

## 研究报告

# HPV16 L2 肽段偶联 AP205 VLP 的原核表达 及免疫原性分析\*

姜 博 毕研伟 张莹莹 蔡路奎 姬秋彦 李智华\*\* 徐维明

(中国医学科学院/北京协和医学院 医学生物学研究所 昆明 650118)

**摘要** 目的:将编码 HPV16 衣壳蛋白 L2 的 65~71、112~120 免疫优势表位连接到 RNA 噬菌体衣壳蛋白 AP205 氮端,组装形成病毒样颗粒,通过在大肠杆菌中实现表达及纯化,对其免疫原性进行研究。方法:合成编码 AP205 衣壳蛋白基因和 HPV16 L2 的 65~71、112~120 位氨基酸表位的基因序列,PCR 连接并克隆至 pET30a(+) 原核表达载体,构建重组表达质粒 pET30-AP205-HPV16 $\Delta$ L2,转化大肠杆菌 BL21(DH3)感受态细胞,IPTG 诱导表达。表达蛋白经凝胶层析纯化及 SDS-PAGE、Western blot 等理化性质检测,免疫接种 ICR 小鼠,通过间接 ELISA 法检测其免疫原性。结果:成功构建重组表达质粒,重组蛋白在大肠杆菌中以可溶性表达,透射电镜观察可见典型病毒样颗粒,该 VLP 在动物实验中表现出较好的免疫原性。结论:成功将 HPV16 L2 表位偶联 AP205 以形成 VLP,在大肠杆菌中实现可溶性表达。

**关键词** 人乳头瘤状病毒 L2 蛋白 AP205

**中图分类号** Q786

宫颈癌在全球妇女因恶性肿瘤死亡的原因中占据第二位,仅次于乳腺癌。在 99.7% 的宫颈癌组织中发现了 HPV DNA,说明 HPV 感染与宫颈癌的发生密切相关<sup>[1]</sup>。HPV 是一种嗜粘膜和皮肤上皮的 DNA 病毒,到目前为止已证实的 HPV 基因型有 100 多种,根据其致病性高低又分为低危型和高危型。低危型可引起皮肤和粘膜的良性乳头状瘤,高危型则与宫颈癌的发生直接相关,尤其以 HPV16 和 HPV18 为甚<sup>[2]</sup>。HPV 表面有主要衣壳蛋白 L1 和次要衣壳蛋白 L2,目前全球上市的预防性疫苗均为以 L1 蛋白为抗原靶点的多价亚单位疫苗。由于 HPV 病毒具有多种基因型,各种型别之间 L1 蛋白差异较大,所以一种或少量几种基因型 L1 蛋白的亚单位疫苗无法针对所有基因型的 HPV 病毒产生免疫反应<sup>[3]</sup>。大量研究表明 L2 蛋白上有许多表位可与

其他基因型的 HPV 发生交叉中和反应,尤其是 65~71、112~120 位氨基酸表位已被证实是能产生中和抗体的主要抗原位点,能引起多种型别 HPV 病毒的交叉中和反应,是良好的亚单位疫苗研究靶点<sup>[4-5]</sup>。AP205 是一种 RNA 噬菌体的主要衣壳蛋白,180 个 AP205 单体可自行组装成一类新的可表达并具有高度免疫原性的病毒样颗粒(VLP),这些 VLP 不含有噬菌体 RNA 基因组因而不能复制。AP205 还可携带目的抗原片段,组装形成 VLP 后可有效提高目的抗原的免疫原性<sup>[6]</sup>。

本文将编码 HPV16 L2 的 65~71、112~120 表位片段偶联到 AP205 氮端,在原核细胞中实现表达,并自行组装形成 VLP,为 HPV L2-AP205 VLP 亚单位疫苗研究打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 质粒 pET-30a(+) 购自 Novagen

收稿日期:2012-02-20 修回日期:2012-04-25

\* 云南省应用基础研究面上项目(2009ZC186M)

\*\*通讯作者,电子邮箱:liwisch@yahoo.com.cn

公司、大肠杆菌 BL21 (DE3) 和 DH5 $\alpha$  购自 Promega 公司, HPV16 假病毒为本科室制作保存(中国医学科学院医学生物学研究所)

