

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710168713.9

[51] Int. Cl.

C07K 14/025 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 5 月 28 日

[11] 公开号 CN 101186636A

[22] 申请日 2007.12.6

[21] 申请号 200710168713.9

[71] 申请人 三峡大学

地址 443000 湖北省宜昌市大学路 8 号

[72] 发明人 肖长义 万 涛 黄利鸣

[74] 专利代理机构 宜昌市三峡专利事务所

代理人 成 钢

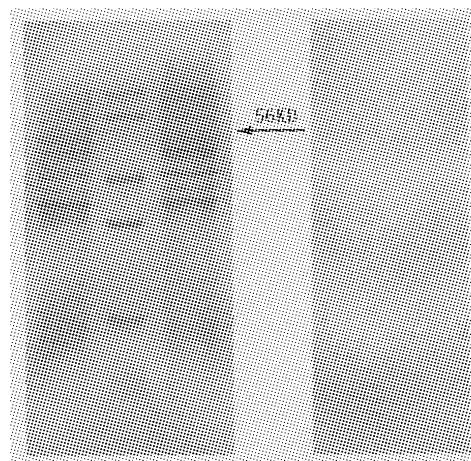
权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 3 页

[54] 发明名称

人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽及其应用

[57] 摘要

本发明涉及一种多肽，具体地说是一种人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽及其应用。其特征是：该人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽的序列为：N 端 - EVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLKAK - C 端。本发明能够同时诱导对高危型和低危型均能产生免疫反应的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽，它可以诱导形成针对多种型别人乳头瘤病毒 (HPV) 和外壳蛋白 (HPV L1) 的抗体，以便用于多种型别 HPV 或 HPV L1 的检测，这种抗体还可用于生物制药工程，用于多种型别 HPV 或 HPV L1 的纯化、制备。



1. 一种人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽，其特征是：该人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽的序列为：

N 端—EVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLKAK—C 端。

2. 根据权利要求 1 所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽，其特征是：所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽是以 HPV16 L1 448—477aa 区段的蛋白序列为基础，长度为 30 个的氨基酸，序列为：

EVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLKAK。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽，其特征是：所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽是多克隆抗血清或单克隆抗体。

4. 权利要求 1、或 2 所述的一种人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽的用途，其特征是：以所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽的氨基酸序列为基础作为抗体诱导物，用所诱导的多克隆抗血清或单克隆抗体用于各型人乳头瘤病毒及人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 的检测。

5. 权利要求 1、或 2 所述的一种人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽的用途，其特征是：对所述人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽的一个或多个氨基酸残基进行变换后，作为抗体诱导物，用所诱导的多克隆抗血清或单克隆抗体用于各型 HPV 及 HPV L1 的检测。

6. 权利要求 1、或 2 所述的一种人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽的用途，其特征是：以所述人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽为基本结构单元，借连接段肽链连接，形成具有多个重复结构的蛋白或长肽，将此具有多个重复结构单元的蛋白作为抗体诱导物，用所诱导的多克隆抗血清或单克隆抗体用于各型 HPV 及 HPV L1 的检测。

7. 权利要求 1、或 2 所述的一种人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽的用途，其特征是：将所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽与具有佐剂效应的蛋白相联接，形成融合蛋白，将此融合蛋白作为抗体诱导物，用所诱导的多克隆抗血清或单克隆抗体用于各型 HPV 及 HPV L1 的检测。

8. 权利要求 1 或 2 所述的一种人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽的用途,其特征是:将所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽与化学合成佐剂或生物佐剂混合后使用,作为抗体诱导物,用所诱导的多克隆抗血清或单克隆抗体用于各型 HPV 及 HPV L1 的检测。

9. 权利要求 1 或 2 所述的一种人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽的用途,其特征是:将所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽作为抗体诱导物,以所诱导的多克隆抗血清或单克隆抗体用于各型 HPV 或 HPV L1 的分离、纯化。

10. 权利要求 1 或 2 所述的一种人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽的用途,其特征是:将所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽作为人乳头瘤病毒抗血清或人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 抗血清和单克隆抗体的被检测物。

人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽及其应用

技术领域：

本发明涉及一种多肽，具体地说是一种人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽及其应用。

技术背景：

1933 年人类首次发现人乳头瘤病毒（HPV），1978 年，第一例生殖道 HPV 被鉴定。目前，根据人乳头瘤病毒（HPV）DNA 序列表达基因不同，已确定的人乳头瘤病毒（HPV）亚型超过 200 种，其中，85 种 HPV 的基因克隆被鉴定，另有 120 种的部分基因型被鉴定，并且，有 30 余种是从生殖道组织中分离得到。根据人乳头瘤病毒（HPV）感染的部位，分为皮肤型和粘膜型；根据其致病性的大小，分为高危型和低危型。高危型主要有 HPV16、18、33、31、58 和 52 等，与宫颈癌的发病有关，低危型主要有 HPV6、11、42 和 44 等，与生殖道疣状物有关。

目前，随着宫颈癌病因学的研究进展，其防治方法也在不断地提高和发展。在 HPV 疫苗尚未在人群中应用之前，普查仍是预防和控制宫颈癌的主要手段。大量研究表明人乳头瘤病毒（HPV）持续感染是引起宫颈上皮癌变的主要危险因素，尤其是高危型 HPV。随着检测技术的提高，宫颈癌组织中 HPV 的检出率高达 99%，其中，HPV16 占 55%至 60%，HPV 18 占 10%至 12%，HPV 31 和 HPV 45 分别占有 4%至 5%。因此许多学者提出把检测 HPV 作为宫颈癌的筛查手段。目前，HPV 的检测主要有病理学变化、免疫组化、分子生物学技术和血清学检测等方法。

