220—224 6843(5)

维普资讯 http://www.cqvip.com

第11卷第3期 中国病毒学 Vol.11 No.3
1996年9月 VIROLOGICA SINICA Sep. 1996

湖北地区宫颈癌组织中人乳头瘤病毒16型E7基因的分离、克隆和序列分析*

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

(R373.9; R737.330.2)

提要 采用加端聚合酶链反应技术，从湖北地区一宫颈癌患者癌组织DNA中分离出人乳头瘤病毒16型(HPV16) E7基因，并在pUC18载体中克隆。经限制性核酸内切酶分析和DNA序列分析，确认了含HPV16 E7重组克隆质粒，命名pHPV16 E7－HB。DNA序列分析表明，HPV 16 E7－HB基因全长294 bp(与报道的标准株基因长度相同)，但其核苷酸顺序中有两处发生了C→T突变，即第43位密码子CAA变为TAA，第76位CGT变为TGT；前者使谷氨酰胺密码子变为终止密码，即无义突变(nonsense mutation)。这种突变发生在294个碱基的DNA扩增产物之中，不像是PCR本身的错配，而很可能是湖北株与标准株之间的结构差异。

关键词 人乳头瘤病毒16型，宫颈癌，聚合酶链反应，序列分析 子宫颈肿瘤；

人乳头瘤病毒16型(HPV16)是宫颈癌病毒病因中最为重要的病毒型之一。它是DNA病毒，其基因组全长7.9 kb，分为早期区(E)、晚期区(L)和上游调控区(URR)。E区含有5个开放读框(ORF)，其中E7、E6基因能使原代细胞转化和使体外培养的细胞永生化；E7还能编码具有转化和反式激活作用的E7蛋白，因而成为肿瘤学研究的热点[1,2] 1991年Chen等报道利用HPV16 E7转染小鼠纤维母细胞和黑色素瘤细胞，并用来免疫同基因小鼠，发现小鼠机体产生了特异性抗体，将移植的黑色素瘤在两周内排斥[3]。由于宫颈癌DNA中60%以上都含有HPV16 E7/E6同源序列[4]，人们希望能利用这些分子及其编码的蛋白抗原来治疗和预防宫颈癌以及与HPV感染密切相关的其它肿瘤。

本文通过对湖北地区宫颈癌组织中分离的HPV16 E7基因的克隆、测序，探讨地方株与标准株(德国株)E7核苷酸顺序的差异，以了解HPV16在本省的分布，为基因表达和疫苗研制打下基础。

材料和方法

1 材料

1.1 宫颈癌活检组织取自湖北医科大学附属二医院肿瘤科。患者湖北籍。病理学检查诊断为宫颈鳞状细胞癌。

本文于1995年9月15日收到，1996年1月23日修回
* 本课题受湖北省科委"八五"科技攻关项目经费资助
** 中国科学院上海生物化学研究所，上海 200032

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 HPV16 E7引物根据已发表的标准株E7核苷酸序列设计[5],由中国科学院上海细胞生物学研究所合成。两引物5′端分别添加有EcoRI和HindⅢ酶切位点。具体核苷酸组成如下:

5′-- GGGAATTCATGCATGGAGATACACCTAC --3′
EcoRⅠ

5′-- GGCAAGCTTATGGTTTCTGAGAACAGATGG--3′
HindⅢ

1.3 Taq DNA聚合酶购于华中农业大学国家重点实验室;核酸限制性内切酶EcoRⅠ、HindⅢ和T4 DNA连接酶以及质粒pUC18 DNA、X-gal、IPTG等购自华美生物工程公司。

1.4 受体菌为*E. coli* JM 109,本室保存。

2 方法

2.1 DNA聚合酶链反应(PCR) 从宫颈癌活检组织中提取DNA,以其为模板,用上述二引物进行HPV16E7基因扩增。PCR实验总体积为100 μL,其中含模板DNA 0.5 μg,dNTP(2 mmol/L)10 μL,引物各25 pmol/L,10×缓冲液10 μL,在95 ℃ 7 min,接着为两个15次反应循环。第一类循环是93 ℃ 1 min,45 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min;第二类循环是93 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min30 s,最后72 ℃ 延伸7 min。

