

pEGFP-HPV16 E7 重组融合蛋白质粒的构建及其表达*

左泽华, 李 辉, 伍欣星**

(武汉大学医学院病毒学研究所分子生物学研究室, 湖北武汉, 430071)

Expression of Recombinant pEGFP-HPV16 E7 in Eukaryocyte

ZUO Ze-hua, LI Hui, WU Xin-xing**

(Virus Research Institution of Medical College, Wuhan University Wuhan 430071, China)

Abstract: In order to make bases for construction of animal tumor model which expresses EGFP-HPV16E7, recombinant expression plasmid was constructed by techniques of gene recombination after screening and identifying by restriction and PCR. Then the recombinant was transfected into mouse liver cancer cell by techniques of gene transfection and detected expression by fluoroscopy. pEGFP-HPV16 E7 was identified by enzyme digestion and PCR. The resent showed that the length, inserted location and direction of the target gene was correct and the expression of EGFP in transfected cell was observed. Because of it's pEGFP-HPV16E7 expression plasmid that makes it easy to assess the expression of EGFP- HPV16E7 fusion protein and to sift the transfected cells.

Key words: *Human papillomavirus*; Eukaryotic expression; Expression vector; *e7* gene;

摘要: 应用基因重组技术, 构建增强绿色荧光蛋白(EGFP)与人乳头瘤病毒 16 型 E7 (HPV16E7) 的重组融合表达质粒, 经限制性内切酶酶切鉴定和 PCR 分析后, 用基因转染技术将其导入小鼠肝癌细胞, 荧光显微镜下观察融合蛋白的表达。酶切鉴定和 PCR 分析证实重组质粒中插入目的基因片段的大小、方向和插入位点均正确, 在转染的小鼠肝癌细胞中观察到绿色荧光蛋白的表达。构建的 pEGFP-HPV16E7 融合表达质粒能直观地反映转染细胞中 EGFP-HPV16E7 融合蛋白的表达。由于转化率与表达率融为一体, 故有利于对转染细胞的筛选, 缩短转染细胞在体外的筛选的时间适用于对 HPV16E7 分子生物学特性、致癌机理及 APC 提呈等的研究。为建立表达 HPV16E7 的实体瘤动物模型奠定了基础。

关键词: 人乳头瘤病毒; 表达载体; 基因转染; 真核表达

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 04-0344-04

人乳头瘤病毒 (*Human papillomavirus*, HPV) 16 型是一种重要的致病因子, 与人子宫颈癌的发生、发展密切相关。HPV16e7 是潜在的致癌基因^[1], 其编码的产物可与细胞内癌基因和抑癌基因相互作用而使细胞失去正常功能, 从而促使肿瘤发生^[2] 导致细胞恶变。为了解 HPV16 e7 癌基因的分子生物学特性、在细胞转化过程中的作用及其在抗原提呈细胞中的亚细胞定位以便了解抗原提呈过程, 以及便于转染细胞的筛选, 本实验构建了 pEGFP-HPV16E7 表达载体, 并对其在真核细胞中

的表达情况进行了检测。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒 pDNA3.1(ysE7)为本实验室构建并保存, pEGFP-C1 为中国科学院水生生物研究所汪亚平博士惠赠, 在该质粒载体的 *EcoR* I 和 *BamH* I 之间插入 16 型人乳头瘤病毒 *e7* (HPV16E7) 开放读框, 约 300 bp; DH5 α 菌株由本室保存; 小鼠肝癌细胞 H22 由华中科技大学同济医学院冯作化教授赠送。

收稿日期: 2002-12-18, 修回日期: 2003-02-19

* 基金项目: 湖北省自然科学基金资助 (97J077)

作者简介: 左泽华 (1972-), 男, 湖北省籍, 硕士研究生。

** 通讯作者: 伍欣星 (1957-), 女, 浙江省籍, 教授, 博士生导师, 从事分子病毒研究。Correspondence author.

1.1.2 限制性内切酶、RNA 酶、DNA Marker、TaqDNA 聚合酶、T4DNA 连接酶以及 MEM 细胞培养基、新生牛血清 (GIBCO)、脂质体 (DOSPER Liposomal Transfection Reagent) 均购自华美公司。

1.1.3 扩增 HPV16E7 基因片段的上、下游引物序列, 由武汉金贝生物科技有限公司合成。

Primer 1: 5' GGAATTCTATGCATGGAG 3'

Primer 2: 5' GGGATCCTATGGTTTC 3'

1.2 实验方法

1.2.1 质粒 pcDNA3.1-ysE7 和 pEGFP-C1 的小量制备^[3]

