基础研究 文章编号:0253-3626(2009)09-1215-03

HPV16E7 基因的原核克隆及表达

姜海蓉[1],彭方毅[1],刘 芳[2],杜志银[3],林治华[1],彭方亮[4],赵卫兵[5]

(1.重庆理工大学化学与生物工程学院,重庆 400050;2.重庆市江北区第一人民医院检验科,重庆 400020;3.重庆医科大学图书馆文献检索教研室,重庆 400016;4.重庆市第四人民医院妇产科,重庆 400014;5.重庆市第四人民医院麻醉科,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨从喉癌组织中 HPV16 E7 蛋白的原核克隆及表达。方法:采用 PCR 方法扩增 HPV16 E7 基因,经 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切后插入相同酶切 pET28a(+)载体,转化 JM109 感受态细胞,并进行阳性克隆筛选。经 IPTG 对重组质粒进行蛋白诱导表达,SDS-PAGE 和 Western blot 检测目标蛋白表达情况。结果:成功构建了原核表达质粒 pET28/E7、HPV16 E7 融合蛋白在 BL21(DE3)菌株中高效表达。结论:HPV16 E7 融合蛋白的表达为进一步深入研究 HPV16E7 蛋白的生物学特性及其致细胞转化的作用机制奠定了基础。

【关键词】HPV16E7;原核表达;SDS-PAGE;Western blot

【中国图书分类法分类号】R739.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-04-29

Prokaryotic cloning and expression of HPV16 E7 gene

JIANG Hai-rong, et al

(*School of Chemistry and Bioengineering, Chongqing University of Technology*)

【Abstract】*Objective*: To explore the cloning and expression of HPV16 E7 protein from laryngeal carcinoma. *Methods*: HPV16 E7 gene was amplified by PCR. The amplified fragment was inserted into the plasmid pET28a (+) digested with *BamH* Ⅰ and *Hind* Ⅲ. The recombinant plasmid pET28/E7 was transformed into E.coli JM109 which was selected with ampicillin. HPV16 E7 recombinant protein expression in the E.coli BL21 (DE3) was identified by SDS-PAGE and Western blot. *Results*: The prokaryotic recombinant plasmid pET28/E7 was successfully constructed. The BL21 (DE3) transformed recombinant plasmid pET28/E7 had expressed HPV16 E7 recombinant protein effectively. *Conclusion*: The construction of the prokaryotic recombinant plasmid pET28/E7 and the successful expression of the recombinant protein HPV16 E7 pave way for the profound research of the biological properties and the transformational mechanism of the HPV16 E7 protein on the specific cells.

【Key words】HPV16-E7;Prokaryotic Expression;SDS-PAGE;Western blot

喉癌是严重威胁人类生命健康的肿瘤之一,尤其是我国南方。这些地区平均死亡率为万分之七,男性发病率是女性的 10 倍。近几十年来,科学工作者对喉癌发病人群的生活习惯、自然地理环境、遗传因素[1-3]、微生物感染等进行了广泛的调查,但是确切的病因至今仍未完全明了。人乳头瘤病毒(Human papillomavirus,HPV)与喉癌的关系,一直是病因学研究的热点。自首次从喉癌中发现 HPV 以来,人们进行了广泛深入的研究,并取得了一些共识。分子生物学实验表明,高危型 HPV 中的两个重要早期基因,E6 和 E7 是两个主要的具有转化功能的病毒癌基因。它们除了整合入宿主 DNA,长期存在于基因组,干扰正常 DNA 外,还通过其编码的蛋白,参与细胞转化及癌变过程。E6 和 E7 通过与细胞内重要蛋白的相互作用发挥致癌功能。E7 蛋白主要通过与 Rb 结合,使 Rb 基因失活;E6 主要与 P53 结合,通过泛素依赖的途径使后者降解灭活。

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,HPV16 E7 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(Cytotoxic lymphocyte,CTL)

作者介绍:姜海蓉(1973-),女,硕士,研究方向:肿瘤分子生物学。

通讯作者:彭方亮,女,主治医师,E-mail:pfl1001@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30571714,编号:60873103);国家自然科学基金重点项目(30830090);重庆市科委自然基金(CSTC,2008BB5331);重庆市教委自然基金(KJ090614);重庆理工大学重点学科微生物与生化药学资助。

