

HPV16E7-HSP70 融合蛋白在大肠杆菌中表达及纯化

英信江¹, 董 频¹, 徐宏鸣¹, 王国良¹, 沈 斌¹, 赵舒薇²

(1. 上海交通大学附属第一人民医院, 上海 200080;

2. 第二军医大学附属长征医院, 上海 200003)

摘 要: [目的] 在大肠杆菌中表达 HPV16E7-HSP70 融合蛋白并进行纯化和复性, 为进一步研究 HPV16E7-HSP70 融合蛋白抗喉癌免疫活性奠定基础。[方法] 用构建的原核表达质粒 pET28a HPV16E7-HSP70 转化大肠杆菌 BL21, 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导蛋白表达; 通过超声波裂解细菌, 高浓度尿素裂解包涵体和 Ni²⁺ 离子金属螯合亲和层析纯化目的蛋白; 并对融合蛋白进行复性; 用 SDS-PAGE 及 Western Blot 进行分析鉴定。[结果] SDS-PAGE 分析显示有分子量约为 90kD 的融合蛋白表达, 表达产物以包涵体形式存在, 表达量可达 30%; 纯化后目的蛋白的纯度达到 95%; 经 Western Blot 鉴定复性后的融合蛋白能与抗 HPV16E7 抗体、抗 HSP70 抗体特异性结合。[结论] HPV16E7-HSP70 融合蛋白能够在体外大肠杆菌中表达获得。

关键词: 人乳头状瘤病毒; 热休克蛋白; 融合蛋白; 包涵体; 纯化; 复性; 大肠杆菌

中图分类号: R730 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)09-0660-05

Expression and Purification of the HPV16E7-HSP70 Fusion Protein in *Escherichia coli*

YING Xin-jiang, DONG Pin, XU Hong-ming, et al.

(Shanghai First People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression, purify and renature of HPV16E7-HSP70 fusion protein in *Escherichia coli* (*E. coli*) and to provide basis for further research. [Methods] The recombinant prokaryotic expression plasmid pET28a HPV16E7-HSP70 was transformed in *E. coli* BL21 and induced by isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). After the bacterial pellet was lysed by sonication, solubilized in ultrapure urea, the fusion protein expressed in *E. coli* was purified by Ni metal chelating chromatography following with renaturation, which was identified by SDS-PAGE and Western Blot analysis. [Results] SDS-PAGE analysis showed that the fusion protein with molecular weight of approximately 90 kD was expressed, which formed inclusion body in the cytoplasm of bacteria, with the ratio of target protein to total protein of host 30%. The purity up to 95% could be achieved after purification of target protein. Western Blot showed that the protein renatured could bind to HPV16E7 Ag and HSP70 Ag specifically. [Conclusion] The HPV16E7-HSP70 fusion protein could be obtained in *E. coli in vitro*.

Subject words: human papillomavirus; heat shock protein; fusion protein; inclusion body; purification; renaturation; *Escherichia coli*

喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤之一, 其发病率约占全身恶性肿瘤的 1%~2%, 占耳鼻咽喉科恶性肿瘤的 11%~22%。随着分子生物学技术的迅速发展, 对于喉癌的治疗手段除手术、放疗和化疗外, 基因治

疗已成为新兴的发展方向^[1]。大量研究已表明, 人乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 16 感染是喉癌发病的重要原因^[2,3], 其早期基因 E7 是重要的转化基因, 表达产物 E7 蛋白具有免疫原性, 能够激发机体抗肿瘤的细胞毒性淋巴细胞应答 (CTL)^[4], 将 E7 蛋白视作肿瘤特异性抗原, 是研究开发 HPV 疫苗的着眼点之一。热休克蛋白 (heat shock protein,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (3701610)

通讯作者: 赵舒薇, 教授, 主任医师, 博士生导师, 博士; 第二军医大学附属长征医院耳鼻咽喉科, 上海市黄浦区凤阳路 415 号 (200003); E-mail: zhaoshw1@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2012-07-11; **修回日期:** 2012-08-26

