维普资讯 http://www.cqvip.com

45-52

第8卷第1期
1993年3月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol.8 No.1
Mar.1993

我国人乳头瘤病毒（HPV16Z）基因克隆和鉴定

张伟 金顺钱 梁肖商铭
孙建衡 王希霞 吴爱茹

（中国医学科学院肿瘤所，北京，100021）

R730.231.3
R373.9

提要

本文作者采用基因克隆手段，以pAt153为载体，从一份山西襄垣宫颈癌高发区宫颈癌患者的手术标本中，成功地克隆到2株与HPV16同源的基因片段。经PstI、KpnI、TaqvI、PvuII等16种限制性内切酶酶谱分析及其部分基因序列的鉴定，证明这是在国内首次克隆到一株分子量约为8.0kb完整的HPV16型全序列DNA及一株分子量为5.4kb的HPV16基因片段。经实验证明：该基因片段的E6、E7及部分LI基因丢失，在750单核苷酸处发生变异，产生一新的BamHI酶切位点。该完整的HPV16基因组被命名为HPV16Z，HPV16基因片段被命名为HPV16F。

用新分离到的HPV16Z作分子探针，检测襄垣337份宫颈癌及阴道活检标本的HPV16互同源序列的结果显示，慢性阴道炎阳性率为17.28%(14/81)；宫颈炎为11.89%(17/143)；宫颈癌前病变为46.81%(22/47)；宫颈癌为72.73%(48/66)。证明山西宫颈癌高发区宫颈癌前病变及宫颈癌组织中主要为HPV16Z感染。

关键词：基因克隆　人乳头瘤病毒16Z　宫颈癌　斑点杂交　酶切图谱分析

目前，已发现多种人类上皮细胞肿瘤与HPV感染有关。在感染妇女宫颈上皮的HPV中，HPV6型及11型与宫颈良性损伤相伴随，而HPV16型及18型则与妇女宫颈癌密切相关，尤为HPV16型为主[1]。分子流行病学资料指出：我国妇女宫颈癌HPV16DNA同源序列检出率为55.06%，占全部HPV阳性标本的70.83%。提示宫颈癌的发生可能主要与HPV16型感染有关[2]。由于HPV至今不能在体外培养，因此，克隆我国HPV16型全序列DNA，并研究其生物学功能、致癌特性及其与宫颈上皮癌变的关系，将有十分重要的意义。

本文作者采用分子克隆手段，从自山西襄垣宫颈癌高发区宫颈原位癌的一名患者的手术标本中，成功地克隆到了2株与HPV16 DNA同源基因片段，经PstI、KpnI、TaqI PvuII等16种限制性内切酶酶谱分析，证明我国首次克隆到了一株分子量为8.0kb完整的HPV16全序列DNA及一株分子量约为5.4kbHPV16基因片段。

本文于1992年4月18日收到，10月15日修回。
*该项研究为国家"七五"资助课题。

维普资讯 http://www.cqvip.com

材料和方法

1. 材料

(1) 标本

基因克隆标本来自山西襄垣宫颈癌高发区一名36岁宫颈癌原位手术椎切标本。其余337份宫颈及阴道活检标本来源上述同一地区，－70℃保存备用。

(2) 试剂

各种限制性内切酶及其它工具为中国华美生物制品公司产品，^{32}P-dCTP及同位素标记试剂盒（N5000）均购自美国Amersham公司。其它常规试剂均为国产。

(3) 菌种及质粒

菌种HB101及HPV16质粒DNA由侯云德教授赠送。pAt153载体DNA购自中国医学科学院基础医学研究所。

2. 方法

(1) 组织DNA提取

待克隆的组织DNA标本提取参照文献[3]，活检组织小标本DNA提取参照文献[4]实验程序。

(2) DNA杂交

DNA Southern印迹杂交参照文献[5]，活检小标本DNA杂交按CosIut杂交程序进行，菌落原位杂交方法参照文献[1]。上述杂交反应均在严格条件下进行（Tm-17℃）。

(3) 待克隆组织DNA标本的部分纯化

对经Southern印迹杂交证实HPV16阳性并含有HPV16全序列DNA的组织DNA标本经BamHI酶切后（20μ/μgDNA，37℃两小时），电泳分离出9.0—5.0kb之间的DNA片段，经酚/氯仿纯化后溶于10mmol/L Tris-HCl缓冲液中，－20℃保存备用。