2.2 PCR产物分子克隆 酚-氯仿抽提PCR产物。用HindⅢ20 u/μg消化PCR产物5 h,接着用EcoRI 20 u/μg消化过夜。pUC18质粒DNA用EcoRI和HindⅢ各5 u/μg同时酶切过夜。酶切产物再次用酚-氯仿抽提纯化。按外源基因和载体分子3:1(摩尔浓度)在T4 DNA连接酶催化下,16 ℃连接过夜。取约0.1 μg连接DNA混合液加入JM109感受态细胞。感受态细胞制备及转化过程按文献[6]进行。转化菌在含x-gal、IPTG、Amp的LB平皿中于37 ℃培养16 h,筛选白色菌落。

2.3 DNA序列分析 采用Sanger双脱氧链终止法对HPV16 E7-HB DNA进行双向测序。

结 果

1 宫颈癌组织DNA中HPV16 E7基因扩增

经PCR 30次循环后,将扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶上电泳分析,在0.3 kb处显现清晰的阳性扩增带。与HPV16标准株质粒DNA扩增带处同一水平;以pBR322 DNA为模板(阴性对照)未出现扩增带(图1)。

2 阳性克隆的鉴定

挑取转化的白色菌落,液体培养后,用碱裂解法提取质粒DNA,经0.8%琼脂糖凝胶电泳,初筛出4个比对照(pUC18)DNA分子量大的克隆。经EcoRI和HindⅢ双酶消化,1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定,其中1个含有约0.3 kb的EcoRI/HindⅢ插入片段。此质粒命名为pHPV16 E7-HB(图2)。

3 HPV16 E7-HB核苷酸序列分析

在pHPV16 E7-HB克隆基础上,通过核酸序列分析获得了HPV16 E7-HB全部核苷酸顺序。HPV16 E7-HB基因全长294 bp,其大小与标准株完全一致。将两者核苷酸顺序进行比较,发现有两处碱基发生了C→T突变;第43位密码子CAA变为TAA,第76位CGT变为TGT。前一个突变将谷氨酰密码子变为终止密码(Ochre termination codon),即无义突变(nonsense mutation),见图4、5。

维普资讯 http://www.cqvip.com

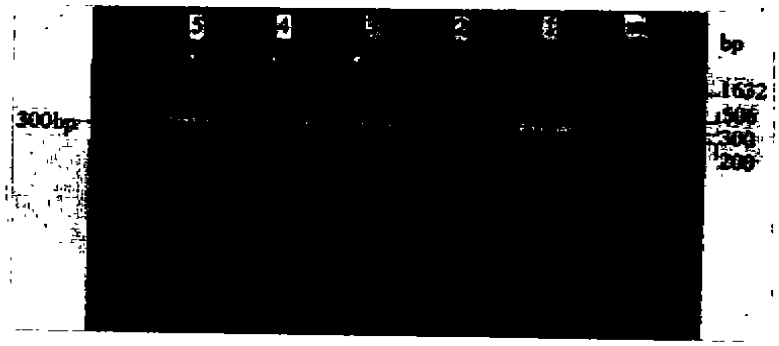

图1 宫颈癌组织DNA PCR产物电泳分析

Fig 1 Electrophoretic analysis of PCR products of CCT DNA

M. pBR322 DNA/HinfI 1. pHPV16 DNA (+)control

2. pBR322 DNA (−)control 3−5. DNA sample of cervical carcinoma tissue(CCT)

