

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510022756.7

[51] Int. Cl.
C07K 14/025 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2006年6月28日

[11] 公开号 CN 1793171A

[22] 申请日 2005.12.29

[21] 申请号 200510022756.7

[71] 申请人 西安交通大学

地址 710049 陕西省西安市咸宁路28号

[72] 发明人 杨 军 张明娟 王一理 司履生

[74] 专利代理机构 西安通大专利代理有限责任公司
代理人 李郑建

权利要求书2页 说明书14页 附图3页

[54] 发明名称

HPV16 L1 蛋白模拟肽及其用于制备 HPV16 诊断试剂和疫苗的用途

[57] 摘要

本发明公开了4段HPV16L1蛋白模拟肽及其用于制备 HPV16 诊断试剂和疫苗的用途。本发明利用噬菌体随机肽库筛选抗 HVP16L1 多克隆抗体,成功筛选出4段 HVP16L1 蛋白模拟肽。经过免疫斑点和动物免疫实验发现,直接用展示该模拟肽的噬菌体展示载体或非噬菌体展示载体检测 HPV16 感染患者血清、体液、组织中的抗 HPV16L1 蛋白抗体,或者经 HPV16L1 蛋白免疫的哺乳类或非哺乳类动物免疫血清中的血清、体液、组织中的抗 HPV16L1 蛋白抗体,也可直接用展示该模拟肽的噬菌体展示载体或非噬菌体展示载体作为疫苗用于哺乳类和非哺乳类动物的免疫,产生抗病毒抗体,尤其是抗 HPV16L1 抗体。因此该模拟肽在检测 HPV16L1 抗体的诊断试剂和 HPV16 预防性疫苗的后续研究中具有巨大的潜在价值。

1. HPV16 L1 蛋白模拟肽，其特征在于，包含 4 段 HPV16 L1 蛋白模拟肽，具体氨基酸序列如下：

Thr Asn Leu Asp Leu Tyr Gly

Ile Phe Asp Asn His Pro

Leu Thr Phe Lys Pro Gln

Gly Ile Asp Ser。

2、如权利要求书 1 所述的 HVP16L1 蛋白模拟肽，其特征在于，该模拟肽氨基酸序列或者是包含 Thr Asn Leu Asp Leu Tyr Gly 氨基酸序列且长度小于 48 个氨基酸的短肽或蛋白。

3、如权利要求书 1 所述的 HVP16L1 蛋白模拟肽，其特征在于，该模拟肽氨基酸序列或者是包含 Ile Phe Asp Asn His Pro 氨基酸序列且长度小于 48 个氨基酸的短肽或蛋白。

4、如权利要求书 1 所述的 HVP16L1 蛋白模拟肽，其特征在于，该模拟肽氨基酸序列或者是包含 Leu Thr Phe Lys Pro Gln 氨基酸序列且长度小于 48 个氨基酸的短肽或蛋白。

5、如权利要求书 1 所述的 HVP16L1 蛋白模拟肽，其特征在于，该模拟肽氨基酸序列或者是包含 Gly Ile Asp Ser 氨基酸序列且长度小于 48 个氨基酸的短肽或蛋白。

6、如权利要求书 1 所述的 HVP16L1 蛋白模拟肽，其特征在于，该模拟肽氨基酸序列可由噬菌体展示系统或非噬菌体展示系统展示。

7、HPV16 L1 蛋白模拟肽用于制备 HPV16 诊断试剂和疫苗的用途。

8、如权利要求书 7 所述的用途，其特征在于，直接用展示该模拟肽的噬

菌体展示载体或非噬菌体展示载体检测 HPV16 感染患者血清、体液、组织中的抗 HPV16L1 蛋白抗体，或者经 HPV16L1 蛋白免疫的哺乳类或非哺乳类动物免疫血清中的血清、体液、组织中的抗 HPV16L1 蛋白抗体，制备 HPV16 感染的诊断试剂。

9、根据权利要求书 7 所述的用途，其特征在于，直接用展示该模拟肽的噬菌体展示载体或非噬菌体展示载体作为疫苗用于哺乳类和非哺乳类动物的免疫，产生抗病毒抗体，或抗 HPV16L1 抗体，制备 HPV16L1 多肽预防性疫苗。

HPV16 L1 蛋白模拟肽及其用于制备 HPV16 诊断试剂和疫苗的用途

技术领域

本发明属于生物医学技术领域，涉及多肽或蛋白质模拟表位的筛选和应用，特别涉及 HPV16 L1 蛋白模拟肽及其用于制备 HPV16 诊断试剂和疫苗的用途。

背景技术

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是包含 8000 bp 双链 DNA 基因组的无胞膜小 DNA 病毒 (Favre M, Ramoz N, Orth G. Human papillomaviruses: general features. Clin Dermatol. 1997;15(2): 181-198), HPV L1 蛋白 (HPV L1 protein) 是构成直径 55nm 的 HPV 病毒衣壳的主要成分, 大小为 58kD, 能在体外自行组装成与天然 HPV 病毒颗粒相似的二十面体结构的复杂空间构象——病毒样颗粒 (virus like particle, VLP), 是诱发宿主保护性体液免疫反应的重要病毒结构蛋白, 而成为目前 HPV 疫苗研究的首选靶蛋白, 尽管 HPV L1 VLP 疫苗也已经通过一期临床试验 (Kevin A. Ault, Anna R. Giuliano, Robert P. Edwards, et al. A phase I study to evaluate a human papillomavirus (HPV) type 18 L1 VLP vaccine. Vaccine. 2004;22:3004 - 3007) 但是, 由于 HPV L1VLP 制备困难, 成本高昂, 这一疫苗并不能被广大发展中国家所接受, 而恰恰在发展中国家 HPV 感染及其所导致的恶性肿瘤的发病率却居高不下 (F. Xavier Bosch a, Nubia Mun. The viral etiology of cervical cancer Virus Research 2002;89:183-190)。因此, 发展适应这一现状的低价高效疫苗刻不容缓。已有研究证实蛋白质分子的主要活性由其活性表位承担, 除线型表位 (linear epitope) 外, 由蛋白质通过非共价键相互作用而折叠成特定天然构像时将不同线性位置的氨基酸残基聚

