

HPV-16L1 植物表达载体的构建及 HPV-16L1 在转基因烟草中表达的鉴定

刘红莉¹ 陈宏伟¹ 李文生¹ 雷 霆¹ 王喆之² 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(陕西师范大学生命科学院,西安 710062)

摘 要 利用 PCR 技术克隆人乳头瘤病毒 HPV-16 L1 蛋白编码基因,将其重组于 pUCmT 和 pBI121 中,构建含 HPV-16L1 基因的植物双元表达载体 pBI-L1, L1 基因由 CaMV 35S 启动子控制表达。采用叶盘共培育法经根瘤农杆菌介导转化烟草(*Nicotiana tabacum* L.),获得 HPV-16L1 转基因烟草植株。经 PCR 及 Southern 杂交分析, HPV-16L1 基因整合到烟草基因组中;Western blot 和 ELISA 分析检测显示转基因烟草叶片蛋白可与 HPV-16 L1 单克隆抗体特异性反应,且定位于 55kD 处,其最高表达量占烟草叶片总可溶蛋白的 0.076%。小鼠红细胞凝集试验(HA)及小鼠红细胞凝集抑制试验(HAI)显示转基因烟草叶片蛋白可引起小鼠红细胞凝集。结果表明已成功构建了 HPV-16L1 的植物双元表达载体,并证实了利用转基因烟草植物能够表达出 HPV-16L1 蛋白,所表达的 L1 蛋白具有良好的抗原性并具有介导小鼠红细胞凝集的生物活性。

关键词 人乳头瘤病毒,病毒样颗粒,转基因烟草,植物疫苗,根瘤农杆菌

中图分类号 R378.2;R394.33 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0827-05

近年来,人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)感染呈明显增多趋势。高危型 HPV,尤其是 HPV-16 作为子宫颈癌主要病因之一已得到普遍公认,因此研制 HPV 预防性疫苗和治疗性疫苗成为这一领域的热点^[1,2]。利用酵母、细菌或昆虫-杆状病毒表达产生的 HPV-16 L1 蛋白,可在体外组装成病毒样颗粒(VLPs),并诱发接种宿主的保护性体液免疫反应^[3,4]。但用这些传统的表达系统生产 HPV 亚单位疫苗,技术复杂且造价昂贵,不适用于作预防性疫苗,尤其在发展中国家。所以人们一直在尝试发展新的廉价的表达系统作为疫苗的来源。转基因植物已被公认是制备各种基因工程蛋白的最价廉、最方便的生物反应器。本研究利用转基因植物作为生物反应器的优点,将 HPV-16 L1 基因构建于植物表达载体,通过根瘤农杆菌介导的转化方法将其转入烟草组织,获得表达 HPV-16 L1 蛋白的转基因烟草植株,向开发廉价的可食用 HPV-16L1 植物疫苗迈出了重要的一步。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株:根瘤农杆菌 LBA4404 由杨陵农

业科技大学赠;质粒 pGEM-HPV16 含 HPV-16L1 基因、大肠杆菌菌株 DH5 α 、TOP10、双元载体 pBI121 由本室保存;测序载体 pUCmT(北京生工生物技术公司)。

1.1.2 主要试剂:各种工具酶购自 TaKaRa 和 Promega 公司;PCRbeads 购自 Amersham Pharmacia 公司;PAGE 电泳试剂及 PVDF 膜均为 AMRESCO 和 Sigma 产品;头孢霉素、卡那霉素、乙酰丁香酮(AS)和植物激素 6-BA、NAA 购自鼎国生物技术公司。HPV-16 L1 单克隆抗体为 Neomarkers 公司产品;辣根过氧化物酶(HRP)标记的小鼠二抗为 DAKO 公司产品。地高辛标记及检测试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司。

1.1.3 培养基:LB、YEB 培养基及 MS 培养基按参考文献方法配制^[5,6]。浸染培养液:MS₀ + AS (400 μ mol/L), AS 在浸染前加入。共培养基:MS + 6-BA(1mg/L) + NAA(0.1 mg/L) + AS(400 μ mol/L)。选择培养基:MS + 6-BA(1mg/L) + NAA(0.1 mg/L) + Kanamycin(100 mg/L) + 头孢霉素(200 mg/L)。

