

• 论 著 •

HPV16E7 致癌相关位点的定向突变及其表达纯化

彭小丽¹, 郭龙华¹, 吴文权¹, 刘梦琼^{2△}

(1. 广东省深圳市龙华新区人民医院检验科 518109; 2. 海南省人民医院检验科, 海口 570102)

摘要:目的 研究定点突变 HPV16E7 基因中与转化有关的位点, 原核细胞表达突变后的 HPV16E7 的表达及其免疫原性。方法 在引物内设计突变位点, T 载体克隆全部与转化有关的全长 HPV16E7 基因, 然后亚克隆构建 pET-28a-HPV16E7 质粒(命名为 pET-28a-HPVm16E7), 转化 E. Coli BL21 细菌, 在异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导下表达 HPVm16E7 蛋白, 用 HPV16E7 单克隆抗体对其进行 Western Blot 分析。结果 DNA 测序证明了构建的 pET-28a-HPVm16E7 是正确的, 转化细菌后能够表达 HPVm16E7 蛋白, 并能与不同的 HPV16E7 单抗抗体反应。结论 在引物中设计突变位点能够定向突变 HPV16E7 与转化有关的位点, 原核表达的 HPVm16E7 不影响其免疫原性, 增加了基于 HPV16E7 的疫苗的安全性。

关键词:人乳头瘤病毒; 定点突变; 免疫原性**DOI:**10.3969/j.issn.1672-9455.2016.14.026 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2016)14-1975-03**Study on the site-directed mutagenesis, expression and purification of HPV16E7 oncogenic sites**PENG Xiaoli¹, GUO Longhua¹, WU Wenquan¹, LIU Mengqiong^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Longhua New District, Shenzhen, Guangdong 518109, China; 2. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Hainan, Haikou, Hainan 570102, China)

Abstract: **Objective** To explore the related sites of transformation in site-directed mutagenesis of HPV16E7 gene and to study the expression and immunogenicity after the mutation of HPV16E7 in prokaryotic cell. **Methods** Mutated sites were designed in the primer. Full length HPV16E7 gene were cloned by T carrier. Then the plasmid of pET-28a-HPV16E7 was subcloned (named pET-28a-HPVm16E7), and the bacteria of E. Coli BL21 were transformed and induced by isopropyl thiogalactoside (IPTG) to express HPVm16E7 protein. The protein was analyzed by Western Blot using monoclonal antibody of HPV16E7. **Results** DNA sequencing showed that pET-28a-HPVm16E7 was direct. The bacteria after transformation could express HPVm16E7 protein and react with different kinds of HPV16E7 monoclonal antibodies. **Conclusion** Mutated sites designed in the primer can make the mutation and transformation of HPV16E7 gene directionally. Expression of HPVm16E7 in prokaryotic cells would not influence the immunogenicity while increase the security of HPV16E7 vaccine.

Key words: human papilloma virus; site-directed mutagenesis; immunogenicity

人乳头瘤病毒(HPV)是一类寄生于鳞状上皮的 DNA 病毒, 属于嗜上皮性病毒, 在人和动物中广泛分布^[1], 基因组编码 8 个开放读码框架, 按功能不同分为 3 个区: (1) 早期区, 含 6 个开放读码框架 (E1、E2、E4、E5、E6、E7); (2) 非编码区, 为基因转录复制调控区; (3) 晚期区, 含 L1 (主要衣壳蛋白) 和 L2 (次要衣壳蛋白) 两个开放读码框架, 编码病毒 2 个衣壳蛋白^[2]。其中 E6 和 E7 主要与病毒细胞转化功能及致癌性有关, 为增殖性 HPV 的主要转化蛋白。E7 蛋白与视网膜母细胞蛋白(RB)反应是 E7 转化的关键。高危型 HPV16E7 与抑癌基因 P53 及 RB 结合力强, 易与宿主 DNA 整合^[3]。因此, E7 蛋白在癌变中有着重要意义, 是宫颈癌免疫治疗的重要靶点^[4-5], 目前已有一些治疗性疫苗, 如多肽、蛋白、重组病毒载体和纳米疫苗等, 正在临床研究, 一些进入了临床 I / II 期, 然而以 E7 癌基因设计的 DNA 疫苗实验显示, 该基因在接受和表达 E7 的细胞中仍然具有很强转化危险^[6-7]。本研究在 HPV16E7 致癌基因的基础上, 通过对 HPV16E7 基因中与宿主 RB 蛋白结合区域进行定点突变获得去转化活性的 HPV16E7 突变体 (HPV16mE7), 通过原核细胞表达获得 HPV16mE7 目的蛋白, 为基于 HPV16E7 疫苗打下基础。

