



32-326

R313.7  
R75人乳头瘤病毒 16 型湖北株 E<sub>7</sub> 基因的克隆和高效表达\*

赵 旻 伍欣星 赵文先

(湖北医科大学病毒研究所, 武汉 430071)

**摘要** 利用基因克隆技术, 将 HPV16 湖北株完整的 E<sub>7</sub> 基因克隆到含乳糖操纵子的表达载体 pWR590-1 上, 经限制性酶切分析获得重组质粒 pWHBE<sub>7</sub>。pWHBE<sub>7</sub> 转化大肠杆菌后表达产生分子量为 70 kD 的融合蛋白 lac-E<sub>7</sub>, 该蛋白在免疫印迹实验中可被标准 E<sub>7</sub> 单抗识别。经 IPTG 诱导后, E<sub>7</sub> 融合蛋白产量可达细菌总蛋白含量的 30% 以上。利用 lac-E<sub>7</sub> 蛋白在细菌胞浆中形成包含体的性质, 简便地提取并纯化了该蛋白质。结果为从免疫学角度探讨 HPV16 与宫颈癌的关系以及 HPV 疫苗的研制打下基础。

**关键词** 人乳头瘤病毒, 克隆表达, 融合蛋白, 包含体, HPV E<sub>7</sub> 蛋白

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV) 16 型与人类宫颈癌等多种恶性肿瘤的发生、发展关系密切。在 90% 以上的宫颈癌活检标本中均可检测到 HPV16 的 DNA 或蛋白产物<sup>[1]</sup>。目前认为 HPV16 致癌作用的分子机制与其几种主要癌基因 E<sub>6</sub>、E<sub>7</sub> 等的作用关系密切。E<sub>7</sub> 基因作为 HPV16 的主要转化基因, 既能与 Ras 基因协同作用, 又可灭活抑癌基因 Rb 的功能, 成为 HPV16 感染细胞发生转化、癌变及恶性表型维持的基础<sup>[2,3]</sup>。

HPV16 湖北株(HB 株)是 1994 年于中国湖北地区一宫颈癌组织 DNA 中分离并鉴定的 HPV16 变异株。经 DNA 测序分析表明该病毒 E<sub>7</sub> 基因第 43 位谷氨酰胺密码子发生无义突变, 此突变使 E<sub>7</sub> 蛋白由标准时 98 个氨基酸残基截短为 43 位氨基酸残基的 E<sub>7</sub> 蛋白<sup>[4]</sup>。为探讨 HB 株 E<sub>7</sub> 基因及蛋白的性质, 我们将 HPV16 HB E<sub>7</sub> 基因由重组质粒 pUC18 E<sub>7</sub> 上亚克隆到原核表达载体 pWR590-1 上, 获得重组质粒 pWHBE<sub>7</sub>, 该质粒在大肠杆菌中可高效表达融合蛋白 lac-E<sub>7</sub>(含 590 个 lacZ 的氨基酸和 43 个 E<sub>7</sub> 的氨基酸残基)。该融合蛋白在细菌中以包含体形式存在于胞浆中, 用 8 mol/L 脲溶的方法提取能简便制备该蛋白。这种融合蛋白可作为 E<sub>7</sub> 抗原, 由于动物的免疫接种, 为从免疫学角度探讨 HPV16 与宫颈癌间的关系以及 HPV 疫苗的研制提供了前提条件。

## 材料和方法

### 1 细菌和质粒

宿主菌 JM109、重组质粒 pUC18E<sub>7</sub> 由本室保存。pWR590-1 质粒由中科院上海细胞生物所郭礼和教授赠送; 标准 HPV16 E<sub>7</sub> 单抗由美国 NIH 郑志明博士赠送。

收稿日期: 1997-12-11, 修回日期: 1998-02-16

\* 湖北省科委“八五”重点攻关课题

## 2 重组质粒的构建

用限制性内切酶 EcoR I、Hind III 双酶切重组质粒 pUC18 E<sub>7</sub>, 将完整的 HBE<sub>7</sub> 基因切下并连接到表达载体 pWR590-1 的相应位点上。转化 *E. coli* JM109 后, 经 α-互补以及质粒 DNA 酶切分析筛选并鉴定阳性重组质粒。

## 3 重组质粒的诱导表达以及 Western blot 分析

将含阳性重组质粒的 *E. coli* JM109 单菌落接种于 LB 培养液中, 经 37℃ 过夜培养后, 将菌液接种于新鲜 LB 培养液中, 继续 37℃ 振荡培养 3 h 后, 用 IPTG 继续诱导培养 2 h。将上述菌液制成全菌裂解液, 加入等量 2× SDS 上样缓冲液后, 进行 8% SDS-PAGE。同时按常规方法进行 Western blot 分析结果。

