

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.08.004

## HPV16 E7 基因定向突变及表达产物免疫原性研究\*

张战锋<sup>1</sup>, 刘媛瑞<sup>2</sup>, 徐建华<sup>3△</sup>

(1. 广州中医药大学第一附属医院检验科, 广州 510405; 2. 南方医科大学南方医院检验医学部, 广州 510515; 3. 广州中医药大学第二附属医院/广东省中医院检验医学部, 广州 510120)

**摘要:**目的 对人乳头瘤病毒(HPV)16 E7 基因中与宿主 Rb 蛋白结合区域进行突变获得 HPV16 E7 突变体(HPV16mE7)序列, 原核表达获得 HPV16mE7 蛋白。方法 采用分子克隆技术扩增野生型 HPV 16E7 基因, 设计特异性引物对目的基因进行定点突变并构建表达质粒, 转化进入原核表达体系并通过 IPTG 诱导表达, 表达产物大小及纯度经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定, 免疫原性经蛋白免疫印迹法(Western blot)鉴定。结果 准确按照设计突变目的基因特定位点, SDS-PAGE 显示获得高纯度目的蛋白, Western blot 结果显示目的蛋白具有良好的免疫原性。结论 成功对 HPV16 E7 进行定点突变并获得纯度较高免疫原性良好的突变表达蛋白。

**关键词:**人乳头瘤病毒; 宫颈癌; 免疫治疗; 蛋白表达**中图分类号:**R737.33**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2019)08-1019-04**The study of specific mutation of HPV16 E7 gene and immunogenicity of expression product\***ZHANG Zhanfeng<sup>1</sup>, LIU Yuanrui<sup>2</sup>, XU Jianhua<sup>3△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine Guangzhou, Guangdong 510405, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Southern Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine/Traditional Chinese Medicine Hospital of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

**Abstract: Objective** To obtain purified HPV16mE7 protein based on the wild type HPV16 E7 gene.

**Methods** The wild-type HPV 16E7 gene was amplified by molecular cloning technology, and specific primers were designed to carry out site-directed mutagenesis of the target gene and construct expression plasmid, which was transformed into prokaryotic expression system and induced by IPTG to express product size and purity by sodium dodecyl sulfate. Identification by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), immunogenicity was identified by Western blot. **Results** Results sequences in the constructed plasmids were correct. The specific bands were identified by Western blot identification with specific HPV16 E7 protein antibody.

**Conclusion** Purified HPV16mE7 protein was made based on the correct site-directed mutation of wild type HPV16 E7 gene.

**Key words:** HPV; cervical cancer; immunotherapy; protein expression

宫颈癌是严重危害女性健康的女性生殖道第一大肿瘤性疾病, 但宫颈癌也是唯一可提前检测、可预防和可控制的肿瘤性疾病。研究发现, 人乳头瘤病毒(HPV)是引起宫颈癌发生发展的重要因素。HPV 是一类寄生于鳞状上皮的小 DNA 病毒, 基因组编码 9 个开放读码框架(E1、E2、E4、E5、E6、E7), 研究发现高型 HPV E6 和 E7 是导致宫颈癌发生、发展的两

个重要病毒蛋白, 所以 HPV E6 和 E7 不仅是 HPV 疫苗的主要作用位点, 同时也是目前宫颈癌免疫治疗研究中的重要靶点<sup>[1-2]</sup>。虽然免疫治疗在临床上的应用还未真正得到开展, 但是对这方面的研究却从未停止。以 E7 基因为靶点设计的 DNA 疫苗的实验显示, 该基因在细胞中的单独表达具有很强的转化危险<sup>[3]</sup>。鉴于此, 本研究中, 为降低其转化活性同时作为免疫

