

# 尖锐湿疣组织中人乳头瘤病毒 6 和 11 型的感染率及其 L1 基因的表达

孙爱华 徐莹 冯燕 严杰

**【摘要】 目的** 了解尖锐湿疣组织标本中人乳头瘤病毒 6 型(HPV-6)和 11 型(HPV-11)感染率的差异,构建 HPV-6 型主要衣壳蛋白 L1 基因原核表达系统,建立 ELISA 方法检测标本中 L1 基因表达情况。**方法** 采用基于 HPV-6 型和 HPV-11 型 L1 基因的双重 PCR,检测尖锐湿疣组织标本中 HPV-6 型和 HPV-11 型的感染率;采用 PCR 扩增 HPV-6 型全长 L1 基因,T-A 克隆后测序,构建原核表达系统 pET32a-L1-*E. coli* BL21(DE3),采用 SDS-PAGE 检测目的重组蛋白 rL1 的表达。制备 rL1 兔抗血清,用免疫双扩散试验检测抗血清的效价;建立 ELISA 方法检测标本中 L1 基因的表达情况。**结果** 116 例患者尖锐湿疣组织标本中,92.2% (107/116) 检出 HPV-6 型和/或 HPV-11 型。其中单一 HPV-6 型阳性者占 70.1% (75/107),单一 HPV-11 型阳性者占 23.4% (25/107),HPV-6 型和 HPV-11 型混合感染者占 6.5% (7/107)。与报道的相应序列比较,所克隆的 HPV-6 型 L1 基因核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 99.20% ~ 99.93% 和 99.80% ~ 100%。IPTG 能诱导 rL1 表达,rL1 兔抗血清免疫双扩散效价为 1:4。尖锐湿疣组织标本 88.8% (103/116) 检出 L1 蛋白。**结论** 成功地构建了 HPV-6 型 L1 基因原核表达系统,并建立了 HPV-6 型和 HPV-11 型 L1 基因分型的双重 PCR 和 L1 蛋白 ELISA 检测方法。浙江省尖锐湿疣患者主要感染 HPV-6 型,病灶中 HPV 高频率表达病毒主要衣壳蛋白 L1。

**【关键词】** 尖锐湿疣; 人乳头瘤病毒 6 型/11 型; L1 基因型

**Study on the frequency of human papillomavirus type 6 and type 11 infection and L1 gene expression of the virus in biopsy samples of pointed condyloma patients** SUN Ai-hua, XU Ying, FENG Yan, YAN Jie. Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310053, China

Corresponding author: YAN Jie, Email: Med\_bp@zju.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To determine the different rates of human papillomavirus types 6 (HPV-6) and 11 (HPV-11) infection in biopsy samples from pointed condyloma patients, and to construct prokaryotic expression system of the major capsid protein L1 of the virus so as to establish an ELISA for detecting the expression of L1 gene in the biopsy samples. **Methods** Using a double PCR based on the L1 gene of HPV-6 and HPV-11, the infection rates of HPV-6 and HPV-11 in the biopsy samples were determined. The whole length of HPV-6 L1 gene was amplified using PCR and the target amplification fragment was sequenced after T-A cloning. The prokaryotic expression system pET32a-L1-*E. coli* BL21 (DE3) was constructed and SDS-PAGE was used to measure the expression of the target recombinant protein rL1. Rabbit anti-rL1 serum was prepared and immuno-diffusion assay was applied to examine the antiserum titer. ELISA was established to detect the expression of L1 gene in the biopsy samples. **Results** In the biopsy samples from 116 pointed condyloma patients, 92.2% (107/116) were detectable for HPV-6 and /or HPV-11. Of the 107 positive samples, 70.1% (75/107) and 23.4% (25/107) were positive for HPV-6 or HPV-11 alone and 6.5% (7/107) were infected with both HPV-6 and HPV-11 respectively. When compared with the reported corresponding sequences, the homology of nucleotide and sequence of the cloned HPV-6 L1 gene was from 99.20% - 99.93% while its putative amino acid sequence homology was from 99.80% - 100%, suggesting IPTG could induce the expression of rL1. The immuno-diffusion titer of the rabbit anti-rL1 serum was 1:4. 88.8% (103/116) of the biopsy samples were the major capsid protein L1 detectable. **Conclusion** A prokaryotic expression system of HPV-6 L1 gene, a double PCR assay for HPV-6 and HPV-11 genotyping, and an ELISA assay for detecting the major capsid protein L1 were

