene and *L2* gene was constructed. This eukaryotic vector was verified by enzymolysis and sequencing. The transcription of capsid genes was observed in vivo and in vitro by hydrodynamics-based transfection and liposome-mediated transfection. The expression of *L1* gene in 293T cells was examined by western blot. **Results** The eukaryotic co-expression vector pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* was successfully constructed and verified by enzymolysis and sequencing. The recombinant plasmid *L1* and *L2* genes were transcribed in the livers of the rats and 293T cells. Cytopathic effect (CPE) occurred after the transfected with pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* into 293T cells, indicating that the two capsid genes were expressed. Western blot detection showed the recombinant plasmid *L1* protein was expressed in 293T cells. **Conclusion** The pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* has been constructed successfully, which lays a foundation for in-dept study on the infectious mechanism of HPV16.

Key words codon optimization; HPV16 capsid gene; eukaryotic co-expression vector; cell transfection

人乳头瘤病毒(Human papillomavirus)属乳多空病毒科,具有上皮细胞嗜性。迄今为止,已分离到的基因型有100种以上^[1,2]。根据各型病毒的潜在致病性可将HPV分为低危型和高危型两类,大量研究证实高危型中的16、18型与宫颈癌的发生密切相关,其中又以HPV16型最为常见。宫颈癌是全世界仅次于乳腺癌致妇女死亡的第二大癌症,据报道全球每年大约有50万宫颈癌新发病例,约25万人死于该癌症^[3]。因为乳头瘤病毒的增殖与上皮细胞的分化紧密相连,所以一直以来感染性乳头瘤病毒只能通过烦琐的器官培养(organotypic cultures)和小鼠异种移植(mouse xenografts)途径获得,而用这两种方法很难获得足量的野生型或突变型人乳头瘤病毒(HPV)颗粒,这大大限制了乳头瘤病毒生物学许多方面的研究^[4,6]。最近Pyeon D^[7]、Culp TD^[8]采用假病毒技术建立了用于病毒培养的瞬时转染系统,该系统中每个细胞能产生大量有感染性的病毒,病毒产生量是常规器官培养的1000倍之多。Pyeon D的研究表明,该瞬时转染系统要求密码子优化的*L1*与*L2*基因必须同时转染细胞,而单独*L1*基因或*L2*基因都不会使该系统发挥作用。Pyeon D采

用的是pcDNA-HPV16-*L1*和pcDNA-HPV16-*L2*两种质粒进行共转染，而本研究我们构建的是密码子优化的HPV16衣壳基因真核共表达载体即pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*，通过连接子IRES实现了*L1*和*L2*基因在一个载体中的共表达，无需同时转染两个质粒，可大大简化实验操作。

1 材料和方法

1.1 材料 988质粒（德国科学家Martin Mueller惠赠），pcDNA3.1(+)载体（本实验室库存）；细胞株：293T细胞（中国农业科学院哈尔滨兽研所惠赠）；LA Taq DNA聚合酶和反转录试剂盒（购自fermentas公司）；质粒提取和胶回收试剂盒（购自AXYGEN公司）；TOPO® XL PCR® 克隆试剂盒及Lipofecamine™2000（购自Invitrogen公司）；电转化感受态Top10菌（购自TaKaRa公司）；HPV16 L1单克隆抗体mAb（购自上海吉泰新择生物科技有限公司）；辣根过氧化物(HRP)标记的羊抗鼠IgG（购自北京博奥森生物技术有限公司）；其他试剂均为国产分析纯；昆明白雌性小鼠，6~8周龄，质量18~22 g（购自新疆医科大学动物实验中心）。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据pcDNA3.1(+)载体和德国科学家Martin Mueller提供的密码子优化的HPV 16 L1、L2基因序列设计5条引物，具体序列见表1。

表1 引物设计

Table 1 Primer design

Primer name	Oligonucleotides	function
HPV-H-L1L2-P1	5'-CCGGAATTCAAATGAGCCTGTGGCTGCCC-3'	Amplify <i>L1-IRES-L2</i>
HPV-H-L1L2-P2	5'-CCCTCGAGTCAGGCGGCCAGGCT-3'	Amplify <i>L1-IRES-L2</i>
HPV-H-L1-P2	5'-CCCTCGAGTCACAGCTTCCTCTTCTCCTCTTG-3'	Amplify <i>L1</i> gene
HPV-H-L2-P1	5'-CCGGAATTCAAATGAGACACAAGAGGAGCGC-3'	Amplify <i>L2</i> gene
IRES-P1	5'-CAAGATGAAGGCCACCCCCACCACC-3'	Sequencing <i>IRES</i>

1.2.2 密码子优化的pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*重组质粒的构建

构建策略:以988质粒为模板扩增*L1-IRES-L2*基因片段，将该片段构建到pCR®-XL-TOPO® 载体上，然后定向亚克隆到pcDNA3.1(+)真核表达载体中。目的基因的获取:以988质粒为模板，以HPV-H-L1L2-P1/ HPV-H-L1L2-P2为引物，在LA DNA聚合酶作用下，94℃预变性5 min，94℃ 变性45 S，67℃ 退火45 S，68℃ 延伸4.5 min，共30个循环，68℃延伸30min，合成*L1-IRES-L2*基因。

10g/L琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增结果。pCR®-XL-TOPO®-*L1-IRES-L2*的构建：琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物，切胶回收并纯化*L1-IRES-L2*片段。按照TOPO®-XL-PCR 克隆试剂盒说明书，构建pCR®-XL-TOPO®-*L1-IRES-L2*。电泳检测*EcoR* I、*Xho* I 和*Sfi* I酶切产物。

用*EcoR* I、*Xho* I 和*Sfi* I酶切pCR®-XL-TOPO®-*L1-IRES-L2*质粒，回收纯化*L1-IRES-L2*片段。T4 DNA连接酶连接*L1-IRES-L2*基因片段与双酶切后的pcDNA3.1载体，16℃过夜。用电转化法转化感受态Top10菌株（电压2500 V，电阻200 Ω，电容25 μF），37℃摇床孵育1 h后涂布含氨苄青霉素的LB选择平板，37℃过夜。次日随机挑取阳性菌落，碱裂解法小量提取质粒。*EcoR* I及*Xho* I双酶切，琼脂糖电泳鉴定正确后送往上海生工测序。