1.1.2 试剂 限制性内切酶 *Hind* III、*Sal* I、*Nde* I 及 Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶等工具酶购自 TaKaRa 生物工程公司; HPV16 L2 (40-150) 单克隆抗体购自美国 SANTA CRUZ 生物技术公司; IgG-HRP 酶标二抗购自天德悦(北京)生物科技有限公司; 质粒抽提和胶回收相关试剂盒购自 OMEGA 公司; 其它试剂为市售分析纯。

1.1.3 目的基因的合成 根据 GeneBank 中收录的 HPV16 L2 蛋白基因序列 (NC-001526), 将第 65 ~ 71、112 ~ 120 位基因序列通过连接肽连接。同时找出 AP205 基因序列 (AF334111), 在不改变氨基酸序列的基础上, 根据大肠杆菌密码子的偏爱性对两段基因进行优化, 在北京三博远志生物工程技术有限公司进行全基因合成。

## 1.2 方法

1.2.1 AP205-HPV16L2 基因的构建 根据全基因合成的 AP205 基因和 HPV16L2 (65 ~ 71, 112 ~ 120) 基因序列分别对二者设计上下游引物, 在 AP205 基因两端分别引入 *Nde* I、*Hind* III 酶切位点, 在 HPV16L2 (65-71, 112-120) 基因两端分别引入 *Hind* III、*Sal* I 酶切位点。

AP205-1: 5'GGAATTCATATGATGGCAAATAAGC  
CGATCA3' *Nde* I

AP205-2: 5'CCCAAGCTTAGCAGTAGTATCAGAGC  
TT 3' *Hind* III

HPV16L2 (65 ~ 71, 112 ~ 120) -1: 5'CCCAAGCTTG  
GTACTGCTGCTGCTGGCTCTG 3' *Hind* III

HPV16L2 (65 ~ 71, 112 ~ 120) -2: 5'ATGTCGACT  
TAACCACTGCCACCGCCAGTACCA3' *Sal* I

分别以全基因合成的序列为模板进行 PCR。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环。AP205 和 HPV16L2 (65 ~ 71, 112 ~ 120) 两个目的片段分别经 *Hind* III 酶切后, 用 DNA Ligation Kit (TaKaRa) 16 $^{\circ}$ C 连接 4h, 回收连接产物。

1.2.2 重组 pET30-AP205-HPV16 $\Delta$ L2 表达载体构建 将构建的 AP205-HPV16 $\Delta$ L2 基因和 pET30a (+) 表达载体分别以 *Nde* I、*Sal* I 进行双酶切, 以 DNA Ligation Kit (TaKaRa) 连接 2 个胶回收的酶切产物, 构建 pET30-AP205-HPV16  $\Delta$ L2 表达载体, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 提取质粒, 酶切和测序鉴定。

1.2.3 在大肠杆菌中表达 AP205-HPV16 $\Delta$ L2 VLP 将构建的 pET30-AP205-HPV16 $\Delta$ L2 表达载体转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 筛选优势表达菌株。工程菌在 37 $^{\circ}$ C 条件下震荡培养, 至 OD 值约 0.6 时加入 IPTG 诱导 6h 后, 超声破菌。超声功率 30 w, 工作时间 30 s, 间隔 90 s, 总共超声 16 次。将超声破菌液在 4 $^{\circ}$ C, 8000 r/min 离心, 取上清液 SDS-PAGE 电泳鉴定表达情况。

1.2.4 蛋白质纯化 表达的 AP205-HPV16 $\Delta$ L2 蛋白以 Sepharose 4FF 凝胶层析纯化 (XK16/100 柱)。用 PBS 缓冲液平衡 Sepharose 4FF 柱后取超声破菌后的上清液上样, 流速 0.1 ml/min, PBS 缓冲液洗脱, SDS-PAGE 分析纯化结果。

1.2.5 纯化蛋白的电镜观察 纯化的 AP205-HPV16 $\Delta$ L2 蛋白经磷钨酸负染后, 日立 H-7650 透射电镜观察 VLP 形成情况。

1.2.6 重组蛋白抗原性检测 将 AP205-HPV16 $\Delta$ L2 蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至 PVDF 膜, 然后以抗 HPV16L2 (40-150) 单克隆抗体为一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体为二抗, 对重组蛋白进行 Western blot, 检测其抗原性。

