维普资讯 http://www.cqvip.com

人乳头瘤病毒16型E_7开放读码框编码免疫反应表位的定位

于修平 Steve A. Jenison

（山东医科大学微生物教研室，济南 250012） （西亚图 Fred Hutchinson 肿瘤研究中心，美国 98104）

提 要

用核酸外切酶Ⅲ和 S1 核酸酶，逐步缺失能在原核细胞中有效表达人乳瘤病毒16型E_7开放读码框的质粒 P16E_7NP1，获得了一系列DNA逐渐缩短的质粒。它们能在大肠杆菌中表达产生一组从羧基端往氨基端逐步减少的融合蛋白，用 Western blot 方法检测相应融合蛋白与阳性血清的免疫反应。分析实验结果，编码免疫反应表位的核酸序列于619至644之间。

关键词： 人乳头瘤病毒16型 E_7开放读码框 表位

3

人乳头瘤病毒(Human Papillomoavirus, HPV)是乳多泡病毒科的双链DNA病毒，它可引起多种上皮细胞乳头瘤样病变。在已鉴定的50多个型别中，与宫颈癌病因最相关的是HPV16[1][2]。近年来，HPV分子生物学研究进展较快，重要型别的HPV基因的全序列都已清楚，已知编码所有病毒蛋白的开放读码框（Open Reading Frame, ORF）都在病毒的同一条DNA链上，编码早期蛋白的ORFs有八个（E_1-E_8）[3]。根据发现与HPV感染有关的宫颈癌细胞中存在着主要的E_7编码的mRNA[4]，Seedof等人提出HPV 16E_7在人细胞的恶性转化中起主要作用[5]。体外的转化实验也进一步支持这一观点[6][7]。鉴于HPV16 E_7的重要作用，增加了人们对其深入研究的兴趣。

HPV16全基因共有7905对核苷酸，E_7ORF是从544到855[8]。Firzlaff等人研制的克隆P16E_7NP1（562—872）表达产生的融合蛋白，能与感染HPV16的某些患者血清（CDS_1）呈阳性免疫反应[9]。我们用其重组质粒，采取DNA序列分析中应用外切酶Ⅲ单方向消化核酸链的原理和方法[10]，制备了一系列DNA逐渐缩短的质粒。用其表达后产生的不同大小的融合蛋白，与CDS_2反应，进而分析确定编码免疫反应表位(epitope)的部位。

材料与方法

一、表达HPV16E_7ORF的克隆： 由Firzlaff提供的p16E_7NP1以及本实验中新制备的克隆p16E_7SP1、p16E_7PP1、p16$E_7$$SP_2$和p16$E_7$$SEX_{6-3}$，均是选择适当的限制性内切酶切割质粒pHP-

本文于1989年5月24日收到

维普资讯 http://www.cqvip.com

V16(pBR_{322}插入完整的HPV16基因)，获得插入基因片段。载体是质粒pATH系列，带有色氨酸启动子[9]。插入基因与pATH连接后，转化大肠杆菌HB101。转化菌在无色氨酸的M_9培养基中，加入3'吲哚乙酸，在30℃培养5小时，可诱生含有插入基因表达产物的融合蛋白[11]。

二、制备一系列含HPV16 E_7 ORF核酸链逐步缩短的质粒：根据外切酶Ⅲ和S1核酸酶能单方向从3'—5'逐步缺失核酸链的原理[12]，具体采用Henikoff的改良方法和步骤[10]。首先用内切酶Nco I (863)和Pst I (875)消化p16E_7NP1，得到线形DNA。然后加入外切酶Ⅲ，置25℃水浴中，每隔30秒取出一份，移至含有S1核酸酶的管中。经消化后的DNA加Klenow多聚酶和dNTP使呈平端，再加T_4 DNA连接酶行平端连接，即得到一系列核酸链逐步缩短的质粒。

三、用Western blot方法检测一系列质粒表达的融合蛋白与CDS_2的免疫反应：将上述一系列质粒转化大肠杆菌HB101，诱导产生不同分子量的融合蛋白，然后作SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)，将电泳后的多肽转移至硝酸纤维膜上，与CDS_2反应。最后加入^{125}I标记的SPA，放射自显影显示反应结果。

