

截短型人乳头瘤病毒 58 型 L1 蛋白的表达及其体外生物活性研究

李文生^{1,2} 郑 瑾¹ 刘红莉¹ 陈宏伟¹ 杨 军¹ 王一理¹ 司履生^{1*}

¹(西安交通大学生命科学与技术学院癌症研究所 环境与疾病相关基因教育部重点实验室, 西安 710061)

²(西安交通大学陕西临床学院, 西安 710068)

摘 要 利用 PCR 技术克隆截短型 HPV58 L1 基因并重组入杆状病毒表达系统穿梭质粒 pFastBac-Htb, 通过转座反应, 将目的基因片段重组入杆状病毒基因组, 分离重组的 Bacmid DNA, 并转染 Sf-9 昆虫细胞, 收集被转染的 Sf-9 细胞, 提取细胞蛋白, SDS-PAGE 检测可见在大约 58Kda 处出现一新生蛋白条带, Western blot 证实为 HPV58L1 蛋白。用 ProBond™ 纯化系统纯化所表达的蛋白。小鼠红细胞凝集试验证实纯化的蛋白可介导小鼠红细胞凝集, 透射电镜观察证实纯化蛋白可自组装成 VLP。结果表明昆虫杆状病毒表达系统可高效表达截短型 HPV58L1 蛋白, 纯化后的截短型 HPV58 L1 蛋白在体外可自组装 VLP, 并具有介导小鼠红细胞凝集的生物活性。

关键词 截短型 HPV58 L1 蛋白, 昆虫-杆状病毒表达系统, 蛋白纯化, 病毒样颗粒

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)04-0536-04

人乳头状瘤病毒(HPV)是引起人类皮肤黏膜增生性病变的一类 DNA 肿瘤病毒, 高危型 HPV 是人类绝大部分宫颈癌的重要启动因子, 近年来的研究发现高危型 HPV 还可能与人类其它肿瘤有关, 如喉癌、食管癌、口腔癌、鼻窦癌、膀胱癌、肺癌等^[1,2]。因此, 利用疫苗接种对生殖道等高危型 HPV 感染进行一级预防, 以减少其感染, 有可能根除子宫颈癌及其他相关癌肿的发生。然而, 由于 HPV 具有严格的宿主范围和组织特异性, 只能感染和侵袭人的皮肤粘膜, 在人的组织中复制, 而病变中病毒样颗粒含量极微, 为预防和治疗性 HPV 相关的人类肿瘤疫苗的研究带来了巨大的障碍。基因工程技术成为解决这一问题的关键技术, 而 HPV VLP 的成功制备更是 HPV 疫苗研制中的突破性成就。目前在美国, HPV16 的 VLP 已经投入临床 I, II 期试验, 并取得良好结果。在我国, 也有几个实验室包括我们实验室, 已经或正在从事 HPV16 预防性疫苗的研究。然而, HPV 型别极多, 据报道, 已经超过 100 种以上。在我国妇女中 HPV58 型已被证实是继 HPV16 之后的第二个常见的引起宫颈癌的启动因子, 其感染主要分布在江西、浙江、江苏、福建等地, 在国际上排第

2 位的高危型 HPV18 在中国仅排第 3 位^[3]。鉴于高危型 HPV58 在我国妇女中感染的独特性, 我们进行了 HPV58 L1 蛋白的表达, 据报道 HPV L1 蛋白的 C 端截短并不影响其 VLP 组装能力, 而且还能增加表达水平^[4], 我们在实验中使用 Sf-9 昆虫细胞-杆状病毒表达系统, 对 C 端截短型 HPV58 L1 蛋白进行了表达, 并且证实: 所表达的蛋白在体外可自组装成 VLP, 并能诱导小鼠红细胞凝集。

1 材料与方法

1.1 试剂及质粒来源

含有 HPV58 型全基因组质粒由山东大学赵蔚明教授馈赠。克隆载体 PUCMT 购自上海生工生物公司, 工具酶均购自 TaKaRa 公司, Grace 培养液及 BAC-TO-BAC 杆状病毒表达系统购自 Gibco 公司, ready to ready PCR beads 为美国 Life tech 公司产品。ProBond™ 纯化系统为 Invitrogen 公司。穿梭质粒 pFastBac-Htb, DH10Bac 感受态细胞及 Sf-9 昆虫细胞均由本室保存。HPV16L1 单克隆抗体为 Neomarkers 公司产品, 辣根过氧化物酶标记 IgG 购自 DAKO 公司。