1.1.4 植物材料:试验用烟草(*Nicotiana tabacum* L. *Cultivar Xanthi*)无菌苗由王喆之教授提供。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 HPV-16L1 基因:根据 GenBank 的

收稿日期:2004-04-13,修回日期:2004-08-16。

基金项目:国家自然科学基金资助(No. 30070848)。

* 通讯作者。 Tel: 86-29-82655191; Fax: 86-29-82655499; E-mail: slusheng@yahoo.com

HPV-16 基因序列,设计 L1 基因上下游引物,并在上、下游引物中分别引入 *Xba* I、*Sma* I 酶切位点。L1 上游引物自 L1 起始密码子 ATG(5637nt)起始:5'-GAC TCT AGA ATG TCT CTT TGG CTG CCT-3',下游引物:5'-CCA CCC GGG TTA CAG CTT ACG TTT TTT G-3'(引物由北京赛百盛生物技术公司合成)。以 pGEM-HPV16L1 为模板 PCR 扩增 L1 编码基因,扩增条件:95℃变性 5min;94℃30s,55℃30s,72℃90s,34 个循环;72℃延伸 10min。

1.2.2 构建 HPV-16L1 重组植物表达载体:PCR 产物回收后,连接于测序载体 pUCmT,转化 DH5 α ,扩增后提取质粒,分别用 *Xba* I、*Sma* I 酶切鉴定,证实为重组体 pUC-L1 后,测序。重组 pUC-L1 及植物载体 pBI121 分别用 *Xba* I/*Sma* I 双酶切,将 HPV-16L1 目的基因定向重组于植物载体构成 pBI-L1,提取质粒,酶切鉴定,测序证实。

1.2.3 重组植物表达载体 pBI-L1 转入根瘤农杆菌:重组植物表达载体 pBI-L1,用电穿孔法导入根瘤农杆菌 LBA4404 感受态细胞,涂于含链霉素(100 mg/L)及卡那霉素(50mg/L)的 YEB 选择培养基,对阳性菌落经 PCR 及酶切鉴定后用于植物转化。

1.2.4 烟草转化:参照 Horsch 等的方法^[5],采用叶盘共培养法进行烟草的遗传转化。将切割的烟草叶片预培养 2d 后,置于含有重组质粒的根瘤农杆菌 LBA4404/pBI-L1($OD_{600nm} = 0.3 \sim 0.4$)浸染液中浸泡 2~5min,于共培养基上暗培养 3~4d。同时设空根瘤农杆菌 LBA4404 浸染对照及未浸染对照。将上述共培养叶片转移至选择培养基上,每日光照 16h,光照强度 4000lx,25℃培养。当愈伤组织长出新芽时,切下小芽转入新的选择培养基,待其长至 4cm 时,转入含卡那霉素(100 mg/L)及头孢霉素(200 mg/L)的 MS 培养基。每隔 2 周左右换一次培养基,筛选出生根苗。幼芽长至 8~10cm 时,移栽于土壤。

1.2.5 转基因烟草的 PCR 检测:取 200mg 新鲜叶片,低温冷冻干燥后研磨成粉末,用 CTAB 法提取总 DNA,干燥后溶于 100 μ L TE 中。取 1 μ L 总 DNA,用 HPV-16L1 上下游引物,按前述方法进行 PCR 扩增。

1.2.6 转基因烟草的 Southern blot 分析:按照 1.2.5 方法提取 PCR 阳性植株总 DNA,用 *Xba* I/*Sma* I 双酶切,同时设未转化植株 DNA 的阴性对照和 DNA 标准 Marker。0.8% 琼脂糖电泳,电泳后转膜、预杂交及与地高辛标记 HPV-16L1 探针杂交,行免疫化学反应及 NBT-BCIP 显色。地高辛探针标记及杂交

方法按试剂盒说明及参考文献进行^[11]。

1.2.7 转基因烟草的 Western blot 分析:取转基因烟草植株和阴性对照植株叶片,按 1:2(W/V)加入蛋白提取液^[5,7],于冰浴中迅速研磨后,4℃,12000 r/min 离心 20min。将上清液低温冷冻干燥,重新溶于 1/10 体积水中。取此浓缩样品 20 μ L,加等体积上样缓冲液,行 SDS-PAGE,电转印至 PVDF 膜,依次加入 HPV-16 L1 单克隆抗体、HRP 标记的小鼠二抗 IgG,最后用 DAB 显色。