1. HPV 感染宫颈的病理学改变

细胞病理学改变：在宫颈移行区取材，行巴氏染色，可见由 HPV 引起的挖空细胞，即可诊断。此方法简单易行，无痛苦，经济实用，可用于大规模普查和筛查。但其敏感性低，假阴性率高。近年来，已由传统的巴氏涂片发展成薄层巴氏涂片和涂片自动检测系统。此方法应用新的收集和制作过程，大大降低了结果的假阴性率。主要有以下：PAPNET 系

统、Auto Pap3000Qc、Thinprep2000 和 CYTORICH 等。

组织病理学改变：对宫颈无明显癌变的可疑区取材做病理检查，当发现挖空细胞，就可诊断有 HPV 的感染，并可发现宫颈细胞是否有异性性，是宫颈癌及其癌前病变确诊的依据。

2. 免疫组化检测 HPV 感染

取少量病变组织制成涂片，用特异抗人类乳头瘤病毒的抗体作染色。如病损中有病毒抗原，则抗原抗体结合。常用过氧化物酶抗过氧化物酶方法（即 PAP），此方法有较好的特异性，还能显示出病毒感染的部位，操作简单，有一定的诊断价值，但是检测率低，敏感性不高，且不能分型。另外，有学者在不典型鳞状细胞（ASCUS）患者的宫颈涂片和活检组织中加入抗 P16 抗体和克隆 E6H4 后进行免疫组化染色，发现巴氏涂片为 ASCUS 并且活检为鳞状上皮内瘤样变（SILs）的患者 P16 表达的强弱与 HR HPV 的病毒量密切相关，P16 免疫染色检测 HR HPV 病毒量的灵敏度、特异度、阳性预测值（PPV）和阴性预测值（NPV）分别为 95%、96%、91%、98%。P16 的过度表达是 HR HPV 致病活跃的指示器。此法可作为宫颈癌普查中检测宫颈上皮细胞是否感染高危型 HPV 的可靠简单的方法。

3. 分子生物学技术

3.1 样本

分子生物学技术检测的样本通常是宫颈部的上皮组织，可以是用于细胞学检查的宫颈刮片或宫颈细胞拭子，这些生殖道脱落细胞为检材避免了活检取材、研磨组织繁杂操作。但如果样本量不够，会影响结果的灵敏度，故大多数还是通过阴道镜下宫颈活检来获得样本。也有学者提出，宫颈癌患者的血液也可用来检测 HPV DNA。但是，Patti Key 通过实验指出：宫颈癌患者晚期，HPV DNA 才释放到血液，即使被检测到，也无诊断学意义，它只对判定有无宫颈癌血液转移具有一定的参考价值。最近，B.K. Prusty 等提出，宫颈外周的上皮及阴道正常的脱落细胞进入尿液，当有 HPV 感染时，这些脱落细胞中也会含有病毒基因或毒粒。收集尿液可直接用于 PCR 检测 HPV DNA，他们对 55 名已婚妇女的尿液、宫颈刮片、活检组织分别进行 PCR 检查，结果发现三者中检测到的 HPV 阳性

符合率接近 100%。用尿液作为检测生殖性 HPV 的感染是一种有用简单无创伤性的方法，可进一步证实并被采用。

3.2 检测指标

目前，检测的指标主要有以下三种：（1）HPV DNA 检测：是最常用的检测指标，作为宫颈癌的初筛手段可更灵敏地检出宫颈癌及其癌前病变，其方法简单，客观性强。但是不能区分是持续性感染还是重新感染。（2）HPV mRNA 检测：可以监测致癌基因如 E6、E7 的表达，这与疾病的恶化进程相关，当病变恶化，E6、E7mRNA 的水平升高，但 RNA 稳定性差，不宜储存。HPV mRNA 检测的敏感度高达 100%，特异性为 70%，但假阳性率较高。Lie AK 等通过实验指出，对于低度病变，DNA 检测的阳性率较高，而对于高度病变，mRNA 检测的阳性率很高，mRNA 检测似乎更适合预测宫颈病变的危险程度。（3）HPV 病毒量：HPV 病毒量被提出作为识别疾病的危险性的手段，但是存在争议，大多数研究还不能为每份样本的细胞数定下统一标准，因此，在进行有效的 HPV 病毒量评估前应调整标本中的细胞数。

3.3 影响分子生物学实验结果的因素

HPV 检测的结果会受诸多因素的影响。主要有以下几方面：（1）样品的来源：HPV 检测的阳性率与取样患者的年龄段有关。另外，还与宫颈病变程度有关，收集样本的量也影响 HPV 检测的成败。（2）样本运输和储存的稳定性也很重要，检测的假阴性可由于内生的核酸内切酶使其核酸降解所造成。现有一些商业性样品储存液，如：PreservCyt(Cytoc Corp.)，它可延长核酸在室温下的储存时间。（3）检测的方法：不同分子生物学实验方法检测宫颈中 HPV 的灵敏度和特异度也不同。引物为 PGMY09/11 和 GP5⁺/6⁺(PGMY/GP⁺)的巢式 PCR 检测宫颈样品中的 HPV DNA，与以 MY/GP⁺为引物的巢式 PCR 相比较，发现前者更具有型特异性和敏感性，可检测更广泛的型别和复制低下的病毒。更好发现样本的多型病毒感染。（4）实验仪器和设备：发展中国家的仪器设备收集和分析样本，进行 HPV 检测的敏感性普遍低于发达国家。