\* 基金项目: 创新强院青年科研人才培养项目(2015QN08)。

作者简介: 张战锋, 男, 主管技师, 主要从事病毒致病分子机制研究。△ 通信作者, E-mail: jhxxu1976@126.com。

治疗的靶点,笔者在 HPV16 E7 野生型基因基础上,通过特异性引物对 HPV16 E7 基因中主要引起宫颈上皮细胞内瘤变的区域进行突变的方法来获得 HPV16 E7 突变体(HPV16mE7)序列,通过原核表达体系,获得 HPV16mE7 目的蛋白,为后续的免疫治疗研究打下基础。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 原核表达质粒 pET-28(a+)和大肠埃希菌(E. coli) DH5α 以及蛋白表达菌株 BL21 (DE3) 均为本实验室保存。

**1.2 仪器与试剂** ABI 9700 PCR 扩增仪购自 ABI 公司;核酸凝胶电泳仪等购自美国 Bio-Rad 公司。DNA Ladder、质粒小提试剂盒、限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶等试剂盒均购自 Takara 公司;引物由 Life Tec 公司合成;HPV16 E7 特异性一抗和二抗均购自 Santa cruz 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 HPV16 E7 基因扩增** 使用潮州凯普试剂公

司的 21 种 HPV 分型检测试剂盒对妇产科门诊患者宫颈上皮细胞进行检测,挑选单独 HPV16 型感染患者标本进行病毒核酸提取,扩增 HPV16 野生型 E7 基因,将扩增产物和 T-vector 融合,构建 pT-HPV16 E7 质粒,并送由测序公司进行测序鉴定。

**1.3.2 HPV16 E7 基因突变** HPV16 E7 蛋白由 98 个氨基酸组成,包含 a、b、c 3 区,为减少其转化活性和增强抗原性,在 a 区对 21、24 和 26 位氨基酸进行定点突变,即 DLYCYEQ 到 GLYGYGQ。在 C 区,修订 C61-G61, C94-G94 锌指结合位点。突变按 TaKaRa 公司突变试剂盒说明书进行。使用 primer premier 5.0 设计 HPV16 E7 突变引物,见表 1。以 pT-HPV16 E7 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。

表 1 HPV16 E7 突变引物

引物名称	序列
HPV16 E7-F	GAATTC GGATCC ATG CAT GGA GAT ACA CCT( <i>Bam</i> H I)
HPV16 E7-R	CTC GAG AAGCTT TTA TGG TTT CTG AGA ACA GAT( <i>Hind</i> Ⅲ)
HPV16 E7-PM1-F	G GT CTC TAC GGT TAT G GG C
HPV16 E7-PM1-R	AGT TGT CTC TGG TTG CAA ATC
HPV16 E7-PM2-F	AAG GGT GAC TCT ACG CTT CGG
HPV16 E7-PM2-R	GCA ACA AAA GGT TAC AAT ATTGT
HPV16 E7-PM3-F	CCC ATC GGT TCT CAG AAA CCA T
HPV16 E7-PM3-R	GCA CAC AAT TCC TAG TGT GCC

注:斜体部分表示括号所示内切酶;\_表示突变碱基

**1.3.3 构建 pET-HPV16mE7 质粒** 以表 1 中的引物, pT-HPV16mE7 为模板,扩增 HPV16mE7 突变序列并纯化回收,对回收产物和载体同时进行酶切之后再用连接酶重组构建重组质粒。重组质粒化学法转化 TOP10 细胞,经卡那霉素平板筛选阳性菌落,增菌培养后提取质粒并经 *Bam*H I 和 *Hind*Ⅲ 双酶切鉴定进行初步重组质粒鉴定,质粒送 Life technology 公司测序鉴定,将测序正确质粒命名为 pET-HPV16mE7。