HSP)具有免疫载体分子的作用,能增强与之结合抗原的抗原性,且其三维结构 N 端肽段结合位点与 MHC I 类分子的肽段结合位点的结构相似,能作为抗原递呈分子发挥作用,使抗原呈递细胞(APC)能够处理其结合的肽段而形成稳定的 MHC I 类分子—多肽复合物,增强免疫效应^[5]。因此,将 HPV16E7 与 HSP70 相连,可望获得对喉癌具有预防和治疗作用的一代新型肿瘤疫苗。我们的前期实验^[6],已通过 PCR 技术将 HPV16E7 与 HSP70 融合,克隆于 pET28a 载体,成功构建了原核表达质粒 pET28a HPV16E7-HSP70。在此基础上,本研究将构建的原核表达质粒 pET28a HPV16E7-HSP70 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*),对其进行诱导表达、纯化和复性,经鉴定证实,HPV16E7-HSP70 融合蛋白能够在大肠杆菌中成功表达获得,为下一步抗喉癌免疫活性研究奠定了实验基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒及菌株

原核表达质粒 pET28a HPV16E7-HSP70 由本实验室构建,*E. coli* DH5 α 、BL21(DE3)由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

低分子量标准蛋白、还原型谷胱甘肽、氧化型谷胱甘肽、Ni-NTA His Bind Resins 等购自上海生工生物工程有限公司;鼠抗人 HPV16E7 单克隆抗体,鼠抗人 HSP70 单克隆抗体,兔抗鼠 IgG-HRP 购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.1.3 引物设计与合成

参照 GeneBank 中收录的 HPV16E7、HSP70 基因序列和测序结果,设计出 4 条引物,由上海博亚生物有限公司合成。其中 HPV16E7 上游引物 E7s:5'-GT GCTAGC ATGCATGGAGATACACCTAC -3',引入 *Nhe* I 内切酶位点(方框部分),下游引物 E7as:5'-TTCTCGACGGAGCTCTGTTTCTGAGAACAGATGGGGCACACA-3',引入 *Sac* I 内切酶位点(方框部分)。HSP70 上游引物 HSPs:5'-CTCCGTCTGAAAATGATAAGTGCCAGCCGAGCTGCAGCAGCC-3',引入 *Sal* I 内切酶位点(方框部分),下游引物 HSPas:5'-

GAGTCGGCCCGCACTGTTTTTCCTCCTTTTGATCTTCCTTTTG-3',引入 *Not* I 内切酶位点(方框部分)。

1.2 方 法

1.2.1 DH5 α 、BL21 感受态菌的制备

将 DH5 α 、BL21 接种于 1ml LB 培养基中 37℃ 摇床培养过夜,再转接入 100ml Psi 培养基中 37℃ 摇床培养至 OD₅₅₀ 约为 0.48,5 000r/min 离心 5min,去掉上清,加入 40ml TfbI 培养基震荡混匀,置冰上 15min,5 000r/min 离心 5min,去掉上清,加入 4ml TfbII 培养基震荡混匀,分装保存于-70℃备用。

1.2.2 原核表达质粒 pET28a HPV16E7-HSP70 鉴定

将原核表达质粒 pET28a HPV16E7-HSP70 转化 DH5 α 感受态菌,涂布含 100 μ g/ml 卡那霉素的 LB 平板,37℃过夜培养,随机挑取 10 个菌落,采用 E7s 和 E7as、HSPs 和 HSPas,及 T7 正反向引物 PCR 扩增鉴定阳性克隆。

1.2.3 HPV16E7-HSP70 融合蛋白诱导表达

将原核表达质粒 pET28a HPV16E7-HSP70 转化 *E. coli* BL21 感受态菌,挑取阳性克隆接种于含卡那霉素的 LB 培养基中,37℃培养过夜,第 2d 取出 2ml 作为未诱导的阴性对照,其余部分以 10ml/L 接种量接入新鲜的 LB 培养基(卡那霉素),培养至 OD₆₀₀ 约为 1.0,加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度 1mmol/L,4h 后收集菌体。用适当体积的 PBS 垂悬,超声破碎,离心分离上清液和沉淀。分别取适量超声处理的上清液、沉淀垂悬液和未诱导的菌体一并作为样品,进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析。

