

人乳头瘤病毒16型晚期蛋白质基因 L₁ 的克隆及表达*

于修平 赵蔚明 董杰德 赵立新 陈晨华

(山东医科大学微生物学教研室, 济南250012)

Steven A. Jenison *Jeni, SAV*
(Seattle FHCRC, USA, WA98104)

提 要

R373.9

人乳头瘤病毒 16 型 (HPV16) 含有两个晚期开放读码框 (L₁ORF 和 L₂ORF), L₁ORF 编码主要衣壳蛋白, 我们用质粒 pHPV16、p16L₂BX₆ 和 pATH, 采用基因重组技术, 制备了含有 HPV16 个长 L₁ORF 序列的基因克隆 p16L₁BN (5071-253), 它能在大肠杆菌中有效表达, 产生分子量约 90KD 的含有 E. coli trpE 的融合蛋白。Western blot 检测, 该蛋白可被抗牛乳头瘤病毒的抗体识别, 这说明克隆 p16L₁BN 能有效表达, 基因产物具有乳头瘤病毒型的共同抗原的性质。

关键词: 人乳头瘤病毒16型 基因克隆 L₁ 开放读码框 基因表达

人乳头瘤病毒

HPV16 与宫颈癌的关系密切, 近年来已成为国内外研究的重点^[1]。HPV16 含有二个晚期ORF, 分别编码病毒的主要和次要衣壳蛋白^[2]。国外已有 HPV16 L₁ORF 克隆的报道, 但由于酶切位点和所需片段分离困难的限制, 研制的克隆只是含有部分 L₁ORF 序列^[3,4]。我们用 Galloway DA 提供的几种质粒, 采用基因重组技术, 研制了含有全长序列 L₁ORF 的克隆 p16L₁BN, 它能在大肠杆菌中有效表达。

材 料 和 方 法

1. 构建克隆 p16L₁BN: 克隆质粒 pHPV16 (pBR322加HPV16 DNA全序列)、p16L₂BX₆ (载体 pATH10, 插入 HPV 序列为 Xho II 5071-BamHI 6150) 和 pATH11 (含有色氨酸启动子的 pBR 322 改建的质粒) 均系 Galloway DA 惠赠。DNA 片段的分离和提取均采用 plaque-sea 低熔点琼脂糖电泳, 切下所需片段, 酚抽提。

(1) 从 p16L₂BX₆ 制备: HPV16 的 BstNI_{5,29}-BamHI_{1,150} 的片段: 先用 Hind III 和 EcoRI 酶切 p16L₂BX₆, 分离提纯第二条带, 用 BstNI 消化, 加 dNTP 和 T₄DNA 多聚酶使呈平端。然后用 BamHI 消化, 分离得到 BstNI_{5,29}-BamHI_{1,150} DNA 片段。

本文于1991年6月28日收到, 1992年2月13日修回。

* 本文曾在第二届全国病毒学学术会议上报告(武汉, 1991.6)。

(2) 从 pHPV16 制备 BamHI₁₁₅₀-Nsi I₂₄₃ 片段: 先后用 Nsi I 和 BamHI 酶切 pHPV16, 分离提纯 2kb DNA。

(3) 载体: 先后用 SmaI 和 pstI 酶切 pATH11, 电泳分离提纯线性 DNA。

(4) 将上述三个片段按 2 : 2 : 1 浓度混合后, 加 T₄ DNA 连接酶, 室温过夜, 按常规方法转化大肠杆菌 HB₁₀₁^[10], 接种于含氨苄青霉素的 LB 平皿中, 次日挑取生长菌落。

2. 重组质粒鉴定: 取产生的菌落, 增殖后提取 DNA, 用 BamHI 和 Hind III, BamHI 和 Sst I 两组酶消化, 观察产生片段的大小是否与预计的相符合。