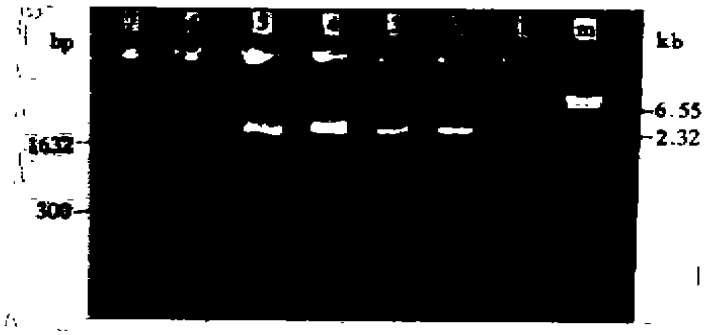

图2 重组质粒的酶切鉴定

Fig 2 Identification of the recombinant plasmid by EcoRI and HindⅢ

M. λDNA/HindⅢ (marker)

3. pUC18 DNA/EcoRI + HindⅢ

1 and 2. No. 4 recombinant plasmid/HindⅢ

4 and 5. No. 4 recombinant plasmid/EcoRI + HindⅢ

6. PCR products of pHPV16 E7 DNA (+)control

7. pBR 322 DNA/HinfI (marker)

讨 论

HPV16是宫颈癌及癌前病变的重要病原。研究HPV16 E7基因及其编码的E7蛋白在宫颈癌发生和发展中的作用，是当前引人注目的领域。我们采用加端PCR技术，从湖北地区一宫颈癌组织DNA中分离出HPV16 E7基因，并将其进行分子克隆。此技术极其省时方便和经济。

近年来，对HPV的分子生物学研究进一步阐明了其致病机理。E7基因所编码的E7蛋白两端有两个保守功能区。其一为氨基末端(N端)的37个氨基酸，此区域与肿瘤病毒—腺病毒E1 A和SV40 T抗原的保守区同源，能与抗癌基因RB的表达产物结合，导致细胞恶性增生；其二为羧基末端(C端)的60个氨基酸，含有两个Cys-X-X-Cys框，即所谓锌指结构(Zinc finger structure)。据报道，完整的C端对E7蛋白的生物学功能有稳定和增强作用。锌指结构突变，可消除角化细胞系永生态，部分或完全抑制细胞转化[7]。与标准株E7相比，我们克隆的湖北株HPV16 E7，其推导的氨基酸序列中N端是完整的，而C端则可能由于基因的无义突变，使所编码的蛋白多肽提前终止，由此可能造成锌指结构的消失。由于在Taq DNA聚合酶

