

宫颈癌组织高危 HPV18 L1 基因的克隆及序列分析

高艳娥¹, 杨会平², 张菊³, 郭金珠¹, 刘宁侠¹, 阎小君³

Cloning and Sequencing of Human Papillomavirus Type 18 L1 Gene from Cervical Cancer Tissue

GAO Yane¹, YANG Hui-ping², ZHANG Ju³, GUO Jin-zhu¹, LIU Ning-xia¹, YAN Xiao-jun³

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Second Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; 2. Sixth Hospital of Xi'an; 3. Institute of Gene Diagnosis, Fourth Military Medical University

Abstract: **Objective** To clone and analyze the whole sequence of L1 gene and its deduced L1 protein of HPV18 from specimen of cervical cancer. **Methods** HPV18 L1 gene was amplified from a HPV18-positive DNA sample of a Chinese patient with cervical adenocarcinoma by means of PCR and then cloned and sequenced. **Results** In comparison with the prototype, there were twelve point mutations in HPV 18 L1 nucleic acid sequence and the differed sequence had changed the triplet codes. Therefore, the amino acid sequence of HPV 18 L1 protein could be subsequently changed. **Conclusion** Some mutations had taken place in the nucleotide sequence of HPV18 L1 gene obtained from the cervical cancer tissue of this Chinese patient.

Key words: Human papillomavirus type 18; L1 gene; Cervical cancer; Cloning

摘要:目的 克隆和分析人乳头瘤病毒 18 型晚期表达基因 L1 序列,为 HPV 感染的检测和基因工程疫苗研制提供基础。方法 采用 PCR 技术扩增了 1 例 HPV18 阳性宫颈腺癌患者癌组织中 HPV18 L1 基因,并对其进行了克隆及全序列分析。结果 本例宫颈癌临床标本 HPV18 L1 基因与 GenBank 收录的原型比较有 12 个碱基变异,推导其编码的氨基酸也发生了变化。结论 本例中国人宫颈癌 HPV18 L1 基因有一定的变异。

关键词:人乳头瘤病毒 18 型;L1 基因;宫颈癌;克隆

中图分类号:Q789 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2006)03-0159-03

0 引言

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染是最常见的性传播疾病之一,至今,已发现 100 多型 HPV,近半数可感染生殖道。其中,HPV 16、18、31、33、35 和 58 等型因与宫颈癌等恶性肿瘤的发生发展密切相关而归属高危群。

虽然 HPV18 是世界大部分地区宫颈癌患者中次于 HPV16 的第二位常见高危 HPV^[1,2],但 HPV18 较 HPV16 具有更强的恶性转化能力^[3]。HPV 感染的控制关键在于疫苗的发展。HPV 晚期基因 L1 编码的病毒主要衣壳蛋白 L1 是病毒的重要抗原,能刺激机体产生保护性抗体,故 L1 基因已被用于制备 HPV 疫苗^[4]。由于 HPV 不能在体外

经组织培养增殖,故而 L1 基因的克隆和表达对基因工程疫苗及诊断试剂的研制具有重要意义。本实验对来自陕西省的一例宫颈腺癌患者手术标本中的 HPV18 L1 基因进行了克隆及一级结构分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 DNA 选取我们用 TDFP 分型方法^[1]鉴定出的一例 HPV18 阳性宫颈癌 DNA。患者源自西安交通大学第二医院妇产科,42 岁。经病理诊断为腺癌,按 FIGO 分期为 a 期。取材前未接受化疗和放疗。

1.1.2 菌株及主要试剂 DH5 大肠杆菌细胞株为第四军医大学全军基因诊断研究所保存,克隆载体连接试剂盒(pGEM-T Easy Vector System I,内有 T4 连接酶)和质粒提取试剂盒(Wizard Plus Minipreps DNA Purification System)购自美国 Promega 公司,Taq DNA 聚合酶、限制性内切

收稿日期:2005-06-10;修回日期:2005-07-21

基金项目:陕西省科技计划资助项目(2004 K13-G2)

作者单位:1. 710004 西安交通大学第二医院;2. 西安市第六医院;3. 第四军医大学全军基因诊断技术研究所

作者简介:高艳娥(1964-),女,博士,主要从事妇科肿瘤研究

酶 Hind Ⅲ 及 Sac Ⅰ、DNA marker(DL2000)、异丙基硫代-D-半乳糖苷(IPTG)和 5-溴-4-氯-3-吡啶-D-半乳糖苷(X-gal)、dNTP 混合物购自大连宝生物公司,电泳凝胶片段回收试剂盒(CONCERT™ Rapid Gel Extraction System)购自美国 GIBCO 公司。蛋白酶 K、RNA 酶购自洛阳华美生物工程公司。引物和寡核苷酸探针由北京赛百盛公司合成。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 HPV18 L1 基因