反应[4,5],因此,HPV16 E7 蛋白可能成为理想的治疗性疫苗。为研究 HPV16 E7 蛋白的理化和生物学特性,本研究对 HPV16 E7 蛋白进行了原核表达和鉴定,为下一步实验打下了良好基础。

1 材料与方法

1.1 标本

喉癌组织标本 DNA 的提取按常规方法进行(来源于重庆市第四人民医院手术切除标本)。

1.2 试剂

原核表达载体 pET28a(+),大肠杆菌 JM109,大肠杆菌 BL21(DE3)为本室保存。T4 DNA 连接酶和限制性内切酶 *BamH* Ⅰ,*Hind* Ⅲ,*Xho* Ⅰ均使用 Promega 公司产品。引物合成由北京华大基因公司完成。硝酸纤维膜、鼠源性抗 HPV16 E7 蛋白的多克隆抗体以及辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.3 引物设计及合成

引物:引用文献中的引物并通过国际互联网,在 Genbank 中检索出已发表的 HPV 各型完整的基因组序列核对无误。引物分别针对 HPV 的晚期区基因 HPV-16 的 E7 基因详见表 1。所用引物均由上海申能博彩公司合成。

1.4 实验方法

1.4.1 HPV16E7 基因扩增 所有 PCR 均采用 25 μl 反应体系:10×PCR buffer(2.5 μl);25 mmol/L Mg^{2+}(1.5 μl);10 mmol/L dNTP(0.5 μl);5 μmol/L Primer1(1.0 μl);5 μmol/LPrimer2(1.0 μl);TaqDNA polymerase(0.3 μl);TemplateDNA(2.0 μl);ddH_2O(16.2 μl)。阳性对照为含 HPV-16 全长的质粒,阴性对照不加模板。将上述各成分加入 0.5 ml PCR 反应管中,离心 10 s 甩下管壁上的残液,然后在 PCR 扩增仪上进行如下反应:94℃预变性 2 min,94℃变性 30 s,52℃复性 40 s,72℃延伸 45 s,共 39 个循环后,72℃再延伸 5 min。20 μl PCR 产物于 2.0%琼脂糖凝胶电泳,75 V,1 h 后在紫外灯下观察结果并拍照。

1.4.2 HPV16 E7 原核表达质粒的构建与鉴定 对 PCR 产物和 pET28a(+)质粒 DNA 分别采用 *BamH* Ⅰ和,*Hind* Ⅲ进行双酶切和琼脂糖凝胶电泳回收目的片段,将 HPV16 E7 基因插入 pET28a(+)质粒,连接产物转化 *JM109* 感受态细菌,挑取 Amp 筛选的阳性克隆并采用 *BamH* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ进行双酶切鉴定,最后将双酶切鉴定正确的质粒送上海生工测序,分析克隆基因序列组成及其阅读框架的正确性。取构建完成的 pET28/E7 质粒转化 BL21(DE3)感受态大肠杆菌并进行 *BamH* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切鉴定,得到含 pET28/E7 质粒的BL21(DE3) HPV16 E7 融合蛋白表达工程菌于 50%甘油、-70℃保存备用。

1.4.3 HPV16 E7 融合蛋白的制备和纯化 取酶切鉴定正确的阳性克隆菌 20 μl,加到含 50 μg/ml Amp 的 2 ml LB 中,37℃过夜培养。次日以 1∶50 稀释,在 100 ml Amp+ LB 培养基中,37℃培养 2~4 h,当 OD_{600}=0.6 左右时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,继续培养 4~6 h。5 000 r/min,4℃离心,15 min;弃上清,并称量大肠杆菌沉淀的重量,加 2 ml 裂解液重悬细菌,混匀,冰上放置 30 min。加入 Triton X-100,20 μl,至终浓度 1%,冰浴 10 min。冰上间歇超声裂解,至菌液不粘。15 000 r/min,4℃离心 25 min,收集上清。将上清过 Glutathione SepharoseTM 4B 亲和层析柱,按试剂盒提示步骤操作,收集洗脱液。取纯化的融合蛋白 10 μl 经 10%SDS-PAGE 电泳鉴定条带位置是否正确。

1.4.4 Western Blot 将重组菌诱导后提取蛋白,进行 10% SDS-PAGE 胶鉴定并转移到硝酸纤维素膜,用 5%脱脂奶粉 4℃封闭过夜,加入 1∶1000 稀释的鼠抗人 HPV16E7 抗体,37℃孵育 60 min,再加入 1∶1000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠抗体,37℃孵育 60 min,以二氨基联苯胺(DAB)显色。

