

· 基础研究 ·

HPV18E7 重组质粒的构建及在大肠杆菌中的表达优化*

胡仁建¹, 蔡家利^{1△}, 刘利¹, 涂漫语¹, 徐涛¹, 杜翠容¹, 罗佳¹, 丁森²

(1. 重庆理工大学药学与生物工程学院 400054; 2. 南京大学生命科学学院 210093)

摘要:目的 构建 HPV18E7 基因重组质粒,并探索其在大肠杆菌中的最佳表达条件。方法 以提取的 HeLa 细胞株中的 DNA 为模板 PCR 扩增 HPV18E7 基因;将 HPV18E7 基因与载体 pET-32a(+)连接为重组质粒 pET-32a(+)-HPV18E7;将该重组质粒转入大肠杆菌 BL21-DE3-pLysS 细胞中,探索优化表达的条件,以获得大量 HPV18E7 致癌蛋白。结果 PCR 扩增的目标基因大小序列与 HeLa 细胞中的 HPV18E7 基因的大小序列一致。用 LB 培养基, IPTG 和乳糖诱导表达显示不同浓度、不同温度、不同诱导起始量等表达量均不高,尝试用 ZYM-5052 自动诱导培养基诱导, HPV18E7 融合蛋白的表达量远远高于用异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)和乳糖诱导表达的表达量。结论 测序正确的 HPV18E7 重组质粒在自动诱导培养基 ZYM-5052 中获得远远高于用异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)和乳糖诱导表达的 HPV18E7 融合蛋白。

关键词: HPV18; HPV18E7 基因; HeLa 细胞株; 自诱导培养基

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.30.022

文献标识码: A

文章编号:1671-8348(2013)30-3647-03

Construction of HPV18E7 recombinant plasmid and exploration of its optimization expression condition in Escherichia coli*

Hu Renjian¹, Cai Jiali^{1△}, Liu Li¹, Tu Manyu¹, Xu Tao¹, Du Cuirong¹, Luo Jia¹, Ding Sen²

(1. School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China;

2. School of Life Science, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210093, China)

Abstract: Objective To construct recombinant plasmids containing HPV18E7 gene, and explore the optimization condition of its expression in Escherichia coli. Methods The genomic DNA extracted from HeLa cell line which served as a template to the HPV18 E7 gene was amplified using PCR method; and the amplified product of HPV18E7 gene was connected to the pET-32a(+) vector, which composed the pET-32a(+)-HPV18E7 recombinant plasmid; the positive recombinant plasmids were transformed into BL21-DE3-pLysS competent cells and the optimized expression condition was explored in order to obtain a large amount of HPV18E7 oncogenic protein. Results The fragment length of PCR products of HeLa cell genomic DNA was consistent with that of HPV18 E7 gene. In LB medium, the expression level of the target protein was not high under such conditions as different concentration of IPTG and lactose, different temperatures and different induction starting amount. Therefore the ZYM-5052 auto-induction medium was tried in this experiment, and the expression amount of the fusion protein was much higher than that induced with IPTG and lactose. Conclusion The amount of HPV18E7 fusion protein in ZYM-5052 automatic induction medium is much higher than that induced with IPTG and lactose.

Key words: human papillomavirus type 18; HPV18E7 gene; HeLa cell line; auto-induction medium

高危型人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)持续感染宫颈是引起宫颈癌及癌前病变的直接病因^[1]。HPV E7 蛋白为宫颈癌发展的潜在标志物,可以用新型双抗夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测到各型 HPV 的重组 E7 蛋白以及宫颈涂片和宫颈癌细胞裂解物中的 HPV E7 蛋白^[2]。HPV 很难在体外培养成功^[3-5], HPV18 整合在 HeLa 细胞株的染色体^[3,6],本研究利用基因重组技术,构建 HPV18E7 基因的重组质粒,并探索 HPV18E7 基因的优化表达,为探索新的简单有效的检测宫颈涂片中的 HPV18E7 蛋白的诊断方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和材料 大肠杆菌 DH5α 和 BL21-DE3-pLysS 由重庆市富进生物技术有限公司惠赠,组织/细胞 DNA 小量抽提试剂盒购于上海华舜生物技术有限公司,质粒抽提