集道统一部位形成一定空间结构的构像表位(conformation epitope)在天然蛋白分子活性中发挥更为重要的作用,但是构像表位很获得,而近年来通过筛选化学组合肽库(chemistry combination library 或噬菌体展示肽库(phage display library)捕获其构像表位为构像表位的发现和研究提供了一条捷径(张明娟,杨军,吕卓人.噬菌体肽文库的筛选.临床检验杂志,2002;20(4):247-248)并取得了大量成果。

目前应用最广的噬菌体随机肽库最早由 Scatt(Scott JK, Smith GP. Searching for peptide li-gands with an epitope library. Science, 1990;249(1):386-390.)于1990年建立,通过将不同短肽的基因序列插入噬菌体单链DNA中,使表达的外源随机序列多肽与丝状噬菌体的表面外壳蛋白的N端融合形成具有一定的空间构象的融合蛋白,呈现于噬菌体表面,并可作为任何靶抗原表位的模拟肽(minotope)。长期以来,噬菌体肽库技术因其在抗原表位的分析中的特殊优势,在基因疫苗、多肽疫苗和重组疫苗的研究中发挥着巨大的作用(Matthew A. S, Deborah S, Kenichi M, et al. HSV-1 amplicon peptide display vector. J Vir Meth. 2002;107:71-79)。目前,噬菌体随机肽库的随机多样性可达 10^7 — 10^9 ,短肽长度已由最初的6肽、7肽发展到9肽、15肽,直到38肽、40肽。本发明将利用噬菌体随机肽库(phage random peptide library)技术筛选HPV16 L1蛋白抗原表位(epitope),并将其用于HPV16感染的诊断和疫苗的研究。

尽管申请人筛选出的模拟小肽其序列与天然已知分子并无相似之处,但这样并不能说明它没有同天然分子相类似的功能,也不能否认其不具有与天然分子类似或相同的作用。如从噬菌体表面随机短肽库中筛选出模拟环状小肽(U.S. Patent No. 5, 835, 382),虽然其序列与天然EPO的序列亦无相似之处,但是它的确能够与EPO受体高亲合力结合,并且模拟促红细胞生成素(EPO)的功能。与此类似,筛选出的HPV16 L1蛋白抗原表位模拟肽将会

在 HPV16 感染的诊断和研制疫苗方面具有重大的意义。

发明内容

本发明的目的在于提供一种 HPV16 L1 蛋白模拟肽的氨基酸序列及其该氨基酸序列用于制备 HPV16 感染的诊断试剂和 HPV16 多肽疫苗中的用途，达到诊断和预防 HPV16 感染的目的。

为实现上述之目的，本发明采取如下技术方案：采用真核表达系统或非真核表达系统或昆虫杆状病毒系统制备 HPV16 L1 病毒样颗粒 (virus-like partical, VLP)，用 HPV16 L1 蛋白作为抗原或者采用表达 HPV16L1 蛋白的真核表达载体通过基因免疫方法免疫动物获得抗 HPV16L1 特异性的多克隆抗体。通过“吸附—洗脱—扩增”的方法，用抗 HPV16L1 多克隆抗体筛选噬菌体随机肽库 (phage random peptide library)，随机选取可与抗 HPV16L1 多克隆抗体特异性结合的噬菌体，经扩增、DNA 的提取、测序和同源性分析，确定 HPV16L1 蛋白模拟肽的氨基酸序列。采用 ELISA 法直接利用展示 HPV16L1 蛋白模拟肽的噬菌体菌株克隆检测 HPV16 感染患者或者实验动物血清、体液、组织中抗 HPV16L1 抗体，或作为 HPV16 多肽疫苗用于 HPV16 感染的预防。

HPV16 L1 病毒样颗粒 (virus-like partical, VLP) 通过真核表达系统或非真核表达系统制备，采用 PCR 或内切酶等方法获得 HPV16L1 基因序列，通过分子克隆技术将其克隆入真核表达载体或非真核表达载体，并经过相应的转染相应的宿主细胞，表达 HPV16 L1 蛋白，非变性条件纯化 HPV16L1 蛋白 (方法详见分子克隆)。

用纯化的 HPV16L1 蛋白或表达 HPV16L1 蛋白的真核表达载体免疫哺乳动物或非哺乳动物，经过 1 次以上肌肉注射途径或非肌肉注射途径免疫之后，抽取被免疫动物血清，经常规方法纯化抗体-70℃保存备用。

采用通过“吸附—洗脱—扩增”的方法，用抗 HPV16L1 多克隆抗体筛选噬菌体随机肽库 (phage random peptide library) (方法详见 Ph. D.-12™

Phage Display Peptide Library Kit 说明书), 随机选取可与抗 HPV16L1 多克隆抗体特异性结合的噬菌体, 经扩增、DNA 的提取、测序和同源性分析, 确定 HPV16L1 蛋白模拟肽的氨基酸序列。