1.2 PCR 扩增及克隆测序

用于扩增 HPV58L1 的上下游引物分别为: CAG-GTCGACATG TCCGTGTGGCGGCCTAGTGAG 及 GGAGAGCTCTTACTTTCGTCCCAAAGG AAA CT-GATCTAGATC。因有报告 HPV L1 蛋白羧基末端缺失突变达 34 个氨基酸时不影响 VLP 的形成和生物活性^[4],故本实验设计的下游引物 C-端缺失 33 个氨基酸。用上下游引物及 HPV58 全基因组为模板扩增截短型 HPV58L1 基因。重组入 PUCMT 克隆载体,构建 pUC-T-hpv58L1 质粒,进行测序鉴定。

1.3 重组质粒 pFB-hpv58L1 的构建及重组杆状病毒的获得

以 *Nco*I 及 *Xho*I 双酶切 pUC-T-hpv58L1 质粒,回收截短型 HPV58L1 基因,连接至 pFastBac-Htb 穿梭载体,构建成重组质粒 pFB-hpv58L1。用 pFB-hpv58L1 转化含有杆状病毒基因组 Bacmid 和辅助质粒的 DH10Ba 感受态细胞。涂板后,挑取阳性克隆,37℃ 培养 24h 的以上,按 Gibco 公司产品说明提取重组的 Bacmid DNA。

1.4 细胞培养和转染 Sf9 昆虫细胞

昆虫细胞 Sf9 在含 10% 的优质胎牛血清的 Grace's 培养液中 27℃ 培养。在 6 孔板中接种约 9×10^5 /孔的 Sf-9 细胞,27℃ 培养 1h 以上使完全贴壁,然后进行细胞转染。细胞转染按照 Invitrogen 公司产品说明书进行。

1.5 表达产物 SDS-PAGE 及 Western blot 分析及其蛋白的纯化

取 10 μ L 离心获得的转染细胞加等量上样缓冲液,煮沸 3min,行 12% SDS-PAGE 后,分别行考马斯亮蓝染色和 Western blot 检测。电转完成后,转印膜以 HPV-16 单克隆抗体行免疫化学反应,DAB 显色。利用 ProBond™ 纯化系统对 HPV58 L1 蛋白进行纯化。采用变性和非变性两种条件下对 HPV58 L1 蛋白进行纯化。首先将表达有 HPV58 L1 蛋白的 Sf9 细胞分别悬于适量 6mol/L 盐酸胍(室温放置 4h)和 pH7.2 的磷酸盐缓冲液中(液氮反复冻融 3 次),将含有 HPV58 L1 蛋白的细胞裂解上清与 Ni 柱混合,使 L1 蛋白和 Ni 柱结合,然后用洗涤液洗去未结合和非特异性结合蛋白,最后用洗脱液洗脱 L1 蛋白。具体方法详见 ProBond™ 纯化系统说明书。

1.6 病毒样颗粒电镜观察

10 μ L 非变性条件下纯化蛋白滴至碳膜包被的铜网上,经磷钨酸复染,H-600 透射电镜观察。

1.7 小鼠红细胞凝集试验

取 C57BL/C 小鼠眼球后取血,制成红细胞悬液,取不同稀释度的纯化蛋白 50 μ L 分别加至 96 孔圆底板,再加 50 μ L 红细胞悬液,4℃ 共育 3h 观察。

2 结果

2.1 Hpv58L1 基因克隆及重组质粒 pFB-hpv58L1 的构建

测序结果与 GenBank 比对,共发生 2 处核苷酸变异,6175 A→G,导致氨基酸错义突变 Gln→Arg; 6233 T→C,氨基酸未发生变异,为同义突变。构建的重组质粒 PFB-HPV58L1 经酶切鉴定所插入的 L1 片段大小及方向正确。