试剂盒和胶回收试剂盒购于 OMEGA 公司,质粒载体 pET-32a(+)购于 Novagen 公司, HPV18E7 引物委托上海博尚生物技术有限公司合成,工具酶 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase、Nco I、Xho I、T4DNA Ligase 等购于大连宝生物技术有限公司。

1.1.2 主要仪器 Thermo Hybrid 公司的 2×P 梯度 PCR 仪, BIO-RAD 电泳仪及电泳槽等。

1.2 方法

1.2.1 pET-32a(+)-HPV18 E7 重组质粒的构建 利用软件分析 HPV18E7 全基因的序列后设计一对特异性引物。以提取的 HeLa 细胞株的 DNA 为模板 PCR 扩增 HPV18E7 基因。将 HPV18E7 基因和载体 pET-32a(+)进行酶切及连接。

1.2.2 感受态细胞的制备与重组质粒的转化 用氯化钙法制备 DH5 的感受态细胞,将连接后的重组质粒 pET-32a(+)-

* 基金项目:重庆市教育委员会科技研究项目(KJ110820)。 作者简介:胡仁建(1968~),硕士,高级实验师,主要从事疫苗与诊断试剂的研究。 △ 通讯作者, Tel:13883003593; E-mail:cjl@cqut.edu.cn。

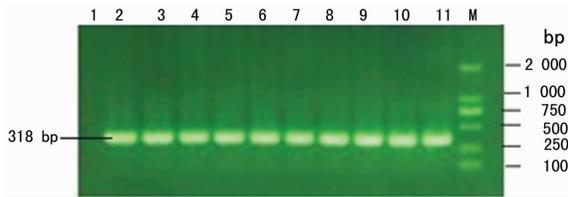
HPV18E7 转化感受态的大肠杆菌 DH5 α ,同时设置阴性对照和阳性对照。

1.2.3 重组质粒的鉴定 挑选 3 个单菌落,提取质粒,进行了 PCR 鉴定、双酶切鉴定和 DNA 测序。

1.2.4 HPV18E7 基因在大肠杆菌中的优化表达 在 LB 培养基中,诱导起始 A₆₀₀ 为 0.6~0.8,用异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖(IPTG)和乳糖两种诱导剂,IPTG 诱导浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0 mmol/L,乳糖浓度 0.10、0.25、0.50、1.00 g/L,4 个诱导温度:20、24、30、37 $^{\circ}$ C,以空载体为空白对照,诱导前和诱导后 2、4、6 h 取样,所有的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳结果显示目的蛋白的表达量不高。据 F. William Studier 的自诱导策略的成功^[7],尝试用为自诱导培养基 ZYM-5052 时,结果显示有大量的目的蛋白表达。

2 结果

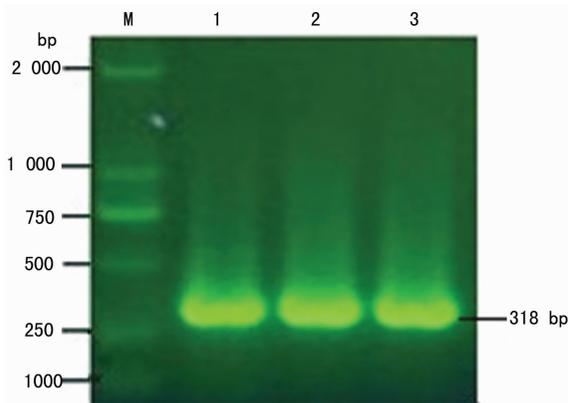
2.1 HPV18E7 基因的 PCR 扩增结果 梯度 PCR 结果显示除 64.2 $^{\circ}$ C 的退火温度不能扩增出目的基因以外,退火温度分别为:64.5、65.1、65.7、66.5、67.3、68.1、69.0、69.6、69.9、70.1 $^{\circ}$ C 均能扩增出与目标基因 HPV18E7(大小为 318 bp)大小一致的片段,且特异性较好,无其他杂带的出现。见图 1。选择 69 $^{\circ}$ C 为退火温度大量 PCR 扩增目标基因 HPV18E7。