**1.3.4 pET-HPV16mE7 在原核细胞中诱导表达纯化及鉴定** 将 pET-HPV16mE7 质粒转化表达菌株,筛选转化成功菌株进行质粒提取并测序验证,使用 IPTG 对含目的质粒菌株进行诱导表达,采用 Ni-NTA His-Bind Resin 亲和纯化重组蛋白,通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对表达产物进行浓度检测,通过蛋白免疫印迹法(Western

blot)对表达产物免疫原性进行鉴定。

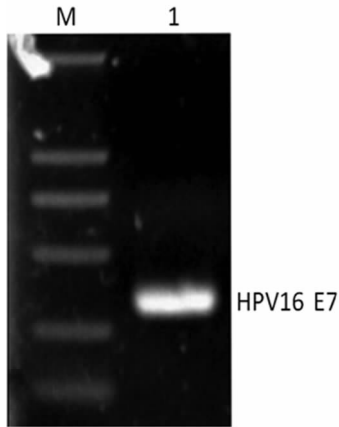
## 2 结果

**2.1 野生型 HPV16 E7 基因扩增** 根据设计好的引物,以 16 型 HPV 为模板,PCR 扩增 E7 基因,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果见图 1。

**2.2 pET-HPV16mE7 原核表达载体构建** 根据突变试剂盒,对野生型 HPV16 E7 的特定位点进行突变,即 D21G、C24G、E26G、C61G、C94G,突变后 HPV16mE7 的氨基酸序列见表 2 斜体标示。将 HPV16mE7 和 pET 质粒进行酶切、连接,构建 pET-HPV16mE7 重组质粒。用 *Bam*H 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一致,见图 2。

**2.3 pET-HPV16mE7 表达** 挑取含 pET-HPV16mE7 的 E. coli BL21(DE3)菌落进行摇菌生长,利用 IPTG 进

行诱导表达 (IPTG 水平分别为 0、1、0.2、0.5、1.0 mmol/L), 6 h 后收集菌体。对菌体进行超声裂解, 收集沉淀进行蛋白电泳鉴定。诱导产物中含有与目的蛋白相对分子质量一致的蛋白, 见图 3。



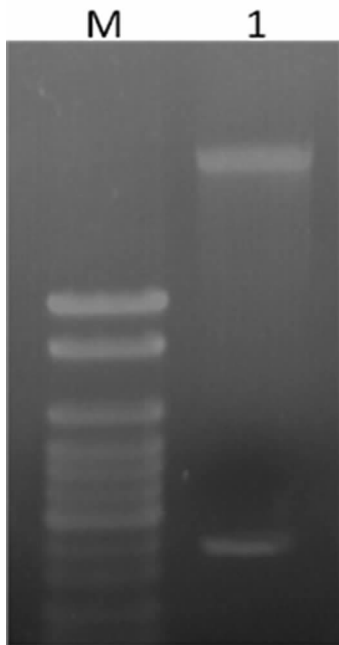
注: M 为 DL2000 DNA 标志物; 1 为野生型 HPV16 E7 基因扩增产物

图 1 HPV16 E7 的 PCR 产物

表 2 突变后 HPV16mE7 的氨基酸序列

区域	突变位点
A 区	MHGDTPTLHE <u>Y</u> MLDLQPET <u>T</u> GLYGYQLND S
B 区	SEEDEIDGPAGQAE PD <u>RAH</u> YNIVT <u>FCCK</u>
C 区	GDSTLRRCVQSTHVDIRTLLEDLLMGTLGIVCPIGSQK