3.4 临床常用检测方法

3.4.1 核酸分子杂交技术

原位核酸杂交 (ISH): 此技术是一种敏感、特异、相对简便的方法, 又有细胞定位准的优点, 能在亚细胞水平上定位特异性核酸分子序列, 从细胞分子水平上来探讨 HPV 感染。例如: Narimatsu R 等利用荧光原位杂交法 (FISH) 检测高度鳞状上皮内瘤样病变 (HSIL) 标本中 HPV E6、E7 mRNA, 结果显示, 其灵敏度为 83.3%, 特异度为 91.3%, 均高于杂交捕获法 (HC) (Digene 公司)。

杂交捕获试验 (HC): 它利用化学发光对抗体捕获的信号加以放大。能检测 13 种高危型 HPV, 包括 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68。Zoltán Hernádi 等用 HC (Digene, USA) 检测 61 名上皮内瘤样病变 (CIN) 患者治疗后的宫颈中 HPV DNA, 发现 43 例 HPV 阴性者, 最终没有发展成为 CIN 和持续性细胞不典型性增生 (NPV=100%), 结果提示, CIN 治疗后 HPV 阴性说明消除了复发的危险。

第二代杂交捕获试验 (HC2): 试验采用 RNA 探针, 能特异性确定一定型别的高危 HPV 型 (16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 和 68) 或低危 HPV 型 (6、11、42、43、44), 可对病毒量进行半定量测定。对于检测 CIN2、3 和浸润癌中的 HPV, 其敏感度为 66% 至 100%, 特异度为 61% 至 96%。

3.4.2 聚合酶链反应 (PCR)

PCR: 此方法特异性敏感性高, 是目前最好的 HPV 检测方法, 简单易行, 标本来源不受限, 可用型特异性引物进行 HPV 分型, 但可发生样品间的交叉反应, 从而导致假阳性率。H. De Vuyst 等对 653 名妇女进行 HPV DNA PCR 检测, 结果: 对于 CIN2 及以下的病人, HPV PCR 和 HR HPV PCR 灵敏度分别为 94.4% 和 73.3%, 特异度分别为 69.3% 和 77.6%。

实时定量 PCR: 该方法灵敏度高, 漏诊率低, 可一次性完成生殖道 HPV 的检测, 但其设备和仪器较贵, 限制了其临床应用。Lo KW 等用实时定量 PCR 对 HPV16 阳性的宫颈赘生物标本中的病毒加载进行定量检测, 结果发现, 高度病变组 (HG-L)、低度病变组 (LG-L) 和正常组中 DNA 复制明显不同, 其程度与病情严重程度呈正比。HPV 16 E6/7 在三组中的

阳性率分别为 88.6%、58.8%和 5.9%。实验表明, 实时定量 PCR 在区分上述三组人中具有诊断价值。

多重巢式 PCR (MNP): 检测 15 种 HR HPV (16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 和 70), 它的引物是针对 HPV 基因的早期区, 它比其它巢式 HR HPV PCR 检测 CIN 中 HPV 的阳性率高。另外, 可通过对其产物分析进行 HPV 分型。Brian Brestovac 等用 MNP 对 282 个常规刮片进行 HPV 检测, HPV 阳性率为 17%。对于 CIN1, CIN2 和 CIN3 患者超薄细胞样品, HR HPV 阳性率为 91.7%均高于限制性片段长度多态性分析 (RHRP) (12.5%和 57.0%)。

PCR-酶免疫测定法: 此法特异性强, 灵敏度高, 可大量样本同时检测, 且操作简单, 检测成本低。Soderlund-Strand A 等用 PCR-EIA 对患者进行 HPV DNA 检测, 结果发现, PCR-EIA 对 CIN III 和 CIN II+诊断的灵敏度分别为 100.0%和 92.9%, 是 CIN II/III 诊断的有效手段。

半巢式 PCR 结合反向杂交: 一种简单便宜的高危型 HPV 的检测及分型方法。Hao Lin 等用纯化的 SiHa DNA 连续稀释 10 倍后作为半巢式 PCR 结合反向杂交及荧光检测的模板进行半巢式 PCR 结合反向杂交实验, 结果发现, 正常者、CIN 和浸润癌中 HPV 阳性率分别为 15%、89.7%和 96.4%。

3.4.3 HPV 检测新的分子生物学实验方法

AMPLICOR HPV 检测方法(Roche 公司): 它是利用 PCR 和分子核酸杂交技术对 HPV-DNA 进行扩增, 可检测高危型 HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 和 68 等 13 种基因型。Joseph Monsonego 等人用 AMPLICOR 方法对 270 名巴氏涂片检查异常 (MAPS) 的患者和 234 名参与宫颈癌普查的患者进行检查, 发现对于中重度上皮内瘤样病变 (CIN2、3) 患者, Roche AMPLICOR HPV 检测特异度为 42.4% (35.7%-49.2%), 灵敏度为 95.2% (89.9%-100.0%)。

INFORM(R): Layfield LJ 等比较了第二代杂交捕获 (R) (HCII(R)) 和 INFORM(R)两种方法对 ASCUS 患者诊治的价值, 他们用这两种方法对 431 位 ASCUS 患者进行 HPV DNA 检查, 通过治疗费和诊断精确性表明,

INFORM 方法优于 HCII, 尽管前者比后者费用增加了 16%, 但减少了 41% 的患者进行阴道镜检查, 且前者特异性较高。

短 PCR 片段 PCR 结合线状探针排列反向杂交法 (SPF10/LiPA): 可检测 11 种低危型 HPV (6、11、34、40、42、43、44、53、54、70、74) 和 14 种高危型 HPV (16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66 和 68), 并且, SPF10/LiPA 系统可判断高危型 HPV 持续感染及型别。Chris Perrons 等用 SPF10/LiPA 对 138 名因宫颈病变做阴道镜检查 and 6 个月后再复查阴道镜的患者进行 HPV 检测。两次检测 HPV 阳性率分别为 81% (112/138) 和 51% (142/276)。通过宫颈涂片, 将患者分为正常组、临界病变组 (BNC)、LSIL 和 HSIL 四组, 其 HPV 阳性率分别为 55%, 69%, 50%, 72%。并且, SPF10/LiPA 可检测低量 HPV DNA, 具有高敏感性。