1.2.3 小鼠肝脏中pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* 重组质粒表达情况的检测 将等量的空pCDNA3.1载体和pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*重组质粒（均为10 μg）分别溶于2.5 ml灭菌生理盐水中。采用以流体力学为基础的大容量快速尾静脉注射法（hydrodynamics-based transfection method, HD）在7 s内注入小鼠尾静脉中^[9,10]。每组2只小鼠，注射后8 h处死，取肝脏，按照Invitrogen trizol 说明书提取总RNA，按照fermentas公司反转录试剂盒要求合成cDNA。利用*L1* 基因、*L2* 基因特异性引物检测这两种基因在小鼠肝脏中的表达情况。

1.2.4 293T细胞中pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* 重组质粒表达情况的检测 选取对数生长期的293T细胞进行转染实验，转染步骤按Invitrogen公司提供的293T转染细胞的实验流程操作。空pCDNA3.1载体作为对照组，pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*重组质粒为实验组。培养48 h后，观察细胞形态变化并按照步骤1.2.3的方法提取RNA，检测*L1* 基因、*L2* 基因的表达情况。同时用Trizol法提取细胞总蛋白，Western blot进行检测，一抗为L1 mAb，二抗为山羊抗小鼠HRP。

2 结果

2.1 目的基因的克隆 对PCR扩增产物进行10g/L琼脂糖凝胶电泳，在约3600 bp处出现清晰的条带（图1）。与预计目的片段大小(3625bp)相符



图 1 *L1-IRES-L2* PCR 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig1 Agrose gel electrophoresis assay for PCR result of *L1-IRES-L2* fragment

M:DL15000+2000 marker;1: PCR fragment of *L1-IRES-L2*

2.2 pCR®-XL-TOPO®-*L1-IRES-L2* 的构建 用限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho*I 和 *Sfi*I 酶切 pCR®-XL-TOPO®-*L1-IRES-L2*, 琼脂糖凝胶电泳检测结果表明pCR®-XL-TOPO® -*L1-IRES-L2* 构建成功 (图2)。



图 2 pCR®-XL-TOPO® -*L1-IRES-L2* 质粒酶切鉴定

Fig2 pCR®-XL-TOPO® -*L1-IRES-L2* plasmid identified by restriction enzyme digestion

M:DL15000+2000 marker; 1:pCR®-XL-TOPO® vector; 2:pCR®-XL-TOPO® -*L1-IRES-L2* plasmid digested by *EcoR* I, *Xho* I and *Sfi* I

2.3 pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*重组质粒构建与鉴定 通过*EcoR* I、*Xho* I和*Sfi*I 酶切pCR®-XL-TOPO® -*L1-IRES-L2*获得*L1-IRES-L2* 基因片段, 定向亚克隆至经*EcoR* I和*Xho*I双酶切的pcDNA3.1载体中, 构建得到pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* 重组载体。用*EcoR* I和*Xho*I双酶切鉴定并测序, 结果证实pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* 重组质粒构建正确, 目的基因序列没有发生变异且插入方向正确 (图3)。

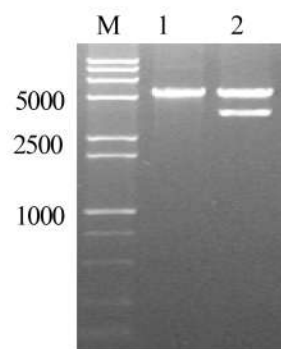


图 3 pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* 质粒酶切鉴定

Fig3 Identification of pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* plasmid by restriction enzyme digestion

M:DL15000+2000 marker ;1: pcDNA3.1 vector;2:pcDNA3.1-L1-IRES-L2 plasmid digested by *EcoRI* and *XhoI*

2.4 重组质粒在小鼠肝脏中的瞬时表达 RT-PCR结果表明，尾静脉注射pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*重组质粒后，密码子优化的HPV 16 *L1*、*L2* 基因均在小鼠肝脏中表达，尾静脉注射pcDNA3.1 (+) 空质粒的小鼠肝脏中则未检测到有*L1*、*L2* 基因表达（图4、5）。

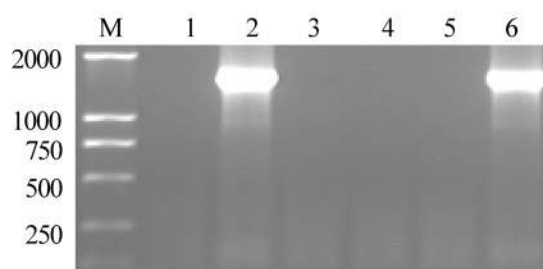


图 4 注射pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* 质粒后小鼠肝脏中*L1* 基因的表达检测

Fig4 Results of *L1* gene expressed in mouse liver after pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* injection

M:DL 2000 marker;1:negative control;2:positive control; 3:RNA of pcDNA3.1-vector; 4: cDNA of pcDNA3.1-vector;5:RNA of pcDNA3.1-Human-L1L2;6:cDNAof pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*

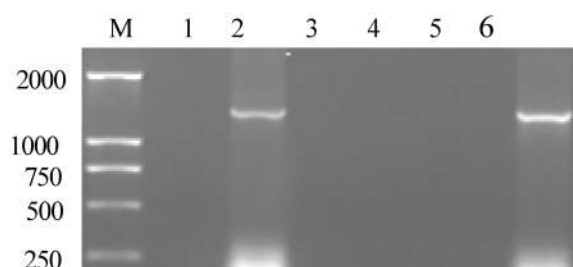


图 5 注射pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*质粒后小鼠肝脏中*L2* 基因的表达检测

Fig5 Results of *L2* gene expressed in liver after pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* injection

M:DL 2000 marker;1:negative control;2: positive control;3:RNA of pcDNA3.1-vector;4:cDNA of pcDNA3.1-vector;5:RNA of pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*;6:cDNAof pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*

2.5 转染后293T细胞的形态观察及pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* 重组质粒表达情况的检测

2.5.1 形态观察 倒置显微镜观察发现实验组细胞与对照组细胞在形态学上发生明显变化, 对照组细胞的触角正常, 贴壁能力较好; 而实验组细胞明显变圆, 形态类似葡萄呈串状排列, 贴壁能力下降, 部分悬浮。(图6)