维普资讯 http://www.cqvip.com

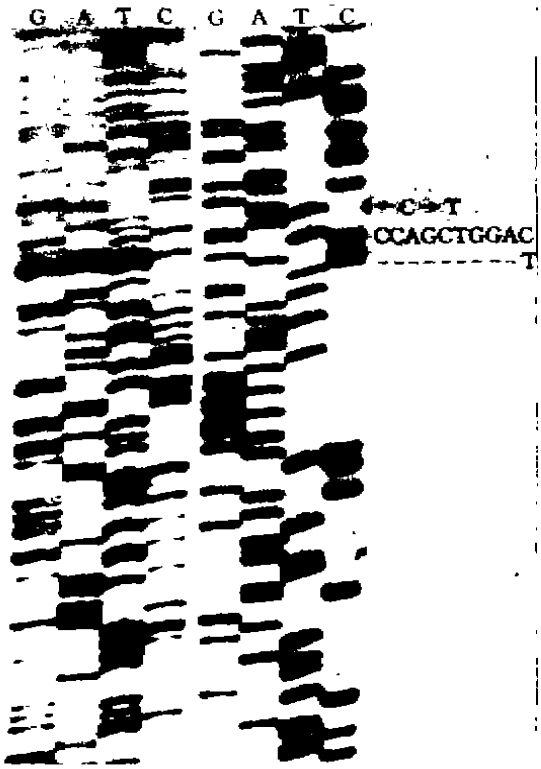

图3 湖北株HPV16 E7部分核苷酸序列

Fig 3 Partial nucleotide sequences of HPV16 E7-HB

EcoR I

TTACgaattc	ATGCATGGAG	ATACACCTAC	ATTGCATGAA	TATATGTTAG
ATTTGCAACC	AGAGACAACT	GATCTCTACT	GTTATGAGCA	ATTAAATGAC
AGCTCAGAGG	AGGAGGATGA	AATAGATGGT	CCAGCTGGAC	AAGCAGAACC
			T	
GGACAGAGCC	CATTACAATA	TTGTAACCTT	TTGTTGCAAG	TGTGACTCTA
CGCTTCGGTT	GTGCGTACAA	AGCACACACG	TAGACATTCG	TACTTTGGAA
			T	
GACCTGTTAA	TGGGCACACT	AGGAATTGTG	TGCCCCATCT	GTTCTCAGAA
ACCATaagctt				

HindIII

图4 湖北株HPV16 E7基因序列

Fig 4 Nucleotide sequences of HPV16 E7-HB "T" is the nucleotide different from standard strain

介导的DNA PCR合成中,碱基错误掺入出现的机率为0.25%,即扩增长400个碱基序列中可能出现一个碱基错误,而在全长294 bp的碱基序列中发生二处差异,最大的可能是病毒基因

维普资讯 http://www.cqvip.com

本身发生了突变，或者是由于毒株来源不同，基因结构之间所存在的多态性。这种差异是否具有普遍性？湖北株E7基因所表达的病毒多肽与标准株E7多肽功能有何不同？能否产生抗瘤免疫？所有这些都是下一步要研究的课题。

致谢 本研究部分工作在中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室进行，朱作言研究员对本实验进行了悉心指导和帮助；核酸序列分析由中科院上海生化所甘人宝研究员、丁红珍同志帮助完成；本室谭云同志参加了部分工作；实验照片由戴天力同志拍摄。在此一并表示衷心感谢！

参 考 文 献

1 Toshiyuki Sasagaw, Masaki Inoa, Hiokazu Inouie *et al*. Induction of uterine cervical neopladias in mice by HPV16 E7/E6 gene. Cancer Research, 1992, 52:4420

2 Vousden K H, J Doniger, J A Dipaolo. The E7 ORF of HPV16 encode a transforming gene. Oncogene Res, 1988, 3:167～175

3 Lieping Chen, Elane Kinney Thomas, Shiu Lok Hu *et al*. HPV16 nucleoprotein E7 is a tumoe rejection antigen. P. N. A. S USA, 1991, 88:110～114

4 刘学锋，杨平，伍欣星等. 聚合酶链反应检测宫颈癌中HPV16 E6/E7相关序列. 中国病毒学, 1992, 7:59～62

5 Seedorf K, G krammer, M Durst, *et al*.. HPV type 16 DNA sequence Viroloy, 1985, 145:181

6 金冬雁，黎孟枫，侯云德等译. 分子克隆. 北京：科学出版社, 1992. 55

7 苏应斌，赵文先. 人乳头瘤病毒E7蛋白的研究进展. 国外医学分子生物学分册, 1995, 17:62～65

The Isolating, Cloning and Sequencing of HPV16 E7 Gene from Cervical Carcinoma Biopsy DNA of Hubei Province

Wu Xinxing Zhao Wenxian Ding Xiaohua *et al*

(*Hubei Medical University, Wuhan* 430071)

The technique of add-on PCR was used for isolating HPV16 E7 gene from cervical carcinoma biopsy DNA in Hubei province. The E7 gene was inserted into vector pUC18. By restriction enzyme cleavage and nucleotide sequence detection, a new recombinant plasmid was constructed and named it pHPV16 E7-HB. The result of nucleotide sequencing showed that the overall length of HPV16 E7-HB gene is 294 bp, it is the same as the standard strain. But there were two C→T mutation in HPV16 E7－HB. A nonsense mutation was identified at codon 43, a Gln codon (CAA) was converted into ochre termination codon (TAA). The mutations occurring in 294 bp of DNA PCR production seemed to be a structure difference between HB strain and standard strain rather than a mismatch of PCR itself.

Key words HPV16, Cervical carcinoma, PCR, Sequence