HPV DNA 芯片: 最近出现的一种新的 HPV 分型方法。它通过大量固化的寡核苷酸探针与生物样品的靶系列进行分子杂交, 根据产生的杂交图谱排列出靶 DNA 的序列。可以快速高效对已知序列进行重测序。Hai Kwang Lee 等用一种以寡核苷酸微集阵列系统为基础的 HPV DNA 芯片检测 20 个 HPV 为阳性的妇科临床标本, 此 HPV DNA 芯片可检测 22 种高危型 HPV (16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68、69) 和 7 种低危型 HPV (6、11、34、40、42、43、44), 结果证明 HPV DNA 芯片的精确性和重复性几乎高达 100%。

3.5 HPV DNA 检测临床价值

HPV DNA 检测的临床价值主要有几个方面: (1) 单独应用 HPV 检测进行宫颈癌普查。很多研究发现, HPV DNA 检测的灵敏度很高, 特别对于高度病变。但是, 其特异性低, 特别是对于年轻已婚妇女。(2) HPV 检测联合细胞学进行宫颈癌普查。在宫颈普查中, 细胞学检查有效但缺乏敏感性, 高危型 HPV DNA 检测可有效地、极大地减少细胞学检查的假阴性结果。对于 CIN1, 两者联合使用, 灵敏度、特异度、PPV 和 NPV 分别为 100%、97.2%、30.8% 和 100%。(3) 决定低度病变进一步诊断和治疗。减少阴道镜检查及病理活检率, 延长复查间隔时间。(4) 作为宫颈病变治疗

后的随访指标。

4. 血清学检查

因 HPV 不能在体外组织细胞中增殖，故血清学检查发展缓慢。并且，血清学方法准确性不高，不能区别是现在还是过去感染。目前，尚不能用血清学方法对 HPV 进行确诊及分型。但是，随着不断的研究，在血清中可检测到一些具有参考价值的指标，作为宫颈癌诊断治疗检测及随诊中的标志物。先前，有研究指出，HPV16/52/58 DNA 阳性的 CIN 有显著的针对自身 L1 衣壳蛋白的抗体反应。针对 HPV16 抗原的 IgG1 和 IgG2 在宫颈癌中明显高于 CIN 患者，因此，对血清学反应为阳性的患者进行 IgG 亚类分析或直接检测针对病毒抗原的细胞免疫可以有效预测 CIN 的自然消退，但是，Koji Matsumoto 通过实验发现 L1 衣壳蛋白的 IgG 抗体与 2 年后 CIN 的消退无关联，因此指出 HPV L1 衣壳蛋白的 IgG 反应不能预测未治疗的 CIN I/II 的自然消退。另外，最近发现，宫颈病变患者的血清之中，L1 表面暴露区缩氨酸 18283 (⁵⁵PNNKILVPKVSGLQYRVFR⁷⁴) 和 18294 (²⁸⁴LYIKGSGSTANLASSNYFPT³⁰⁰) 可被抗体特异性识别，有学者用 EILSA 法对这两个缩氨酸进行检测，发现抗缩氨酸 18283 和 18294 抗体与 HR HPV 所致宫颈病变密切相关，其灵敏度和特异度分别为 94.5-97.2 % 和 90.9-97.5%，并且，EILSA 法简单、便宜、快速，可用于大规模血清学普查。

近年来，HPV 的检测发展迅速，在宫颈癌的筛查和宫颈癌前病变的预报中发挥了重要作用。目前的观点是联合应用薄层巴氏涂片法和 HPV 检测，对所有高危妇女定期复查，逐渐消除宫颈癌的可能。此外，HPV 检测技术的改进方向是使其灵敏度和特异度进一步提高，可以大规模应用，同时可分型，能够自动化，减少财力、人力和物力，成为宫颈病变筛查中不可少的辅助手段。

发明内容：

本发明的目的就是提供一种能同时诱导针对多种型别，尤其是同时诱导对高危型和低危型均能产生免疫反应的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽，它可以诱导形成针对多种型别人乳头瘤病毒 (HPV) 和外壳蛋白 (HPV

L1) 的抗体, 以便用于多种型别 HPV 或 HPV L1 的检测, 这种抗体还可用于生物制药工程, 用于多种型别 HPV 或 HPV L1 的纯化、制备。

本发明的技术方案是: 一种人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽, 其特征是: 该人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽的序列为:

N 端—EVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLKAK—C 端。所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽是以 HPV16 L1 448—477aa 区段的蛋白序列为基础, 肽长度为 30 个的氨基酸, 序列为: EVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLKAK。

所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽是多克隆抗血清或单克隆抗体。

本发明具有以下用途:

1、以所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽的氨基酸序列为基础作为抗体诱导物, 用所诱导的多克隆抗血清或单克隆抗体用于各型人乳头瘤病毒及人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 的检测。

2. 对所述人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽的一个或多个氨基酸残基进行变换后, 作为抗体诱导物, 用所诱导的多克隆抗血清或单克隆抗体用于各型 HPV 及 HPV L1 的检测。

3. 以所述人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽为基本结构单元, 借连接肽链连接, 形成具有多个重复结构的蛋白或长肽, 将此具有多个重复结构单元的蛋白作为抗体诱导物, 用所诱导的多克隆抗血清或单克隆抗体用于各型 HPV 及 HPV L1 的检测。