1.2.7 重组蛋白 AP205-HPV16 $\Delta$ L2 免疫原性测定 用纯化的 AP205-HPV16L2 蛋白及加入 Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂的蛋白免疫 ICR 小鼠, 共设 3 组, 分别为 PBS 对照组、AP205-HPV16 $\Delta$ L2 组、AP205-HPV16 $\Delta$ L2 + Al(OH)<sub>3</sub> 组, 每组 10 只, 腹部皮下注射 AP205-HPV16 $\Delta$ L2 蛋白 25  $\mu$ g/只, 佐剂组加 Al(OH)<sub>3</sub> 25  $\mu$ g/只, 在第 14 和 28 天加强免疫 2 次, 于第 14、28、35 天尾静脉采血, 分离血清。以纯化的 HPV16 假病毒颗粒为包被抗原, 抗原稀释到 10  $\mu$ g/ml 包被。用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体作为二抗, 采用间接 ELISA 法测定血清抗体滴度。

## 2 结果

### 2.1 AP205-HPV16 $\Delta$ L2 基因的构建

以全基因合成的 AP205 和 HPV16L2 (65-71, 112-120) 序列为模板进行 PCR, 分别获得了两端含 *Hind* III、*Sal* I 酶切位点的 HPV16L2 (65 ~ 71, 112 ~ 120) 和含 *Nde* I、*Hind* III 酶切位点的 AP205 基因片段, 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见约 100bp 和 400bp 的目的基因条带 (图 1)。将 AP205 和 HPV16L2 (65 ~ 71, 112 ~ 120) 的 PCR 产物经 *Hind* III 酶切后连接, 酶切产物电泳分析, 可见约 500bp 基因条带, 大小与预期一致 (图 2)。

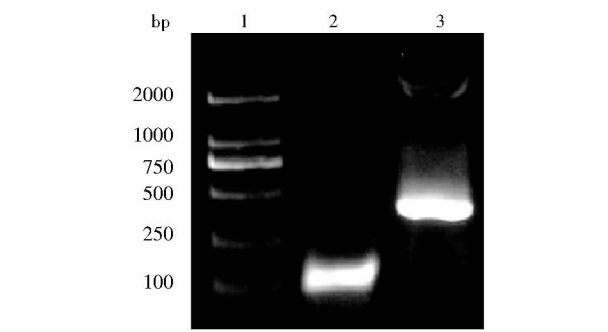


图 1 AP205 和 HPV16L2(65 ~ 71,112 ~ 120) 基因 PCR 扩增产物的凝胶电泳分析

Fig. 1 Analysis of PCR amplified AP205 and HPV16L2 (65 ~ 71,112 ~ 120) gene  
1:DNA marker 2000;2: AP205 amplification;  
3: HPV16L2 (65 ~ 71,112 ~ 120) amplification

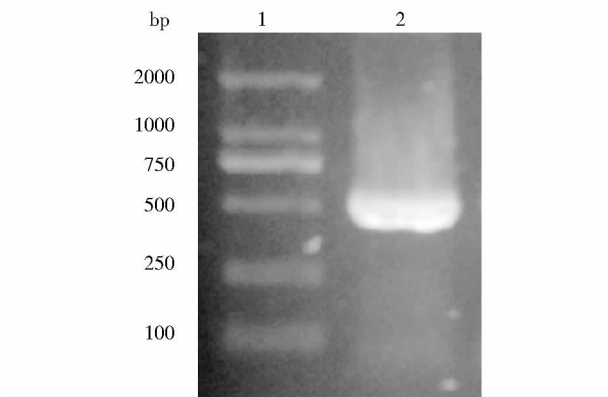


图 2 AP205 和 HPV16L2(65 ~ 71,112 ~ 120) 基因的连接产物鉴定

Fig. 2 The connection of AP205 和 HPV16L2 (65 ~ 71,112 ~ 120)

1:DNA marker 2000;2:AP205-HPV16L2(65 ~ 71,112 ~ 120)

2.2 重组 pET30-AP205-HPV16ΔL2 质粒的鉴定

连接的 AP205-HPV16ΔL2 基因与 pET-30a(+) 质粒分别经 *Nde* I、*Sal* I 双酶切后相连,构建重组 pET30-AP205-HPV16ΔL2 表达载体,经酶切鉴定(图 3)和测序结果表明,AP205-HPV16ΔL2 基因序列与预期一致。

2.3 表达产物的鉴定

含 pET30-AP205-HPV16ΔL2 表达载体的工程菌诱导表达后,超声破菌。经 15% SDS-PAGE 分析,重组蛋白以可溶形式表达,其相对分子质量约 21kDa(图 4),凝胶扫描分析,重组蛋白约占菌体总蛋白 40% 左右。

