

## Research Paper

## 研究报告

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
49 (11) :1527 - 1533; 4 November 2009  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 大肠杆菌来源的人乳头瘤病毒 11 型病毒样颗粒的制备及其免疫原性

杨春燕, 李少伟, 王晋, 魏<sup>彗</sup>希, 黄博, 庄玉娣, 李仲艺, 潘晖榕, 张军\*, 夏宁邵

(厦门大学生命科学学院, 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

**摘要:**【目的】利用大肠杆菌表达系统制备人乳头瘤病毒 11 型病毒样颗粒 (HPV11 VLPs), 并对其免疫原性和所诱导中和抗体的型交叉反应性进行研究。【方法】在大肠杆菌 ER2566 中非融合表达 HPV11-L1 蛋白, 并通过离子交换层析, 疏水相互作用层析其进行纯化。纯化后的 HPV11-L1 经体外组装形成病毒样颗粒, 通过动态光散射, 透射电镜检测其形态, 并通过多种 HPV 型别假病毒中和实验评价 HPV11 VLPs 的免疫原性及型交叉反应性。【结果】HPV11-L1 蛋白在大肠杆菌中可以以可溶形式表达。经过硫酸铵沉淀、离子交换和疏水相互作用色谱纯化, 目的蛋白纯度能够达到 95% 以上。纯化的 HPV11-L1 蛋白去除还原剂 DTT 后, 能够在体外自发组装成为直径约 50 nm、与天然病毒颗粒形态高度相似的 VLPs。动物实验结果显示, 该病毒样颗粒在小鼠体内的中和抗体半数有效剂量 ( $ED_{50}$ ) 为 0.031  $\mu\text{g}$ , 在小鼠体内可诱导高达  $10^6$  的中和抗体滴度, 这些中和抗体与 HPV6 有较好的交叉反应, 与 HPV18 有一定的交叉反应, 而与 HPV16 没有明显的交叉反应, 这一结果与分子进化树的分析相一致。【结论】本研究利用原核表达系统获得了具有较高免疫原性的 HPV11 VLPs, 为 HPV11 预防性疫苗的研制奠定了良好的基础。

**关键词:** 人乳头瘤病毒 11 型; 大肠杆菌表达系统; 病毒样颗粒; 免疫原性; 型交叉中和

**中图分类号:** R37      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2009) 11-1527-07

人乳头瘤病毒 HPV (Human Papillomavirus, HPV) 属乳头瘤病毒科 (Papovaviridae) 乳头瘤病毒属, 为无包膜 DNA 病毒, 主要引起人类皮肤粘膜的增生性病变。高危型 HPV (如 HPV16, 18) 等主要引起宫颈癌等生殖器部位的恶性病变。低危型 HPV 感染主要引起皮肤、粘膜的良性疣状病变, 其中尖锐湿疣是仅次于衣原体感染和滴虫病而居于第三位常见的性传播疾病。流行病学和相关研究表明, 90% 的尖锐湿疣主要由 HPV6, 11 的感染引起<sup>[1]</sup>。因此, 研制安

全、有效的 HPV11 预防性疫苗可大大减少尖锐湿疣的发病率, 具有良好的社会及经济效益。

由于 HPV 具有严格的种属特异性且其增殖严格依赖于宿主细胞的分化状态, 使得其难以在体外培养。目前仅有少数几种 HPV 能够通过裸鼠组织移植等复杂手段进行增殖<sup>[2]</sup>。这就使得传统的灭活及减毒疫苗形式难以开展。因此, HPV 疫苗研究的重点为基因工程疫苗, 其中, 病毒样颗粒 (Virus-like Particle, VLP) 由于具有免疫原性好、不带病毒基因

基金项目: 国家“863 计划”——国家高技术研究发展计划重点项目 (2006AA020905); 国家自然科学基金 (30500092); 科技部工程中心建设项目 (2005DC105006); 教育部新世纪优秀人才培养计划 (NCEF05-0567)