1.2.4 包涵体的制备、裂解

收获诱导表达菌体,用 0.1 倍体积的洗液(20mmol/L pH7.5 的 Tris-HCl,10mmol/L EDTA,10ml/L Triton X-100)垂悬,冷却至 4℃,加入终浓度 100 μ g/ml 的溶菌酶,30℃温育 15min,超声波裂解。1 200r/min 离心 10min,收集包涵体,用上述洗液连续洗 2 次。每克包涵体加入 5ml 含 20mmol/L 咪唑(imidazole)的裂解—结合缓冲液(8mol/L 尿素,0.1mol/L NaH₂PO₄,0.01mol/L Tris,pH8.0),室温裂解 1h,1 200r/min 室温离心 25min,收集上清液备用。

1.2.5 HPV16E7-HSP70 融合蛋白的纯化

每 4ml 上述上清液加入 500ml/L Ni-NTA His Bind Resins 1ml,室温摇床培养 1h,装入空层析柱中,用 4ml 洗液(8mol/L 尿素,0.1mol/L NaH₂PO₄,0.01mol/L

Tris-HCl pH6.3)洗涤 2 次,洗脱非特异性结合在柱子上的蛋白质。然后用 1ml 洗脱液 (8mol/L 尿素, 0.1mol/L NaH_2PO_4 , 0.01mol/L Tris-HCl pH4.5) 洗涤 4 次,洗脱吸附在柱子上的 HPV16E7-HSP70 融合蛋白,SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定。

1.2.6 纯化 HPV16E7-HSP70 融合蛋白的复性

纯化后的蛋白用复性液缓慢稀释至终浓度为 0.05 g/L。先用 50 倍体积的含 0.1mmol/L DTT 的复性液(20mmol/L Tris-HCl, pH 8.5)4℃透析 3h 以上,并换液 1 次,继续透析 3h 以上;用不含 DTT 的复性液再透析 3h 以上,并换液 1 次,以除去 DTT。再用大约 25 倍体积的含 1mmol/L 还原型谷胱甘肽和 0.1mmol/L 氧化型谷胱甘肽的复性液 4℃透析过夜。

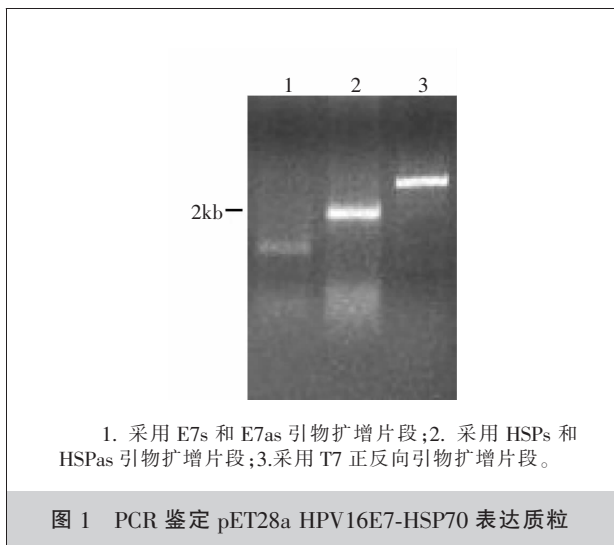
1.2.7 Western Blot 分析

将复性后的蛋白用 SDS-PAGE 电泳,将电泳的蛋白带转移至硝酸纤维素膜上,然后用含 20g/L BSA 的 TBST 封闭,以鼠抗人 HPV16E7 单克隆抗体和鼠抗人 HSP70 单克隆抗体为一抗,羊抗鼠 IgG 为二抗,二氨基联苯胺(DAB)染色。

