

· 论 著 ·

HPV16 E6E7 与 C3d3 融合基因真核表达质粒的构建及表达*

郑秀惠[#], 李力[△], 郭建新, 郑英如, 李军果, 林爽, 陈竹钦
(第三军医大学大坪医院野战外科研究所妇产科, 重庆 400042)

摘要:目的 构建可作为 DNA 疫苗的包含人乳头瘤病毒 16 型(HPV16)E6E7 与 C3d3 融合基因真核表达质粒,并在体外进行表达和鉴定。方法 采用 PCR 技术扩增 HPV16 E6E7 片段,将该片段插入到 pMDT-18 载体中后,亚克隆至真核表达载体 pSG. SS. C3d3. YL 和 pSG. SS. YL,构建 E6E7 与 C3d3 融合基因及 E6E7 表达质粒 pSG. SS. E6E7. C3d3. YL 和 pSG. SS. E6E7. YL。经限制性酶切鉴定和 DNA 序列测定后,将重组质粒 pSG. SS. E6E7. C3d3. YL、pSG. SS. E6E7. YL 转染 COS-7 细胞,用 Western blot 及免疫细胞化学技术检测其表达。结果 经酶切、DNA 测序及转染真核细胞后表达产物的鉴定结果显示,重组质粒构建成功。结论 构建的质粒可在真核细胞内正确表达,为其作为 DNA 疫苗诱导免疫效应的动物实验打下了基础。

关键词:人乳头瘤病毒 16 型; C3d3; DNA 疫苗

中图分类号:R730.54;R737.33

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)01-0040-03

Construction and expression of HPV16E6E7 and C3d3 fusion gene eukaryotic expression vector*

ZHENG Xiu-hui[#], LI Li[△], GUO Jian-xin, et al.

(Department of Gynaecology and Obstetrics, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To construct plasmid pSG. SS. E6E7. C3d3. YL and pSG. SS. E6E7. YL which can respectively express Flk-1ECD-C3d3 fusion protein and Flk-1ECD protein in eukaryotic cell. **Methods** PCR was applied to amplify E6E7 cDNA with Bgl II and BamH I restriction endonuclease site at two ends respectively. Then the cDNA fragment was linkaged into pMDT-18 and was subcloned into eukaryotic expression vector pSG. SS. C3d3. YL and pSG. SS. YL, which leading to pSG. SS. E6E7. C3d3. YL and pSG. SS. E6E7. YL. After identification by endonuclease digestion and DNA sequence analysis, the recombinant plasmids were transfected into COS-7 cells and the expressed product was detected by Western blot and immunocytochemistry. **Results** The constructions of eukaryotic expression vector pSG. SS. E6E7. C3d3. YL and pSG. SS. E6E7. YL were successful and the two plasmids could express recombinant E6E7-C3d3 fusion protein and Flk-1ECD protein respectively. **Conclusion** The success in constructions of pSG. SS. E6E7. C3d3. YL and pSG. SS. E6E7. YL do the groundwork for further studies in animals.

Key words: human papillomavirus16; C3d3 ; DNA vaccine

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一,严重威胁着女性健康。已有研究证明,高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)持续感染是宫颈癌主要致病原因,而高危型 HPV E6、E7 蛋白为转化基因,在宫颈癌组织和细胞系内呈构成性持续表达,与细胞转化和病毒复制的调控有关,在转化组织恶性表型的维持中具有至关重要的作用,并具有一定抗原性。因此,利用 E6 和(或)E7 作为靶抗原进行疫苗研究具有重要意义^[1]。目前以 E6 和(或)E7 为靶抗原的宫颈癌疫苗的研究取得了一定进展,但仍面临诱导免疫应答弱,难以产生令人满意的免疫保护效应等问题。因此,需通过一定途径增强其免疫原性,激发更有效的免疫应答,进一步提高其免疫保护效应和抗肿瘤作用^[2-3]。近年研究发现,2~3 个串联的补体 C3 裂解片段 C3d 具有强烈的免疫佐剂效应,可大大提高抗原的免疫原性,而且补体分子为人体自身成分,不良反应小^[4-5]。因此,本研究引入 C3d 作为分子内佐剂,制备了含有 HPV16E6E7 和串联的 3 个 C3d(C3d3)融合基因的真核表达质粒,以期制成一种高效、安全的宫颈癌 DNA 疫苗。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒及细胞 含 HPV16 全基因序列的重组质粒

pBR322/HPV16 由德国癌症研究中心(DKFZ) Emde Villiers 教授惠赠。真核表达质粒 pSG. SS. YL 及含有串联的 3 个拷贝 C3d 的 pSG. SS. C3d3. YL 由英国 Fearon 教授惠赠。T 载体 pMDT-18 购自 Promega 公司。大肠杆菌 E. coli DH5 α 为本室保存。COS-7 细胞购自中科院上海细胞库。

