

## 8 种新型 HPV 的分型及特异型引物设计

王启广, 谌芳, 曹友德

湖南省人民医院检验科 湖南 长沙 410005

**摘要:目的:** 本文主要研究近几年来 NCBI 数据库最新释放出来的 8 种新型 HPV 即 HPV(126, 135, 136, 137, 140, 144, 154, 166), 对其进行分子进化树分析, 进行分类并设计特异型引物。**方法:** NCBI 检索 8 种新型 HPV 的基因组序列, 然后用 Blast 相似性比较得到与其 L1 高度相似的 HPV, 其次选择 HPV  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$  各属具代表性的 HPV, 最后用 Clustal W 对以上所有 58 种 HPV L1 区氨基酸序列进行比较分析, 构建分子进化树; 进一步用 Primer-Blast 对 8 种新型 HPV 进行特异型引物设计。**结果:** 系统进化树分析得出 8 种 HPV 均属于  $\gamma$  属, 利用 Primer-Blast 分析得到这 8 种 HPV 特异型引物。**结论:** HPV126、HPV 135、HPV 136、HPV 137、HPV 140、HPV 144、HPV 154、HPV 166 均为  $\gamma$  属。

**关键词:** 人乳头瘤病毒; 氨基酸序列; 核苷酸序列; 分子系统进化树

Typing and the Primer design of eight new HPV

Wang Qiguang, Shen Fang, Cao Youde

(Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Hunan

Province, Changsha 410005, Hunan, China)

**Abstract:Object:** This study is based on the latest report of 8 types of HPV genome in NCBI. The eight HPVs are HPV (126, 135, 136, 137, 140, 144, 154, 166). the Phylogenetic tree was constructed, the boxshadow was built based on the L1 amino acid sequence and the specific primers was designed based on the L1 nucleotide sequence. **Method:** The similar HPV to 8 types was searched by Blast, the representative HPV of  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  genus was selected, and the all of the 58 HPV L1 amino acid sequences was analyzed and compared by the Clustal W software to constructing the Phylogenetic tree. The specific primers were designed by the primer-blast. **Result:** From the Phylogenetic tree, we know that all the eight HPVs are from  $\gamma$  genu. Using the Primer-Blast, we designed the specific primers of each HPV. **Conclusion:** The HPV type of 126, 135, 136, 137, 140, 144, 154, 166 are all in  $\gamma$  genus.

**Key words:** HPV; Amino acid sequence; Nucleotide sequence; Phylogenetic tree

人乳头瘤病毒（HPV）感染是发病率排第一位的性传播疾病，持续的 HPV 感染是宫颈癌发生的首要原因<sup>[1]</sup>。研究表明 HPV 检测对诊断宫颈癌及癌前病变具有至关重要的临床意义<sup>[2]</sup>。乳头瘤病毒的基本单位是“型”，1995 年型定义为只要 L1 区的 DNA 序列有 10%以上与已知型不同，则为一新型；如差异在 2%~10%和 2%以下分别称为亚型和变异体。2004 年 Bernard HU 为首的工作组引入了生物学中的属和种的概念<sup>[2]</sup>。L1 区的核酸序列差异同源性少于 60%且整个序列的核酸序列同源性 23%~43%之间为属；L1 区核酸同源性在 60%~70%之间以往称为组（亚组、微小分支）的统称为种。现代分类学根据种系发生进行分类，是建立在氨基酸或核酸序列数据的基础上，通过研究病毒种系发生的时间、空间以及它们的相互作用建立模式图；它表示物种分子水平上进化的同时也可作为一种分类体系<sup>[3]</sup>。

目前临床上用于检测 HPV 的方法包括细胞学方法、免疫组化、原位杂交、斑点杂交、核酸印迹、PCR 等<sup>[4]</sup>。PCR 方法的敏感性最高，操作简单，是目前应用最多的方法，但易造成假阳性<sup>[5]</sup>。目前用于检测 HPV 的引物有特异型和通用型。特异型引物 PCR 工作量大，精确性、特异性高。通用型引物可同时检测大量标本，不同的通用型引物，PCR 扩增的效率不同，通用型引物与大多数型别 HPV 引物结合区存在或多或少的错配。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象和目的

