维普资讯 http://www.cqvip.com

第13卷第4期 中国病毒学 Vol.13 No.4
1998年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 1998

人乳头瘤病毒16型E_6基因的T-A克隆及在真核细胞中的表达*

栾怡 于修平 赵蔚明 贾继辉 周亚滨
(山东医科大学微生物教研室,济南250012)

摘 要 由于HPV16 E_6蛋白能诱导机体保护性免疫反应,可作为基因治疗的靶抗原。用杆状病毒-昆虫细胞表达系统制备了HPV16 E_6基因工程蛋白,拟用于宫颈癌细胞系小鼠模型抗癌的免疫治疗。用PCR技术从HPV16基因组中扩增获得转化基因E_6的完整ORF,按T-A策略将其克隆到自行制备的杆状病毒转移载体pVL1 393T-尾载体中,置于杆状病毒AcMNPV Polh晚期启动子控制之下,用此重组转移质粒pVL1 393-E_6与杆状病毒DNA共转染昆虫细胞Sf-9,经噬斑筛选获得带有编码E_6蛋白基因的重组杆状病毒株,并在昆虫细胞Sf-9中表达为非融合性E_6蛋白。SDS-PAGE电泳分析其分子量约为18 kD,免疫印迹实验表明,此重组蛋白能被兔抗HPV16 E_6抗体所识别。

关键词 HPV16型E_6,T-A克隆,杆状病毒,昆虫细胞,表达

人乳头瘤病毒是一个重要的DNA肿瘤病毒,与人类多种良、恶性肿瘤的发生相关。其中高危型HPV16与宫颈癌的发生密切相关。全世界范围内,女性HPV总感染率为5~44%[1],男性感染率与女性相似。中国(南京)约为19.4%[2],且HPV16胎盘垂直传播率达77.8%[3],可见HPV感染的防治是急待解决的公共卫生问题。

HPV16基因组含7905个碱基对,编码7~8个不同功能的早期非结构蛋白和2个晚期结构蛋白。其中早期蛋白E_6是重要的转化蛋白之一,E_6蛋白含151或158个氨基酸,是Zn^{++}结合的磷酸蛋白,位于癌细胞的细胞核内,有致癌的潜能[4]。另外,E_6蛋白是特异性肿瘤排斥抗原,可作为诱导CTL-介导的免疫治疗的十分有吸引力的靶肽。关于HPV16 E_6蛋白的抗原性及其B细胞、T辅助细胞和CTL细胞抗原识别表位的研究很多,如表1。用合成的E_6多肽片段可诱导DBC/2(H-2^d)小鼠抗E_6的体液免疫、Th细胞增殖反应和CTL反应,并且CD_8^+ T细胞介导的CTL反应能溶解E_6基因转化的肿瘤细胞系[5]。由于目前尚未建立HPV的体外培养系统,目前HPV各基因的研究大多采用大肠杆菌表达系统或人工合成多肽。本研究利用杆状病毒表达系统,将HPV16 E_6的PCR扩增片段克隆至自行制备的pVL1 393 T-载体中,表达了HPV16 E_6蛋白,并检测其抗原性。

收稿日期:1997-06-27,修回日期:1998-03-12
* 本课题受山东省卫生厅科研基金资助

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1　HPV16 E_6 免疫表位的序列

Table 1　The sequences of HPV16 E_6 immune epitope

识别单位 Recognition unit	蛋白来源 Original protein		肽序列 Sequence of peptide
B 细胞/抗体	$16E_6$	86－95	TTLEQQYNKP
B cell/antibody		96－100	LCDLL
		111－120	CPEEKQRHLD
		136－140	CMSCC
		141－146	RSSRT
		146－150	RRETQ
CD_4^+ T 细胞 (T_H)	$16E_6$	41－50	EVYDFAFRDL
CD_4^+ T cell (T_H)		91－100	QYNKPLCDLL
		146－151	RRETQL
CD_8^+ T 细胞 (CTL)			
CD_8^+ T cell (CTL)			
H－$2D^b$	$16E_6$	131－140	RWTGRCMSCC
D^d	$16E_6$	116－125	QRHLDKKQRF
		86－95	TTLEQQYNKP
K^d	$16E_6$	50－57	YIFAFRDL
HLA－A2	$16E_6$	18－26	KLPQLCTEL
		29－38	TIHDIILECV