HPV18 L1 ORF 全长引物依据 GenBank 设计。上游引物外设 Sac Ⅰ 酶切位点和保护碱基 CG,下游引物外设 Hind Ⅲ 酶切位点和保护碱基 GC。该引物扩增的靶序列全长 1707bp。PCR 以从宫颈癌组织中提取的总 DNA 作为模板,总体系 25 μ l,内含 dNTP 0.25 mmol L⁻¹,引物各 0.25 μ mol L⁻¹,MgCl₂ 2.5 mmol L⁻¹,Taq 酶 2.5U。扩增条件:94 变性 5min 后,进行 35 个循环:94 40s,56 40s,72 2min,末次循环后 72 延伸 7min。

1.2.2 HPV18 L1 基因的克隆和测序

将 PCR 产物经含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,紫外灯下看到 1707bp 的 L1 扩增带,将含有相应片段的凝胶切下置入 1.5ml Eppendorf 管中,分别严格参照电泳凝胶片段回收试剂盒及克隆载体连接试剂盒(pGEM-T Easy Vector System I)说明回收目的片段,并将目的片段与克隆载体 pGEM-T Easy 连接,构建 HPV18 L1-pGEM-T 重组质粒,转化至 CaCl₂ 法制备的大肠杆菌 DH5 感受态细胞中。在含有 IPTG 和 X-gal、氨苄青霉素阳性的 LB 琼脂平皿中蓝白筛选,随机挑取 3 个白色单菌落扩大培养,按 Wizard Plus Minipreps DNA 纯化试剂盒说明书步骤小量提取重组质粒,并进行酶 Hind Ⅲ 及 Sac Ⅰ 双酶切鉴定。含有 1707bp(L1)外源 DNA 片段的克隆为阳性克隆,送上海 Sangon 生物工程公司进行 DNA 序列测定,对测序结果进行分析。

2 结果

2.1 HPV18 L1 基因的 PCR 扩增

从宫颈癌组织中提取的总 DNA 作为模板,用合成的 HPV18 L1 引物进行 PCR 扩增,产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析,可见一条清晰的扩增带,见图 1,与预计的片段大小一致,为 1700bp 左右。

2.2 重组质粒的构建及双酶切鉴定

目的片段回收后与线性克隆载体 pGEM-T Easy 连接,构建了 HPV18 L1-pGEM-T 重组质粒。将重组质粒经转化及 Hind Ⅲ 和 Sac Ⅰ 双酶切鉴定筛选出阳性克隆。

酶切电泳结果如图 2,可见重组质粒的插入片段与预计的 1707bp 片段大小一致。

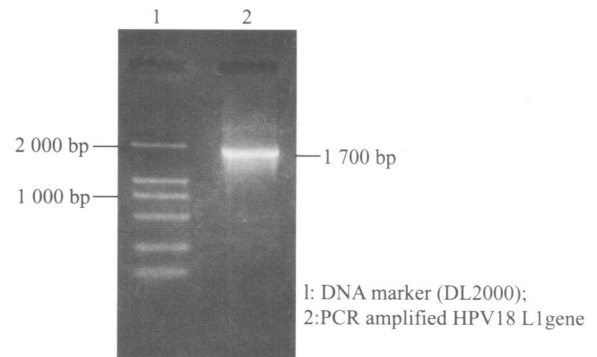


图 1 HPV18 L1 基因 PCR 产物的电泳分析

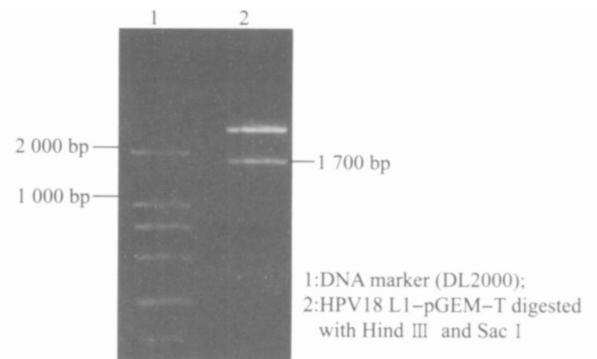


图 2 重组质粒 HPV18 L1-pGEM-T 的双酶切鉴定

2.3 重组质粒的序列测定和分析

将含重组质粒的阳性克隆经上海 Sangon 生物工程公司自动测序仪行正、反双向测定,拼接出 L1 完整序列,推导出相应的 L1 蛋白质氨基酸序列。经 blast 同源性分析证实,克隆获得的 HPV18 L1 基因从起始密码子(ATG)到终止密码子(TAA)共 1707bp,与 GenBank 收录的(收录号: X05015)、由 Cole 等^[5]报道的原型(prototype)比较,有 12 个碱基发生了变异,推导其蛋白质一级结构中可能有 11 个氨基酸发生改变,见表 1。

3 讨论

近 20 年来对宫颈癌的病因及癌变机制的研究表明 HPV 是宫颈癌的主要致癌因素,近 99% 的宫颈癌组织中可检出 HPV DNA。HPV16 和 HPV18 是宫颈癌中最常见的高危型 HPV,检出率达 50%~90%^[1,2]。

