

## 利用重组 HPV16L1 抗原检测宫颈癌抗 L1 或 VLP 抗体的对比\*

栾 怡, 于修平, 宋长芹, 卞继峰, 赵蔚明, 贾继辉, 周亚滨, 齐 眉

(山东大学医学院微生物学教研室, 山东济南 250012)

### Comparison of Detection Antibodies to *Human papillomaviruses* 16 L1 in the Cervical Cancer People with Different Recombinant Antigen

LUAN Yi, YU Xiu-ping, SONG Chang-qin, BIAN Ji-feng, ZHAO Wa-ming, JIA Ji-hui, ZHOU Ya-bin, QI Mei  
(Department of Microbiology, Shandong University Medical College, Jinan 250012, China)

**Abstract:** In order to use major capsid protein L1 of *Human papillomaviruses* (HPV)16 produced in a fused form in *E. coli* and HPV16 L1 VLP produced in recombinant adenovirus in 293 cells as antigen to detect antibodies of HPV 16 L1 in the cervical cancer people, and compare the serological difference of the two antigen in the diagnosis of cervical cancer, we used PCR to amplify HPV16L1 gene from the cervical cancer, then cloned into pUC18-T. After DNA sequencing, HPV16L1 gene was cloned into pGEX-2T expressing vector, and induced by IPTG to express in *E. coli* as glutathione-S-transferase-L1 (GST-L1) fusions and purified to near homogeneity as antigen, together with HPV16 L1 VLP produced in recombinant adenovirus in 293 cells, to test antibodies of human-papillomavirus (HPV)16 L1 of 12 cervical cancer and 53 blood donors. The gene derived from the cervical cancer HPV16 genome was 1535 bp in length, and expressed by *E. coli* to the full-length 83 kD polypeptide, which recognized by HPV16L1 monocloned antibody. In the 12 cervical cancer sera, there were 7 positive in HPV16L1 antibody (58.3%); while 8 positive in HPV16L1 VLP antibody (66.7%). Among 7 positive in anti-HPV16 L1 using HPV16L1 protein from the *E. coli* as antigen, all are positive when using HPV16L1-VLP as antigen. While among 5 negative in anti-HPV16 L1 using HPV16L1 protein from the *E. coli* as antigen, there is 1 positive when using HPV16L1-VLP as antigen. There are no difference between two group as antigens in ELISA detection. ( $P > 0.05$ ) Our research suggested that HPV 16 is highly associated with cervical cancer. The sensitivity of the test is the same whether using HPV16L1 protein from the *E. coli* or HPV16L1-VLP as antigens. To detect HPV16L1 antibody is helpful to diagnosis cervical cancer.

**Key words:** *Human papillomavirus*; HPV16L1; HPV16L1 VLP; ELISA

**摘要:** 为了评价重组大肠杆菌表达的 HPV16L1 蛋白和重组腺病毒表达的 HPV16L1-VLP 两种抗原在检测宫颈癌抗 16 L1 或 VLP 抗体及在宫颈癌血清学诊断意义上的差别,应用 PCR 技术从宫颈癌组织的 DNA 中扩增出全长 1535bp 的 HPV16L1 基因片段,克隆至 pUC18-T 载体中,进行 DNA 测序鉴定。然后,将 HPV16L1 基因克隆至 pGEX-2T 表达载体中,并诱导表达 HPV16L1 融合蛋白,分子量为 83kD,能被 HPV16L1 单克隆抗体所识别。经 GST 柱层析法纯化后,与重组腺病毒表达的 HPV16L1-VLP 分别经酶联免疫吸附(ELISA)法检测 12 份宫颈癌患者和 35 份献血员血清。12 例宫颈癌血清标本中,抗 HPV16L1 蛋白的抗体阳性率为 7 例(占 58.3%);抗 HPV16L1-VLP 的抗体阳性率为 8 例(占 66.7%)。经大肠杆菌表达的重组抗原 HPV16L1 检测为 HPV16 抗体 IgG(+)的 7 份患者血清,利用 HPV16L1-VLP 试剂盒检测均阳性;经大肠杆菌表达的重组抗原检测为 HPV16 抗体 IgG(-)的 5

收稿日期:2002-03-14, 修回日期:2002-04-26

\* 基金项目:山东省卫生厅青年基金资助(981010101)

作者简介:栾 怡(1971-),女,山东省济南籍,讲师,硕士,从事医学微生物学教学与科研。E-mail: yiluan@yahoo.com.cn

份患者血清,利用 HPV16L1-VLP 试剂盒检测有 1 份阳性。两者对 HPV16 抗体的阳性检出率并无显著差异( $P > 0.05$ )。本实验结果说明 HPV16 与宫颈癌高度相关,利用大肠杆菌表达的重组抗原 HPV16L1 和 HPV16L1-VLP 重组抗原检测抗体的敏感性并不受影响。利用重组抗原 HPV16 L1 对宫颈癌的抗体进行定性、定量分析有助于该疾病的诊断。

