维普资讯 http://www.cqvip.com

303—308

6775(6)

第10卷 第4期 中国病毒学 Vol. 10 No. 4
1995年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 1995

# 人乳头瘤病毒16型 $E_7$ 基因的体外扩增及其克隆和序列分析*

苏应斌 赵文先 伍欣星
戴天力 丁晓华
（湖北医科大学病毒研究所，武汉 430071）

R373.9

**提要** 人乳头瘤病毒16型 $E_7$ 基因是转化基因。作者设计了一对 PCR 引物，在引物的5′端分别引入 EcoRI 和 Hind Ⅲ 酶切序列，以 HPV 16 DNA 为模板成功地扩增出 $E_7$ 基因。通过 EcoRI 和Hind Ⅲ 双酶切位点将 $E_7$ 基因定向克隆入 pUC18载体，经过 PCR、酶切分析和 Southern 印迹杂交鉴定得到 $E_7$ 重组克隆 $pHSE_7$、DNA 序列分析表明所克隆的 $E_7$ 基因与已发表的 HPV 16 $E_7$ 基因序列完全一致且读框正确。

**关键词** 人乳头瘤病毒16型，体外基因扩增，$E_7$ 基因，克隆，DNA 序列分析

人乳头瘤病毒（HPV）是一种能引起人类皮肤和粘膜乳头状瘤病变的病毒，目前已发现的 HPV 有60型。最近10年的研究证据表明 HPV 在生殖器肿瘤尤其是宫颈癌的发生发展中起重要作用，大约90%的宫颈癌中发现有 HPV 16 DNA[1]。HPV 16 DNA 含7904个碱基对，分为早期基因区，即 $E_1$、$E_2$、$E_4$、$E_5$、$E_6$ 和 $E_7$；晚期基因区，即 $L_1$ 和 $L_2$；非编码基因调控区（NCR）。体外实验表明表达量最高的 $E_6$ 和 $E_7$ 基因能使原代细胞转化[2]和体外培养的细胞永生化[3]。由此推测 $E_6$ 和 $E_7$ 基因可能是 HPV 16的转化基因和潜在的癌基因。

由于 HPV 有明显的上皮嗜性，目前尚未有合适的组织培养系统供其复制繁殖。近年国内外学者采用分子克隆技术已克隆了 HPV 16的许多开放读框，使其功能的研究得到较快的发展。我们用 PCR 技术快速扩增出 HPV 16 $E_7$ 基因并进行克隆，为 $E_7$ 基因在大肠杆菌中表达、获得表达产物、研究基因产物的生物学特性及在细胞中定位奠定基础。

## 材料与方法

### 1 材料来源

1.1 菌种与质粒 pSV16d 质粒由德 Zur Hausen 博士惠赠，*E. coli* JM109 pUC18质粒由中国科学院上海生物化学研究所俞贤明惠赠。

1.2 工具酶与试剂 限制性内切酶为华美生物工程公司产品。$T_4$DNA 连接酶为美国 Promega 公司产品。TaqDNA 聚合酶为复旦大学科技开发公司产品。X-gal 和 IPTG 由中国科学院上海生化所俞贤明惠赠。非放射

本文于1995年1月9日收到，4月20日修回
* 湖北省科委"八五"攻关课题资助

维普资讯 http://www.cqvip.com



性标记及检测试剂盒为德国柏林格尔曼海姆中国有限公司产品。

2 PCR引物的设计与合成 根据HPV 16 $E_7$开放读框序列，设计了一对特异性引物，见图1。引物由中国科学院上海细胞生物所合成。

```
                    EcoRI
Primer 上：5' GGGAATTCATGCATGGAGATACACCTAC 3'
HPV16 E7              5'ATGCATGGAGATACACCTACATTGC……

                                  ……CCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAAGCTT3'
Primer 下：                          3'  GGTAGACAAGAGTCTTTGGTATTCGAACGG 5'
                                                          Hind Ⅲ
```

图1 PCR引物在HPV16 $E_7$基因上的位置图
Fig 1 Position of two PCR primers in HPV16 $E_7$ gene

