文章编号:1000-5404(2006)05-0469-03

论著

带有不同亚型 HPV L_1 基因片段的哺乳动物细胞克隆的建立

卓勤强,刘 昕,钱春荣,刘丽莎,高玉梅 (第三军医大学基础医学部医学遗传学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 构建携带 HPV 亚型 L_1 基因片段的标准细胞株。**方法** 根据 HPV 通用引物 $GP5^+/GP6^+$,用重叠延伸 PCR 方法合成 HPV 亚型 L_1 基因中约 150 bp 片段;插入真核细胞表达载体 EGFP-N_1,用脂质体转染 SPC 细胞,筛选以获得带有不同 HPV L_1 基因片段细胞克隆,并用定量 PCR 方法确认。**结果** 重叠延伸 PCR 后得到约 150 bp 的基因片段,测序结果经 BLAST 比对,分别与相应 HPV 亚型公开报告序列一致;将所获片段与 EGFP-N_1 载体连接后酶切及测序鉴定正确;经筛选获得了携带 HPV6、11、16、18、31、35 亚型 L_1 基因片段的细胞株;并用定量 PCR 方法进行了确认。**结论** 成功构建了带有不同 HPV 亚型 L_1 基因片段的 30 个亚克隆和 6 个细胞株,为进一步的 HPV 分型检测研究提供了保证。

关键词: HPV;重叠延伸;$GP5^+/GP6^+$;定量 PCR
中图法分类号: R394-33; R394.2 **文献标识码:** A

Establishment of mammalian cell cloning with different subtype HPV L_1 gene fragment

ZHUO Qin-qiang, LIU Xin, QIAN Chun-rong, LIU Li-sha, GAO Yu-mei (Department of Molecular Genetics, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To prepare the standard cell line involved clinical frequent HPV subtype L_1 gene fragment. **Methods** According to HPV consensus primer $GP5^+/GP6^+$, 150 bp gene fragment of each HPV subtype L_1 gene was synthesized with the overlap extension PCR, recombined with PMD18-T vector and identified by enzymase digestion and sequencing. The recombinant was restructed with EGFP-N_1 vector, transfected into SPC cell line, screened by G418 and identified by real-time PCR. **Results** A gene fragment about 150 bp was obtained by OE-PCR, and its DNA sequence was identical to public sequence of each subtype. Each recombinant plasmid was conjuncted with EGFP-N_1 vector and confirmed by enzymase digestion and sequencing. Screened by G418, cell strains involving HPV6, 11, 16, 18, 31, 35 L_1 gene fragment were obtained and identified by real-time PCR. **Conclusion** The successful cloning of 30 clinical frequent HPV subtype L_1 gene fragments and construction of 6 cell strains have laid a foundation for the further studies on detection of HPV.

Key words: HPV; overlap-extension PCR; $GP5^+/GP6^+$; quantitative PCR

人类乳头状瘤病毒(human papillomaviruses, HPV)属于 Papovaviridae 家族,目前已发现了 200 多种亚型[1,2]。研究表明,HPV 感染是宫颈癌发生的主要病因,在 99.7% 宫颈癌患者检测到了 HPV DNA,而且持续高危型 HPV 的感染是癌前病变和浸润性宫颈癌发展的必要因素[3],检测 HPV 可能帮助发现潜在的宫颈癌病人。由于不同亚型 HPV 的致病机制和致癌危险性各不相同[4],因此很有必要对 HPV 各亚型进行分型鉴别。目前,在临床上尚没有一个公认的对 HPV 进行分型检测的方法,而且现有的检测方法均没有可靠的阳性对照。为此,我们通过向哺乳动物细胞中转入带有不同 HPV 亚型 L_1 基因片段(通用引物 $GP5^+/GP6^+$ 在 HPV 基因组中的扩增片段)的方法,建立不同 HPV 亚型的阳性对照细胞系。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5α、SPC(人肺腺癌细胞)由本室保存,EGFP-N_1 真核表达质粒载体由本室许雪青博士惠赠,PMD18-T Vector、*Taq* 酶试剂盒、T_4DNA 连接酶购自大连宝生物有限公司,核酸提取试剂盒购自 Omega 公司,限制性内切酶购自 NEB 公司,DOTAP Liposomal Transfection Reagent 购自罗氏试剂公司,HPV 各亚型 DNA 序列及其通用引物由上海博亚生物有限公司合成,DNA 测序由上海博亚生物有限公司完成,定量 PCR 探针由上海基康生物公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 各亚型 HPV L_1 基因待合成片段的确定 选择目前