8 种新型 HPV 的基因组：HPV（126、135、136、137、140、144、154、166）。均为 2011.11-2013.06 期间在 NCBI 数据库中释放出来且未分类的人乳头瘤病毒。目的：对其进行分子系统发生树分析，进行分类，并进一步设计特异型引物。

### 1.2 工具

DNAStar (Editseq、Megalign) 软件、Treeview 软件、NCBI、Mobyly portal 网页上的 Clustal W 在线分析、NCBI 在线蛋白质-蛋白质 BLAST 分析、NCBI 在线 Primer-BLAST 分析。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 NCBI 数据库检索

##### 1.3.1.1 新型未分类 HPV 基因组检索

①登陆网页 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) , 在 Genome 中检索出双链 DNA 病毒的全基因组的乳头瘤病毒 (Papillomaviridae) , 选择其中尚未分类的各型 HPV 作为研究对象。

②登陆 NCBI 主页后选择核苷酸 (Nucleotide) , 输入要查询的 HPV , 得到其全基因序列和蛋白的氨基酸序列。并用 DNAStar 的 EditSeq 编辑每种 HPV 的 L1 氨基酸序列、核苷酸序列。

##### 1.3.1.2 相似序列比较

选择 NCBI 中的 BLAST 工具, 选择蛋白质-蛋白质 BLAST 即 blastp (protein-protein BLAST) 算法。分别对 8 种 HPV L1 的氨基酸序列进行相似性比较分析。

##### 1.3.1.3 $\alpha, \beta, \gamma$ 属代表性 HPV 基因组检索

乳头瘤病毒的 16 个属中与人类密切相关的 HPV 分属  $\alpha, \beta, \gamma$  属。选取其中代表型 HPV, 在 NCBI 上检索其核苷酸、氨基酸序列。

#### 1.3.2 构建分子进化树

登陆 Mobyly portal 网页, 选择 alignment 子程序下的 clustalw- multialign 进行多个序列的比较, 载入已经编辑好的上述所有 HPV L1 氨基酸序列的

FASTA 格式的文件，进行 clustalw-multialign 分析，得到扩展名为 dnd 的进化树，用软件 Treeview 查看这个图形化的进化树结果。

### 1.3.3 特异型引物设计

Primer-BLAST 在线设计整合了 Primer3 软件和 NCBI 上的 Blast 功能，用于聚合酶链反应（PCR）特异性核苷酸引物<sup>[6]</sup>。在模板区输入 1.3.1.1 生成含 8 种 HPV L1 核苷酸序列的 FASTA 格式文件，进入 NCBI 主页中的 Primer-BLAST 界面，在 PCR template（PCR 模板区）输入进行特异型引物设计的 HPV 的 L1 区的碱基序列，引物范围选择特异性区域，参数设置：产物长度 300-500bp，Tm 为 57-63℃，两引物间相差不超过 3℃，进行引物设计。

## 2 结果

### 2.1 NCBI 数据库检索

#### 2.1.1 8 种新型 HPV 基因组检索

利用 NCBI 数据库检索出 8 种新型 HPV。其基因组序列号、大小、蛋白质数量等信息见表 1；其 L1 蛋白序列 ID 及氨基酸长度等信息见表 2。

**表 1 8 种 HPV 基因组数据列表**

HPV 病毒	序列号	基因组大小	蛋白质数量	宿主
Human papillomavirus type 126	NC_016157	7326 nt	7	vertebrates, human
Human papillomavirus type 135	NC_017993	7293 nt	7	vertebrates, human
Human papillomavirus type 136	NC_017994	7319 nt	7	vertebrates, human
Human papillomavirus type 137	NC_017995	7236 nt	7	vertebrates, human
Human papillomavirus type 140	NC_017996	7341 nt	7	vertebrates, human
Human papillomavirus type 144	NC_017997	7271 nt	7	vertebrates, human
Human papillomavirus type 154	NC_021483	7286 nt	7	vertebrates, human
Human papillomavirus type 166	NC_019023	7212 nt	6	vertebrates, human