3 一般操作技术 质粒DNA的提取和纯化、质粒酶切分析和片段回收、DNA片段的连接转化、重组质粒的筛选和鉴定均参照文献[4]进行。

4 PCR反应 100 μl反应体积中含模板pSV16d质粒DNA 0.1 pmol/L，$P_上$和$P_下$各1 μmol/L，4×dNTP各200 μmol/L，20 μl 5×buffer：50 mmol/L Tris·Cl，pH8.2，125 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$，7.5 mmol/L $MgCl_2$，1 mg/ml明胶及2U TaqDNA聚合酶。先将未加入TaqDNA聚合酶的反应混合物95℃变性10 min，室温下退火的同时迅速加工2U TaqDNA聚合酶，覆盖矿物油50 μl，离心数秒，72℃水浴5 min，然后依93℃30 S，45℃30 S，70℃90 S的顺序循环10次，再按93℃30 S，55℃30 S，72℃90 S的顺序进行20轮循环，最后72℃保温10 min。

5 DNA序列分析 采用双脱氧法，测序样品制备按Pharmacia的$T_7$ Sequencing Kit说明书进行。

## 结 果

### 1 HPV 16 $E_7$基因的PCR扩增

从HPV 16 DNA的全序列看[5]，$E_7$基因开放读框中有起始码ATG（第562位）和终止码TAA（第856位），全长294 bp。为了方便克隆和序列分析，我们在$P_上$和$P_下$的5′端分别设计有原序列中不存在的EcoRI和Hind Ⅲ酶切位点，预计扩增产物全长约300 bp。

取8 μl PCR产物在2%琼脂糖凝胶上电泳，可见一条清晰的扩增条带，其电泳大小约为300bp，与预计相符，未见非特异性扩增带，见图2。实验中设置了试剂对照，即除了DNA模板外，加入其它所有试剂和Taq DNA聚合酶，结果出现了一条带，可能是引物二聚体。

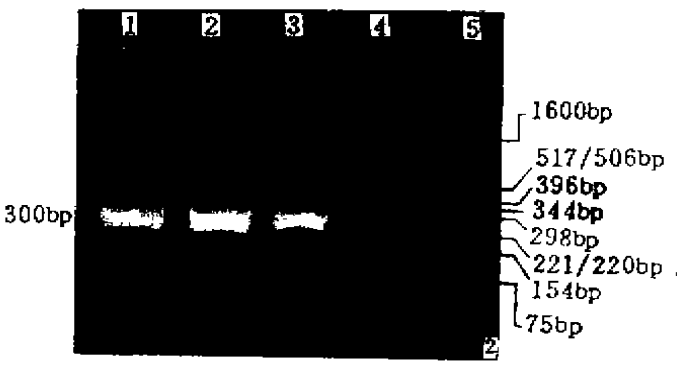


图2 PCR产物的2%琼脂糖凝胶电泳结果
Fig 2 PCR products of HPV16 $E_7$ gene on 2% agarose gel
1—3. PCR amplified products 4. The reagent control
5. pBR322 DNA/Hinf I molecular marker

维普资讯 http://www.cqvip.com



2　$E_7$基因片段的克隆和鉴定

回收纯化的 PCR 扩增片段用 EcoRI 和 Hind Ⅲ 酶解，与经 EcoRI 和 Hind Ⅲ 双酶解的 pUC18载体以1∶3的摩尔比混合，$T_4$DNA 连接酶14℃反应过夜，转化 *E. coli* JM109，挑选在含 Ap、IPTG、X-gal 的琼脂平板上呈白色的转化菌落，快速提取质粒，再次进行 PCR 扩增，结果见图3，均扩增出一个特异的靶 DNA 片段，片段大小与第一次扩增产物大小相同。

进一步把转化质粒用 EcoRI 和 Hind Ⅲ 消化，切下一条长约300 bp 的 DNA 带，见图4。用地高辛配基标记扩增的 HPV 16 $E_7$基因片段作为探针，将酶切片段进行 Southern blot 鉴定，硝酸纤维素薄膜上出现专一性的杂交信号带，证明得到预期的重组 $E_7$克隆 $pHSE_7$，见图5。

