

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)。

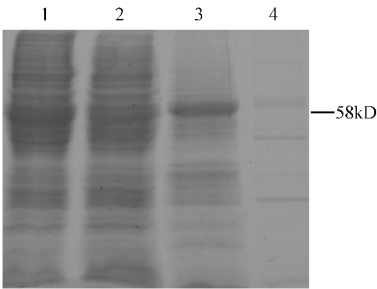


图 1 SDS-PAGE 分析 Hpv 58 L1 蛋白在 Sf-9 细胞中的表达
Fig.1 Expression of truncated Hpv 58L1 proteins in insect cells was analyzed by 12% SDS-PAGE
1: Sf-9 cells , negative control 3 :Sf-9 cells , infected with recombinant baculovirus AcHPV58L1 ,the extra protein band is located at 58kD 4 : Marker 97.4/66.2/43.0/31.0/20.1/14.4

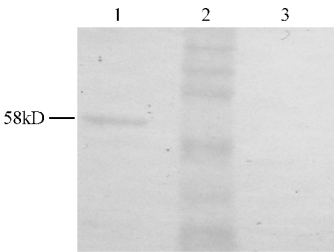


图 2 Western-blot 分析 Hpv58L1 蛋白在 Sf-9 细胞中的表达
Fig.2 Western-blot analysis of truncated Hpv58 L1 proteins , the blotting membrane was incubated with Hpv16L1 McAb
1 :Sf-9 cells , infected with recombinant baculovirus AcHPV58L1 ,positive band is located around 58kD 2 :rainbow maker 3 :Sf-9 cells ,negative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

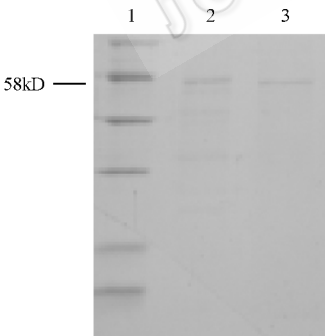


图 3 SDS-PAGE 分析 Hpv58L1 蛋白的纯化结果
Fig.3 Expression of purified truncated Hpv 58L1 proteins was analyzed by 12% SDS-PAGE
1 :Marker 97.4/66.2/43.0/31.0/20.1/14.4 2 :the purified HPV58L1 protein purified under the native conditions , the purification protein band is located at 58kD 3 :the purified HPV58L1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

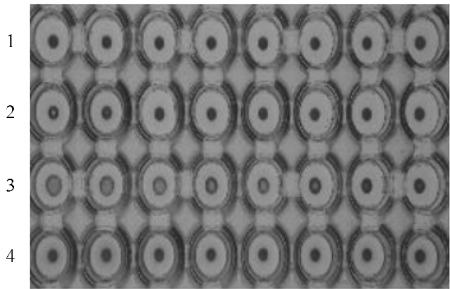


图 4 小鼠红细胞凝集试验分析 Hpv58L1 蛋白的生物学活性
Fig.4 Result of murine hemagglutination assay of the expressed Hpv58L1 protein
1 :native elution buffer negative control 2 :purified Hpv58L1 protein under native conditions (elute the protein by applying 50 mmol/L Imidazole elution buffers) 3 :purified Hpv58L1 protein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

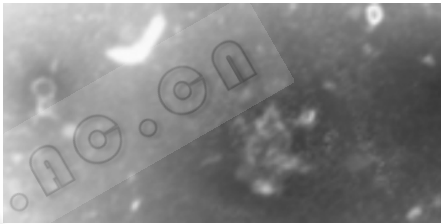


图 5 HPV58 VLP 电镜观察(放大 50000 倍) 见 VLP ,球形空心颗粒 ,直径 55nm
Fig.5 Electron micrograph of HPV58 VLP(50000 ×) , 55nm hollow spherical particles

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 Lǚ-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