1.2 主要试剂 PCR 试剂盒购自上海生工生物有限公司, DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自美国 O-MEGA BIO-TEK 公司, T4 DNA 连接酶及限制性内切酶 BamH I、Bgl II 等均购自美国 MBI 公司,质粒转染试剂盒 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司, HPV16E7 鼠单克隆抗体由本室保存, BM Chemiluminescence Western Blotting 试剂盒为 Roche 公司产品,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠 IgG 及 DAB 试剂盒为北京中杉生物有限公司产品。

1.3 DNA 疫苗质粒的构建 根据 HPV16 E6E7 cDNA 序列,并在两端分别添加 Bgl II 和 BamH I 酶切位点,设计引物后交由上海生工生物公司合成。上、下游引物分别为 5'-GAA GAT CTG CCT CTG TGG GTT TGC CTG GCG ATT TTC-3', 5'-CGG GAT CCT TCC AAG TTG GTC TTT TCC TGG GCA

* 基金项目:第三军医大学青年基金资助项目(06XG051)。 # 第三军医大学大坪医院妇产科在读博士生。 △ 通讯作者。

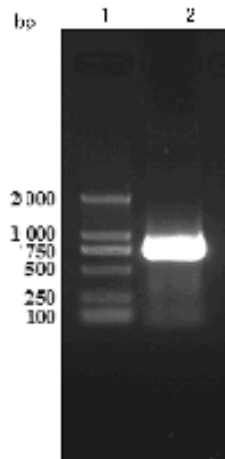
CC-3'。以 pBR322/HPV16 为模板进行 PCR 扩增(95℃ 预变性 5min,94℃、15s,58℃、30s,72℃、40s,完成 30 个循环后于体系中加 rTaq 5u,68℃ 保温 20min 加 A 尾)。扩增产物进行 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳,判断扩增片段的大小及扩增质量后,利用试剂盒常规回收约 770bp 的片段,连入中间载体 pMDT-18 得到 pMDT-18-E6E7,将其与真核表达载体质粒 pSG. SS. C3d3. YL 及 pSG. SS. YL 进行 Bgl II 和 BamH I 双酶切,获得 770bp 左右的目的片段和线性化的骨架质粒,相连后获得重组质粒 pSG. SS. E6E7. C3d3. YL 和 pSG. SS. E6E7. YL,再进行酶切及 DNA 序列测定鉴定。

1.4 重组质粒转染真核细胞 采用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) 试剂盒,将重组质粒瞬时转染真核细胞 COS-7,依照说明书进行操作,简要步骤如下:(1)孔培养板内铺盖玻片后接种 COS-7 细胞,接种量为 1×10^6 细胞/孔;(2)取 4 μ g 质粒 DNA 及 10uL Lipofectamine,均使用 250 μ L 无血清 DMEM 培养基进行稀释后混合;(3)在 6 孔板中加入 DNA-Lipofectamine 混合物,轻柔混匀,于 37℃、50mL/L CO₂ 培养箱中培养 48h。

1.5 重组质粒转染真核细胞后表达产物的鉴定 采用 Western blot 技术,首先收集转染细胞培养上清液,经离心(10 000r/min,4℃,10min)并浓缩后,按常规进行蛋白定量,并用上样缓冲液稀释至 2 500 μ g/mL 后进行 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 分析。一抗和二抗分别为 HPV16E7 鼠单克隆抗体(1:100)、HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1:1 000)。取 6 孔板内铺有细胞的盖玻片,经 PBS 洗涤、冷丙酮固定、0.3% H₂O₂ 甲醇溶液封闭以及 Triton-X 100 通透等步骤,依次加入一抗和二抗(同前),再经 DAB 显色后,光镜下观察照相。