**关键词:** 乳头瘤病毒;HPV16L1;HPV16L1-VLP;酶联免疫吸附法

**中图分类号:** R373 **文章标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2002)04-0308-04

宫颈癌是最为常见的女性恶性肿瘤之一,人类乳头瘤病毒(*Human papillomavirus*, HPV)致瘤株感染可致宫颈癌,该病毒经性传播,是发达和发展中国家常见的感染。在加拿大和美国性生活活跃的年轻女性中感染率高达 25%。在 50% 的宫颈癌中可检出 HPV 16,而在另外的 30% 中为 HPV 18、HPV 31 和 HPV 45。

HPV 晚期区基因编码壳蛋白,包括病毒主要壳蛋白(L1)和病毒次要壳蛋白(L2),病毒蛋白 L1 的功能是装配病毒体外层的衣壳,具有属特异性,L2 具有型特异性。这两个基因当病毒 DNA 在宿主细胞内扩增到相当高水平时才表达,即在病毒生活周期的晚期才表达。天然 HPV 16 L1 的表达通常是在终端分化的角质化上皮组织的基底细胞中,这大大限制了对 L1 蛋白分子的生物学研究以及对天然 HPV16 生活史及其疫苗的研究。

在宫颈癌的诊断中,HPV 16 L1 和 HPV 16 L1-VLP 的抗体是重要的实验室检查指标之一。传统上检测抗 HPV 16 L1 抗体多用基因工程表达的 HPV 16 L1 蛋白,又可分为原核细胞和真核细胞表达抗原之分,其中真核细胞表达 HPV 16 L1 可自行组装成病毒样颗粒,是优良的检测抗原。但其制备较为复杂,成本较高,难以纯化,也难以对抗原-抗体之间的分子作用作进一步研究。因此,我们尝试用大肠杆菌高效表达的重组抗原 HPV16L1 检测抗体,以替代价格昂贵的 HPV 16 L1-VLP 作为诊断抗原。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与标本

蜡块包埋的宫颈癌组织来自山东大学齐鲁医院病理科,经脱蜡,蛋白酶 K 消化后,提取核酸标本。PCR 检测筛选 HPV16 DNA 阳性的标本<sup>[1]</sup>。原核表达质粒 pGEX-2T 由美国陈健行教授惠赠。含编码人乳头瘤病毒 16 型 L1 全长 DNA 质粒 pHX16L1 由于修平教授构建;各种工具酶、Marker、辣根过氧

化物酶标记的羊抗鼠/人 IgG 购自华美公司。鼠 HPV16L1 单抗购自 Merck 公司。Taq DNA 多聚酶, *EcoR* I 内切酶, *Sma* I 内切酶, T4 DNA 连接酶均购自 Promega 公司。工程菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  和 JM109 菌株为本实验室保存。宫颈癌血清来自山东大学齐鲁医院检验科和济南市妇幼保健院,35 份正常对照血清取自献血员。

### 1.2 以宫颈癌 DNA 标本为模板扩增 HPV16 L1 片段

引物设计根据 HPV16 L1 基因序列,上游引物序列: 5'-CGC GAA GCT TAT GTC TCT TTG GCT GCC TAG-3', 下游引物: 5'-CGC GAT CGA TTT ACA GCT TAC GTT TTT TCG-3', 扩增片段 1535bp。PCR 扩增条件:先经 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 然后经 94 $^{\circ}$ C 1 min $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C 2min $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 3min, 扩增 35 个循环,最后经 72 $^{\circ}$ C 5min 结束,1.2% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

### 1.3 RCR 产物的基因克隆与序列测定

PCR 扩增的 HPV16L1 片段直接克隆至 pUC18-T 载体,转化 DH5 $\alpha$ , 蓝白斑筛选挑选阳性菌落,经 *EcoR* I 和 *Sma* I 双酶切与 pGEX-2T 连接。连接产物转化 JM109 菌,经双酶切和特异性 PCR 鉴定重组质粒。对阳性克隆中含有的 cDNA 片段进行 DNA 测序鉴定,按通用引物 ABI 公司荧光标记末端终止物循环测序法进行。