## 4 包含体的提取<sup>[5,6]</sup>

制备 50 mL 经 IPTG 诱导培养过夜的前述菌液, 4℃ 下收获细菌, 菌体沉淀按 3 mL/g(湿重)的量加入裂解液, -20℃ 下反复冻融后经超声碎菌处理。以 12 000 r/min 4℃ 下离心 10 min, 菌体沉淀用 0.1% (V/V) Tween20 和 1 mol/L 脲各洗涤二次。用 8 mol/L 脲溶解沉淀, 以 12 000 r/min 离心 20 min 收集上清。取 10 μL 上述菌液加入等体积 2× SDS 上样缓冲液后沸水浴 5 min, 进行 8% SDS-PAGE 电泳。

# 结 果

## 1 重组质粒的构建和鉴定

为了获得含 HPV16 HBE<sub>7</sub> 完整基因的重组表达质粒, 将 pUC18 E<sub>7</sub> 中的 E<sub>7</sub> 基因亚克隆到原核载体 pWR590-1 上, 位于 lacZ 基因的下游。用 EcoR I、Hind III 双酶切重组质粒, 以鉴定是否存在 E<sub>7</sub> 基因(约 300 bp) DNA 片段的插入。结果表明 HBE<sub>7</sub> 基因已克隆到 pWR590-1(约含 4.7 kb)上, 该重组质粒命名为 pWHBE<sub>7</sub>。见图 1。

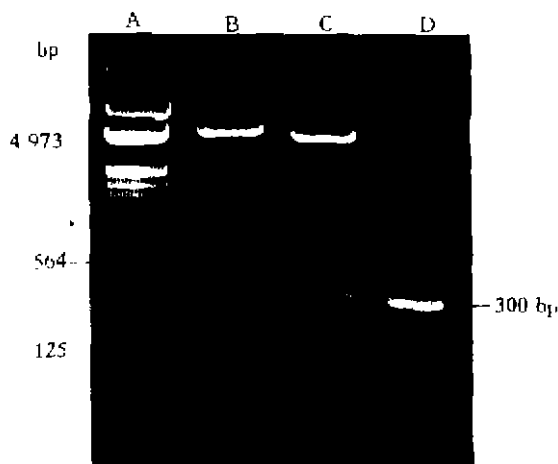


图 1 pWHBE<sub>7</sub> 的限制酶切鉴定

Fig. 1 Restriction endonuclease analysis of pWHBE<sub>7</sub>,  
lane A: DNA EcoR I/Hind III marker;  
Lane B: pWR590-1 EcoR I;  
lane C: pWHBE<sub>7</sub> EcoR I/Hind III;  
Lane D: HPV16 E<sub>7</sub> PCR production.

## 2 重组蛋白的表达

pWHBE<sub>7</sub> 可表达生成一个含 633 个氨基酸残基的融合蛋白 lac-E<sub>7</sub>(其中 E<sub>7</sub> 蛋白占 43 个残基), 经理论计算该融合蛋白分子量为 69 kD。将含 pWHBE<sub>7</sub> 的 *E. coli* JM109 菌液培养后制成的全细菌裂解液进行 8% SDS-PAGE, 结果可见生成了一条新的蛋白条带, 其分子量约 70 kD, 与理论值一致, 并且经 IPTG 诱导 2 h 后, 其产量明显增加。凝胶经光密度扫描测定 lac-E<sub>7</sub> 蛋白产量占细菌总蛋白量的 30% 以上。见图 2。

图2 lac-E<sub>7</sub> 蛋白的表达和 8% SDS-PAGEFig. 2 Expression of lac-E<sub>7</sub> protein and 8% SDS-PAGE

Lane M: protein marker;

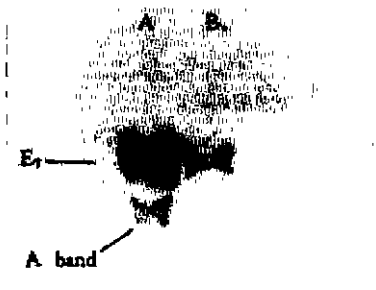
lane A: pWHB E<sub>7</sub> (no IPTG)lane B: *E. coli* JM109;

lane C: pWR590-1

lane D: pWHB E<sub>7</sub> (IPTG induced 2 hours)