2.4 纯化产物的鉴定

重组 AP205-HPV16ΔL2 蛋白经 Sepharose 4FF 凝胶

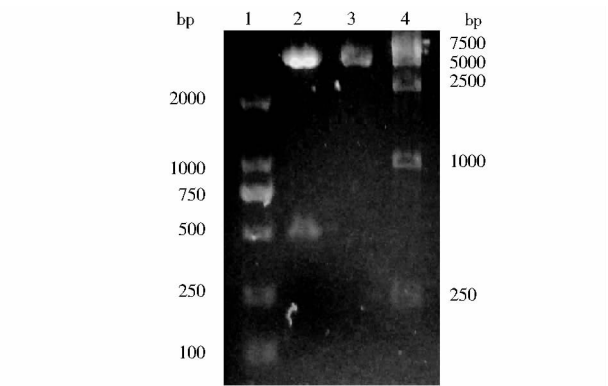


图 3 重组质粒酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pET30-AP205-HPV16ΔL2 by enzyme digestion

1: DNA marker DL2000; 2: Recombinant plasmid pET30-AP205-HPV16ΔL2 digested with *Nde* I/*Sal* I; 3: Recombinant plasmid pET30-AP205-HPV16ΔL2; 4: DNA marker DL15000

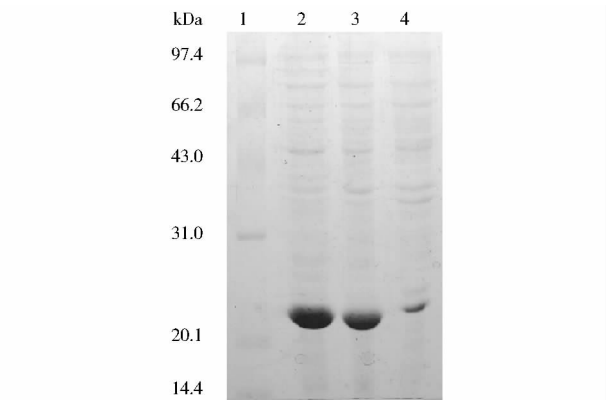


图 4 AP205-HPV16ΔL2 基因在 *E. coli* BL21 中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of AP205-HPV16ΔL2 gene expressed in *E. coli* BL21

1:Protein marker;2: Supernatant of lysate of *E. coli* BL21 (AP205-HPV16ΔL2) with IPTG induction; 3: BL21 (AP205-HPV16ΔL2) with IPTG induction; 4: BL21 (AP205-HPV16ΔL2) before IPTG induction

层析纯化,SDS-PAGE 凝胶扫描分析,蛋白纯度达 90% 以上(图 5)。

2.5 重组蛋白抗原性鉴定

Western blot 分析表明,纯化的 AP205-HPV16ΔL2 蛋白可与抗 HPV16L2(40 ~ 150) 单克隆抗体特异性结合,在相对分子质量约 21kDa 处可见明显条带(图 6),表明纯化的 AP205-HPV16ΔL2 蛋白具有良好的抗原性。

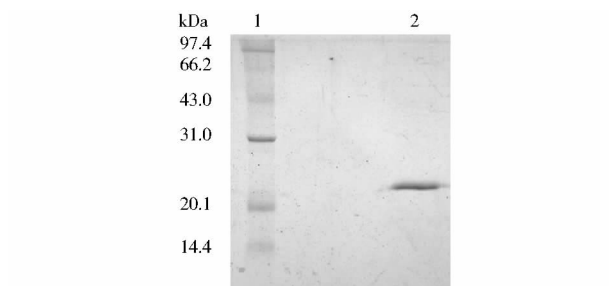


图5 纯化的 AP205-HPV16 $\Delta$ L2 蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 The purification of AP205-HPV16 $\Delta$ L2 protein

