

人乳头瘤病毒 16 型 E2 蛋白真核载体的构建与表达

周 良^{1,2}, 陈 杰¹, 唐双阳¹, 李 薇¹, 余敏君¹, 朱翠明¹, 万艳平¹

(1. 南华大学 病原生物学研究所, 湖南 衡阳 421001;

2. 怀化医学高等专科学校)

摘 要: **目的** 构建人乳头瘤病毒 16 型 (HPV16) E2 蛋白真核载体, 为研究其基因疫苗免疫活性奠定实验基础。 **方法** PCR 扩增 HPV16 E2 基因片段, 将其连接到真核表达载体 pcDNA3.1(+), 双酶切及测序鉴定。将质粒 pcDNA3.1(+) 与 pcDNA3.1(+)/HPV16 E2 分别转染 HeLa 细胞, RT-PCR 鉴定 E2 基因在 HeLa 细胞中的表达。 **结果** HPV16 E2 基因片段插入到 pcDNA3.1(+) 相同酶切位点, 即构建了真核表达载体 pcDNA3.1(+)/HPV16 E2; 转染 pcDNA3.1(+)/HPV16 E2 的细胞, 检测到 HPV16 E2 mRNA。 **结论** 构建的真核表达载体 pcDNA3.1(+)/HPV16 E2 能在 HeLa 细胞内有效表达。

关键词: 人乳头瘤病毒 16 型; E2; 表达

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 2095-1116(2011)01-0055-03

Expression and Construction of Eukaryotic Vector of HPV16 E2 Protein

ZHOU Liang, CHEN Jie, TANG Shuang-yang, et al

(*Institute of Pathogenic Biology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China*)

Abstract: Objective To provide the experimental basis for further researching immunological competence of human papillomavirus type 16 (HPV16) E2 gene vaccine, eukaryotic expression vector of HPV16 E2 protein is constructed.

Methods HPV16 E2 gene fragment amplified by PCR was inserted into eukaryotic expression vector of pcDNA3.1(+) with the same restriction sites. Enzymes digestion and DNA sequencing were used to identify E2 gene fragment. The eukaryotic expression vector of pcDNA3.1(+) or pcDNA3.1(+)/HPV16 E2 was transfected into HeLa cells, respectively. The expression of HPV16 E2 was analyzed using RT-PCR. **Results** The gene fragment of HPV16 E2 was successfully insert into pcDNA3.1(+). The mRNA products of HPV16 E2 were detected in the cells transfected with pcDNA3.1(+)/HPV16 E2. **Conclusion** Eukaryotic expression vector of pcDNA3.1(+)/HPV16 E2 successfully express HPV16 E2 mRNA in HeLa cells.

Key words: HPV16; E2; expression

根据使细胞永生物化学的潜在能力, 人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 被分为低危型与高危型。HPV16 与 HPV18 等高危型 HPV 是引起宫颈癌等恶性肿瘤的主要原因, 两者诱发宫颈癌分别达 50% 与 20%^[1]。在 HPV 6 种早期蛋白 E1、E2、E4、E5、E6 和 E7 中, E2 表达量随细胞转化的进程

而逐渐降低, 最后在宫颈癌细胞中无表达^[2]。因此, E2 是否表达可作为癌变的指标之一。目前国内有不少学者将 E2 蛋白用来研发 HPV 疫苗。本文拟构建并研究真核表达载体 pcDNA3.1(+)/HPV16 E2 在 HeLa 细胞内的表达, 为进一步研究 HPV16 E2 基因疫苗的免疫活性奠定前期试验

收稿日期: 2010-06-11

基金项目: 湖南省科学技术厅计划项目 (2009FJ3048)。

通讯作者: 万艳平, 教授, 硕士研究生导师, E-mail: wanyy1991@yahoo.com.cn.