2 结 果

2.1 HPV16 E7 原核表达质粒的构建与鉴定

PCR 扩增后,得到约 100 bp 的基因片段(图 1)。对 pET28-E7 重组质粒酶切鉴定得到了 100 bp 左右的目标小片段和大约 5.4×10^3 bp 左右的大片段(图 2)。将该质粒送公司测序,测序结果表明所构建的原核表达质粒不仅含有完整的 HPV16E7 序列,而且阅读框架也正确无误。所克隆的 HPV16E7 基因与本实验引物设计所用的 HPV16E7 基因序列完全相同,没有碱基突变。

2.3 重组蛋白的免疫印迹分析

对 pET28/E7 质粒表达得到的 HPV16 E7 融合蛋白进行 Western blot 鉴定,结果表明该蛋白与对应抗体具有较好的结合能力,与空载体表达的 TRX 蛋白不能结合,DAB 显色后在相对分子质量大约 3.6×10^3Da 位置有清晰的目标条带(图 4)。

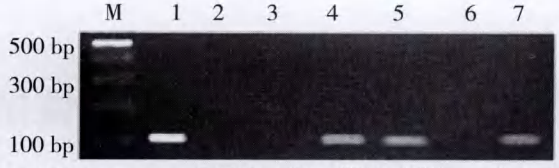
3 讨 论

HPV 与人类肿瘤的发生密切相关,现已确定高危型 HPV(如 HPV-16、18)是人类宫颈癌发生的必要因素。大量研究还提示 HPV 感染是喉癌发生的危险因素。流行病学的证据、动物实验及体外细胞的结果均确立了 HPV 作为重要的肿瘤病毒的致癌活性。分子机制的研究表明 E6、E7 蛋白是 HPV 两个主要参与细胞恶性转化的蛋白。用高危型 HPV 的 E6、E7 基因可以使原代培养上皮细胞发生转化,而低危

表 1 HPV16E7 及 β-actin 引物序列及扩增长度

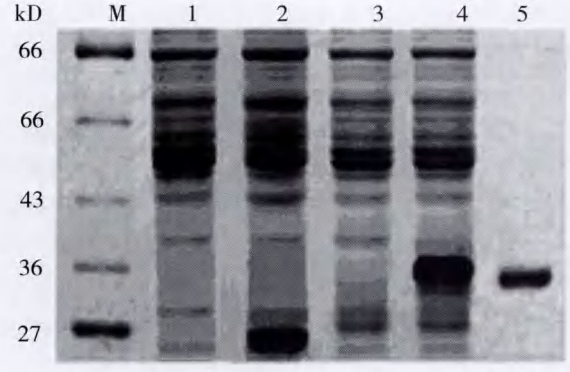
引物名称	引物序列	扩增长度
HPV16E7[6]	U:GATGAAATAGATGGTCCAGC	100 bp
	D:GCTTTGTACGCACAACCGAAGC	
β-actin[7]	U:GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	268 bp
	D:CAACTTCATCCACGTTCACC	

注:β-actin 作为内部参照



M.600 bp marker；1.阳性对照；2.阴性对照（water）；4、5、7.阳性样本；Lane 3、6.阴性样本

图 1 喉癌中 HPV16E7 的 PCR 扩增鉴定



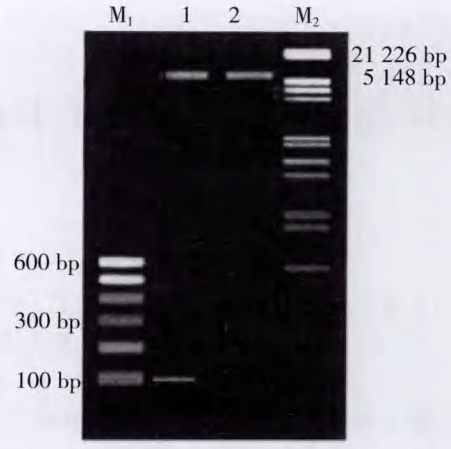
M. 蛋白质分子量标准；1. 未用 IPTG 诱导的 pET28 的蛋白质；2. 用 IPTG 诱导的表达 pET28 的蛋白质；3. 未用 IPTG 诱导的表达 pET28/E7 的蛋白质；4. 用 IPTG 诱导的表达 pET28/E7 的蛋白质；5. 用 Glutathion-Sepharose4B 纯化的 pET28/E7 表达的蛋白质