利用常规免疫学方法 (如噬菌体 ELISA 法、或免疫斑点等方法), 直接以展示 HPV16L1 蛋白模拟肽的噬菌体作为抗原, 通过测定模拟肽与抗 HPV16L1 抗体的结合能力确定筛选模拟肽的特异性 (方法详见 Ph. D. -12™ Phage Display Peptide Library Kit 说明书), 或用于检测 HPV16 感染患者或者实验动物血清、体液、组织中抗 HPV16L1 抗体。

直接将展示 HPV16L1 蛋白不同抗原表位模拟肽的噬菌体克隆单独和混合作为免疫原直接免疫哺乳类 (包括人类) 或非哺乳类动物, 获得抗 HPV16L1 蛋白的特异性抗体, 达到预防 HPV16 感染的目的。

本发明经过上述方案获得了 4 段 HPV16 L1 蛋白模拟肽 (HPV16 L1 minotope, HLM) 氨基酸序列 (编号为 HLM₁₋₄) (图 1):

HLM₁: Thr Asn Leu Asp Leu Tyr Gly

HLM₂: Ile Phe Asp Asn His Pro

HLM₃: Leu Thr Phe Lys Pro Gln

HLM₄: Gly Ile Asp Ser

且展示上述模拟肽的噬菌体载体或非噬菌体载体均可作为抗原用于通过免疫学方法检测 HPV16 感染患者或者接受 HPV16L1 蛋白免疫的哺乳类 (包括人类) 或非哺乳类动物血清、体液、组织中抗 HPV16L1 抗体。

直接将展示上述模拟肽的噬菌体载体或非噬菌体载体克隆均可单独和混合作为免疫原通过常规免疫途径免疫哺乳类 (包括人类) 或非哺乳类动物, 可诱导产生抗 HPV16L1 蛋白的特异性抗体, 用于 HPV16 预防性疫苗的研制。

附图说明

图 1 是本发明的 4 段 HPV16L1 蛋白模拟肽的氨基酸序列。

图2是本发明的pFB-HPV16L1重组质粒的酶切鉴定:Lane 1 DNA marker; Lane 2 HPV16 L1 PCR产物; Lane 3,5,7 pFB-hpv16L1质粒; Lane 4,6,8 XbaI+HindIII酶切pFB-HPV16L1质粒。

图3 Western blot检测纯化HPV 16 L1蛋白:Lane 1 Sf-9 cells对照; Lane 2,3,4 非变性条件下纯化的HPV 16 L1蛋白; Lane 5 蛋白Maker。

图4是本发明的同源性分析确定HPV16L1抗原模拟肽:图中字母为标准单字母氨基酸代码。I展示HLM₁模拟肽(Thr Asn Leu Asp Leu Tyr Gly)的噬菌体克隆同源性分析,16.7[#]为展示该模拟肽的噬菌体克隆;II展示HLM₂模拟肽(Ile Phe Asp Asn His Pro)的噬菌体克隆同源性分析,16.20[#]为展示该模拟肽的噬菌体克隆;III展示HLM₃模拟肽(Leu Thr Phe Lys Pro Gln)的噬菌体克隆同源性分析。16.14[#]为展示该模拟肽的噬菌体克隆;IV展示HLM₄模拟肽(Gly Ile Asp Ser)的噬菌体克隆同源性分析,16.S32[#]为展示该模拟肽的噬菌体克隆。

图4是本发明的将展示上述HPV16L1抗原模拟肽的噬菌体克隆作为抗原采用免疫斑点法检测小鼠HPV16L1抗体:1展示HLM₁模拟肽的噬菌体克隆(16.7[#]);2展示HLM₂模拟肽的噬菌体克隆(16.20[#]);3展示HLM₃模拟肽的噬菌体克隆(16.14[#]);4展示HLM₄模拟肽的噬菌体克隆(16.S32[#]);5不含任何模拟肽的噬菌体克隆作阴性对照。

图5是本发明的ELISA法检测噬菌体免疫后小鼠血清抗HPV16L1抗体:1不含任何模拟肽的噬菌体克隆作阴性对照;2展示HLM₁模拟肽的噬菌体克隆(16.7[#])免疫组;3展示HLM₂模拟肽的噬菌体克隆(16.20[#])免疫组;4展示HLM₃模拟肽的噬菌体克隆(16.14[#])免疫组;5展示HLM₄模拟肽的噬菌体克隆(16.S32[#])免疫组;6展示HLM₁、HLM₂、HLM₃、HLM₄模拟肽的噬菌体克隆(16.7[#]、16.20[#]、16.14[#]、16.S32[#])混合物免疫组。

具体实施方式

以下结合附图对本发明作进一步的详细说明，所述的实施例用于描述本发明，而不是限制本发明。

实施例中采用的质粒、菌种、噬菌体随机肽库、宿主菌、细胞、实验动物及主要试剂如下：

pT-L1 质粒(重组 pGEM-T 质粒, 含 HPV16L1 基因)由本室构建并保存(郑滨, 王健伟, 姜惠英,等.利用昆虫-杆状病毒表达系统表达人乳头瘤病毒 16 型 L1 蛋白.中华实验和临床病毒学杂志.2001;15(4):314-316.)。