2.2 重组杆状病毒的获得及细胞转染结果

以 pFB-hpv58L1 质粒转化 DH10Bac 感受态细胞,经涂板,重复筛选挑取转座成功真正含有外源基因 hpv58L1 的 Bacmid DNA 转染 Sf-9 细胞。27℃ 培养 48h 后被转染细胞变圆,肿大,折光性增强,说明转染成功。收获转染细胞,取细胞裂解上清行 PCR 扩增,琼脂糖电泳在大约 1.4kb 处可见特异性条带,与截短型 L1 基因大小一致。说明转染的细胞中含有重组杆状病毒 AcHPV58L1。

2.3 SDS-PAGE 及 Western blot 分析及 HPV58L1 蛋白的纯化

取适量重组杆状病毒感染昆虫细胞的裂解液行 SDS-PAGE。与对照细胞相比,在大约 58 kD 处出现一新生条带,与截短型 HPV58 L1 蛋白分子量一致。因无法购到 HPV58 单克隆抗体,而 HPV58 L1 与 HPV16 L1 基因序列 64% 同源,两者之间存在交叉反应,故用 HPV16 L1 单克隆抗体作为一抗进行 Western blot,证实该条带可与 HPV16 L1 单克隆抗体发生特异性反应。说明所建立的重组杆状病毒可表达 L1 目的蛋白,而且所表达的 L1 蛋白具有良好的抗原性(图 1,2)。同时用 ProBond™ 纯化系统纯化所表达的蛋白,经光密度扫描仪扫描,可见变性条件下所纯化蛋白纯度为 91.8%,非变性条件下纯化的蛋白纯度为 90.1%。双缩脲法测定变性蛋白浓度为 4.56mg/mL,非变性蛋白浓度为 4.23mg/mL(图 3)。

2.4 小鼠红细胞凝集试验结果

非变性条件下纯化的 HPV58L1 蛋白引起小鼠红细胞凝集,而变性条件下纯化的蛋白及对照组(不含纯化蛋白的蛋白洗脱液)则否(图 4)。

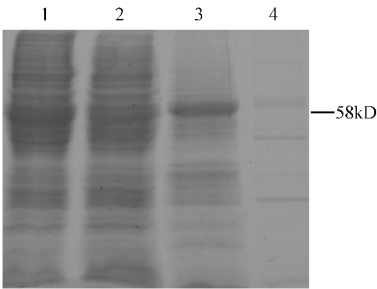


图 1 SDS-PAGE 分析 Hpv 58 L1 蛋白在 Sf-9 细胞中的表达
Fig.1 Expression of truncated Hpv 58L1 proteins in insect cells was analyzed by 12% SDS-PAGE
1: Sf-9 cells, negative control 2: Sf-9 cells, infected with recombinant baculovirus AcHPV58L1, the extra protein band is located at 58kD 3: Marker 97.4/66.2/43.0/31.0/20.1/14.4

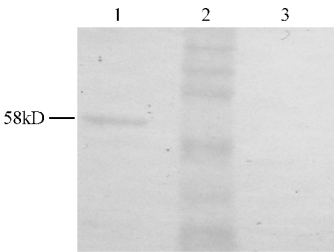


图 2 Western-blot 分析 Hpv58L1 蛋白在 Sf-9 细胞中的表达
Fig.2 Western-blot analysis of truncated Hpv58 L1 proteins, the blotting membrane was incubated with Hpv16L1 McAb
1: Sf-9 cells, infected with recombinant baculovirus AcHPV58L1, positive band is located around 58kD 2: rainbow maker 3: Sf-9 cells, negative control

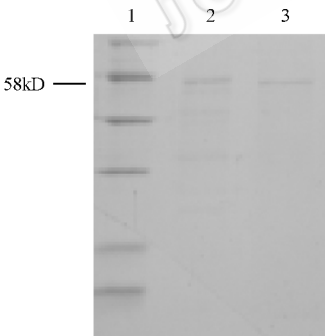


图 3 SDS-PAGE 分析 Hpv58L1 蛋白的纯化结果
Fig.3 Expression of purified truncated Hpv 58L1 proteins was analyzed by 12% SDS-PAGE
1: Marker 97.4/66.2/43.0/31.0/20.1/14.4 2: the purified HPV58L1 protein purified under the native conditions, the purification protein band is located at 58kD 3: the purified HPV58L1 protein purified under the denaturation conditions, the purification protein band is located at 58kD