图 3 HPV16 E7 在 BL21(DE3)中的表达和纯化

型 HPV（如 HPV-6、-11）仅有较弱的转化作用或无转化作用[6,7]。这两个基因的作用方式主要是整合入宿主 DNA，破坏 DNA 结构及表达相应蛋白，而 E6、E7 蛋白均能与细胞内众多的重要功能蛋白结合而干扰细胞的正常运转程序。肿瘤中病毒的存在状况表明，HPV E6、E7 基因在 HPV 感染的肿瘤中均能表达；另一方面在 HPV 阳性的细胞系中用反义或 RNAi 技术抑制 E6、E7 表达，或用 E2 表达抑制 E6、E7 启动子可导致细胞生长阻滞、细胞衰老或凋亡[8-11]。因此，E6、E7 作为一个与细胞转化密切相关的病毒癌基因已经得到确立。随后，大量的研究集中在对 E6、E7 致癌的分子机制方面。由于 HPV16 E7 蛋白在子宫颈癌细胞内存在持续性表达，因此该蛋白被认为是子宫颈癌肿瘤特异性抗原，也是理想的治疗性疫苗组成成分。本研究从临床标本中克隆得到正确的 HPV16E7 基因序列，该基因经正确插入 pET28a(+)原核表达质粒后，在 IPTG 诱导下在 BL21(DE3)大肠杆菌中以可溶性蛋白形式有效地表达了 HPV16 E7 融合蛋白，并且经 Western blot 证实所表达的目标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，可以进行大量纯化并用于其他理化性质和生物学功能研究。实验的初步结果为进一步深入研究 HPV16 E7 的生物学功能打下了基础。

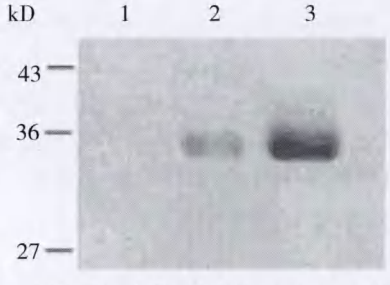
参 考 文 献

[1] Zur Hausen H. Papillomavieuses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis[J]. Natl Cancer Inst, 2000, 92(9): 690-698.



M1. 100 bp DNA marker; M2. λ DNA/*EcoR* Ⅰ+*Hind*Ⅲ marker; 1. 用 *BamH* Ⅰ/*Hind*Ⅲ酶切的 pET28-E7；2. 用 *BamH* Ⅰ/*Hind*Ⅲ酶切的载体 pET28

图 2 pET28-E7 重组质粒酶切鉴定



1.未用 IPTG 诱导的表达 pET28/E7 的蛋白质；
2. 用 IPTG 诱导的表达 pET28/E7 的蛋白质；
3. 用 GST 纯化的 pET28/E7 蛋白

图 4 HPV16E7 蛋白 Western Blot 分析

[2] Maleno I, Lopez-Nevot M A, Cabrera T, et al. Multiple mechanisms generate HLA class I altered phenotypes in laryngeal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21[J]. Cancer Immunol Immun, 2002, 51(7): 389-396.

[3] Cabrera T, Salinero J, Fernandez M A, et al. High frequency of altered HLA class I phenotypes in laryngeal carcinomas[J]. Hum Immunol, 2000, 61(5): 499-506.

[4] Hausen H Z. Virus in human cancer [J]. Science, 1991, 254(4): 1167-1173.

[5] Luxton J, Shepherd P. Human papillomavirus antigens and T-cell recognition [J]. Curr Opin Infect Dis, 2001, 14(2): 139-143.

[6] Zur Hausen H. Viruses in human cancers[J]. Eur. J.Cancer, 1999, 35: 1878-1885.

[7] Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference [J]. Oncogene, 2002, 21(39): 6041-6048.

[8] Song S, Liem A, Miller J A, Lambert PF. Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis [J]. Virology, 2000, 267(2): 141-150.

[9] Song S, Pitot H C, Lambert P F. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals[J]. J Virol, 1999, 73(7): 5887-5893.

[10] Xiao T, Howley P M. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton[J]. PNAS, 1997, 94: 4412-4417.

[11] 成海恩，张 溢，张翠莉，等.表达 HPV-16 E6 基因 siRNA 真核载体的构建及体外转染效率鉴定[J].重庆医科大学学报，2006，31(5)：636-640.

（责任编辑：冉明会）