

新疆株 HPV-16 L1 在真核细胞中表达水平的初探

许璐 刘立鸿 李轶杰 张富春 马正海*

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源与基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046)

摘要 以密码子优化的人乳头瘤病毒 16 型(HPV-16)主要衣壳蛋白基因 L1 作为对照研究新疆株 HPV-16 L1 在真核细胞中的表达水平。将新疆株 HPV-16 L1 与密码子优化的 HPV-16 L1 分别克隆入真核表达载体 pcDNA3.1 重组质粒通过水动力转染技术注入小鼠体内或采用脂质体法转染 293T 细胞, RT-PCR 检测 HPV-16 L1 在小鼠肝脏及 293T 细胞中的转录; Western 印迹检测 HPV-16 L1 在 293T 细胞中表达的蛋白质。结果显示新疆株及密码子优化的 HPV-16 L1 在小鼠肝脏及 293T 细胞中均发生转录, 但新疆株 L1 的表达水平显著低于密码子优化 L1 的表达水平。

关键词 人乳头状瘤病毒 16 型; 新疆株; 主要衣壳蛋白; 表达; 密码子优化

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是一种致癌 DNA 病毒, 可引起人生殖道和肛门皮肤、黏膜恶性肿瘤。其中与宫颈癌发病密切相关的有 HPV-16、HPV-18 等^[1, 2]。HPV-16 基因组为双链环状 DNA 分子, 全长 7 905 bp, 由早期基因区(E 区)、晚期基因区(L 区)和长控制区(long control region, LCR)组成, E 区包含了与转化有关的 E6 和 E7 基因, L 区包括 L1 与 L2 基因, 表达产物分别为主要病毒壳体蛋白和次要病毒壳体蛋白。由于 HPV-16 L1 蛋白结构保守, 含多个抗原表位, 在真核以及原核细胞中表达后能自我装配成病毒样颗粒(VLP), 其结构和抗原表位与天然的病毒颗粒十分相似, 能刺激机体产生保护性抗体, 是 HPV-16 预防性疫苗的主要靶抗原^[3-6]。HPV-16 L1 在哺乳动物细胞中的表达受多方面的调控, 如宿主细胞的分化状态, HPV-16 L1 基因中存在的抑制表达元件, 以及稀有密码子的存在^[6]。通过改变和优化基因使用的密码子能明显提高 HPV-16 L1 的瞬时表达水平。

新疆南部维吾尔族聚居区是宫颈癌高发区, 患病率高达 0.459%~0.59%, 平均发病年龄为 43 岁, 已有的调查表明, 新疆南部维吾尔族妇女高发宫颈癌与新疆株 HPV-16 的感染密切相关, 其宫颈癌组织中 HPV-16 检出率达 72%~84.61%^[7-9]。我们在前期研究中发现新疆南部维吾尔族妇女宫颈癌患者组织中 HPV-16 L1 基因发生了多位点变异^[10]。本研究以密码子优化的 HPV-16 L1 基因为对照, 对新疆株 HPV-16 L1 在 293T 细胞中的表达水平进行了探讨。

1.1 材料

1.1.1 质粒及细胞株 含密码子优化的 HPV-16 L1 质粒 988 为德国科研中心所属赫尔曼-冯-黑尔姆霍茨联合会 Martin Mueller 惠赠, pcDNA3.1(+)质粒购自 Invitrogen 公司; 293T 细胞株购自上海亚培生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂 Taq DNA 聚合酶和反转录试剂盒购自 Fermentas 公司; 基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒和 DNA 回收试剂盒购自 Axygen 公司; 小鼠抗 HPV-16 L1 单克隆抗体购自美国 Biodesign 公司; 辣根过氧化物(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 试验动物 6~8 周龄, 体重 18~22 g 的昆明白雌性小鼠购自新疆医科大学动物实验中心。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 pcDNA3.1(+)载体、HPV-16 L1 保守序列及含密码子优化 HPV-16 L1 的 988 质粒 DNA 序列设计 4 条引物(表 1)。

1.2.2 PCR 扩增 HPV-16 L1 宫颈癌病料(为新疆医科大学肿瘤附属医院手术切除组织并经病理鉴定)组织 DNA 提取按照 Axygen 公司基因组提取试剂盒说明书进行, 以该基因组为模板, HPV-16-xj-L1-P1 和 HPV-16-xj-L1-P2 为引物 PCR 扩增新疆株 HPV-16 L1。PCR 参数为: 95 °C 5 min; 95 °C 45 s, 54.5 °C 45 s, 72 °C 1.5 min, 共 30 个循环; 72 °C 7 min。以

