

# 人乳头瘤病毒 16 型病毒样颗粒的制备及其免疫原性研究

魏旻希, 李少伟, 黄博, 沈文通, 苏永在, 张春华, 顾颖, 杜海莲, 张军, 夏宁邵

(厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心)

生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

**摘要:**利用 PCR 技术从 HPV16 阳性阴道分泌物标本中获得 HPV16 L1 基因片段, 并将其插入表达载体 pTO-T7 中, 构建重组表达质粒 pTO-T7-HPV16-L1; 以该重组质粒转化大肠杆菌 ER2566 并表达 HPV16 L1 蛋白; 所表达的 HPV16 L1 蛋白经过硫酸铵沉淀、离子交换层析和疏水相互作用层析等纯化步骤后, HPV16 L1 纯度达到 98% 以上, 并可在体外装配为直径 50nm 的病毒样颗粒; 动物免疫原性研究结果显示, 该病毒样颗粒可诱导高滴度的针对 HPV16 的中和抗体。上述研究结果表明通过大肠杆菌表达系统制备的 HPV16 病毒样颗粒具有纯度高, 与天然病毒颗粒形态高度相似的特点, 并具有高度免疫原性, 可以应用于 HPV16 病毒样颗粒的结构功能研究及 HPV16 疫苗研发等领域。

**关键词:**人乳头瘤病毒 16 型; 大肠杆菌表达系统; 纯化; 病毒样颗粒; 免疫原性

**中图分类号:**R373.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8721(2009)04-0245-06

人乳头瘤病毒 16 型 (Human Papillomavirus type 16, HPV16) 属于乳头瘤病毒科, 为小双链 DNA 病毒, 可以通过人体间的密切接触传播, 引起肛生殖器粘膜的恶性肿瘤。分子流行病学调查证实, HPV 的持续感染是宫颈癌发生的重要启动因子。在所有宫颈癌标本中 HPV DNA 检出率高达 80% 以上, 而其中仅 HPV16 就占 60% 以上。其它型别的 HPV (如 HPV18、31、45 和 58) 约占 25% ~ 30%<sup>[1]</sup>。因此, 一种安全有效的 HPV16 疫苗可以大大降低妇女中宫颈癌的发病率, 具有良好的市场前景。

由于 HPV16 的体外培养相当困难, 虽然有报道采用角化细胞系培养法可在体外获得 HPV16 病毒颗粒, 但是该方法费时、费力、成本高昂, 无法做到大规模生产<sup>[2]</sup>。此外, 由于 HPV16 病毒基因组中含有病毒癌基因, 具有潜在致癌可能, 因此, 传统的灭活疫苗及减毒疫苗形式无法适用于 HPV16。综合以上考虑, 基因工程重组疫苗成为了当前 HPV16 疫苗研究的主要方向。

利用多种表达系统表达的重组 HPV 主要衣壳蛋白 L1 具有在体外自装配的特性, 能够形成在结构上与天然病毒高度相似的病毒样颗粒 (Virus-like

Particles, VLPs)。VLPs 保留了天然病毒的绝大多数表位, 具有高度免疫原性, 可以诱导高滴度的中和抗体, 是理想的 HPV 疫苗形式<sup>[3-5]</sup>。目前, 已有两种 HPV 疫苗上市, 它们分别是 Merck 的 Gardasil<sup>[6]</sup> 以及 GSK 的 Cervarix<sup>[7]</sup>。这两种疫苗均为 VLPs 疫苗, 区别是 Gardasil 源于酿酒酵母表达系统, 含有 HPV6/11/16/18 四种型别的病毒样颗粒, 不但可以预防宫颈癌, 同时还可以预防尖锐湿疣; Cervarix 源于昆虫细胞表达系统, 含有 HPV 16/18 两种型别的病毒样颗粒, 仅能够预防宫颈癌。但是其采用了 GSK 所独有的 AS04 佐剂, 被认为能够诱导更强的免疫应答。临床试验及上市后的监测均证实上述两种疫苗具有良好的安全及有效性。上述两种疫苗均来源于真核表达系统, 价格高, 我国大部分消费者难以承担。