4. 将所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽与具有佐剂效应的蛋白相联接, 形成融合蛋白, 将此融合蛋白作为抗体诱导物, 用所诱导的多克隆抗血清或单克隆抗体用于各型 HPV 及 HPV L1 的检测。

5. 将所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽与化学合成佐剂或生物佐剂混合后使用, 作为抗体诱导物, 用所诱导的多克隆抗血清或单克隆抗体用于各型 HPV 及 HPV L1 的检测。

6. 将所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽作为抗体诱导物, 以所诱导的多克隆抗血清或单克隆抗体用于各型 HPV 或 HPV L1 的分离、纯化。

7. 将所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽作为人乳头瘤病毒抗血

清或人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 抗血清和单克隆抗体的被检测物。

附图说明

图 1. Western Blot 检测。1 带为表达重组 HPV16 L1 的 sf9 培养细胞；2 带为 Marker。

图 2. 兔抗血清对细胞裂解物的 ELISA 检测

图 3. Western Blot 检测。1, 4 带为 Caski 细胞；3, 5 带为 HeLa 细胞；2 带为 Marker。

图 4. 兔抗血清对临床标本的 ELISA 检测。HPV16、18 型的样本为宫颈癌组织；HPV6、11 型的样本为尖锐湿疣组织；HPV 其他型别的样本为寻常疣组织。

图 5. 鼠抗血清对临床标本的 Western Blot 检测。1 带为蛋白 MARKER: 条带分别对应 119KD、79.0KD、46.0KD、31.0KD、24.0KD、19.0KD；2 带 HPV16 型；3 带 HPV18；4 带 HPV6 型；5 带 HPV11 型；6 带其他型别。

图 6. 兔抗血清对临床标本的组化检测。HPV11 型的尖锐湿疣标本。阳性主要见于表面的角化层，某些挖空细胞核内呈阳性反应。

图 7. 兔抗血清对临床标本的组化检测。HPV16 型的宫颈上皮内病变标本。阳性见于上皮各层，细胞胞质或核内出现棕黄色颗粒。

图 8. 短肽内优势表位的 ELISA 试验确定。对照为抗短肽抗血清对短肽的反应。

图 9. 4 个小肽对抗短肽抗血清封闭效能的 ELISA 检测。对照为抗短肽抗血清对短肽的反应。

具体实施方式

以下结合实施例对本发明及其用途作进一步说明：

本发明人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽的序列为：

N 端—EVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLKAK—C 端。所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽是以 HPV16 L1 448—477aa 区段的蛋白序列为基础，肽长度为 30 个的氨基酸，序列为：EVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLKAK。

所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽是多克隆抗血清或单克隆抗

体。

以所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽的氨基酸序列为基础作为抗体诱导物，用所诱导的多克隆抗血清或单克隆抗体可以用于各型人乳头瘤病毒及人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 的检测。

对所述人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽的一个或多个氨基酸残基进行变换后，作为抗体诱导物，用所诱导的多克隆抗血清或单克隆抗体可以用于各型 HPV 及 HPV L1 的检测。

以所述人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽为基本结构单元，借连接段肽链连接，形成具有多个重复结构的蛋白或长肽，将此具有多个重复结构单元的蛋白作为抗体诱导物，用所诱导的多克隆抗血清或单克隆抗体可以用于各型 HPV 及 HPV L1 的检测。

将所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽与具有佐剂效应的蛋白相联接，形成融合蛋白，将此融合蛋白作为抗体诱导物，用所诱导的多克隆抗血清或单克隆抗体可以用于各型 HPV 及 HPV L1 的检测。

将所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽与化学合成佐剂或生物佐剂混合后使用，作为抗体诱导物，用所诱导的多克隆抗血清或单克隆抗体可以用于各型 HPV 及 HPV L1 的检测。

将所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽作为抗体诱导物，以所诱导的多克隆抗血清或单克隆抗体可以用于各型 HPV 或 HPV L1 的分离、纯化。

将所述的人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 短肽可以作为人乳头瘤病毒抗血清或人乳头瘤病毒外壳蛋白 L1 抗血清和单克隆抗体的被检测物。

实施例 1

(a) HPV L1 短肽的合成

本实施例中，以 HPV16 L1 aa448—477 区段的蛋白序列为基础，肽长度为 30 个氨基酸，序列为：EVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLKAK。

委托北京赛百盛基因技术有限公司在美国 Genemed Synthesis Inc. 公司用常规方法合成该序列短肽。

(b) 抗血清的制备

将合成短肽以 PBS 溶解后, 1:1 加 Freund's 完全佐剂, 乳化后分别以 25ug 及 10ug 的剂量免疫日本长耳大白兔及 Balb/c 小鼠, 共 3 次。于最后一次免疫的第 14 天, 处死动物, 取抗短肽的兔抗血清及鼠抗血清。

实施例 2

抗短肽抗血清对重组 HPV16 L1 反应性的 Western Blot 检测

表达重组 HPV16 L1 的 sf9 细胞由中国医学科学院基础医学研究所获得。

将表达重组 HPV16 L1 的 sf9 培养细胞的裂解液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将电泳后的凝胶转移至硝酸纤维素膜, 再以兔或小鼠的抗短肽抗血清为一抗与之进行反应。结果, 小鼠及兔的短肽免疫抗血清能使表达重组 HPV16 L1 的 sf9 培养细胞裂解液电泳泳道上, 在 56KD 的位置上出现特异性的反应条带 (图 1)。

实施例 3

抗短肽抗血清对含 HPV 病毒培养细胞反应性的 ELISA 检测及 Western Blot 检测

含 HPV16 病毒的 Caski 细胞和含 HPV18 病毒的 HeLa 细胞购自武汉大学中国细胞保藏中心。进口 HRP 标记及荧光标记二抗购于北京中山生物技术有限公司(sigma 产品)。