收稿日期: 2008-02-15 接受日期: 2008-04-10

国家自然科学基金资助项目(No.30460008)

* 通讯作者: Tel: 0991-8583259, Fax: 0991-8583517, E-mail:

mzhxju@126.com

1 材料与方法

Table 1 Primer design

Primer name	Oligonucleotides
HPV-16-xj-L1-P1	5'-ATTCCTATAGTTCACGGGTCTCCA-3'
HPV-16-xj-L1-P2	5'-ACTTACAGCTTACGTTTTTTCGCGTT-3'
HPV-16-O-L1-P1	5'-CCGGAATTCAAATGAGCCTGTGGCTGCCC-3'
HPV-16-O-L1-P2	5'-CCCTCGAGTCACAGCTTCCTCTTCTTCTTG-3'

988 质粒为模板, HPV-16-O-L1-P1 和 HPV-16-O-L1-P2 为引物 PCR 扩增密码子优化 HPV-16 L1, PCR 参数为: 95 °C 5 min; 95 °C 45 s, 61 °C 45 s, 72 °C 1.5 min, 共 30 个循环; 72 °C 7 min。琼脂糖电泳检测后分别切胶回收以上 PCR 产物, 继而将其克隆入 pMD18-T Vector, 具体操作按 TaKaRa 公司 pMD18-T Vector 试剂盒说明书进行。连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 在含有 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上挑选克隆, 增菌培养后以碱裂解法小提重组质粒, 重组质粒经 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切鉴定正确后分别命名为 pMD18-T-xj-L1, pMD18-T-optimization-L1。

1.2.3 新疆株 HPV-16 L1 及密码子优化 HPV-16 L1 真核表达质粒的构建及鉴定 分别用 *EcoRI* 及 *XhoI* 双酶切质粒 pMD18-T-xj-L1 和 pMD18-T-optimization-L1, 回收纯化新疆株和密码子优化的 HPV-16 L1 片段, 将该片段与 *EcoRI* 及 *XhoI* 双酶切的 pcDNA3.1 载体在 T4 DNA 连接酶作用下于 16 °C 连接过夜。连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 在含有 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上挑选克隆, 增菌培养后以碱裂解法小提重组质粒, 经 *EcoRI* 及 *XhoI* 双酶切鉴定正确后分别命名为 pcDNA3.1-xj-L1 和 pcDNA3.1-optimization-L1。

1.2.4 HPV-16 L1 在小鼠肝脏中表达的检测 分别将 10 μ g pcDNA3.1、pcDNA3.1-xj-L1 及 pcDNA3.1-optimization-L1 溶于 2.5 ml 灭菌生理盐水, 采用流体力学为基础的大容量快速尾静脉注射法(hydrodynamics-based transfection method, HD 法)在 7 s 内注入小鼠尾静脉^[11], 8 h 后处死小鼠取肝脏, 按照 Invitrogen TRIzol 说明书提取总 RNA, 按照 Fermentas 公司反转录试剂盒说明书合成 cDNA, 以该 cDNA 为模板, 用 HPV-16 L1 特异性引物 PCR 扩增, 检测 HPV-16 L1 在小鼠肝脏中的转录情况。

1.2.5 HPV-16 L1 在 293T 细胞中转录检测 分别以 5 μ g pcDNA3.1、pcDNA3.1-xj-L1 及 pcDNA3.1-optimization-L1 转染对数生长期的 293T 细胞, 转染按 Invitrogen 公司试剂盒说明书进行, 48 h 后提取转染细胞的总 RNA 并检测 HPV-16 L1 转录情况, 方法同 1.2.4。

1.2.6 HPV-16 L1 在 293T 细胞中表达蛋白的检测

pcDNA3.1、pcDNA3.1-xj-L1 及 pcDNA3.1-optimization-L1 转染 293T 细胞, 方法同 1.2.5, 转染 48 h 后按照 Invitrogen TRIzol 说明书提取细胞总蛋白, 步骤如下: 在细胞培养板中直接加入 TRIzol 溶液裂解并悬浮细胞, 将裂解液转入 1.5 ml EP 管中室温放置 5 min, 加入氯仿置 3 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上层水相, 将中层及下层有机相乙醇沉淀 DNA 后取上清用异丙醇沉淀蛋白质, 用含 0.3 mol/L 盐酸胍的 95% 乙醇洗涤沉淀两次, 无水乙醇洗涤一次, 1% SDS 溶解蛋白质沉淀。继而以 Western 印迹检测该蛋白质, 细胞总蛋白经 SDS-PAGE 分离后, 电转移至硝酸纤维素膜, 5 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h, 依次与小鼠抗 HPV-16 L1 单克隆抗体及山羊抗小鼠 IgG-HRP 反应, DAB 显色并拍照。