1.2.2 PCR 扩增 HPV16 E7 基因片段及回收: 在 0.5mL Eppendorf 管中依次加入 10×Buffer 5μL, 10×dNTP 5μL(终浓度 200μmol/L), HPV16 e7 Primer 1, 2 各 1μL(约 30pmol), 模板 pcDNA3.1-ysE7 1μL(约 0.1μg), ddH₂O 31μL 混匀, 加 TaqDNA 聚合酶 1U, 石蜡油 40μL。按下列条件循环 30 次, 94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1min, 最后延伸 5min。扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将扩增的产物 300bp DNA 片段经低熔点琼脂糖回收。

1.2.3 pEGFP-HPV16E7 表达质粒的构建: 用碱裂解法提取质粒 pEGFP-C1 DNA, 经 *EcoR* I/*Bam*H I 双酶切, 回收 4.7kb 的大片段; 纯化的 *e7* DNA 经相同的酶双酶切后, 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 按目的片段与载体 3:1 摩尔比将 *e7* 基因插入 pEGFP 的 *EcoR* I 与 *Bam*H I 两个酶切之间。氯化钙法将连接产物导入大肠杆菌 DH5 α, 随机挑取抗

性克隆, 碱裂解法提取重组质粒, 并用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 进行双酶切鉴定。

1.2.4 重组质粒转染小鼠肝癌细胞: 采用脂质体转染法。将 3×10^6 个肝癌细胞悬于 1mL 无血清 MEM 培养基中, 转种于 6 孔培养板。1.5μg 重组质粒 DNA 和 6μL DOSPER 分别用 HBS 稀释至 50μL, 再将两液温和混匀, 于室温放置 15min。将 100μL DNA/脂质体复合物逐滴滴加入细胞悬液中, 同时温和和摇动培养板混匀。37℃ 温育 6h 后, 更换 2mL 新鲜培养基 (含谷氨酰胺), 继续培养 48h, 48h 后在荧光显微镜下观察重组质粒的表达情况。

1.2.5 转染细胞 E7 mRNA 的检测: 按照 Trizol 试剂盒说明, 室温下离心收集转染细胞约 5×10^6 个细胞提取细胞总 RNA。在上述 RNA 提取物中, 取 10μL 进行逆转录, 方法见参考文献^[4]。

1.2.6 表达检测: 收集 5×10^6 转染的 H22 细胞用 PBS 洗细胞 2 次, 室温丙酮固定 30 min, PBS 振洗, 细胞涂片在荧光显微镜下用 488 nm 激发波长观察, 表达 EGFP-E7 的细胞应出现绿色荧光。

2 结果

2.1 pEGFP-HPV16E7 表达重组质粒的构建

用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切 pcDNA3.1-ysE7 的 PCR 产物, 得到预期的约 300bp 片段, 同时用相同的双酶将 pEGFP-C1 切开。在 T4 连接酶的作用下, HPV16 *e7* 基因插入 pEGFP 中, 构建的重组质粒命名为 pEGFP-HPVE7, 见图 1。