作者简介:卓勤强(1978-),男,河南省商丘市人,硕士研究生,医师,主要从事芯片检测技术方面的研究。电话:(023) 68753879
通讯作者:刘 昕,电话:(023) 68753934
收稿日期:2005-10-28;修回日期:2005-11-17

多数研究应用的扩增 HPV L_1 基因的通用引物 $GP5^+/GP6^+$（5′-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3′，5′-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3′）[5]，将各亚型 HPV DNA 序列（GenBank 编号见表1）与通用引物 $GP5^+/GP6^+$ 比对，找出各亚型在该对通用引物下的扩增序列（约 150 bp）作为待合成片段。

表1 临床常见亚型 GenBank 编号

亚型	GenBank 编号	亚型	GenBank 编号
HPV11	M14119	HPV18	X05015
HPV39	M62849	HPV40	X74478
HPV44	U31788	HPV45	X74479
HPV53	X74482	HPV54	U37488
HPV59	X77858	HPV61	U31793
HPV70	U21941	HPV72	X94164
HPV26	X74472	HPV31	J04353
HPV42	M73236	HPV43	AJ620205
HPV51	M62877	HPV52	X74481
HPV56	X74483	HPV58	D90400
HPV66	U31794	HPV68	X67161
HPV73	X94165	HPV81	AJ620209
HPV33	A07020, A12360, M12732	HPV35	M74117 X74477
HPV6	AF092932, L41216, X00203	HPV16	K02718, U89348, AF125673
HPV82	AB027021	HPV CP6108	U12478

1.2.2 各亚型 L_1 基因片段的重叠延伸 PCR 合成 分别合成30个亚型待合成片段双链 DNA 5′端长约 85 nt 的寡核苷酸片段，每对寡核苷酸3′端有约 30 个碱基互补；50 μl PCR 反应管中各成分终浓度分别为 2.0 mmol/L $MgCl_2$，200 μmol/L dNTP，上下引物各 0.25 μmol/L，10 × Buffer 5.0 μl，2.5 U *Taq* 酶 1.0 μl，加水至 50 μl。PCR 反应条件：94 ℃预变性 5 min，20 个循环（94 ℃，30 s；72 ℃，1 min），72 ℃，10 min。上述 PCR 产物纯化后与 PMD 18-T Vector 载体连接，*Eco*R Ⅰ + *Hind*Ⅲ 双酶切鉴定并进一步测序鉴定。

1.2.3 各亚型基因 L_1 片段质粒与 EGFP-N_1 质粒的连接及鉴定 分别对携带各亚型 L_1 基因片段的质粒和 EGFP-N_1 质粒用 *Hind* Ⅲ 酶切，产物经纯化后用 T_4 DNA 连接酶进行连接；分别对各亚克隆酶切及测序鉴定，所获重组质粒命名为 HPVxx-N_1，其中 xx 代表相应亚型。

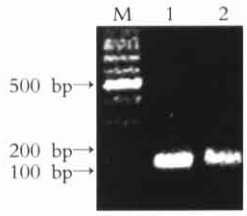
1.2.4 携带各亚型 L_1 基因片段细胞株的构建与筛选 利用 DOTAP 脂质体将携带各亚型 L_1 基因片段的 HPVxx-N_1 质粒转染入 SPC 细胞；用 G 418（600 ng/ml）筛选两周后挑选单个细胞克隆进行增殖，所获细胞系命名为 HPVxx-N_1-SPC，其中 xx 代表相应亚型。

1.2.5 细胞株的定量 PCR 验证 提取不同 L_1 基因片段转染细胞的基因组 DNA，用 Taqman 方法对各亚型进行定量 PCR 验证。25 μl 定量 PCR 反应管中各成分终浓度分别为 3.5 mmol/L $MgCl_2$，0.1 mmol/L dNTP，上下游引物各 0.4 mmol/L，Taqman 探针 0.3 mmol/L，10 × Buffer 2.5 μl，2.5 U *Taq* 酶 0.2 U/μl，加水至 25 μl。PCR 反应条件：94 ℃预变性 3 min，40 个循环（94 ℃，20 s；60 ℃，2 min），40 ℃，20 min，读板。