1~11:退火温度分别为:64.2、64.5、65.1、65.7、66.5、67.3、68.1、69.0、69.6、69.9、70.1 $^{\circ}$ C;M:DL2 000 DNA 分子标志物。

图 1 HPV18E7 基因的梯度 PCR 扩增核酸电泳图

2.2 重组质粒 pET-32a(+)-HPV18E7 的 PCR 鉴定 以 3 个克隆的重组质粒 pET-32a(+)-HPV18E7 为模板,用 HPV18E7 特异性引物 PCR 扩增 HPV18E7 基因,有 3 个克隆的重组质粒能够扩增出相对分子质量大小与 HPV18E7 基因一致的条带,见图 2。



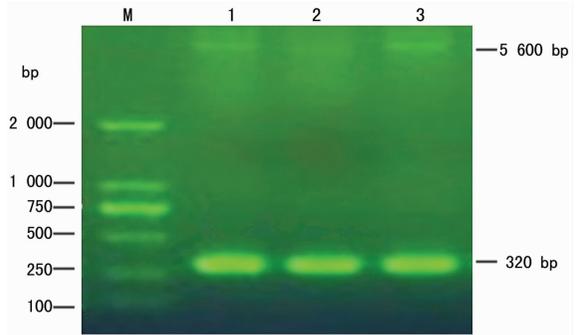
M:DL2 000 DNA 分子标志物;1~3:3 个克隆的重组质粒 PCR 鉴定产物。

图 2 重组质粒 pET-32a(+)-HPV18E7 的 PCR 鉴定图

2.3 重组质粒 pET-32a(+)-HPV18E7 的双酶切鉴定 用 *Nco*I 和 *Xho*I 双酶切 3 个经 PCR 鉴定有目标基因的重组质粒 pET-32a(+)-HPV18E7,核酸电泳显示有与质粒 pET-32a(+)-HPV18E7 的相对分子质量大小一致的条带

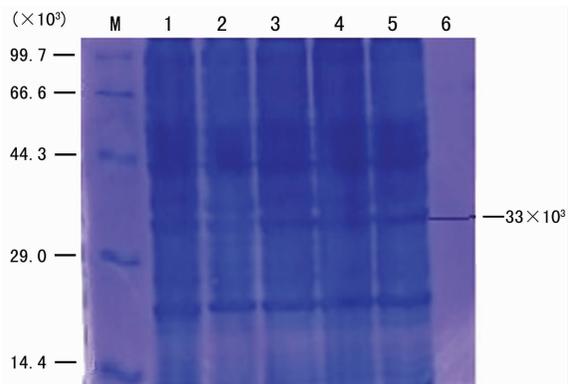
出现。见图 3。

2.4 重组质粒 pET-32a(+)-HPV18E7 的 DNA 测序 先将 3 个经 PCR 鉴定和双酶切鉴定有目的基因的重组质粒 pET-32a(+)-HPV18E7 送大连宝生物公司测序,有 2 个质粒中 HPV18E7 序列与 HeLa 细胞中的 HPV18E7 序列一致,有 1 个质粒有 1 个碱基变异。另外提取 3 个质粒,DNA 测序,经比对后发现这 3 个质粒中的目标基因 HPV18E7 的序列与模板 HeLa 细胞中的 HPV18E7 序列一致。选择其中任何一个质粒转化感受态的大肠杆菌 BL21-DE3-pLysS 制备成工程菌用于表达 HPV18E7 致癌蛋白。