### 1.4 重组融合蛋白在大肠杆菌的表达、鉴定与纯化

挑取经鉴定后的重组克隆 pGEX-HPV16L1 于 LB/Amp 培养液、37 $^{\circ}$ C 培养至 OD 值为 0.6, 以 IPTG 诱导表达过夜。全菌蛋白进行 12% SDS-PAGE 电泳,重组蛋白经电泳后转印至硝酸纤维素膜,用含 3% BSA 的 PBS(pH7.4)封闭 1 h;而后依次加入鼠抗 HPV16L1 单抗、HRP 标记兔抗鼠 IgG 抗体,加入 DAB 显色,分析重组融合蛋白的抗原特异性。收集菌液,重悬于 PBS 中,超声破碎,用含 8 mol/L 尿素的裂解缓冲液溶解包含体,而后加入 900  $\mu$ L 氧化还原缓冲液进行复性。将样本液反复

流经平衡后的 GST 亲和层析柱,再用含 5 mmol/L 还原型谷胱甘肽的 PBS 溶液洗脱柱上的融合蛋白,收集洗脱液,按 1:4 稀释至包被液(pH 9.8),100 $\mu$ L 包被酶标板。

### 1.5 HPV16-VLP 的制备

293 细胞在 MEMF11 + 10% BSA 培养基中形成单层,将 TCD<sub>50</sub> 为 6 的重组腺病毒 rAd5HPV16L1-E7<sup>[2]</sup> 感染的 293 细胞至细胞出现 CPE。收集病毒感染的细胞,弃上清,反复冻融 5 次。细胞裂解液溶于碳酸盐缓冲液(pH 9.5)中,系列对倍稀释,方阵滴定测其工作浓度。

### 1.6 利用重组抗原 ELISA 法检测宫颈癌的抗体

重组融合抗原和 HPV16-VLP 分别用包被缓冲液(碳酸氢钠缓冲液 pH 9.5)调节至其工作浓度,4 $^{\circ}$ C 过夜(16 h)。而后依次加入被检血清、HRP 标记兔抗人 IgG 抗体,加显色剂 3,3-二氨基联苯胺和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,3~5 min 后加入 0.1 mL 2mol/L 硫酸终止反应,经酶联免疫检测仪测 490 nm 吸光度。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的构建与鉴定

PCR 的方法以宫颈癌 DNA 标本为模板扩增 HPV16 L1 片段,长约 1.5 Kb。测序结果表明,除引物设计的添加核酸序列外,核苷酸序列与 GenBank 中的人 HPV16L1 基因序列一致。pGEX-HPV16L1 重组质粒 DNA 经 PCR 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳,大约在 1.5 kb 处可见清晰的特异性扩增条带(图 1)。

### 2.2 HPV16L1 重组融合蛋白的表达、纯化

pGEX-HPV16L1 在大肠杆菌经 IPTG 诱导表达的菌液经 10% SDS-PAGE 电泳显示在相对分子量约 83 kD 处有一浓染蛋白条带(载体表达的谷胱甘肽-S-转移酶为 26 kD,HPV16L1 蛋白为 57 kD),而未经 IPTG 诱导的菌体蛋白在此处呈阴性(图 2)。经 GST 层析柱纯化后,获得纯化的融合蛋白,蛋白质印迹(WB)实验可见被鼠抗 HPV16L1 单抗识别,但其下方有降解的蛋白条带(图 3)。

### 2.3 HPV16-VLP 的制备及其工作浓度

重组腺病毒 rAd5HPV16L1-E7 感染的 293 细胞,2d 细胞出现 CPE。透射电镜观察到细胞裂解液中含 VLP,另有论文报导<sup>[2]</sup>。测其 ELISA 工作浓度为 1:16。

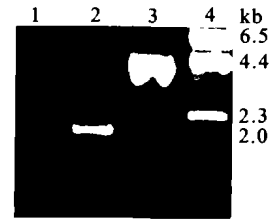


图 1 HPV16L1 PCR 扩增产物与重组子酶切鉴定的电泳图  
Fig.1 Pattern of PCR amplified products of HPV 16 L1 gene and recombinant plasmid after digestion of enzyme  
1, PCR amplified products of HPV16L1 gene from cervical cancer; 2, PCR amplified products of HPV16L1 gene from recombinant plasmid; 3, Recombinant plasmid after digestion of *EcoR* I/*Sma* I; 4, DNA marker.

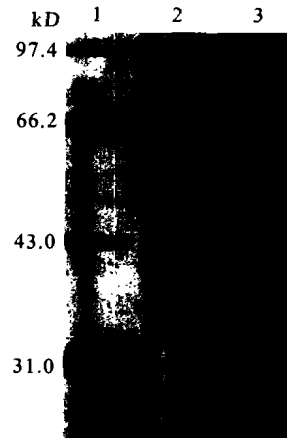


图 2 重组融合蛋白 GST-HPV16L1 电泳  
Fig.2 The SDS-PAGE of GST-HPV16L1 fusion protein  
1, Protein marker; 2, The lysis of *E. coli* JM109; 3, The lysis of *E. coli* JM109 containing pGEX-2T-HPV16L1 plasmid (IPTG Induced).