\*通信作者。Tel: +86-592-2184110; Fax: +86-592-2181285; E-mail: zhangj@xmu.edu.cn

作者简介: 杨春燕 (1983-), 女, 福建厦门人, 博士研究生, 从事分子病毒学方面的研究。E-mail: yangchunyan@xmu.edu.cn

收稿日期: 2009-04-13; 修回日期: 2009-06-11

组而成为 HPV 疫苗的主要形式<sup>[3]</sup>。已上市的 HPV 疫苗 Gardasil 以及 Cervarix 均为 VLP 疫苗。

本研究采用大肠杆菌表达系统高效可溶性表达了 HPV11 的 L1 蛋白,经离子交换层析、疏水相互作用层析等步骤纯化后,能够在体外自组装为具有良好免疫原性的 VLP,这为开发基于 HPV11 VLP 的预防性疫苗奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司,所采用的 Taq 酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司。蛋白分子量 Marker 购自 PIERCE 公司。本研究中所采用的 FPLC 层析系统及层析介质均为美国 GE 公司产品。CENTRASSETTE 5 切向流系统为 PALL 公司产品,膜包截留分子量为 30 kDa。DynaPro MS/X 型动态光散射仪(含温度控制器)为美国 Protein Solutions 公司产品。JEM2100 透射电镜为日本电子株式会社产品。EPICS XL 型流式细胞仪为美国 BeckmanCoulter 公司产品。动物实验所用的 SPF 级 BAL B/c 小鼠,购自厦门大学抗癌中心。

**1.1.2 载体:** pTO-T7 原核表达载体由本实验室构建<sup>[4]</sup>。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5、ER2566 均为本室保存。针对 HPV6,11,16 共有线性表位的单抗 D9 由 Christensen 博士惠赠。用于 HPV11 假病毒构建的质粒 p11L1h、p11L2h 由 Schiller 教授惠赠。

### 1.2 HPV11-L1 全长基因的合成

参考 NCBI 的 GenBank 数据库,根据 AF335603.1 序列合成 HPV11-L1 全长基因,基因合成工作由上海英骏生物技术有限公司完成。

### 1.3 非融合表达质粒 pTO-T7-HPV11-L1 的构建

**1.3.1 引物:** 根据 HPV11L1 基因序列设计。正向引物 H11NF: 5'-AGTATCTCATATGTGGCGCCTAGCGAC-3'; 反向引物 H11CR: 5'-ACTGGTTCGACTTACTTICTGGTTTTGGTACG-3'。其中正反引物分别引入 *Nde*I 和 *Sal*I 酶切位点(以下划线表示)。

**1.3.2 PCR 扩增:** 以所合成的 HPV11-L1 基因全长为模板进行 PCR 扩增,扩增条件:95 预变性 5 min 后进入 PCR 循环,循环参数分别为:95 变性 1 min,57 退火 1 min,72 延伸 1 min,共 25 个循环;最后于 72 延伸 10 min。

**1.3.3 克隆和测序:** 以 2% 琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 片段并插入 pMD18-T 载体中,获得亚克隆

pMD18-T-HPV11-L1。*Nde*I/*Sal*I 双酶切处理 pMD18-T-HPV11-L1 获得 HPV11-L1 基因片段,将其接入同样处理的 pTO-T7 载体,获得 pTO-T7-HPV11-L1 重组非融合表达载体,目的基因经测序(上海生工)确认无误。

### 1.4 HPV11-L1 的表达与纯化

取 1  $\mu$ L 的 pTO-T7-HPV11-L1 质粒(0.15 mg/mL)转化 40  $\mu$ L 感受态大肠杆菌 ER2566 进行表达,当  $OD_{600}$  值达 0.5 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L,25 诱导培养 8 h。以 1/10 培养基体积的裂解液(20 mmol/L Tris 缓冲液 pH7.2,150 mmol/L NaCl)重悬离心收集的菌体进行超声破碎处理,离心获得菌体裂解上清。往菌体裂解上清中缓慢加入饱和硫酸铵至终浓度 30%,于 4 静置 4 h 以上,离心收集沉淀。沉淀重悬液经 0.22  $\mu$ m 孔径滤膜过滤后,在 AKTA explorer 100 型快速液相色谱仪上进行 CM Sepharose 4 Fast Flow 阳离子交换色谱纯化,以含 500 mmol/L NaCl 的缓冲液洗脱杂蛋白,800 mmol/L NaCl 缓冲液洗脱目的蛋白。洗脱的目的蛋白补充 NaCl 至终浓度为 2 mol/L,进行 Butyl Sepharose 4 Fast Flow 疏水相互作用色谱纯化,以含 20 mmol/L NaCl 的缓冲液洗脱目的蛋白。将上述表达纯化过程中留取样品进行 SDS-PAGE 及 Western blotting 检测,在 Western blotting 检测中所使用的一抗为针对 HPV6,11,16 共有线性表位的单抗 D9。