**表 2 8 种 HPV L1 段氨基酸序列数据**

HPV 病毒	序列号	L1 蛋白质 ID	氨基酸长度(AA)
--------	-----	-----------	-----------

Human papillomavirus type 126	NC_016157	YP 004934018.1	523
Human papillomavirus type 135	NC_017993	YP 006393287.1	515
Human papillomavirus type 136	NC_017994	YP 006393294.1	523
Human papillomavirus type 137	NC_017995	YP 006393301.1	516
Human papillomavirus type 140	NC_017996	YP 006393308.1	528
Human papillomavirus type 144	NC_017997	YP 006393315.1	517
Human papillomavirus type 154	NC_021483	YP 008083737.1	526
Human papillomavirus type 166	NC_019023	YP 006908977.1	506

### 2.1.2 相似 HPV 基因组检索

采用 BLASTP，查询蛋白库中与所研究的 8 种 HPV 的 L1 蛋白高度相似的 HPV，见表 3。在 NCBI 上检索出下列 HPV 的基因组序列。

**表 3 BLAST 得到的同源性 HPV**

HPV 病毒	BLAST 得到的同源的 HPV*							
HPV126	HPV169	140	141	136				
HPV135	HPV146	95	163	65	4	88		
HPV136	HPV141	154	140	126	129	169	116	
HPV137	HPV129	169	141	116	140	126	136	
HPV140	HPV136	169	126	154	129	116	60	
HPV144	HPV163	95	65	4				
HPV154	HPV140	169	126	137	147	128		
HPV166	HPV162	161	48	144	88	135	146	

注:\*相似性在 70%左右且基因组已测序

### 2.1.3 各属代表性 HPV 选择

按照其分类原则，随机选出  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  属中的 HPV（见表 4），利用 NCBI 检索出相应 HPV 的基因组序列。

**表 4  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$  属 HPV**

属	HPV 型												
$\alpha$	HPV2	7	10	13	16	31	32	34	43	45	55	57	
	58	61	68	697	28	2	83	84	94				
$\beta$	HPV5	15	19	23	25	37	47	49	76	80	93	96	
$\gamma$	HPV50	4	48	60	65	88	95	128					

#### 2.1.4 编辑生成 FASTA 文件

将 2.1.1-2.1.3 中检索得到的共 58 种 HPV 的 L1 氨基酸序列用 DNASTar 的 EditSeq 编辑成 FASTA 格式的文件；将 8 种新型 HPV 的 L1 核苷酸序列编辑生成 FASTA 文件。

#### 2.2 构建分子系统进化树

在 Mobyly portal 网页中在线对 2.1.4 生成的含 58 种 HPV L1 氨基酸序列的 FASTA 格式文件进行 ClustalW 多个序列比较，得到一个基于 L1 的系统进化树，用软件 Treeview 查看并编辑这个图形化的进化树结果（见图 1）。