四、选择对确定表位有意义的数个质粒作序列测定：根据Sanger的酶促法，具体采用Fahnestock的方法步骤[13]，测定DNA序列。

结　　果

用Nco I和Pst I消化质粒p16E_7NP1(图1)，在Pst I的切点，恰好产生四个碱

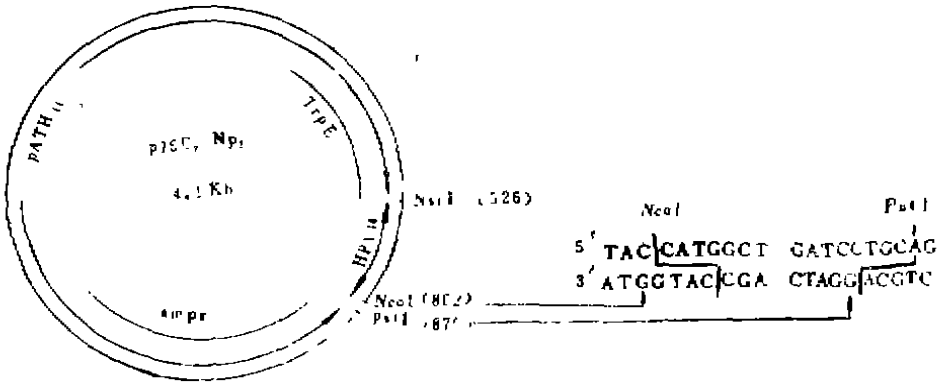

图1. 质粒p16E_7NP1物理图

Fig. 1. Physical map of P16E_7NP1.

基突出的3'末端，它能对抗核酶外切酶Ⅲ的消化；在NcoI的切点处，产生缺少四个碱基的3'末端，它对核酸外切酶Ⅲ是敏感的。外切酶Ⅲ从NcoI切口处逐步消化3'末端缺少碱基的一条核酸链，继而S1核酸酶消化另一条核酸链，从而得到一系列大小不同的质粒(图2)。

上述质粒诱生的蛋白，与CDS_2反应，结果显示1—6号质粒为阳性，7—22号均为阴性。再分别从6、7号质粒转化的HB101菌的培养皿中各取四个菌落，分别定为Ex6-1、6—2、6—3、6—4和Ex7-1、7—2、7—3、7—4。根据其诱生蛋白的大小及与CDS_2反应的结果，选择Ex6-1、6—3、7—1和7—3，测定DNA序列，其含HPV16DNA序列的末端分别为723、644、619和615。

维普资讯 http://www.cqvip.com

图 2. 核酸链缺失法获得的一系列质粒，0.7%琼脂凝胶电泳图。
（1、25是核酸分子量标记：λ/HindⅢ；2，24是外切酶Ⅲ消化前的质粒；3……23是消化后每隔30秒依次取出的质粒）

Fig. 2. ExoIII-deleted plasmid DNA electrophoresis through a 0.7% agarose gel.
(1, 25: λ/HidⅢ; 2, 24: DNA of pre-digested plasmid; 3……23: digested DNA, from reaction at 30 seconds interval.)

应用限制性内切酶消化及核酸链缺失法获得的一系列质粒，根据酶切位点和DNA序列测定得知各质粒的结构（表1）。

表 1. 表达 HPV16E_7 多肽的质粒结构
(Table 1. The constructs of expression HPV E7 ORF Plasmid)

表达结构	酶切位点	pATH 载体（插入部位）
p16E_7NP1	NsiI(526)—PstI(875)	$pATH_{11}$(PstI—PstI)
p16E_7SP1	Sau3AI(622)—PstI(875)	$pATH_{16}$(BamHI—PstI)
p16E_7PP1	PvuⅡ(683)—PstI(875)	$pATH_{11}$(SmaI—PstI)
p16E_7SP2	Sau3AI(622)—PvuⅡ(683)	$pATH_{16}$(BamHI—SmaI)
p16E_7Ex6-1	NsiI(526)—723	$pATH_{11}$(PstI—PstI)
Ex6-3	NsiI(526)—644	$pATH_{11}$(PstI—PstI)
Ex7-1	NsiI(526)—619	$pATH_{11}$(PstI—PstI)
Ex7-3	NsiI(526)—615	$pATH_{11}$(PstI—PstI)
*p16E_7SEx6-3	Sau4AI(622)—644	$pATH_{16}$(BamHI—PstI)

* The insertion of this plasmid was made by Sau3AI and Pst I digestion of p16E7Ex6-3.

该质粒是用 Sau3A I 和 Pst I 切割 p16E_7Ex6-3 获得插入基因，连接 pAT_{16}。

表1中所列的质粒诱生蛋白后，作SDS-PAGE电泳，结果如图3。Western blot实验结果如图4。从图4可以明显看出：p16E_7NP1、SP1、SP2、Ex6-1，Ex6-3和SEx6-3均为阳性；p16E_7PP1、Ex7-1、Ex7-3和pATH均为阴性。

为便于分析确定编码表位的基因部位，图示上述质粒的大小及Western blot反应结果（图5）

维普资讯 http://www.cqvip.com

图 3. 10%SDS-PAGE, Coomassie兰染色的各种质粒表达产生的蛋白。箭头指示产生的融合蛋白，左第一列为分子量标记。

Fig. 3 Proteins from *E.coli* which contained the expression plasmids were analyzed on a 10% SDS-PAGE with coomassie blue. The position of the expression plasmid-encoded proteins is marked with arrows. The number on the right is molecular masses in kilodlaons.