(4) 载体pAt153的克隆前处理

pAt153质粒经BamH I限制性内切酶酶切后（4U/μgDNA，37℃2h），电泳分离出完整的具有BamH I粘性末端的pAt153载体DNA，经酚/氯仿提取后，溶于10mmol/L Tris缓冲液中，经碱性磷酸酶处理（2μ/μgDNA，37℃ 1h）及纯化后分装－20℃保存备用。

(5) 基因克隆

经部分纯化后的分子量为9.0－5.0kb组织DNA片段与经BamH I酶切后的pAt153载体DNA进行连接(组织DNA片段1μg，pAt153 0.2μg，T4DNA连接酶8U，ATP1mmol/L，总反应体积15μl。12℃水浴连接12h）。氯化钙法转入HB101受体菌中，转化程序参照文献[7]进行。

(6) 阳性菌落的挑选及质粒DNA提取

经菌落原位杂交法筛选出HPV16DNA阳性菌落，扩增后用煮沸法快速提取质粒DNA，并进行酶切鉴定。

结 果

1. 证实在待克隆的组织DNA标本中存在有完整的HPV16DNA分子。

待克隆的组织DNA标本经BamH I及Pst I限制性内切酶酶解，电泳分离后以32P-dCTP标记的HPV-16DNA为分子探针，经Southern印迹杂交证实该份宫颈癌组织标本中

维普资讯 http://www.cqvip.com

HPV DNA分子主要以游离状态存在（图1.B），证实该HPV为HPV16型（图1.C），该标本适合于HPV16DNA基因克隆。

图 1　Southern印迹杂交结果 A.阳性对照，HPV16 BamH I及BamH I/Pst1双酶解片段，B.宫颈原位癌组织DNA经BamH I酶切后Southern杂交结果，C.同一份组织DNA经Pst I酶切后杂交结果.DNA杂交在严格条件下完成（Tm-17℃）

Fig 1　The result of southern blot hybridization was shown. A. Positive control HPV16 BamH1 and BamH I/Pst1 fragments. B. The tissue DNA from a cervix cancer in situ cut by BamH I. C. The same tissue DNA cleaved by Pst I. Hybridization was performed at high strict condition(Tm-17℃)

2. HPV16DNA的克隆及酶切鉴定。

经BamH I酶解及部分纯化的组织DNA片段，插入到pAt153载体的BamH I位点，经转化HB101宿主菌后，用菌落原位杂交技术从Arts阳性菌落中筛选出HPV16DNA杂交阳性菌落。提取质粒经BamH I酶切，电泳分离及Southern印迹杂交（Tm-17℃）。证明我们克隆到了一株分子量为7.9kb的HPV16全序列及一株分子量为5.4kb的HPV16DNA片段（图2）。经BamH I/PstI双酶解后，证实前者酶切图谱与标准HPV16DNA酶切图谱对照相一致（图3）；而后者发生了PstI B片段，F片段的全部丢失及C片段的部分丢失（图3），并在第750核苷酸处出现一新的BamH I位点，克隆到的HPV16全序列DNA及HPV16DNA片段被分别命名为HPV16Z及HPV16F。以32P-dCTP标记的HPV16ZDNA为分子