2 结果

2.1 pcDNA3.1-xj-L1 及 pcDNA3.1-optimization-L1 重组质粒的构建

2.1.1 HPV-16 L1 克隆 PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检测到约 1 500 bp 的 DNA 条带(图 1), 与预计片段大小(新疆株 HPV-16 L1 大小为 1 601 bp, 密码子优化的 HPV-16 L1 大小为 1 517 bp)相符。

2.1.2 pMD18-T-xj-L1 和 pMD18-T-optimization-L1 的构建 重组质粒经 *EcoRI*、*XhoI* 双酶切的产物进行琼脂糖凝胶电泳, 检测到约 1 500 bp 的新疆株 HPV-16 L1 片段和约 2 700 bp 的 pMD18-T 片段(图 2)。

2.1.3 pcDNA3.1-xj-L1 和 pcDNA3.1-optimization-L1 的构建 重组质粒经 *EcoRI*、*XhoI* 双酶切的产物进行琼脂糖凝胶电泳, 检测到约 1 500 bp 的新疆株 HPV-16 L1 片段和约 5 400 bp 的 pcDNA3 片段(图 2)。酶切鉴定正确的重组质粒进行 DNA 测序, 结果表明新疆株 HPV-16 L1 已正确克隆入 pcDNA3.1 载体。

2.2 HPV-16 L1 在小鼠肝脏中的瞬时表达

RT-PCR 结果表明, 尾静脉注射 pcDNA3.1-xj-L1、pcDNA3.1-optimization-L1 重组质粒的小鼠肝脏总 RNA 中均能检测到 HPV-16 L1 的转录体(图 3、图



Fig.1 Agarose gel electrophoresis assay of PCR product of HPV-16 L1

M: DL2000 marker; 1: Negative control of Xinjiang strain HPV-16 L1; 2: Xinjiang strain HPV-16 L1; 3: Negative control of optimization HPV-16 L1; 4: optimization HPV-16 L1.

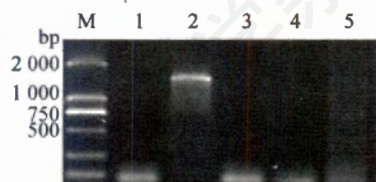


Fig.3 Detecting the transcript of Xinjiang strain HPV-16 L1 in mouse liver with RT-PCR

M: DL 2000 marker; 1: Negative control; 2: Positive control; 3: cDNA from the mouse injected with pcDNA3.1; 4: RNA from the mouse injected with pcDNA3.1-xj-L1; 5: cDNA from the mouse injected with pcDNA3.1-xj-L1.



Fig.5 Detecting the transcript of Xinjiang strain L1 in 293T cell with RT-PCR

M: DL 2000 marker; 1: Negative control; 2: Positive control; 3: cDNA from the 293T cell transfected with pcDNA3.1; 4: RNA from 293T cell transfected with pcDNA3.1-xj-L1; 5: cDNA from the 293T cell transfected with pcDNA3.1-xj-L1.

4), pcDNA3.1对照组小鼠肝脏中未检测到HPV-16 L1的转录产物(图3、图4), 以小鼠肝脏总RNA为模板, HPV-16 L1特异性引物直接PCR扩增亦未检测到HPV-16 L1 (图3、图4), 故可排除RT-PCR体系中的DNA污染。上述结果说明新疆株HPV-16 L1和密码子优化HPV-16 L1均在小鼠肝脏中转录。

2.3 HPV-16 L1在293T细胞中的瞬时表达

2.3.1 HPV-16 L1在293T细胞中转录的检测 RT-PCR结果表明, pcDNA3.1-xj-L1、pcDNA3.1-optimization-L1重组质粒转染的293T细胞的总RNA中均能检测到HPV-16 L1的转录体(图5、图6), pcDNA3.1

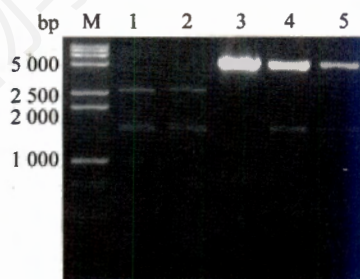


Fig.2 Restrictive enzyme digestion analysis of pcDNA3.1-xj-L1, pcDNA3.1-optimization-L1 plasmid by EcoRI and XhoI

M: DL15000+2000 marker; 1: pMD18-T-xj-L1/EcoRI+XhoI; 2: pMD18-T-optimization-L1/EcoRI+XhoI; 3: pcDNA3/EcoRI+XhoI; 4: pcDNA3-xj-L1/EcoRI+XhoI; 5: pcDNA3-optimization-L1/EcoRI+XhoI.