1 材料与与方法

1.1 HPV16E7 基因来源 HPV16 基因组从海南省中医院妇产科门诊确诊感染 HPV 的女性患者标本中提取的, 用特异

性引物 PCR 扩增 HPV16E7 基因, PCR 产物与 T-Vector 相连, 测序证明为野生型 HPV16E7 基因, 命名为 pT-HPV16E7。

1.2 方法

1.2.1 HPV16mE7 的获得 HPV16E7 蛋白含 98 个氨基酸, 包含 a、b、c 三个区, 本研究将在 a 区对氨基端 21、24 和 26 的氨基酸突变, 即 DLYCYEQ 到 GLYGYGQ, 以减少转化活性和增强抗原性。在 C 区, 修订 2 个锌指结合基序, 即 C61-G61、C94-G94。突变按 TaKaRa 公司突变试剂盒说明书进行操作。以 pT-HPV16E7 为模板, 按重叠 PCR 方式, 以引物 PM1-F、PM1-R 为引物进行 PCR, 其产物与 T-Vector 相连, 测序正确的质粒命名为 pT-16E7m1, 其他的突变按上述方法进行, 最后的突变命名为 pT-HPV16mE7。HPV16E7 突变引物设计见表 1。

1.2.2 构建 pET-HPV16mE7 表达载体 以表 1 中的引物和 pT-HPV16mE7 为模板, 以保证 Pyrobest DNA 酶 PCR 扩增, 用 BamH I 和 Hind III 同时酶切纯化后的 PCR 产物和载体 pET-28a(+), 然后用 T4 连接酶连接过夜, 转化感受态细胞 TOP10, 用卡那霉素进行筛选。提取质粒后, 用 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定, 测序正确的质粒的命名为 pET-28a-HPV16mE7。

1.2.3 阳性克隆菌鉴定 阳性克隆用菌落 PCR, 质粒双酶切和 DNA 测序证实。

1.2.4 重组蛋白优化诱导表达 挑取含重组质粒的阳性 BL21(DE3)菌置于新鲜含抗生素的 LB 液体培养基中,于 37 °C 250 r/min 剧烈振荡,培养过夜;当其 OD 值达到 0.6~0.8 时,用 IPTG(终浓度为 0.5 mmol/L)进行诱导,继续震荡培养 4~6 h, 10 000 r/min 离心 1 min,收集细菌重悬于 10 mL Buffer A(500 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 20 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 6 mol/L 尿素)中,超声破碎细胞,然后以 10 000 r/min 离心 20 min,收集上清液。采用 Ni-NTA His-Bind Resin 亲和纯化重组蛋白。

1.2.5 Western blot 检测 HPV16m7 目的蛋白 用 Western Blot 分析 HPV16mE7 蛋白,HPV16E7 的单抗购自 Santa Cruz 生物技术公司。用 ECL 试剂显色。

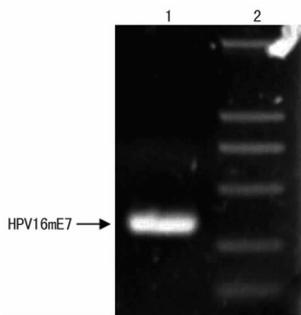
表 1 HPV16E7 突变引物

| 引物名称 | 序列 |
|---------------|--|
| HPV16E7-F | GAATTC GGATCC ATG CAT GGA GAT ACA CCT(BamH I) |
| HPV16E7-R | CTC GAG AAGCTT TTA TGG TTT CTG AGA ACA GAT(Hind III) |
| HPV16E7-pM1-F | GGT CTC TAC GGT TAT GGG C |
| HPV16E7-pM1-R | AGT TGT CTC TGG TTG CAA ATC |
| HPV16E7-pM2-F | AAG GGT GAC TCT ACG CTT CGG |
| HPV16E7-pM2-R | GCA ACA AAA GGT TAC AAT ATTGT |
| HPV16E7-pM3-F | CCC ATC GGT TCT CAG AAA CCA T |
| HPV16E7-pM3-R | GCA CAC AAT TCC TAG TGT GCC |

