

## 不同地区 HPV16 E7 基因的克隆及序列差异分析\*

熊金虎, 伍欣星\*\*, 谭云

(武汉大学医学院病毒学研究所分子生物学研究室, 湖北武汉 430071)

### Cloning, Sequencing and Comparing Analysis of Human Papillomavirus Type 16 E7 Gene Isolated from Different Region

XIONG Jin-hu, WU Xing-xin\*\*, TAN Yun

(Virus Research Institute of Medical College, Wuhan University Wuhan 430071, China)

**Abstract:** In order to study the structure specificity of HPV16 E7 gene of cervical carcinoma in Wuhan city and Wufeng county of Hubei the tissue DNA was abstracted from cervical carcinoma biopsies from Wuhan and high incidence region of cervical carcinoma in Wuhan county. HPV16 E7 gene was amplified by PCR from the cervical carcinoma tissue DNA with the infection of HPV16, and then was cloned into pGEM-T vector. After sequencing the double strands, the gene was compared with the prototype E7 gene of HPV16, HPV16 Hubei strain and compared with each other. Sequencing results showed one point mutation in the viral neocleotide sequence of high incidence region that the 229th neocleotide "C" was changed into "T", which caused the Arg codon TGT to convert into a Cys codon CGT. This may be the cause of high incidence of HPV infection and high oncogenesis. The results also show that there is only a synonymous mutation in the viral neocleotide sequence of Wuhan which is different from the HPV16 HB E7 gene, suggesting that HPV16 HB and the HPV16 prototype are co-exist in Hubei, but the HPV16 prototype are the main type.

**Key words:** Human papilloma virus type 16; E7 gene; Sequence comparing analysis; Point mutation

**摘要:** 采用 PCR 扩增、pGEM-T 载体克隆和核苷酸序列分析的方法对一例武汉地区及两例五峰县高发区宫颈癌患者体内 HPV16 型的 E7 基因编码区进行序列分析与野生型(德国标准株)及已发表的 HPV16 湖北株(HPVHB)进行了比较。结果发现武汉地区 HPV16 型 E7 基因仅第 54 位出现一个同义突变, 而高发区 HPV16 型 E7 基因存在差异, 第 77 位氨基酸由精氨酸(Arg)变为半胱氨酸(Cys), 第 96 位由谷氨酰胺(Gln)变为精氨酸(Arg), E7 蛋白的二级结构及亲、疏水性也相应改变, 与野生型有较大差异。

**关键词:** 人乳头瘤病毒 16 型; E7 基因; 序列比较分析; 点突变

**中图分类号:** R373 **文章标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2002)03-0211-05

人乳头瘤病毒(HPV)是一种高度螺旋化的环状双链 DNA 病毒。HPV 感染与人类各种良、恶性疾病密切相关, 如宫颈癌、乳腺癌等。尤其是宫颈癌的发生与 HPV 感染关系密切, 流行病学资料显示: 约 93% 的宫颈癌组织中可检测到 HPVdsDNA, 其中

HPV16 型占 65%<sup>[1]</sup>。HPV E7 基因是其中重要的转化基因, 自从陈列平等<sup>[2]</sup>发现 E7 为肿瘤排斥抗原以来, E7 就一直是人们研究的焦点, 其对细胞的恶性转化及维持其恶性表型具有重要作用。人乳头瘤病等感染具有明显的地域性分布特征, 我国为

收稿日期: 2001-12-12, 修回日期: 2001-03-01

\* 基金资助: 湖北省自然科学基金资助(97J077)

作者简介: 熊金虎(1977-), 男, 湖北省籍, 硕士研究生。

\*\* 通讯作者: 伍欣星(1957-), 女, 浙江籍, 教授, 博士生导师, 从事分子病毒学研究。Correspondence author.