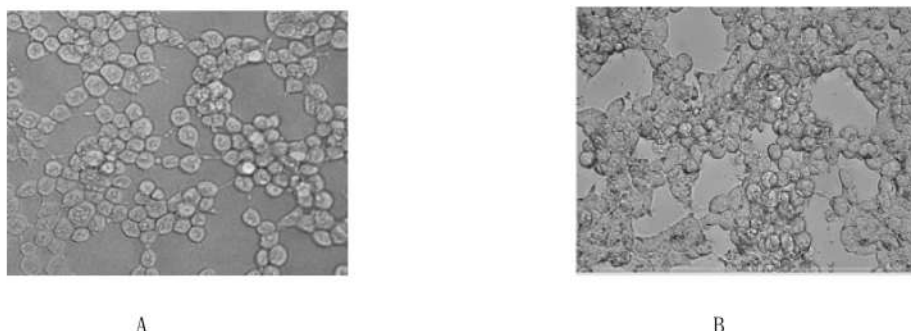


图 6 pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* 转染293T细胞后48 h细胞状态

Fig6 Images of 293T cells 48 hours after transfected pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*

A: pcDNA3.1($\times 200$); B: pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* ($\times 200$)

2.5.2 重组质粒转录情况的检测 RT-PCR结果表明, pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*重组质粒转染293T细胞后, 密码子优化的HPV 16 *L1*、*L2*基因均在293T细胞中转录表达, 而pcDNA3.1(+)空质粒未检测到*L1*、*L2*基因转录(图7、8)。

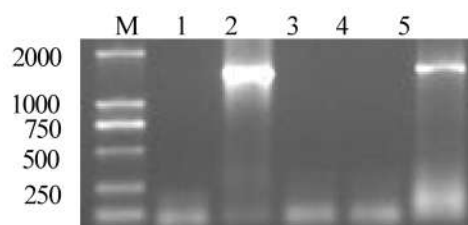


图 7 pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*转染293T细胞后48 h *L1*基因转录检测

Fig7 Results of *L1* transcription in the transfected 293T cells with pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* after 48 h

M:DL 2000 marker;1:negative control; 2:positive control;3:cDNA of pcDNA3.1-vector;4:RNA of pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* ;5:cDNA of pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*

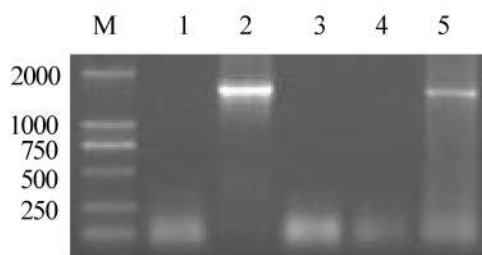


图 8 pcDNA3.1-*LI-IRES-L2*转染293T细胞后48h *L2*基因转录检测

Fig8 Results of *L2* transcription in the transfected 293T cells with pcDNA3.1-*LI-IRES-L2* after 48 h

M: DL 2000 marker; 1:negative control;2:positive control;3:cDNA of pcDNA3.1-vector;4:RNA of pcDNA3.1-*LI-IRES-L2*;5:cDNA of pcDNA3.1-*LI-IRES-L2*

2.5.3 重组质粒蛋白的检测 用Trizol提取细胞总蛋白后，通过Western blot检测重组质粒中*LI*基因的表达情况，印迹中只有实验组出现Mr 55 000的条带，与预计大小相符（图9）。

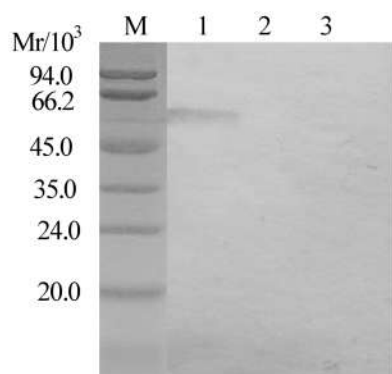


图9 pcDNA3.1-*LI-IRES-L2*转染293T细胞后48h *L1*蛋白表达检测

Fig9 Western blotting for expression of *L1* protein in the transfected 293T cells with pcDNA3.1-*LI-IRES-L2* after 48 h

M:Protein marker; 1: 293T cells transfected with pcDNA3.1-*LI-IRES-L2*;

2: 293T cells transfected with pcDNA3.1(+) vector; 3: 293T cells

3 讨论

宫颈癌在世界范围内成为导致妇女死亡的第二大恶性肿瘤。野生型病毒衣壳基因在真核细胞中表达水平极低，这极大限制了人乳头瘤病毒生物学方面的研究，比如病毒复制与宿主的关系、疫苗与药物的开发^[3,4]。众多研究者为了提高衣壳基因在真核细胞中的表达量进行了大量的探索性研究，其中Leder C成功合成了高表达的密码子优化的衣壳基因^[11]。同义密码子的偏好性在生物界中普遍存在，对基因表达有显著影响^[12]。我们所构建的pcDNA3.1-*LI-IRES-L2*载体中，衣壳基因

的密码子优化是根据人的密码子偏好性进行的,这大大增强了衣壳基因在人细胞中的表达能力,为获得大量的乳头瘤病毒样颗粒奠定基础。另外,pcDNA3.1(+)载体由于含有抗G418的抗性基因(即新霉素抗性基因,NeoR),所以可以用G418筛选出成功转染pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*的稳定细胞株,这是Leder C构建的988重组质粒所不具备的。

Pyeon D等研究发现,单单*L1*或*L2*基因都不能使培养病毒的瞬时转染系统发挥作用。而本研究利用IRES(细胞内部核糖体进入位点)将*L1*和*L2*基因克隆到同一个载体中,从而构建出密码子优化的HPV16衣壳基因真核共表达载体。IRES是mRNA5'端编码区的一段特殊序列,它允许核糖体不从mRNA的5'到3'端阅读而直接在此序列处结合mRNA并起始翻译。通过*IRES*可将多个非相关基因连接在一起同时转录成一条单链mRNA,但翻译相互独立而互不干扰,这样就保证了用*IRES*序列连接的非相关基因可独立表达^[13]。pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*同时表达*L1*、*L2*两个衣壳基因,该质粒与HPV基因组共转染293T细胞即可获得有感染性的病毒颗粒,无需用多个质粒共转染,简化了实验操作,更方便于HPV生物学特性的研究。