本研究中采用成熟、廉价的大肠杆菌表达系统制备具有高纯度的、良好免疫原性的 HPV16 VLPs, 为 HPV16 预防性疫苗的研制奠定良好的基础。大肠杆菌来源的 VLPs 疫苗有望最大程度地降低疫苗成本, 增加产品的竞争力, 有利于在我国等发展中国家进行推广, 因此, 具有重大的潜在社会效益。

## 材料与方法

**1 材料** HPV16 阳性阴道分泌物标本由厦门 174 医院提供。本研究中所用的 pTO-T7 原核表达载体由本实验室构建。pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司, DH5 和 ER2566 株

收稿日期: 2008-10-08; 修回日期: 2009-04-20

基金项目: 国家自然科学基金 (30600106, 30500092); 国家工程技术研究中心研究建设项目 (2005DC105006); 863 计划重点项目 (2006AA020905)。

作者简介: 魏旻希 (1983-) 男, 博士研究生, 分子病毒学。

Tel: 86-592-2184110; E-mail: wmx@xmu.edu.cn

通讯作者: 顾颖, E-mail: guying@xmu.edu.cn

大肠杆菌均为本室保存。所用 Taq 酶、限制性内切酶和 T4DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司。HPV16 线性单抗 D9 由 Christensen 博士惠赠。蛋白质分子量标记购自 PIERCE 公司。本研究中所用的 FPLC 层析系统及层析介质均为 GE 公司产品。

**2 HPV16 基因组 DNA 的提取** 将含有 HPV16 阳性阴道分泌物的棉拭子放入具有 1 ml 含蛋白酶 K (200 $\mu$ g/ mL) 的 TE 缓冲液 (10 mmol/ L Tris 缓冲液 pH 8.0, 1 mmol/ L EDTA) 的样品管中, 充分漂洗并贴壁挤干。55 $^{\circ}$ C 孵育 5 h, 95 $^{\circ}$ C 灭活 10 min, 2 000 r/ min 离心 5 min, 留上清, 经过酚-氯仿抽提后, 以异丙醇沉淀 DNA, 以 50  $\mu$ l TE 缓冲液溶解沉淀后 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

**3 非融合表达载体 pTO-T7-HPV16-L1 的构建** 根据 HPV16 L1 基因序列设计正向引物 16NF : 5'-CATATGCAGGTGACTTTTATT -3 及反向引物 16CR : 5'-CTCGAGTTACAGCTTACGTTTTTTGC-3, 其中 16NF 的 5 端含有 *Nde* I 位点 (以下划线表示), 16CR 的 5 端含有 *Xho* I 酶切位点 (以下划线表示)。用上述 HPV16 L1 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增条件如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后进入 PCR 循环, 循环参数为: 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 57 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 25 个循环; 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。将扩增所得目的片段插入 pMD18-T 载体。以 *Nde* I/ *Xho* I 双酶切鉴定其中正确插入扩增片段的重组载体 pMD18-T-HPV16-L1。测序 (由上海生工公司完成) 正确的克隆用于下一步实验。

重组质粒 pMD18-T-HPV16-L1 经 *Nde* I/ *Xho* I 双酶切, 将所得片段 HPV16-L1 连接至经过相同酶切处理的 pTO-T7 载体上, 按常规分子生物学方法获得重组表达质粒 pTO-T7-HPV16-L1。由该质粒中插入片段表达的 HPV16 L1 蛋白命名为 HPV16-L1。以 16NF 为正向引物, 16CR 为反向引物对所得克隆进行 PCR 鉴定, 选取鉴定正确克隆进行下一步实验。