2 结果

2.1 各亚型 HPV L_1 基因片段的合成

每对3′端互补的寡核苷酸片段经 PCR 后所得产物长约 150 bp（图1），与预期大小基本一致。

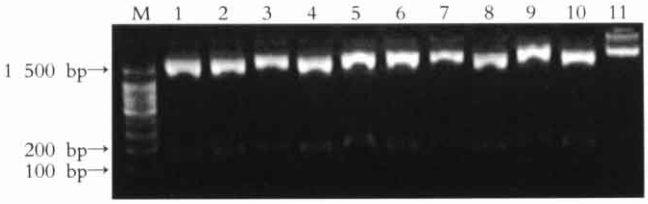


M：100 bp marker；1，2：HPV 亚型基因片段

图1 各亚型基因片段的合成

2.2 各亚型 L_1 基因片段的克隆与鉴定

将上述 PCR 产物连接至 PMD18-T 载体中，转化后得到白色单克隆；提取质粒后 *Eco*R Ⅰ + *Hind* Ⅲ 双酶切鉴定（图2），所得产物与预期相符。重组质粒经进一步测序鉴定，表明与公开报告序列一致。



M：100 bp 标准；1－10：重组质粒 *Eco*R Ⅰ + *Hind*Ⅲ酶切；11：重组质粒 *Eco*R Ⅰ 酶切

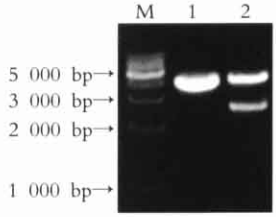
图2 重组质粒的酶切鉴定

2.3 各亚型 L_1 基因片段真核载体的构建与鉴定

将各亚型 L_1 基因片段与 EGFP-N_1 载体连接，转化后得到阳性克隆（表2）；*Hind*Ⅲ 单酶切鉴定（图3），所得产物与预期相符；质粒进一步经测序鉴定，分别与各亚型公开发布的序列完全一致。

表2 带有 HPV L_1 基因片段真核质粒和细胞系

亚型	克隆	细胞系
HPV6	HPV6-N_1	HPV6-N_1-SPC
HPV16	HPV16-N_1	HPV16-N_1-SPC
HPV31	HPV31-N_1	HPV31-N_1-SPC
HPV11	HPV11-N_1	HPV11-N_1-SPC
HPV18	HPV18-N_1	HPV18-N_1-SPC
HPV35	HPV35-N_1	HPV35-N_1-SPC



M：1 000 bp 标准；1：EGFP-N_1 质粒 *Hind* Ⅲ 酶切；2：重组质粒 *Hind* Ⅲ 酶切

图3 真核载体的酶切鉴定

2.4　携带不同亚型 L_1 基因片段细胞株的构建、筛选及其定量 PCR 验证

将重组质粒转染进入 SPC 细胞，经 G418 筛选后获得阳性细胞集落（表 2）；增殖，提取基因组 DNA，进行定量 PCR 验证，各个亚型的 Taqman 探针分别只能对相应亚型基因组 DNA 进行结合而不能与其他亚型发生作用。

3　讨论

人乳头瘤病毒是一种与人体相关的小型 DNA 病毒，基因组 DNA 大小约 8 000 bp ，根据其基因的差异分为多种亚型，目前已检出 200 余种人乳头瘤病毒。HPV 感染与宫颈癌有密切关系，1995 年 WHO 和 IARC 将 HPV 确定为宫颈癌的病因。不同亚型 HPV 的致病机制和致癌危险性各不相同，根据 HPV 流行病学分类，其中 15 个亚型 HPV 可以作为高危型，3 个亚型为可能高危型，12 个亚型为低危型[6]。

各亚型 HPV 致病力有很大差异，因此 HPV 临床检测，特别是型别的鉴定对于宫颈癌的辅助诊断、治疗及预后非常重要，临床上有必要建立一种简便、快速、灵敏、特异的分型检测方法。人是 HPV 的唯一自然宿主，迄今为止，HPV 尚无动物模型，无法进行体外病毒培养，不能通过分离病毒来确定 HPV 的型别，对 HPV 的检测主要通过分子生物学方法来进行。在 HPV DNA 临床样本的检测方法中，PCR 方法是最为灵敏的方法之一。目前，使用较好的是 $GP5^+/GP6^+$ 通用引物[5]。但是单纯的 PCR 并不能对相应 HPV 进行分型，并且假阳性较高。