本研究我们分别采用脂质体细胞转染法和水动力转染技术(尾静脉注射)转染pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*重组质粒,RT-PCR检测结果显示*L1*基因、*L2*基因在293T细胞和小鼠肝脏内均得到表达;Western blot进一步证实*L1*基因可在293T细胞中表达。重组质粒转染293T细胞后出现CPE(cytopathic effect)现象,表明衣壳基因在细胞中已表达。上述结果表明pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*重组质粒构建成功,为HPV16感染机制的进一步研究奠定基础。

参考文献(References)

- [1] Clifford G M, Smith J S, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide:a meta-analysis[J]. Br J Cancer, 2003, 88 (1): 63-73
- [2] Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology[J]. Gynecol Oncol, 2007, 107 (2): S2-S5
- [3] Newall AT, Beutels P, Wood JG, Edmunds WJ, MacIntyre CR. Cost-effectiveness analyses of human papillomavirus vaccination[J]. Lancet Infect Dis, 2007, 7 (4): 289-296
- [4] Dollard SC, Wilson JL, Demeter LM, Bonnez W, Reichman RC, Broker TR, Chow LT. Production of human papillomavirus and modulation of the infectious program in epithelial raft cultures[J]. Genes Dev, 1992, 6 (7): 1131-1142

- [5] Meyers C, Frattini MG, Hudson JB. Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation[J]. *Science*, 1992, 257 (5072): 971-973
- [6] McLaughlin-Drubin ME, Christensen ND, Meyers C. Propagation, infection, and neutralization of authentic HPV16 virus[J]. *Virology*, 2004, 322 (2): 213-219
- [7] Pyeon D, Lambert PF, Ahlquist P. Production of infectious human papillomavirus independently of viral replication and epithelial cell differentiation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005, 102 (26): 9311-9316
- [8] Culp TD, Cladel NM, Balogh KK, Budgeon LR, Mejia AF, Christensen ND. Papillomavirus particles assembled in 293TT cells are infectious in vivo[J]. *J Virol*, 2006, 80 (22): 11381-11384
- [9] Liu F, Song YK, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA[J]. *Gene Ther*, 1999, 6 (7): 1258-1266
- [10] Kobayashi N, Hirata K, Chen S, Kawase A, Nishikawa M, Takakura Y. Hepatic delivery of particulates in the submicron range by a hydrodynamics based procedure: Implications for particulate gene delivery systems[J]. *J Gene Med*, 2004, 6 (4): 455-463
- [11] Leder C, Kleinschmidt JA, Wiethe C, Müller M. Enhancement of Capsid Gene Expression: Preparing the Human Papillomavirus Type 16 Major Structural Gene L1 for DNA Vaccination Purposes[J]. *J Virol*, 2001, 75 (19): 9201-9209
- [12] Shpaer EG Constraints on codon context in Escherichia coli genes. Their possible role in modulating the efficiency of translation[J]. *J Mol Biol*, 1986, 188 (4): 555-564
- [13] Malecki M, Przybyszewska M, Janik P. Construction of a bicistronic proangiogenic expression vector and its application in experimental angiogenesis in vivo[J]. *Acta Biochim Pol*, 2003, 50 (3): 875-882

第五章

探索新疆株 HPV16 病毒样颗粒在 293T 细胞中的包装

摘要 目的 探索单独转染线性或者环状新疆 HPV16 在 293T 细胞中是否形成病毒颗粒, 为研究新疆 HPV16 致病机理奠定基础。方法 提取 pCR®-XL-TOPO®-XJHPV16 质粒, 通过 *Apa*I 酶切作用从该载体获得线性化的 XJHPV16 基因, 部分线性片段在 T4 连接酶的作用下将其连接成环。线性或环化的新疆 XJHPV16 基因用于后续转染实验。实验共设置 4 组: (1) 用线性新疆 XJHPV16 基因与密码子优化 HPV16 衣壳基因真核共表达载体 pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* 共同转染 293T 细; (2) 自身环化新疆 XJHPV16 基因与密码子优化 HPV16 衣壳基因真核共表达载体 pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* 共同转染 293T 细; (3) 线性新疆 XJHPV16 基因单独转染 293T 细胞。(4) 自身环化的新疆 XJHPV16 基因单独转染 293T 细胞。RT-PCR (reverse transcription PCR) 检测上述 4 组中 HPV16 *E2* 基因和 *E5* 基因的转录情况, Western blot 方法检测 293T 细胞中 L1 衣壳蛋白的表达。结果 上述 4 组均能够检测到病毒 *E2* 基因和 *E5* 基因的转录, 但是只有在病毒基因组 (线性或环化) 与衣壳基因共同转染的实验组中检测到 L1 蛋白的表达, 而在单独转染线性或环化 XJHPV16 基因组的实验组未检测 L1 蛋白表达。结论 单独转染线性或环化 XJHPV16 基因组在 293T 细胞中无法包装出病毒, 密码子优化 HPV16 衣壳基因是病毒颗粒形成所必需。

关键词 HPV16; 新疆株; HPV16 衣壳基因; 293T 细胞; 装配

Research of the assemblage of XinJiang Strain HPV16 virus particles in 293T cells

[Abstract] **AIM** We assemble the HPV16 virus of Xinjiang strain in 293T cells and in order to lay a foundation for future studying the pathogenesis of it. **Methods** First, we extracted the plasmid pCR®-XL-TOPO®-XJHPV16, digested it with enzyme *Apa*I and got the linear fragments of XJHPV16. A portion of the fragments circulated with T4 ligase. Both of them were utilized in transfection experiments. The experiments have been divided into four groups : (1)transfect 293T cells with the plasmid pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* co-expression the genes of linear fragments of XJHPV16 and codon-optimized capsid genes;(2) transfect 293T cells with the plasmid pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* co-expression the genes of circular fragments of XJHPV16 and codon-optimized capsid genes;(3) transfect 293T cells with the linear fragments of XJHPV16 alone;(4) transfect 293T cells with the circular

fragments of XJHPV16 individually. Next, we used reverse-transcription PCR assay to test the transcription of HPV16 E2 gene and E5 gene in the four groups and western blot assay to test the expression of capsid protein L1. Transmission Electron Microscope was used to observe of the virus formed situation in 293T cells. **Results** We can test the transcription of HPV16 E2 gene and E5 gene in four groups. However, the expressions of the capsid protein L1 can only be tested in group one and group two. There's no result in other two groups. **Conclusion** Eventually, we successfully packaged HPV16 virus like particles in 293T cells and demonstrated that the codon-optimizing of capsid genes is essential for the forming of virus particles.

