

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620101152332

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

人乳头瘤病毒 16 型 L1 和 L2 蛋白相互作用
研究

Interaction between human papillomavirus type 16 L1 and L2
capsid proteins

吴坤宝

指导教师姓名: 李少伟 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2013 年 6 月

论文答辩日期: 2013 年 6 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

宫颈癌是全世界继乳腺癌之后的女性第二大癌症，据 WHO/ICO 2010 年统计数据显示，全球 23.4 亿女性处于被高危型的 HPV 感染的威胁中，每年约有 53 万女性被确诊为宫颈癌，约有 27 万人死亡。而人乳头瘤病毒（Human papillomavirus, HPV）的持续感染是导致宫颈癌的主要病因。

HPV 病毒颗粒的衣壳由主要衣壳蛋白 L1 和次要衣壳蛋白 L2 组成。L1 能够单独组装成外观形态和表位均与天然病毒相似的病毒样颗粒(Virus-Like Particles, VLPs)，能够诱导产生高滴度的中和抗体。L2 在病毒感染初期的免疫逃逸、入侵宿主细胞、病毒 DNA 的核定位及病毒颗粒的高效组装等过程中均具有重要作用。随着研究的深入，人们逐渐对 HPV 的入胞和致癌机制等均有一定的认识，但天然 HPV 颗粒的组装机制及其成熟释放的过程尚未清楚。因此，研究 HPV 的衣壳组装和感染机制对有效预防和治疗宫颈癌具有重要指导意义。

本研究初步建立了两类大肠杆菌 HPV16L1&L2 共表达系统：一类是双质粒表达系统：在双重抗生素选择压力下，使得 2 种质粒共存于大肠杆菌中稳定表达；另一类是多顺反子表达系统：在同一载体上表达 L1 和 L2 基因。其又划分为单启动子和双启动子表达系统。这几种共表达系统均能同时可溶性的表达 L1 和 L2，其中多顺反子表达产生的包涵体较少，推测 L1 和 L2 的相互作用有利于它们构象的正确折叠，因此该方法可能更有利于研究 L1 和 L2 相互作用。

在前期研究中，我们构建了 L1、L2 和 GFP 共转染制备 HPV 假病毒的检测系统，并发现 L1 无法单独有效的包裹报告基因形成能感染细胞的假病毒，需要 L2 的参与辅助。利用该结果，本研究通过分析 HPV16L1 五聚体的结构，获得 23 个可能与 L2 相互作用的氨基酸位点。分别构建了这 23 个位点单独突变的 L1 基因的表达质粒，在真核 293FT 细胞中制备了能够包裹报告基因的 L1/L2 假病毒。利用蛋白质免疫印迹法和 L1 双抗夹心定量系统监控突变假病毒的生产情况；通过对突变假病毒感染能力的测定发现 Phe²⁵⁶、Arg³¹⁵、Gln³¹⁷ 和 Thr³⁴⁰ 位点突变会导致假病毒的感染能力显著降低。同时利用免疫共沉淀的方法正反面证明了该四个位点是 L1 与 L2 相互作用的关键位点。

进一步的，本研究在原核表达系统上验证 Phe²⁵⁶、Arg³¹⁵、Gln³¹⁷ 和 Thr³⁴⁰ 四个位点单点突变对 L1 VLPs 组装和表位的影响。在大肠杆菌系统中克隆表达可

溶的突变 L1，经纯化获得纯度 90%以上的突变蛋白。经高效液相色谱和电子显微镜观察，证实该四个位点并不影响 L1 VLPs 的组装。最后，利用抗体证明位点突变对 VLPs 表面构象无影响。

综上所述，本研究成功建立多种 HPV16L1 与 L2 的原核共表达系统，为研究 L1&L2 相互作用奠定了实验基础。通过真核表达系统证实了 L1&L2 相互作用的四个关键位点，为 HPV 组装机制及 HPV 的感染等研究奠定了基础，并为针对 L1 和 L2 相互作用的疫苗或治疗药物的设计提供参考。

关键词：人乳头瘤病毒；衣壳蛋白；共表达；相互作用；假病毒

Abstract

Cervical cancer is the second largest female cancer in the world after breast cancer. According to the data from the WHO/ICO in 2010, there has a population of 529,000 women who are diagnosed with cervical cancer and 270,000 of them die from the disease every year in the world. Persistent infection of Human papillomavirus (HPV) is the main cause of cervical cancer.

