

论著·基础研究

人乳头瘤病毒 16 型和 18 型 E6 蛋白单抗制备及其鉴定*

夏 斌^{1,2}, 王芙蓉^{1,2}, 严茹红^{1,2}, 朱红楠^{1,2}, 蔡培培^{1,2△}

(1. 苏州科技城医院检验科, 江苏苏州 215153; 2. 南京医科大学附属苏州医院检验科, 江苏苏州 215153)

摘 要:目的 开发能够用于检测 HPV16、HPV18 感染的诊断技术, 原核表达 HPV16E6、18E6 重组蛋白, 制备相应的单克隆抗体, 为建立 HPV 的诊断方法提供物质基础。方法 BL21-PET28a-16E6、BL21-PET28a-18E6 工程菌株由该实验室前期构建, 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导 HPV16E6、18E6 重组蛋白表达, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)、蛋白质免疫印迹法(Western blot)对 HPV16E6、18E6 重组蛋白进行鉴定, His 亲和层析柱对目的蛋白进行纯化。以纯化的重组蛋白 HPV16E6、18E6 为免疫原免疫 BALB/c 小鼠, 杂交瘤技术制备相应单克隆抗体, 间接法测抗体, 酶联免疫吸附测定(ELISA)方法检测抗体效价, Western blot 检测抗体特异性。结果 表达并纯化获得了 HPV16E6、18E6 蛋白, 杂交瘤技术获得 HPV16E6-2-G9、HPV16E6-2-F2、HPV18E6-3-H1 杂交瘤细胞株, Western blot 结果显示, 其分泌抗体可分别与 HPV16E6、18E6 特异性结合, 用 HPV16E6-2-G9、HPV18E6-3-H1 制备的腹腔积液效价分别可达 10⁶。结论 成功制备抗 HPV16E6、18E6 单克隆抗体, 该抗体效价高, 特异度好, 为建立血清学诊断方法打下了基础。

关键词:人乳头瘤病毒; 原核表达; 纯化; 单克隆抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.06.002

中图法分类号:R737.33

文章编号:1673-4130(2019)06-0645-04

文献标识码:A

The preparation and identification of monoclonal antibodies HPV16E6 and 18E6*

XIA Bin^{1,2}, WANG Furong^{1,2}, YAN Ruhong^{1,2}, ZHU Hongnan^{1,2}, CAI Peipei^{1,2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Suzhou Science and Technology Town Hospital, Suzhou, Jiangsu 215153, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Suzhou Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou, Jiangsu 215153, China)

Abstract: **Objective** To develop a diagnostic technique for detecting HPV16, HPV18 infection. Expression the recombinant proteins HPV16E6 and 18E6 in prokaryote and prepare the monoclonal antibodies, which shall provide a basis for the establishment of antigen-antibody diagnostic methods of HPV. **Methods** The engineering strain of BL21-PET28a-16E6 and BL21-PET28a-18E6 were built by a laboratory and the recombinant proteins HPV16E6 and 18E6 were expressed, which was induced by Isopropyl 1-Thio-β-D-galactopyranoside(IPTG), identified by Western blot and purified by His affinity chromatography. Using the purified recombinant proteins as immunogen to prepare the corresponding monoclonal antibodies in BALB/c mice with the method of hybridoma technology. The antibody titer was detected by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the specificity was detected by Western blot. **Results** The proteins HPV16E6 and 18E6 were expressed and purified. The hybridoma cell lines HPV16E6-2-G9, HPV16E6-2-F2 and HPV18E6-3-H1 were obtained. Western blotting showed that the secreted antibodies HPV16E6 and 18E6 specifically bound with HPV16E6-2-G9 respectively and the antibody titers were up to 10⁶ in ascites prepared with HPV16E6-2-G9 and HPV18E6-3-H1. **Conclusion** The monoclonal antibodies of anti-HPV16E6 and 18E6 are prepared with high titer and specificity, setting the stage for the establishment of serological diagnostic methods.