注:括号所示内切酶。

2 结 果

2.1 HPV16E7 PCR 产物 根据设计好的引物 PCR 扩增 HPV16E7 基因,条带位置与预期相符,结果见图 1。



注:1 为 PCR 产物;2 为 DL2000 DNA 标志物。

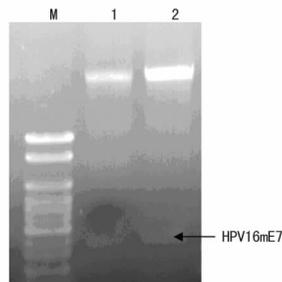
图 1 HPV16E7 的 PCR 产物

2.2 HPV16E7 突变获得 HPV16mE7 利用突变试剂盒,对 HPV16E7 的具有转化活性和增加免疫功能的位点进行突变,即 D21G、C24G、E26G、C61G 和 C94G。突变后 HPV16mE7 的氨基酸序列如下: A 区, MHGDTPTLHEYMLDLQ-PETTGLYGYGQLND S; B 区, SEEDEIDGPAGQAE PDRAH YNIVT FCCK; C 区, GDSTLRLCVQSTHVDIRT-LEDLLMGTLGIVCPIGSQKP。

2.3 pET-HPV16mE7 原核表达构建 用 BamH I 和 Hind III 对 pET-HPV16mE7 用双酶切进行鉴定和测序分析,测序证明全部序列与预期的一致。见图 2。

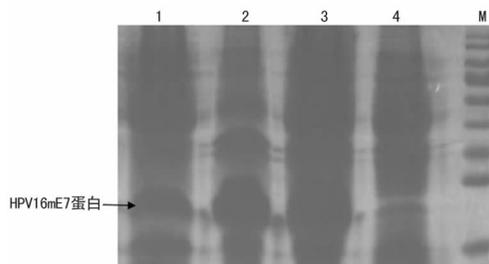
2.4 pET-HPV16mE7 原核表达 挑取 pET-28a-HPV16mE7 转化 E. coli BL21(DE3)的阳性菌落,并经酶切和测序,结果正确,阳性菌落进行摇菌生长,待菌液 OD 值为 0.6~0.8 时,利用 IPTG 进行诱导表达,IPTG 浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0

mmol/L,诱导时间为 6 h 后,收集菌体,重悬于裂解缓冲液中,超声破碎后离心收集沉淀部分,溶解包涵体,进行 SDS-PAGE 鉴定。图 3 结果显示,0.5 mmol/LIPTG 诱导可获得较高的表达量。



注:1 和 2 为 HPV16mE7 产物;M 为 DNA 标志物。

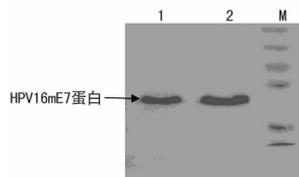
图 2 pET-HPV16mE7 重组质粒鉴定



注:1 为 1.0 mmol/L;2 为 0.5 mmol/L;3 为 0.2 mmol/L;4 为 0.1 mmol/L;M 为蛋白标志物。

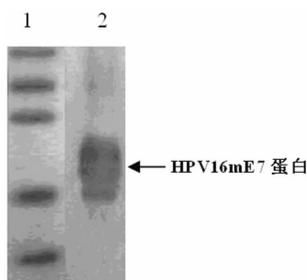
图 3 HPV16mE7 在不同浓度的 IPTG 诱导表达结果

2.5 HPV16mE7 目的蛋白纯化 将经酶切和测序正确的质粒转化 E. coli BL21(DE3),待菌液 OD 值为 0.6~0.8 时,用 0.5 mmol/L IPTG 进行诱导 4~6 h,收集菌体后重悬于裂解缓冲液中,超声破碎后离心收集沉淀部分,溶解包涵体,用于 Ni 离子亲和和层析柱纯化,分别用 60、100、150、200 mmol/L 咪唑洗脱样本,收集 150、200 mmol/L 咪唑洗脱液,然后进行透析,在透析过程中,逐步减少尿素的浓度和盐的浓度,冷冻干燥。吸取部分样本进行 SDS-PAGE 分析,结果显示,200 mmol/L 咪唑洗脱液样本纯度和浓度较高。见图 4。