杆状病毒表达系统的穿梭载体 pFastBac[™]HTb、DH10Bac 感受态细胞、Sf-9 细胞购自 Invitrogen 公司。Grace`s 培养基、cellfectin 转染试剂购自 GIBCO 公司。噬菌体随机十二肽库 (Ph. D. 12[™]Phage Display Peptide Library) 和 E. coli ER2738 (Cat. 8110S) 购自 New England Biolabs 公司；新西兰大白兔、C57BL/6 小鼠、Balb/C 小鼠由西安交通大学医学动物实验中心提供；RNase、XbaI、HindIII、Nco I、Sal I 限制性内切酶购自宝生物(大连)公司；Protein G Magnetic Beads 购自 New England BioLabs 公司；HPV-16 L1 单克隆抗体购自 Neomarker 公司；HRP-IgG 购自 DAKO 公司；PCR beads 购于 phamasia 公司。

本实施例中涉及到的各种试剂的配置和方法参见《分子克隆》、《GIBCO 公司 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统操作手册》《ProBond[™] 纯化系统说明书》、《New England BioLabs 公司 Ph. D. -12[™] Phage Display Peptide Library Kit 说明书》等。

1. 技术方案及其路线

1.1 HPV16 L1 蛋白的制备

1.1.1 重组 pFB-HPV16L1 辅助表达载体的构建

1.1.1.1 HPV16L1 片段的获得及回收纯化：以 XbaI+HindIII 消化 pT-L1 质粒(重组 pGEM-T 质粒, 含 HPV16L1 基因)，酶切体系 50 μl，37℃ 反应 2h，将酶切产物行 1.0%低熔点琼脂糖凝胶电泳。长波紫外灯下对照 DNA 分子量标

准, 迅速切下 HPV16L1 1450bp 条带, 加入 pH8.0 的 TE 至总体积 500 μ l, 70 $^{\circ}$ C 水浴 5~10min 至低熔点胶完全熔化, 其间间断摇动数次, 等体积酚、酚/氯仿、氯仿于室温各抽提一次, 两倍体积的无水乙醇、0.2 体积的乙酸氨沉淀水相, 75%乙醇洗涤沉淀, 室温风干, 溶于 10~20 μ l 去离子水, 4 $^{\circ}$ C 备用。

1.1.1.2 pFastBac-Htb 质粒的制备: 取-70 $^{\circ}$ C 冻存的含 pFastBac-Htb 质粒的菌株 DH5 α 划线接种于含 50 μ g/ml Amp 的 LB-琼脂培养皿上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜或 16~20h。挑取单菌落于 10ml 含 50 μ g/ml Amp 的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。采用碱裂解小量质粒提取法提取质粒 DNA, 对 pFastBac-Htb 质粒行 XbaI+HindIII 双酶切 4h 或过夜, 紫外灯下观察酶切完全后, 于 0.7%低熔点琼脂糖凝胶回收 pFastBac-Htb 大片段, 方法同上, 洗涤后的沉淀物溶于去离子水中备用。

1.1.1.3 连接反应: 将纯化回收的 HPV16L1 片段和回收的线性化的 pFastBac-Htb 连接, 连接体系 10 μ l, 目的片段和载体的比例为 3~4:1, 连接酶 1 μ l, 14~16 $^{\circ}$ C 连接 16h 以上。连接产物命名为 pFB-HPV16L1。转化 DH5 α 宿主菌, 提取质粒进行酶切鉴定 (图 2)。

1.1.2 重组杆状病毒辅助表达载体的转座反应 (具体方法参照 GIBCO 公司 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统操作手册)

1.1.2.1 DH10Bac 感受态细胞的制备: 挑取单菌落 DH10Bac 菌株接种于不含抗生素的 2ml LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养过夜。取 100 μ l 菌液重新接种于 50ml LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养 2-3h, 测菌液于 600nm 的 A 值, 当 A_{600} =0.3~0.4 时, 将菌液转移至预冷的 50ml 无菌离心管, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 用 1/10 菌液体积预冷的 1 \times TSS 溶液重悬菌体沉淀, 冰浴 15min, 用无菌的 1.5 或 2.0ml Eppendorf 管分装感受态细胞, 每管 100 μ l, -70 $^{\circ}$ C 速冻备用。

1.1.2.2 重组杆状病毒辅助表达载体的转座反应: 首先制备 Luria Agar 选

择性平板（融化 1.5%LB 固体培养基，室温放凉至 40℃，快速加入下列物质至终浓度分别为卡那霉素 50 μg/ml，庆大霉素 7 μg/ml，四环素 10 μg/ml，X-gal 200mg/ml，IPTG 40 mg/ml），然后从 -70℃ 冰箱取出保存的 DH10Bac 感受态细胞置冰上溶融化。100ml 感受态细胞加入 1ng 重组辅助表达载体，冰浴 30min，42℃ 热休克 90s，置冰上 2min；加入 900 μl S. O. C 培养基混匀，37℃，200rpm，振荡培养 3h，分别取 150 μl、100 μl、50 μl 菌液用无菌弯管玻棒涂布于 Luria Agar 选择性平板，37℃ 倒置培养 48h。

1.1.3 分离重组 Bacmid DNA

1.1.3.1 从上述选择性培养基上挑取白斑悬于 2ml 选择性 LB 培养液（卡那霉素 50 μg/ml，庆大霉素 7 μg/ml，四环素 10 μg/ml），37℃，200rpm，振荡培养 24h。

1.1.3.2 将 1.5ml 菌液转于 1.5ml Eppendorf 管中，14,000g，离心 1min，弃上清，将沉淀悬于 0.3ml 溶液 I，加入 0.3ml 溶液 II，轻轻混匀，室温 5min，缓慢加入 0.3ml 3Mol/L 乙酸钾 (pH5.5)，边加边混匀，置冰浴 10min，14,000g，离心 10min，同时标好另一干净 Eppendorf 管，加入 0.8ml 异丙醇；轻轻将上清转至已加好异丙醇的新管中，注意不要混有蛋白沉淀，将离心管颠倒数次混匀，置冰浴 10min，14,000g，室温离心 15min，弃净上清，分别用 70% 和 100% 乙醇各洗涤 1 次；室温晾干，溶于 40 μl 无菌 TE 缓冲液，4℃ 短期保存或 -20℃ 冻存。