M:DL2000 DNA Marker;1~3:3 个阳性克隆的双酶切鉴定产物。

图 3 重组质粒 pET-32a(+)-HPV18E7 的双酶切鉴定



M:中分子蛋白分子标志物;1:空载体表达 4 h;2~6:不同诱导浓度诱导 4 h 和胞外液。

图 4 用 IPTG 和乳糖诱导表达时无明显的 HPV18E7 融合蛋白出现的 SDS-PAGE 图

2.5 重组质粒 pET-32a(+)-HPV18E7 在大肠杆菌中的优化表达 在 LB 培养基中,用 IPTG 和乳糖,在不同温度、不同诱导剂浓度、不同时间等任何一个条件诱导,然后经 SDS-PAGE 电泳,结果显示均无明显的目的蛋白出现。见图 4。在自诱导培养基 ZYM-5052 中,选择 4 个诱导温度 20 $^{\circ}$ C、24 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C,任何一个温度的 SDS-PAGE 蛋白电泳显示:与空载体 pET-32a(+)-BL21-DE3-pLysS 相比,pET-32a(+)-HPV18E7-BL21-DE3-pLysS 诱导前即 0 h、诱导 2 h 未见与目标蛋白相对分子质量大小一致的条带,4 h 均开始出现新的相对分子质量约 33×10^3 的条带,诱导 18 h 的量明显多于诱导 4 h 的量,HPV18E7 融合蛋白出现在上清中,显示 HPV18E7 基因表达的融合蛋白为可溶性表达,见图 5。空载体 pET-32a(+)-BL21-DE3-pLysS 表达的蛋白相对分子质量约为 20×10^3 ,HPV18E7 蛋白的相对分子质量约为 13×10^3 ,重组质粒 pET-32a(+)-HPV18E7 表达的融合蛋白

的相对分子质量大约 33×10^3 , 正好与新出现的条带相对分子质量一致。

经硫酸镍亲和层析初步纯化 HPV18E7 融合蛋白(因为载体 pET-32a(+))本身带有 6 个组氨酸标签, 可以与硫酸镍结合), SDS-PAGE 蛋白电泳显示用含 50 mmol/L 咪唑和 75 mmol/L 咪唑的洗脱液不能洗脱表达的融合蛋白, 用含 200 mmol/L 咪唑和 500 mmol/L 咪唑的洗脱液可以洗脱, 加上相对分子质量与目标蛋白的相对分子质量一致, 说明 500 mmol/L 咪唑洗脱的蛋白为目标融合蛋白。见图 6。