3. 诱导表达及检测: 参照 Jenison SA 方法^[11], 转化菌在含色氨酸 (30 μg/ml) 和氨苄青霉素 (50 μg/ml) 的 M9 培养基中 37℃ 振荡过夜培养, 次日以 1 : 10 稀释接种于不含色氨酸的 M9 培养液, 30℃ 1 小时后, 再加 3-吲哚乙酸 (5 μg/ml), 继续培养 5 小时, 离心留菌体, 重悬于 Laemmli 样本液中, 超声波处理, 用 Western blot 法检测诱生的融合蛋白与兔抗牛乳头瘤病毒血清 (DAKO 制品, 兔抗 BPV) 的免疫反应。样本先经 10% SDS-PAGE, 然后将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 再加兔抗 BPV (1 : 1000), 最后加 ¹²⁵I-SPA (4 μCi/μg, 1 : 1000) 放射自显影。

结 果

质粒 p16L₂XB₅ (图 1-A-a) 经 EcoRI 和 Hind III 酶切后, 琼脂糖电泳, 提取约 1090

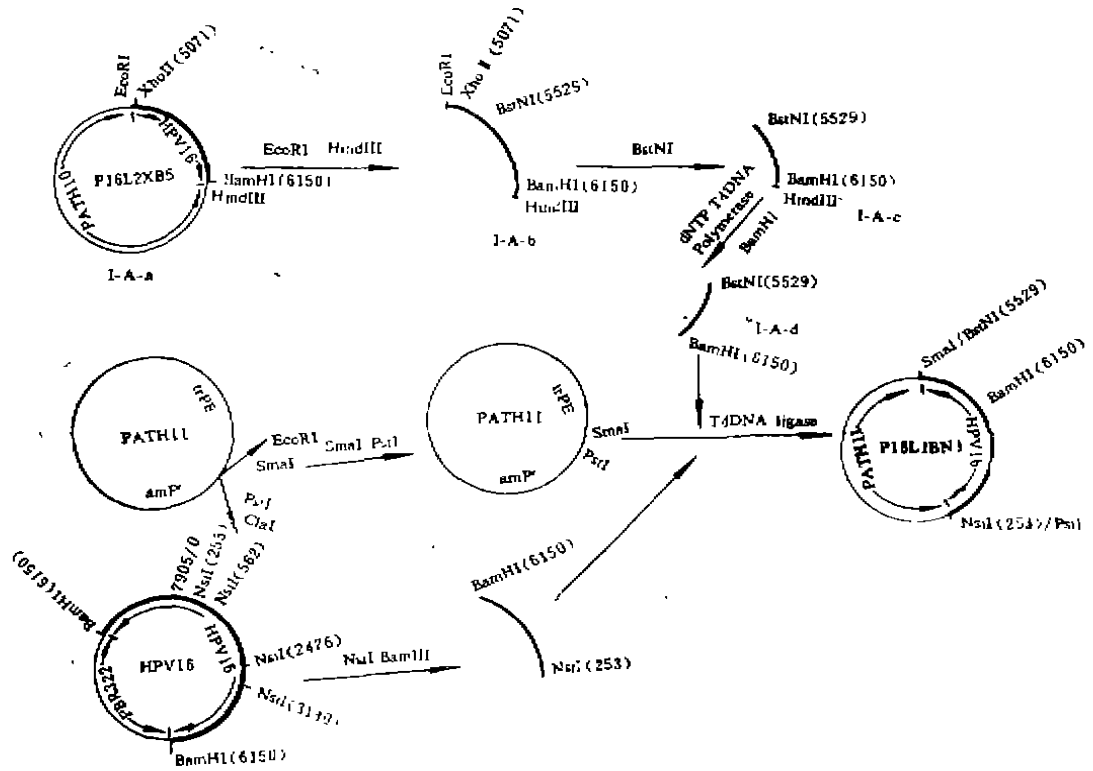


图 1. HPV16 全长 L₁ORF 表达克隆的构建

Fig. 1 Construction of PHV16 L1 ORF expression plasmid (p16LIBN)

bp 的第二条带 (图 2 -c), 即为片段 EcoRI-Xho II₅₀₇₁-BamHI₆₁₅₀-Hind III (图 1 -A-b)。然后用 BstNI 消化, 提取较大的片段 (图 3), 即为 BstNI₅₅₂₉-BamHI₆₁₅₀-Hind IV (图 1 -A-C)。再用 dNTP 和 T₄DNA 多聚酶, 使两个粘末端填补成平端, 最后用 BamHI 消化, 即得 BstNI₅₅₂₉-BamHI₆₁₅₀片段 (图 1 -A-d)。