1.1.4 HPV16L1 蛋白的表达

1.1.4.1 用重组 Bacmid DNA 转染 Sf-9 细胞及重组杆状病毒的收获：在 35mm 培养皿中分种约 9×10^5 个 Sf-9 细胞，每平皿中含 2ml 完全培养液，27℃ 培养至少 1h，使细胞完全贴壁，在无菌 Eppendorf 管中配置以下溶液：

A 液：5 μl lBacmid DNA 加 95 μl 高压去离子水

B 液：6 μl cellfectine 加 94 μl 高压去离子水

A液与B液轻轻混匀，室温放置30min

将Sf-9细胞用无血清、无抗生素的TNM-FH洗涤3次，弃尽溶液，逐滴加入AB混合液，补加0.8ml无血清、无抗生素的TNM-FH，27℃培养5h弃上清，换2ml完全培养基，27℃过夜，换维持液，继续培养48h(共培养72h)。收集培养上清，500g离心10min，将上清分成小份作为原毒种。4℃避光可保存半年，-70℃可长期保存。

1.1.4.2 PCR法检测HPV16L1基因在重组杆状病毒中的整合：取0.75ml重组杆状病毒培养上清，加入0.75ml PEG 8000[20%(W/V)PEG, 1mol/L NaCl]，混合后室温放置30min，14000g离心10min，弃上清，沉淀悬于100μl去离子水，加10μl蛋白酶K(10mg/ml)，50℃作用1h，等体积酚-氯仿抽提后乙醇沉淀，-20℃过夜。次日14000g离心，弃上清，沉淀晾干后溶于10μl去离子水中。取2μl作模板，分别以HPV16L1上下游引物和M13/pUC上下游引物(M13/pUC上游引物：CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG；下游引物：AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG)进行PCR扩增，鉴定L1基因在重组杆状病毒中的整合。循环参数为95℃，30秒，55℃，30秒，72℃，90秒，循环35次，72℃延伸10min。取5μl PCR产物行1%琼脂糖凝胶电泳，对产物进行鉴定。

1.1.4.3 HPV16L1蛋白的表达和鉴定：培养Sf9细胞至80-90%汇合时，弃上清，加入含重组Bac/B-HPV16L1杆状病毒毒株(包含HPV16L1基因)有的Grace's培养液200μl，再加入5ml含2%胎牛血清的Grace's维持培养液，27℃培养72h，收集细胞。27℃培养Sf-9细胞至80%细胞融合时，弃上清，加入5-6ml维持培养液，再加入重组杆状病毒毒种400μl/瓶，继续培养72h，2000g离心，10min，收集病毒感染细胞。

1.1.4.4 HPV16L1蛋白的纯化和检测：ProBond™ Column非变性条件纯化HPV16L1蛋白(方法详见ProBond™纯化系统说明书)；取150μl树脂移入2ml EP管，800×g离心2min，弃上清，加入700μl去离子水，重复洗涤2

次；加入 700 μ l 非变性结合液，重复洗涤 2 次；将 2×10^7 接毒细胞重悬于 1ml 非变性结合液，用液氮反复冻融 2 次， $3000 \times g$ 离心 15min，将上清移入已准备好的树脂中，轻柔混匀 20min， $800 \times g$ 离心 2min，弃上清；加入 500 μ l 非变性结合液，重复洗涤 2 次；加入 500 μ l 非变性洗涤液，重复洗涤 2 次。加入 250 μ l 50mM 非变性一咪唑洗脱液，轻柔混匀 5min， $800 \times g$ 离心 2min，收集上清；加入 250 μ l 200mM 非变性一咪唑洗脱液，轻柔混匀 5min， $800 \times g$ 离心 2min，收集上清；加入 250 μ l 350mM 非变性一咪唑洗脱液，轻柔混匀 5min， $800 \times g$ 离心 2min，收集上清；加入 250 μ l 500mM 非变性一咪唑洗脱液，轻柔混匀 5min， $800 \times g$ 离心 2min，收集上清。取 20 μ l 样品，加入等量 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液，混匀后置沸水中 5min，取 20 μ l 样品做 12% SDS-PAGE。Western blot 检测纯化蛋白：样品经 12%SDS-PAGE 电泳，用 Bio-Rad 蛋白转印系统，70V 电压，200mA 电流，4 $^{\circ}$ C 转印 PVDF 膜 90min，5% 脱脂奶室温封闭 2h，1:200 稀释的抗 HPV16L1 单克隆抗体室温孵育 2h，TBST(含 0.5%Tween-20 的 TBS)洗，10min \times 3，1:1000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 室温孵育 20min，TBST 洗 10min \times 3，DAB 显色（图 3）。

1.2 抗 HPV16L1 多克隆抗体的制备

双缩尿法定量 HPV16L1 蛋白。并于第 1 天用 200 μ g HPV16L1 蛋白加弗氏完全佐剂 (Freunds complete adjuvant, FCA) 充分混匀后背部皮下多点注射免疫实验兔，第 14 天：用 200 μ g HPV16L1 蛋白加弗氏不完全佐剂 (Freunds incomplete adjuvant, FIA) 充分混匀后背部皮下多点注射免疫实验兔，第 21 天和第 28 天分别耳缘静脉注射 200 μ g HPV16L1 蛋白/只。第 3 次免疫后 3 天，耳缘静脉采血 ELISA 法检测血清抗体滴度。第 4 次免疫后 3 天行颈动脉采血，吸取血清后，加入终浓度为 0.02% 的叠氮钠，ELISA 法检测抗体滴度，硫酸铵盐析法纯化 IgG，冷冻抽干成粉末状，-70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 噬菌体随机肽库的筛选