### 1.5 HPV11 VLPs 病毒样颗粒的组装

在 HPV11-L1 纯化样品中补充 DTT 至终浓度为 100 mmol/L,37 充分作用 2 h 以上。切向流系统(PALL 公司)将样品中的缓冲液更换为 PBS,交换体积为样品体积的 10 倍,充分除去样品中的 DTT,使得目的蛋白自行组装为 VLPs。

### 1.6 HPV11 VLPs 的形态学检测

**1.6.1 动态光散射分析:** HPV11 VLPs 样品经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤后,使用动态光散射仪进行测量,使用算法为 Regulation 算法。

**1.6.2 透射电镜观察:** HPV11 VLPs 经 2% 磷钨酸 pH7.0 负染,固定于喷炭的铜网上。设定放大倍率为 25000 倍,在电镜下观察颗粒。

### 1.7 HPV11 VLPs 的免疫原性分析

**1.7.1 HPV11 VLP 中和抗体滴度的检测:** 以假病毒中和细胞模型实验<sup>[5]</sup>评估 HPV11 抗血清的中和能力。将 293FT 细胞(Invitrogen)铺于 96 孔细胞培养板中( $1.5 \times 10^4$ /孔)。5 h 后进行中和实验,将待测的血清样品分别用 10% DMEM 进行连续倍比稀释,然

后取 50 μL 分别与 50 μL 稀释于 10% DMEM 的 HPV11 假病毒液 (moi = 0.1) 混合, HPV11 假病毒制备方法参见文献<sup>[5]</sup>。将上述混合物 4 孵育 1 h 后分别加入预铺有 293FT 细胞的 96 孔细胞培养板中, 37 培养 72 h 后先用荧光观察确定各样品大概的中和滴度, 再用流式细胞仪检测各孔细胞的感染率, 计算单抗或多抗血清的准确中和滴度。感染率为细胞样品在阳性区中的细胞数量百分率减去未感染的对照细胞样品在阳性区的数量百分率。

感染抑制率 = (1 - 阻断孔的感染率/未阻断孔的感染率) × 100 %。

抗体中和滴度的定义为: 达到高于 50% 感染抑制率的最大稀释倍数。经 50 倍稀释后能达到 50% 以上感染抑制率的单抗或多抗被视为具有中和能力。

**1.7.2 HPV11-L1 VLP 免疫小鼠实验:** (1) 小鼠半数有效剂量 (ED<sub>50</sub>) 测定: 实验动物为经上述中和实验鉴定其血清无中和能力的 3~4 周龄的雌性 BAL B/c 小鼠, HPV11 VLPs 与自制的铝佐剂混合, 起始剂量为 0.100 μg/只, 3 倍滴度稀释, 共 4 个剂量组, 每组 10 只小鼠, 免疫方式为单次腹腔注射, 5 周时抽取外周静脉血, 分离血清, 按上述方法进行检测, 100 倍稀释血清的具有中和能力的判定为阳性, 按照 Reed-Muench 法进行半数有效剂量 (ED<sub>50</sub>) 的计算。(2) 小鼠中和抗体生成水平和 HPV6/11/16/18 型交叉能力测定: 实验动物为经上述中和实验鉴定其血清无中和能力的 3~4 周龄的雌性 BAL B/c 小鼠。将制备的 HPV11 VLPs 与等量福氏完全佐剂混合进行初次免疫, 而后用 HPV11 VLPs 与等量福氏不完全佐剂混合后加强免疫, 免疫方式为皮下、足底注射, 初次免疫剂量为 100 μg/只, 此后分别于 2、4 周各加强一次, 加强免疫剂量为 100 μg/只。免疫后, 每周抽取外周静脉血, 分离血清, 通过假病毒中和细胞模型实验评估小鼠免疫血清对 HPV6/11/16/18 四种假病毒的中和能力。