现有的 HPV 分型检测都是在 PCR 扩增 HPV 基因的基础上，进一步利用 RFLP、反向杂交以及测序等方法完成的。目前有很多实验室在进行 HPV 分型检测的研究：Gravitt 等[6]用尼龙膜上反向杂交的方法可以同时区分 27 个 HPV 亚型，该方法用地高辛对样本进行标记，组化显色进行检测，操作较为复杂，不适用于临床诊断。Szuhai 等[7]应用 SybrGreen 和分子信标定量 PCR 的方法对 HPV 进行分型检测，特异性很好，而且可以对样本的 HPV 进行相对定量，但是他们只能直接区分出 7 个 HPV 亚型，远远不能满足需要。Speich 等[8]用 PCR 扩增后直接测序的方法检测了 2 916 个临床样本，这种技术具有最好的特异性，同时也能提供已知 HPV 型别的突变信息；但是测序技术对检测设备的要求高，且工作量大，在体外诊断中的应用因而受到限制。目前对于 HPV 分型检测研究中最好的方法是 Oh 等[9]用的微阵列检测方法，可以同时区分 27 个 HPV 临床亚型；该研究可以简便、快速、灵敏、特异的对 HPV 进行分型，证实了应用基因芯片技术检测 HPV 的可行性，有很好的临床应用前景；但是该研究中用各亚型的探针作为阳性对照检验微阵列的特异性，与实际检测时差距很大，所得的特异性结果不足以令人信服；而且该芯片不能完全区分目前临床常见致病性 HPV 亚型，有待进一步的改进。

对 HPV 分型检测进行研究，阳性对照是必不可少的，而这也正是目前进行这方面研究所缺乏的，因此，我们构建了携带临床常见 HPV 亚型 L_1 基因片段的亚克隆和细胞系。

本实验采用分段合成然后进行重叠延伸 PCR 连接的方法合成所需序列，并将其转染入哺乳动物细胞，我们构建的基因片段在细胞株中不能表达，成为本实验的一个遗憾。总之，我们成功克隆了 30 个临床常见 HPV 亚型 L_1 基因片段，成功构建并筛选出 6 个携带有 HPV 亚型 L_1 基因片段的细胞株，为进一步 HPV 分型检测研究打下了基础。

参考文献：

[1] BURD E M. Human papillomavirus and cervical cancer[J]. Clin Microbiol Rev, 2003, 16(1): 1 - 17.

[2] 刘　君，孙　红. 人类乳头状瘤病毒与宫颈癌 [J]. 上海医学，2003，26(10)：768 - 770.

[3] BOSCH F X, LORINCZ A, MUNOZ N, *et al*. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer[J]. J Clin Pathol, 2002, 55(4): 244 - 265.

[4] MUNOZ N, BOSCH F X, DE SANJOSE S, *et al*. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer [J]. N Engl J Med, 2003, 348(6): 518 - 527.

[5] DE RODA HUSMAN A M, WALBOOMERS J M, VAN DEN BRULE A, *et al* . The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR[J]. J Gen Virol, 1995, 76(Pt 4): 1057 - 1062.

[6] GRAVITT P E, PEYTON C L, APPLE R J, *et al* . Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L_1 consensus pcr products by a single-hybridization, reverse line blot detection method[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(10): 3020 - 3027.

[7] SZUHAI K, SANDHAUS E, KOLKMAN ULJEE S M, *et al*. A novel strategy for human papillomavirus detection and genotyping with SybrGreen and molecular beacon polymerase chain reaction [J]. Am J Pathol, 2001, 159(5): 1651 - 1660.

[8] SPEICH N, SCHMITT C, BOLLMANN R, *et al*. Human papillomavirus (HPV) study of 2916 cytological samples by PCR and DNA sequencing: genotype spectrum of patients from the west German area[J]. J Med Microbiol, 2004, 53(Pt 2): 125 - 128.

[9] OH T J, KIM C J, WOO S K, *et al*. Development and clinical evaluation of a highly sensitive DNA Microarray for detection and genotyping of human papillomaviruses [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(7): 3272 - 3280.

（编辑　栾　嘉）