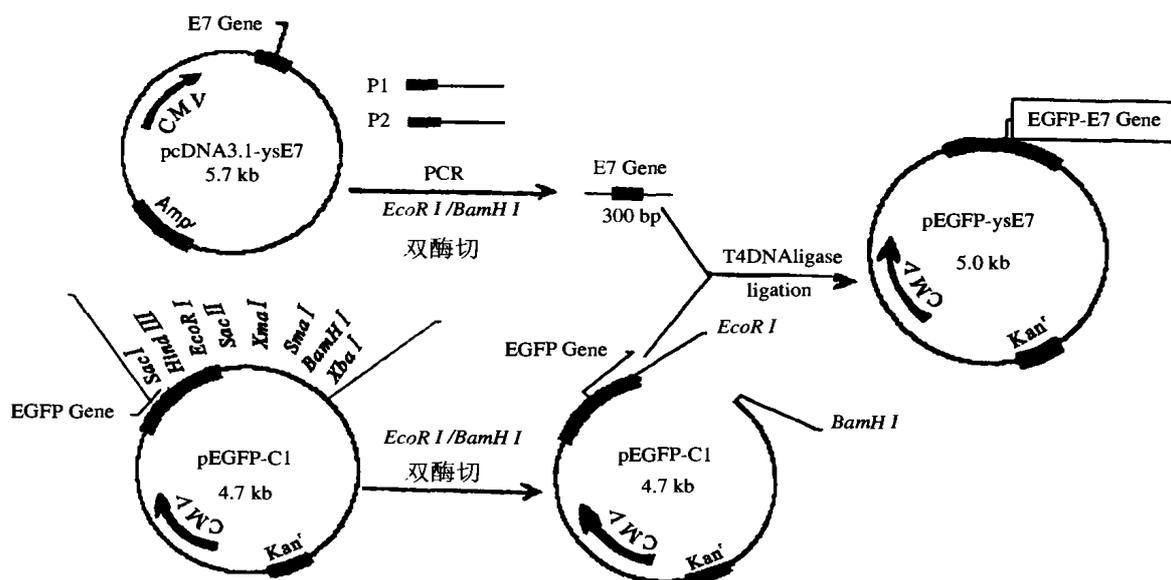


图 1 pEGFP-HPV16E7 的构建图

Fig.1 Construction of pEGFP-HPV16E7

2.2 重组体平板筛选及 PCR 鉴定

将构建的重组 DNA 转化大肠杆菌, 在含卡那霉素的 LB 培养板上, 随机挑取 12 个单菌落, 培养后提取质粒 DNA, 以此质粒 DNA 为模板, 用特异性 HPV16 *e7* 引物进行聚合酶链反应, 同时设立阴性对照, 阴性对照模板为空载体 pEGFP。结果重组质粒 pEGFP-HPV16E7 有特异性扩增产物, 其长度约为 300 bp, 空载体 pEGFP 的 PCR 结果为阴性, 见图 2。

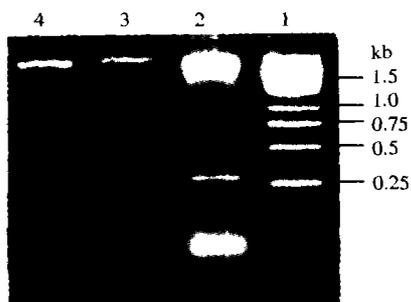


图 2 pEGFP-HPV16E7 酶切鉴定

Fig.2 Identification of pEGFP-HPV16E7 enzyme digestion

1. DNA Marker; 2. pEGFP-HPV16E7: *EcoR* I+*Bam*H I; 3. pEGFP-HPV16E7: *Bam*H I; 4. pEGFP-HPV16E7: *EcoR* I.

2.3 pEGFP-HPV16E7 重组表达质粒的酶切鉴定

取初筛后的两个质粒 DNA 及空载体作双酶切 (*EcoR* I/*Bam*H I)。1%琼脂糖电泳,紫外透射反射检测仪上观察可见一条 300 bp 的目的片段和 4.7 kb 的载体片段, 与预期的结果相符, 表明 HPV16 *e7* 已

被插入到 pEGFP 中, 并经测序分析证实。将该重组载体命名为 pEGFP-HPV16E7。

2.4 RT-PCR 结果分析

收集转染的 H22 细胞约 5×10^6 个, 提取总 RNA 进行逆转录 PCR, 可扩增出长度为 300bp 的特异性条带即 HPV16 *e7* cDNA (图 3)。

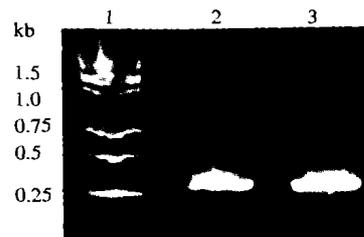


图 3 转染细胞的 RT-PCR 鉴定

Fig.3 RP-PCR identification in transfected cell

1. Marker; 2. pEGFP-HPV16E7 RT-PCR product; 3. pDNA3.1(ysE7) product (positive).

2.5 绿色荧光蛋白的表达

肝癌细胞 H22 在 pEGFP-HPV16E7DNA 转染 48 h 后, 在荧光显微镜下观察, 发现约 5% 的细胞表达 EGFP, 表现为细胞发出明亮的绿色荧光。此外, 还可见到个别发出弱绿色荧光的细胞。未转染的正常肝细胞未见绿色荧光, 见图 4。

3 讨论

人乳头瘤病毒 (HPV) 是一种嗜上皮性 DNA 病毒, 由两条互补 DNA 链构成, 长约 8 kb, 基因



图 4 转染细胞表达 GFP, 图示阳性细胞发出绿色荧光, 其周边为阴性细胞 (10×40)

A, 可见光下细胞; B, 可见光+紫外光下细胞; C, 紫外光下细胞。

Fig.4 GFP expression in transfected cell. The positive cells can give off green fluorescent light and the negative cells around it (10×40)