**1.8 HPV6、11、16、18、33、45、52、58 八个型别 L1 氨基酸序列的进化树分析**

利用 GCG 软件包 (licensed No. 85852, Accelrys Inc.) 中的 CLUSTAL W 程序绘制 HPV L1 蛋白的分子进化树。选分子流行病学调查中最为常见的 HPV 型别, 根据如下序列 HPV6 (AF092932.1), HPV11 (AF335603.1), HPV16 (AF472508.1), HPV18 (AY262282.1), HPV33 (M12732.1), HPV45 (X74479.1), HPV52 (X74481.1), HPV58

(D90400.1), 将 8 个 HPV 型别的 L1 蛋白氨基酸序列进行多序列比对, 根据序列比对的结果采用距离依靠法 (distance methods) 中的邻位相连法 (Neighbor-joining) 构建进化树, 先采用 Kimura protein distance 计算修正进化距离, 而后用邻位相连法构建进化树, 计算过程中的其余设置均为 GCG 的默认参数, 进化树枝条的长度代表着进化距离, 即每 100 个氨基酸中出现的差异数。

**2 结果**

**2.1 HPV11-L1 的表达与纯化**

如图 1 所示, 诱导表达的 HPV11 L1 蛋白呈现为包涵体 (Lane 1) 和可溶性 (Lane 2) 两种形式, 大小约为 55 kDa, 包涵体的表达量是可溶性形式的 5 倍左右。由于包涵体形式经盐酸胍或尿素变性后组装成为 VLPs 的效率极低 (结果未显示), 本研究主要以可溶性形式进行纯化, 经过硫酸铵沉淀后目的蛋白纯度有明显的提高 (Lane 3), 再经过阳离子交换 (Lane 5) 和疏水相互作用色谱 (Lane 6) 纯化后, 纯度大于 95%。获得的纯化样品具有良好的溶解性, 可用于进一步的 VLPs 自组装实验。

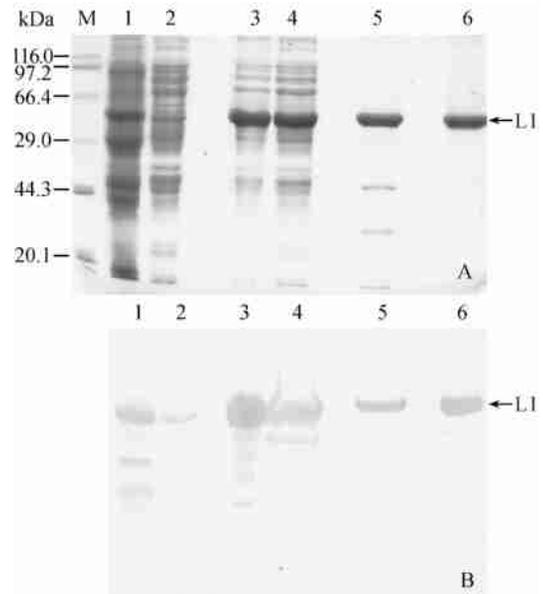


图 1 HPV11-L1 的 SDS-PAGE (A) 和 Western blot (B) 分析

Fig. 1 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of expression and purification of HPV11-L1. A, 10% reduced SDS-PAGE; B, Western blotting with D9 monoclonal antibody; M, Protein Molecular Weight mark; 1, Cell lysate precipitation; 2, Cell lysate supernatant; 3, Ammonium sulfate precipitation; 4, Sample for CM chromatography; 5, Interest fraction of CM chromatography; 6, Interest fraction of Butyl chromatography.

### 2.2 HPV11 VLPs 的形态学检测

动态光散射分析结果 (图 2) 显示, 自组装的 HPV11 VLPs 呈现为单一组分, 颗粒的强度分布比例为 100%, 未见其他未组装的单体或中间态组分, 水化分子动力学半径约为 30 nm, 分散度为 17.7%。

