

## 研究工作

## 人乳头瘤病毒 16 型 E7 基因的克隆和表达\*

齐凤菊 徐 铃

(第一军医大学生物化学教研室, 广州 510515)

## 提 要

用分子克隆技术在大肠杆菌中表达 HPV16 E7 基因。用限制性内切酶 DdeI 将含有大部分 E7 基因的 191bp 片段从 HPV16 基因组中切出。将此片段与含有色氨酸操纵子的启动子的表达载体 pATH10 连接成重组 DNA, 用以转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 并筛选出阳性重组子。还进行了限制酶切分析和蛋白质 SDS-PAGE 分析。表达的新蛋白质带的分子量与预期的分子量相符。我们认为表达的新蛋白质是 TrpE 和 E7 蛋白的融合蛋白。

**关键词** 人乳头瘤病毒, 细胞转化, 克隆表达, 重组 DNA

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 属乳多空泡病毒科 (papovaviridae family)。HPV 基因组为有约 7900bp 的环状双链 DNA。HPV 实际上包括许多异源群体, 根据在严谨条件 (stringent conditions) 下交叉杂交的结果, 目前已发现 HPV 有 60 多型, 而且还在不断出现新型。重要的是不同型 HPV 引起人体病变的部位和良恶性程度不同。生殖道尖锐湿疣早就被认为是一种传染性疾病。据报告, 美国每年新发生的生殖道湿疣病例超过一百万<sup>[1]</sup>, 其中绝大部分病损是由 HPV 6 和 11 引起的。越来越多的证据说明, HPV16 是子宫颈癌和宫颈发育异常 (dysplasia) 的致病因子。在宫颈、外阴和阴茎的活检样品中约有 60—80% 发现有 HPV16 和 HPV18 的 DNA 顺序<sup>[2]</sup>。

近年来人们认为, E6, E7 基因可能是 HPV 16 和 18 的转化基因, 是潜在的癌基因<sup>[3]</sup>。由于 HPV 只能在高度分化的角质化上皮细胞内完整地复制, 完成其生活周期, 目前尚无合适的体外细胞培养系统能大量繁殖病毒粒子, 因

此很难取得这些基因所编码的蛋白质来进行研究。国外许多学者用重组 DNA 技术合成了许多病毒蛋白质, 其中包括 HPV16 的 E6 和 E7 蛋白<sup>[4]</sup>, 而且对这些合成的病毒抗原制备了抗体。

对肿瘤组织中 HPV 基因转录的研究结果发现<sup>[5,6]</sup>, 良性肿瘤中早期与晚期基因基本上是均等地得到表达; 而在恶性肿瘤中仅 E6, E7 基因有较高程度的表达, 因此认为 E6, E7 基因产物可能在维持细胞恶性表型方面起一定作用。

Dyson 等报告<sup>[7]</sup>, HPV 的 E7 蛋白, 与腺病毒 E1A 蛋白和 SV40 大 T 抗原 (LT) 相似, 能与抗癌蛋白 p105-Rb 相结合。E1A, SV40LT 和 E7 这 3 种病毒癌蛋白在结构上有一段氨基酸顺序是相同的, 而正是这一段乃是 p105-Rb 的识别和结合区, 而其余部分的结构则彼此不同。这 3 种病毒癌基因各自均能使胚胎细胞永生, 并均能与 ras 癌基因协作使这些细胞转

\* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1991-04-15 修回日期: 1991-07-23

化。

我们克隆了 HPV16 的 E7 基因,并在大肠杆菌中以融合蛋白的形式表达,以期获得较纯的基因产物,为下一步工作奠定基础。按照 Seedorf 等<sup>[6]</sup>发表的 HPV16 的 DNA 顺序分析结果,E7 基因开始于第 562 位核苷酸(ATG),终止于 856 位(TAA),共长 294bp,其编码的 E7 多肽有 96 个氨基酸残基,分子量为 11024。我们用限制性内切酶 DdeI 切割 HPV 16 DNA,选取 654 位至 845 位核苷酸的一段,经两端补齐后共长 194bp,编码 64 个氨基酸残