基金项目:浙江省医药卫生科技计划(2004A018)

作者单位:310053 浙江大学医学院(孙爱华、徐莹、冯燕、严杰)

通讯作者:严杰, Email: Med\_bp@zju.edu.cn

第一作者现工作单位:310053 杭州,浙江医学高等专科学校

successfully established in this study. The pointed condyloma patients in Zhejiang area mainly infected with HPV-6. The HPV in the focus frequently expressed major capsid protein L1.

**【Key words】** Pointed condyloma; Human papillomavirus type 6/type 11; L1 genotype

当前尖锐湿疣已成为我国主要性传播疾病之一,人乳头瘤病毒 6 型(HPV-6)和 11 型(HPV-11)是引起尖锐湿疣的主要病原体<sup>[1]</sup>。HPV 衣壳蛋白由主要衣壳蛋白 L1 和次要衣壳蛋白 L2 组成<sup>[2, 3]</sup>。L1 序列保守,是 HPV 主要种特异性抗原,可诱生中和性抗体<sup>[4, 5]</sup>。HPV 难以体外培养,其蛋白抗原不易获得。本研究从尖锐湿疣患者病变组织中克隆了 HPV-6 的 L1 基因并构建了其原核表达系统,建立了基于 L1 基因、可同时检测 HPV-6 和 HPV-11 双重 PCR 以及 L1 蛋白 ELISA,以了解尖锐湿疣患者中两型 HPV 感染率差异,并为 L1 蛋白作为实验室诊断乃至疫苗候选抗原提供依据。

## 材料与方法

1. 研究对象与标本:选取 2003 年 9 月至 2004 年 10 月在浙江省妇产科医院、嘉兴市妇幼保健院、杭州市第三人民医院临床诊断为尖锐湿疣的 116 例患者为研究对象,门诊手术收集病理组织标本。

2. DNA 模板的制备:组织标本充分剪切研磨后,留少数用于 L1 蛋白的 ELISA 测定,其余用上海博彩生物科技有限公司(BioColor)提供的基因组 DNA 提纯试剂盒提取 DNA,并用紫外分光光度法测定 DNA 浓度和纯度。

3. 全长 L1 基因的扩增:根据 GenBank 中 HPV-6 型 L1 基因(GenBank No.: NC\_001668、AF067036、AF092932)和 HPV-11 型 L1 基因(GenBank No.: U55993、M14119)的核苷酸序列设计 PCR 引物。引物由上海博亚生物技术有限公司(BioAsia)合成。引物序列:上游 5'-CCG GAA TTC ATG TGG CGG CCT AGC GAC AG-3'(EcoR I),下游 5'-CCG CTC GAG ACA CAT ATA TTA CCT TTT AG-3'(Xho I)。PCR 反应体系:2.5 mol/L dNTP、0.25 mmol/L 引物、2.5 U EX-Taq (TaKaRa)、100 ng DNA 模板、1×PCR 缓冲液(pH 值 8.3),总体积为 100 μl。PCR 反应条件:94℃ 5 min,94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 90 s,10 个循环;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 100 s(以后每循环增加 10 s),20 个循环;72℃ 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,目的基因扩增产物的预期大小为 1503 bp。

4. T-A 克隆、核苷酸序列测定和亚克隆:采用 BioColor 公司的 T-A 克隆试剂盒,将目的扩增片段克隆至质粒 pGEM-T 中,转化入 *E. coli* DH 5α 株,提取重组质粒,送 BioAsia 公司测序,与上述报道的 HPV-6 型和 HPV-11 型 L1 基因核苷酸及氨基酸序列进行比较。将测序正确的 pGEM-T-L1 双酶切,获得目的基因片段与线性 pET32a 载体(Novagen)连接,转化 *E. coli* BL21(DE3)(Novagen),提取质粒后再次测序。亚克隆时连接所用试剂购自 TaKaRa 公司。