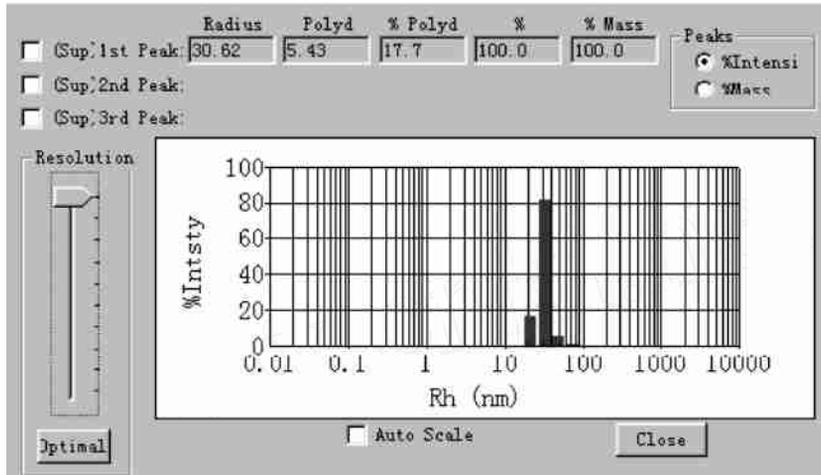


图 2 HPV11 病毒样颗粒的动态光散射分析

Fig. 2 Dynamic light scattering analysis of HPV11L1 VLPs.

提示 HPV11 L1 自组装的效率接近 100%, 颗粒均一, 大小与 HPV11 天然病毒颗粒的半径相近。

透射电镜观察结果见图 3, 视野中可见大量直径为 50 nm 左右的空心球状颗粒, 颗粒大小与天然 HPV 病毒大小相符, 均匀一致。

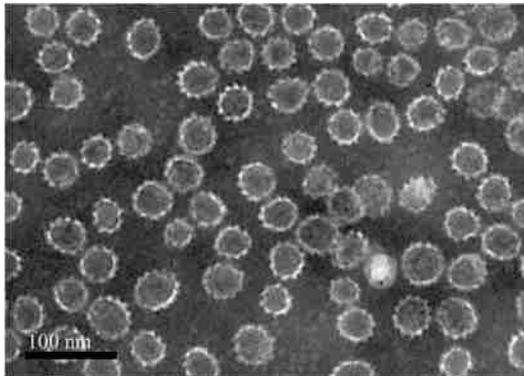


图 3 HPV11-L1 VLP 透射电镜观察 (25000 ×)

Fig. 3 Transmission Electron Micrograph of HPV11L1 VLPs (25000 ×).

### 2.3 HPV11 VLPs 免疫原性分析

2.3.1 HPV11 VLPs 的半数有效剂量测定: 实验结果如表 1, 0.100 μg 的剂量可使 80% 的小鼠中和抗体阳转, 0.004 μg 的剂量未能诱发小鼠中和抗体阳转, 0.011 μg 和 0.033 μg 剂量的阳转率分别为 6% 和 60%, Reed-Muench 法计算的 ED<sub>50</sub> 值为 0.031 μg, 提示本研究获得的 HPV11 VLPs 具有较好的免疫原性。

2.3.2 HPV11 VLPs 诱发小鼠的抗体生成水平及型交叉中和反应分析

如图 4 所示, 在初免 4 周后, 中和抗体滴度即有明显上升, 经过第二次加强免疫后, 中和抗体的滴度即能达到较高水平, 第 7 周中和抗体水平达到最高, 平均中和滴度为 10<sup>6</sup>。

表 1 HPV11 VLPs 在小鼠体内诱发中和抗体生成的半数有效剂量 (ED<sub>50</sub>)

Table 1 Half-Effective Dose (ED<sub>50</sub>) of HPV11 VLPs in mice

Dose /μg	Positive	Total	Rate of Seroconversion/ %	ED <sub>50</sub> /μg
0.100	8	10	80	
0.033	6	10	60	
0.011	1	10	6	0.031
0.004	0	10	0	
0.000	0	10	—	

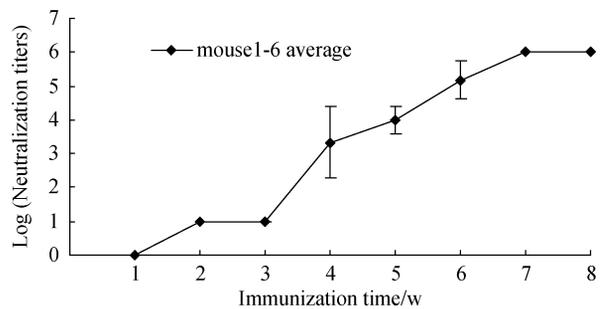


图 4 HPV11 VLP 免疫小鼠后不同阶段血清中和抗体滴度

Fig. 4 Neutralizing antibody titers of antiserum after vaccination.