基,约为天然 E7 蛋白的 65.3%,分子量约 7.2 kD。

### 1. 材料与方 法

表达性质粒 pATH10<sup>[9]</sup>,受体菌 *E.coli* DH5 $\alpha$ ,和 Hind III 人工接头(5'-AATTGAAGCTTC-3')由周辰博士赠送。含 HPV16 全基因组的质粒 HPV16-pBR322 由德国 E. M. de Villier 博士赠送。所用工具酶均购自华美生物工程公司。

整个实验设计的流程图见图 1。

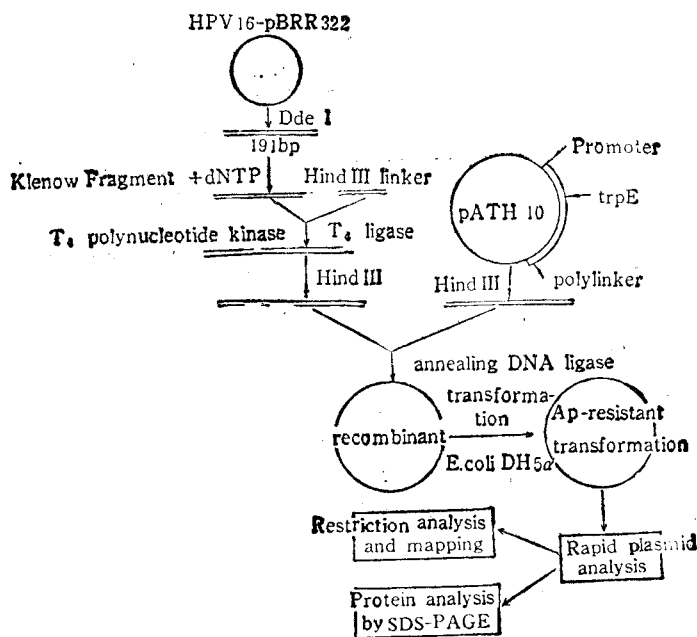


图 1 实验流程图

Fig. 1 Cloning strategy of the E7 gene

**1.1 E7 基因的分离和制备** 用 DdeI 切割质粒 HPV16-pBR322。按顾良银报道的方法<sup>[10]</sup>回收含有大部分 E7 基因的 191bp 片段。按 Maniatis 等方法<sup>[11]</sup>以 4 种 dNTP 为底物,用 DNA 聚合酶 I Klenow 片段补齐 DdeI 切割留下的粘性末端,使之成为平端。再按 Maniatis 等方法在所得目的基因两端用 T4 DNA 连接酶接上 Hind III 人工接头。

**1.2 重组 DNA 的制备和重组子的筛选**<sup>[11]</sup> 将两端接上 Hind III 接头的目的基因

和载体 pATH10 分别用 Hind III 切开,将等摩尔数目的基因和载体 DNA 混合,退火,并用 T4 DNA 连接酶连接。用所得重组 DNA 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  筛选重组子。

**1.3 重组子的快速质粒分析**<sup>[11]</sup> 提取阳性转化菌的质粒进行电泳分析,并用 Hind III, EcoRI, BamHI, XbaI, PstI 和 PvuII 等限制酶进行酶切分析。

**1.4 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)** 将含有目的基因的转化子

进行蛋白质分析。用吲哚丙烯酸 (IAA) 诱导 pATH10 中色氨酸操纵子的表达<sup>[9]</sup>。样品的制备按 Amann 法<sup>[12]</sup>, SDS-PAGE 基本按照 Laemmli 法<sup>[13]</sup>。

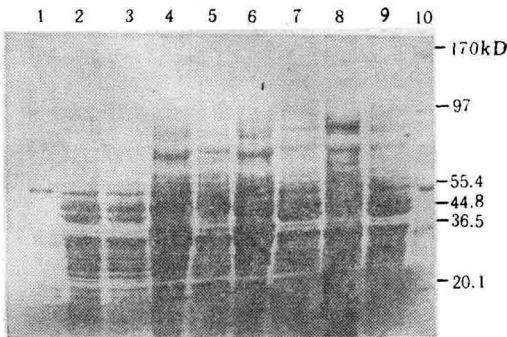
**1.5 表达蛋白质的纯化** 取 1L 培养液的重组菌, 经 IAA 诱导后, 将全细菌裂解液用 SDS-PAGE 法电泳, 考马斯亮蓝染色。切取 TrpE/E7 融合蛋白凝胶带, 放入置有 TG 缓冲液 (Tris HCl 0.025mol/L, 甘氨酸 0.192mol/L, SDS 1%, pH8.3) 的透析袋中, 电泳驱出凝胶中的融合蛋白, 浓缩后低温储存。