材料与方法

1　质粒

pBR322-HPV16 系美国 Galloway 教授惠赠。转移载体质粒 pVL1 392/1 393 由李昌林老师惠赠。

2　病毒与昆虫细胞

核型多角体病毒(AcMNPV)系 CLONTECH Lab 产品。昆虫细胞 Sf-9(*Spodoptera frugiperda* 9)在 TNM-FH 培养基(Sigma)和 10% 胎牛血清(GIBCO)营养液中 27 ℃培养。

3　酶类

Taq DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司。Sma Ⅰ、Pvu Ⅱ内切酶均购自华美生物工程公司。

4　基因扩增与重组转移质粒的构建

PCR 扩增、引物设计见文献[6],最后达到 72 ℃,时间延长至 15 min,以保证所有 DNA 片段都带有 A 尾。转移质粒 pVL1 393 经 Sma Ⅰ,25 ℃消化 1 h,切成钝末端,然后进行加 T 反应。反应体系如下:Taq 聚合酶(1 u/μg 质粒·20 μL),标准反应缓冲液(40 mmol/L NaCl,20 mmol/L Tris·Cl pH8.9,5 mmol/L $MgSO_4$,0.01% (W/V)明胶,0.1% (W/V)Triton X-100)和 2 mmol/L dTTP,总体积 100 μL。75 ℃反应 2 h。PCR 产物与 T-尾 pVL1 393 载体经常规抽提纯化后,按两者摩尔数之比 3:1 混合,用 T_4DNA 连接酶 4～5 ℃连接过夜。转化大肠杆菌 DH5α,通过 PCR 技术挑选含有插入外源基因片段的克隆,并用 Pvu Ⅱ酶切鉴定,选择 E_6 基因插入正方向的阳性克隆,扩增并纯化之。

5　重组病毒的构建与筛选

转移载体 DNA 与野生型 AcMNPV 病毒 DNA 按文献所述[7]的磷酸钙共沉淀法进行共转染昆虫细胞 Sf-9。通过噬斑纯化和地高辛标记的 HPV16 E_6 DNA 探针进行原位杂交筛选,培养重组病毒。

6　HPV16 E_6 非融合性表达蛋白的检测

取感染病毒的细胞裂解液用于 15% SDS-PAGE 电泳,然后将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,氨基黑染色后

维普资讯 http://www.cqvip.com

观察。取未染色的硝酸纤维素膜用抗 HPV16 E_6 抗体作免疫印迹检测。抗 HPV16 E_6 抗体 ZY96A 由美国 Galloway 教授惠赠。

结 果

1 含 HPV16 E_6 基因的转移载体质粒的构建

在质粒 pVL1 393 多角体启动子 Polh 下游 +6 bp 处单一 Sma I 位点酶切后的钝末端加上未配对的 T 尾。由于 PCR 体系中，TaqDNA 聚合酶非特异性催化扩增的 DNA 片段 3′末端加上 A 尾，导致 PCR 产物两个 3′-末端带有未配对的单 A 凸出尾，按照 T-A 配对原则与 T-载体连接，构建成重组质粒 pVL1 393-E_6(图 1)。菌落 PCR 筛选含有 E_6DNA 片段的阳性质粒(图 2.1)。经 BamH I 酶切后，可得到载体质粒和外源基因两个片段(图 2.2)。E_6 基因片段近 TAA 一端有 Pvu II 单一酶切位点，因此 Pvu II 酶切后可选择外源基因正向插入的重组质粒(图未显示)。