1: Protein marker; 2: Purified AP205-HPV16 $\Delta$ L2 protein

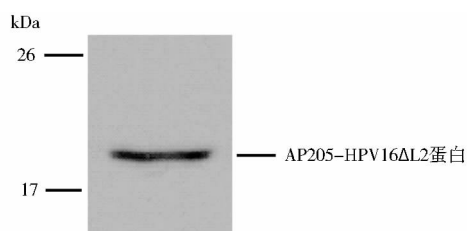


图6 AP205-HPV16 $\Delta$ L2 蛋白的 Western blot 分析

Fig. 6 Western blot of AP205-HPV16 $\Delta$ L2 protein

## 2.6 纯化蛋白的电镜观察

透射电镜观察可见典型病毒样颗粒,大小均一,直径约为 30 nm(图 7)。

## 2.7 重组蛋白 AP205-HPV16 $\Delta$ L2 免疫原性测定

间接 ELISA 结果见表 1,单纯注射 AP205-

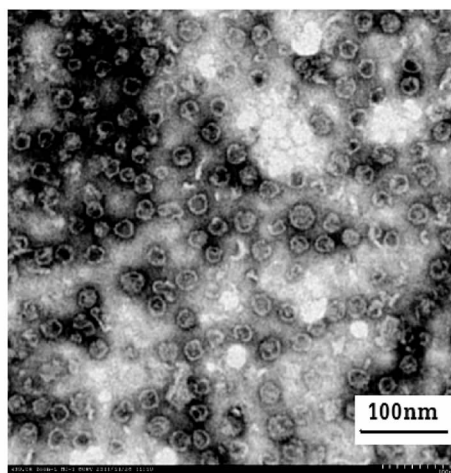


图7 透射电镜观察 AP205-HPV16 $\Delta$ L2 VLP 颗粒

Fig. 7 Transmission electron microscopy of AP205-HPV16 $\Delta$ L2 VLPs

HPV16 $\Delta$ L2 蛋白的 B 组和加佐剂的 C 组在 3 次免疫后都产生了高滴度的抗体。在同组不同针次间,无佐剂组免疫 3 次后,小鼠每针次后的抗体水平各不相同,佐剂组免疫后各针次后抗体水平亦不相同,经两两比较,差异均有统计学意义( $P$  值均小于 0.05),说明经过多针注射可增强重组蛋白的免疫效果。在不同组相同针次间,每一针次 B、C 组间抗体水平相差不大,统计学上无显著性差异(各  $P$  值均大于 0.05),说明氢氧化铝佐剂未明显增强 AP205-HPV16 $\Delta$ L2 蛋白的免疫原性。

表 1 小鼠血清中特异性抗 AP205-HPV16 $\Delta$ L2 IgG 抗体几何平均滴度

Table 1 GMT of serum IgG anti-AP205-HPV16 $\Delta$ L2

Group	Immunogen	GMT(1;x)		
		1 <sup>st</sup> dose	2 <sup>nd</sup> dose	3 <sup>rd</sup> dose
B	AP205-HPV16L2	16384(9/10)	65536(10/10)	155872(10/10)
C	AP205-HPV16L2 and Al(OH) <sub>3</sub>	16384(10/10)	75281(10/10)	131072(10/10)

## 3 讨论

当前,HPV 疫苗的研究主要集中在预防性疫苗和治疗性疫苗两大方向,治疗性疫苗尚未取得重大突破,预防性疫苗则已有成品上市。目前上市的 HPV 疫苗都是以主要衣壳蛋白 L1 为基础生产,默克公司的四价“Gardasil”疫苗,可预防 70% 以上由 HPV16 和 18 型引起的宫颈癌以及约 90% 肛门癌,另外还能预防 HPV6 和 11 型引起的尖锐湿疣<sup>[7]</sup>。另一种上市疫苗是葛兰素史克公司的二价 HPV 疫苗“Cervarix”,可预防 HPV16 型和 18 型引起的宫颈癌<sup>[8]</sup>。虽然上述疫苗可

以对相应型别的 HPV 感染产生高度有效的保护作用,但是由于主要衣壳蛋白 L1 高度变异,无法产生交叉免疫性,所以它们并不能完全保护机体免受其他宫颈癌 HPV 型别的感染。目前研究发现,HPV 次要衣壳蛋白 L2 虽然免疫原性较低,但其在 HPV 各型中有高度保守性,L2 蛋白上有许多表位能与其他基因型的 HPV 发生交叉反应,因此 L2 蛋白成为目前 HPV 疫苗研究的新热点<sup>[9]</sup>。

AP205 蛋白是一种 RNA 噬菌体 QB 的主要衣壳蛋白,180 个 AP205 蛋白单体可组装成二十面体的 VLP。AP205 蛋白可在大肠杆菌中高效表达,并可自行组装成 VLP。AP205 的 N 端和 C 端都可携带目的蛋白,当