**1.6 对流免疫电泳** 用离子强度 0.03, pH 8.6 的巴比妥缓冲液配制琼脂(日本进口)溶液, 吸取 4ml 加于载玻片上, 凝固后打孔(孔径 3 mm, 间距 5mm)。将纯化的表达蛋白用巴比妥

缓冲液逐倍稀释, 各取 20 $\mu$ l 点于每对孔的阴极侧, 在阳极孔中点抗 TrpE 抗血清(周辰博士赠送)20 $\mu$ l, 100V/10mA 电泳 1h, 观察沉淀带。

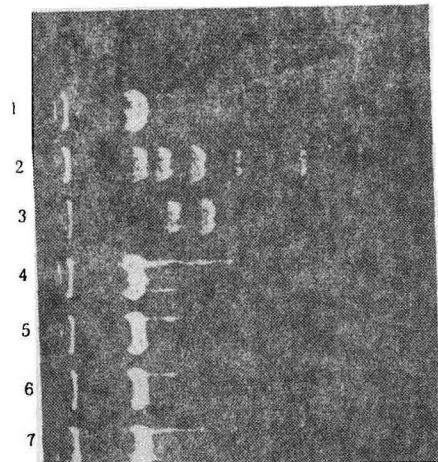
## 2 结果与讨论

用制备的重组 DNA 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 选取 4 个能表达融合蛋白的重组质粒克隆, 分别为 pDV30, 31, 34 和 39。载体质粒 pATH10 表达分子量约为 37.5kD 的 TrpE 蛋白带; 而上述 4 个重组子均无此带而另表达分子量约为 44.8kD 的新蛋白质带。这与预期表达的融合蛋白 TrpE/E7<sub>32-95aa</sub> 的分子量相符。



**图 2 重组菌的蛋白质凝胶电泳结果**  
Fig.2 Analysis of total cellular *E. coli* protein extracts by SDS-PAGE

第 1 和第 10 行: 蛋白质分子量标准  
第 5 行: *E. coli* DH5 $\alpha$  株含有 pATH10 质粒(未诱导)  
第 4 和 6 行: DH5 $\alpha$  菌含有 pATH10 质粒, 已经吲哚丙烯酸 (IAA) 诱导  
第 2, 3, 7, 9 行: DH5 $\alpha$  菌含有 pDV31, 34, 39 和 30 质粒, 已经 IAA 诱导, 可见一条新的蛋白带, 分子量约为 44.8kD  
第 8 行: DH5 $\alpha$  菌含有 pDV32 质粒, 未见新的蛋白带  
lanes 1 and 10: Standard protein markers  
lane 5: *E. coli* DH5 $\alpha$  with plasmid pATH10, not induced  
lanes 4 and 6: *E. coli* DH5 $\alpha$  with plasmid pATH10, induced with indole acrylic acid (IAA)  
lanes 2, 3, 7 and 9: *E. coli* DH5 $\alpha$  with plasmid pDV 31, 34, 39, and 30 respectively, induced with IAA. A new protein band with a molecular weight of about 44.8 kD is visible  
lane 8: *E. coli* DH5 $\alpha$  with plasmid pDV32. No new protein band is seen



**图 3 重组质粒 pDV-30 的限制酶切分析结果**  
Fig.3 Restriction patterns of pDV 30

第 1 行: HindIII 酶切结果  
第 2 行: DNA 片段长度(bp)标准: 3175, 2800, 1776, 1063, 483, 216 (from left to right)  
第 3 行: PvuII 酶切结果  
第 4—7 行: 分别为 BamHI, EcoRI, XbaI 和 PstI 酶切结果  
lane 1: cleaved with HindIII  
lane 2: markers of DNA fragment size (in bp): 3175, 2800, 1776, 1063, 483, 216 (from left to right)  
lane 3: cleaved with PvuII  
lanes 4 to 7: cleaved with BamHI, EcoRI, XbaI and PstI respectively