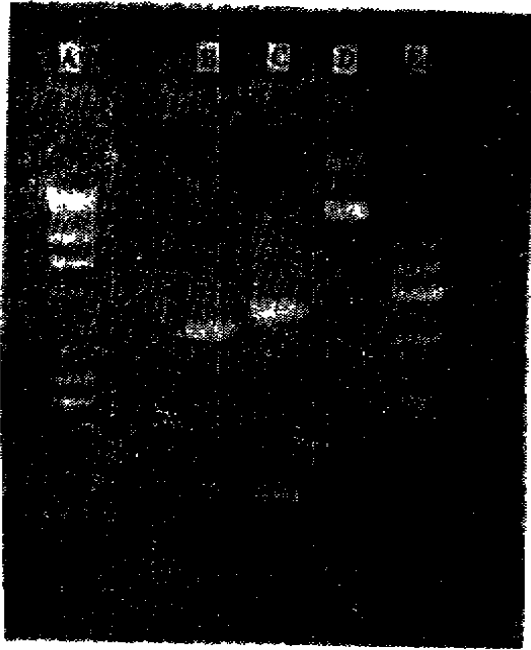


图 2 p16L₂XB₅ 和 pHPV16 DNA 经限制性内切酶消化后, 1% 琼脂糖电泳结果

- A, DNA 分子量标准 λ/HindIII B, p16L₂XB₅ DNA
 - C, p16L₂XB₅ 经 EcoRI 和 HindIII 酶切 D, pHPV16 DNA
 - E, pHPV16 经 NsiI 和 BamHI 酶切
- 箭头指示待提取的 DNA 带

Fig. 2 Restriction fragments of p16L₂XB₅ and pHPV16 were electrophoresed through 1% agarose gel

- A, MW standards of DNA, λ/HindIII.
 - B, p16L₂XB₅ C, p16L₂XB₅/EcoRI, HindIII
 - D, pHPV16 E, pHPV16/NsiI, BamHI
- Arrows indicate extracting DNA bands

先后用 NsiI 和 BamHI 消化 pHPV (图 1-C), 可以产生大小不同的多个片段, 提取约 2Kb 条带, 即为 BamI₆₁₅₁-NsiI₂₅₃ (图 2 -E 中箭头所示)。

重组质粒鉴定, 用 BamHI 和 Hind III 酶切, 根据已知序次: BamHI 切点在插入的 HPV16 DNA 的 6150 处, Hind III 切点在 pATH 的多联体处, 如果连接方向正确, 则可产生 4381bp 和 2013bp 的两个片段, 这与实验结果一致 (图 4)。此后的 Western blot 检测结果阳性, 也说明重组的方向正确, 如果方向不正确或位相错误, 重组质粒均不能有效表达产生 HPV 的衣壳蛋白。用 BamHI 和 SstI 酶切结果也与预计相符。

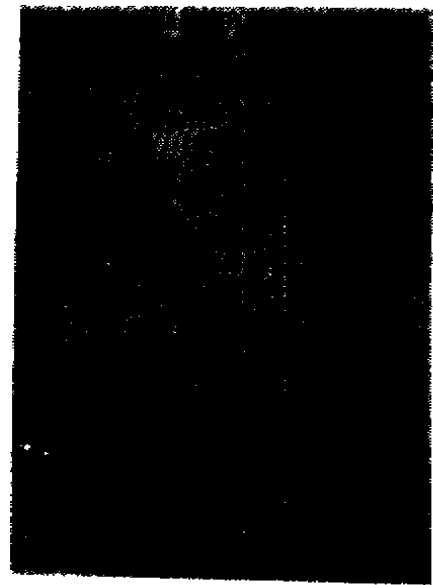


图 3 用 BstNI 消化 1090bp 的 DNA 片段后, 1% 琼脂糖电泳结果

- A, λ/HindIII
 - B, 1090bp DNA/BstNI
- 箭头指示 630bp 的 DNA 条带

Fig. 3 The fragments of 1090 bp DNA digested by BstNI were electrophoresed through 1% agarose gel

- A, λ/HindIII B, 1090bp DNA/BstNI
- Arrow indicates 630bp band.