**4 HPV16-L1 的表达与纯化** 取 1  $\mu$ l 的 pTO-T7-HPV16-L1 质粒 (0.15 mg/ mL) 转化 40  $\mu$ l 感受态大肠杆菌 ER2566, 挑取阳性单菌落至含 4 ml 卡那霉素抗性液体 LB 培养基的试管, 37 $^{\circ}$ C, 220 r/ min 振荡培养 10 h。将试管中的菌液放大接种至含 500 ml 卡那抗性 LB 培养基的三角瓶中, 37 $^{\circ}$ C, 220 r/ min 振荡培养。当 OD<sub>600</sub> 值达 0.7 时, 添加 IPTG 至终浓度 0.6 mmol/ L, 25 $^{\circ}$ C 诱导培养 8 h。菌体经离心收集, 按 1g 菌体对应于 10 ml 裂解液 (20 mmol/ L Tris 缓冲液 pH 7.2, 300 mmol/ L NaCl) 的比例用裂解液重悬, 并且在超声法破碎菌体后, 通过离心获得菌体裂解上清液。存在于菌体裂解上清液中的目的蛋白首先以饱和硫酸铵沉淀法进行初步纯化, 尔后通过 SP 阳离子交换层析及 Butyl 疏水相互作用层析对目的蛋白进一步精纯<sup>[8]</sup>。留取各纯化步骤的样品, 分别进行 SDS-PAGE 及开展 Western-blotting (以 D9 单克隆抗体为二抗) 检测。

**5 HPV16-L1 VLPs 的装配** 对疏水相互作用层析法纯化的 HPV16-L1 蛋白溶液补加 DTT 至终浓度 100 mmol/ L, 充

分作用 2 h 以上。随后将目的蛋白溶液置于 200 倍体积的 PBS 中透析, 充分去除还原剂 DTT, 从而使目的蛋白自装配为 VLPs。

## 6 HPV16-L1 VLPs 的形态学检测及其免疫原性测定

**6.1 动态光散射分析** HPV16-L1 VLPs 样品经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤后, 使用 DynaPro MS/X 型动态光散射仪 (美国 Protein Solutions 公司), 利用 Regulation 算法测量。

**6.2 透射电镜观察** HPV16-L1 VLPs 经 2% 磷钨酸 pH7.0 负染, 固定于喷炭的铜网上。在 JEM2100 透射电镜上 (日本电子公司) 观察 VLPs 颗粒。

### 6.3 免疫动物的免疫保护性评价

**6.3.1 假病毒中和细胞模型实验** HPV16 假病毒中和细胞模型按照文献<sup>[9]</sup>建立。将 293FT 细胞 (Invitrogen) 铺种在 96 孔细胞培养板中 (1.5  $\times$  10<sup>4</sup> 个细胞/孔)。5 h 后进行中和实验。将待测血清样品分别用 10% DMEM 连续倍比稀释, 然后各取 50  $\mu$ l 稀释的血清样品分别与 50  $\mu$ l 稀释于 10% DMEM 的上文制备的假病毒液 (MOI = 0.1) 混合。混合物在 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后分别加入预先铺种 293FT 细胞的 96 孔细胞培养板中, 在 37 $^{\circ}$ C 培养 72 h。随后, 首先通过荧光观察确定各样品的粗略中和滴度, 随后再用流式细胞仪 (EPICS XL, 美国 Beckman Coulter 公司) 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。感染率表述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)  $\times$  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视为具备中和能力。

**6.3.2 兔的免疫保护性评价** 实验动物是通过上述中和实验鉴定其血清无中和能力的雄性新西兰白兔 (体重约 1.5 kg), 以 HPV16-L1 VLPs 进行免疫。初免时, HPV16-L1 VLPs 与等量福氏完全佐剂混合, 加强免疫则与等量福氏不完全佐剂混合进行制备, 免疫方式为多点皮下注射, 初次免疫剂量为 100  $\mu$ g/ 只, 此后分别在第 4 和第 10 周各加强免疫一次, 加强免疫的剂量为 50  $\mu$ g/ 只。每周抽取外周静脉血, 分离血清, 以上述假病毒中和细胞模型实验评估受检血清的中和效价。

**6.3.3 羊的免疫保护性评价** 实验动物是通过上述中和实验鉴定其血清无中和能力的雄性山羊两只, 以 HPV16-L1 VLPs 进行免疫。初免时, HPV16-L1 VLPs 与等量福氏完全佐剂进行混合, 加强免疫则与等量福氏不完全佐剂混合进行制备。免疫方式为多点皮下注射, 初次免疫剂量为 1 mg/ 只, 此后分别在第 4 和第 10 周各加强免疫一次, 加强免疫的剂量为 0.5 mg/ 只。每周抽取外周静脉血, 分离血清, 以上述假病毒中和细胞模型实验评估上述抗血清的中和效价。

