

## 人乳头瘤病毒 6b 型晚期蛋白 L<sub>2</sub> 免疫反应表位的确定

于修平 戴景宜 赵蔚明 董杰德 周亚滨 袁晓霞

(山东医科大学微生物学教研室, 济南 250012)

R373.9

**A** **摘要** 人乳头瘤病毒(HPV)含有2个晚期开放读码框(ORF), L<sub>2</sub>ORF 编码的蛋白具有型特异性。本研究用能表达产生完整 HPV6bL<sub>2</sub> 蛋白的质粒 p6b L<sub>2</sub> NX, 采取核酸外切酶 III 定向连续次级克隆的方法, 制备了一系列一端逐渐删切的 DNA 片段, 诱生一组从 C 端至 N 端依次减少的 L<sub>2</sub> 蛋白与相应血清作免疫印迹实验, 最小的仍保持阳性反应的多肽即含有抗原表位, 实验结果 HPV6bL<sub>2</sub> 蛋白的核酸编码区位于 5481—5506 之间, 其相应氨基酸序列是 EPGINPTQ。

**关键词** 人乳头瘤病毒 6b 型, L<sub>2</sub> 蛋白, 抗原表位

免疫反应表位

HPV6b 是众多的 HPV 型别中最常见的, 它是性传播疾病尖锐湿疣的病因<sup>[1]</sup>。HPV 含有两个晚期开放读码框(L<sub>1</sub>ORF 和 L<sub>2</sub>ORF), 分别编码病毒主要和次要衣壳蛋白<sup>[2]</sup>。L<sub>1</sub> 含有 HPV 的型共同性抗原(群特异性抗原), L<sub>2</sub> 含有型特异性抗原<sup>[3]</sup>。Jenison 等人研制了含有全长 HPV6bL<sub>2</sub>ORF 的表达质粒 p6b L<sub>2</sub>NX<sup>[4]</sup>, 它能在大肠杆菌中有效表达, 产生的融合蛋白在生物学特性方面与自然感染的病毒相似, 可与患者血清呈阳性反应。但该质粒表达产生的蛋白较大, 与其他型别的 HPV 也有轻度交叉反应。本研究以此质粒为基础, 主要采用定向连续次级克隆的方法, 确定了 HPV6b L<sub>2</sub> 的表位序列, 这可为 HPV 的流行病学研究打下基础。

### 材料与方 法

- 1 制备质粒 p6b L<sub>2</sub> NXK** 在质粒 p6b L<sub>2</sub> NX(Jenison 惠赠, 载体 pATH11, HPV6b 插入序列为 NcoI<sub>(421)</sub>-XhoI<sub>(613)</sub>)的多酶接头处用 Hind III 切开, 加 dNTP 和 T<sub>4</sub> 多聚酶填补成平端, 连接上 KpnI 接头(dGGGTACCC), 这样在原质粒 p6b L<sub>2</sub> NX 的基础上插入了 KpnI 的识别位点, 该质粒定名为 p6b NXK。
- 2 制备一系列核酸序列逐步缩短的质粒** 根据核酸外切酶 III 定向连续次级克隆的原理, 采用 Henikoff 改良的方法<sup>[5]</sup>, 先用内切酶 SalI 和 KpnI 依次消化 p6b NXK, 得到线形 DNA, 再加入核酸外切酶 III, 置 25℃ 水浴中, 每隔 30 秒取出 1 份, 移至含有核酸酶 S<sub>1</sub> 的小管中, 消化后的 DNA 再加 T<sub>4</sub> DNA 连接酶使其连接, 即得到一组含有 HPV6bL<sub>2</sub> ORF 从 3' -5' 端逐步缩小的质粒。
- 3 诱生一组从 C 端至 N 端逐步变小的融合蛋白** 将上述制备的一系列质粒转化大肠杆菌 HB101, 用无色氨基酸的 M<sub>9</sub> 培养基, 30℃ 振荡培养, 加 3-吡啶丙酸诱导产生融合蛋白<sup>[6]</sup>。

本文于 1994 年 10 月 31 日收到, 1995 年 3 月 1 日修回

4 Western blot 免疫印迹检测 粗提诱生的细菌的融合蛋白<sup>[4]</sup>,作 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将电泳后的多肽转移至硝酸纤维素膜上,加入相应患者血清(阳性血清由 Jenison SA 友好提供,1:100 稀释),常规方法洗膜,最后加入<sup>125</sup>I-SPA,放射自显影显示结果。

5 选择对确定表位有意义的质粒作 DNA 序列测定 采用 Fahnesfock 改进的终点标记引物法,仅确定含 HPV 6b L<sub>2</sub> ORF 的终止部位即可。