Key words HPV16;xinjiang strain HPV16;HPV16 capsid gene;293Tcells;assemblage

乳头瘤病毒(HPV)是一类无包膜的小DNA病毒,可感染皮肤和黏膜的上皮细胞并引起不同程度的良性或恶性增生性病变,大于>95%的宫颈癌和大约20%脑癌和颈癌与其密切相关^[1,2]。HPV具有严格的组织特异性,其HPV的生活周期与上皮细胞的分化紧密联系,所以一直以来感染性乳头瘤病毒只能通过烦琐的器官培养(organotypic cultures)和小鼠异种移植(mouse xenografts)途径获得,而用这两种方法很难获得足量的野生型或突变型人乳头瘤病毒(HPV)颗粒,这大大限制了乳头瘤病毒生物学许多方面的研究^[3-6]。最近Buck应用假病毒技术成功建立培养BPV的瞬时转染系统,但是研究结果表明BPV衣壳蛋白包裹目的基因的大小有限,大约6-7 kb,这远远小于BPV基因组^[7]。Pyeon D^[2]采用采用同样假病毒技术建立了用于HPV病毒培养的瞬时转染系统,该系统中每个细胞能产生大量有感染性的病毒,病毒产生量是常规器官培养的1000倍之多。Pyeon D^[2]还发现密码子优化HPV16衣壳基因可以包裹7.9kb的HPV基因组,但是Pyeon D没有对衣壳蛋白包裹基因组的上限做研究。新疆HPV16全长基因组大小为7963 bp,是目前世界上报道最长的HPV16基因组,密码子优化HPV16衣壳基因是否可以将其包裹,产生病毒样颗粒有待探讨。同时该研究将为研究新疆病毒复制能力、疫苗等方面奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 质粒: pCR®-XL-TOPO®-XJHPV16 (包含完整新疆 HPV16 基因组), pcDNA3.1-L1-IRES-L2 (L1基因, L2基因均经过密码子优化);细胞株: 293T细胞(中国农业科学

院哈尔滨兽研所惠赠); LA Taq DNA聚合酶和反转录试剂盒(购自fermentas公司); 质粒提取和胶回收试剂盒(购自qiagen公司); TOPO® XL PCR® 克隆试剂盒及Lipofecamine™2000(购自Invitrogen公司); 电转化感受态Top10菌(购自TaKaRa公司); Benzonase核酸酶(购自Sigma公司) HPV16 L1单克隆抗体mAb(购自上海吉泰新择生物科技有限公司); 辣根过氧化物(HRP)标记的羊抗鼠IgG(购自北京博奥森生物技术有限公司); 引物于上海生工合成; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 线性化和自身环化XJHPV16片段的获得 将含pCR®-XL-TOPO®-XJHPV16菌种按照1%比例接入LB(含Kana+ 50 mg/L)培养基中, 同时pcDNA3.1-LI-IRES-L2菌种按照1%接入LB(含Amp+ 50 mg/L)培养基中, 两者均于37℃培养14-16小时后用qiagen公司质粒提取试剂盒质粒。用Apa I 酶切pCR®-XL-TOPO®-XJHPV16质粒, 结晶紫凝胶电泳并回收XJHPV16目的片段, 同时在低浓度下16℃连接过夜, 结晶紫凝胶电泳回收自连接产物^[8]。

1.2.2 病毒包装 选取对数生长期的293T细胞进行转染实验, 转染步骤按Invitrogen公司提供的293T转染细胞的实验流程操作。实验共设4组(1)用线性新疆XJHPV16基因与密码子优化HPV16衣壳基因真核共表达载体共同转染293T细; (2)自身环化的新疆XJHPV16基因与密码子优化HPV16衣壳基因真核共表达载体共同转染293T细; (3)线性新疆XJHPV16基因单独转染293T细胞。(4)自身环化的新疆XJHPV16基因单独转染293T细胞。

1.2.3 线性的新疆HPV16基因组成环检测 转染后培养48 h, 从转染线性XJHPV16基因组实验组中取一部分转染细胞离心收集, 并重悬于PBS(含有9.5 mM MgCl₂, 0.25% Brij58, 0.3% benzonase) 37℃孵育24 h。裂解产物加入0.17体积5mol / L NaCl, 置冰上10Min, 4℃2000g离心10M, 收集上清, 1ml上清液中加入20ul蛋白酶K(20mg/ml), 37℃消化2h, 酚、氯仿纯化, 从收获的上清中提取病毒基因组DNA, Southern blot 实验检测线性新疆HPV16基因组成环情况, Southern 实验的探针为HPV16 E1 基因全长。

1.2.4 293T细胞中E2基因和E5基因的转录情况的检测 转染后培养48 h, 提取每组细胞的RNA, 步骤按照Invitrogen公司提供的Trizol说明书进行, RNA经过DNAase I 37℃消化30M, 以去除DNA污染。按照fermentas公司提供的逆转录说明书进行合成cDNA, 用E2基因和E5基因的特

引物检测其转录情况。E2P1: 5'-TAAGTTTGCACGAGGACGAGG-3', E2P2: 5'-CCCGCATGAACTTCCCATAC-3'; E5P1: 5'-GATACTGCATCCACAACATTACTGG-3', E5P2: 5'-TGTGTCGCATTGTTAAGTAATAACAGTT-3'。E2/E5 扩增条件均为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 45 S, 54 °C 退火 30 S, 72 °C 延伸 45 S, 共 30 个循环, 72 °C 延伸 7 min。

1.2.5 293T 细胞中 L1 表达情况的检测 转染后培养 48 h, 用 Trizol 法提取每组细胞的总蛋白, 步骤按照 Invitrogen 公司提供的 Trizol 说明书进行。Western blot 进行 L1 表达情况的检测, 一抗为 L1 单抗, 二抗为山羊抗小鼠 HRP。

2 结果

2.1 线性化和自身环化 XJHPV16 片段的获得 用限制性内切酶 *Apa I* 酶切 pCR®-XL-TOPO®-XJHPV16, 琼脂糖凝胶电泳出现一条大小约为 8kb 条带和另一条大小约为 3.5kb 条带(图1), 回收约 8kb 条带用于自连接, 连接结果表明获得连接成功(图2)。