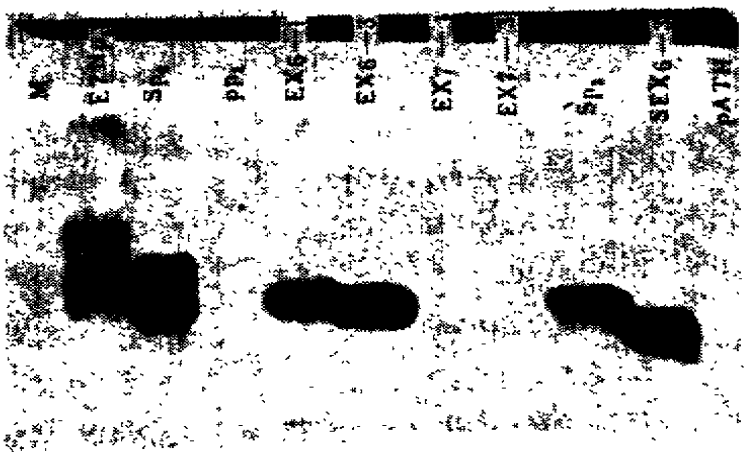

图 4. Western blot 实验，放射自显影结果

Fig. 4. Autoradiography of protein-antibody complexes in Western immunoblot assay.

维普资讯 http://www.cqvip.com

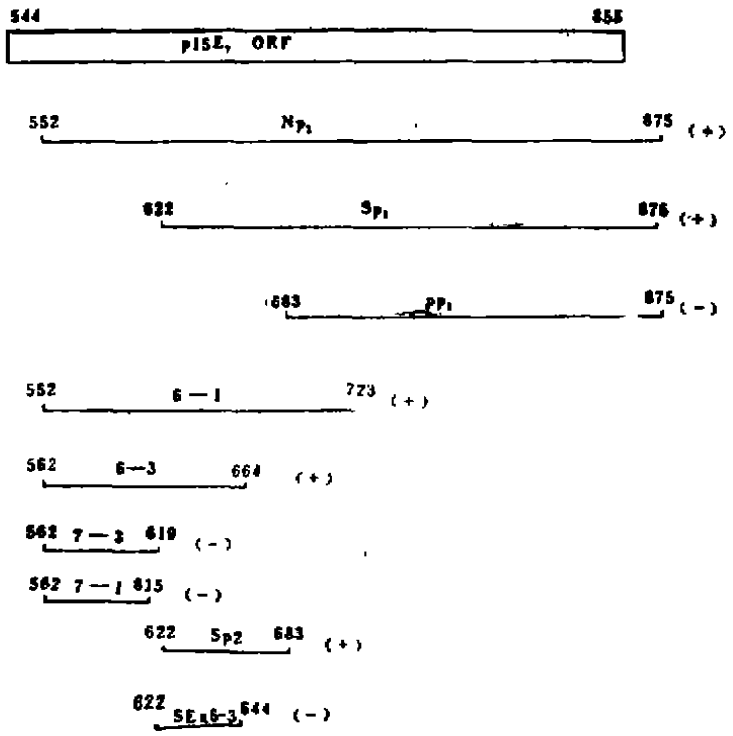

图 5. p16E7ORF和各种质粒含有HPV16的DNA片段（＋或－表示质粒编码的融和蛋白与 CDS_2 反应的结果）

Fig. 5. The map of the HPV16 E7 ORF and the HPV16 DNA fragment contained within the expression plasmid. (The + and — symbols indicate the reactivity of CDS2 with the fusion protein encoded by that expression plasmid.)