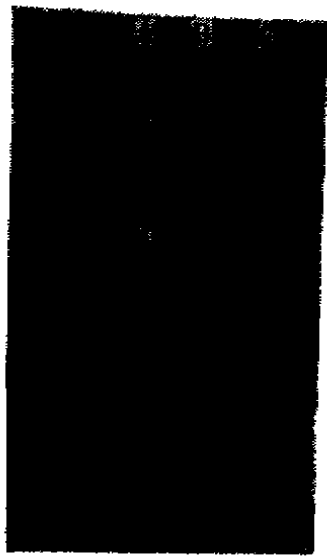


图 4 p16L1BN酶切鉴定

- A. λ /HindIII
- B. p16L₁BN DNA 第一条带: 缺口环状 DNA, 第二条超螺旋 DNA
- C. p16L₁BN 经 HindIII、BamHI 消化, 第一条带: 4381bp, 第二条带: 2013bp.

Fig. 4 Identification of p16L1BN cleaved by restriction endonuclease

- A. λ /HindIII
- B. DNA of p16L1BN, first band, nicked circular, second band, superhelical twist
- C. p16L1BN/HindIII+BamHI first band: 4381bp, second band, 2013bp.

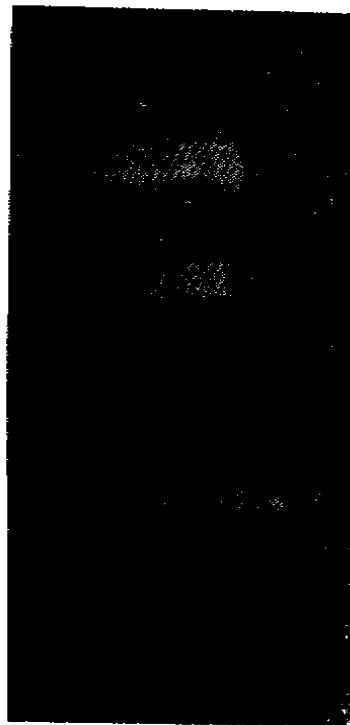


图 5 用 Western blot 检测 p16L1BN 表达蛋白与抗 BPV-1

反应的放射自显影结果

左侧数字为 KD 表示的分子量。

A. 未用 3-吲哚乙酸诱导的蛋白。

B. 用 3-吲哚乙酸诱导的蛋白。

在 90KD 位置上可见明显的阳性反应。呈阳性反应的小分子量条带是降解的融合蛋白。

Fig. 5 Autoradiograph of reactivity of anti-BPV serum to p16L1BN fusion protein in western blot.

Numbers on the left are molecular masses in kilodalton.

A. The proteins were not induced by 3-indoleacetic acid.

B. The proteins were induced by 3-indoleacetic acid.

Obvious positive reactivity on the 90×10³d position. Smaller MW bands are degenerated fusion proteins.

用质粒 p16L₁BN 转化的 HB101 的菌体蛋白作 SDS-PAGE, 经 3-吲哚乙酸诱生的融合蛋白量稍多于未诱生的, 据推算完整的融合蛋白分子量约为 90KD, 在该位置可见蛋白条带, 但该带是否含有 HPV16L₁ 蛋白, 还应从与相应血清的反应结果判定。从放射自显影结果可以看出, 该克隆产生的融合蛋白, 无论用吲哚乙酸诱生与否, 均可与抗 BPV 血清呈阳性反应 (图 5)。

讨 论

HPV16L₁ORF 是7.9Kb中的5526至7151 DNA 片段。Firzlaff 等人研制的克隆 p16 L₁BX₃和 pHX₁, 分别含有 HPV16 DNA 的6150—6951和5564—6150⁽³⁾, 只是 L₁ORF 的一部分, 可能不包括编码表位的序列。由于在 L₁ORF 的起始和终止部位没有合适的酶切位点, 如果用在这些部位有切点的内切酶消化, 由于酶切后的 DNA 片段分子量相似, 也难于从酶切后的条带中分离出所需片段, 因而 Firzlaff 放弃了克隆 L₁ORF 全长序列 DNA 的尝试。