注:M 为标志物;1 和 2 为 HPV16mE7 纯化产物。

图 4 HPV16mE7 目的蛋白纯化后 PAGE 分析



注:1 为蛋白标志物;2 为 HPV16mE7。

图 5 HPV16mE7 目的蛋白的 Western blot 分析

2.6 Western blot 结果 Western blot 分析纯化后的

HPV16mE7 目的蛋白,一抗为抗 HPV16E7 单克隆抗体,结果显示,可见 HPV16mE7 有表达,并且与预期的分子量一致,获得需要的目的突变蛋白,见图 5。

3 讨论

世界卫生组织建议在世界范围内开展宫颈癌的前期筛查。在欧美国家,由于宫颈癌前病变的筛查和治疗,其发病率已经得到大幅降低。临床实践表明,通过筛查可以较早地发现癌前期病变,从而可以及时有效地阻断癌前病变的恶化。目前,由于普查工作广泛开展和检测技术提高,早期检出率明显升高^[8]。宫颈病变发现越早,其治疗效果往往越好。据报道,宫颈浸润癌的 5 年生存率为 67%,宫颈早期癌变为 90%,而原位癌则可以到达 100%^[9]。因此,宫颈癌普查应早诊早治,从而降低宫颈浸润癌的发病率和病死率。

HPV 是一种能引起包括食管癌,尖锐湿疣,子宫颈癌等在内的多种良恶性病变重要病原体,其中 HPV16 与子宫颈癌关系最为密切。HPV16 感染引起子宫颈癌的漫长过程中,HPV16 E7 蛋白可以在感染的细胞内稳定持续表达,并通过与抑癌蛋白 RB 结合,促进其降解,并使细胞进入 S 期,引起细胞转化。研究表明,HPV16E7 蛋白存在有效的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞抗原表位,机体感染 HPV16 后可出现抗 HPV16 E7 抗体和细胞毒性 T 淋巴细胞 CTL 反应,因此,HPV16 E7 蛋白与宿主蛋白同源性低,且较保守,是理想的治疗性疫苗的靶标^[10-11]。

本研究首先从临床标本中利用 PCR 克隆 HPV16E7 目的基因,其序列与国内外诸多报道的 HPV16E7 序列相同,具有很好代表性和临床实际意义,也说明 HPV16E7 具有较高的保守性,有利于作为 HPV16E7 治疗型疫苗抗原的研究和应用。目前虽然已经有一些治疗性疫苗正在进行临床试验研究,但以 E7 癌基因设计 DNA 疫苗实验显示该基因在接受和表达其细胞中仍然具有很强转化危险。在兼顾靶向性、免疫原性和生物安全性方面考虑,本研究在已获得 HPV16E7 目的基因基础上,利用多重 PCR 扩增方式,通过对 HPV16E7 基因中与宿主 RB 蛋白结合区域进行修饰及对 E7 基因进行突变的方法来获得 HPV16mE7,以降低其转化活性。

HPV16mE7 突变体目的基因再亚克隆入 pET-28 a(+)原核表达载体中,成功构建 pET-HPV16mE7 重组表达载体,经双酶切和测序验证,结果与预期突变序列相符。在 0.5 mmol/L IPTG 浓度下在 DE3 中以包涵体蛋白形式高效表达带 His 标签目的蛋白 HPV16mE7,利用 Ni 离子亲和层析柱纯化,150~200 mmol/L 咪唑洗脱样本,透析后可获得较高纯度的目的蛋白。