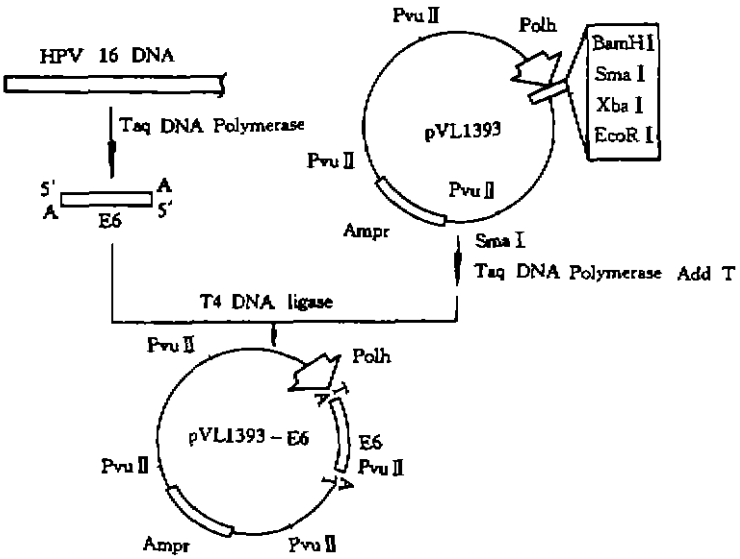


图 1 重组质粒 pVL1 393-E_6 的 T-A 构建

Fig. 1 T-A construction of recombinant plasmid pVL1 393-E_6

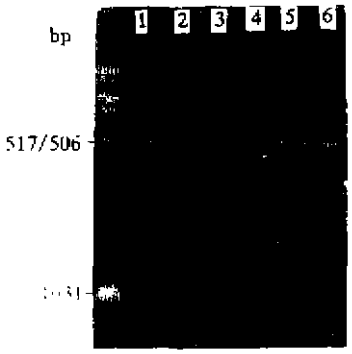
2 重组病毒的获得与筛选

用 pVL1 393-E_6 和亲本病毒共转染 Sf-9 细胞，同源重组后得到含 E_6 基因的重组病毒，用空斑纯化和原位杂交方法筛选并获得了重组病毒(图 3)。

3 重组蛋白的检测和抗原性分析

细胞裂解液的 15% SDS-PAGE 电泳结果显示，重组病毒感染的细胞蛋白样品在 18 kD 处出现一条特异性蛋白条带，是昆虫细胞蛋白样品所没有的(图 4)，并被抗 HPV16 E_6 抗体所识别(图 5)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



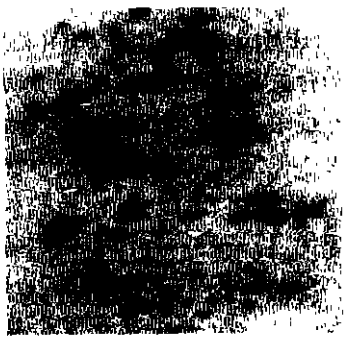


图2.1　菌落PCR筛选的扩增片段电泳结果

Fig.2.1　Electrophoretic pattern of PCR products fragment of colonial DNA

M：marker pBR322/HinfⅠ　1：positive control of pBR322-HPV16　2：negative control of DH5 without plasmid

3,5,6：DH5 with pVL1 393-E_6　4：DH5 with pVL1 393 only

图2.2　重组转移质粒的酶切结果

Fig.2.2　Restriction endonuclease analysis of recombinant transfer plasmid

M：DNA/HindⅢ　A：pVL1 393/BamHⅠ　B：pVL1 393-E_6/BamHⅠ

图3　噬斑原位杂交结果

Fig.3　The result of plaque *in situ* hybridization

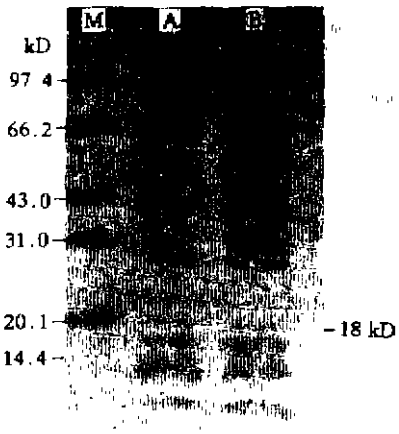


图4　SDS-PAGE电泳检测表达蛋白

Fig.4　Expression protein analysed by SDS-PAGE pattern

M：marker protein

A：total protein of Sf-9 cells infected with wt AcMNPV

B：total protein of Sf-9 cells infected with AcMNPV-E_6

图5　Western blot免疫检测结果

Fig.5　Immunoblot analysis of antigens recognized by anti-E_6 antibody in Western blot assay

1：lysates of Sf-9 cells infected with wild-AcMNPV

2：lysates of Sf-9 cells infected with AcMNPV-E_6

维普资讯 http://www.cqvip.com

讨 论

HPV16 E_6 蛋白对 HPV 感染、致癌的临床诊断及病因学研究都有很高的应用价值[8]。国内外有关 E_6 蛋白表达多采用质粒-大肠杆菌表达系统或人工合成多肽。前者由于 *E. coli* 表达的重组蛋白需高度提纯以保证其特异性，后者由于合成肽疫苗缺乏蛋白的天然构象，仅含某些线性免疫表位，影响免疫原性和检测灵敏性。近年来，由于杆状病毒表达外源蛋白具有效率高、能糖基化、磷酸化、信号肽和蛋白切割等后加工修饰功能，细胞培养简单，适合于大规模生产等优点，是目前外源蛋白制备所广泛应用的一种真核表达系统[9]。