其组装成 VLP 颗粒时,可将抗原表位展示在 VLP 颗粒表面,从而增加了抗原的浓度。Jegerlehner 等<sup>[10]</sup>将长达 55 个氨基酸的含 Nef 共有序列 T 细胞表位的 HIV 肽段连接到 AP205 上,成功组装成了 VLP 颗粒,且将目的蛋白展示在 VLP 颗粒表面。为检测以 AP205 VLP 为平台的疫苗能否在体内诱导高强度免疫应答,他们还将鼠类的促性腺激素释放激素(GnRH)偶联到 AP205 VLP 上。在初次免疫 28 天后,小鼠体内睾酮浓度显著下降,睾丸体积缩小,重量降低,说明偶联到 AP205 VLP 上的 GnRH 在小鼠体内打破了 B 细胞对自身抗原 GnRH 的无反应性,诱导了有效的免疫应答。迄今为止的研究表明,连接在 AP205 VLP 上的目的蛋白,都引起了高强度的免疫应答。

以 HPV L1 蛋白为基础的疫苗只对本基因型 HPV 有效,以 L2 蛋白为基础的疫苗虽然可以与其他基因型 HPV 发生交叉反应但免疫原性较低。HPV16 L2 蛋白的 65~71 位氨基酸表位可与 HPV16、18、56、6b 型反应,112~120 位氨基酸表位可与 HPV6、16、18 型发生交叉中和。用引起免疫应答关键部分的表位取代完整的抗原成分可改善疫苗的安全性,同时通过 VLP 展示表位可增加抗原的免疫原性和稳定性,克服表位疫苗的分子小,免疫原性差,半衰期短,还可能引起免疫耐受的不足之处。将抗原表位与 VLP 偶联,低剂量即能激起强烈的免疫反应,有利于打破肿瘤和病毒慢性感染所产生的免疫耐受,而且使 VLP 展示表位疫苗具备直接用于治疗的可能性。本研究尝试将 HPV16 L2 蛋白的 65~71、112~120 表位与 AP205 蛋白偶联形成 AP205-HPV16 $\Delta$ L2 VLP 颗粒,以期其既能预防多种基因型 HPV 感染,又能产生高效免疫应答。为了能让目的蛋白以最佳方式展示在 AP205 VLP 表面,我们在 65~71、112~120 表位之间以及它们与 AP205 蛋白之间引入了长短两个连接肽(GTAGGGSG, GSG)。长的连接肽由 8 个氨基酸组成,来自 QB 衣壳蛋白的 A1 延长区域,短的连接肽由 3 个氨基酸残基组成。连接肽的引入,有可能促进 AP205-HPV16 $\Delta$ L2 VLP 的正确形成<sup>[11]</sup>。将重组表达质粒 pET30-AP205-HPV16 L2 转化大肠杆菌 BL21,获得了高效的可溶性表达,负染后透射电镜下观测,可见有明显特征的直径 30 nm 左右的 VLP 颗粒。

将 AP205-HPV16 $\Delta$ L2 VLP 免疫 ICR 小鼠后,佐剂组与无佐剂组都产生了高滴度的抗 AP205-HPV16 $\Delta$ L2 IgG 抗体,说明 AP205-HPV16 $\Delta$ L2 融合蛋白能刺激机体

产生有效的免疫应答,但无佐剂组与有佐剂组抗体滴度并无明显差异。这可能跟 AP205 VLP 具有高度免疫原性,并且可诱导所展示抗原的强免疫应答等特性有关。研究表明,病毒表面上抗原的组织程度和重复性是免疫系统识别自我和外来物的强烈信号,AP205 可以将所连接的蛋白以规则、重复阵列形式呈递到 VLP 的表面,有利于抗原呈递细胞(APCs)对其加工处理。此外 AP205 蛋白还可将可溶性抗原连接到其表面,形成颗粒抗原,有利于 APCs 的吞噬。这些特点与铝佐剂的作用效果类似,铝佐剂通过静电吸引力,疏水作用,配体交换等作用力与抗原吸附,亦可将可溶性抗原与其结合形成颗粒抗原来促进 APCs 对抗原的处理<sup>[12-13]</sup>。所以佐剂组与无佐剂组抗体滴度差别不明显可能跟 AP205 蛋白对抗原的某些特点与铝佐剂类似有关,不过二者对免疫记忆从而对长期免疫的影响还未可知,有待进一步观察。