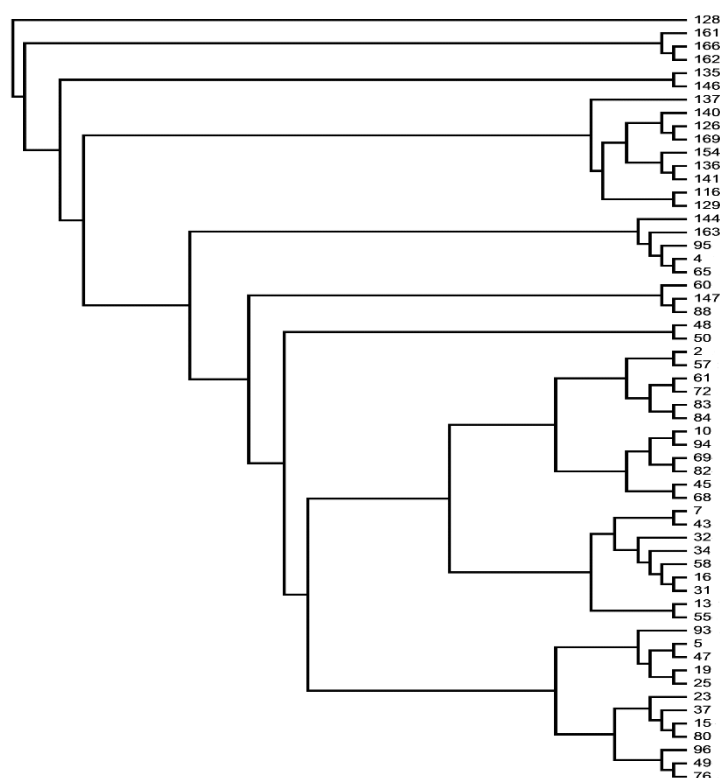


图 1 矩形分支树

#### 2.3 特异型引物设计

所得特异性引物见表五

表 5 8 种 HPV L1 区特异型引物

HPV	Primer	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%
126	Forward primer	ATTGGCACAACAGGTCATCCT	Plus	21	349	369	59.92	47.62
	Reverse primer	ATCCTCAGGGATACTGTCTGC	Minus	20	828	809	58.67	55.00
	Product length	480						
135	Forward primer	AGGCACTTGTCCTCCTATACA	Plus	21	548	568	57.88	47.62
	Reverse primer	TTTGCTGAGCACCATCAGTAGG	Minus	22	870	849	60.62	50.00
	Product length	323						
137	Forward primer	TGGAAGCAGATATCCTGGCAC	Plus	21	1172	1192	59.86	52.38
	Reverse primer	TGGAGGTGTAGCATTGTCAGG	Minus	21	1509	1489	59.54	52.38
	Product length	338						
136	Forward primer	CACACAACCTATTCAGGATGGAGA	Plus	23	574	596	57.91	43.48
	Reverse primer	TGGAGGTGTAGCATTGTCAGG	Minus	21	879	859	59.72	52.38
	Product length	306						
140	Forward primer	GTGCGATATTGGGCTTGGTG	Plus	20	612	631	59.62	55.00
	Reverse primer	CACCGGTGTGTACAGACAAT	Minus	20	1093	1074	57.84	50.00
	Product length	482						
144	Forward primer	TCAGTTCATCTGGTCATCCATTATT	Plus	25	350	374	58.10	36.00
	Reverse primer	GTGCACCAGAGCGATCTTCC	Minus	20	667	648	61.09	60.00
	Product length	318						
154	Forward primer	AATTGACCGTGGTGGTCCTC	Plus	20	318	337	59.96	55.00
	Reverse primer	GGAGCATCGGCTCTACTAGC	Minus	20	665	646	59.76	60.00
	Product length	348						
166	Forward primer	CTGGAGCCTGTCCACCTATTG	Plus	21	548	568	60.13	57.14
	Reverse primer	GAATTCAGTGAGCCACTCGG	Minus	20	908	889	58.64	55.00
	Product length	361						

### 3 讨论

分类对于病毒的研究很重要，种系分类体系的建立和分子学诊断方法有助于发现新型病毒致癌的可能性，有助于 HPV 的鉴定，构建系统发生树能确定各种病毒之间的关系。

乳头瘤病毒的病毒分类经历了从杂交法到种系分类的发展过程，种系分类

更自然、更系统、更准确<sup>[8,9,10]</sup>。本文将 8 种新型 HPV 和  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$  属中的 HPV、Blast 得到的 HPV 共 58 种, 利用生物信息软件 Clustal W 进行分析, 构建分子系统进化树, 显示其均属于  $\gamma$  属,  $\gamma$  属主要侵犯皮肤组织, 引起皮肤疣状病变。临床上最重要是  $\alpha$  属, 该属包括了所有与粘膜和生殖道病变相关的型, 属是同时具有国际病毒委员会 (ICTV) 要求的共同的生理和病理特性的 PV 类型<sup>[7]</sup>。