美国西亚图 Hutchinsonson 肿瘤研究中心已克隆了 p16L₂XB₅和 pHPV16, 我们与该单位的 Jenison S A 共同制定了本文方案: 从p16L₂XB₅制备氨基端的序列部分, 从 pHPV16 获得羧基端部分, 载体选用 pATH 系列的 pATH₁₁(pATH 系列质粒的 trp E 基因的羧基端有多酶接头, 有三个不同位相读码框的 pATH₁、pATH₁₀和pATH₁₁可供选择)。

用吡啶乙酸诱导的转化菌的 PAGE 结果, 并未见含量明显增加的融合蛋白带。以前 Jenison S A 在研制大肠杆菌表达 HPV6b 晚期蛋白时, 也出现类似情况⁽⁶⁾, 插入的外源序列能否有效表达, 不能从是否出现明显增加的蛋白条带来判定, 应通过与相应特异性抗体的反应结果决定。即使从凝胶上看无明显增加的融合蛋白带, 只要 Western blot 检测与相应血清呈阳性反应, 其位置又与推算的分子量相符, 即可确定插入的片段已有效表达。推算克隆 p16L₁BN 表达产生的融合蛋白分子量约为 90KD, Western blot 显示该位置阳性反应条带, 这说明表达产生的融合蛋白能被抗 BPV 血清识别, 融合蛋白具有乳头瘤病毒的抗原特性。

我们准备用该克隆产生的融合蛋白检测人血清中是否有相应抗体, 来探讨 HPV 的感染状况和免疫特点。但该融合蛋白具有乳头瘤的共同性抗原, 难于区分不同型别的感染。我们也拟以此克隆为基础, 采用单方向缺失核酸链的方法, 研制只含表位的基因克隆⁽⁷⁾, 为制备具有特异性的蛋白打下基础。

考 参 文 献

- (1) Galloway DA et al., 1989, *Adv in Virus Res.*, 37: 125-174.
- (2) Seedorf K et al., 1985, *Virology*, 145: 181-185.
- (3) Firzlaff JM et al., 1987, *Cancer cells*, 5: 105-113.
- (4) Tomita YS et al., 1987, *J.Virology*, 61: 2389-2394.
- (5) Maniatis T et al., 1982, *Molecular Cloning, a Lab. Manual*, NY.
- (6) Jenison SA et al., 1988, *J.Virology*, 62: 2115-2123.
- (7) 于修平等, 1990, *病毒学杂志*, 3: 245-251.

Clone and Expression of Human Papillomavirus Type 16 L₁ Open Reading Frame

Yu Xiu-ping Zhao Wei-ming Zhao Li-xing Dong Jie-de
(Department of Microbiology, Shandong Medical University, Jinan, 250012)

Steven A. Jenison

(Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle WA 98104 USA)

The human papillomavirus type 16 (HPV 16) genome contains two later open reading frames (L₁ ORF and L₂ ORF). L₁ ORF encoded major capsid protein. Using plasmid of pHPV16, p16L2XB5 and pTHA11, the complete HPV 16 L₁ ORF in plasmid was cloned, designated p16LIBN (5071—253). The coding amino terminus part, the fragment of BstNI 5529—BamHI 6150, was prepared from p16L2XB5, the coding carboxy terminus part, BamHI 6150—NsiI 253, was produced from pHPV16. The obtained HPV 16 DNA fragment was inserted into polylinker of vector pTHA. The clone p16LIBN expressed and produced about 90×10^3 fusion protein with E. coli trpE in E. coli HB101. Western blot analysis indicated that the expressed fusion protein could be recognized by rabbit anti-bovine-papillomavirus antiserum (DAKO anti-BPV-1). The result showed that expressed fusion protein of the clone p16LIBN, complete gene product of p16L₁ ORF, contained type-common antigen of papillomavirus.

Key words, Human papillomavirus type 16 L₁ open reading frame
Gene clone Gene expression