体外研究发现,与 HPV16 相比,HPV18 的恶性转化及使细胞永生化的能力更强^[3]。据报道 HPV18 相关的宫颈癌癌前病变进程更快^[6]。HPV18 也是宫颈癌再发的独立危险因素^[7],且与宫颈腺癌显著相关^[8],HPV18 相关宫颈癌早期诊断率低、预后差。因此,控制 HPV18 感染必将能减少 HPV18 感染相关肿瘤的病死率。

表 1 宫颈腺癌样本中 HPV18 L1 基因突变分析

突变号	核苷酸在 HPV18 基因组中的位置	核苷酸变化(箭头左为参照的原型)	相应三联码的改变(箭头左为参照的原型)	突变码编码的氨基酸(箭头左为参照的原型)
1	5603	G A	CGG CAG	Arg ²⁵ Gln ²⁵
2	5701	C G	CCC CGC	Pro ⁹¹ Arg ⁹¹
3	5875	C A	ACT AAT	Thr ¹⁴⁹ Asn ¹⁴⁹
4	5920	C T	GCT GTT	Ala ¹⁶⁴ Val ¹⁶⁴
5	6157	A T	CAG CTG	Gln ²⁴³ Leu ²⁴³
6	6312	T A	TAT AAT	Tyr ²⁹⁵ Asn ²⁹⁵
7	6357	T C	TGC CGC	Cys ³¹⁰ Arg ³¹⁰
8	6382	C T	GCT GTT	Ala ³¹⁸ Val ³¹⁸
9	6401	A G	A GA A GG	Arg ³²⁴
10	6430	A C	CAA CCA	Gln ³³⁴ Pro ³³⁴
11	6460	C G	CCT CGT	Pro ³⁴⁴ Arg ³⁴⁴
12	6625	C G	CCC CGC	Pro ³⁹⁹ Arg ³⁹⁹

到目前为止,对 HPV 感染所致的疾病尚无特异的抗病毒治疗方法,其控制关键在于开发 HPV 疫苗。由于 HPV 不能在体外培养增殖,相关基因/蛋白的获得只能依赖基因工程重组及表达系统。HPV 晚期基因 L1 编码的病毒主要衣壳蛋白 L1 是 HPV 的重要抗原,多种 HPV 重组 L1 蛋白能够自发折叠成病毒样颗粒(VLP),免疫机体后可刺激 B 淋巴细胞产生中和抗体,从而阻断 HPV 病毒感染,故而 L1 基因及蛋白已成为基因工程疫苗研制的重要靶向基因和蛋白^[4]。

已知各型 HPV 有多种变种(variant)存在,即 HPV 基因呈高度多态性,这种多态性与地理位置有关,且因人群遗传背景差异而与疾病的相关关系不同^[9]。本例 HPV18 L1 基因序列较 GenBank 收录的源自巴西的原型^[5]比较有 12 个碱基发生突变,推导出的 L1 蛋白一级结构中的氨基酸 11 个发生了变化。L1 基因变异导致的 L1 蛋白一级结构变化对蛋白功能,尤其蛋白免疫原性的影响尚需深入研究。在对 HPV 检测及疫苗研制时应考虑到基因变异可能的影响。

本实验从西安地区 1 例宫颈腺癌患者临床标本中成功地克隆到了 HPV18 型 L1 基因,该基因的成功克隆为其相应蛋白表达的后续工作奠定了基础,并对疫苗的进一步研制,以及开发具有诊断或预防功能的生物制剂都具有重大意义。

参考文献:

- [1] Gao YE, Zhang J, Wu J, et al. Detection and genotyping of human papillomavirus DNA in cervical cancer tissues with fluorescence polarization[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2003, 35(11): 1029-1034.
- [2] Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, et al. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005, 14(5): 1157-1164.
- [3] Villa LL, Schlegel R. Differences in transformation activity between HPV 18 and HPV 16 map to the viral LCR-E6-E7 region[J]. Virology, 1991, 181(1): 374-377.
- [4] Yuan H, Estes PA, Chen Y, et al. Immunization with a pentameric L1 fusion protein protects against papillomavirus infection[J]. J Virol, 2001, 75(17): 7848-7853.
- [5] Cole ST, Danos O. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome[J]. J Mol Biol, 1987, 193(4): 599-608.
- [6] Kurman RJ, Schiffman MH, Lancaster WD, et al. Analysis of individual HPV types in cervical neoplasia: a possible role for type 18 in rapid progression[J]. Am J Obstet Gynecol, 1988, 195(2): 293-296.
- [7] Rose BR, Thompson CH, Simpson JM, et al. Human papillomavirus DNA as a prognostic indicator in early stage cervical cancer: a possible role for type 18[J]. Am J Obstet Gynecol, 1995, 173(5): 1461-1468.
- [8] Kim JW, Cho YH, Lee CG, et al. Human papillomavirus infection and TP53 gene mutation in primary cervical carcinoma [J]. Acta Oncol, 1997, 36(3): 295-300.
- [9] Yamada T, Manos MM, Peto J, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective[J]. J Virol, 1997, 71(3): 2463-2472.

[编辑:贺文]