上述 SDS-PAGE 图经考马斯亮蓝染色后, 进行了光密度扫描。经计算融合蛋白产量约占细菌蛋白质总量的 30%。

质粒 pDV30, 31, 34 和 39 的酶切分析结果 4 者基本相同。用几种限制酶切割后的电泳结

果见图 3,根据 DNA 片段的泳动距离及其 bp 数的对数值之间的关系,计算出各片段的大小并绘出其酶切图谱(图 4)。用 EcoRI, BamHI, XbaI 和 PstI 酶切后均只能得一条长约 4000 bp 的线性 DNA 带,这是因为这些酶只在载体的多接头 (polylinker) 中有切点。用 HindIII 酶切可得长约 3800bp 的带(载体 DNA)和 200 bp 左右的小带(目的基因),证明所得到的是预期的重组 DNA。用 PvuII 酶切可得两个 DNA 片段,一个约 1500bp, 另一个约 2500bp。由于 PvuII 在载体上的切点位于 0 位,在 E7 上的切点位于第 683 位核苷酸,故足以证明 E7 基因的方向是正确的(正向插入)。

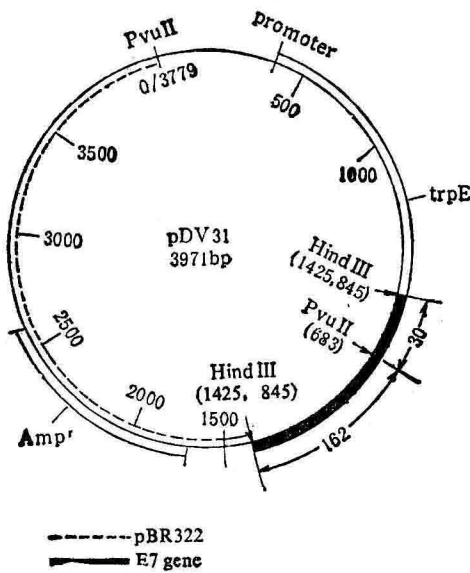


图 4 重组质粒 pDV 的物理图  
Fig.4 Restriction map of the recombinant plasmid pDV

细线部分为 pATH10 (载体)  
粗线部分为目的基因 (E7)  
thin line: the vector (pATH10)  
thick line: the target gene(E7)

用凝胶电泳法纯化了 1L 培养液重组菌中的融合蛋白,得到部分纯化的 TrpE/E7<sub>32-95aa</sub>, 产量约 11mg。将纯化的融合蛋白与抗 TrpE 抗血清进行对流免疫电泳,结果显示抗原量少至 0.7μg(1:32 稀释,20μl)时,仍可出现沉淀带(图 5),证实表达蛋白具有 TrpE 抗原性。

重组质粒的酶切图谱如图 3 所示。如为正

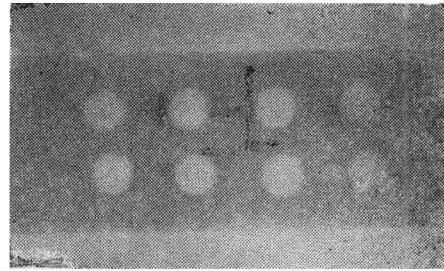


图 5 纯化的融合蛋白与抗 TrpE 抗血清的对流免疫电泳结果

Fig.5 Countercurrent immunoelectrophoresis of the partially purified fusion protein (antigen) with the antisera against TrpE polypeptide (antibody)

抗原融合蛋白的稀释度为: 上行: 左侧 1:8 右侧 1:16 下行: 左侧 1:32 右侧 1:64

The antigen has been diluted:

top row	left side	1:8
	right side	1:16
bottom row	left side	1:32
	right side	1:64