1.2.8 转基因烟草中 L1 蛋白的 ELISA 检测:将上述蛋白提取液用双缩脲法行总蛋白定量后,取 50 μ L 加 50 μ L 碳酸盐缓冲液(pH9.6)包被酶标板,同时对 L1 标准蛋白进行梯度稀释包被酶联板;用 5%脱脂奶封闭后,依次与 HPV-16 L1 单克隆抗体、HRP 标记的兔抗鼠 IgG 共育,最后用 TMB 显色,用酶标仪于 450nm 波长读 OD 值。

1.2.9 小鼠红细胞凝集试验(HA):C57BL/6 小鼠眼球后取血,肝素钠抗凝,0.1% BSA PBS 洗涤细胞 5 次后,按 1:100 体积比制成指示细胞悬液;取 Western blot 结果为阳性的新鲜烟草叶片蛋白提取液 100 μ L,加入 96 孔圆底板中进行倍比稀释,再加入 100 μ L 指示细胞悬液,4℃共育 3h。以纯化的昆虫-杆状病毒表达的 HPV-16VLP 蛋白及未转化烟草叶片蛋白为阳性及阴性对照,观察结果。

1.2.10 小鼠红细胞凝集抑制试验(HAI):根据小鼠红细胞凝集试验选取最佳烟草叶片蛋白浓度,将其与 4 μ L HPV-16 L1 单克隆抗体预先室温中和 1h,然后与等体积小鼠红细胞悬液混匀,4℃共育 3h,以未转化烟草叶片蛋白为阴性对照,照相记录实验结果。

2 结果

2.1 植物表达载体的构建

以 pGEM-HPV16L1 为模板经 PCR 扩增出 HPV-16L1(5637-7154nt)基因,片段长约为 1500bp,将该片段重组于测序载体 pUCmT 形成 pUC-L1,经酶切鉴定片段大小与预期相符,测序证实 L1 基因无突变及移码。定向重组所获得的植物表达重组子 pBI-L1,亦经 PCR 及酶切鉴定无误,并进一步测序确证。该植物表达载体含有卡那霉素抗性基因 *npt* II、CaMV35S 启动子、左右两侧 25bp 边界序列(图 1)。

将重组植物表达载体 pBI-L1 用电穿孔法转入根瘤农杆菌 LBA4404 后,PCR 可扩增到 HPV-16L1 基因片段,证实 pBI-L1 已经导入根瘤农杆菌中,与根瘤农杆菌中的 Ti 质粒共同构成植物表达双元载体。

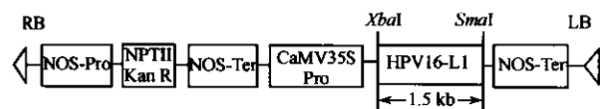


图 1 pBI-L1 植物双元表达载体结构模式图

Fig.1 Structure of the T-DNA region of pBI-L1 binary vector
RB and LB, the right and left borders. NPTII, to confer kanamycin resistance to plants. CaMV 35S, Cauliflower mosaic virus 35S promoter. HPV16-L1, HPV16-L1 cDNA gene

2.2 HPV-16L1 在转化烟草中整合的分析

用含有 pBI-L1 的根瘤农杆菌浸染烟草叶片,经 3~4 周的选择培养,从叶片周围的愈伤组织分化出不定芽。而用空根瘤农杆菌 LBA4404 浸染及未浸染对照叶片未见有愈伤组织形成及分化。经过生根培养得到生根苗,提取其基因组 DNA,行 PCR,证实 25 株转化苗可扩增出 1500bp 片段,与 L1 基因大小一致。对 PCR 阳性转化苗的总 DNA 用 *Xba* I / *Sma* I 酶切,进行 Southern 杂交分析,结果显示 L1 基因已整合到转基因烟草基因组中(图 2)。