5. 目的基因表达、产物鉴定和抗血清制备:L1 基因原核重组表达系统 pET32a-L1-*E. coli* BL21(DE3)0.5 mmol/L 的 IPTG 37℃ 诱导表达 4 h,10% SDS-PAGE 检测目的重组蛋白 rL1 的分子量。采用 Ni-NTA(BioAsia)亲和层析法提取 rL1,常规家兔皮下免疫法制备抗血清,用免疫双扩散试验确定抗血清的效价。

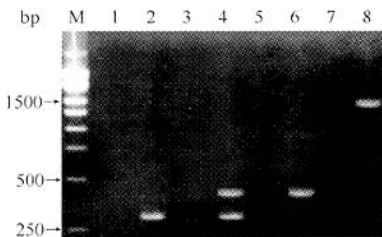
6. 标本中 HPV-6 和 HPV-11 型 L1 基因的检测:由于 HPV-11 型 L1 基因氨基酸序列第 130 和 131 位分别为 G 和 Y,HPV-6 型 L1 基因中序列中第 130 位氨基酸缺失、第 131 位为 S,以及 HPV-6 和 11 型 273~278 氨基酸序列分别为 IIKGSG 和 LVKGGN,分别设计 HPV-6 和 HPV-11 型的特异性引物。HPV-6 型 L1 基因引物序列:上游 5'-ACT AAT ACA CCT GTA CAG GC-3'(第 514~533 位),下游 5'-GAT TTC CAC TAC CCT TAA-3'(第 835~818 位)。HPV-11 型 L1 基因引物序列:上游 5'-GTA GAA AAT AGT GGT GGG TA-3'(第 376~395 位),下游 5'-TGT TAT TAC CCC CTT TTA CC-3'(第 838~819 位)。建立 HPV-6 和 11 型 L1 基因片段双重 PCR,反应总体积为 100 μl,内含:2.5 mol/L 各 dNTP、250 nmol/L 各引物、3.0 U EX-Taq(TaKaRa)、100 ng DNA 模板、1×PCR 缓冲液(pH 值 8.3),反应参数:94℃ 5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 60 s,35 个循环;72℃ 7 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,HPV-6 和 HPV-11 型 L1 基因扩增产物预期大小分别为 305 和 444 bp。

7. L1 基因表达产物的检测:采用 ELISA 法。116 例患者尖锐湿疣病理组织标本匀浆超声破碎(300 V, 5 s×3),3000 r/min 离心 10 min 后取上清,

紫外分光光度法测定蛋白浓度。用蛋白含量为 100 μg/ml 的病理组织标本超声破碎物上清为包被抗原, 1:500 稀释兔抗 L1 血清为一抗, 1:3000 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG (Jackson Immuno Research) 为二抗, 检测各标本中 L1, 同时分别用 5 份相同蛋白含量的手术切除包皮组织超声破碎物上清和 rL1 为阴性和阳性对照。以 OPT 为底物, 用酶联免疫检测仪检测  $A_{490}$  值, 以阴性对照  $A_{490}$  均值加 3 s 为阳性判断标准。

### 结 果

1. PCR 扩增: 116 例患者尖锐湿疣组织标本中, 92.2% (107/116) 检出 HPV-6 和/或 HPV-11。其中单一 HPV-6 阳性者占 70.1% (75/107), 单一 HPV-11 阳性者 23.4% (25/107), HPV-6 和 HPV-11 型混合感染者 6.5% (7/107)。用双重 PCR 检测的 HPV-6 型 L1 基因片段 (305 bp) 和 HPV-11 型 L1 基因片段 (444 bp) 及扩增获得的全长 HPV-6 型 L1 基因片段 (1503 bp), 见图 1。



M: 250 bp DNA Marker; 1、3、5、7: 空白对照; 2: 单一 HPV-6 感染 (305 bp, 标本编号 H66); 4: HPV-6 和 HPV-11 型混合感染 (305 bp 和 444 bp, 标本编号 H91); 6: 单一 HPV-11 感染 (444 bp, 标本编号 H53); 8: 全长 HPV-6 L1 基因片段 (1503 bp, 标本编号 H26)