L1, HPV major capsid protein, is able to assemble into particles in vitro, which morphology and epitope are similar to the native virus, and they can induce high neutralizing antibodies. L2, the minor capsid protein of HPV, plays an important role in process of immune escape at the beginning of the virus infection, entry of cell, nucleus location of DNA and promoting virus assembly efficiently. With the deepening research of HPV, the mechanism of HPV cell invasion and carcinogenic mechanism is known partly, but native HPV particles assembly and the process of mature virus release has not yet clear. Therefore, research of HPV assembly and the infection mechanism has important guiding significance for prevention effectively and treatment of cervical cancer.

We successfully established two kinds of HPV16 L1&L2 in *E.coli* coexpression systems. The first is the two plasmids co-transformation which made two plasmids coexist in *E.coli* under the two antibiotics, and the other is one plasmid expressing L1&L2 genes from one or multiple transcription units. All of these co-expression systems can express L1 and L2 in soluble form. The product of coexpression systems with one plasmid is less inclusions, and it means that interaction of L1 and L2 can keep their conformation exactly, so this system is good for the research of proteins interaction.

Previous study has shown that pseudovirus prepared with only L1 cannot effectively infected 293FT cells expressing GFP, and L2 is needed to enhance the infection ability. We analysed the amino acids inner the HPV16 L1 pentamer and found out 23 sites that could be the L1 and L2 interaction sites probably. We replaced these amino acids with alanine respectively and generated mutant

pseudovirus of HPV16L1/L2 which can pack GFP gene in 293FT cell. And we monitor the preparation of these mutant pseudovirus through Western Blotting and quantitative L1 Elisa. We found out respectively the mutant of Phe²⁵⁶, Arg³¹⁵, Gln³¹⁷ and Thr³⁴⁰, which on L1, can reduce pseudovirus infection ability significantly. At the meantime, we confirmed that these four sites are the key sites of L1&L2 interaction using the method of immune co-precipitation.

Furthermore, we cloned and expressed respectively these mutant L1 proteins in non-fusion soluble form in *E.coli*. After purified with chromatography, the purity of mutant L1 protein can reach 90%. We confirmed that the mutant of Phe²⁵⁶, Arg³¹⁵, Gln³¹⁷ and Thr³⁴⁰ did not affect L1 VLPs assembly and the epitopes on the surface of L1 VLPs via HPLC、TEM and HPV16L1 antibodies.

In a conclusion, we successfully established kinds of HPV16L1 and L2 in *E.coli* coexpression systems. It established the foundation of the study of L1 and L2 interaction. And we confirmed that the four sites are important to L1&L2 interaction in eukaryotic expression system. Our findings significantly advance the understanding of mechanism for HPV assembly and infection. It will support the design technically of vaccine and medicine based on L1 and L2 interaction.

Key word: Human papillomavirus; capsid protein; coexpression; interaction; pseudovirus