2.3 转基因烟草表达 L1 蛋白的检测

将浓缩的蛋白提取液用 HPV-16 L1 单克隆抗体进行 Western blot 检测,结果显示部分浓缩蛋白可与 HPV-16 L1 单克隆抗体特异性反应,且定位于 55kD 处。说明 HPV-16L1 蛋白已在转基因烟草中表达,且所表达的 L1 蛋白具有良好的抗原性(图 3)。经 ELISA 测定证实,不同转基因烟草植株中 L1 蛋白的表达量分别占烟草叶片总可溶性蛋白(total soluble protein, TSP)的 0.034% ~ 0.076%。

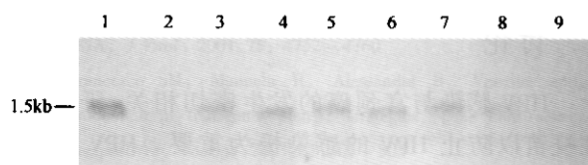


图 2 HPV16-L1 转基因烟草的 Southern blot 分析

Fig.2 Southern blot analysis of HPV16-L1 transformed plants

1: positive control pBI-L1(digested with *Xba* I / *Sma* I);
2: genomic DNA of untransformed tobacco plant;
3~9: genomic DNA of transformed tobacco plants
(digested with *Xba* I / *Sma* I)

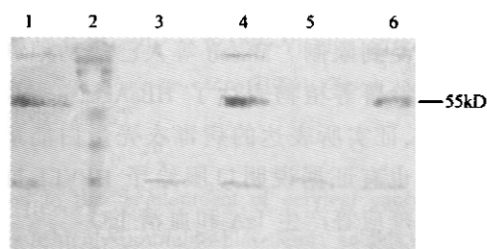


图 3 转基因烟草的 Western blot 分析

Fig.3 Western blot analysis of transformed plants HPV16-L1 proteins

1,4,6: protein of transformed plants leaf tissue
2: protein marker (RPN800 Marker, red 160 kD, green 105 kD, yellow 75 kD, purple 50 kD, blue 35 kD, orange 30 kD);
3,5: protein of untransformed plants leaf tissues

2.4 小鼠红细胞凝集试验及凝集抑制试验

HA 试验显示转基因烟草叶片蛋白可引起小鼠红细胞凝集,而未转化烟草叶片蛋白不能引起小鼠红细胞凝集。HAI 试验表明,转基因烟草叶片蛋白可与 HPV16L1 单克隆抗体特异性结合,抑制小鼠红细胞凝集,而未转化烟草叶片蛋白则不能抑制小鼠红细胞凝集(图 4)。

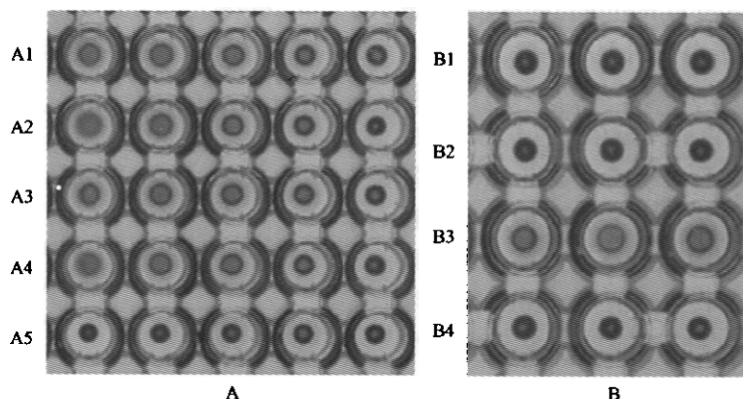


图 4 小鼠红细胞凝集试验(HA)及凝集抑制试验(HAI)

Fig.4 Hemagglutination assay(A)and Hemagglutination inhibition assay(B)

A1: HPV-16 VLP positive control; A2-A4: protein of transformed plants leaf tissue; A5, protein of untransformed plants leaf tissue. B1, B2: protein of transformed plants leaf tissue; B3: protein of untransformed plants leaf tissue; B4: HPV-16 VLP positive control