维普资讯 http://www.cqvip.com

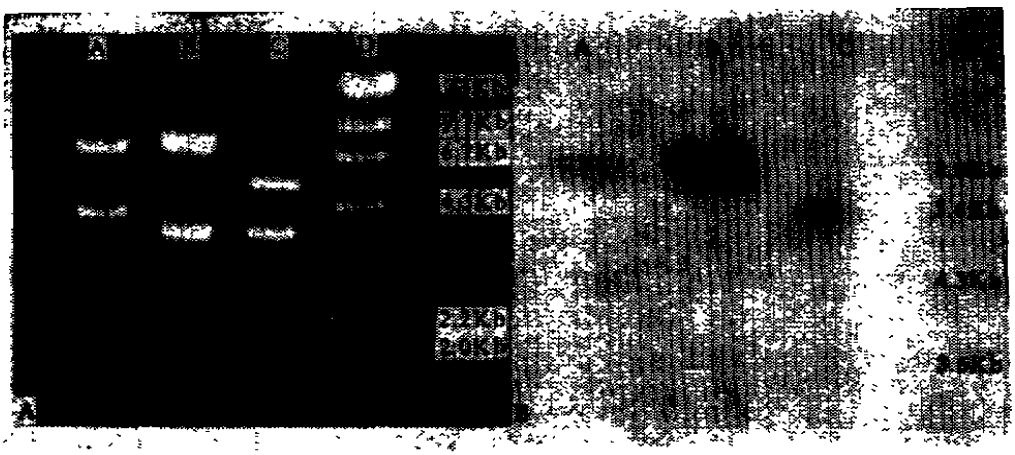


图 2 克隆到的HPV16 DNA电泳及Southern印迹杂交结果。A. BamH I酶切后的标准HPV16 DNA质粒，其在8.0kb及4.3kb处分别出现HPV16全序列DNA分子及载体PBR322DNA带。B. 新克隆到经BamH I酶解的HPV16Z质粒DNA在8.0kb处及3.6kb处出现的带型分别代表HPV16Z全序列DNA及载体pAt153DNA。C. 新克隆到的HPV16F质粒DNA，经BamH I酶解后在5.4kb及3.6kb处分别出现新克隆到的HPV16DNA片段及PAt153质粒DNA。D. λDNA/HindⅢ分子量标准DNA。本实验用HPV16 DNA为探针DNA，杂交在严格条件下完成（Tm—17℃）。

Figure 2 The results of cloned HPV16 DNAs electrophoresis(A) and southern blot hybridization(B) were shown. A. Standard HPV16 plasmid DNA cut by BamHI, which show a 8.0kb HPV16 band and a 4.3kb pBR322 vector band. B. Cloned HPV16Z plasmid DNA cleaved by BamH I, which show a 8.0kb HPV16 full-length DNA band and a 3.6kb pAt153 vector DNA band.(C).cloned a HPV16F plasmid, which show a 5.4kb HPV16 Fragment and a 3.6kb pAt153 plasmid DNA band.(D). λ DNA molecular marker cut by HindⅢ. The hybridization was performed under high strict condition (Tm—17℃) using HPV16 DNA plasmid as probes.

探针，与经BamHI/PstI双酶解的待克隆组织DNA进行杂交，证实HPV16DNA来源于该宫颈癌组织DNA标本（图4）。

（三）用16种限制性内切酶对新克隆的HPV16Z进行酶切图谱分析，结果发现它与已知的HPV16DNA无明显差异（图5）。

（四）用32P-dCTP标记的HPV16DNA为探针，用Coclot杂交法对来自我国山西襄垣宫颈癌高发区的非正常宫颈及阴道活检标本进行了检测，结果证实阴道炎、慢性宫颈炎、轻、中、重宫颈内皮瘤（癌前病变）、宫颈原位癌（CIS）、宫颈浸润癌（ISC）-HPV-16Z感染率分别为17.28%、11.89%、40%、35.71%、69.23%、67.57%和79.31%。详见表1。