1 材料与方法

1.1 材料

HPV16 全基因、真核表达载体 pcDNA3.1(+) 和 HeLa 细胞由本室保存。限制性内切酶、RNA 酶、DNA Marker、Taq DNA 聚合酶、RT-PCR 试剂盒均购自 Fermentas 公司;DMEM 细胞培养基、新生牛血清(GIBCO)均购自华美公司;脂质体(Lipofectamine 2000)购自 Invitrogen 公司;低温高速离心机是德国 HETTICH 公司产品。

1.2 HPV16 E2 基因的扩增

根据 HPV16 全基因序列,采用 Primer Premier 5.0 软件设计一对特异性引物,分别引入 EcoR I、Xho I 酶切位点,引物 P1:5'-GGA ATT CAT GGA GAC TCT TTG CC-3';引物 P2:5'-CGC TCG AGT CAT ATA GAC ATA AAT C-3'。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。以 HPV16 全基因组为模板扩增 E2 基因,1.2% 琼脂糖凝胶电泳,另按胶回收试剂盒说明回收 PCR 产物。

1.3 pcDNA3.1(+)/HPV16 E2 的构建

用 EcoR I 和 Xho I 双酶切,回收纯化的 PCR 产物以及 pcDNA3.1(+)载体,纯化后进行连接,转化 E. coli JM109 感受态细胞,经蓝白斑筛选,挑选疑为 pcDNA3.1(+)/HPV16 E2 阳性克隆进行酶切鉴定,并测序。

1.4 质粒转染 HeLa 细胞

脂质体转染法按照 Lipofectamine 2000 说明书的方法进行。转染前 HeLa 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养,置 37℃ 5% CO₂ 培养箱,每隔 2 天换 1 次液。转染前将细胞接种于 24 孔板,密度为 1×10⁵ 个/孔,次日当细胞的汇合度约 50%~60% 时进行转染。转染时培养基换为不含血清和抗生素的 DMEM 培养基。分别转染 pcDNA3.1(+) 和 pcDNA3.1(+)/HPV16 E2 质粒。室温孵育 20 min 后,将各混合物分别加入到培养板中,转染 6 h 后更换为含 10% 血清的 DMEM 培养基。置 37℃ 5% CO₂ 培养箱继续培养 36 h。

1.5 HPV16 E2 在 HeLa 细胞内的表达

培养 36 h 后,吸弃培养基,按 RT-PCR 试剂盒说明书进行细胞全基因组 DNA 提取,RT-PCR 扩增 E2 mRNA,1.2% 琼脂糖凝胶电泳,观察结果。

2 结 果

2.1 pcDNA3.1(+)/HPV16 E2 表达载体的构建与鉴定

以 HPV16 全基因组为模板通过 PCR 方法扩增 HPV16 E2 基因片段,1.2% 琼脂糖凝胶电泳结果如图 1,PCR 产物位于核酸标准分子 1 000 bp 与 2 500 bp 之间,靠近 1 000 bp,与预期目的基因片段 1 098 bp 大小相符。pcDNA3.1(+)/HPV16 E2 经 Sal I 与 EcoR I 双酶切,得到 2 个片段,小片段与 PCR 产物平行(图 1, lane2)。测序结果说明 HPV16 E2 基因读码框完全正确(数据未显示)。

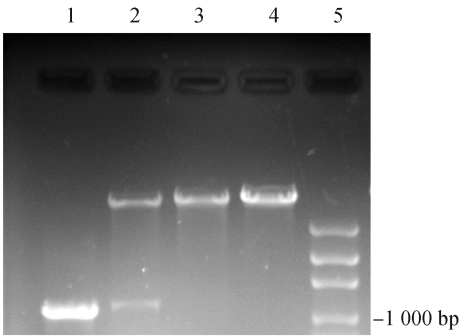


图 1 HPV16 E2 PCR 产物与 pcDNA3.1(+)/HPV16 E2 酶切鉴定

1:PCR 产物;2:pcDNA3.1(+)/HPV16 E2 双酶切;3,4:pcDNA3.1(+) 双酶切;5:DNA marker

2.2 pcDNA3.1(+)/HPV16 E2 在细胞中的表达

RT-PCR 琼脂糖电泳结果见图 2,内对照 β -actin 3 组均有条带,空白对照组与 pcDNA3.1(+)转染组细胞未见 HPV16 E2 条带,pcDNA3.1(+)/HPV16 E2 转染组细胞有大小约 1 100 bp 的 HPV16 E2 条带。