将中和抗体滴度最高的小鼠系列血清进行 HPV16/18/6/11 四种型的中和滴度分析, 结果如图 5 所示, HPV11 抗血清对 HPV6 的交叉反应比较明显, HPV18 次之, 而 HPV16 则完全没有交叉反应。8 种型别 HPV (6, 11, 16, 18, 33, 45, 52, 58 等) L1 氨基酸序

列进化树分析结果如图 6 所示, HPV11 与 HPV6 的亲缘关系最近, 与 HPV18 次之, 与 HPV16 的亲缘关系较远, 提示 HPV11 VLPs 诱导中和抗体的型交叉反应性与氨基酸的序列同源性相关。

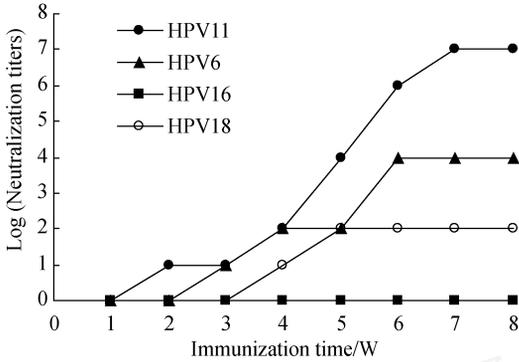


图 5 HPV11 VLP 抗血清对 HPV6, HPV16, HPV18 的 VLP 的交叉中和滴度

Fig. 5 Cross-neutralization titer of anti-HPV11 VLP serum to HPV 6/16/18 VLP.

### 3 讨论

在 HPV VLP 疫苗的研制中, 如何以最简便高效的方式制备结构完整、免疫原性强的 VLP 是所有问题的关键。目前已上市的 HPV 疫苗均为真核表达系统所制备。其中 Merck 的 Gardasil 采用了酿酒酵母表达系统<sup>[6-7]</sup>, GSK 的 Cervarix 采用昆虫杆状病毒表达系统<sup>[8]</sup>。采用真核表达系统所表达的 HPV L1

蛋白可较好地保留了天然的构象和活性, 可以在胞内自发形成 VLP, 从而使得后续的生产工艺避开了繁琐而低效蛋白体外复性步骤<sup>[9-10]</sup>。但是由于真核表达系统产量低, 生产成本高使得该系统来源的 HPV 疫苗成本高昂, 限制了其在第三世界国家中的推广应用。

大肠表达系统是最早应用于基因制药的表达系统, 具有安全、高效、成本低廉的特点。若能够将大肠杆菌表达系统应用于 HPV 疫苗的生产中, 将使得 HPV 疫苗的生产成本大大降低。本研究尝试建立一套基于大肠杆菌表达系统的 HPV VLP 高效表达纯化工艺, 为 HPV11 预防性疫苗开发奠定基础。大肠杆菌表达系统应用于 HPV VLP 疫苗生产所面临的主要问题在于大肠杆菌中所表达的 L1 蛋白大多以不溶性包涵体形式存在, 失去了天然构象, 无法诱导有效的中和抗体。若经过包涵体体外复性, 颗粒体外重组步骤, 则大部分蛋白无法恢复正确构象。因此, 可溶性表达非融合的 HPV-L1 蛋白成为将大肠杆菌表达系统应用于 HPV 疫苗生产的关键问题。本研究采用了高效的非融合原核表达载体的 pTO-T7 并于低温 (25 ) 表达。pTO-T7 载体的调控序列中有增强子 序列以及强启动子 T7 启动子, 以上两个序列呈串连排列, 从而大大的增强目的蛋白在大肠杆菌上清中的表达<sup>[4]</sup>。低温有助于减慢目的蛋白的表达速度, 从而有助于目的蛋白进行正确折叠, 增加其可溶性表达。