注: 斜体部分表示括号所示内切酶; · 表示突变碱基

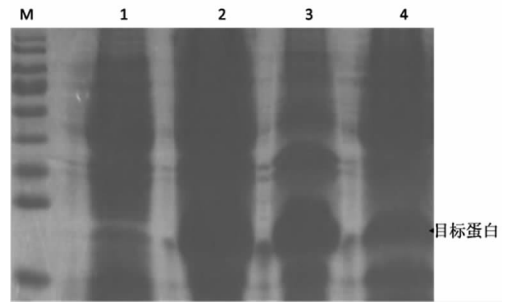


注: M 为 DNA 标志物; 1 为 pET-HPV16mE7 双酶切

图 2 酶切鉴定重组质粒 pET-HPV16mE7

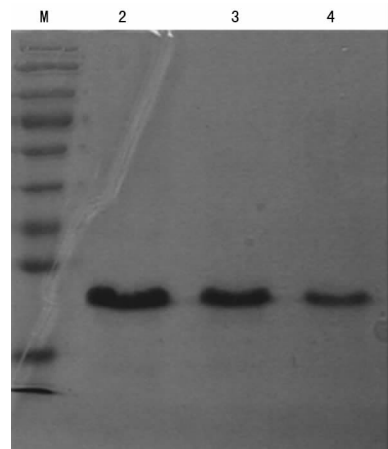
**2.4 HPV16mE7 目的蛋白纯化** 用于 Ni 离子亲和层析柱对 0.5 μmol/L IPTG 进行诱导 6 h 后的表达产物纯化, 分别用不同浓度咪唑 (100、150 和 200

mmol/L) 洗脱标本, 透析冷冻干燥。吸取部分标本进行 SDS-PAGE 分析, 100 和 150 mmol/L 咪唑洗脱液样本纯度较高, 见图 4。



注: M 为蛋白标志物; 1~4 为不同 IPTG 水平诱导产物

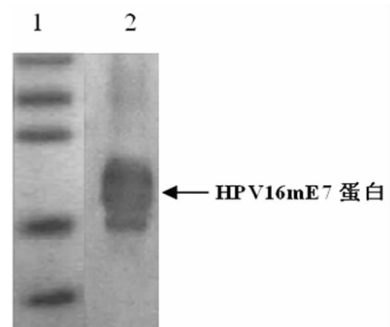
图 3 含有 pET-HPV16mE7 的 E. coli BL21 (DE3) 阳性菌落诱导表达结果



注: M 为 Protein 标志物; 2~4 为不同浓度咪唑洗脱液产物

图 4 HPV16mE7 目的蛋白纯化后电泳分析

**2.5 Western blot 结果** 使用 HPV16 E7 的特异性抗体对纯化产物进行 Western blot 检测, 可见到有特异性的条带出现, 并且与预期相对分子质量一致, 见图 5。



注: 1 为蛋白标志物; 2 为纯化产物的 Western blot 结果

图 5 纯化产物的免疫原性鉴定

### 3 讨 论

HPV 感染的预防和治疗正逐渐被人们重视。目前针对 HPV 的预防主要是疫苗接种, 但是疫苗接种重在预防, 而对已经获得感染的患者治疗效果并不理

想,并且由于抗病毒药物的种类较少,以及 HPV 主要感染宫颈上皮的特殊性,使得抗病毒药物很难作用于 HPV<sup>[4]</sup>。另外,鉴于 HPV 与宫颈癌发生、发展的重要相关性,越来越多的研究开始致力于 HPV 治疗性疫苗的开发<sup>[5]</sup>。16 和 18 型 HPV 被认为是导致宫颈癌的高危因素,主要是因为这两种型别 HPV 表达的 E6、E7 蛋白能够与宿主细胞内的抑癌蛋白(RB)结合,降低 RB 蛋白细胞内含量,从而对细胞周期的调控出现紊乱,导致细胞内瘤变甚至癌变的发生。正是 E7 蛋白在导致上皮细胞发生内瘤变甚至癌变方面的重要性,人们对该蛋白的研究不仅仅局限于肿瘤发生机制方面。研究发现,E7 蛋白本身存在有效的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞抗原表位,所以人体感染 HPV 后可出现针对 E7 蛋白的特异性抗体和细胞毒性 T 淋巴细胞反应,这个特点为 E7 蛋白能够成为理想的治疗性疫苗靶点提供了功能<sup>[6-7]</sup>。