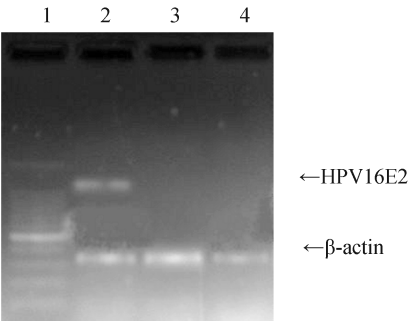


图 2 pcDNA3.1(+)/HPV16 E2 在细胞内表达 HPV16 E2 mRNA

1:100-10000 DNA marker;2:pcDNA3.1(+)/HPV16 E2 转染组;3:pcDNA3.1(+)转染组;4.空白对照

3 讨 论

HPV16 早期基因区编码的 E2 蛋白由 365 个氨基酸组成, E2 蛋白既调节病毒的转录又调节病毒的复制, 且通过多种途径影响细胞增殖。在宫颈上皮内癌变前期 E2 蛋白高表达, 而后期病变和高度恶性的宫颈癌中, 存在 E2 蛋白去表达及 E6 与 E7 癌蛋白的高表达的现象。如在 HPV16 感染的宫颈癌细胞中重新引入 E2 基因, 可以抑制 HPV16 E6 和 E7 癌蛋白的表达, 使细胞周停滞于 G1 期, 细胞发生衰老或凋亡, 也就是说 E2 蛋白在癌变过程中可能发生负调控的作用^[3,4]。由于 E2 蛋白的这种生物学作用, 它有可能作为防治性疫苗在防治宫颈上皮内癌变中起重要作用。由此, 为了研究 HPV16 E2 基因作为 DNA 疫苗的可能性, 本文成功构建了 HPV16 E2 蛋白真核表达载体 pcDNA3.1(+)/HPV16 E2, 为下一步研究该基因疫苗免疫学活性奠定了基础。

pcDNA3.1(+) 是一种带有巨细胞病毒强启动子、能在哺乳动物细胞或宿主内高水平稳定和瞬时表达的真核细胞表达载体。它含有来源于人巨细胞病毒的增强启动子, 与其它启动子相比, 它具有高效且适于多种蛋白质表达的特点。其加 A 尾信号和转录终止信号来源于小牛生长激素, 增强了转录物的稳定性。同时 pcDNA3.1(+) 携带有氨苄青霉素和新霉素的抗性基因, 不仅利于转化和转染后阳性克隆的筛选, 而且氨苄青霉素抗性基因中所含的 CpG 序列是具有较强活性的免疫刺激序列, 在 DNA 的免疫中具有免疫佐剂作用, 可有效地激活免疫细胞, 增强免疫反应^[5]。本文将 HPV16 E6 基因连接

到 pcDNA3.1(+) 载体上, 以构建能表达目的蛋白的真核表达载体, 即 HPV16 DNA 疫苗; 当 pcDNA3.1(+)/HPV16 E2 转染 HeLa 细胞后, 能在细胞内表达 HPV16 E2 mRNA。彭俊等^[6]发现 HPV18 E2 及其 TAD 与 EGFP 融合蛋白瞬时高表达可诱导巨噬细胞凋亡并上调其分泌 TNF- α 和 IL-1 β 。本课题组下一步的工作除研究该基因疫苗的免疫效果外, 还拟将该质粒转染 THP-1 细胞, 以探讨 HPV16 E2 蛋白瞬时高表达对巨噬细胞凋亡及分泌活性的影响, 为进一步研究 HPV16 E2 蛋白在 HPV16 致癌机制中的作用提供参考依据。

参考文献:

- [1] Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer [J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35 (Pt 6): 1456-1460.
- [2] Raffaella Ghittoni, Rosita Accardi, Uzma Hasan, et al. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses [J]. Virus Genes, 2010, 40: 1-13.
- [3] Lagunas-Martínez A, Madrid-Marina V, Gariglio P. Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2010, 1805: 6-16.
- [4] McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses [J]. Virus Research, 2009, 143: 195-208.
- [5] Abdulhaqq SA, Weiner DB. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses [J]. Immunol Res, 2008, 42(1-3): 219-232.
- [6] 彭俊, 朱翠明, 余敏君, 等. HPV18 型 E2 蛋白高表达对巨噬细胞凋亡及其分泌功能的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(2): 136-138, 141.

(此文编辑 朱雯霞)