针对 8 种新型 HPV 碱基序列中特异性区域进行特异型引物设计, 可用于型别的鉴定。L1 ORF 是最保守的基因, 一直被用于鉴别新 PV 类型, 本文选择 L1 编码区进行特异型引物设计。所得引物对病毒的分型、研究具有重要的意义。如能采集到相应足够的标本, 可进一步对所得引物进行验证。

在乳头瘤病毒的分子生物学特性的研究基础上, 根据乳头瘤病毒的分类体系, 目前正在研究预防性和治疗性 HPV 疫苗。HPV 疫苗可诱导机体产生中和抗体, 激发保护性免疫反应, 达到有效预防与癌症相关型 HPV 的传播, 降低宫颈癌的发生率。目前被美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准上市的默克 (Merck) 公司四价疫苗 (Gardasil, 针对 HPV6/11/16/18) 和葛兰素史克 (GSK) 公司二价疫苗 (Cervarix, 针对 HPV16/18) 对于尚未感染 HPV 的女性人群具有很好的预防 HPV16/18 持续感染及相关宫颈上皮内瘤变 II 级及以上病变的效果。此外, 四价疫苗对相关 HPV 引起的生殖器病变(如尖锐湿疣)也有很好的预防作用。但是目前市场上的 HPV 疫苗存在价格高, 难以普及, 持续时间不过长, 不能涵盖所有高危型 HPV 等缺点<sup>[8,9,10]</sup>。所以把研制的疫苗集中在 4-5 种最流行的高危 HPV 类型,用于控制 80%-90%的子宫颈癌是十分重要的<sup>[11]</sup>。本研究在 HPV 疫苗的研发方面有一定的参考价值。

参考文献:

- [1] Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence[J]. Journal of clinical virology, 2000, 19(1): 1-5.



- [2] 阳月娥.716 例妇科宫颈疾病患者 HPV 检测结果分析[J].实用预防医学, 2013,20 (8) : 992-993
- [3] De Villiers E M, Fauquet C, Broker T R, et al. Classification of papillomaviruses[J]. Virology, 2004, 324(1): 17-27.
- [4] Holmes EC. The phylogeography of human viruses[J].Mol Ecol,2004,13(4):745-756.
- [5] 井明霞,陈继明,郭晓青.et al.人类乳头瘤病毒(HPV)的检测方法[J].现代预防医学, 2007, 22:4270- 4271.
- [6] 张友忠.HPV 的检测方法及利弊[J].现代妇产科进展,2011,20(5):339-341.
- [7] Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction[J]. BMC bioinformatics,2012,13(1):134.
- [8] Egawa N,Kawai K,Egawa K,et al. Molecular cloning and characterization of a novel human papillomavirus,HPV 126, isolated from a flat wart-like lesion with intracytoplasmic inclusion bodies and a peculiar distribution of Ki-67 and p53[J]. Virology,2012,422(1):99-104.
- [9] Bottalico D,Chen Z,Dunne A,et al. The oral cavity contains abundant known and novel human papillomaviruses from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera[J]. Journal of Infectious Diseases,2011,204(5):787-792.
- [10] Li J, Cai H, Xu Z, et al. Nine complete genome sequences of cutaneous human papillomavirus genotypes isolated from healthy skin of individuals living in rural he nan province, china[J]. Journal of virology,2012,86(21):11936-11936.
- [11] 洪蝶,陈怀增,谢幸,等.乳头瘤病毒分类进展[J].国外医学.病毒学分册,2005, 6:005.
- [12] Ault K A. Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2,grade 3,and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials[J].The Lancet,2007,369(9576):1861-1868.
- [13] Paavonen J, Naud P, Salmeron J, et al. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women[J].The Lancet,2009,374(9686):301-314.
- [14] Muñoz N, Kjaer S K, Sigurdsson K, et al. Impact of human papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 vaccine on all HPV-associated genital diseases in young women[J].Journal of the National Cancer Institute,2010,102(5):325-339.
- [15] Munoz N, Bosch F X, Castellsagué X, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective[J]. International Journal of Cancer,2004,111(2):278-285.