2 结 果

2.1 原核表达质粒 pET28a HPV16E7-HSP70 的鉴定

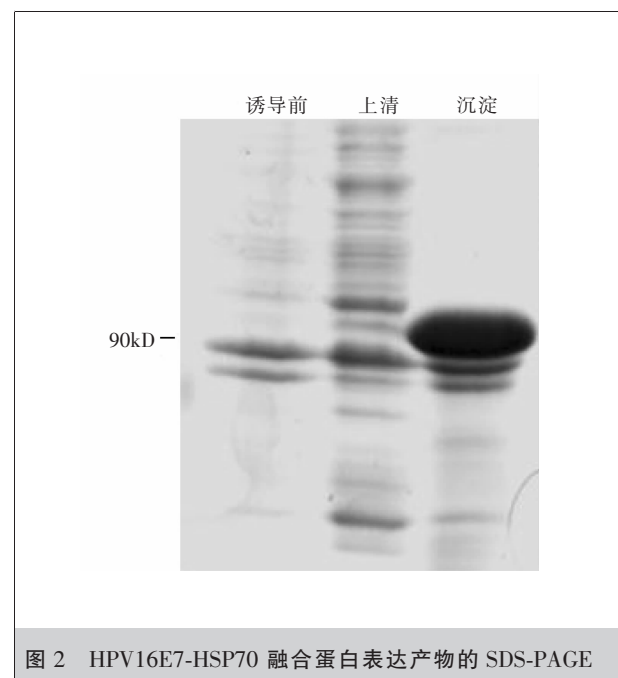
如图 1 所示,阳性克隆采用 E7s 和 E7as(E7 基因片段特异引物)扩增出 300bp 特异性片段,采用 HSPs 和 HSPas 引物 PCR 扩增出 2 000bp 的 HSP70 基因片段,采用 T7 正反向引物 PCR 扩增出 2 300bp 的 HPV16E7 和 HSP70 融合的基因片段,此结果提



示质粒 pET28a 中存在着一个 2 300bp 的与 HPV16E7-HSP70 融合的基因片段大小相符的基因片段。

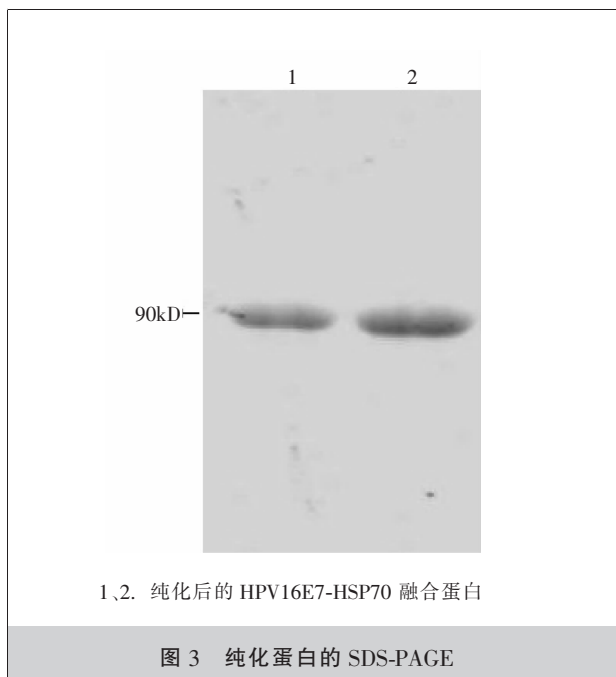
2.2 HPV16E7-HSP70 融合蛋白的表达

将重组表达质粒 pET28a HPV16E7-HSP70 转化表达宿主 *E. coli* BL21,经 IPTG 诱导后,收集菌体进行 SDS-PAGE 电泳分析 (图 2),结果表明, HPV16E7-HSP70 融合蛋白表达菌诱导后在分子量约 90kD 处有一蛋白条带明显增粗,与理论分子量相符,凝胶成像分析显示其蛋白量占菌体总蛋白的 30%,而未诱导的阴性对照则没有相应的表达蛋白条带。同时可以看出目的蛋白绝大部分出现在超声沉淀中,说明融合蛋白在宿主中主要以包涵体的形式存在。