维普资讯 http://www.cqvip.com

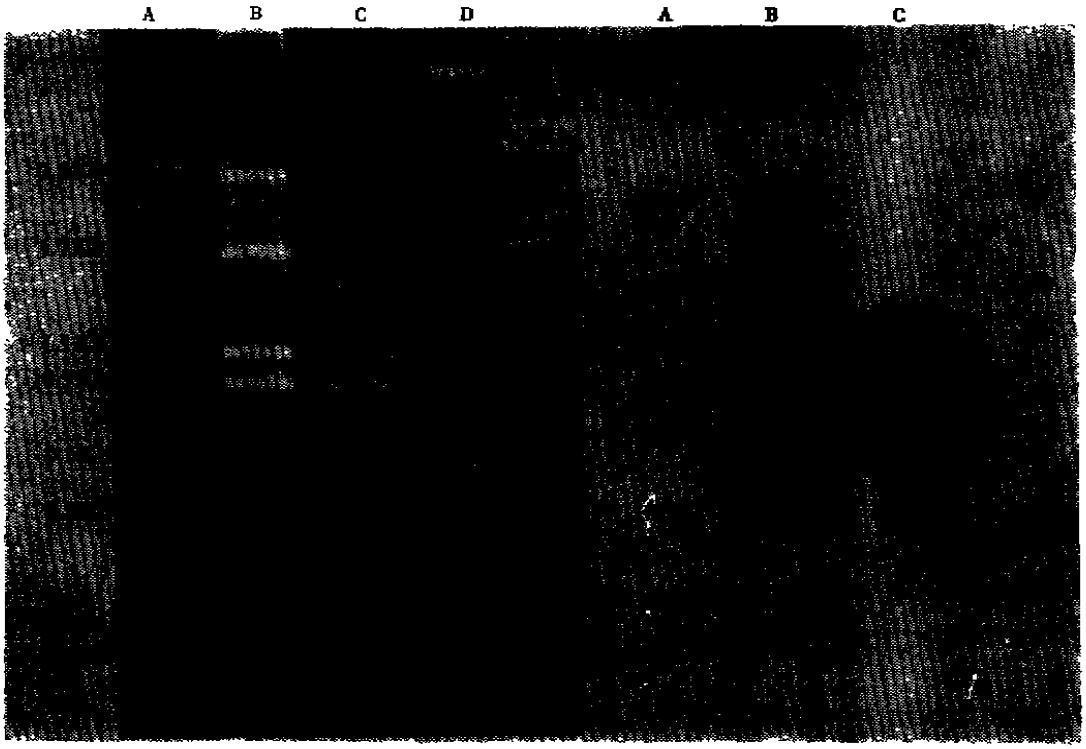


图 3　Pst I/BamH I双酶解后HPV16Z及HPV16F电泳(A)及Southern印迹杂交(B)结果。A. 标准HPV16酶切电泳图谱杂交结果。B. HPV16Z酶切电泳图谱及Southern印迹杂交。C. HPV16F酶切电泳图谱及Southern印迹杂交。D. λ DNA/Hind Ⅲ分子量标准。

Fig 3　The results of HPV16Z and HPV16FDNA electrophoresis (A) and southern bolt hybridization(B) were shown after cleaving by endonucleasses Pst I/BamH I. A. A standard HPV16DNA electrophoresis endonucleaes map. B. HPV16Z DNA electrophoresis endonuclease map. C. HPV16F DNA electrophoresis endonuclease map. D. λ DNA/Hind Ⅲ molecular marker.