HPV16 型感染的流行区<sup>[3]</sup>。湖北五峰县是宫颈癌高发区,其发病率和死亡率高居全国之冠,HPV 感染率高达 99.5%,其中 HPV16 感染率为 87.5%<sup>[4]</sup>。本研究克隆了高发区及武汉地区 HPV16 E7 基因,并进行了序列测定,经分别与野生型(德国标准株) E7 基因进行比较,发现武汉地区 E7 与野生型基本一致,而高发区 E7 则存在一些变异。本研究对 HPV 相关肿瘤的防治及 HPV DNA 疫苗的构建、发展具有一定意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

武汉地区一例标本取自武汉大学中南医院,高发区两例癌颈癌组织标本取自五峰县妇幼保健院,HPVHB 株的血清学资料及 HPV16 HB 株 E7 基因片段资料见文献<sup>[5]</sup>。

### 1.2 分子生物学工具酶和试剂(盒)

TaqDNA 聚合酶 Kit、dNTP、IPTG、X-gal 等购自华美生物工程公司,pGEM-T 载体购自 Promage 公司。

### 1.3 菌株

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为本室保存菌种。

### 1.4 癌组织 DNA 的提取

将癌组织先研磨匀浆后经蛋白酶 K 消化,经酚/氯仿/异戊醇提取 DNA。

### 1.5 HPV E7 基因扩增

以癌组织提取 DNA 为模板 PCR 法扩增 E7。

P<sub>1</sub>:5'CGAGATCACACGGAGAGAAACCCAGC  
T3'

P<sub>2</sub>:5'ACGCCTCGAGAGGATCAGCCATGGTA  
GAT3'

94℃ 预变性 300s 后 94℃ 变性 60s,55℃ 60s,72℃ 60s,共 30 循环,末次循环后 72℃ 延伸 300s。扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.6 HPV16 E7 基因的克隆

将 PCR 扩增的 300bpDNA 片段经低熔点琼脂糖回收后,与 pGEM-T 载体以 3:1 的摩尔比混合,T<sub>4</sub> 连接酶 4℃ 过夜连接;用此连接物 CaCl<sub>2</sub> 法转化感受态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,在含 X-gal、IPTG 和氨苄青霉素的固体 LB 培养基中过夜培养,随机挑取 10

个白色菌落,按常规方法提取质粒 DNA,PCR 鉴定。克隆与鉴定方法参考文献<sup>[6]</sup>。

### 1.7 HPV16 E7 基因核苷酸序列测定及分析

DNA 测序由上海基康生物工程公司完成。运用 DNASTar、Genedoc、Clustalx 等软件对测定的 E7 序列进行比较分析。

## 2 结果

### 2.1 HPV16 E7 基因的 PCR 扩增及克隆

扩增片段大小 300bp 左右,克隆重组载体经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,泳动条带位于空载体之后,PCR 在 300bp 处可见阳性扩增带,与预期的结果一致。

### 2.2 HPV E7 基因的 DNA 序列比较

图 1 列出了武汉地区、高发区及野生型 HPV16 E7 基因的 DNA 序列,文献发表的 HPV16 湖北株 E7 基因 DNA 序列也排列在一起进行了比较。图 1 可见高发区 E7 基因在 DNA 序列上有三个碱基不同于野生型(德国标准株)且都位于 3'端,5'端的三分之一则与野生型完全一致。武汉地区则仅在第 54 位存在一个同义突变。而已发表的 HPV16 湖北株(HPV HB)在第 43 位出现了一个无义突变。

### 2.3 E7 癌蛋白氨基酸序列比较

由武汉地区、高发区、HPVHB 株及野生型 E7 基因推导出来的氨基酸序列及比较见图 2。武汉地区的变异为同义突变,氨基酸序列与野生型完全一致,HPVHB 株则由于第 43 位产生无义突变导致后续氨基酸表达中断。高发区 E7 基因的三个点突变中两个为有义变异,导致相应两个氨基酸变异即第 77 位由精氨酸(Arg)变为半胱氨酸(Cys)第 96 位由谷氨酰胺(Gln)变为精氨酸(Arg)。

### 2.4 HPV E7 癌蛋白的二级结构比较

武汉地区、高发区、HPV HB 株及野生型 E7 癌蛋白的二级结构比较见图 3。武汉地区分离的 HPV16 E7 基因编码癌蛋白二级结构与野生型完全一致,HPV16hb 株碳端缺失。高发区碳端 93—98 位为  $\alpha$  螺旋区,与野生型有明显差异。

### 2.5 HPV E7 癌蛋白的亲、疏水性比较

用 Protean 程序对武汉地区、高发区、HPVHB 株及野生型 E7 癌蛋白进行了亲、疏水性比较,结果

见图 4。HPV16 E7(g)亲、疏水性与野生型无差异, 蛋白质的亲、疏水性, 造成第 73—77 位由亲水变为疏水, 78—82 位疏水性增强。而高发区 E7 癌蛋白的氨基酸变异则明显的影响了