目前，PCR 产物的克隆技术有多种，钝末端连接效率低，黏末端由于末端酶切活性低，使克隆失败。而 T-A 克隆技术操作简单，重组效率高（>80～90%），适用于酶切位点不匹配或内部含多个酶切位点的 DNA 片段的克隆。我们利用 Taq 酶的末端转移酶活性，将 Sma I 酶切成钝末端的 pVL1 393 在 3′末端加上单一 T，构建成 T 载体，与 PCR 扩增产物 E_6 片段直接低温连接，连接效率>80%。

本研究描述了非融合性蛋白 E_6 的基因构建和表达，使用启动子 Polh 的重组杆状病毒在昆虫细胞中表达的 E_6 蛋白较稳定，表达量多。在杆状病毒-昆虫细胞表达系统中，E_6 基因表达水平均大大高于其它表达载体系统[10]。考虑到影响外源基因表达水平的因素，构建的重组毒株 AcMNPV-E_6 中，外源基因 E_6 上游距 Polh 启动子只有 6 个碱基对，缩短了 E_6 基因起始密码子 ATG 上游的前导序列，大大增加了 E_6 基因活性转录的能力。并且，该重组毒株有强启动子 Polh 和 E_6 基因携带的 TATA 盒，与其起始密码子 ATG 之间有 10 个碱基对，使两者之间结构更为紧凑，能提高外源基因的表达水平，并且昆虫细胞表达的蛋白类似病毒天然蛋白的构象和抗原性。这一蛋白抗原的免疫学效应有待进一步研究。

参 考 文 献

1 Bosch FX, Manos MM, Munoz N *et al*. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. J Natl Canc Inst, 1995, 87(11):796－802

2 陈伟丽，姚堃、王明伦等. 慢性宫颈炎患者宫颈中人乳头瘤病毒基因的检测. 中华实验和临床病毒学杂志，1995，9(2)：168－170

3 Tseng CT, Evander M, Edlund K *et al*. Possible transplacental transimission of human papillomaviruses. Am J Obstet Gynecol, 1992, 166(3):35－38

4 Scott AF, Demers GW, Etscheid BG *et al* The ability of human papillomavirus E_6 proteins to target P53 for degradation *in vivo* correlates with their ability to abrogate actinomyc in D-induced growth arrest. J Virol, 1994, 68:5698－5705

5 Gao L, Chain B, Sinclair C *et al*. Immune response to human papillomavirus type 16 E_6 gene in a live vaccinia vector. J Gen Virol, 1994, 75(3):157－164

6 栾怡、于修平、赵蔚明等. 人乳头瘤病毒 16 型完整 E_6 开放读码框的基因克隆和鉴定. 山东医科大学学报，1997，35(1)：15－18

7 Reilly DR. Baculovirus expression vectors: A laboratory manual. New York: W.H. Freman and Company, 1992, 1－347

8 Matlashewski G. The cell biology of human papillomavirus transformed cells. Anticancer Research, 1989, 9(5):1447－1556

9 Summers MD, Smith GE. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experimental Station, Texas A&M University, Texas, 1987, 1－109

10 Park DS, Selvey LA, Kalsall SR *et al*. Human papillomavirus type 16 E_6, E_7 and L1 and type 18 E_7 proteins produced by recombinant baculoviruses. J Virol Meth, 1993, 45(2):303－318

维普资讯 http://www.cqvip.com

Human Papillomavirus Type 16 E_6 Gene's T-A Cloning and Expression in Insect Cell

Luan Yi　Yu Xiuping　Zhao Weiming *et al*

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

Abstract The baculovirus-insect cell expression system was used to prepare the HPV16 E_6 recombinant protein. The HPV16 E_6 complete ORF amplified by PCR from HPV16 genome was T-A cloned into the baculovirus transfer vector pVL1393-T under AcMNPV Polh. This recombinant transfer plasmid pVL1 393-E_6 DNA and baculovirus DNA were co-transfected into insect cell Sf-9. After the plaque screening, the recombinant baculovirus AcMNPV-E_6 was expressed in insect cells. The E_6, analysised by SDS-PAGE, was 18 kD, and was recognized by antibody against E_6 protein, which showed their natural antigenecity.

Key words Human Papillomavirus Type 16 E_6, T-A cloning, Baculovirus, Insect cell, Expression