## 结 果

### 1 非融合表达载体 pTO-T7-HPV16-L1 的构建

2%琼脂糖凝胶电泳显示,以 *Nde* *V* *Xho* I 对重组质粒 pTO-T7-HPV16-L1 双酶切鉴定,可以得到与预期大小相符的约 1 500bp 的片段,结果见图 1。DNA 测序结果显示插入片段序列与模板序列完全符合。PCR 鉴定 pTO-T7-HPV16-L1 显示,可扩增出与预期大小相符合的大小约 1 500bp 的片段。

## 2 HPV16-L1 的表达与纯化

如图 2 结果显示,HPV16 L1 蛋白以可溶形式在菌体裂解上清(Lane1)中,SDS-PAGE 难以分辨目的蛋白,但在 Western blotting 结果中清晰可见与 D9 单抗反应的特异条带,大小约为 55kD,与理论分子量相符。经过硫酸铵沉淀后目的蛋白得以富集,纯度明显提高(Lane2);经过 SP 阳离子交换和 Butyl 疏水相互作用层析纯化,纯度进一步提高,达到 95%以上。(图 2)

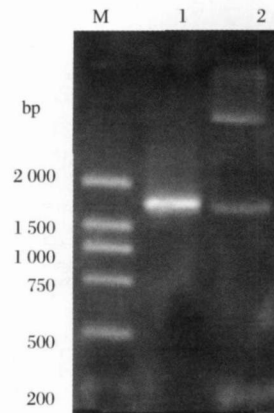


图 1 HPV16-L1 的 PCR 扩增以及 pTO-T7-HPV16-L1 *Nde* *V* *Sal* I 酶切鉴定  
Figure 1 The PCR amplification of HPV16 L1 gene and *Nde* *V* *Sal* I digestion of pTO-T7-HPV16-L1  
M DL2 000 Molecular weight marker, 1. The PCR amplification of HPV16 L1, 2. *Nde* *V* *Sal* I digestion of pTO-T7-HPV16-L1.

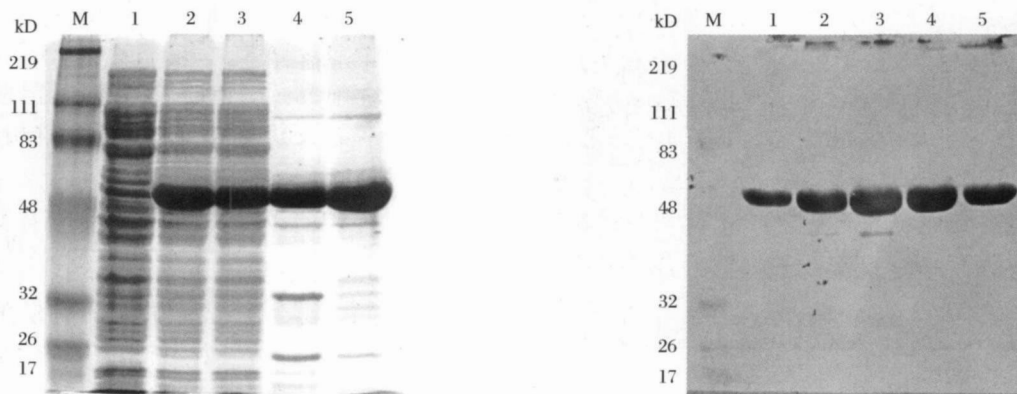


图 2 HPV16-L1 蛋白表达、纯化的 SDS-PAGE 及蛋白免疫印迹图

Figure 2 10%SDS-PAGE and Western blot analysis of HPV16-L1 expression and purification

1. Cell lysate supernatant; 2. precipitation of SAS precipitate(40% saturation); 3. Supernatant of redissolved precipitation; 4. Sample after SP chromatography; 5. Sample after Butyl chromatography.