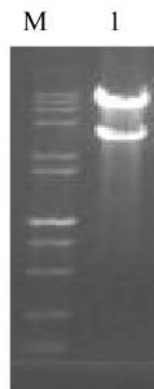


图 1 pCR®-XL-TOPO®-XJHPV16 质粒酶切鉴定

Fig1 Identification of pCR®-XL-TOPO®-XJHPV16 plasmid by restriction enzyme digestion

M: DL15000+2000 marker; 1: pCR®-XL-TOPO®-XJHPV16 plasmid digested by *Apa I*

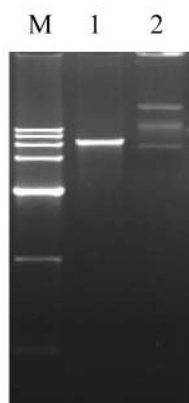


图 2 线性化XJHPV16片段在T4连接酶作用后自身环化

Fig 2 Self-Ligation of linear XJHPV16 by T4 ligase

M:DL15000+2000 mark 1: Recovery of linear XJHPV16 from pCR®-XL-TOPO®-XJHPV16 plasmid digested by *Apa* I ;2: recircularized XJ-HPV16 by by T4 ligase

2.2 Southern 检测线性的新疆HPV16基因组成环

Southern 实验结果表明无论是单独转染线性的新疆HPV16基因组还是和衣壳基因共同转染的线性的新疆HPV16基因组在293T细胞均重新成环（断点处重新闭合）（图3）。

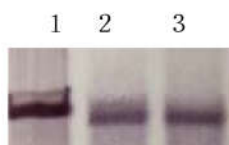


图 3 Southern 检测线性的新疆 HPV16 基因组成环

Fig 3 linear XJHPV16 is recircularized by Southern

1:Linear XJ-HPV16;2: Linear XJ-HPV16 transfected 293T cells

3: Linear XJ-HPV16 and pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* transfected 293T cells

2.3 293T细胞中E2基因和E5基因的转录情况的检测 RT-PCR(reverse transcription PCR)结果表明，每个实验组的RNA 均未能检测到E2基因和E5基因的转录(结果不显示)，而每个实验组的cDNA 均能检测到（图4， 5）

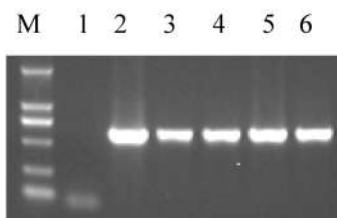


图 4 转染48h后检测每组293T细胞中E2基因的转录情况

Fig 4 Results of E2 transcription in the thanscripted 293T cells after 48 h

M:DL 2000 marker;1:negative control;2:positive control; 3: cDNA of Linear XJHPV16 and pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* transfected 293T cells 4: cDNA of recircularized XJHPV16 and pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*transfected 293T cells 5: cDNA of Linear XJHPV16 transfected 293T cells 6: cDNA of recircularized XJHPV16 transfected 293T cells

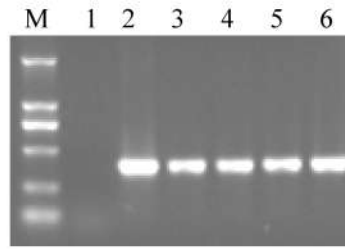


图 5 转染48h后检测每组293T细胞中E2基因的转录情况

Fig5 Results of E5 transcription in the thanscribed 293T cells after 48 h

M:DL 2000 marker;1:negative control;2:positive control; 3: cDNA of Linear XJHPV16 and pcDNA3.1-L1-IRES-L2 transfected 293T cells 4: cDNA of recircularized XJHPV16 and pcDNA3.1-L1-IRES-L2 transfected 293T cells 5: cDNA of Linear XJHPV16 transfected 293T cells 6: cDNA of recircularized XJHPV16 transfected 293T cells

2.4 293T细胞中L1表达情况的检测 用Trizol提取细胞总蛋白后,通过Western blot检测每个实验组L1基因的表达情况,印迹中只有与衣壳基因共同转染的实验组出现Mr 55 000的条带,与预计L1蛋白大小相符,而单独转染线性还是环化的XJHPV16未出现目的条带(图6)。



图 6 293T 细胞中 L1 表达情况的检测

Fig 6 Western blotting for expression of L1 protein in the transfected 293T cells after 48 h

1: Linear XJHPV16 transfected 293T cells;2: Linear XJHPV16 and pcDNA3.1-*L1-IRES-L2*transfected 293T cells 3: Recircularized XJHPV16 and pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* transfected 293T cells 4: Recircularized XJHPV16 transfected 293T cells

3 讨论

人乳头瘤病毒(HPV)是一类无包膜的小DNA病毒,可感染人皮肤和黏膜的上皮细胞,引起不同程度的良性或恶性增生性病变^[9,10]。HPV具有严格的组织特异性,用HPV直接进行动物实验有一定困难。由于HPV的生活周期与上皮细胞的分化紧密联系,因此,HPV在体外常规单层细胞培养中产生感染性病毒颗粒比较困难^[2]。Pyeon D^[2]等人用同样假病毒技术建立了用于HPV病毒培养的瞬时转染系统,该系统中每个细胞能产生大量有感染性的病毒,病毒产生量是常规器官培养的1000倍之多。本研究参考Pyeon D^[2]实验方法,探索新疆株XJHPV16病毒样颗粒在293T细胞中的包装,将为研究新

疆HPV16传播、致病能力等方面奠定一定的基础。

本研究中病毒基因组的大小为7963bp, 现有关于HPV16基因组大小报道均小于7963bp^[11,12]。Buck发现在瞬时转染系统中BPV衣壳基因包裹基因组大小有一定限制, 大约6-7 kb, 这远远小于BPV基因组^[7], 虽然Pyeon D^[2]发现HPV衣壳基因可以包裹出自身基因组, 但是未研究比7.9kb大的基因组。本研究发现密码子优化的HPV衣壳基因可以包裹7963bp的基因组, 说明HPV衣壳基因包裹能力不仅仅是7.9kb, 探索HPV衣壳基因包裹能力, 将为研究HPV16假病毒颗粒奠定良好基础。