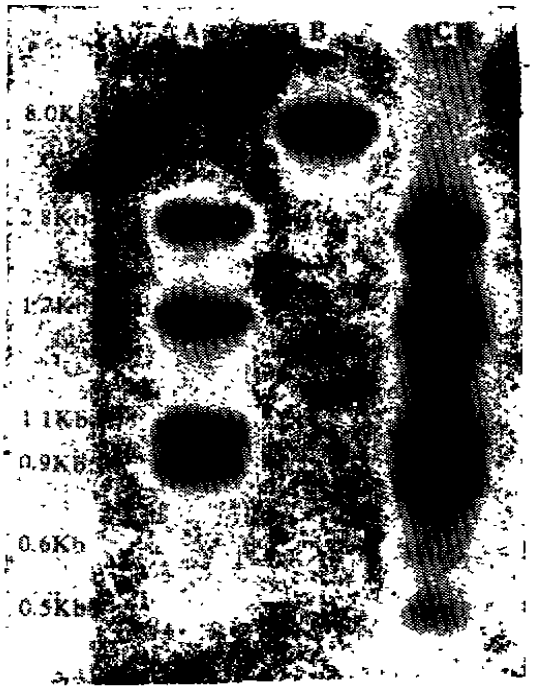
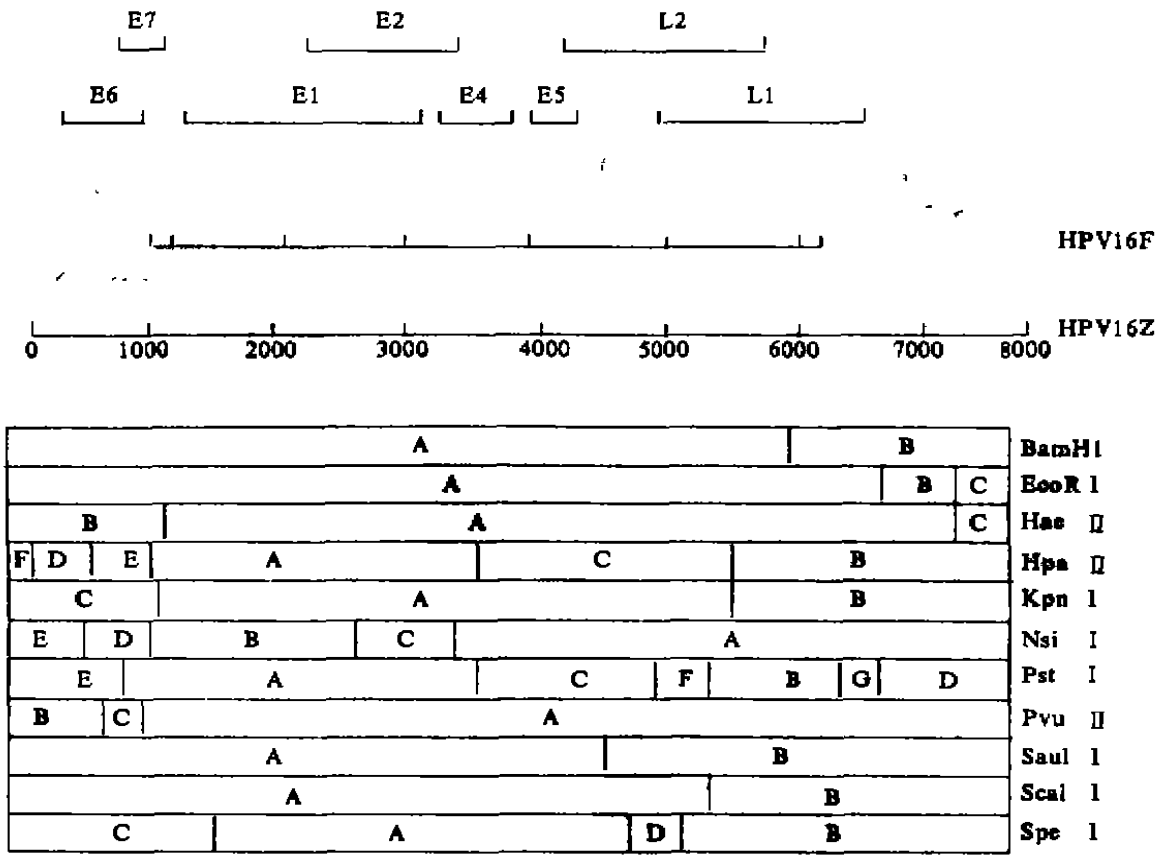


图 4　HPV16Z DNA探针与其自身来源组织DNA杂交结果。A. 经BamH I/Pst I双酶解的HPV16DNA片段。B. 经BamH I 酶解组织DNA。C. 经BamHI/pstI酶解组织DNA。

Fig 4　The hybridizatton result of HPV16Z probe with the tissue DNA from which HPV16Z was cloned. A. Standar dHPV16 DNA fragment control cut by BamH I/Pst I. B. The tissue DNA cut by enclonnclease BamH I. C. The tissue DNA cut by endonucleasses BamH I/Pst I.

维普资讯 http://www.cqvip.com

HPV16Z基因分布
Distribution of HPV16Z Genes



	BamH1	EcoR1	HacII	HpaII	KpnI	NsiI	PstI	DvuII	SauII	ScaII	SpeI
A	6150	6818	6115	2794	4497	4760	2817	7218	4335	5227	3107
B	1753	635	1313	2528	2522	1914	1549	553	3568	2676	3038
C		450	475	1881	884	663	1063	132			1461
D				444		309	896				297
E				199		257	879				
F				57			483				
G							216				

图 5 HPV16Z 限制性内切酶酶切图谱。确定各种内切酶酶切位点，并以线条加以说明。图下面为各种内切酶的不同酶切片段。Hind Ⅱ、Bgl Ⅱ、Xho Ⅰ、Sal Ⅰ及Sma Ⅰ无内切酶识别位点。

Fig 5 The restriction map HPV16Z is shown, cleavage sites for various restriction enzymes were determined and splotted on a linear map. The size of individual fragments were given below the map. Noncut enzymes were Hind Ⅱ、Bgl Ⅱ、Xho Ⅰ、Sal Ⅰ and sma Ⅰ.