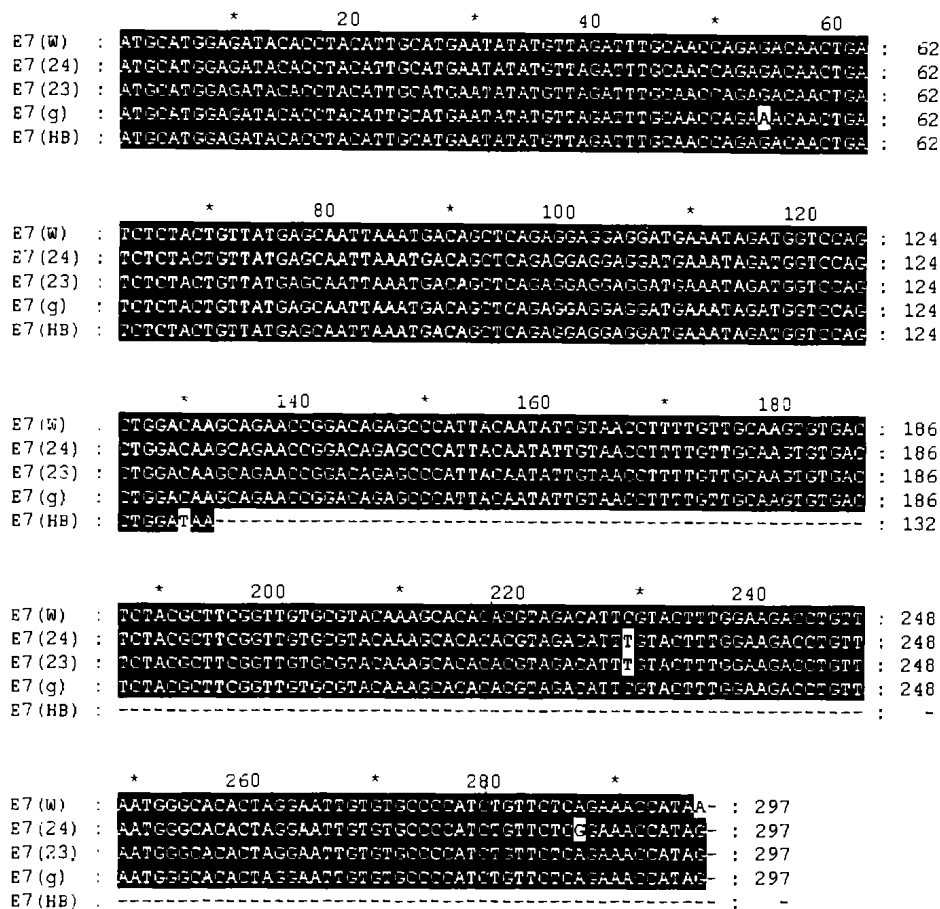


图 1 武汉地区、高发区、HPV16 湖北(HPV HB)及野生型 E7 基因的 DNA 序列比较

Fig. 1 Comparing the DNA sequence of E7 gene Wuhan(g,HB), Wufeng(23,24) and the standard strain(w).

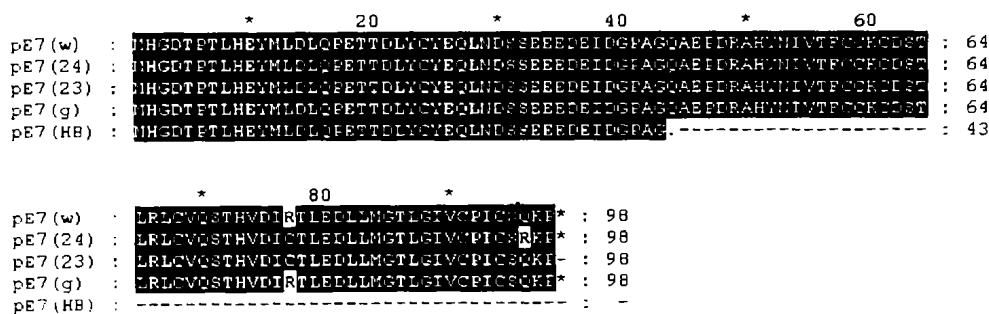


图 2 武汉地区、高发区、HPV HB 株及野生型 E7 癌蛋白氨基酸序列比较

Fig. 2 Comparing the amino acid sequence of E7 oncoprotein Wuhan(g,HB), Wufeng(23,24) and the standard strain(w).