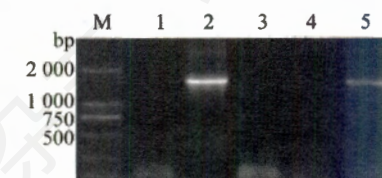


Fig.4 Detecting the transcript of codon optimizing HPV-16 L1 in mouse liver with RT-PCR

M: DL 2000 marker; 1: Negative control; 2: Positive control; 3: cDNA from the mouse injected with pcDNA3.1; 4: RNA from the mouse injected with pcDNA3.1-optimization-L1; 5: cDNA from the mouse injected with pcDNA3.1-optimization-L1.

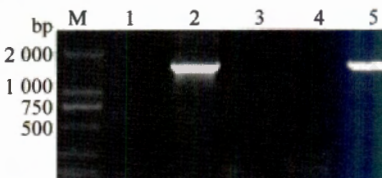


Fig.6 Detecting the transcript of codon optimizing L1 in 293T cell with RT-PCR

M: DL 2000 marker; 1: Negative control; 2: Positive control; 3: cDNA from the 293T cell transfected with pcDNA3.1; 4: RNA from the 293T cell transfected with pcDNA3.1-optimization-L1; 5: cDNA from the 293T cell transfected with pcDNA3.1-optimization-L1.

对照组未检测到HPV-16 L1的转录产物(图5、图6), 以重组质粒转染细胞总RNA为模板, HPV-16 L1特异性引物直接PCR扩增亦未检测到HPV-16 L1 (图5、图6), 故可排除RT-PCR体系中的DNA污染。上述结果说明新疆株HPV-16 L1和密码子优化HPV-16 L1均在293T细胞中转录。

2.3.2 HPV-16 L1在293T细胞中的表达 Western印迹检测重组质粒转染293T细胞中表达的HPV-16

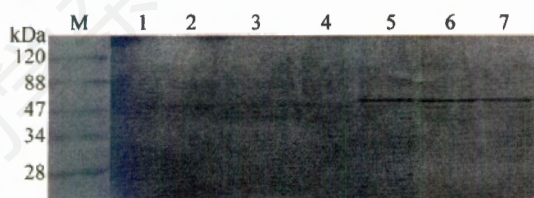


Fig.7 Detecting the HPV-16 L1 protein in 293T cells with Western blotting

M: Protein marker; 1: The 293T cell transfected with pcDNA3.1; 2, 3, 4: The 293T cell transfected with pcDNA3.1-xj-L1; 5, 6, 7: The 293T cells transfected with pcDNA3.1-optimization-L1.

L1 蛋白, pcDNA3.1-xj-L1 转染组未能检测到 L1 蛋白, pcDNA3.1-optimization-L1 转染组检测到约 55 kDa 的蛋白质, 与 HPV-16 L1 蛋白大小相符(图 7)。

3 讨论

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤,世界卫生组织的统计资料表明,宫颈癌在全球妇女癌症死亡率中位居第二^[12],每年全球大约有 50 万例新发宫颈癌病例,约 25 万人死于宫颈癌,其发病率在发展中国家居妇科恶性肿瘤首位。新疆南部维吾尔族聚居区是宫颈癌的高发区,已有研究表明该区宫颈癌高发与 HPV-16 感染密切相关^[13]。目前认为,HPV-16 可通过性行为传播,临床上尚无预防 HPV-16 感染的措施,中晚期宫颈癌的化疗和手术治疗效果也不理想,因此,研制高效、安全、廉价的疫苗预防 HPV-16 感染有着十分重要的意义。

HPV-16 主要衣壳蛋白 L1 自我组装成的 VLPs 是理想的预防性疫苗。2002 年 Koutsky 等^[14]进行的 HPV-16 L1 VLPs 疫苗 I / II 期临床试验已经完成,试验结果显示,用 VLPs 疫苗以肌肉注射途径进行免疫,能激发产生较高滴度的中和抗体,受试者中未见明显毒性反应,并减少了宫颈癌的发病机率,极大地推进了 HPV-16 疫苗走向临床应用。

根据文献报道^[6,15~18], HPV-16 L1 在哺乳动物细胞中的表达是受限的,改变 HPV-16 L1 基因使用的密码子可提高 HPV-16 L1 基因在哺乳动物细胞中的表达水平。为此,在研制 HPV-16 L1 疫苗时必须考虑提高 HPV-16 L1 的表达水平。前期我们已经从新

疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌患者组织中获得新疆株 HPV-16 L1 基因,该基因发生多位点变异,并形成突变的主流模式,这些突变引起新疆株 HPV-16 L1 蛋白疏水性和抗原性的改变^[10]。本研究以密码子优化的 HPV-16 L1 为参照,初步探讨了新疆株 HPV-16 L1 在哺乳动物细胞中的表达水平。结果表明新疆株 HPV-16 L1 在小鼠肝脏细胞和 293T 细胞中能正常转录,但表达水平很低,Western 印迹无法检测到相应蛋白质的表达,而能够检测到密码子优化的 HPV-16 L1 的表达。

HPV-16 L1 在哺乳动物细胞中的低水平表达与密码子的偏爱性有关。有学者对 78 个型别 HPVs 的密码子使用的总体规律进行了总结,发现 HPV 偏爱密码子与人的明显不同,其第 3 位均以 A 或 T 结尾,而人的偏爱密码子第 3 位则均采用 C 或 G 结尾。此种密码子使用倾向可能是限制 HPV-16 L1 基因在哺乳动物细胞中高效表达的原因之一^[17]。经过基因序列的比对,新疆株和德国标准株密码子第三位中的 AT 含量均为 75.6%;德国优化株 HPV-16 L1 全长中除终止密码子 TAA 外,其余密码子的第三位均不含有 A 或 T,AT 含量为 1.98%。上述结果提示可以通过改变新疆株 HPV-16 L1 使用的密码子来提高其在哺乳动物细胞中的表达水平。

参考文献 (References)

- [1] Hwang TS et al. *Gynecol Oncol*, 2003, **90**: 51
- [2] Clifford GM et al. *Br Cancer*, 2003, **88**: 63
- [3] Schiller JT et al. *J Natl Cancer Inst Monographs*, 2000, **28**: 50
- [4] Nardelli-Haeffliger D et al. *Infect Immun*, 1997, **65**: 3328
- [5] Ohlschlager P et al. *J Virol*, 2003, **77**: 4635
- [6] Leder C et al. *J Virol*, 2001, **75**: 9201
- [7] 古扎丽努尔·阿布力孜等. *实用癌症杂志*, 2001, **16**: 271
- [8] 拉莱·苏祖克等. *新疆医学院学报*, 1997, **20**: 77
- [9] 李庭芳等. *新疆医学院学报*, 1996, **19**: 199
- [10] 马正海等. *中华医学杂志*, 2004, **84**: 987
- [11] Kobayashi N et al. *J Gene Med*, 2004, **6**: 455
- [12] Parkin DM. *Lancet Oncol*, 2001, **2**: 533
- [13] 祖菲娅·艾力等. *新疆医科大学学报*, 2006, **29**: 572
- [14] Koutsky LA et al. *N Engl J Med*, 2002, **347**: 1645
- [15] Zhou J et al. *J Virol*, 1999, **73**: 4972
- [16] Collier B et al. *J Virol*, 2002, **76**: 2739
- [17] Zhao KN et al. *Virus Res*, 2003, **98**: 95
- [18] Mossadegh N et al. *Virology*, 2004, **326**: 57

Preliminary Study on the Expression Level of Xinjiang Strain HPV-16 L1 in Eukaryotic Cells

Lu Xu, Li-Hong Liu, Yi-Jie Li, Fu-Chun Zhang, Zheng-Hai Ma*

(College of Life Science and Technology, Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering,
Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract To contrast the expression level of Xinjiang strain HPV-16 L1 and codon optimizing HPV-16 L1 in eukaryotic cells. Xinjiang strain HPV-16 L1 and codon optimizing HPV-16 L1 were cloned into pcDNA3.1 respectively. The recombinant plasmids were infused quickly into the mouse through tail vein or transfected into 293T cells, and then the transcripts of HPV-16 L1 were detected in the liver of the mouse and in 293T cells with RT-PCR, HPV-16 L1 protein was detected in 293T cells with Western blotting. The results show that Xinjiang strain HPV-16 L1 and codon optimizing HPV-16 L1 can be transcribed in the liver of the mouse and in 293T cells, and the L1 protein expression levels of Xinjiang strain HPV-16 L1 is lower than that of codon optimizing HPV-16 L1 markedly.

Key words human papillomavirus 16; Xinjiang strain; major capsid protein; expression; codon optimization

Received: February 15, 2008 Accepted: April 10, 2008

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30460008)

*Corresponding author. Tel: 86-991-8583259, Fax: 86-991-8583517, E-mail: mzhxju@126.com