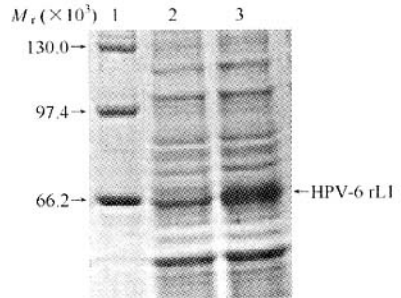
图1 临床标本中 HPV-6 和 HPV-11 L1 基因目的扩增条带

2. 目的克隆基因序列分析: 与报道的 HPV-6 L1 基因序列比较, 从编号 H26 标本 DNA 中克隆的 HPV-6 型全长 L1 基因核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 99.20%~99.93% 和 99.80%~100%, T-A 克隆和亚克隆序列完全相同。

3. rL1 表达及其抗血清效价: 0.5 mmol/L IPTG 能有效地诱导 rL1 表达, 其分子量大小在预期范围内 (图 2)。rL1 兔抗血清免疫双扩散效价为 1:4。

4. 标本中 L1 基因表达产物的检测结果: 5 例阴性对照的  $A_{490}$  均值为  $0.17 \pm 0.06$ , 阳性标准分别为 0.35。按上述判断标准, 尖锐湿疣组织标本 88.8%

(103/116) 的 L1 蛋白检测结果阳性, 其  $A_{490}$  值范围为 0.46~1.15, 均来自 L1 基因 PCR 扩增结果阳性的标本。另有 4 例标本 L1 基因 PCR 扩增结果阳性 (1 例为 HPV-6 型, 3 例为 HPV-11 型), 但 ELISA 检测结果阴性。



1: 蛋白 Marker; 2: 未经 IPTG 诱导; 3: 0.5 mmol/L IPTG 诱导  
图2 IPTG 诱导 HPV-6 rL1 基因的表达情况

### 讨 论

HPV 型别众多, 不同型的 HPV 侵犯部位及所致疾病差异很大。其中 HPV-6 型和 HPV-11 型具有嗜黏膜性, 主要引起尖锐湿疣或喉及口腔乳头瘤。然而, 至今尚不能用常规体外培养方法获得大量 HPV, 给相关实验室诊断及疫苗研究带来很大的困难<sup>[1]</sup>。L1 是 HPV 的主要衣壳蛋白, 且可诱生中和性抗体的产生<sup>[3-7]</sup>, 因而有可能作为实验室诊断及疫苗的候选抗原。

HPV-6 型和 HPV-11 型 L1 基因核苷酸及其氨基酸序列有 3 个主要的突变区域<sup>[5, 8-11]</sup>。其中 HPV-11 型 L1 基因第 130 和 131 位氨基酸分别为 G 和 Y, HPV-6 型 L1 基因中序列中第 130 位氨基酸缺失、第 131 位为 S; HPV-6 型和 HPV-11 型 273~278 氨基酸序列分别为 IIKGSG 和 LVKGGN; 因此有可能在上述区域设计特异性引物并应用 PCR 分辨 HPV-6 型和 HPV-11 型。国内有关尖锐湿疣 HPV 感染型别研究报道不多, 史庭燕等<sup>[12]</sup> 报告 50 例尖锐湿疣标本中, 40% 感染 HPV-6、48% 感染 HPV-11、6% HPV-6 和 HPV-11 混合感染。我们检测的 107 例 HPV 阳性的尖锐湿疣标本中, 70.1% (75/107) 为 HPV-6 型、23.4% (25/107) 为 HPV-11 型、6.5% (7/107) HPV-6 型和 HPV-11 型混合感染, 提示浙江省可能以 HPV-6 型为尖锐湿疣感染的主要型别。上述尖锐湿疣 HPV 主要感染型别不同, 有可能是地区、人群差异所致<sup>[13]</sup>。