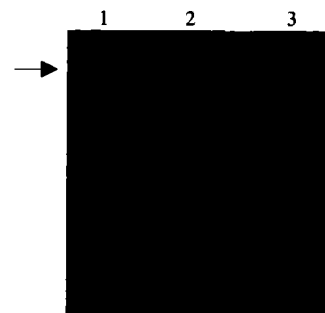


图 3 GST-HPV16L1 重组融合抗原的免疫印迹  
Fig.3 Immunoblotting of GST-HPV16L1 fusion protein  
1-2, The lysis of *E. coli* JM109 containing GST-HPV16L1 protein; 3, The lysis of *E. coli* JM109.

### 2.4 重组融合抗原和 VLP 检测抗血清

ELISA 法检测结果显示,12 例宫颈癌血清标本中,抗 HPV16L1 蛋白的抗体阳性率为 7 例(占

58.3%);抗 HPV16L1-VLP 的抗体阳性率为 8 例(占 66.7%)。经大肠杆菌表达的重组抗原 HPV16L1 检测为 HPV16 抗体 IgG(+)的 7 份患者血清,利用 HPV16L1-VLP 试剂盒检测均阳性;经大肠杆菌表达的重组抗原检测为 HPV16 抗体 IgG(-)的 5 份患者血清,利用 HPV16L1-VLP 试剂盒检测有 1 份阳性。两者对 HPV16 抗体的阳性检出率并无显著差异( $P>0.05$ )。本研究将同一份血清标本检测 10 次,所得结果的 CV 值为 10.5%;将同一份血清分装冻存标本在 3 个月内检测 10 次,所得结果的 CV 值为 11.4%,表明本研究建立的重组抗原 ELISA 检测法重复性和精确性较好。

### 3 讨论

目前,ELISA 检测 HPV16L1 抗体是一种简便、快速、灵敏度高的方法。HPV16L1 基因表达成 VLP,aa 突变区自 83~97,似乎影响到 L1 的表达。研究表明:应用基因重组法在昆虫细胞表达六株 HPV16 的 L1 主壳蛋白,不同株间的变化范围自 aa 1~79 不等,L1 主壳蛋白与原型比较多至 15 个 aa 的不同。用 IgG 特异酶联免疫吸附法检测抗 HPV16 VLPs 的血清活性,结果发现三种株间的 VLP 有强交叉反应,虽然这三种株种的 L1 氨基酸差异多达 14 个,血清学仍有交叉反应,提示自一种 HPV16L1 基因产生的 VLP 可能足供制备疫苗和血清试验之用<sup>[3]</sup>。所以,本研究用组织来源的 HPV16L1 基因表达的蛋白对于血清学检测及疫苗研制是适用的。

pGEX-2T 是一种融合基因原核表达载体,它的组成元件中含有强启动子 tac 及 Lac 操纵基因、SD

序列、Lac I 阻遏蛋白基因等,SD 序列下游就是 GST(谷胱甘肽 S-转移酶)基因,GST 基因下游的多克隆位点上有编码凝血酶(thrombin)识别位点的序列,外源基因在此插入,高效表达的融合蛋白可用 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析纯化,用凝血酶水解回收外源蛋白。我们构建的 GST-HPV16L1 融合蛋白表达载体 pGEX-2THPV16L1,可高效表达此融合蛋白并获得一定数量的纯品。

本研究大肠杆菌表达的 HPV16L1 融合蛋白与真核细胞表达的 HPV16VLP 用于 ELISA 检测抗原没有差异,说明 HPV16L1 融合蛋白除具有线性免疫表位外,还有 VLP 相关的立体构象免疫表位。这一推论得到国外研究的证实:大肠杆菌高效表达的 HPV16L1 蛋白形成病毒衣壳的五邻体组装单位,但尚未组装成完整的病毒样颗粒。其免疫原性和免疫反应性与 VLP 相同,完全可以代替 VLP 用于疫苗设计和检测抗原<sup>[4]</sup>。

### 参考文献

- [1] 栾 怡,卞继峰,宋长芹,等. 宫颈癌组织中 HPV16E6 的基因克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 山东医科大学学报, 2000, 38:120-122.
- [2] 卞继峰,于修平,齐 眉,等. HPV16L1-E7 重组腺病毒 rAd5HPV16L1-E7 的构建及克隆表达[J]. 山东医科大学学报, 2000, 38:113-116.
- [3] Touze A, El Mehdaoui S, Sizaret P Y, *et al.* The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 16 variants affects yield of virus-like particles produced in an insect cell expression system [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36:2046-2051.
- [4] Chen X S, Garcea R L, Goldberg I, *et al.* Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16 [J]. Mol Cell, 2000, 5:557-567.