先取扩增并稀释后的噬菌体肽库 (1.0×10^{11} pfu), 和 300ng 正常兔 IgG 溶液到 2ml 结合液中, 37°C , 振荡孵育 50rpm, 1h 进行预吸附, 加入 SPA 标记的磁珠 $50\mu\text{l}$, 37°C , 振荡孵育 50rpm 20min 后, 磁力吸附 2min, 取上清, 用 1/6 体积 2.5M PEG/NaCl 沉淀, $200\mu\text{l}$ TBS 溶解, 加入到含 300ng 抗 HPV16L1 的兔 IgG 溶液 2ml 结合液中, 37°C , 孵育 1h, 加入 SPA 标记的磁珠 $50\mu\text{l}$, 37°C , 振荡孵育 50rpm, 20min, 磁力吸附 2min, TBST (TBS+0.1% Tween-20) 冲洗, $5\text{min} \times 3$ 次, 加入 $100\mu\text{l}$ 0.2M glycine-HCl (pH2.2), 1mg/ml BSA, 轻轻摇晃 10min, 磁力吸附 5min, 收集洗脱液, 加入 1M Tris-HCl (pH9.1) 中和, 检测噬菌体滴度, 留取 $20\mu\text{l}$ 用于保存, 对其余洗脱液加入到 20ml ER2738 培养液 (已达对数生长期) 中, 在 37°C , 230 rpm, 孵育 4.5h。1/6 体积 2.5M PEG/NaCl 沉淀, $200\mu\text{l}$ TBS 溶解即为已扩增的噬菌体, 检测噬菌体滴度, 4°C 保存, 并检测噬菌体滴度, 取等量噬菌体 (1.0×10^{11} pfu) 重复上述筛选过程 3 次, 检测第 3 次洗脱液的噬菌体滴度。

1.4 快速纯化噬菌体测序模板及测序

用无菌的木签, 随机蘸取测定第 3 次洗脱液噬菌体滴度的双层琼脂培养皿中的蓝色噬菌体菌斑, 投入含 5ml 已达指数生长期的 ER2738 培养液中, 在 37°C , 剧烈震荡孵育 230rpm, 4.5h。离心后取上清液并再次离心, 取 80% 上清, NaI 法快速纯化噬菌体测序模板 (方法详见 Ph. D. -12™ Phage Display Peptide Library Kit 说明书), 琼脂糖凝胶电泳检测, 上海华诺生物科技有限公司测序。

1.5 序列分析

采用 NCBI 的 Blastn 和 Blastp 分析, 并经同源性分析确定 HPV16L1 抗原表位 (图 4)。

1.6 免疫斑点实验

选择上述经测序和 Blastp 分析的噬菌体菌株进行免疫斑点实验, 方法如

下：分别取 1 μ l 噬菌体点膜，未插入外源片段的噬菌体克隆作为阴性对照，5%脱脂奶室温封闭 2h，1:500 稀释的抗 HPV16L1 多克隆抗体室温孵育 2h，TBST(含 0.5%Tween-20 的 TBS)洗，10min \times 3，1:1000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 室温孵育 20min，TBST 洗 10min \times 3，DAB 显色。结果可见 4 组噬菌体均能与 HPV16L1 天然抗原诱导的抗体反应(图 5)，说明直接使用展示本发明的 4 种不同 HPV16 L1 蛋白模拟肽的噬菌体载体作为抗原均可用于 HPV16L1 抗体的检测，可用于 HPV16 诊断试剂的研制。

1.7 噬菌体免疫

按照 Ph. D. -12TM Phage Display Peptide Library Kit 说明书方法扩增并纯化筛选出的阳性克隆，并测定滴度。6 周龄雌性二级 Balb/C 小鼠随机分 6 组，每组 3 只，将纯化的阳性噬菌体分为 6 组，分别是：1 组，展示 HLM₁ 模拟肽噬菌体克隆 (16.7[#])；2 组，展示 HLM₂ 模拟肽噬菌体克隆 (16.20[#])；3 组，展示 HLM₃ 模拟肽噬菌体克隆 (16.14[#])；4 组，展示 HLM₄ 模拟肽噬菌体克隆 (16.S32[#])；5 组，展示 HLM₁₋₄ 模拟肽的噬菌体克隆 (16.7[#]、16.20[#]、16.14[#]、16.S32[#]) 混合物；6 组，阴性对照组，为一个无外源插入序列的 M13 噬菌体。第一次免疫时，每只小鼠用 0.5ml 福氏完全佐剂加入 1 \times 10¹³pfu 噬菌体充分搅拌混匀，背部及腹股沟皮下多点注射免疫。21 天后，每只动物以 0.5ml，0.9%NaCl 稀释 1 \times 10¹³pfu 噬菌体，腹腔注射免疫第二针，以后每隔 3 周腹腔注射免疫一次，共免疫四次，后三次均不加佐剂。第四次免疫后 5 天，眼球静脉取血，断颈处死小鼠，检测血清抗体。