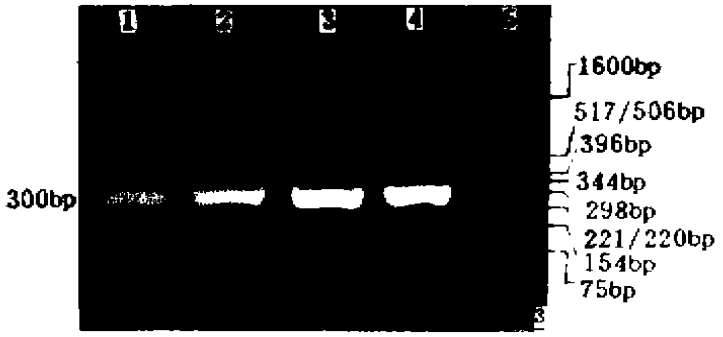


图3　重组克隆的 PCR 产物电泳分析
Fig 3　Electrophoretic analysis of recombinant clones PCR amplification
1. PCR product of HPV16 $E_7$ gene　2—4. PCR products of recombinant clones
5. pBR322 DNA/Hinf I molecular marker

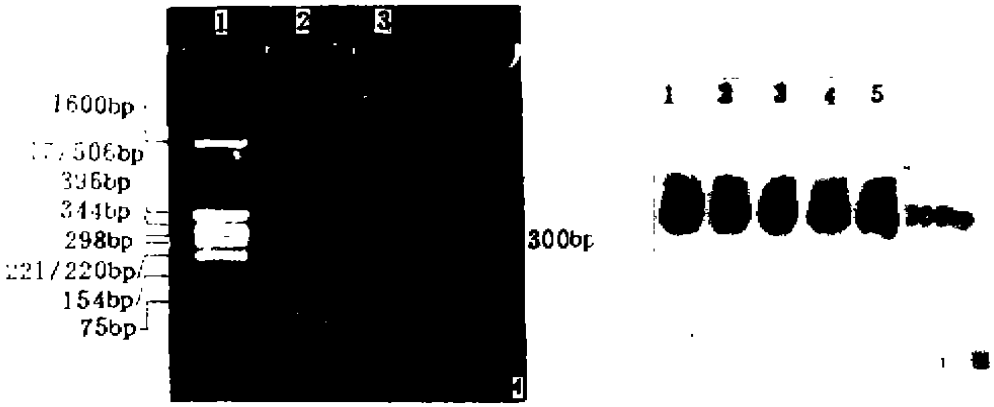


图4　重组质粒 $pHSE_7$的 EcoRI/Hind Ⅲ 酶切分析
Fig 4　Restriction map of recombinant plasmid $pHSE_7$
1. pBR322 DNA/Hinf I molecular marker
2. $pHSE_7$ DNA/EcoRI＋Hind Ⅲ　3. $pHSE_7$
图5　$pHSE_7$的 EcoRI/Hind Ⅲ 酶切片段 Southern 杂交结果
Fig 5　Southern blot analysis of $pHSE_7$
1—4. $pHSE_7$ plasmid digested with EcoRI/Hind Ⅲ
5. HPV 16 $E_7$ gene fragment

3　序列分析

序列分析结果证实 $pHSE_7$中 $E_7$基因5′端增加了 EcoRI 酶切位点、3′端增加了 Hind Ⅲ 酶切位点，序列和 HPV 16 $E_7$序列完全一致且读框正确，见图6、图7。

维普资讯 http://www.cqvip.com

图6 pHSE$_7$中E$_7$基因序列的放射自显影

Fig 6 Autoradiogram nucleotide squence of pHSE$_7$

Primer 1233——→
TTACGAATTCATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAG
EcoRI
ATTTGCAACCAGAGACAACTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAAATGAC

AGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACC

GGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTTGCAAGTGTGACTCTA

CGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAA

GACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAA

ACCATAAGCTT
Hind Ⅲ
←——Primer 1212

图7 pHSE$_7$中E$_7$基因的核苷酸序列

Fig 7 The result of nucleotide Sequencing of pHSE$_7$

## 讨 论

PCR技术能体外扩增任何所需的DNA片段，寡核苷酸引物的3′端与模板序列的特异结合决定了PCR产物的特异性，因此可以在引物的5′末端增添非互补碱基[6]，如设计不同的酶切序列，对扩增效果无影响。这些两端带有不同酶切位点的扩增产物很容易定位组入特定载体，使分子克隆过程大为简化。本实验中的上、下游引物5′端均加入EcoRI或Hind Ⅲ的酶切位点和保护碱基，2～3个保护碱基有利于限制性内切酶与PCR产物末端的稳定结合，提高酶切

维普资讯 http://www.cqvip.com



效率。因此引物中有长约8～17个碱基的区域与 $E_7$ 序列不配对。为了提高 PCR 反应的特异性，调整了退火温度，反应初始的10个循环中，退火温度选择45℃，保证了引物与模板间的配对，不影响反应产量。在以后的20个循环中，退火温度上升为55℃可使在45℃退火时产生的非特异性产物不能退火延伸，提高特异性，退火时间选择为30S 可以减少引物与模板间的错配。经过30轮循环后的扩增产物电泳证实：反应效率和专一性较高，没有明显副产品，见图2。试剂对照中出现的引物2聚体可能是由于两引物3′端有4个碱基互补所致，由于引物序列来自模板 DNA，不可能完全符合引物设计的原则，但是可以通过调整反应条件，如减少引物量和酶量、提高退火温度、加大模板量等，达到特异性扩增的目的。

PCR 方法扩增目的基因进行分子克隆虽然简便、快速、效率高，但也存在碱基错配问题，不利于克隆基因今后的表达和融合。由于 TaqDNA 聚合酶没有3′→5′外切核酸酶活性，所以在 PCR 过程中可出现由于 dNTP 某种核苷三磷酸盐浓度过高等原因引起的错误碱基掺入。我们对重组克隆 $pHSE_7$ 进行序列分析，证实序列及读框均无错误，得到了可以直接插入高效表达载体进行表达的 HPV 16 $E_7$ 基因。

**致谢**　中国科学院上海生物化学所俞贤明、甘人宝老师及全室同志对本课题的大力支持，特表谢意。

## 参考文献

1 Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, *et al*. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. Proc Natl Acad Sci USA, 1983; 80:3812

2 Phelps WC, Yee CL, Munger K, *et al*. The human papillomavirus type 16 $E_7$ gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. Cell, 1983; 53:539

3 Kanda T, Watanabe S, Yeshiike K. Immortalization of primary rat cells by human papillomavirus type 16 subgenomic DNA fragments controlled by the SV40 promotor. Virology, 1988; 165:321

4 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning (second edition), a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

5 Seedorf K, Krammer G, Durst M, *et al*. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. Virology, 1985; 145:181

6 Scharf SJ, Horn GT, Erlich HA. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequence. Science, 1986; 233:1076

# PCR Amplifying, Cloning and Sequencing of $E_7$ Gene of Human Papillomavirus Type 16

Su Yingbin　Zhao Wenxian　Wu Xinxin *et al*

(*Virus Research Institute, Hubei Medical University, Wuhan* 430071)

The primers were designed to amplify $E_7$ gene of HPV16 by polymerase chain reaction (PCR), according to the sequence of $E_7$ gene of HPV16. The primers 5′ terminal incorporate restriction endonuclease sites of EcoRI and Hind Ⅲ. The amplified $E_7$ gene fragment was inserted into pUC18 vector at EcoRI/Hind Ⅲ cloning site. Recombinant DNA formed was transformated

维普资讯 http://www.cqvip.com



into *E. coli* JM109. Restriction enzyme cleavage and Southern blot analysis revealed that the restriction endonuclease sites were true. The result of DNA sequencing showed that inserted DNA sequence is well in correspondence with that expected theoretically. Recombinant clone of HPV 16 $E_7$ gene obtained was named $pHSE_7$.

**Key words** Human papillomavirus type 16, PCR, $E_7$ gene, Cloning, DNA sequencing