2.5 电镜观察结果

电镜观察证实,非变性条件下纯化的 L1 蛋白可形成直径约 55nm 的球形空心颗粒,即有 VLP 形成。变性条件下纯化的 L1 蛋白不形成 VLP(图 5)。

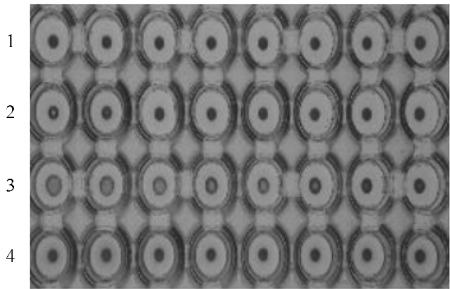


图 4 小鼠红细胞凝集试验分析 Hpv58L1 蛋白的生物学活性
Fig.4 Result of murine hemagglutination assay of the expressed Hpv58L1 protein
1: native elution buffer negative control 2: purified Hpv58L1 protein under native conditions (elute the protein by applying 50 mmol/L Imidazole elution buffers) 3: purified Hpv58L1 protein under native conditions (elute the protein by applying 200 mmol/L Imidazole elution buffers) 4: purified Hpv58L1 protein under denaturalization conditions

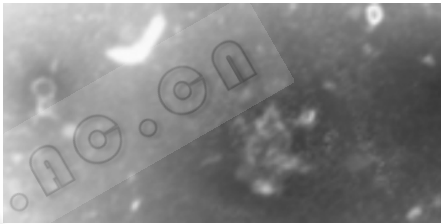


图 5 HPV58 VLP 电镜观察(放大 50000 倍) 见 VLP, 球形空心颗粒,直径 55nm
Fig.5 Electron micrograph of HPV58 VLP(50000 ×), 55nm hollow spherical particles

3 讨论

早在几年前,人们就利用各种真核表达系统成功的制备了 HPV 16VLPs,实验表明 VLPs 可有效激发免疫小鼠产生特异性抗体和 CTL 细胞^[5,6]。我们用基因工程技术表达了 HPV 58L1 蛋白,所表达蛋白可在体外自组装成 VLP,并具有 VLP 的生物学活性,能凝集小鼠红细胞,说明其保留有 VLP 的空间构象。

早在 1991 年 Zhou 等人就通过实验发现 HPV 16L1 蛋白 C-末端 22 个氨基酸存在 2 个核定位序列(NLS),一位位于 525-530,为 KRKKRK;另一个为位于 510-512 位的 KRK 和 525,526 位的 KR。如果这两个 NLS 均发生缺失突变,L1 蛋白将滞留于胞浆中。对其他型别 HPV(HPV18,33,15,57 等)的研究表明:几乎所有的乳头瘤病毒含有相似的 C-末端序列^[7]。Paintsil 等人的研究也表明:牛乳头状瘤病毒 1 型 L1 蛋白的 C-末端对于 BPV VLP 的形成并非必需的,C-末端截短 24 个氨基酸后不影响 VLP 的形成,并且其 VLP 形成效率大大提高,是野生型的 3

倍^[8]。上述的研究表明 :HPV L1 蛋白 C-末端截短一定长度并不影响 VLP 的形成。同时我们室用昆虫杆状病毒表达系统表达嵌合 EGFP-HPV16L1 证明 :VLP 主要定位于 Sf-9 细胞核。因此 ,在不影响 VLP 形成及生物活性的情况下 ,为了使所表达的 L1 蛋白主要定位于胞浆 ,而不进入细胞核 ,从而使得 L1 蛋白纯化变得相对容易 ,我们去掉了 C-末端 33 个氨基酸。实验结果表明 :这种截短并不影响其蛋白的表达 ,而且因为表达的蛋白主要定位于胞浆 ,更易被纯化 ,也不影响其 VLP 自组装及其生物学活性。