2 结 果

2.1 目的片段 HPV16E6E7 的获取 通过 PCR 技术成功获得了大小约 770 bp 的片段,与 E6E7 理论值相符(图 1)。



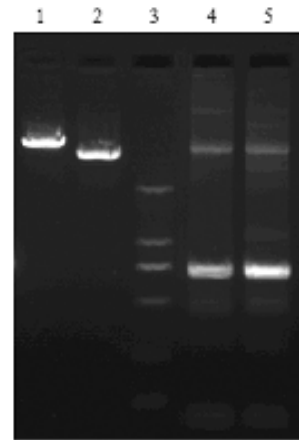
1:DL2000 Marker;2:约 770bp 的 PCR 产物

图 1 PCR 扩增 E6E7 片段凝胶电泳图

2.2 重组质粒的构建 将 pMDT-18-E6E7、pSG. SS. C3d3. YL、pSG. SS. YL 均进行 Bgl II 和 BamH I 双酶切,可分别获得大小约 770bp 的片段和线性化的质粒(图 2)。

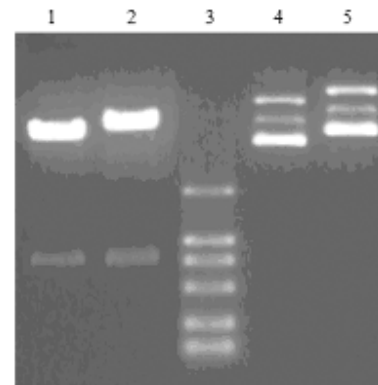
将上述约 770bp 片段和线性化的 pSG. SS. C3d3. YL、pSG. SS. YL 骨架质粒进行连接反应后,转入 DH5 α 菌中进行扩增,并筛选出重组质粒 pSG. SS. E6E7. C3d3. YL 和 pSG. SS. E6E7. YL,再次用 BamH I、Bgl II 双酶切,均可获得两个

片段,其中小片段大小均为 770bp(图 3),同 E6E7 预期理论值相符。



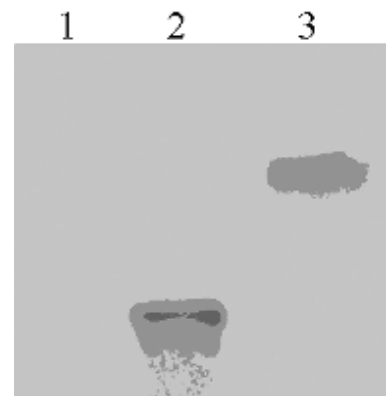
1:BamH I、Bgl II 双酶切后线性化的 pSG. SS. C3d3. YL 质粒;2:BamH I、Bgl II 双酶切后线性化的 pSG. SS. YL 质粒;3:DL2000 Marker,由上至下依次为 2 000、1 000、750、500、250、100bp;4、5:BamH I、Bgl II 双酶切 pMDT-18-E6E7。

图 2 重组质粒的构建



1:BamH I、Bgl II 双酶切 pSG. SS. E6E7. YL 质粒;2:BamH I、Bgl II 双酶切 pSG. SS. E6E7. C3d3. YL 质粒;3:DL2000 Marker,由上至下依次为 2 000、1 000、750、500、250、100bp;4、5:未酶切的 pSG. SS. E6E7. YL 和 pSG. SS. E6E7. C3d3. YL 质粒。

图 3 重组质粒 pSG. SS. E6E7. C3d3. YL 和 pSG. SS. E6E7. YL 酶切电泳图



1:对照;2:pSG. SS. E6E7. YL;3:pSG. SS. E6E7. C3d3. YL。

图 4 pSG. SS. E6E7. C3d3. YL 和 pSG. SS. E6E7. YL 转染 COS-7 细胞后培养上清液中蛋白产物的 Western Blot 检测结果

2.3 重组质粒转染真核细胞后表达产物的鉴定 经 SDS-PAGE 和 Western blot 分析可见两条带(图 4), 分别对应于 pSG. SS. E6E7. C3d3. YL 和 pSG. SS. E6E7. YL 转染 COS-7 细胞后培养上清液中的蛋白产物, Mr 大小与 E6E7-C3d3 融合蛋白(约为 146×10^3)及 E6E7 蛋白(约为 36×10^3)的理论值相近。免疫细胞化学分析显示转染细胞胞浆和胞膜呈阳性反应, 表明目的片段能够正确表达。

3 讨 论

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一, 严重威胁着女性身体健康。HPV 感染和子宫颈癌有着密切的关系, 90% 以上的宫颈癌组织中含有 HPV DNA^[6]。目前已发现有 100 多种基因型 HPV, 80% 的宫颈癌与其中 4 个高危型 HPV 感染有关, 分别是 16、18、31 和 45 型, 而 50% 的宫颈癌与 HPV16 型感染有关^[7]。目前虽然早期宫颈癌患者放疗及手术治疗效果较好, 但中晚期患者则多采用放、化疗为主的综合性治疗方法。由于放疗有较大不良反应及宫颈癌对化疗的不敏感性, 且费用大, 复发率高, 有约 35% 的患者出现目前尚无法治疗的严重合并症, 因此研究开发以 HPV 为靶点的宫颈癌预防性和治疗性疫苗很有必要。