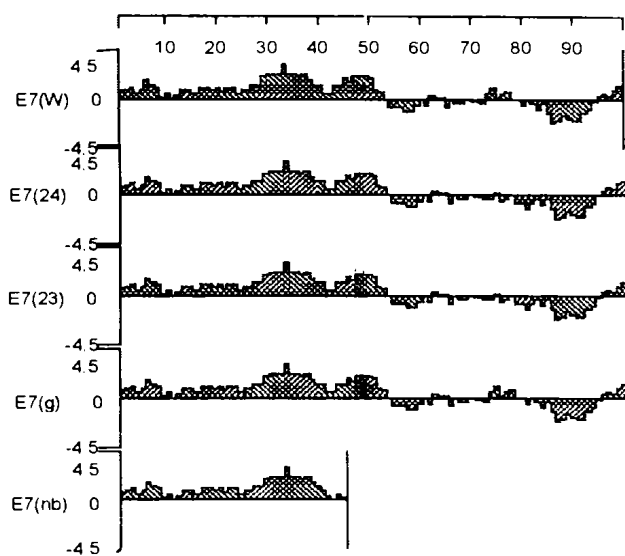


图 3 武汉地区、高发区、HPV HB 株及野生型 E7 癌蛋白的亲、疏水性比较

Fig. 3 Comparing the hydrophilicity of E7 protein Wuhan(g, HB), Wufeng(23, 24) and the standard strain(w) Hydrophilicity Plot-Doolittle.

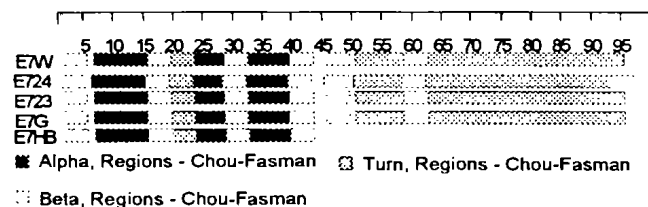


图 4 武汉地区、高发区、HPVHB 株及野生型 E7 癌蛋白二级结构比较

Fig. 4 Comparing the second structure of E7 protein Wuhan (g,HB), Wufeng(23,24) and the standard strain(w).

### 3 讨论

HPV16 E7 基因是病毒的主要转化基因,其编码的 E7 蛋白为含“Cys-X-X-Cys”锌指结构的 DNA 结合蛋白,E7 蛋白的 C 端存在 2 个锌指结构,N 端 37 个氨基酸残基与 Ad E1 A 和 SV40 T 抗原蛋白相似,可与抑癌基因蛋白 Rb 结合,为 E7 蛋白的转化活性区,可干扰 P53、Rb 等抑癌基因的功能,对细胞永生、恶性转化及维持细胞的恶性表型具有重要作用<sup>[7,8]</sup>,所比较的各地区 E7 基因及氨基酸序列同源性都在 99% 以上,可见人乳头瘤病毒 16 型 E7 基因较为保守,特别是其 5' 端具有重要功能的 PRb 结合域,这与 E7 蛋白的重要作用是一致的,但国内外