缩略词

Amp: Ampicillin, 氨苄青霉素

bp: base pair, 碱基对

BPV: Bovine Papillomavirus, 牛乳头瘤病毒

DNA: Deoxyribonucleic Acid, 脱氧核糖核酸

ELISA: Enzyme-linked ImmunoSorbant Assay, 酶联免疫吸附测定

FDA: Food and Drug Administration, 美国食品及药品管理局

GAM-AP: 标记碱性磷酸酶的羊抗鼠抗体

GAM-HRP: 标记辣根过氧化物酶的羊抗鼠抗体

GFP: Green Fluorescent Protein, 绿色荧光蛋白

HPLC: High Performance Liquid Chromatography, 高效液相色谱

HPV: Human Papillomavirus, 人乳头瘤病毒

HRP: Horseradish Peroxidase, 辣根过氧化物酶

ICTV: International Committee on the Taxonomy of Viruses, 国际病毒分类委员会

Kan: Kanamycin, 卡那霉素

KDa: kilo Daltons, 千道尔顿

Mab: monoclonal antibody, 单克隆抗体

ORF: Open Reading Frame, 开放阅读框

pRb: Retinoblastoma Tumor Suppressor Gene, 视网膜母细胞瘤抑制基因

RNA: Ribonucleic Acid, 核糖核酸

SAS: Solvent Accessible Surface, 溶剂可及化表面积

SPFF: Sp Sepharose™ Fast Flow, 阳离子交换层析介质

TEM: Transmission Electron Microscopy, 透射电子显微镜

VLPs: Virus-Like Particle(s), 类病毒颗粒

WHO: World Health Organization, 世界卫生组织

LCR: Long control region, 长调控区

ATP: adenosine triphosphate, 腺嘌呤核苷三磷酸

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
缩略词.....	V
前言.....	1
1. HPV 简介.....	1
1.1 HPV 的结构及早期蛋白功能研究.....	1
1.2 HPV 的分类.....	4
1.3 流行病学与相关疾病.....	5
1.4 HPV 的感染机制.....	9
1.5 现有的 HPV 疫苗.....	10
2 HPV16 衣壳蛋白 L1 和 L2 结构与功能研究进展.....	11
2.1 HPV16 L1 结构功能研究进展.....	11
2.2 HPV16 L2 结构与功能.....	13
3 蛋白质共表达策略.....	14
3.1 多质粒共表达系统.....	15
3.2 多顺反子共表达系统.....	15
3.3 哺乳动物细胞蛋白质共表达进展.....	17
4 蛋白相互作用研究方法.....	17
4.1 免疫共沉淀.....	18
4.2 GST-Full down.....	19
4.3 荧光共振能量转移.....	20
4.4 双分子荧光互补.....	21
4.5 酵母双杂交系统.....	22
4.6 表面等离子共振.....	24
4.7 化学交联法.....	24
4.8 其它方法.....	25
5 HPV 假病毒研究进展.....	25

6.本研究的 目的、思路和意义	27
材料与方法	29
1.仪器	29
2.材料	30
2.1.大肠杆菌菌株、质粒和基因	30
2.2.细胞株、质粒和基因	31
2.3.酶、单抗和实验动物	31
2.4.工作站和软件	31
2.5.常见溶液及培养基的配制	32
3.方法	36
3.1.分子克隆相关生物学实验方法	36
3.2.蛋白质的诱导表达和纯化方法	39
3.3.单克隆抗体相关方法	43
3.4 假病毒相关方法	44
结果与分析	49
第一部分：HPV16L1&L2 原核共表达系统的初步建立和相互作用分析	49
1.原核共表达系统的建立	49
2. L1&L2 相互作用分析	54
3.第一部分小结	56
第二部分：真核系统 HPV16L1&L2 相互作用关键位点研究	57
1.HPV16L1h 突变位点的确定.....	57
2. 突变假病毒的构建	57
3.突变假病毒性质分析	59
4. L1&L2 相互作用分析	65
5.突变位点的同源性分析	66
6.第二部分小结	68
第三部分：在原核系统中验证位点突变对 L1 VLP 的影响	69
1. pTO-T7-16L1-F256A/R315A/Q315A/T340A 表达载体构建和蛋白表达纯化.....	69
2.HPV16 L1 VLPs 的组装及性质分析	70
3.第三部分小结	72

讨论.....	74
1 原核共表达系统的选择.....	74
2 原核共表达系统表达条件优化.....	74
3.化学交联法分析蛋白质相互作用.....	75
4.相互作用的位点的设计.....	75
5.突变假病毒的构建.....	76
6.假病毒的纯化与电镜观察.....	77
7. 突变蛋白 VLPs 表面构象分析.....	77
小结与展望.....	79
参考文献.....	80
致谢.....	89
附录.....	90