分别将含 HPV16 病毒的 Caski 培养细胞及含 HPV18 的 HeLa 培养细胞裂解液包被塑料板, 以兔或小鼠的抗短肽抗血清为一抗与之进行反应。结果, 小鼠及兔的抗短肽抗血清能使 Caski 培养细胞及 HeLa 培养细胞裂解液包被的塑料板呈现阳性反应 (图 2)。

将含 HPV16 病毒的 Caski 培养细胞及含 HPV18 的 HeLa 培养细胞的裂解液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将电泳后的凝胶转移至硝酸纤维素膜, 再以兔或小鼠的抗短肽抗血清为一抗与之进行反应。结果, 小鼠及兔的短肽免疫抗血清能使 Caski 培养细胞及 HeLa 培养细胞裂解液电泳泳道上, 在 56KD 的位置上出现特异性的反应条带 (图 3)。

实施例 4

抗短肽抗血清对 PCR 鉴定 HPV 阳性临床标本反应性的 ELISA 检测

分别将经 PCR 鉴定的临床标本中筛选出的 HPV6、11、16、18 四种主要 HPV 型别及除此以外的其他型别的 5 种类型的标本进行裂解，将裂解液包被塑料板，以兔或小鼠的抗短肽抗血清与之进行反应。结果，小鼠及兔的短肽免疫抗血清，能使标本裂解液包被的塑料板呈现阳性反应（图 4）。

实施例 5

抗短肽抗血清对 HPV 阳性临床标本反应性的 Western Blot 检测

分别将经 PCR 鉴定的临床标本中筛选出的 HPV6、11、16、18 四种主要 HPV 型别及除此以外的其他型别的 5 种类型的标本进行裂解，裂解液作 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳，转膜后以兔抗短肽抗血清作一抗，结果于蛋白分子量约为 56K 的区间，均可见有一条阳性反应带（图 5）。

实施例 6

抗短肽抗血清对 HPV 阳性临床标本反应性的免疫组织化学检测

将临床病理检验为肿瘤，或尖锐湿疣的病理组织进行 PCR 鉴定，取 PCR 鉴定为 HPV6，11，16，和 18 阳性的进行反应。结果抗短肽抗血清可使 HPV6，11 阳性的尖锐湿疣组织内的一些细胞的胞质内呈现阳性反应，可见阳性反应仅出现于胞浆之内，胞质被染成棕黄色，胞核透亮，呈负染状态，反应越近表层越强，角化层反应最强。抗血清可使 HPV16，18 阳性的病变组织内的一些细胞出现阳性反应，反应常呈巢状，阳性细胞与阴性细胞分界明显，胞质内反应强（图 6，7）。

实施例 7

（a）短肽序列内的小肽合成

由吉尔生化（上海）有限公司以上述短肽氨基酸序列为基础、合成 15 个氨基酸残基长、相互错开 5 个氨基酸残基的 4 个小肽，序列分别为：EVNLKEKFSADLDQF，EKFSADLDQFPLGRK，DLDQFPLGRKFLLQA 和 PLGRKFLLQAGLKAK（以下简称为：EF、EK、DA、PK）。

（b）抗血清的制备

按实施例 1 的方法取得上述 4 个小肽的抗血清。

实施例 8

短肽内优势表位的 ELISA 试验确定

以上述 4 个小肽包被塑料板，以抗短肽抗血清（1:100）作为一抗与之结合，检测抗短肽抗血清与包被在塑料板上的小肽的反应能力，通过对 4 个小肽反应能力，确定短肽内的优势表位存在的区段。结果显示，抗短肽抗血清对 4 个小肽的反应强度基本相近，仅对 EK 区段的小肽反应稍强，平均反应强度仅为 12.8%。说明短肽内表位分布相对比较均衡，没有明显的优势线性表位，短肽内可能有独立的构象表位（图 8）。

实施例 9

4 个小肽对抗短肽抗血清封闭效能的 ELISA 检测

以短肽包被塑料板，以 4 个小肽与抗短肽抗血清（2:900）共同孵育，37℃封闭 1h 后作为一抗，检测抗短肽抗血清与包被在塑料板上的短肽的反应能力，通过 4 个小肽对抗短肽抗血清的封闭效应，确定短肽内的优势表位。结果 4 个小肽对抗短肽抗血清的封闭效应基本相近，仅 EK 区段的小肽封闭作用稍强，平均封闭效能约为 33.6%。这也说明短肽内表位分布相对比较均衡，没有明显的优势线性表位（图 9）。

氨基酸序列表

GAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGCAAATT
TTTACTACAAGCAGGATTGAAGGCCAAA

HPV L1.seq.txt

Organization Applicant

Street : 大学路8号
City : 宜昌
State : 湖北
Country : 中国
PostalCode : 443002
PhoneNumber : 13972605871
FaxNumber : 0717-6252960
EmailAddress : xiaochy@ctgu.edu.cn
<110> OrganizationName : 三峡大学

Application Project

<120> Title : 人乳头瘤病毒外壳蛋白L1短肽及其应用
<130> AppFileReference : 071203

Sequence

<211> Length : 90
SequenceName : HPV L1 DNA氨基酸序列
<212> Type : DNA
<213> OrganismName : 人乳头瘤病毒(Human Papillomavirus)

<400> PreSequenceString :
GAAGTAAATT TAAAGGAAAA GTTTTCTGCA GACCTAGATC AGTTTCCTTT AGGACGCAAA 60
TTTTTACTAC AAGCAGGATT GAAGGCCAAA 90