Key words: human papilloma virus; prokaryotic expression; purification; monoclonal antibodies

宫颈癌是现代女性常见的恶性肿瘤之一, 全球范围内每年都有将近 50 万人新患宫颈癌, 我国宫颈癌

* 基金项目: 苏州高新区医疗卫生科技计划项目(2016Q006)。

作者简介: 夏斌, 男, 技师, 主要从事分子检验的工作研究。△ 通信作者, E-mail: yrhzl@hotmail.com。

本文引用格式: 夏斌, 王芙蓉, 严茹红, 等. 人乳头瘤病毒 16 型和 18 型 E6 蛋白单抗制备及其鉴定[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(6):

患病率就占了 25%^[1-5],研究发现 99% 以上的宫颈癌都能够找到人乳头瘤病毒(HPV)感染的迹象,这些感染中主要型别是 HPV16(约占 53%)和 HPV18(约占 15%)^[6-9],HPV 不能在体外经组织进行增殖培养,相应的抗原及抗体来源相对缺乏,使得有关 HPV 血清学检测方法的研究也因此相对比较滞后^[10],本研究利用蛋白原核表达和细胞融合技术制备 HPV16E6、18E6 特异性单克隆抗体,对 HPV16、HPV18 型别感染者的快速检测和诊断打下物质基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 BL21-PET28a-16E6、BL21-PET28a-18E6 工程菌株由本实验室前期构建;本实验室自备 SP2/0 细胞株;SPF 级 BALB/C 小鼠由上海斯莱克实验动物有限公司提供。

1.2 仪器与试剂 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导剂、次黄嘌呤-氨基喋呤-胸腺嘧啶核苷(HAT)培养基、次黄嘌呤-胸腺嘧啶核苷(HT)培养基、融合诱导剂 PEG4000 由美国 MERK 公司提供;卡那霉素由上海生工生物工程公司提供;小鼠抗 His-Tag 单克隆抗体、弗氏完全佐剂和不完全佐剂由美国 Sigma 公司提供;胎牛血清、1640 培养基、青霉素、链霉素由美国 Hiclone 公司提供;BCA 蛋白浓度测定试剂盒由碧云天公司提供;HPV E6、HPV16E6、18E6 蛋白由上海沪震实业有限公司提供;HR40-II A2 生物安全柜由青岛海尔特种电器有限公司提供;MCO-18AIC 二氧化碳培养箱由三洋电机株式会社提供;超声破碎仪 JY-250 由浙江省三门超声波仪器厂提供;JS POWER-300 电泳仪由上海培清科技有限公司提供;羊抗鼠 IgG-HRP、Muliskan MK3 酶标仪由赛默飞世尔科技公司提供;96 孔酶标板、96 孔细胞培养板由美国 Corning 公司提供;His Trap FF 亲和层析柱购自美国 GE Healthcare 公司。

1.3 HPV16E6、18E6 蛋白在大肠杆菌中的表达、纯化及定量

1.3.1 HPV16E6、18E6 基因诱导表达 BL21-PET28a-16E6、BL21-PET28a-18E6 工程菌株在琼脂平板(含卡那霉素 50 μ g/mL)涂板活化后挑取单菌落接种于 5 mL LB 液体培养基(含卡那霉素 50 μ g/mL)培养过夜,之后取菌液 1:100 稀释作扩增培养至 OD 值为 1.0,以终浓度为 0.2 mmol/L IPTG 诱导过夜后收集菌液。诱导产物作十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)分析,以稀释度为 1:2 000 的小鼠抗 His-Tag 单克隆抗体作为一抗,稀释度为 1:2 000 的羊抗鼠 IgG-HRP 为二抗作蛋白质免疫印迹法(Western blot)鉴定。

1.3.2 HPV16E6、18E6 重组蛋白的纯化及定量 收集诱导后菌液离心取沉淀,超声破碎菌体,取超声破碎后悬液的上清和沉淀同时进行 SDS-PAGE 分析,

考马斯亮蓝染色、脱色,观察是否在 20×10^3 、 22×10^3 的位置出现蛋白质条带,以确定重组蛋白以可溶性形式存在于超声裂解上清中。按照 His Trap FF 亲和层析柱使用说明书进行纯化操作,对纯化前和纯化后的产物分别进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)分析,考马斯亮蓝染色、脱色,分析纯化效果。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对纯化后蛋白进行定量分析。