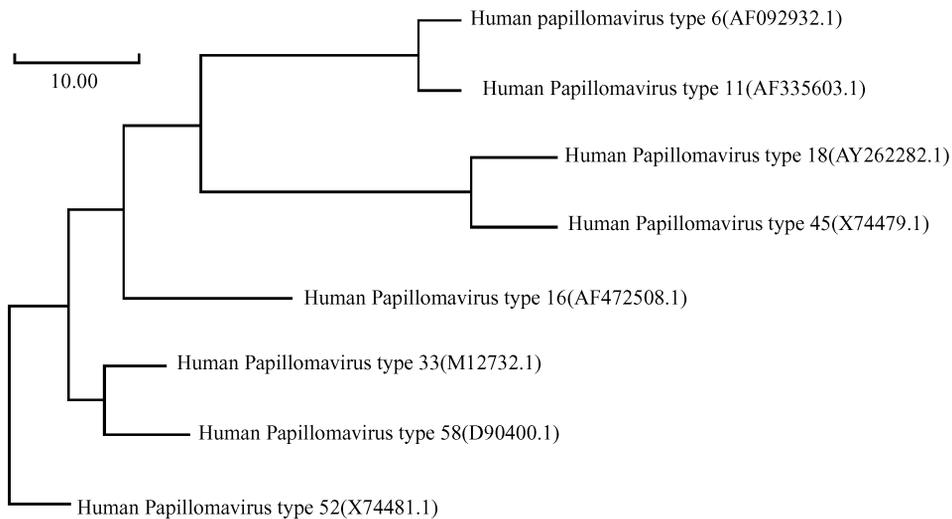


图 6 GCG 绘制的八型 HPV L1 序列进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of L1 sequences of eight HPV types produced by CCG software.

The GenBank accession number of L1 sequences of HPV types in GenBank was shown in parentheses. The length of each branch indicates the evolutionary distances between different L1 sequences. Bar, 10 substitutions per 100 residues.

由于目的蛋白在细胞裂解上清中含量较低,因此本研究采用了硫酸铵沉淀的方法对目的蛋白进行了浓缩富集。而后,利用相应的缓冲液使得目的蛋白重新溶解,进行下一步的色谱纯化。该过程是一温和过程,并未使用尿素,SDS等强烈的变性剂,从而使得目的蛋白维持了天然构象,减少了因为目的蛋白变性而带来的损失,有利于后续的色谱纯化。经过色谱纯化,目的蛋白的纯度可达95%,两步色谱纯化可有效地去除样品中的核酸和内毒素等杂质(分析结果未显示)。颗粒组装过程中,无明显的蛋白损失,组装获得的HPV11-L1 VLPs结构完整,颗粒均一。这些纯化和重组装过程均可线性放大,为疫苗的研制和大规模生产提供了参考工艺,具有很好的疫苗应用前景。

HPV表面有多个免疫优势表位,HPV的VLP免疫后能诱导针对病毒表面多个中和表位的抗体反应<sup>[11-12]</sup>,使得VLP免疫后的多抗血清能中和同型病毒的不同突变株<sup>[13]</sup>。本研究的假病毒中和试验结果表明,本研究得到的HPV11 VLPs可在小鼠体内诱导产生高滴度的中和抗体。本研究还进一步发现,HPV11 VLPs诱导产生的抗体对HPV6和HPV18假病毒也具有一定的中和能力,其中以HPV6假病毒的交叉中和活性最高。由进化树分析结果可知,HPV11与HPV6的同源性高达90%,且二者的VLPs有较多相同的中和表位。因此,本研究的HPV11 VLPs也可用于交叉中和表位的研究,为HPV型别差异和分子进化证据的研究提供素材。