## 3 HPV16-L1 VLPs 的形态学检测

动态光散射分析结果见图 3, HPV16-L1 VLP 的水化分子动力学半径为 24.39 nm,与 HPV16 天然病毒颗粒的半径相近,颗粒装配比例接近 100%,达到较好的装配效果。

透射电镜观察显示视野中可见到大量半径为 25nm 左右的空心颗粒,颗粒大小与理论预期相符,尺度均匀一致(图 4)。

## 4 兔的免疫保护性评价

在初免 1 周后,免疫兔血清中的中和抗体滴度即明显上升,经过 1 次加强免疫后,中和抗体的滴度

即达到  $10^7$ ,结果见图 5。

## 5 羊的免疫保护性评价

在初免 1 周后,免疫山羊血清中的中和抗体滴度即明显上升,经过 1 次加强免疫后,中和抗体的滴度即能达到  $10^7$ ,结果见图 6。

## 讨 论

本研究中所用的大肠杆菌表达系统是目前最成熟的原核表达系统,具有廉价、安全、高效的特点。若能将其应用于 HPV 疫苗的生产则可以大大降低

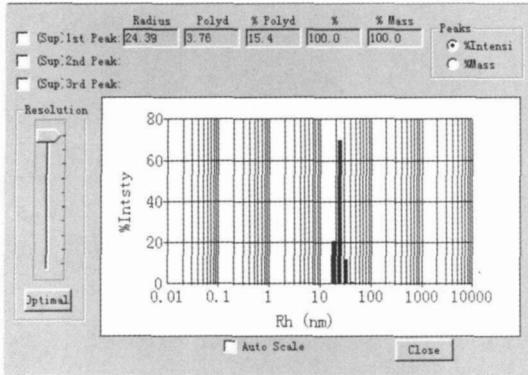


图3 HPV16-L1 VLP的动态光检测结果  
Figure 3 Dynamic light scattering analysis of HPV16-L1 VLP

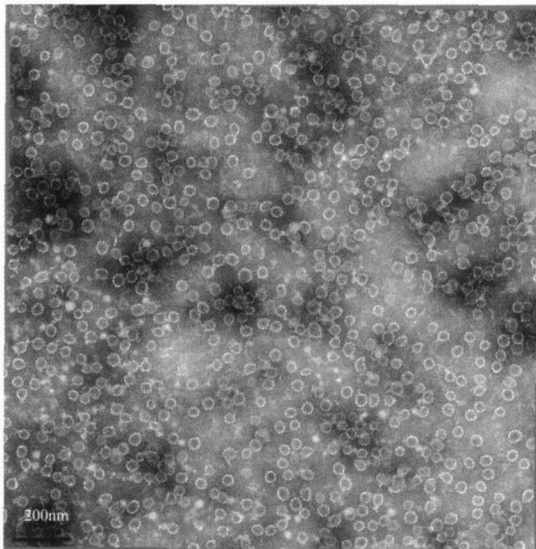


图4 HPV16-L1 VLP透射电镜观察 (×25 000)  
Figure 4 Transmission Electron Micrograph of HPV16-L1 VLP (×25 000, Bar = 200 nm)

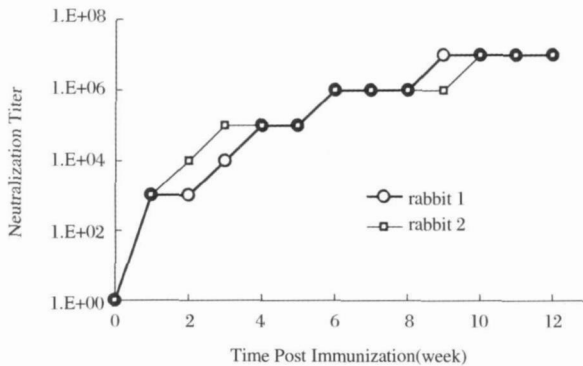


图5 HPV16 VLP免疫后兔血清中和抗体滴度  
Figure 5 The neutralization titer of rabbit serum after vaccination

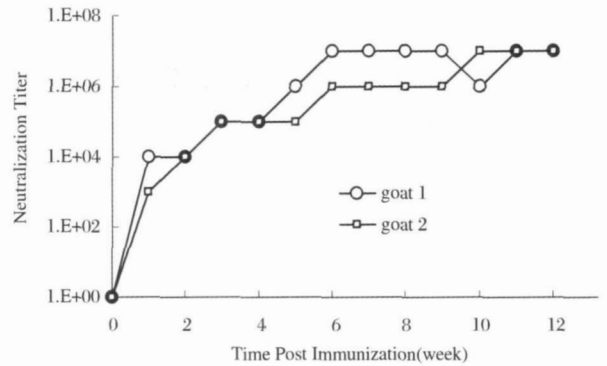


图6 HPV16 VLP免疫后山羊血清中和抗体滴度  
Figure 6 The neutralization titer of goat serum after vaccination