## 结 果

利用核酸外切酶 III 建立连续次级克隆过程时,在目的 DNA 与载体连接区之间,应有 2 个合适的限制酶切位点,现已加入了 KpnI 识别位点。用 SalI 和 KpnI 消化质粒 p6b L<sub>2</sub> NXX DNA,在 KpnI 的切点,产生 4 个碱基突出的 3' 末端(图 1),该侧能对抗外切酶 III 的消化;在 SalI 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 SalI 切口处逐步消化 3' 末端缺少碱基的一条链,由于每隔 30 秒取出 1 份标本,每份的核酸数目相差 100 个碱基左右,继而核酸 S<sub>1</sub> 消化另一条核酸链。

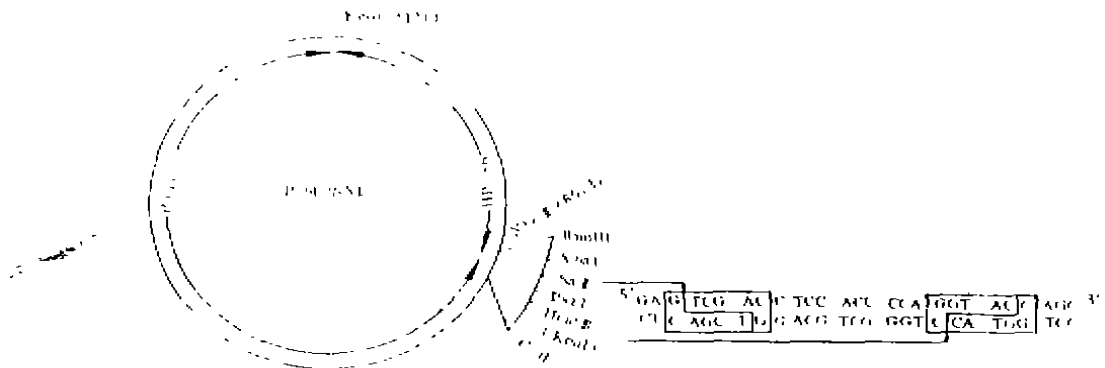


图 1 质粒 p6b L<sub>2</sub> NXX 及 SalI 和 KpnI 酶切后的末端

Fig. 1 Physical map of plasmid p6bL<sub>2</sub> NXX and the nt sequences around the SalI and KpnI sites

上述质粒转化大肠杆菌诱生的融合蛋白与相应患者血清作免疫印迹试验,结果 1—8 号均为阳性(外切酶 III 作用前为 1 号,作用 30 秒后为 2 号,再一个 30 秒为 3 号,依次类推),9 号以后呈阴性。每号之间碱基数目相差较多,约 100 个碱基,为减少碱基数目之间的差别,再分别从 8 号和 9 号质粒转化的 HB101 的培养皿中各取 4 个菌落,分别培养诱生融合蛋白后作免疫印迹试验,结果能被相应血清识别的最小质粒是 9-1 号,命名为 p6b L<sub>2</sub> EX<sub>9-1</sub>。不能被相应血清识别的最大质粒是 9-3 号,命名为 p6b L<sub>2</sub> EX<sub>9-3</sub>,免疫印迹的放射自显影结果如图 2 所示。

DNA 序列测定表明,p6b L<sub>2</sub> EX<sub>9-1</sub> 的含 L<sub>2</sub> ORF 的末端是 5506,p6b L<sub>2</sub> EX<sub>9-3</sub> 的末端是 5481,为便于观察分析结果,图 3 显示有关质粒的大小及免疫印迹试验结果。

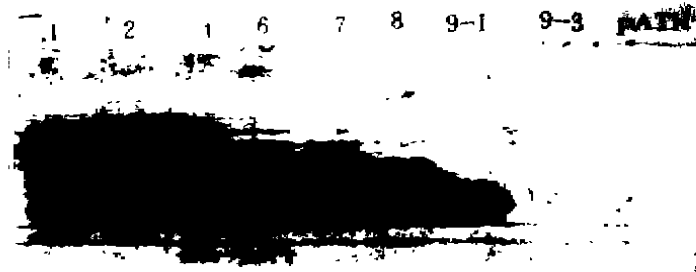


图2 诱生的一系列融合蛋白与血清的 Western blot 放射自显影结果

Fig 2 Autoradiography of fusion proteins-serum antibody complex in western blot assays