另外 ,在实验中我们对以往利用杆状病毒昆虫表达系统表达纯化 L1 蛋白的方法进行了改进。我们使用了带有 6XHis 标签的表达载体 pFastBacHTb ,在所表达蛋白的氨基端带有 6 个组氨酸标签 ,从而可利用 Ni-树脂柱进行纯化。省去了过去在 HPV VLP 制备中所使用氯化铯超速离心步骤 ,相对而言这既省时省力又经济实惠。同时也证明了带有 6 个组氨酸的 L1 蛋白并不影响其 VLP 的组装及生物学活性。

致谢 :山东大学医学院于修平、赵蔚明教授对本实验

提供了帮助 ,特此致谢。

REFERENCES (参考文献)

- [1] McCance DJ. Human papillomaviruses and cervical cancer. *J Med Microbiol* .1998 **47** (5) 371 – 373
- [2] Sanclemente G , Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J Eur Acad DermatolVenereol* , 2002 ,**16**(3) :231 – 240
- [3] LIU BY(刘宝印) ,LI J(李洁) , De Villiers EM *et al* . Corelation between HPV58 infection and cervical cancer in China. *Chinese J Exp Clin Viro*(中华实验和临床病毒学杂志) ,1996 ,**10** :118 – 121
- [4] Müller M ,Zhou J ,Reed TD *et al* . Chimeric papillomavirus-like particles. *Virology* .1997 **234** (1) 93 – 111
- [5] Cann L , Coursaget P , Iochman S. Self-assembly of human papillomavirus type 16capsids by expression of the L1 protein in insect cells. *FEMS Microbiol Lett* ,1994 ,**117** :269 – 274
- [6] Breitburd F ,Kimbauer R ,Hubbert NL , *et al* . Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPVinfection. *J Virol* ,1995 ,**69**(6) : 3959 – 3963
- [7] Zhou J ,Doorbar J ,SUN XY *et al* . Identification of the Nuclear Localization Signalof Human Papillomavirus Type 16L1 Protein. *Virology* , 1991 ,**185** :625 – 632
- [8] Paintsil J , Muller M ,Picken M *et al* . Carboxyl terminus of bovine papillomavirus type-1 L1 protein is not required for capsid formation. *Virology* ,1996 **223**(1) 238 – 244

Carboxyl Terminus Truncated HPV58 Virus L1 Protein Expressed with Baculovirus System and its Bioactivity

LI Wen-Sheng^{1 2} ZHENG Jin¹ LIU Hong-Li¹ CHEN Hong-Wei¹ YANG Jun¹ WANG Yi-Li¹ SI Lü-Sheng^{1*}

¹(Institute for Cancer Research School of Life Science&Technology , Xi 'an Jiaotong University , Xi 'an 710061 , China)

²(Shanxi Hospital of Xi 'an Jiaotong University , Xi 'an 710068 , China)

Abstract To prepare carboxyl terminus truncated human papillomavirus type 58 L1 protein ,and study on its in vitro bioactivity . PCR was used to amplify carboxyl terminus truncated HPV 58L1 gene , the product was inserted into the PUCMT cloning vector , preparing recombinant PFastBacHTb containing carboxyl terminus truncated HPV 58L1 gene . Further more ,the recombinant plasmid PfastbacHTb was used to transform DH10Bac cells ,constructing recombinant Baculovirus ,then the recombinant virus was successfully used to infect Sf-9 insect cells . After incubating at 27℃ for 72 hours ,the infected cells were collected and total cellular proteins were extracted . The target protein with MW 58KD was revealed by SDS-PAGE and confirmed by Western blot .The interested protein was purified by ProBondTM purification system . The purified interested protein was identified to self-assemble into VLPs by Transmission electron microscope , and induce murine erythrocyte hemagglutination ,indicating that the given proteins had the conformation of VLPs ,collecting ,HPV58 L1 proteins with carboxyl terminus truncation could be efficiently expressed in baculovirus Sf-9 cells expression system , it has identical in vitro bioactivity to the wild type HPV58 L1 ,The present study is fundmental for preparing HPV58 L1 prophylactic vaccine .

Key words Hpv58 L1protein of carboxyl terminus truncation , baculovirus expression system , protein purification , virus-like particles

Received : 12-29-2003

This work was supported by the National Natural Scence Foundation of China(No.30271184) .

* Corresponding author . Tel 86-29-82655191 ; Fax : 86-29-82655499 ; E-mail : slsheng @ yahoo . com

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>