用大肠杆菌表达 HPV L1 蛋白<sup>[10]</sup>。但是由于大肠杆菌表达的 HPV L1 蛋白大多丧失其天然构象并且主要以不溶性的包涵体形式存在。虽然通过包涵体纯化、复性等步骤也可得到 HPV VLP<sup>[11]</sup>，但是在复性过程中重组蛋白大量损失，得率低，难以在商业化生产中应用。尽管也有文献报道通过 GST 融合表达的方式可以提高细胞裂解上清液中 L1 蛋白的表达量并且有助目的蛋白的纯化<sup>[12]</sup>，但融合蛋白的切割往往需要价格昂贵的酶，所以这种方法往往仅限于实验室应用。

本研究为了增加目的蛋白在大肠杆菌中可溶性表达的表达式，采用了高效的原核表达载体 pTO-T7。在 pTO-T7 载体的调控序列中存在串连排列的增强子 序列及强启动子 T7，从而大大增强目的蛋白在大肠杆菌细胞裂解物上清液中的表达<sup>[13]</sup>。

在目的蛋白的纯化中，采用硫酸铵沉淀法进行纯化。目的蛋白在特定浓度的硫酸铵上被选择性沉淀，随后用含有特定盐浓度的缓冲液重悬目的蛋白。经过上述步骤的初步纯化后，目的蛋白不但得以明显富集而且其蛋白纯度明显提高。更重要的是，以上初步纯化步骤是一个温和过程，不使用尿素、SDS 等蛋白质强变性剂，从而使目的蛋白维持其天然构象，降低了因目的蛋白变性而招致的损失，同时也为后续层析法进一步纯化目的蛋白奠定了良好的基础。

由于 HPV 的中和表位多为构象表位，其表位的完整性取决于 HPV 结构的完整性<sup>[14, 15]</sup>。在本研究中，在 HPV16 L1 蛋白装配成病毒样颗粒前，首先加入还原剂 DTT，使维系颗粒完整性的二硫键充分还原，再进行体外装配，从而获得完整、均一的病毒样颗粒。既往研究表明，通过酵母表达系统产

成本，提高产品竞争力。早在 1987 年，就有报道利

生的 HPV VLP 的颗粒均一性,结构稳定性及免疫原性均较差,但是如果经过解聚再重组,则 HPV VLP 将变得更为均一,其结构稳定性及抗原性也大为提高<sup>[16]</sup>。本研究也证实,经过体外装配之后,HPV16-L1 VLPs 结构完整,颗粒大小均一。动物实验也进一步证明该病毒样颗粒具有良好的免疫原性,可以诱导针对 HPV16 的高滴度中和抗体。

目前尚未见大肠杆菌来源的 HPV VLPs 与已上市疫苗 VLPs 免疫原性比较的报道。一般认为 HPV 上的表位高度依赖于 HPV 结构的完整性及正确性,若 VLPs 的形态结构正常,往往就能够得到 HPV 上的天然表位。现有研究表明,大肠杆菌来源的 HPV VLPs 在形态和结构上与真核生物来源的 HPV VLPs 高度一致,本研究的结果也证实这一点。此外,目前结构已知的多个型别 HPV L1 的 VLP 或五聚体均来源于大肠杆菌,与已知 HPV VLP 的结构有较好的相似性<sup>[12,17,18]</sup>。当然要最终证实两种来源的 HPV VLPs 是否存在免疫原性差异还需要进一步的动物实验平行比较,这也是我们下一步的工作。