3 讨论

HPV 感染与宫颈癌的发生密切相关,研制预防性疫苗以防止 HPV 的感染极为重要。HPV 预防性疫苗的主要策略是基于 L1 蛋白自组装或是 L1、L2 蛋白共同组装成 VLP 设计的蛋白疫苗^[3,4]。已证实,这种疫苗在动物模型上能诱发持久的保护性免疫反应,从而阻断病毒入侵宿主细胞^[8,9]。其中 L1VLP 疫苗已进入临床试验,不久将获得生产许可^[1]。但是这种疫苗的生产和运送费用极高,也许会使其应用受到限制。Mason 等人已成功利用烟草、番茄、马铃薯等植物表达了 HBsAg、Norwalk virus 等抗原成分,证实所表达的病毒衣壳蛋白能组装成 VLPs。同时也有证据说明口服给予 HPV L1 抗原可诱导黏膜免疫应答产生 IgA 和血清 IgG^[7,10,11]。王静等^[12]使用黏膜免疫佐剂 LT-B 与 HPV-16VLP 免疫小鼠,已经证明 LT-B 可明显增强阴道黏膜的抗 HPV-16L1 免疫反应。因此,利用 L1 转基因植物作为生物反应器生产 HPV VLP 疫苗或可食用性疫苗是一个最有希望的途径。

我们所构建的 HPV-16L1 植物表达载体,具有完整的植物表达调控元件,如组成型启动子 CaMV35、含有植物筛选标志及左右边界序列,可与农杆菌中的 Ti 辅助质粒构成植物双元表达载体。实验中得到了 25 株含有目的基因的烟草植株,说明我们构建的植物双元表达载体适用于根瘤农杆菌介导的植物转化,也为进一步将其转化入其它植物奠定了基础。

用 Western blot 分析 L1 蛋白在转基因烟草中的表达时,浓缩的样品显示有特异性蛋白表达,表达蛋白位于 55 kD 处,与 L1 蛋白预期大小一致。经验证明 HPV VLP 可引起小鼠红细胞凝集^[13],其阳性结果完全取决于 HPV VLP 蛋白的构象依赖性抗原表位,因此,小鼠红细胞凝集试验已经成为鉴定 HPV L1 蛋白生物活性的实验室标准技术。使用小鼠 HA 和 HAI 试验证明所获得的转基因烟草蛋白可引起小鼠红细胞凝集,说明烟草植物表达的 HPV16L1 蛋白可能具有与 HPV16VLP 蛋白的同样的构象和生物活性。

外源蛋白在植物中的表达水平大多占总可溶蛋白 0.01% ~ 0.4% 之间^[14]。我们的测定显示转基因烟草植株中 L1 蛋白含量最高可达 0.076% TSP。据 Gerber 等人报道,用 0.3 μg 的 HPV-16VLPs 免疫小鼠就能引起强烈的系统免疫应答^[15]。据推测,仅食用

几百毫克的 HPV-16L1 转基因植物,就可以预防 HPV-16 的感染。可以想象,转基因 HPV16 预防性植物疫苗将为全世界广大人民带来福音。为进一步提高 L1 蛋白的表达量,还可以采取一些提高外源基因在植物中表达的技术策略,如优化抗原编码序列、采用调控序列或信号、靶向于组织或细胞表达等措施^[16]。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Lehtinen M, Malm C, Apter D *et al.* Preventive vaccines against papillomavirus and cervix cancer will soon enter clinical practice. *Lakartidningen*, 2003, 100(43): 3408 - 3412
- [2] Osen W, Jochmus I, Muller M *et al.* Immunization against human papillomavirus infection and associated neoplasia. *J Clin Virol*, 2000, 19(1-2): 75 - 78
- [3] De Bruijn ML, Greenstone HL, Vermeulen H *et al.* L1-specific protection from tumor challenge elicited by HPV16 virus-like particles. *Virology*, 1998, 250(2): 371 - 376
- [4] Schiller JT, Lowy DR. Papillomavirus-like particle vaccines. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2001, 15(28): 50 - 54
- [5] WANG GL(王关林), FANG HJ(方宏筠). Principle and methods of plant biotechnology (植物基因工程原理和方法). Beijing: Science Press, 1998, pp. 464 - 446
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [7] Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(24): 11745 - 11749
- [8] Rocha-Zavaleta L, Alejandro JE, Garcia-Carranca A. Parenteral and oral immunization with a plasmid DNA expressing the human papillomavirus 16-L1 gene induces systemic and mucosal antibodies and cytotoxic T lymphocyte responses. *J Med Virol*, 2002, 66(1): 86 - 95
- [9] Sun X, Si L, Cao Z *et al.* Immune response to plasmid DNA encoding HPV16-L1 protein. *Chin Med J (Engl)*, 2000, 113(3): 277 - 280
- [10] Mason HS, Warzecha H, Mor T *et al.* Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends Mol Med*, 2002, 8(7): 324 - 329
- [11] Mason HS, Ball JM, Shi JJ *et al.* Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(11): 5335 - 5340
- [12] Wang J(王静), Li LL(李琳琳), Zheng J(郑瑾) *et al.* High efficient expression, purification of recombinant LTB protein and its activity of mucosal immunoadjuvant by nasal immunization. *Chin Med J (中华医学杂志)*, 2003, 116(7): 1115 - 1117
- [13] Roden RB, Hubbert NL, Kimbaurer R *et al.* Papillomavirus L1 capsids agglutinate mouse erythrocytes through a proteinaceous receptor. *J Virol*, 1995, 69(8): 5147 - 5151