1.8 诱生抗体的 ELISA 检测

用稀释后的 HPV16 L1 蛋白，包被 ELISA 板，4 $^{\circ}$ C 过夜，5%脱脂奶，37 $^{\circ}$ C 封闭 1h，加入 1:100 稀释的待检小鼠血清，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h，再加 1:1000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体，37 $^{\circ}$ C，45min，OPD 显色，正常鼠血清作阴性对照。结果上述展示不同 HPV16L1 蛋白模拟肽的噬菌体克隆作为免疫原

单独或混合免疫小鼠均可诱导实验小鼠产生不同滴度的抗 HPV16L1 蛋白抗体，混合组产生的抗体滴度最高（图 6）。说明本发明的 4 种不同 HPV16 L1 蛋白抗原模拟肽均能够诱导实验动物产生免疫反应，可以用于 HPV16 疫苗的研制。

2. 技术效果

本发明采用上述方案获得的展示 HPV16L1 蛋白模拟肽的噬菌体可直接用于检测 HPV16 感染患者血清、体液、组织中的抗 HPV16L1 蛋白抗体，或经 HPV16L1 蛋白免疫的哺乳类或非哺乳类动物免疫血清中的血清、体液、组织中的抗 HPV16L1 蛋白抗体，也可直接作为疫苗用于哺乳类和非哺乳类动物的免疫，产生抗病毒抗体，尤其是抗 HPV16L1 抗体。这些模拟肽的发现将会在 HPV16 的诊断试剂和预防性疫苗的研制方面具有巨大的潜在价值。

3. 最佳实施方式

3.1 HPV16 L1 抗体检测试剂盒的构建

直接将本发明中发现的展示 HPV16L1 蛋白模拟肽的噬菌体作为抗原通过常规免疫学检测方法从而构建检测 HPV16 L1 抗体的试剂盒，用于患者血清、体液、组织中的抗 HPV16L1 蛋白抗体，或经 HPV16L1 蛋白免疫的哺乳类或非哺乳类动物免疫血清中的血清、体液、组织中的抗 HPV16L1 蛋白抗体。

3.2 HPV16 疫苗的制备

直接将本发明中发现的展示 HPV16L1 蛋白模拟肽的噬菌体作为免疫原通过常规免疫途径用于免疫哺乳类和非哺乳类动物，产生抗 HPV 抗体，尤其是抗 HPV16L1 抗体，从而达到预防 HPV16 感染的目的。

HPV16 L1 蛋白模拟肽氨基酸序列

HLM₁: Thr Asn Leu Asp Leu Tyr Gly

HLM₂: Ile Phe Asp Asn His Pro

HLM₃: Leu Thr Phe Lys Pro Gln

HLM₄: Gly Ile Asp Ser

H1M₁: Thr Asn Leu Asp Leu Tyr Gly
H1M₂: Ile Phe Asp Asn His Pro
H1M₃: Leu Thr Phe Lys Pro Gln
H1M₄: Gly Ile Asp Ser

图 1

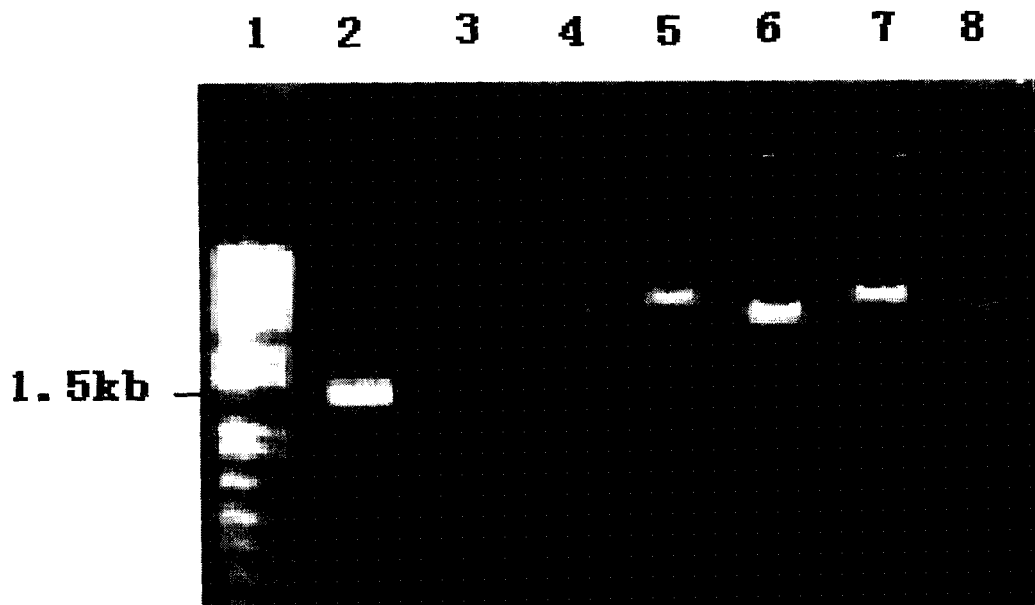


图 2

Number	Code	Sequence	
I	1	16C10	NFDLYGRLPFQS
	2	16.10	SNFDLYGPLVSL
	3	16.9	GNTTNSDLYGIW
	4	16.7	TNLDLYGRWGLM
	5	16.13	NNWAPRGNLDLY
II	6	16C14	SHAIFDNIIPRPS
	7	16.4	MPQNIIDNRPAH
	8	16.16	WPHQSRIIDNHI
	9	16.20	MIIDFNHPKDYGT
	10	16C13	ATIIDFNHPPGYM
	11	16C2	KIIDFNHPPELD
12	16.1	KIIDNLSLPVALQ	
III	13	16C8	NNIFKPKQILNFK
	14	16C20	NNIFKPKQILNFK
	15	16.2	THVIFKPKQLNGR
	16	16.6	EPLIFKPKQLVPR
	17	16.14	LIFKPKQPQVGNL
	18	16C5	IIFKTKQPTLVPH
	19	16C12	DYQHTYVIFKPKQ
20	16.11	NYAPQSPLIFKPKQ	
IV	21	16.12	GTHSAHRHHSLS
	22	16S32	GIDSPKLRNTLA
	23	16C16	GIDSKPFFKPAI
	24	16C19	GIDSWNLSGNLS