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1　用HPV-16Z探针检测生殖道标本中HPV同源序列

Table 1　Detection of HPV-16 sequences in genital biopsies using HPV-16Z probe

组织学诊断 Diagnosis of Histology	病例数 Number of cases	HPV-16Z 阳性标本 Homology to HPV-16Z DNA	%
阴道炎 Vaginitis	81	14	17.28
慢性宫颈炎 Chronic Cervicitis	143	17	11.89
CIN Ⅰ	20	8	40.00
CIN Ⅱ	14	5	35.71
CIN Ⅲ	13	9	69.23
CIS	37	25	67.57
ISC	29	23	79.31
总数 Total	337	101	29.97

CIN Ⅰ-Ⅲ：宫颈内膜上皮增生分级Ⅰ-Ⅲ

CIS：宫颈原位癌

ISC：宫颈鳞状侵润癌

CIN Ⅰ-Ⅲ：Cervix Intraepithelial Neoplasia Degree Ⅰ-Ⅲ

CIS：Cervical Cancer in situ

ISC：Invasive squamous cervical carcinomas

讨　论

本文以pAt153为载体，从一份来自山西襄垣宫颈癌高发区宫颈原位癌手术标本组织中，克隆到HPV16全序列DNA（7.9kb）及HPV16DNA片段（5.4kb），在国内尚属首次，分别被命名为HPV16Z及HPV16F。主要证据如下：

1. 克隆到的HPV16Z碱基对数为7.9kb，与其它HPV型别全序列DNA大小相一致。2. HPV16Z及HPV16F与标准HPV16DNA在严格条件（Tm-17℃）下发生杂交反应。3. 16种限制性内切酶酶谱分析，证实与HPV16DNA酶切图谱相一致。4. 以HPV16Z为分子探针，与同来源的组织DNA进行杂交，证实其来源于该份组织标本。

以HPV16Z为探针，对襄垣宫颈癌高发区妇女生殖道HPV感染情况的分子流行病学调查结果认为，HPV16Z感染主要与宫颈癌及癌前病变有关，且随组织病变加重，HPV16Z检出率明显增高，认为宫颈癌变可能与HPV16Z感染有关。

我国HPV16Z及HPV16F克隆成功，对于进一步研究该病毒之生物学功能、致癌特性及其与宫颈癌发生的关系均有重要意义。

参 考 文 献

〔1〕 Schneider, A. et al., 1985, *Int. J. Cancer*, 35: 443.

〔2〕 Zhang Wer. et al., 1991, *Chin. Med. Sci. J.*, 6: 2.

维普资讯 http://www.cqvip.com

〔3〕 Gissmann,L.et al., 1982, *Int.J.Cancer*, 29 : 143
〔4〕 Zhang Wei.et al., 1991, *Proc.CAMS and PUMC*.6 : 4
〔5〕 T.Maniatis.et al., 1983, *Molocular Cloning*, CSH.PP : 382
〔6〕 Benton.W.D.et al., 1977, *Science*, 180 : 251
〔7〕 J.Sambrook, et al., 1987, *Molecular Cloning*, CSH.Vol 1 pp : 92-104

The Cloning and Characterization of the Genome of Human Papilloma Virus Type 16 in China

Zhang Wei Jin Shunqian Liang Xiao Shang Ming
Sun Jianheng Wang Xixia Wu Airu

(*Institute of Oncology, CAMS, Beijing* 100021)

The cloning and characterization of a whole genome of human Papillomavirus type 16 (7.9kb) and a 5.4kb subgenomic fragment are presented here for the first time in China. Both of them were cloned in HB101 after insertion in plasmid pAt153, using it's unique BamH1 site. The full-length genome and subgenomic fragment are designated HPV16Z and HPV16F, respectively. After analysis of 16 endonucleases, none of new endonuclease site were found in HPV16Z comparing with standard strain. A new BamH1 site was observed in 750bp in HPV16F. DNA sequencing will he done in next experiment.

Using HPV16Z as molecular probe, 337 cervix and vagina biopsies from Xiang Yuan County were tested by means of Coslot hybridization at high strict condition (Tm-17℃). The experiment result showed that the HPV16Z infectious rates of chronic cervicitis, vaginitis, cervical pre-cancer lesions (CIN Ⅰ-CIN Ⅲ), cervical cancer are 11.89% (17/143), 17.28% (14/81), 46.81%(22/47) and 72.73(48/66), respectively. The above information indicated that HPV16Z infection is predominant in the cervix pre-cancer lesion and cervical cancer at the cervical cancer high incidence region.

Key words: Human Papillomavirns Cervical Cancer Gene Clone Dot-blot Hybridization