综上所述本文成功表达了 AP205-HPV16L2 融合蛋白,并在电镜下观察到典型的 VLP 颗粒,融合蛋白免疫小鼠后显示重组蛋白具有良好的免疫原性,为今后多种基因型 HPV 感染的交叉保护作用等研究奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55 (2): 74-108.
- [2] de Villiers E M, Fauquet C, Broker T R, et al Classification of papillomaviruses. *Virology*, 2004, 324: 17-27.
- [3] Harper D M, Franco E L, Wheeler C M, et al. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: Follow-up from a randomised control trial. *Lancet*, 2006, 367: 1247-1255.
- [4] Karanam B, Jagu S, Huh W K, et al. Developing vaccines against minor capsid antigen L2 to prevent papillomavirus infection. *Immunology and Cell Biology*, 2009, 87: 287-299.
- [5] Pereira R, Hitzeroth I I, Rybicki E P. Insights into the role and function of L2, the minor capsid protein of papillomaviruses. *Arch Virol*, 2009, 154: 187-197.
- [6] Tissot A C, Renhofa R, Schmitz N, et al. Versatile virus-like particle carrier for epitope based vaccines. *PLoS One*, 2010, 5: e9809.
- [7] Harper D M, Franco E L, Wheeler C, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus - like partical vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomized controlled trial. *Lancet*, 2004, 364 (9447): 1757-

- 1765.
- [ 8 ] Harper D M. Impact of vaccination with Cervarix™ on subsequent HPV-16/18 infection and cervical disease in women 15-25 years of age. *Gynecologic Oncology*, 2008, 110: S11-S17.
- [ 9 ] 徐海燕, 辛晓燕, 蔡国青. HPV L2 肽段宫颈癌疫苗的研究进展. *中国妇幼健康研究*, 2008, 19(5): 489-491.
- Xu H Y, Xin X Y, Cai G Q. Progress in research on HPV minor capsid protein L2 vaccine for cervical carcinoma. *Chinese Journal of Woman and Child Health Research*, 2008, 19(5): 489-491.
- [ 10 ] Jegerlehner A, Tissot A, Lechner F, et al. A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses. *Vaccine*, 2002, 20: 3104-3112.
- [ 11 ] Kozlovskaya T M, Cielens I, Dreilinn D, et al. Recombinant RNA phage Q beta capsid particles synthesized and self-assembled in *Escherichia coli*. *Gene*, 1993, 137: 133-137.
- [ 12 ] Mannhalter J W, Neychev H O, Zlabinger G J, et al. Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide; effect on antigen uptake and antigen presentation. *Clin Exp Immunol*, 1985, 61(1): 143-151.
- [ 13 ] Iyer S, HogenEsch H, Hem S L. Relationship between the degree of antigen adsorption to aluminum hydroxide adjuvant in interstitial fluid and antibody production. *Vaccine*, 2003, 21: 1219-1223.

## Prokaryotic Expression and Immunogenicity Analysis of HPV16 L2 Peptide Coupled to AP205VLP

JIANG Bo BI Yan-wei ZHANG Ying-ying CAI Lu-kui JI Qiu-yan LI Zhi-hua XU Wei-ming

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

**Abstract** Objective: To connect the residues 65 ~ 71 and 112 ~ 120 of HPV minor capsid protein L2 to the coat protein of RNA bacteriophage AP205. The fusion protein was self-assembled into virus-like-particles (VLPs) after expressing in *E. coli*, then the protein was purified and the immunogenicity was analyzed. Methods: After being synthesized artificially, the AP205 coat protein gene and HPV16L2 gene were connected by PCR and cloned into vector pET-30a(+). The constructed plasmid pET30-AP205-HPV16 $\Delta$ L2 was transformed to *E. coli* BL21 (DH3), the recombinant protein was expressed under induction of IPTG and purified by Gel chromatography, then identified through SDS-PAGE and Western blot. The immunogenicity of purified product was measured by indirect ELISA after ICR mouse was immunized. Results: Recombinant plasmid pET30-AP205-HPV16 $\Delta$ L2 was constructed correctly and the protein was expressed solubly in *E. coli* BL21 (DH3). The typical VLPs can be observed through Transmission electron microscopy which Showed good immunogenicity in animal experiments. Conclusion: The HPV16L2 epitope was fused successfully to the N-terminus of AP205 coat protein, and The VLPs was self-assembled in *E. coli*.

**Key words** Human papillomavirus L2 protein AP205 VLP