1.4 HPV16E6、18E6 蛋白单克隆抗体制备及其鉴定

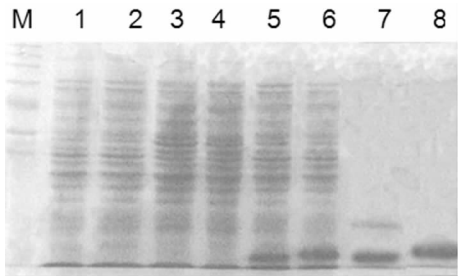
以纯化的 HPV16E6、18E6 重组蛋白为免疫原免疫 6~8 周的 BALB/c 小鼠。以 HPV16E6、18E6 蛋白作为抗原分别包被 96 孔酶标板,1:10 000 稀释度的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗间接酶联免疫吸附测定(ELISA)法测定 BALB/c 小鼠血清抗体效价;以 HPV E6 抗原包被 96 孔酶标板,1:10 000 稀释度的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗间接 ELISA 法测定 BALB/c 小鼠血清腹腔积液效价。取免疫鼠脾细胞与 SP2/0 细胞作细胞融合实验。采用以 HPV16E6、18E6 抗原分别包被 96 孔酶标板,1:10 000 稀释度的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗间接 ELISA 法筛选融合阳性杂交瘤细胞,有限稀释法对阳性细胞进行单克隆增殖培养,以获取可稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。Western blot 对单克隆抗体进行鉴定,提取蛋白质并进行 SDS-PAGE 电泳、转膜,以抗 His-Tag 单克隆抗体作为一抗、羊抗鼠 IgG-HRP 为二抗,按照产品书进行孵育,ECL 显色液显色。分析观察是否在 20×10^3 、 22×10^3 位置出现特异性条带。

2 结果

2.1 HPV16E6、18E6 重组蛋白表达、纯化及定量结果 BL21-PET28a-16E6、BL21-PET28a-18E6 诱导和纯化后进行 SDS-PAGE 电泳,鉴定结果见图 1,在诱导后出现相对高浓度的蛋白条带,并伴有杂带,在纯化后杂带消失。将 IPTG 诱导后进行 Western blot 鉴定,结果显示,与 BL21 相比,HPV16E6、18E6 在 20×10^3 、 22×10^3 处有明显条带,说明所诱导的表达蛋白即为目的蛋白,见图 2。对所获得的蛋白质进行浓度测定,测得吸光度为 0.650,根据本实验室绘制的标准蛋白浓度测定曲线,计算得出目的蛋白浓度为 0.25 mg/mL。见图 3。

2.2 HPV16E6、18E6 蛋白单克隆抗体制备及其鉴定结果 血清抗体效价测定结果显示 HPV16E6 免疫后小鼠血清 1:16 000 稀释后高达 1.219,见表 1。

2.2.1 腹腔积液效价测定 间接 ELISA 法检测结果显示,腹腔积液在作 1:512 000 稀释后 OD 值仍高达 0.937,效价高达 10^6 。



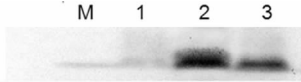
注:M 为 DNA 标记物; 1 为 BL21 未诱导; 2 为 BL21 诱导后; 3 为 BL21-PET28a-16E6 未诱导; 4 为 BL21-PET28a-18E6 未诱导; 5 为 BL21-PET28a-16E6 诱导后; 6 为 BL21-PET28a-18E6 诱导后; 7 为 HPV 16E6 纯化后; 8 为 HPV 18E6 纯化后

图 1 诱导表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

2.2.2 细胞融合后阳性克隆筛选 脾细胞与骨髓瘤细胞融合后经筛选共得到 3 株阳性杂交瘤细胞。其中两株可分泌抗 HPV16 抗体, 分别命名为 HPV16E6-2-G9、HPV16E6-2-F2; 1 株可分泌抗 HPV18 抗体, 命名为 HPV18E6-3-H1, 其中中间数字代表 96 孔板序号, 后字母加数字代表在 96 孔板的位置, 细胞培养液吸光度(A_{450} , 参考波长 630 nm)分别为 0.995、1.003、1.012。

2.2.3 阳性克隆鉴定 以 BL21、BL21-PET28a-

16E6、BL21-PET28a-18E6 为抗原, 收集杂交瘤细胞 HPV16E6-2-G9、HPV16E6-2-F2、HPV18E6-3-H1 培养液为一抗, HRP 标记羊抗鼠 IgG 为二抗, 进行 Western blot, 结果显示杂交瘤细胞 HPV16E6-2-G9、HPV16E6-2-F2 分泌抗体可特异性与 HPV16E6 结合, 见图 4, HPV18E6-3-H1 分泌抗体可特异性与 HPV18E6 结合, 见图 5。