### 3 重组蛋白的 Western blot 分析

为测定 lac-E<sub>7</sub> 融合蛋白的抗原性和生物活性, 我们进行了蛋白印迹分析。结果表明, lac-E<sub>7</sub> 能与标准 E<sub>7</sub> 单抗反应而于 NC 膜上发生显色反应, 这说明该蛋白保留 HPV16 E<sub>7</sub> 蛋白的抗原性或决定簇。在 IPTG 诱导后, 该 NC 膜显色增强, 在主显色带远端又生成一分子量稍小且较弱的蛋白显色条带, 称为 A 带 (Additional band)。见图 3。

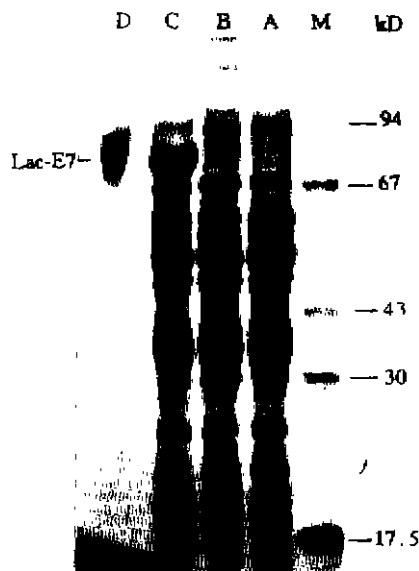
图3 lac-E<sub>7</sub> 融合蛋白的 Western blot 分析Fig. 3 Analysis of lac-E<sub>7</sub> fusion protein by Western blotlane A: *E. coli* JM109 transfected with pWHBE<sub>7</sub> (IPTG induced 2 hours)lane B: *E. coli* JM109 transfected with pWHB E<sub>7</sub> (no IPTG)

### 4 lac-E<sub>7</sub> 包含体的提取

lac-E<sub>7</sub> 融合蛋白在 *E. coli* 中高效表达 (达细菌总蛋白量的 30% 以上), 推测它将以包含体形式存在于细菌胞浆中。经超声波碎菌、离心、洗涤及 8 mol/L 脲溶的方法简便的提取并纯化了该融合蛋白。见图 4。

## 讨 论

目前依据 DNA 杂交及序列分析已鉴定了 77 种 HPV 型别。其中与恶性肿瘤关系密切的 HPV16 型的 E<sub>6</sub>、E<sub>7</sub> 等癌基因已被克隆。大量研究已证实 HPV16 E<sub>7</sub> 基因及蛋白在宫颈癌发生、发展中具有关键作用。E<sub>7</sub> 基因全长 296 bp, 其表达水平与其转化功能密切相关, 而且其转录剪切形式的不同造成产物产量的变化<sup>[7]</sup>。E<sub>7</sub> 蛋白由 98 个氨基酸残基组成, 分子量约 11 kD,

图4 lac-E<sub>7</sub> 包含体的提取Fig 4 Extraction of lac-E<sub>7</sub> inclusion body

lane M: protein marker;

lane A: *E. coli* JM109 infected with pWR590-1;lane B: *E. coli* JM109;lane C: *E. coli* JM109 infected with pWHB E<sub>7</sub>;lane D: lac-E<sub>7</sub> inclusion body

N端的37个氨基酸残基中含有Rb结合区及细胞激酶II磷酸化位点;C端60个氨基酸残基含锌指结构并与E<sub>7</sub>蛋白稳定性有关<sup>[8]</sup>。E<sub>7</sub>蛋白能抑制Rb基因的功能,并与胞内的p107、p130蛋白、Cyclin A等多种因子结合而促发转化、永生化培养细胞的作用,构成HPV16致癌机制的中心环节。

众所周知,HPV自身存在广泛变异,已证实HPV16存在5个系统发育分支<sup>[9]</sup>。HPV的变异性对相关疾病的防治及疫苗研制均具有重要意义。HPV16湖北株的E<sub>7</sub>基因存在突变,其第43位密码子发生无义突变,造成E<sub>7</sub>蛋白由98个氨基酸残基截短为仅含N端43个残基的多肽。为探讨HPV16 HB株E<sub>7</sub>蛋白的性质,我们将HPV16 HB E<sub>7</sub>基因克隆到原核载体pWR590-1上,由此获得能高效表达lac-E<sub>7</sub>融合蛋白的重组质粒pWHB E<sub>7</sub>。在IPTG诱导下,lac-E<sub>7</sub>产量可达细菌总蛋白量的30%。Western blot分析表明lac-E<sub>7</sub>蛋白可被标准E<sub>7</sub>单抗识别,说明该蛋白仍保留E<sub>7</sub>蛋白的抗原性,这与Stacey<sup>[10]</sup>提出E<sub>7</sub>蛋白的N端是主要的B细胞识别区的结论一致,这对于HPV16抗原性的研究具有重要意义。同时Western blot中出现的A带,由于它可被IPTG诱导并且分子量约64~65 kD,故分析其来源可能为:(1) lac-E<sub>7</sub>融合蛋白在细菌蛋白酶作用下的裂解产物;(2) lac-E<sub>7</sub>的同源蛋白产物;(3) 抗原抗体的交叉反应。对于A带蛋白的性质有待进一步研究。