本研究发现单独转染线性还是环状的XJHPV16的293T细胞均未检测到L1蛋白的表达, 推断其与野生型HPV16表达量较低有关^[13-14]。是否可以将密码子优化的衣壳基因替换到野生型HPV16基因组中, 来实现单转HPV16包装病毒的能力, 这方面研究有待于探讨。

本研究发现线性XJHPV16转染细胞可以实现自身连接, 推测其与293T细胞的蛋白有关, 具体的原因不是很清楚, 有待于进一步探索。

参考文献(References)

- [1] Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer[J]. Clin Microbiol Rev. 2003, 16: 1-17
- [2] Pyeon D, Lambert PF, Ahlquist P. Production of infectious human papillomavirus independently of viral replication and epithelial cell differentiation[J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2005, 102 (26): 9311-9316
- [3] Woodman CB, Collins SI, Young J. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(1): 11-22
- [4] Dollard SC, Wilson JL, Demeter LM, Bonnez W, Reichman RC, Broker TR, Chow LT. Production of human papillomavirus and modulation of the infectious program in epithelial raft cultures[J]. Genes Dev, 1992, 6 (7): 1131-1142
- [5] Meyers C, Frattini MG, Hudson JB. Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation[J]. Science, 1992, 257 (5072): 971-973
- [6] McLaughlin-Drubin ME, Christensen ND, Meyers C. Propagation, infection, and neutralization of authentic HPV16 virus[J]. Virology, 2004, 322 (2): 213-219
- [7] Culp TD, Cladel NM, Balogh KK, Budgeon LR, Mejia AF, Christensen ND. Papillomavirus particles assembled in 293TT cells are infectious in vivo[J]. J Virol, 2006, 80 (22): 11381-11384
- [8] Genther SM, Sterling S, Duensing S, Münger K, Sattler C, Lambert PF. Quantitative role of the human papillomavirus

type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle[J],2003, J Virol,77(5):2832-2842

[9]Zur Hausen H.Papillomaviruses and cancer:from basic studies to clinical application[J] ,Nat Rev Cancer,2002,2:342-350

[10]Clifford G M,Smith J S,Plummer M,Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide:a meta—analysis[J].Hr J Cancer,2003,88:63-73

[11] Myers, G. H. Delius, J. Icenogle, H. U. Bernard, M. Favre, M. van Ranst, and C. M. Wheeler. 1997. Human papillomaviruses 1997: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences[M]. Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N.Mex

[12] Chen Z, Terai M, Fu L, Herrero R, DeSalle R, Burk RD. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses[J]. J Virol. 2005 ,79(11):7014-7023

[13]Tan W,Felber B K ,Zolotukhin A S.Efficient expression of the human papillomavirus type 16 L1 protein in epithelial cells by using Rev and the Rev—responsive element of human immunodeficiency virus or the cis-acting transactivation element of simian retrovirus type 1[J] .J Virol,1995,69:5607-5620

[14] Leder C, Kleinschmidt JA, Wiethe C, Müller M. Enhancement of Capsid Gene Expression: Preparing the Human Papillomavirus Type 16 Major Structural Gene L1 for DNA Vaccination Purposes[J]. J Virol, 2001, 75 (19): 9201-9209

结论与展望

- 1、本研究在世界上第一次对新疆维吾尔族宫颈癌患者的 HPV16 全基因组进行克隆及序列分析, 其基因组大小 7963bp, 是世界上已报道的最长的 HPV16 全长基因组序列。
- 2、本研究新疆株 HPV16 *E1* 基因多态型进行分析, HPV16 *E1* 阳性率为 78%(32/41), 说明 HPV16 是导致新疆维吾尔族妇女患宫颈癌的主要元凶。新疆株 HPV16 *E1* 基因在核苷酸水平上形成 11 种突变模式; 氨基酸水平上形成 5 种突变模式, 其中 63 个核苷酸重复突变在世界未见报道。该重复突变是否与新疆宫颈癌高发有关, 有待探讨。
- 3、成功构建的 pcDNA3.1-*L1-IRES-L2* 载体, 其通过 *IRES* 作用实现在一个启动子作用下可以表达 HPV16 主衣壳和次衣壳基因, 为病毒包装所必备元件; 并且由于 pcDNA3.1 载体的特性, 真核共表达载体均有 G418 筛选标记, 为后续筛选工作奠定基础。
- 4、本实验室马正海副教授对新疆 HPV16 *L1* 基因多态性进行分析, 发现 新疆 HPV16 *L1* 基因发生了多位点变异, 从而导致 HPV16 *L1* 蛋白疏水性和抗原性的改变, 这可能与 HPV16 逃避机体免疫识别有关, 因此用新疆本地分离的 HPV16 *L1* 基因研制宫颈癌预防性疫苗, 将能更有效地保护当地妇女免受 HPV16 的感染。本研究开展新疆株 HPV16 *L1* 在真核细胞中表达水平的初探研究, 研究结果表明虽然新疆 HPV16 *L1* 存在较大变异, 但是与其它已报道的 HPV16 野生型的 *L1* 一样在 293T 细胞中的表达量仍然很低, Western blot 无法检测到相应蛋白的表达。这也将成为我们在进行开发疫苗和机理研究时需要注意的问题。
- 5、将线性或者环化的 XJHPV16 单独转染 293T 细胞后, 无法检测到衣壳基因表达, 说明衣壳基因对包装新疆株 HPV16 病毒颗粒室必需的。线性 HPV16 转染 293T 细胞后, 在细胞内可以重新成环, 这为以后包装病毒提供重要实验依据, 无需将线性的 HPV16 在体外连接成环。

本研究有关新疆 HPV16 全基因组序列及病毒颗粒的包装研究, 有利于了解新疆病毒变异, 为研究新疆 HPV16 致癌能力变化、宫颈癌高发原因奠定一定基础。同时也为新疆地区当地宫颈癌疫苗、和相关药物的设计奠定基础。

致 谢

三年的研究生生活转瞬即逝,回顾这三年来我在新疆生物资源基因工程重点实验室成长经历,终生难忘,因为它成为我事业、人生的转折点、进步的阶梯。我在导师张富春教授的严格要求和悉心指导下完成了硕士毕业论文。三年中,导师那渊博的学识、敏锐的洞察力,严谨的治学作风,尤其是对科学研究工作的热情和激情、勇于探索的精神深深地感染了我。从导师身上学到的不仅是知识与做人做事的道理,更为重要的领悟到了科学家做科学的真正内涵,找到了可以奉献一生的事业方向。导师平易近人、乐于奉献、宽以待人的人格魅力和在做人和做学问上的深切教诲,将使我获益终生!在即将毕业之际,谨向导师致以最崇高的敬意和最衷心地感谢!