本研究采用 HPV 分型检测试剂盒从临床标本中筛选单独 HPV16 型感染患者宫颈上皮细胞标本,从中提取病毒核酸组为模板,PCR 技术克隆 HPV16 E7 目的基因序列并进行定点突变处理。对 PCR 产物测序并与 NCBI 基因库进行比对,测序结果与国内外诸多已报道的 HPV16 E7 序列吻合,说明本实验中的 E7 基因序列具有较好的代表性,有利于 HPV16 E7 治疗型疫苗的研究和应用。鉴于 E7 蛋白作为治疗性疫苗理想型靶点的可能性,已有研究尝试以 E7 基因设计 DNA 疫苗作为治疗性疫苗的可行性,但实验显示该基因在其表达的细胞中仍然具有很强的转化危险<sup>[3-4]</sup>。根据 E7 基因及其编码蛋白的生物学功能特点,同时兼顾靶向性和生物安全性两方面因素,本研究在已获得 HPV16 E7 目的基因基础上,将 HPV16 E7 基因中与宿主 RB 蛋白结合区域进行修饰并对 E7 基因进行特异性突变(HPV16mE7),在不影响其免疫原性的前提下降低其转化活性。

利用双酶切、基因连接技术将 HPV16mE7 突变体克隆入原核表达载体 pET-28 a(+ )中,成功构建 pET-HPV16mE7 重组表达质粒,对重组质粒经双酶切和琼脂糖凝胶电泳鉴定,电泳结果与预期相符,可初步判断重组成功。重组质粒送生物公司测序验证,测序结果与美国国立生物技术信息中心(NCBI)基因库数据比对,测序数据与 HPV16 E7 基因序列基本相符,对不相符基因序列部分重点分析,发现为按照设计进行的特异性突变位点,说明本研究成功突变了 HPV16 E7 相应位点并获得完整的 pET-HPV16mE7 突变质粒<sup>[8-10]</sup>。对含有表达质粒的表菌株使用不同水平 IPTG 培养基诱导,对表达产物的相对分子量大小

小进行 SDS-PAGE 分析,结果显示在目的蛋白相对分子量大小相似位置有条带出现,并且在 0.5 mmol/L IPTG 水平诱导下该位置蛋白表达相对较高。对表达产物利用 Ni 离子亲和层析柱纯化,100 mmol/L 咪唑洗脱标本,透析获得目的蛋白。透析产物经 Western blot 使用特异性 HPV16 E7 抗体进行检测,可出现单一条带,证实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活性,可以用于基于此目的蛋白的后续研究。

综上所述,本实验结果为基于 HPV16 E7 的疫苗研究及 HPV16 E7 生物学功能的进一步研究打下基础。

### 参考文献

- [1] LIU Y W, HEILMAN S A, 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.
- [2] 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.
- [3] ZHENG Y, ZHANG Y J, MA Y D, 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.
- [4] 程琳, 张珉, 许天敏. 预防性 HPV 疫苗的临床应用进展及思考[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(2):328-331.
- [5] 王卡娜, 郗明蓉. HPV 治疗性疫苗研究现状[J]. *实用妇产科杂志*, 2017, 33(2):89-91.
- [6] 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.
- [7] 左亚刚, 王家璧, 晋红中, 等. 突变型与野生型 HPV16DNA 疫苗的免疫原性[J]. *中国医学科学院学报*, 2004, 26(5):554-557.
- [8] 黄灵, 潘超, 廉成翔, 等. 女性尖锐湿疣和宫颈上皮内瘤变 HPV16 型 E2、E6、E7 基因突变及 E6、E7 抗原表达[J]. *中国中西医结合皮肤性病学期刊*, 2016, 15(6):325-330.
- [9] 王华, 蔡红兵, 丁晓华. 湖北地区 HPV16 E7 和 E5 基因突变与宫颈病变的相关性[J]. *肿瘤防治研究*, 2011, 38(3):337-340.
- [10] 刘佳, 王言奎, 孙欣, 等. 青岛地区不同宫颈病变组织中 HPV16 E2 基因突变分析[J]. *现代妇产科进展*, 2012, 21(5):361-364.