目录

Abstract in Chinses	I
Abstract in English	III
Abbreciations	V
Chapter 1: Preface	1
1. Introduction of HPV	1
1.1 Structure and function of HPV	1
1.2 HPV types.....	4
1.3 Epidemiology of HPV and related diseases	5
1.4 HPV infection mechanism.....	9
1.5 HPV vaccine	100
2 Research of HPV capsid protein L1 and L2	111
2.1 Structure and function of major capsid protein L1.....	111
2.2 Structure and function of major capsid protein L2.....	133
3 Proteins co-expression strategy	144
3.1 Multigene co-expression in different plasmids	155
3.2 Mutigene co-expression in one palsmid.....	155
3.3 Mutigene co-expression in mammalian cell.....	177
4 methods of proteins interaction analysis	177
4.1 Immune coprecipitation.....	188
4.2 GST-Full down	19
4.3 Fluorescence resonance energy transfer	20
4.4 Bimolecular fluorecence complementation	21
4.5 Yeast two-hybrid system	22
4.6 Surface plasmon resonance	24
4.7 Chemical crosslinking	24
4.8 Other methods.....	25
5 Research peogress of HPV pseudovirus	25
6. The purpose and meaning of this research	27

Chapter 2: Materials and Methods	29
1. Instrument.....	29
2. Meterials and Reagents.....	30
2.1. Bacterial strain, plasmid and gene.....	30
2.2. Cell strain, plasmid and gene	31
2.3. Enzyme, Mabs and experimental animal	31
2.4. Work station and sofeware	31
2.5. Common solution and culture medium	32
3. Methods..	36
3.1. Molecular cloning related methods	36
3.2. Protein expression and purification methods	40
3.3. Mabs related methods.....	43
3.4. Pseudovirus reated methods	44
Chapter 3: Results and Analysis.....	50
Part 1: Establishment of HPV16L1 and L2 prokaryotic coexpression systems	
and its interaction analysis.....	50
1. Establishment of prokaryotic co-expression systems	49
2. Analysis of L1 and L2 coexpresion.....	54
3. Sumary of Part 1.....	56
Part 2: Research of HPV16L1 and L2 interaction sites in eukaryotic systems	57
1. The determination of HPV16L1h mutant sites.....	57
2. Mutant pseudovirus construction	57
3. Analysis of HPV mutant pseudovirus characterization	59
4. Analysis of L1 and L2 interaction	65
5. Homology of mutant sites	66
6. Sumary of Part 2.....	69
Part 3: Influence of mutant points for L1 VLPs expressed in E.coli system.....	70
1. Vector construction and expression and purification of mutant L1 protein.....	69
2. Assembly and characterization analysis of HPV16L1 VLPs.....	70
3. Sumary of Part 3.....	72

Discussion.....	74
Summary and prospect	79
Reference.....	80
Acknowledgment.....	89
Appendix.....	90

厦门大学博硕士论文摘要库

前言

1. HPV 简介

1.1 HPV 的结构及早期蛋白功能研究

HPV 是一种无包膜的小型的双链闭合环状的 DNA 病毒，天然病毒颗粒呈约 55nm 的二十面体球形对称结构^[1]，基因组约为 8000 个碱基（图 1、图 2）。HPV 基因组按功能可分为 3 个编码区：早期基因区(E)、晚期基因区(L)和非编码区(LCR)。早期基因区（E）主要行使病毒基因组复制、转录和诱导宿主细胞发生转化的功能，约 4500bp，分别编码 E1、E2、E4、E5、E6 和 E7 早期蛋白（表 1）。晚期基因区（L）主要编码病毒的衣壳蛋白，分为主要衣壳蛋白（L1）和次要衣壳蛋白（L2），是构成病毒颗粒外壳的主要蛋白。非编码区（LCR）又称长调控区，约 800bp，含有基因组的复制起始位点和基因表达所必须的调控元件，能够控制病毒早晚期转录和病毒组装。LCR 区不编码任何蛋白，而含有许多转录激活因子和抑制因子的结合位点，从而实现病毒转录、复制以及组装的调控^[2]。