向插入,表达蛋白质的分子量约为 44kD。如为反向插入,则在 trpE 后的插入子中,无论那个读框都会很快出现终止密码子,故分子量应为 37kD 左右。根据限制酶的酶切图谱和对流免疫电泳的结果,以及表达蛋白质的分子量与预期分子量相符,我们初步肯定此表达蛋白质即是 TrpE/E7<sub>32-95aa</sub> 融合蛋白。

1986 年 Smotkin 等<sup>[4]</sup>首先克隆和表达了 HPV16 的 E6 和 E7 基因。他们发现在培养的人宫颈癌细胞系 CaSki 和 SiHa 细胞中,最丰富的 HPV16 的转录本及其翻译产物是 E7 mRNA 及其蛋白<sup>[4]</sup>。在 Caski 细胞的胞浆中并发现有磷酸化的 E7 蛋白,这和 SV 40LT 的性质相似。Smotkin 等还指出,HPV16 的 E6 蛋白可以在体外独立转化细胞,但是对宿主体内癌的进展,则 E6 和 E7 蛋白都是必需的。Sager 报告<sup>[15]</sup>, p105-Rb 能与 SV40LT, E1A 和 E7 蛋白结合形成复合体。在受病毒转化的细胞中,正是由于 p105-Rb 与 E7 蛋白等的结合导致了 p105-Rb 正常抑制作用的丧失,从而引起细胞不受控制的生长。

我们认为,今后,E7 蛋白致癌作用的研究,特别是它与宿主细胞蛋白之间的相互作用,可能将成为研究的热点。

## 参 考 文 献

- 1 Centers for disease control. *Morbid Mortal Weekly Rep*, 1983; 32: 306
- 2 Durst M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80: 3812
- 3 Bedell M A *et al.* *J Virol*, 1987; 6(11): 3635
- 4 Smotkin D *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83(13): 4680
- 5 Yasumoto S *et al.* *Cell Biol*, 1987; 7(6): 2165
- 6 Androphy E J *et al.* *EMBO J*, 1987; 6(4): 989
- 7 Dyson N *et al.* *Science*, 1989; 243: 934
- 8 Seedorf K *et al.* *Virology*, 1985; 145: 181
- 9 Kleid D G *et al.* *Science*, 1981; 214(4525): 1125
- 10 顾良银. 生命的化学, 1988; 18(1): 21
- 11 Maniatis T *et al.* *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor, 1982
- 12 Amann E *et al.* *Gene*, 1984; 32: 203
- 13 Laemmli U K *et al.* *Nature*, 1970; 227: 680
- 14 Smotkin D *et al.* *J Virol*, 1987; 61(5): 1686
- 15 Sager R. *Science*, 1989; 246: 1406

## SUBCLONING AND EXPRESSION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 E7 GENE IN *ESCHERICHIA COLI*

Qi Fengju                      Xu Qian

(Department of Biochemistry, The First Medical College of PLA, Canton 510515, P. R. China)

### ABSTRACT

The E7 gene of human papillomavirus type 16 was expressed in *E. coli* with molecular cloning technique. A 191 bp fragment containing most of the E7 gene was cut out from the HPV 16 genome with the restriction enzyme Dde I. The plasmid pATH10 which contains the promoter of the tryptophane operon was chosen as the expression vector. The 191 bp fragment and the vector plasmid were ligated together later and the recombinant DNA formed was used to transform *E. coli* DH5 $\alpha$ . Restriction enzyme mapping and SDS-PAGE protein analysis were done on four transformants. The molecular weight of the newly expressed protein of the transformant was estimated and found to correspond well with that expected theoretically. We concluded that the expressed protein was a fusion protein of TrpE/E7<sub>32-95</sub>aa.

**Key words** human papillomavirus, cell transformation, cloning and expression, recombinant DNA

## 应用 PCR 及寡核苷酸探针研究人原发性 肺癌中 Ki-ras 点突变\*

覃 扬 孙芝琳 赵建升 孙 宁

(华西医科大学生化教研室, 成都 610041)

步 宏 刘开凤

(华西医科大学病理教研室)

### 提 要

应用 PCR 及寡核苷酸探针杂交方法研究了 50 例人原发性肺癌石蜡切片标本

\* 国家“七·五”攻关资助项目。

收稿日期: 1991-05-13      修回日期: 1991-10-07