总之,本研究建立了一种从大肠杆菌表达系统高效获取高纯度 HPV16 VLPs 的方法,该方法简便、经济和高效,适于大规模生产,具有良好的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] Insinga R P, Dasbach E J, Elbasha E H, et al. Incidence and duration of cervical human papillomavirus 6, 11, 16, and 18 infections in young women: an evaluation from multiple analytic perspectives[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007, 16(4): 709-715.
- [2] Sterling J, Stanley M, Gatward G. Production of human papillomavirus type 16 virions in a keratinocyte cell line [J]. *J Virol*, 1990, 64(12): 6305-6307.
- [3] Zhou J, Sun X Y, Stenzel D J, 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[J]. *Virology*, 1991, 185(1): 251-257.
- [4] Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, et al. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(24): 12180-12184.
- [5] Rose R C, Reichman R C, 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. *J Gen Virol*, 1994, 75 (Pt 8): 2075-2079.
- [6] Villa L L, Costa R L, Petta C A, et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial [J]. *Lancet Oncol*, 2005, 6 (5): 271-278.
- [7] Harper D M, Franco E L, 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 [J]. *Lancet*, 2004, 364(9447): 1757-1765.
- [8] 潘晖榕,李少伟,刘波,等. 人乳头瘤状病毒 6 型病毒样颗粒的制备及其中和抗体的检测[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2009, 1(29): 71-77.
- [9] 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[J]. *生物工程学报*, 2006, 22 (6): 990-995.
- [10] Banks L, Matlashewski G, Pim D, et al. Expression of human papillomavirus type 6 and type 16 capsid proteins in bacteria and their antigenic characterization [J]. *J Gen Virol*, 1987, 68 (Pt 12): 3081-3089.
- [11] Kelsall S R, Kulski J K. Expression of the major capsid protein of human papillomavirus type 16 in *Escherichia coli* [J]. *J Virol Methods*, 1995, 53(1): 75-90.
- [12] Chen X S, Garcea R L, Goldberg I, et al. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16 [J]. *Mol Cell*, 2000, 5(3): 557-567.
- [13] 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[J]. *生物工程学报*, 2000, 16 (5): 578-581.
- [14] Thompson G H, A Roman, Expression of human papillomavirus type 6 E1, E2, L1 and L2 open reading frames in *Escherichia coli* [J]. *Gene*, 1987, 56 (2-3): 289-295.
- [15] Christensen N D, Kreider J W, Cladel N M, et al. Monoclonal antibody-mediated neutralization of infectious human papillomavirus type 11 [J]. *J Virol*, 1990, 64(11): 5678-5681.
- [16] Mach H, Volkin D B, Troutman R D, et al. Disassembly and reassembly of yeast-derived recombinant human papillomavirus virus-like particles (HPV VLPs) [J]. *J Pharm Sci*, 2006, 2195-2206.
- [17] Chen X S, Casini G, Harrison S C, et al. Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1 [J]. *J Mol Biol*, 2001, 307(1): 173-182.
- [18] Bishop B, Dasgupta J, Klein M, et al. Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(43):

31803-31811.

## Production of Human Papillomavirus Type 16 Virus-like Particles and Its Immunogenicity

WEI Min-xi , LI Shao-wei , HUANG Bo , SHEN Wen-tong , SU Yong-zai , ZHANG Chun-hua ,  
GU Ying\* , DU Hai-lian , ZHANG Jun , XIA Ning-shao

(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract :** HPV16 L1 gene was amplified from HPV16 positive vaginal secretion sample by PCR , and inserted into pTO-T7 to obtain the recombinant expression vector pTO-T7-HPV16-L1. Then , the pTO-T7-HPV16-L1 was transformed into *E coli* strain ER2566 and the recombinant protein HPV16 L1 was expressed in soluble form. After purification by ammonium sulfate precipitation , ion-exchange chromatography , and hydrophobic interaction chromatography , the recombinant protein HPV16 L1 had a purity of more than 98 % . By removing DTT , purified HPV16 L1 proteins self-assembled *in vitro* into VLPs with the diameter of 50nm . The vaccination experiments on experimental animals showed the VLPs could elicit high titer of neutralizing antibodies against HPV 16 . HPV16 VLPs with high immunogenicity and high purity can be produced easily and effectively from an *E coli* expression system in the study , and thus can be used in structure investigation and HPV16 vaccine development.

**Key words :** Human papillomavirus type 16 ; *Escherichia coli* expression system ; Purification ; Virus-like particle ; Immunogenicity

---

Corresponding author : GU Ying , E-mail : guying@xmu.edu.cn