讨　论

设计本实验确定编码免疫反应表位的依据是：编码表位的核酸序列诱生的多肽与 CDS_2 呈阳性反应；与表位无关的核酸序列编码的多肽与 CDS_2 呈阴性反应。如图 5 所示，p16E7PP1 表达产生的多肽与 CDS_2 反应阴性，可见该片段的HPV16的DNA（683—875）与表位无关。在核酸链缺失法制备的一系列质粒中，阴性反应的最大质粒是 $p16E_7Ex7$-3（562—619），可见619以前DNA序列也与产生免疫反应无关；阳性反应最小的质粒是 p16E7Ex6-3（562—644），从而可以推导出，决定免疫反应表位的基因位于619—644的核酸序列中。该部位的核酸序列及编码的相应氨基酸如下：

										ACT	GAT	
										T	D	
CTC	TAC	TGT	TAT	GAG	CAA	TTA	AAT	GAC	AGC	TCA	GAG	GAG
L	Y	C	Y	E	Q	L	N	D	S	S	E	E
GAG												
E												

我们根据上述分析结果，又制备了新的克隆 p16E7SEx6-3，插入基因为622—664，

维普资讯 http://www.cqvip.com

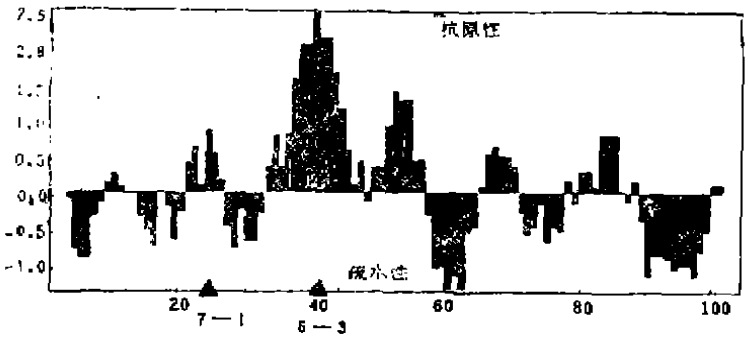

图 6. HPV16tE7ORF 蛋白的疏水性和抗原性。（箭头分别表示p16E7Ex7-3和 p16E7Ex6-3 插入基因的终止部位）

Fig. 6. Antigenicity and hydrophobicity plot of the HPV16 E7 ORF protein. (The arrows indicate the terminal of insert DNA of p16E7Ex7-3 and p16E7Ex6-3.)

仅含42对核苷酸，其诱生的多肽仍与 CDS_2 呈强阳性反应（图5），这也说明该 DNA片段编码免疫反应表位。

根据 Hopp(13)和Kyte(14)的方法，可以推算出 p16E7ORF 编码的氨基酸的疏水性和抗原性（图6）。

从图6看出，p16E7Ex6-3 插入基因的后半部分的核苷酸编码的氨基酸序列抗原性强，从而可以推导出，主要引起免疫反应的氨基酸序列是亮、天冬酰胺、丝、丝、谷、谷和谷氨酸。

参 考 文 献

〔1〕 Zur Hausen H, et al., 1987, *Cancer* 59：1892—16.
〔2〕 Seventh Inter. HPV Workshop., 1988.
〔3〕 Chen EY, et al., 1988, *Nature* 229：529—534.
〔4〕 Schneider-Gadick A., 1986, *EMBO J* 5：2285—2292.
〔5〕 Seedorf K, et al., 1987 *EMBO J* 6：139—144.
〔6〕 Phelps WC, et al., 1988, *Cell* 53：539—547.
〔7〕 Kanda T, et al., 1988, *J. Virol* 62：610—613.
〔8〕 Seedorf K, et al., 1985, *Virol* 145：181—185.
〔9〕 Firzlaff JM, et al., 1987, *Cancer Cell* 5 P105—113.
〔10〕 Henikeff S., 1987, *Method Enzymol* 155：156—164.
〔11〕 Jenison SA, et al., 1988, J.Virol 62：2115—2123.
〔12〕 Guo LH, et al., 1982, *Nucleec Acid Res* 10：2065—2084.
〔13〕 Fahnestock P, DS DNA Seq. Sept 13, 1986.
〔14〕 Hopp TP., 1981, Proc. *Natl. Acad. Sci.* USA 78：3824—3828.
〔15〕 Kyte J. et al., 1982, *J. Mol. Biol* 157：105—132.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Mapping the Location of Human Papillomavirus Type 16 E7 Open Reading Frame-encoded Immunoreactive Epitope

YU Xiu-ping

(*Department of Microbiology, Shandong Medical University, Jinan 250012*)

Steven A. Jenison

(*Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington 98104*)

To map the immunoreactive epitope of HPV 16 ORF, the pro-caryotic expression plasmide p16E7NP1 was deleted with exonuclease III and nuclease S1. The deleted plasmids, which contained a nested set of 3′ to 5′ deletion in the HPV 16 E7 ORF, expressed a set of carboxy to amino terminus truncated fusion proteins. Region containing the immunoreactive epitope was mapped by determining which of the deleted fusion proteins retained reactivity with sera in Western immunoblot assays. The coding sequence for a human antibody-reactive linear epitope mapped between HPV16 nucleotide coordinates 619 and 664.

Key Words: Human Papillomavirus Type 16 Epitope E7 Open Reading Frame