衷心感谢马正海副教授给我在学术上最大的自由度和发挥的空间,他独特、敏锐的思维深深影响了我,使我终身受益,是我奋斗的榜样,在这即将毕业之际,谨向马正海老师致以最崇高的敬意和最衷心地感谢!

衷心感谢涂玉娴师姐、许璐师妹在学术生活方面的帮助。

衷心感谢马纪教授、兰海燕教授、刘小宁副教授、庄淑珍副教授、李江伟副教授、梁永海老师、阿力木老师、曾幼玲老师、刘忠渊老师、李轶杰老师、张爱莲老师、热西丹老师在实验中给予的悉心指导和帮助。

衷心感谢德国科学家德国科学家 Martin Mueller 惠赠密码子优化 HPV16 衣壳基因。

衷心感谢河南师范大学生命科学学院一省部共建细胞分化调控重点实验室陈晓光博士在论文写作方面指导,在此深表感谢!

衷心感谢中国科学院上海巴斯德研究所汪凯在实验帮助。

衷心感谢新疆生物资源基因工程重点实验室和分子免疫学实验室的所有同学、师弟、师妹们,特别是我们同年级的本实验室的研究生,感谢你们的支持与帮助。

衷心感谢我的父母,女朋友及亲友,谢谢他们的无私支持、理解和奉献,使我顺利完成学业。

再次向所有热情帮助过我的老师、同学和朋友们致以最崇高的敬意和最诚挚的感谢!

个人简历

刘立鸿,男,汉族,1982年10月出生,籍贯:福建。

联系方式: xjliulihong1234@126.com

主要经历:

2006年7月毕业于新疆大学,获学士学位;

2004年9月至今,在新疆大学攻读理学硕士学位,师从张富春教授,研究方向为肿瘤病毒学,主要新疆宫颈癌致病机理方面的研究。

获奖情况:

1. 《传播 HPV16 媒介微生物的发现及其在预防宫颈癌中的应用》获新疆大学第六届大学生课外学术科技作品一等奖。
2. 《1+1>2》获 2005 年全国学术年会-新疆青少年科技教育与思想道德建设论坛论文一等奖
3. 《传播 HPV16 媒介微生物的发现及其在预防宫颈癌中的应用》获第九届“挑战杯”飞利浦全国大学生课外学术科技作品竞赛中荣获三等奖



硕士和本科期间已发表和待发表的论文

1. LIU Li-hong, XU Lu , MA Zheng-Hai , ZHANG Fu-chun. Genomic Sequence Analysis of a Human Papinomavirus Type 16 Isolated from Uygur Cervical Cancer Patient in Xinjiang, China , 待投
2. LIU Li-hong, XU Lu , MA Zheng-Hai , ZHANG Fu-chun. Polymorphism of HPV16 type *E1* genes from cervical carcinoma biopsies in Xinjiang Uygur women, 待投
3. 刘立鸿, 许璐, 张富春, 马正海. 探索新疆株 HPV16 病毒样颗粒在 293T 细胞中的包装, 待投
4. 刘立鸿, 许璐, 李铁杰, 张富春, 马正海. 密码子优化 HPV16 衣壳基因真核共表达载体的构建及细胞转染[J], 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 第 4 期
5. 刘立鸿, 王凯, 张富春, 马正海. 地高辛标记探针 Southern 印迹杂交法技术要点及改进[J], 生物技术通报, 2008, 第6期
6. 刘立鸿, 王凯, 张富春, 马正海. 人乳头瘤病毒致癌机制研究进展[J], 生命科学, 2008, 第2期
7. 刘立鸿, 李菁菁, 王咏星. 微生物肥料及其发展前景[J], 新疆大学学报, 2004年第21卷
8. Haiyan Lan, Lihong Liu, Lili Gu, Tianyu You, Lu Xu, Xiuming Li, Shixiang Yao, Fuchun Zhang. Secretion and Composition of Seed Coat Mucilage of *Lepidium perfoliatum* and Its Possible Ecological Roles. (Submitted to Journal of Arid Environment), 2007
9. 王咏星, 刘立鸿, 苏保卫. 常见五种药物对丁鱼岁鱼的敏感性试验[J], 2004 年第 4 期
10. 许璐, 刘立鸿, 张富春, 马正海. 新疆株 HPV16 L1 在真核细胞中表达水平的初探[J], 2008 年第 6 期
11. 张海波 , 刘彭 , 刘立鸿, 兰海燕 , 张富春. 新疆短命植物小拟南芥 (*Arabidopsis pumila*) 种子萌发特性及其生态适应性[J], 生态学报 , 2007 年第 10 期
12. 张海波 , 刘彭 , 刘立鸿, 兰海燕 , 张富春. 新疆短命植物小拟南芥耐盐性的初步研究[J], 西北植物学报 , 2007 年第 2 期
13. 王咏星, 陈海洋, 谢利琼, 刘立鸿. 提高甘草种子的发芽率和出苗率试验[J], 种子, 2004
14. Zhenghai Ma , Bangdang Chen, Fuchun Zhang, Meng Yu, Tingting Liu, Lihong Liu . Increasing the expression levels of papillomavirus major capsid protein in *Escherichia coli* by N-terminal deletion, 2007, period 56

学位论文独创性声明

本人声明,所呈交的学位论文系本人在导师指导下独立完成的研究成果。文中依法引用他人的成果,均已做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果,也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

本人如违反上述声明,愿意承担由此引发的一切责任和后果。

论文作者签名: 刘立红 日期: 2008年5月21日

学位论文知识产权权属声明

本人的学位论文是在学期间在导师指导下完成的,知识产权归属学校。学校享有以任何方式发表、复制、公开阅览、借阅以及申请专利等权利。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时,署名单位仍然为新疆大学。

本学位论文属于:

保 密 ☐ ,在 年解密后适用于本声明。

不保密 ☒ 。

(请在以上方框内打“√”)

论文作者签名: 刘立红 日期: 2008年5月21日

导师签名: 张永春 日期: 2008年5月27日