## 参考文献

- [1] Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH, et al. Incidence and duration of cervical human papillomavirus 6, 11, 16, and 18 infections in young women: an evaluation from multiple analytic perspectives. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention*, 2007, 16(4): 709 - 715.
- [2] Roden RB, Greenstone HL, Kirnbauer R, et al. In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *Journal of Virology*, 1996, 70(9): 5875 - 5883.
- [3] Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, et al. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*, 1991, 185(1): 251 - 257.
- [4] 罗文新, 张军, 杨海杰, 等. 一种带增强子的原核高效表达载体的构建及初步应用. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2000, 16: 578 - 581.
- [5] 卢五迅, 程通, 李少伟, 等. 人乳头瘤病毒16型假病毒中和实验的建立和初步应用. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2006, 22(6): 990 - 995.
- [6] Ruiz W, McClements WL, Jansen KU, et al. Kinetics and isotype profile of antibody responses in rhesus macaques induced following vaccination with HPV 6, 11, 16 and 18 L1-virus-like particles formulated with or without Merck aluminum adjuvant. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines*, 2005, 3(1): 2.
- [7] Villa LL, Costa RL, Petta CA, et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *British Journal of Cancer*, 2006, 95(11): 1459 - 1466.
- [8] Harper DM, Franco EL, Wheeler C, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2004, 364(9447): 1757 - 1765.
- [9] Rose RC, Reichman RC, Bonnez W. Human papillomavirus (HPV) type 11 recombinant virus-like particles induce the formation of neutralizing antibodies and detect HPV-specific antibodies in human sera. *Journal of General Virology*, 1994, 75(8): 2075 - 2079.
- [10] Cook JC, Joyce JG, George HA, et al. Purification of virus-like particles of recombinant human papillomavirus type 11 major capsid protein L1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification*, 1999, 17(3): 477 - 484.
- [11] Orozco JJ, Carter JJ, Koutsky LA, et al. Humoral immune response recognizes a complex set of epitopes on human papillomavirus type 6 L1 capsomers. *Journal of Virology*, 2005, 79(15): 9503 - 9514.
- [12] Carter JJ, Wipf GC, Madeleine MM, et al. Identification of human papillomavirus type 16 L1 surface loops required for neutralization by human sera. *Journal of Virology*, 2006, 80(10): 4664 - 4672.
- [13] Da Silva DM, Pastrana DV, Schiller JT, et al. Effect of preexisting neutralizing antibodies on the anti-tumor immune response induced by chimeric human papillomavirus virus-like particle vaccines. *Virology*, 2001, 290(2): 350 - 360.

## Expression, purification and immunogenicity of human papillomavirus type 11 virus-like particles from *Escherichia coli*

Chunyan Yan, Shaowei Li, Jin Wang, Minxi Wei, Bo Huang, Yudi Zhuang, Zhongyi Li, Huirong Pan, Jun Zhang\*, Ningshao Xia

(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in infectious diseases, Life Science School, Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] To produce human papillomavirus type 11 virus-like particles (HPV11 VLPs) from *Escherichia coli* and to investigate its immunogenicity and type cross neutralization nature. [ **Methods** ] We expressed the major capsid protein of HPV11 (HPV11-L1) in *Escherichia coli* ER2566 in non fusion fashion and purified by amino sulfate precipitation, ion-exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography, sequentially. Then we removed the reductant DTT to have the purified HPV11-L1 self-assemble into VLPs *in vitro*. We investigated the morphology of these VLPs with dynamic light scattering and transmission electron microscopy. We assayed the immunogenicity of the resultant HPV11 VLPs by vaccinations on mice and evaluated by HPV6/11/16/18 pseudovirus neutralization cell models. [ **Results** ] We expressed HPV11 L1 in *Escherichia coli* with two forms, soluble and inclusion body. The soluble HPV11 L1 with over 95% purity can self assemble to VLPs in high efficiency. Morphologically, these VLPs were globular, homogeneous and with a diameter of ~ 50 nm, which is quite similar with native HPV11 virions. The half effective dosage ( $ED_{50}$ ) of HPV11 VLPs is 0.031  $\mu\text{g}$ , and the maximum titer of neutralizing antibody elicited is averaged to  $10^6$ . The cross neutralization activity (against HPV6/16/18) of the anti-HPV11 serum was found to have exact correlation to the inter-type homology in amino acid alignment. [ **Conclusion** ] We can provide HPV11 VLPs with highly immunogenicity from prokaryote expression system, which may pave a new way for research and development of prophylactic vaccine for HPV11.

**Keywords:** human papillomavirus type 11; *Escherichia coli*; virus-like particle; immunogenicity; cross neutralization

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA020905), the National Natural Science Foundation of China (30500092), the Project in National Engineering Research Center (2005DC105006) and the Program for New Century Excellent Talents in University (NCEF0500567)

\* Corresponding author. Tel: +86-592-2184110; Fax: +86-592-2181258; E-mail: zhangj@xmu.edu.cn

Received: 13 April 2009/ Revised: 11 June 2009