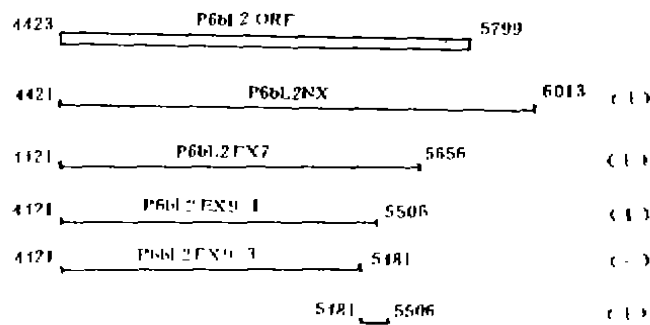


图3 HPV 6b L<sub>2</sub> ORF 及含有 HPV 6b L<sub>2</sub> 表位的质粒大小(+或-表示质粒编码的融合蛋白与血清的反应结果)

Fig 3 The maps of HPV 6b L<sub>2</sub> ORF and the expression plasmids (+ and - symbols indicate the reaction results of the serum to the fusion proteins encoded by expression plasmids)

### 讨 论

HPV 6b L<sub>2</sub> ORF 的序列是从 4423 至 5799, 质粒 p6b L<sub>2</sub> NX 含有 L<sub>2</sub> ORF 的全序列, 它转化的大肠杆菌经色氨酸饥饿和 3-吡啶丙烯酸诱导产生的融合蛋白含有 L<sub>2</sub> 蛋白, 它可与患者血清呈阳性抗原抗体的反应。本实验的阳性血清由 Jenison SA 惠赠, 患者经临床湿疣标本检查和核酸杂交确诊。我们设计本实验的依据是, 编码表位的核酸序列诱生的多肽能被患者血清识别, 即免疫印迹试验阳性, 与表位无关的核酸序列诱生的多肽与相应血清呈阴性反应。p6b L<sub>2</sub> EX<sub>9-1</sub> 是呈阳性反应的最小质粒, p6b L<sub>2</sub> EX<sub>9-3</sub> 是呈阴性反应的最大质粒, 编码表位的核酸序列即位于它们相差的序列中, 即在 5481 与 5506 之间, 其核苷酸序列是 GAA CCT GGC ATT AAC CCT ACC CAA CAA, 其相应的多肽序列是 EPGINPTQ。

## 参 考 文 献

- 1 Gissmann L, Wolnick L, Ikenberg H, *et al.* HPV6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas in some cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80:560—563
- 2 Seedorf K, Krammer G, Durst M, *et al.* Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*. 1985;145:181—185
- 3 Kontsky LA, Galloway DA, Holmes KK, *et al.* Epidemiology of genital HPV infection. *Epidemiol Rev*. 1988;10:122—163
- 4 Jensen SA, Firzlaff JM, Langenberg A, *et al.* Identification of immunoreactive antigens of HPV6b by using *Escherichia coli* expressed fusion proteins. *J Virol*. 1988;62:2115—2123
- 5 Honikoff S. Unidirectional digestion with exonuclease III in DNA sequence analysis. *Methods Enzymol*. 1987;155:156—165
- 6 Firzlaff JM, Hsia CL, Halbert CP, *et al.* Polyclonal antibodies to HPV6b and HPV16 bacterially derived fusion proteins. *Cancer Cells*. 1987;5:105—113

### Mapping the Immunoreactive Epitope Encoding Sequence of HPV6b L<sub>2</sub> ORF

Yu Xiuping    Dai Jingyi    Zhao Weiming    Dong Jiede    Zhou Yabing

(Dept. of Microbiology, Shandong Medical University, Jinan 250012)

HPV contains two late open reading frames. The L<sub>2</sub> protein encoded by L<sub>2</sub> ORF possesses type-specific antigenicity. To map the immunoreactive epitope of HPV6b L<sub>2</sub>, a L<sub>2</sub> expression plasmid p6bL<sub>2</sub> NX was used. Plasmid p6b L<sub>2</sub> NXX was made by adding KpnI linker into polylinker of p6bL<sub>2</sub> NXX. Unidirectional 3' to 5' deletions were made in the HPV6b L<sub>2</sub> ORF insert of p6b L<sub>2</sub> NXX by using exonuclease III and nuclease S<sub>1</sub>. The deleted plasmids expressed a set of carboxy to amino terminus truncated fusion proteins. Region containing the immunoreactive epitope was mapped by determining retained reactivity of the deleted fusion proteins with sera in Western immunoblot assays. The related plasmids were sequenced. The immunoreactive epitope was located at 5481—5506 nts region, and the corresponding peptide was EPGINPTQ.

**Key words** Human Papillomavirus 6b, L<sub>2</sub> protein, Immunoreactive epitope