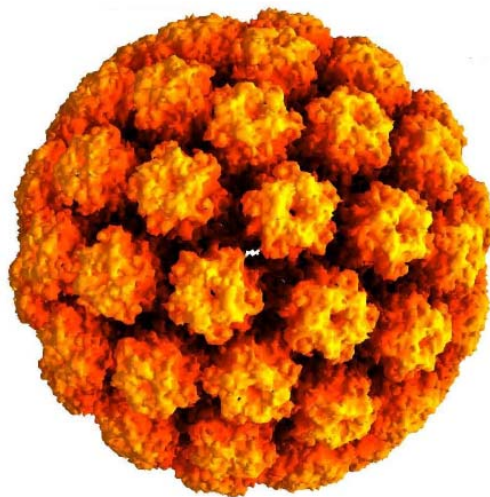


图 1:HPV16L1 VLP 原子模型^[1]

Fig.1: View of the molecular surface of the atomic model of HPV16

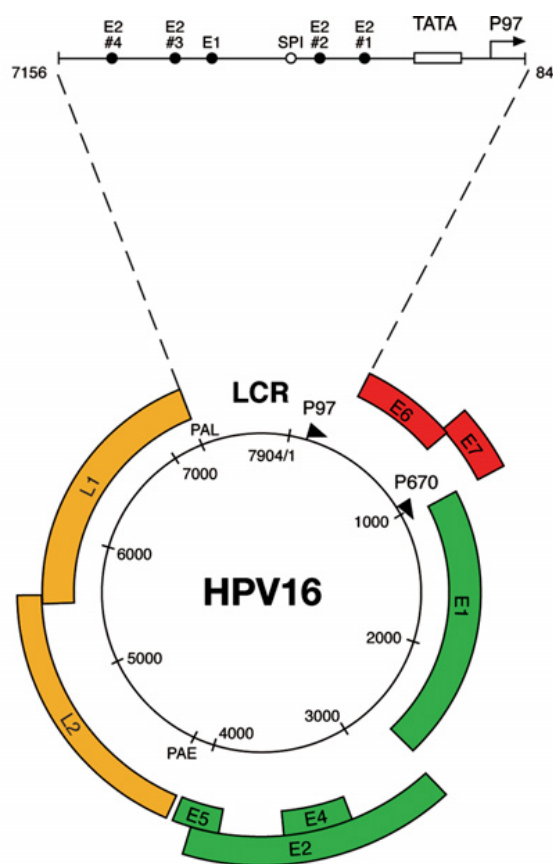


图 2: HPV16 的基因组以及编码的蛋白^[16]

Fig.2: The group of genome and encoding proteins of HPV16

HPV 早期基因在病毒感染的早期表达，早期蛋白包括 E1-E8，各个蛋白的功能总结如表达 1，但目前对 E3、E8 蛋白的功能还不清晰。E1 蛋白具有 ATP 酶和解旋酶活性，参与病毒 DNA 的复制^[3]；E2 蛋白可编蛋白酶的激活子和抑制子 2 种拮抗功能小蛋白，共同调节病毒的复制及基因的转录，能够抑制 E6 和 E7 蛋白表达^[4]。E4 蛋白的基因在 E2 蛋白的基因内，但具有独立的阅读框，E4 蛋白能够破坏细胞骨架，诱使细胞角质网络解体，可能与病毒感染后期的成熟和释放有密切关系。另外 E4 蛋白还可能与病毒基因组扩增有关^[5]。E5 蛋白是一种疏水配体蛋白，本身不具有酶的活性，能够与多种细胞膜蛋白和成长因子受体结合，使其泛素化降解，还能通过蛋白激酶信号传导通路刺激 E6、E7 蛋白的表达以及改变与细胞膜增生相关蛋白酶活性，从而影响细胞的生长周期^[6]。E6、E7 蛋白在细胞的癌变过程中起到至关重要的作用。

E6 蛋白具有 2 个特别的锌指结构，每个锌指结构由 2 个 cys-x-x-cys 组成，研究表明，锌指结构与病毒转化和蛋白反式激活有关，与蛋白之间的相互作用有

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