注:M 为 DNA 标记物; 1 为 BL21; 2 为 HPV16E6; 3 为 HPV18E6

图 2 HPV16E6、HPV18E6 Western blot 鉴定

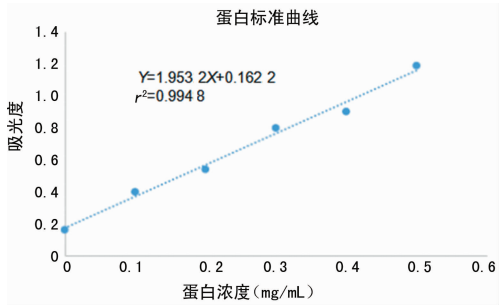
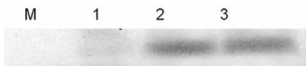


图 3 HPV16E6、18E6 蛋白标准曲线

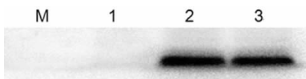
表 1 小鼠血清抗体效价结果 OD 值

蛋白类型	1 : 2 000	1 : 4 000	1 : 8 000	1 : 16 000	1 : 32 000	1 : 64 000	空白对照
HPV16E6	2.290	1.762	1.500	1.011	0.553	0.323	0.063
HPV18E6	2.123	1.781	1.219	0.747	0.467	0.263	0.066



注:M 为 DNA 标记物; 1 为 BL21; 2 为 BL21-PET28a-16E6 (HPV16E6-2-G9); 3 为 BL21-PET28a-16E6(HPV16E6-2-F2)

图 4 抗 HPV16E6 单克隆 Western blot 鉴定



注:M 为 DNA 标记物; 1 为 BL21; 2 为 HPV18E6(HPV18E6-3-H1 第 1 次); 3 为 HPV18E6(HPV18E6-3-H1 第 2 次)

图 5 抗 HPV18E6 单克隆 Western blot 鉴定

3 讨 论

在 HPV 感染患者中, 亚型发生率最高的是 HPV16 型和 HPV18 型, 这也是我国妇女宫颈癌的主要型别^[11-12]。因此, 加强对 HPV16 型和 18 型感染的检测对宫颈癌的早发现 and 早治疗具有极其重要的意义。一方面 HPV 的血清学研究对 HPV 流行病学研究具有重要价值, 但另一方面由于条件限制现在还没有体外培养 HPV 的合适方法, 所以很难要获得足够的 HPV 天然抗原作为研究材料。原核表达系统具有产量高、费用低廉方面的优势, 通过降低诱导温度, 控制诱导前细菌的浓度、降低诱导时转速和减少诱导时间

可以明显促进目的蛋白的可溶性表达^[13], 同时 His 标签不但不会使重组蛋白的生物学活性受到影响, 而且还使得蛋白质的纯化和检测步骤更方便。本实验室通过预先构建的 BL21-PET28a-16E6、BL21-PET28a-18E6 转化菌原核表达获得了大量的 HPV16E6、18E6 蛋白, 经 Western blot 鉴定, 证实了目的蛋白即是研究者所需要的蛋白。纯化的 HPV16 E6、18E6 融合蛋白作为免疫原免疫小鼠, 取小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞作细胞融合, 作单克隆培养, 有限稀释筛选出 2 株分泌抗 HPV16 E6 及 1 株分泌抗 HPV18E6 的抗体, 分别命名为 HPV16E6-2-G9、HPV16E6-2-F2、HPV18E6-3-H1。Western blot 检测所筛选到的抗体, 结果显示 HPV16E6-2-G9、HPV16E6-2-F2 只与 HPV16 型的 E6 蛋白发生抗原抗体反应, 确认是抗 HPV16 E6 特异性单克隆抗体。同样, HPV18E6-3-H1 只与 HPV18 型的 E6 蛋白发生抗原抗体反应, 确认是抗 HPV18 E6 特异性单克隆抗体。通过制备小鼠腹腔积液, 本实验成功地获得了大量的 HPV16E6、18E6 特异性单克隆抗体, 腹腔积液检测显示出极高的效价, 免疫结果良好。不仅为今后进一步研究 HPV16、HPV18 的致癌机制, 提供了一个重要的实验

资源,而且对 HPV16、HPV18 感染者的快速检测和治疗将具有重要的实际应用价值。

4 结 论

成功制备抗 HPV16E6、18E6 单克隆抗体,该抗体效价高,特异度好,为建立血清学诊断方法打下了基础。

参考文献

[1] DAS M. Cervical cancer vaccine controversy in India[J]. Lancet Oncology, 2018, 19(2): 84.