A. Cells in visible light; B. Cells in visible and ultra-violet light; C. Cells in ultra-violet light.

组中共有 8 个主要的开放读框, 其中 *e7* 开放读框为调节病毒生长的编码区, 目前已鉴定出 100 多种 HPV 基因型, 多数具有特异性的感染部位和特征性的临床表现^[5-7]. 已有文献报道在生殖器、口腔和皮肤的鳞状细胞癌损害中检测出 HPV16^[8, 9], 提示它可能在这些恶性肿瘤的发生学中具有重要意义. 由于发现在宫颈癌组织和细胞株中能选择性地保留和表达 HPV16 *e7*, 而且转染 HPV16 *e7* 的一些上皮细胞能够获得永生, 这种永生细胞如在活化 *ras* 或其它因素的协同作用下还可发生转化, 因而认为, *e7* 是 HPV16 的主要功能区. 其作用表现在参与了肿瘤形成的多个阶段, 包括诱导细胞永生化和分化抑制、协同作用使永生细胞发生转化、并维持转化细胞的恶性表型. 并且 HPV 转化细胞能将出现在肿瘤细胞核内或胞浆中的病毒转化蛋白提呈到细胞表面供免疫系统识别^[2], 由于 E7 蛋白在宫颈癌细胞中持续表达^[10], 因而可作为 HPV 感染后的外来抗原, 激发免疫应答, 产生抗 HPV 相关肿瘤的作用. 为了便于研究 HPV16 *e7* 癌基因的分子生物学特性、与细胞转化的关系、APC 细胞在递呈 E7 抗原中的作用, 以及构建治疗性 DNA 疫苗的靶细胞模型. 我们构建了 HPV16 *e7* 的真核表达重组质粒, 实验所选择的 pEGFP 载体中带有增强绿色荧光蛋白 (EGFP) 序列, 这是一种新型的报告分子, 在暴露于紫外线后即可发出明亮的绿色荧光, 可在荧光显微镜下观察到. EGFP 作为一种新型的报告基因具有许多优越性: 它的分子量较小, 对细胞无毒性, 不干扰标记蛋白的功能和定位; 另外 EGFP 是目前唯一能在异源细胞内表达后自发产生荧光的蛋白、不需辅助因子的参与、直接用于活体检测的报告基因; 可以说通过 EGFP-融合基因的检测是当前研究活体细胞中基因表达和蛋白质分布的最好手段^[11, 12]. 而现在常用的报告分子如氯霉素乙酰基转移酶、 β -半乳糖苷酶、细菌荧光素酶、萤火虫荧光素酶基因等, 基因的活性测定都需要底物和辅助因子的参与, 且步骤烦琐, 不能用与活体测定. 我们通过基因重组技术成功构建了 pEGFP-HPV16E7 表达载体, 并转染肿瘤细胞, 在荧光显微镜下观察到发出绿色荧光的细胞, 提示转入的质粒已在细胞中表达出 EGFP-HPV16E7 融合蛋白. 由于这种载体在转染细胞后很快就能通过观察荧光细胞而检测出基因的表达情况, 转化率即为表达率, 因而为基因转染研究中确定转染效率、HPV16E7 的表达情况、在组织中的分布及转染阳性细胞的筛选^[13]等提供了直观的靶标记, 有望被应用于

对 HPV16E7 分子生物学特性、致癌机理及基因免疫等的研究.

致谢: 感谢中国科学院水生生物研究所汪亚平博士赠送 pEGFP-C1 质粒; 华中科技大学同济医学院冯作化教授赠送 H22 细胞; 武汉大学医学院人解与组织胚胎系的宋健教授在荧光检测中给予的帮助.

参考文献

- [1] De villers E M. Heterogeneity of the human papillomavirus group[J]. *J Virol*, 1989, 63: 4898-4903.
- [2] Meneguzzi G. Immunization against human papillomavirus type 16 tumor cells with recombinant vaccinia viruses expressing E6 and E7[J]. *Virology*, 1991, 181: 62-69.
- [3] 伍欣星, 聂广. 医学分子生物学原理与方法[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 318-319.
- [4] 金冬雁, 黎梦枫. 分子克隆实验指南[M]. 第二版, 北京: 科学出版社, 1995. 683-684.
- [5] Androphy E J. Molecular biology of human papillomavirus infection and oncogenesis[J]. *J Invest Dermatol*, 1994, 103: 248-256.
- [6] Boyer S N, Wazer D E, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway[J]. *Cancer Res*, 1996, 56: 4620-4624.
- [7] Kleter B, van Doorn L J, Schrauwen L, *et al*. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus[J]. *J Clin Microbiol* 1999, 37: 2508-2517.
- [8] Zerbass K, Schulze A, Spitkovsky D, *et al*. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation[J]. *J Virol*. 1995, 69: 6389-6399.
- [9] Matlashewski G, Schneider J, Banks L, *et al*. Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated *ras* in transforming primary cells[J]. *EMBO J*, 1987, 6: 1741-1746.
- [10] Pater M, Pater A. Human papillomavirus type 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix[J]. *Virology*, 1985, 145: 313-318.
- [11] Yang T T, Cheng L Z, Kain S R. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein[J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24: 4592-4593.
- [12] Plautz J D, Day R N, Dailey G M, *et al*. Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living *drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells[J]. *Gene*, 1996, 173: 83-87.
- [13] Van Tendeloo V F, Ponsaerts P, Van Broeckhoven C, *et al*. Efficient Generation of stably electrotransfected human hematopoietic cell lines without drug selection by consecutive FAC sorting[J]. *Cytometry*, 2000, 41: 31-35.