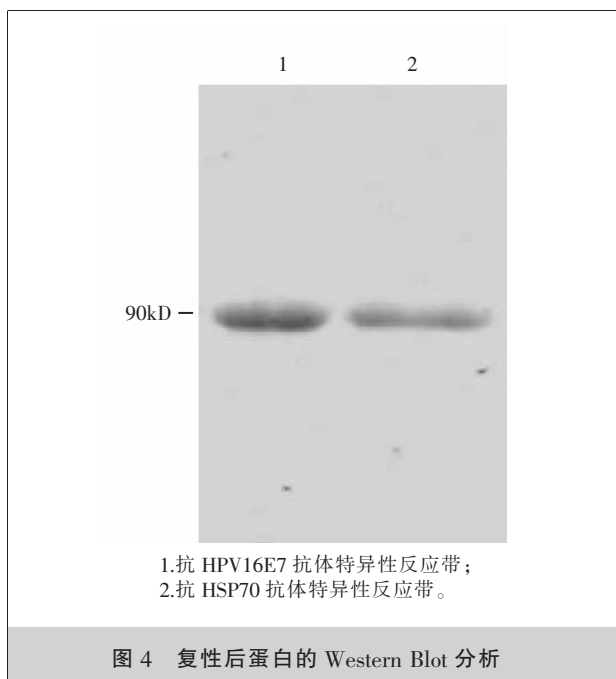
2.3 HPV16E7-HSP70 融合蛋白的纯化与复性

在表达质粒构建过程中, HPV16E7-HSP70 基因与 pET28a 质粒上的 6×His 纯化标签共阅读框融合。因此,表达产物 N 末端带有 6×His 纯化标签,可以通过 Ni^{2+} 离子螯合亲和层析柱纯化。对纯化蛋白进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析(图 3),发现只有 1 条约 90kD 的蛋白带,凝胶成像分析其纯度达到 95%。我们采用稀释法和氧化型、还原型谷胱甘肽系统相结合的方法对融合蛋白进行复性,复性蛋白回收率为 40%。



2.4 HPV16E7-HSP70 融合蛋白的 Western Blot 分析

纯化复性后的融合蛋白经 SDS-PAGE 电泳的蛋白带转移至硝酸纤维素膜上进行免疫学反应。结果显示,鼠抗人 HPV16E7 单克隆抗体和鼠抗人 HSP70 单克隆抗体都能与纯化复性后的融合蛋白在约 90kD 处形成了特异的抗原抗体反应带。证明复性后的融合蛋白能与鼠抗人 HPV16E7、鼠抗人 HSP70 阳性血清发生反应(图 4)。



3 讨 论

在 HPV 相关的肿瘤研究中,有以结核杆菌 HSP70 与 HPV16E7 融合构建 DNA 疫苗治疗宫颈癌报道。对于人 HSP70 与 HPV16E7 融合进行克隆并在原核中表达、纯化蛋白进行抗肿瘤研究尚未见报道。因此,我们设想用人 HSP70 与 HPV16E7 进行融合并在大肠杆菌中表达,提取纯化蛋白,制备蛋白疫苗,用于抗喉癌免疫活性研究。

随着分子生物学技术的迅速发展,真核生物基因在细菌中高效表达日趋成熟,许多天然产率很低,但具有重要临床意义的真核蛋白在大肠杆菌中得到了大量表达,并且大肠杆菌生产重组蛋白,具有产量高、成本低和生产周期短等优点,极力推动了肿瘤疫苗的研究与发展。重组蛋白在大肠杆菌中高水平表达时,易使目的蛋白以不溶性蛋白的形式存在,有利于目的蛋白分离纯化,能有效抵御大肠杆菌中的蛋白酶对目的蛋白的降解。同时带来不利的因素,形成难溶的包涵体没有生物活性,需经过复性才能成为可溶性的具有生物活性的蛋白质^[7,8]。

目前,国内对包涵体纯化多采用离子交换与疏水层析法,由于步骤较多,蛋白损失大,且在操作过程中对样品的要求高,给纯化带来一定的困难,且不能使包涵体中除了目的蛋白外其他宿主菌蛋白质、核酸、脂质以及糖类等杂质降至最低水平,不利于下一步的复性^[9]。利用组氨酸对 Ni-NTA 有很强吸附能力的特点,通过 Ni-NTA 亲和层析柱纯化表达产物,具有配基简单,吸附量大,分离条件温和,通用性强等特点,极大提高了目的蛋白的纯度。在表达质粒构建过程中,我们已设计将 HPV16E7-HSP70 融合基因与 pET28a 质粒上的 6×His 纯化标签共阅读框融合。在组氨酸标记的融合蛋白与 Ni-NTA His Bind Resins 结合的过程中,常常会非特异性地结合一些其他的杂蛋白,使目标蛋白纯度降低,为了降低非特异性结合,本研究在纯化过程中加入 20 mmol/L 咪唑。在低浓度咪唑存在时,6~10 个组氨酸形成的融合蛋白与 Ni-NTA His Bind Resins 有很强的亲和力,可有效地结合,而非特异性结合的其他蛋白却被阻止,取得了较好的纯化效果,纯化后的蛋白质纯度达 95% 以上。