均发现 HPV16 存在一些微小变异,Fujnaga 等<sup>[9]</sup>通过 PCR 法测序分析发现,大多数侵袭性宫颈癌及癌前病变都检出了 HPV16 E7 序列变异株。Icenogle 等<sup>[10]</sup>的研究表明,世界不同地区,如美国乔治亚州、亚拉巴马州、密苏里州及巴拿马地区的宫颈癌组织都普遍存在 HPV16 E7 变异株。Esche 等<sup>[11]</sup>研究也证实存在 HPV16 E7 变异株,通过进一步与对照组德国患者宫颈癌组织中病毒序列的比较分析,认为坦桑尼亚变异株具有地域特点。根据本研究的分析表明 HPV16 E7 的变异主要存在于羧基端,本研究中高发区两例标本 HPV16 E7(23), HPV16 E7(24)基因第 77 位密码子突变为半胱氨酸,这是否影响了 E7 编码蛋白二聚体、多聚体的形成,增加了蛋白质的稳定性及其金属结合能力、细胞转化能力,与高发区乳头瘤病毒的高感染率及高度致癌能力有关,应作进一步研究。先前分离的 HPV 湖北株第 43 位出现终止突变,导致 E7 蛋白不能正常表达,其在原核细胞中只表达截短的 E7 蛋白,以 HB 株 E7 蛋白免疫小鼠发现能诱导体液免疫产生特异性抗 E7 抗体,但不能诱导小鼠细胞免疫反应<sup>[5,12]</sup>。而武汉地区分离的 HPV16 E7(g)基因仅 54 位出现同义突变,氨基酸序列与野生株一致,与湖北株存在差异,第 44 位密码子并未突变,湖北株为 1996 年分离,而此次分离的病毒为野生型,提示在武汉地区野生型与湖北株并存。为排除 DNA 聚合酶可能造成的各种碱基错配,本实验通过在正反两个方向对目的基因的正链及负链进行测序,最大限度地减少了测序中可能存在的错配模板;且双向测序具有一定的校对功能,变异处 G 峰(反意链)清晰,单一背景无杂峰,因此消除了由实验造成的核苷酸序列改变的可能性,表明本研究发现的病毒核苷酸序列第 77 位的变异是由高发区 HPV16 E7 基因与标准株病毒基因之间本身存在差异引起的。鉴于湖北地区目前分离的人乳头瘤病毒以野生型为主,因此针对湖北地区乳头瘤病毒的 DNA 疫苗设计仍应以标准株 E7 基因为基础。

### 参考文献

[1] Bosch F X, Manos M, Munoz N. Provalence of human papillomavirus in cervical cancer. a world wild prospective[J]. JNCI, 1995, 87:796 - 862.  
 [2] Chen L P, Thomas E K, Hellstrom K E, et al. HPV16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88:110 - 114.

- [3] 任占平, 石 喆, 陈蔚麟, 等. 子宫颈癌人乳头状瘤 16 及 18 型感染与多种癌基因产物表达的关系[J]. 中华妇产科杂志, 1998, 33: 173 - 174.
- [4] 伍欣星, 邱小萍, 刘学锋, 等. 人乳头瘤病毒分子流行病学研究及意义[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 1997, 17 (增): 226.
- [5] 伍欣星, 赵文先, 丁晓华, 等. 湖北地区宫颈癌组织中乳头瘤病毒 16 型 E7 基因的分离、克隆和序列分析[J]. 中国病毒学, 1996, 11: 220 - 224.
- [6] Sambrook J, Fritsch F E, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Second edition[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994.
- [7] Vousden K H, J Doniger J A Dipaolo. The E7 ORF of HPV16 encode a transforming gene[J]. Oncogene Res, 1988, 167 - 175.
- [8] Barbosa M S, Lowy D R, Schiller J T. Papillomavirus polypeptides E6 E7 are zinc-binding proteins[J]. J Virol, 1998, 63: 1404 - 1407.
- [9] Fuinage Y, Kazawa K, Nishikawa A, et al. Sequence variation of human papillomavirus type HPV16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias[J]. Virus Genes, 1994, 9: 85 - 92.
- [10] Icenogle J, Sathya P, Miller D, et al. Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and 16[J]. Virology, 1991, 184: 101 - 107.
- [11] Eschl D, Durst M, Meulen J T, et al. Geographical dependence of sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus 16 [J]. General Virol, 1992, 73: 1829 - 1832.
- [12] 赵 旻, 伍欣星, 赵文先. 人乳头瘤病毒 16 型湖北株 E7 基因的克隆、表达及其抗原性研究[J]. 湖北医科大学学报, 2000, 21: 1 - 3.

## 欢迎订购《中国病毒学》2002 年增刊 ——中国普通病毒保藏中心专刊

《中国病毒学》是由科学出版社出版、中国科学院武汉病毒研究所和中国微生物学会共同主办、国内外公开发行的学报级学术期刊, 1986 年创刊, 为我国生物学核心期刊, 被国内外多家重要检索刊物和数据库收录。

《中国病毒学》2002 年 12 月份将出版增刊——中国普通病毒保藏中心专刊。主要内容有: 国内外保藏机构简介、中国普通病毒保藏中心简介、中国普通病毒保藏中心毒种管理条例和中国普通病毒保藏中心保藏毒种目录。是从事病毒基础理论和应用研究的工作者的重要参考书。该专刊定价每本 8 元, 欢迎读者订阅。

联系人: 中国科学院武汉病毒研究所 陈绳亮 邮编: 430071, 电话: 027-87641112。