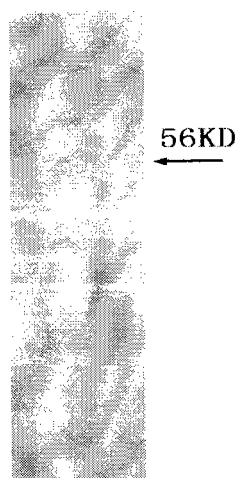


图 1

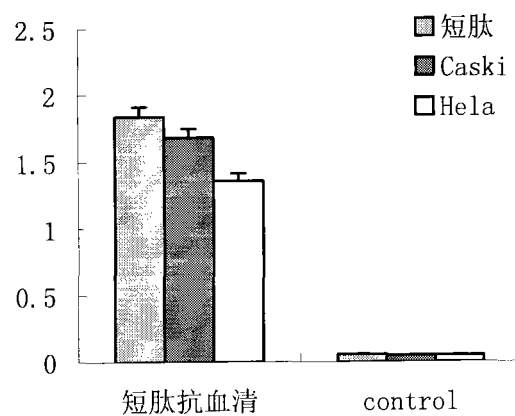


图 2

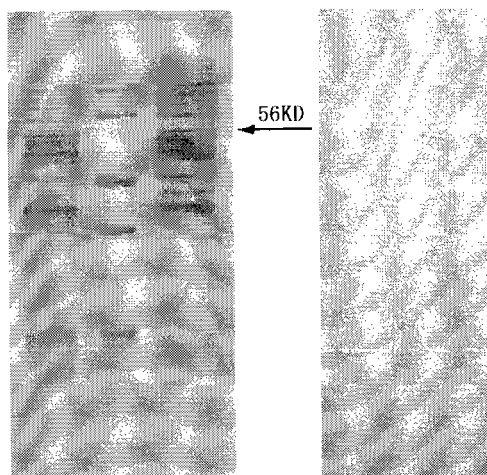


图 3

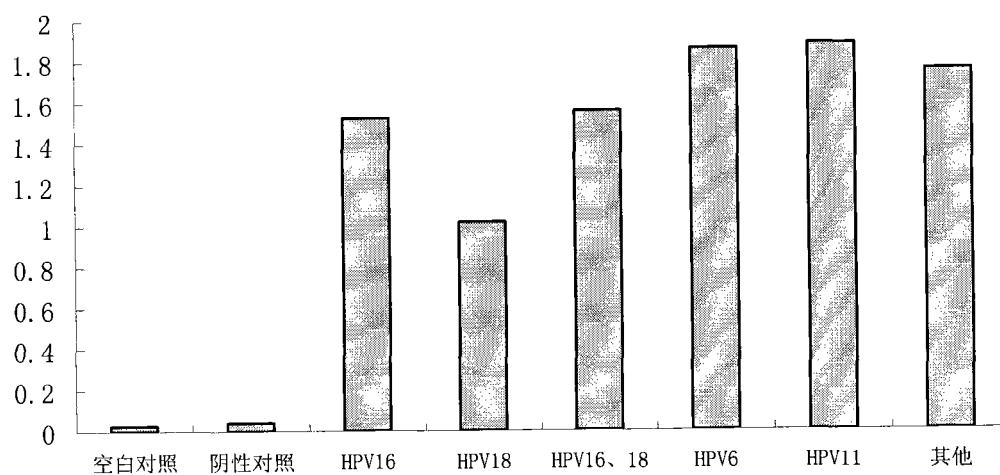


图 4

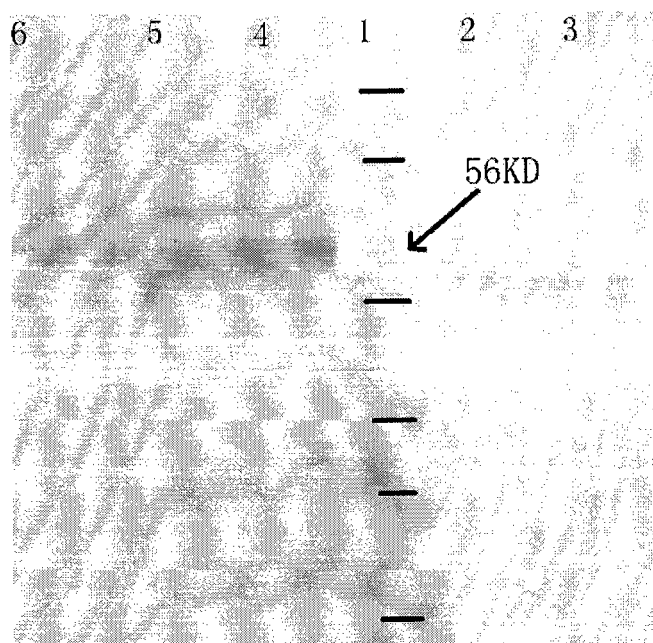


图 5

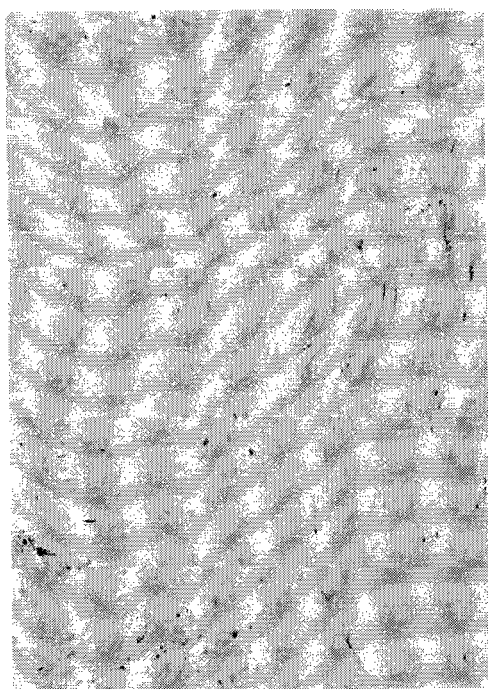


图 6

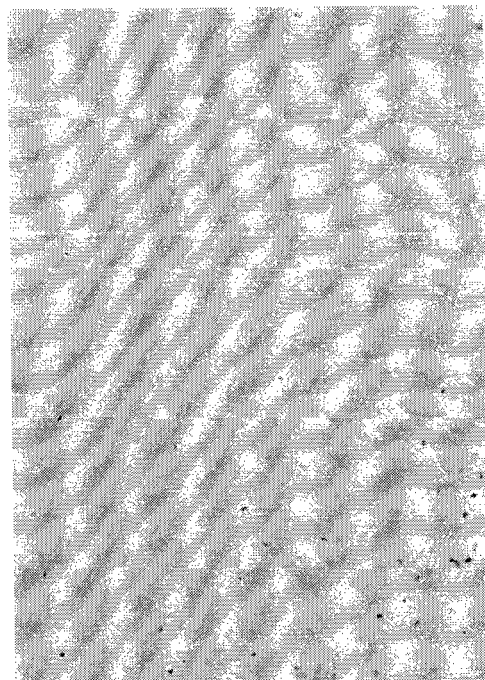


图 7

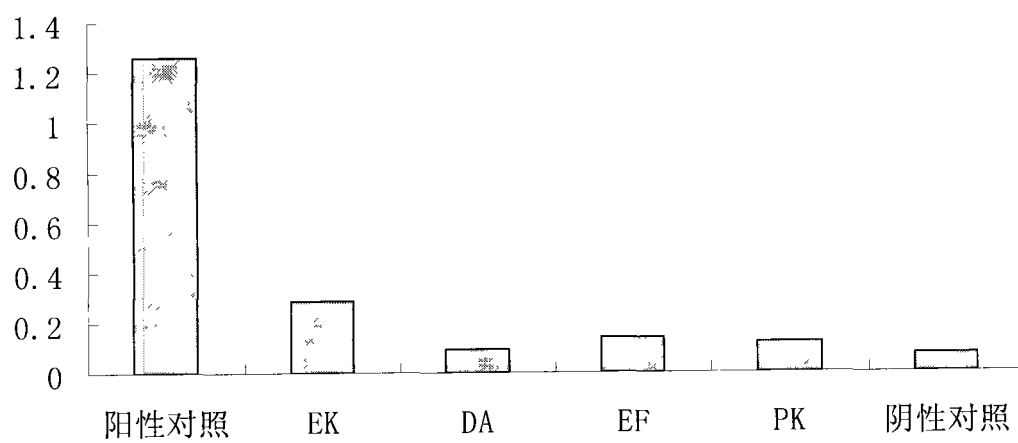


图 8

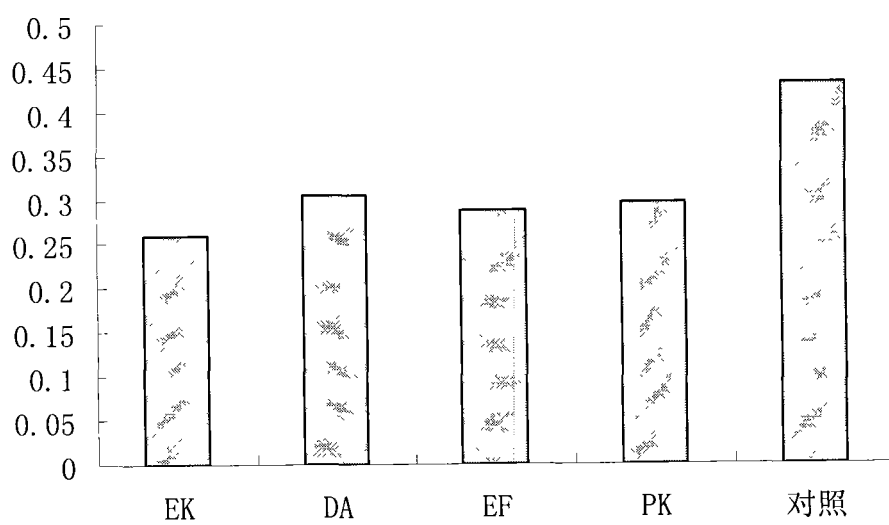


图 9

专利名称(译)	人乳头瘤病毒外壳蛋白L1短肽及其应用		
公开(公告)号	CN101186636A	公开(公告)日	2008-05-28
申请号	CN200710168713.9	申请日	2007-12-06
[标]申请(专利权)人(译)	三峡大学		
申请(专利权)人(译)	三峡大学		
当前申请(专利权)人(译)	三峡大学		
[标]发明人	肖长义 万涛 黄利鸣		
发明人	肖长义 万涛 黄利鸣		
IPC分类号	C07K14/025 C07K16/06 C07K16/28 G01N33/531 G01N33/577 G01N33/543		
代理人(译)	成钢		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种多肽，具体地说是一种人乳头瘤病毒外壳蛋白L1短肽及其应用。其特征是：该人乳头瘤病毒外壳蛋白L1短肽的序列为：N端 - EVNLKEKFSADLDQFPLGRKFLLQAGLKAK - C端。本发明能够同时诱导对高危型和低危型均能产生免疫反应的人乳头瘤病毒外壳蛋白L1短肽，它可以诱导形成针对多种型别人乳头瘤病毒(HPV)和外壳蛋白(HPVL1)的抗体，以便用于多种型别HPV或HPV L1的检测，这种抗体还可用于生物制药工程，用于多种型别HPV或HPV L1的纯化、制备。