纯化后蛋白质复性的关键是如何通过重折叠使

分子内二硫键正确形成。目前在体外复性时,使变性蛋白产生正确二硫键的方法主要有空气氧化法、混合二硫化物法、谷胱甘肽再氧化法和二硫苏糖醇再氧化法等^[10],较为有效且实用的是谷胱甘肽再氧化法。复性过程中一些条件,如蛋白浓度、杂质含量、重折叠速率、温度、pH 和离子强度等均会影响复性的收率。因此,为了获得较高的蛋白收率,必须进行优化复性条件。本研究在碱性 pH 值与低温条件下,对所纯化的融合蛋白采用稀释透析法和氧化型、还原型谷胱甘肽系统相结合的方法进行复性,取得了较好的复性效果。我们确定 HPV16E7-HSP70 融合蛋白复性的最终条件为:蛋白浓度 100mg/L,还原型谷胱甘肽浓度为 1mmol/L,氧化型的谷胱甘肽浓度 0.1mmol/L,缓冲液 pH 8.0,尿素浓度保持在 1mol/L,复性温度 10℃,复性时间 20h,然后 4℃透析 48h 除去其中的尿素。

本研究在大肠杆菌菌中表达 HPV16E7-HSP70 融合蛋白,通过包涵体的制备、裂解、目的蛋白的纯化、复性等一系列工作,得到了具有抗原活性的 HPV16E7-HSP70 融合蛋白,为下一步抗喉癌免疫活性研究奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] Stewart SL, Cardinez CJ, Richardson LC, et al. Surveillance for cancers associated with tobacco use-United States, 1999-2004[J]. MMWR Surveill Summ, 2008, 57(8): 1-33.
- [2] Chitose S, Sakazaki T, Ono T, et al. Immunological responses against human papilloma virus and human papilloma virus induced laryngeal cancer [J]. Laryngol Otol, 2010, 124(6):659-662.
- [3] Mendelsohn AH, Lai CK, Shintaku IP, et al. Histopathologic findings of HPV and p16 positive HNSCC[J]. Laryngoscope, 2010, 120(9):1788-1794.
- [4] Narayan S, Choyce A, Linedale R, et al. Epithelial expression of human papillomavirus type 16 E7 protein results in peripheral CD8 T-cell suppression mediated by CD4⁺ CD25⁺ T cells[J]. Eur J Immunol, 2009, 39(2):481-490.
- [5] Fischer N, Haug M, Kwok WW, et al. Involvement of CD91 and scavenger receptors in Hsp70-facilitated activation of human antigen-specific CD4⁺ memory T cells[J]. Eur J Immunol, 2010, 40(4):986-997.
- [6] 赵舒薇, 邱杰, 英信江, 等. HPV16E7-HSP70 融合基因原核表达质粒的构建和鉴定[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2006, 13(2): 67-70.
- [7] Agarwal S, Jha S, Sanyal I, et al. Expression and purification of recombinant human alpha1-proteinase inhibitor and its single amino acid substituted variants in *Escherichia coli* for enhanced stability and biological activity [J]. Biotechnol, 2010, 147(1):64-72.
- [8] Caswell J, Snoddy P, McMeel D, et al. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli* using an N-terminal tag derived from sortase [J]. Protein Expr Purif, 2010, 70(2):143-150.
- [9] Marquès L, Oomen RJ, Aumelas A, et al. Production of an Arabidopsis halleri foliar defensin in *Escherichia coli*[J]. Appl Microbiol, 2009, 106(5):1640-1648.
- [10] Heiker JT, Klötting N, Blüher M, et al. Access to gram scale amounts of functional globular adiponectin from *E. coli* inclusion bodies by alkaline-shock solubilization[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 398(1):32-37.