提取包涵体所含有的外源蛋白质分子,首先必须采取措施溶解包涵体中的变性蛋白,进而将其完整的高级空间结构进行恢复,也就是实施复性操作的过程。将包涵体蛋白复性为完全的生物活性态是有难度的。低效率的复性也是许多外源基因在大肠杆菌中的表达产物难以有效制备或者造成损失的主要原因。尽管大肠杆菌表达外源基因时常会导致包涵体的形成并对后期重组蛋白的制备产生困难,但大肠杆菌表达系统仍然是目前重组蛋白生产的一条重要途径。本研究中采用亲和色谱(AFC)对变性蛋白进行了复性。与传统的稀释法和透析法相比,液相色谱复性的优点是:在进样后可很快的除去变性剂;由于色谱固定相对变性蛋白质的吸附可明显地减少、甚至完全消除变性蛋白质分子在脱离变性剂环境后的分子聚集,从而避

免了沉淀的产生,提高蛋白质复性的质量和活性回收率;在蛋白质复性的同时,可使目标蛋白质与杂蛋白分离达到纯化的目的,使复性和纯化同时进行;便于回收变性剂,降低废水处理成本。但 AFC 使用范围窄、所需时间长、价格昂贵。

经 Western Blot 证实所表达的目的蛋白与相应抗体具有较好的结合能力,表明该蛋白具有较好的免疫原性。由于大肠杆菌表达的蛋白易被脂多糖等热原质污染,本研究对收集的包涵体用异丙醇洗涤,有效去除了热原质。这为 HPVmE7 进行大量纯化并用于其他理化性质、生物学功能以及为后续疫苗的开发等研究奠定了基础。HPV16mE7 目的蛋白表达成功,为进一步深入研究 HPV16E7 的生物学功能打下坚实基础。

参考文献

- [1] 邹菁帆,许金全,李建明.同步放疗治疗局部晚期宫颈癌的临床疗效分析[J].现代生物医学进展,2010,10(12):2330-2332.
- [2] 孙晓梅,温宏武,廖秦平.新辅助化疗在宫颈癌治疗中的应用及疗效观察[J].中国妇产科临床杂志,2008,9(3):166-169.
- [3] 边爱平,赵倩,张君玲.腹腔镜与开腹手术对宫颈癌患者术后生存质量影响的对比分析[J].中国内镜杂志,2009,15(2):113-115,119.
- [4] Liu Y, Heilman SA, Illanes D, et al. p53-independent abrogation of a postmitotic checkpoint contributes to human papillomavirus E6-induced polyploidy [J]. Cancer Res, 2007,67(6):2603-2610.
- [5] Tritarelli A, Oricchio E, Ciciarello M, et al. p53 localization at centrosomes during mitosis and postmitotic checkpoint are ATM-dependent and require serine 15 phosphorylation[J]. Mol Biol Cell, 2004,15(8):3751-3757.
- [6] Zheng Y, Zhang YJ, Ma YD, et al. Enhancement of immunotherapeutic effects of HPV16E7 on cervical cancer by fusion with CTLA4 extracellular region[J]. J Microbiol, 2008,46(6):728-736.
- [7] Wang YT, Li WS, Liu QS, et al. Dendritic cells treated with HPV16mE7 in a three-dimensional model promote the secretion of IL-12p70 and IFN-gamma[J]. Exp Mol Pathol, 2011,91(1):325-330.
- [8] Khair MM, Mzibri ME, Mhand RA, et al. Molecular detection and genotyping of human papillomavirus of cancer from Moroccan women[J]. J Med Virol, 2009,81(4):678-679.
- [9] Murphy GP, Lawrence W, Lenhard RE, et al. American Cancer Society Textbook of Clinic Oncology[M]. Atlanta, GA: American Cancer Society, 1995.
- [10] 李艳佳,齐凤英,左连富,等. HPV16E7 基因疫苗诱导小鼠细胞免疫功能的实验研究[J]. 中国免疫学杂志, 2005, 21(5):340-342,344.
- [11] 左亚刚,王家璧,晋红中,等. 突变型与野生型 HPV16 DNA 疫苗的免疫原性[J]. 中国医学科学院学报, 2004, 26(5):554-557.