目前认为基因工程菌中外源蛋白产量占总量的20%以上时,由于表达部位的低电势以及蛋白自身的特性,造成重组蛋白与杂蛋白、核酸等形成不溶性聚合物包含体<sup>[11,12]</sup>。鉴于lac-E<sub>7</sub>蛋白的高产量,我们利用离心、洗涤、脲溶的方法,简便地提取了lac-E<sub>7</sub>蛋白。在提取过程中均采用适量β-ME,以还原融合蛋白中的错配二硫键并提高溶液pH值,促进包含体的溶解并保护其生物活性。

HPV具严格的嗜上皮性,难以在组织培养系统中生长、增殖。利用基因克隆技术,我们构建的pWHE E<sub>7</sub>能高效表达lac-E<sub>7</sub>融合蛋白,克服了HPV抗原成分制备上的困难,为进一步研究HPV的抗原性以及机体的免疫反应提供了前题条件。

## 参 考 文 献

- 1 Zur Hausen H. Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1996, 1288: F55 - 78
- 2 De Geest K, Bergman CA, Turyk ME *et al*. Differential response of cervical intraepithelial and cervical carcinoma cell line to transforming growth factor- $\beta$ . *Gynecol. Oncology*, 1994, 55: 376 - 385
- 3 Chen LP, Thomas EK, Hu SL *et al*. Human papillomavirus type 16 nucleoprotein E<sub>7</sub> in a tumor rejection antigen. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1991, 88: 110 - 114
- 4 伍欣星, 赵文先, 丁晓华. 中国地方株人乳头瘤病毒 16 型 E<sub>7</sub> 基因一级结构及变异. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1996 (6): 395 - 398
- 5 Shepherd PS, Tran TT, Rowe AJ *et al*. T cell response to the human papillomavirus type 16 E<sub>7</sub> protein in mice of different haplotypes. *J Gen Virol*, 1992, 73: 1269 - 1274
- 6 Jochmus-Kudielka I, Scheniden A, Braun R *et al*. Antibodies against the human papillomavirus type 16 early proteins in human sera: correlation of anti-E<sub>7</sub> reactivity, 1989, 81: 1698 - 1703
- 7 Liu ZJ, Ghai J, Ostrow RS *et al*. The expression levels of the human papillomavirus type 16 E<sub>7</sub> correlate with its transforming potential. *Virol*, 1995, 207: 260 - 270
- 8 苏应斌, 赵文先. 人乳头瘤病毒 E<sub>7</sub> 蛋白的研究进展. *《国外医学》分子生物学分册*, 1995, 17(2): 62 - 65
- 9 Yamada T, Wheeler CM, Halpern A *et al*. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E<sub>6</sub>, L2 and L1 coding segments. *J Virol*, 1995, 69: 7743 - 7753
- 10 Stacey SN, Eklund C, Jordan D *et al*. Scanning the structure and antigenicity of HPV 16 E<sub>6</sub> and E<sub>7</sub> oncoproteins using anti-peptide antibodies. *Oncogene*, 1994, 9: 635 - 645
- 11 唐松山, 刘钟滨. 大肠杆菌外源基因表达产物的下游技术. *《国外医学》遗传学分册*, 1995, 18(3): 124 - 127
- 12 Marston FAO. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 1986, 240: 1 - 12

## Cloning and Expression of E<sub>7</sub> Gene of Human Papillomavirus Type 16 (HB Strain)

Zhao Min    Wu Xinxing    Zhao Wenxian

(Virus Research Institute, Hubei Medical University, Wuhan 430071)

**Abstract** HPV 16 (HB strain) E<sub>7</sub> gene was cloned into expression vector pWR590-1 by gene cloning technique. Recombinant plasmid pWHB E<sub>7</sub> was obtained by analysis of restrictional endonuclease. 70 kD HPV 16 (HB strain) E<sub>7</sub> fusion protein was expressed by *E. coli* JM 109 transfected with pWHB E<sub>7</sub>. The recombinant protein could be recognized by standard E<sub>7</sub> monocloned antibody in Western blot. The production of E<sub>7</sub> recombinant protein was more than 30 percent of total *E. coli* protein by induction of IPTG. The E<sub>7</sub> fusion protein existing in inclusion body in *E. coli* could be conveniently extracted and purified.

**Key words** HPV, Cloning expression, Fusion protein, Inclusion body, HPV E<sub>7</sub> protein