[2] WALBOOMERS J M, JACOBS M V, MANOS M M, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J]. J Pathol, 1999, 189(1): 12-19.

[3] WU Y P, CHEN Y L, LI L Y, et al. Associations of high-risk HPV types and viral load with cervical cancer in China[J]. J Clin Virology, 2006, 35(3): 264-269.

[4] SMOTKIN D, WETTSTEIN F O. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and cancer-derived cell lines and identification of E7 protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(1): 4680-4684.

[5] ANDROPHY E J, HUBBER N L, SCHILLER J T, et al. Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines[J]. Embo J, 1987, 6(4): 989-992.

[6] WERNESS B A, LEVINE A J, HOWLEY P M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53[J]. Science, 1990, 248(1): 76-79.

[7] HUIBREGTSE J M, SCHEFFNER M, HOWLEY P M. A cellular protein mediates association of p53 with the E6

oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18[J]. EMBO J, 1991, 10(1): 4129-4135.

[8] HUBBERT N L, SEDMAN S A, SCHILLER J T. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes[J]. Virol, 1992, 66(1): 6237-6241.

[9] CHEN W, ZHANG X, MOLIJN A, et al. Human papillomavirus type-distribution in cervical cancer in China: the importance of HPV 16 and 18[J]. Cancer Causes Control, 2009, 20(9): 1705-1713.

[10] CANFELL K, SHI J F, LEW J B, et al. Prevention of cervical cancer in rural China: Evaluation of HPV vaccination and primary HPV screening strategies[J]. Vaccine, 2011, 29(13): 2487-2494.

[11] KEDZIA W, OLEJNIK A, SCHMIDT M, et al. The level of antibody against E6 HPV 16 oncoprotein in blood sera of women with chronic HPV 16 infection and cervical cancer[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2006, 27(1): 65-68.

[12] KHAN M J, CASTLE P E, LORINCZ A T, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(14): 1072-1079.

[13] COTTINGHAM I R, MILLAR A, EMSLIE E, et al. A method for the amidation of recombinant peptides expressed as intein fusion proteins in Escherichia coli[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19(10): 974-977.

(收稿日期:2018-09-20 修回日期:2018-12-28)

(上接第 644 页)

[12] WONG S Y, LAU E M, LI M, et al. The prevalence of Apo E4 genotype and its relationship to bone mineral density in Hong Kong Chinese[J]. J Bone Miner Metab, 2005, 23(3): 261-265.

[13] ZAULI G, RIMONDI E, NICONLIN V, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRALT) blocks osteoclastic differentiation induced by RANKL plus M-CSF [J]. blood, 2004, 104(1): 2044-2050.

[14] BOYCE B F, XING L P. The RANKL/RANK/OPG pathway[J]. Curr Osteoporos Rep, 2007, 5(3): 98-104.

[15] TAKAHASHI N, VDAGAWA N, SUBA T. A new member of tumor necrosis factor ligand family OOF/OPGL/TRANSE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and faction[J]. Biochem Biophys Res commun, 1999, 256(1): 449-455.

[16] PEACOCK M, TURNER C H, ECONS M J, et al. Genetics of osteoporosis[J]. Endocrine Rev, 2002, 23(1): 303-326.

[17] 薛月华, 谢匡成, 许翔, 等. 绝经期冠心病妇女血脂水平与骨密度的研究[J]. 中国骨质疏松杂志. 2008, 14(1): 389-390.

[18] JOHN A, KANISA F B, NIKLAS Z, et al. Intervention thresholds for osteoporosis in the UK[J]. Bone, 2005, 36(1): 22-32.

[19] 韩志钧, 黄志锋, 卢业成, 等. 临床化学常用项目自动分析法[M]. 3 版. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2005: 726-730.

[20] 束怀德, 曹霖. 雌激素代谢研究的进展[J]. 生殖与避孕, 1984, 22(2): 9-15.

(收稿日期:2018-09-11 修回日期:2018-11-28)