图 3

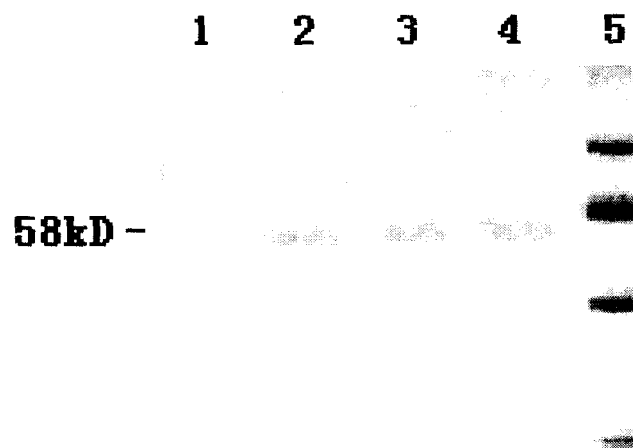


图 4

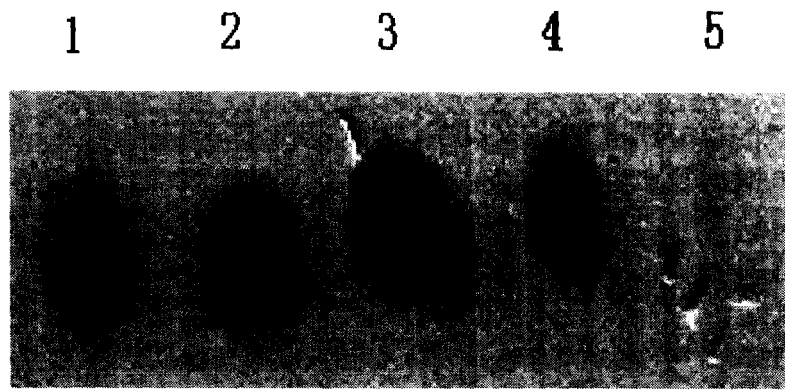


图 5

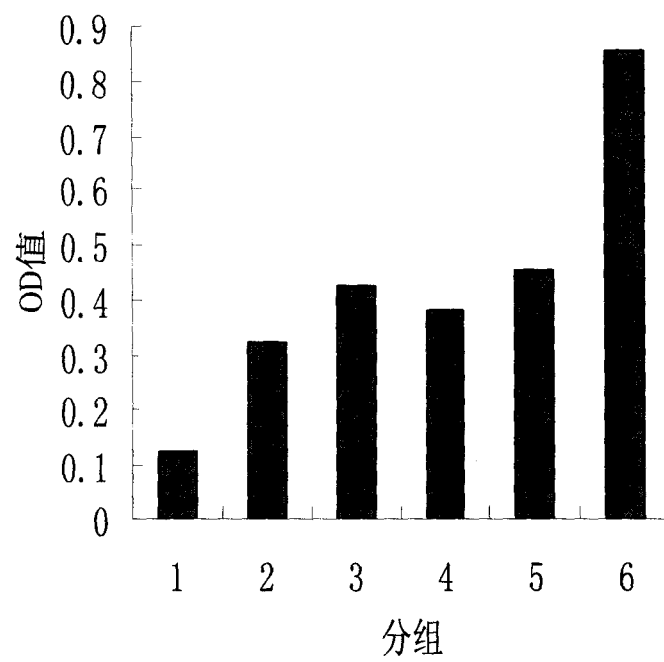


图 6

专利名称(译)	HPV16 L1蛋白模拟肽及其用于制备HPV16诊断试剂和疫苗的用途		
公开(公告)号	CN1793171A	公开(公告)日	2006-06-28
申请号	CN200510022756.7	申请日	2005-12-29
[标]申请(专利权)人(译)	西安交通大学		
申请(专利权)人(译)	西安交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	西安交通大学		
[标]发明人	杨军 张明娟 王一理 司履生		
发明人	杨军 张明娟 王一理 司履生		
IPC分类号	C07K14/025 C12N15/63 G01N33/53		
其他公开文献	CN1328287C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了4段HPV16L1蛋白模拟肽及其用于制备HPV16诊断试剂和疫苗的用途。本发明利用噬菌体随机肽库筛选抗HVP16L1多克隆抗体，成功筛选出4段HVP16L1蛋白模拟肽。经过免疫斑点和动物免疫实验发现，直接用展示该模拟肽的噬菌体展示载体或非噬菌体展示载体检测HPV16感染患者血清、体液、组织中的抗HPV16L1蛋白抗体，或者经HPV16L1蛋白免疫的哺乳类或非哺乳类动物免疫血清中的血清、体液、组织中的抗HPV16L1蛋白抗体，也可直接用展示该模拟肽的噬菌体展示载体或非噬菌体展示载体作为疫苗用于哺乳类和非哺乳类动物的免疫，产生抗病毒抗体，尤其是抗HPV16L1抗体。因此该模拟肽在检测HPV16L1抗体的诊断试剂和HPV16预防性疫苗的后续研究中具有巨大的潜在价值。