有研究证实, 在大多数 HPV16 相关宫颈癌及其癌前病变中, HPV E6 和 E7 蛋白的持续表达在肿瘤发生发展中起重要作用。E6 对肿瘤恶性转化的机制主要有两种: (1) 结合并降解 p53; (2) 激活端粒酶使正常细胞永生。E7 则是与视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)反应发挥转化活性。因此, E6 和(或)E7 两种蛋白可作为发展 HPV16 相关宫颈癌及癌前病变治疗性疫苗的理想靶抗原。

与单独 E6 或 E7 基因免疫相比, 利用 E6E7 两段基因为靶基因构建 DNA 疫苗, 可涵盖较多的抗原表位(包括 Th 表位、CTL 表位), 诱发机体产生针对靶细胞可能呈递的多个抗原表位的杀伤性 T 细胞克隆, 从而表现出较高的杀伤活性, 获得免疫活性加强的效果^[8]。目前, 以 HPV E6 和(或)E7 蛋白为靶抗原的治疗性疫苗有重组蛋白疫苗、多肽疫苗、嵌合疫苗、核酸疫苗等, 已经完成了动物实验。结果证明, 这些疫苗均可诱导动物产生特异性细胞免疫反应, 但 I / II 临床实验并未取得良好的免疫效果, 其主要原因是患者机体处于免疫抑制状态, 应用疫苗后并没有诱导机体产生足够强的特异性细胞免疫反应。因此, 如何选择恰当的佐剂以进一步提高免疫效果, 是开发 HPV16 治疗性疫苗的关键。

近年补体研究领域有一个重要发现, 即补体 C3 裂解片段 C3d 具有促进免疫应答的佐剂效应, 为解决上述问题提供了一条有效途径。目前, C3d 的佐剂效应已在 HIV、流感病毒和牛腹泻病毒等传染病的疫苗研制中得到了充分的实验证实^[4-5, 9]。此外, 由于补体分子为人体自身成分, 不良反应小,

本研究设想, 如果将补体分子 C3d 作为分子内佐剂与 E6E7 分子相连, 则有可能制成安全、有效的抗 HPV 疫苗。基于以上分析, 本研究设计并制备了含有 E6E7 和串联的 3 个 C3d 融合基因的真核表达质粒, 以期获得一种高效、安全的 HPV 疫苗, 为宫颈癌治疗提供一种新的思路。本实验证实质粒完全符合设计要求, 能够在真核细胞中良好表达, 为其作为 DNA 疫苗接种实验动物后免疫效应的研究奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] Jung WW, Chun T, Sul D, et al. Strategies against human papillomavirus infection and cervical cancer[J]. J Microbiol, 2004, 42(4): 255.
- [2] Steller MA. Cervical cancer vaccines: progress and prospects[J]. Soc Gynecol Investig, 2002, 9(5): 254.
- [3] Rocha Z, Avalata L, Alexandre JE, et al. Parenteral and oral immunization with a plasmid DNA expressing the human papillomavirus 16 L1 gene induces systemic and mucosal antibodies and cytotoxic T lymphocyte responses [J]. J Med Virol, 2002, 66(1): 86.
- [4] Watanabe I, Ross TM, Tamura S, et al. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of C3d fused hemagglutinin [J]. Vaccine, 2003, 21(31): 4532.
- [5] Wang L, Sunyer JO, Bello LJ. Fusion to C3d enhances the immunogenicity of the E2 glycoprotein of type 2 bovine viral diarrhoea virus [J]. J Virol, 2004, 78(4): 1616.
- [6] Subramanya D, Grivas PD. HPV and cervical cancer: updates on an established relationship [J]. Postgrad Med, 2008, 120(4): 7.
- [7] Schiffman M, Khan MJ, Solomon D, et al. A study of the impact of adding Human papillomavirus types to cervical cancer screening and triage tests [J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(2): 147.
- [8] Velders MP, Weijzen S, Eiben GL, et al. Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine [J]. J Immunol, 2001, 166(9): 5366.
- [9] Green TD, Montefiori DC, Ross TM. Enhancement of antibodies to the human immunodeficiency virus type 1 envelope by using the molecular adjuvant C3d [J]. J Virol, 2003, 77(3): 2046.

(收稿日期: 2009-07-05 修回日期: 2009-08-14)