- [14] Koprowski H, Yusibov V. The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine*, 2001, 19 (17 - 19): 2735 - 2741
- [15] Gerber S, Lane C, Brown DM *et al.* Human papillomavirus virus-like particles are efficient oral immunogens when co-administered with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin mutant R192G or CpG DNA. *J Virol*, 2001, 75: 4752 - 4760
- [16] Francesco SM, Manuela R, Alessandra B. Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine*, 2003, 21: 803 - 805

Construction of HPV-16L1 Plant Expression Vector and Expression L1 Protein in Transgenic Tobacco Plants

LIU Hong-Li¹ CHENG Hong-Wei¹ LI Wen-Sheng¹ LEI Ting¹ WANG Zhe-Zhi² 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 Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract Infectious with the Human papillomavirus (HPV) are related to the development of cervical cancer. It's very important to develop of an HPV prophylactic vaccine. Transgenic plants is a highly-profitable bioreactor, in this experiment, it was planning to establish HPV16-L1 transgenic plants, producing large amount of HPV16-L1 L1 major capsid protein. The HPV16-L1 coding sequence was amplified by PCR with specific primers and plasmid pEGM- HPV16 used as a template, subcloned into middle vector pUCmT and binary vector pBI121 to obtain plant expression vector pBI-L1. On the T-DNA regions of the pBI-L1 binary vector contained constitutive Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter, nopaline synthase terminator, and neomycin phosphotransferase *npt II* gene, which allows the selection of transformed plants against kanamycin. The tobacco (*Nicotiana tabacum* L. *Cultivar Xanthi*) plants were transformed by co-cultivating leaf discs method via *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 harboring the plant expression vector. The regenerated transgenic tobacco plants were selected by kanamycin, and confirmed by PCR, Southern blot and Western blot. PCR and Southern blot analyses confirmed stable integration of the HPV16-L1 gene into the transformed tobacco plants genome. Western blot verified the expressed protein of interest being reactive with the antibody against HPV16-L1, showed that the protein was about 55 kD, consistent with the of HPV16-L1 protein, implying that the given protein was HPV16-L1. The levels of L1 expression were up to 0.076 % of total soluble tobacco leaf protein by ELISA assay. Expressed protein of transgenic tobacco plants was analyzed by mouse erythrocyte hemagglutination assay (HA) and hemagglutination inhibition assay (HAI), which had the same bio-activity as the natural HPV-16L1 protein, causing murine erythrocyte agglutination and forming VLP by self-assemble in vitro. These results indicate clearly that transgenic HPV16-L1 tobacco plants were generated, and HPV16-L1 protein was expressed effectively in transgenic tobacco plants. This result is an important step close to developing an edible vaccine, which will contribute to the prevention of HPV 16 infectious.

Key words Human papillomavirus, virus-like particles, transgenic tobacco, plant vaccine, *Agrobacterium tumefaciens*, L1 major capsid protein

Received: 04-13-2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30070848).

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