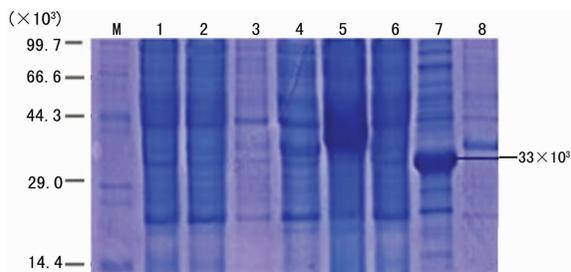


图 5 ZYM-5052 诱导 pET-32a(+)-HPV18E7-BL21-DE3-pLysS 表达图

图 5 ZYM-5052 诱导 pET-32a(+)-HPV18E7-BL21-DE3-pLysS 表达图

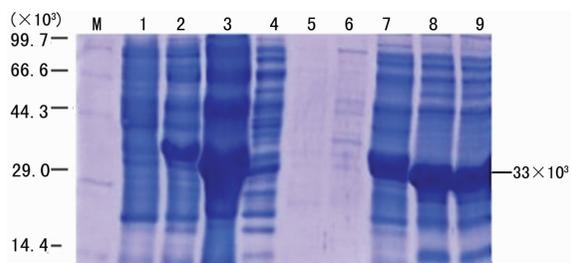


图 6 硫酸镍亲和和层析初步纯化 HPV18E7 融合蛋白的电泳图

图 6 硫酸镍亲和和层析初步纯化 HPV18E7 融合蛋白的电泳图

3 讨论

3.1 重组质粒 pET-32a(+)-HPV18E7 的构建 构建 HPV18E7 基因时, 设计针对 HPV18E7 全长基因的特异引物, 目的是希望获得 HPV18E7 全长天然蛋白, 以此天然蛋白筛选的单抗能更好特异结合宫颈涂片中表达的天然的 HPV18E7 蛋白。选择载体 pET-32a(+))是因为它带有 T7 强启动子、带有融合标签(Trx. Tag、His. Tag、S. Tag 等)可使目的 HPV18E7 蛋白可溶性的持续性表达, 而且在设计引物时使表达的初始 2 个氨基酸(蛋氨酸和缬氨酸)为非极性氨基酸时会提高表达量。采用梯度 PCR 探索出最佳的退火温度并大量扩增特异 HPV18E7 基因, 为后续的酶切、连接、鉴定等奠定基础。特别强调的是在回收 PCR 产物、酶切后的产物时一定要迅速, 避免在紫外线下暴露时间过长而引起的点突变。

3.2 重组质粒 pET-32a(+)-HPV18E7 的优化表达探索 pET 表达系统为 T7 诱导系统, 用 IPTG 诱导存在不足^[8]。本

研究实验证明, 在 LB 培养中, 用 IPTG 诱导 HPV18E7 基因, 无论选用哪种温度、何种诱导浓度、何种起始量, 以及诱导时间长短都未见有 HPV18E7 融合蛋白的明显表达; 用传统的乳糖诱导方法无论在何种条件下, 都未见有 HPV18E7 基因的明显表达。美国布鲁克黑文实验室的 Studier 提出了自诱导表达策略这一理论并实践成功^[7]。彭淑英等^[9]启用自诱导表达系统提高了表达的效率。本研究采用了 Studier 的自诱导不固定型组分培养基 ZYM-5052, 的确获得大量的呈可溶性表达的 HPV18E7 融合蛋白, 大大超过用 IPTG 和乳糖诱导的结果, 再次证明了自诱导表达策略的确可以提高外源基因在原核系统的表达效率。

培养基 ZYM-5052 包含细菌生长的各种营养成分和自诱导因素, 包括葡萄糖和乳糖, 葡萄糖消耗完毕后乳糖诱导作用开始。使用自诱导培养基 ZYM-5052 操作简单, 表达效率高, 价格便宜, 易于推广。

后续的纯化实验表明表达的融合蛋白可以用硫酸镍亲和和层析纯化得到, 且相对分子质量的大小与 HPV18E7 融合的相对分子质量大小一致, 证实了表达的融合蛋白确实是目标蛋白。初次纯化的 HPV18E7 蛋白的纯度虽然远远不够, 但可以通过提高硫酸镍亲和和层析柱的柱效以得到纯度高的融合蛋白, 为后续的肠激酶酶切 HPV18E7 融合蛋白奠定基础。

参考文献:

- [1] Burd EM. Human papillomavirus and cervical Cancer[J]. Clin Microbiol Rev, 2003, 16(1): 1-175.
- [2] Ehehalt D, Lener B, Pircher H, et al. Detection of human papillomavirus type 18 E7 oncoprotein in cervical smears: a feasibility study[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(2): 246-257.
- [3] 李忠明, 张延龄, 徐德启, 等. 当代新疫苗[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001: 509-514.
- [4] Yan J, Harris K, Khan AS, et al. Cellular immunity induced by a novel HPV18 DNA vaccine encoding an E6/E7 fusion consensus protein in mice and rhesus macaques [J]. Vaccine, 2008, 26(40): 5210-5215.
- [5] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 812-831.
- [6] Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(4): 315-319.
- [7] Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures[J]. Protein expression and purification, 2005, 41(1): 207-234.
- [8] 冯彬. T7 表达系统及自诱导蛋白产出策略[J]. 教育学院管理学报自然科学版, 2009, 4(3): 10-15.
- [9] 彭树英, 吕宁, 贾淑玲, 等. 应用自动诱导表达体系提高原核表达效率[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(1): 138-143.