由于我们检测的尖锐湿疣 HPV PCR 检测结果

阳性标本中,约 3/4 与 HPV-6 型感染有关,且 HPV-6 型和 HPV-11 型 L1 基因氨基酸序列同源性可达 80%~85%<sup>[5, 8-11]</sup>,因此仅构建了 HPV-6 型的 L1 基因原核表达系统。与报道的 HPV-6 型 L1 基因序列比较,所克隆的 HPV-6 型 L1 基因核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 99.20%~99.93% 和 99.80%~100%,T-A 克隆和亚克隆序列完全相同,提示 L1 基因序列的高度保守性。应用 rL1 及其兔抗血清建立的 ELISA,发现尖锐湿疣组织标本 88.8% (103/116) 的 L1 蛋白阳性。由于上述 L1-ELISA 阳性标本 L1 基因 PCR 扩增结果均阳性,且未发现 PCR 扩增阴性而 L1-ELISA 阳性者,表明 L1-ELISA 与双重 PCR 检测结果有较高的一致性。我们在实验中发现,有 1 例 HPV-6 型、3 例 HPV-11 型 PCR 扩增结果阳性的标本,ELISA 检测结果均为阴性,这可能与 PCR 的检测敏感性较高有关,也可能是 L1 基因突变或其转录、翻译水平受阻所致<sup>[3-5]</sup>,值得进一步探讨。

综上所述,本研究建立的基于 L1 基因双重 PCR 可用于同时检测并分辨尖锐湿疣组织标本中的 HPV-6 型和 HPV-11 型,所构建的原核表达系统表达的 rL1 有良好的免疫原性,所建立的 L1-ELISA 可用于检测尖锐湿疣组织标本中 HPV-6 型或 HPV-11 型表达的主要衣壳蛋白 L1,故该 rL1 可作为免疫学诊断乃至疫苗的抗原。

#### 参 考 文 献

- Favre M, Ramoz N, Orth G. Human papillomavirus: general features. Clin Dermatol, 1997, 15: 181-198.
- Plietr H, Fuchs PG. Anatomy, taxonomy, and evolution of papillomaviruses. Intervirology, 1994, 37: 143-149.
- Berg M, Difatta J, Holeczyk E, et al. Viable adenovirus vaccine prototypes: high level production of a papillomavirus capsid antigen from major late transcriptional unit. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 4590-4595.
- Li M, Cripe TP, Estes PA. Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domain involved in DNA binding and capsid assembly. J Virol, 1997, 71: 2988-2995.
- Neeper MP, Hofmann KJ, Jansen KU. Expression of the major capsid protein of human papillomavirus type 11 in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 1996, 180: 1-6.
- Baud D, Ponci F, Bobst M, et al. Improved efficiency of a *Salmonella*-based vaccine against human papillomavirus type 16 virus-like particles achieved by using a codon-optimized version of L1. J Virol, 2004, 78: 12901-12909.
- Matsumoto K, Kawana K, Yoshikawa H, et al. DNA vaccination of mice with plasmid expressing human papillomavirus 6 major capsid protein L1 elicits type-specific antibodies neutralizing pseudovirions constructed in vitro. J Med Virol, 2000, 60: 200-204.
- Hofmann KJ, Cook JC, Joyce JG, et al. Sequence determination of human papillomavirus type 6a and assembly of virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. Virology, 1995, 209: 506-518.
- Caparros-Wanderley W, Savage N, Hill-Perkins M, et al. Intratype sequence variation among clinical isolates of the human papillomavirus type 6 L1 ORF: clustering of mutations and identification of a frequent amino acid sequence variant. J Gen Virol, 1999, 80: 1025-1033.
- Kovelman R, Bilter GK, Roman A, et al. Human papillomavirus type 6: classification of clinical isolates and functional analysis of E2 proteins. J Gen Virol, 1999, 80: 2445-2451.
- Dartmann K, Schwarz E, Gissmann L, et al. The nucleotide sequence and genome organization of human papilloma virus type 11. Virology, 1986, 151: 124-130.
- 史庭燕, 赵秀丽, 施燕峰, 等. 应用树突状 DNA 杂交 (DDH) 对生殖道尖锐湿疣中 HPV DNA 的分型和检测. 病毒学报, 2004, 20: 12-16.
- Rocha-Zavaleta L, Yescas G. Human papillomavirus infection and cervical ectopy. Int J Gynaecol Obstet, 2004, 85: 259-266.

(收稿日期: 2005-04-11)

(本文编辑: 孙强正)