



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104371025 B

(45)授权公告日 2017.11.10

(21)申请号 201410666087.6

(22)申请日 2014.11.19

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104371025 A

(43)申请公布日 2015.02.25

(66)本国优先权数据
201410017908.3 2014.01.15 CN

(73)专利权人 扬州大学
地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72)发明人 焦新安 殷月兰 段斐斐 潘志明
陈祥 孙林 黄金林

(74)专利代理机构 上海光华专利事务所 31219
代理人 许亦琳 余明伟

- (51) Int. Cl.
- C07K 19/00(2006.01)
 - C12N 15/62(2006.01)
 - C12N 15/74(2006.01)
 - C12N 1/21(2006.01)
 - A61K 39/12(2006.01)
 - A61K 48/00(2006.01)
 - A61P 31/20(2006.01)
 - A61P 35/00(2006.01)
 - C12R 1/01(2006.01)

(56)对比文件

- US 2009081248 A1,2009.03.26,
- US 2009081248 A1,2009.03.26,
- Gunn G.R.等.Two Listeria monocytogenes Vaccine Vectors That

Express Different Molecular Forms of Human Papilloma Virus-16 (HPV-16) E7 Induce Qualitatively Different T Cell Immunity That Correlates with Their Ability to Induce Regression of Established Tumors...《The Journal of Immunology》.2001,(第167期),第6471-6479页.

Gunn G.R.等.Two Listeria monocytogenes Vaccine Vectors That Express Different Molecular Forms of Human Papilloma Virus-16 (HPV-16) E7 Induce Qualitatively Different T Cell Immunity That Correlates with Their Ability to Induce Regression of Established Tumors...《The Journal of Immunology》.2001,(第167期),第6471-6479页.

周晓辉等.李斯特菌细胞溶解素在疫苗研制中的应用.《中华微生物学和免疫学杂志》.2003,(第05期),

殷月兰等.产单核细胞李斯特菌actA/plcB缺失株的构建及其生物学特性.《微生物学报》.2008,(第03期), (续)

审查员 马静

权利要求书1页 说明书11页
序列表14页 附图4页

(54)发明名称

一种针对宫颈癌具有免疫原性的蛋白及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种针对宫颈癌具有免疫原性的融合蛋白及其应用,本发明的针对宫颈癌具有免疫原性的融合蛋白,为含有人乳头瘤病毒16

亚型E7原癌蛋白的融合蛋白,本发明还进一步公开了一种重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌,所述重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌的基因组中整合有密码子优化的HPV16 E7的编码基因.本发明的融合蛋白或其编码基因或重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌可用于制备宫颈癌疫苗。

CN 104371025 B

[接上页]

(56)对比文件

Sewell D. A.等.Recombinant Listeria Vaccines Containing PEST Sequences Are Potent Immune Adjuvants for the Tumor-Associated Antigen Human Papillomavirus-16 E7.《CANCER RESEARCH》.2004,第8821-8825

页.

Decatur A. L.等.A PEST-Like Sequence in Listeriolysin O Essential for Listeria monocytogenes Pathogenicity.《SCIENCE》.2000,第992-995页.

1. 一种多核苷酸,其编码一种针对宫颈癌具有免疫原性的融合蛋白,所述融合蛋白为在减毒重组李斯特菌中分泌表达的HPV16E7的融合蛋白,所述融合蛋白为单核细胞增生性李斯特菌溶血素蛋白LL0与HPV16E7的融合蛋白,所述融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示,所述多核苷酸中编码HPV16E7的基因序列为SEQ ID NO.6。

2. 一种载体,其含有权利要求1所述多核苷酸。

3. 一种宿主细胞,其被权利要求2所述载体转化。

4. 如权利要求3所述宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞为单核细胞增生性李斯特细菌。

5. 如权利要求4所述宿主细胞,其特征在于,所述单核细胞增生性李斯特细菌的血清型为1/2a。

6. 一种重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌,所述重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌的基因组中,野生型的hly编码基因被替换成了氨基酸序列为SEQ ID NO.3的融合蛋白的编码基因,所述重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌能融合表达单核细胞增生性李斯特菌溶血素蛋白LL0与HPV16E7的融合蛋白,所述重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌的基因组中编码所述融合蛋白的编码基因为权利要求1所述的多核苷酸。

7. 如权利要求6所述重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌,其特征在于,所述单核细胞增生性李斯特细菌的血清型为1/2a。

8. 如权利要求6所述重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌,其特征在于,所述单核细胞增生性李斯特细菌为单核细胞增生李斯特菌株yzuLM4。

9. 如权利要求6-8任一所述重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌的构建方法,包括下列步骤:

1) 合成HPV16E7蛋白编码基因片段;从单核细胞增生李斯特菌株中扩增出待插入位点的上游同源臂片段hlya和下游同源臂片段hlyb;

2) 将步骤1)获得的HPV16E7编码基因及上下游同源臂片段拼接成hlya-HPV16E7-hlyb融合片段并连接入穿梭质粒获得重组穿梭质粒;

3) 将步骤2)获得的重组穿梭质粒转化单核细胞增生性李斯特细菌,经过抗性和温度双压力筛选,再通过无抗性传代得到无抗性基因的重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌。

10. 权利要求6-8任一所述重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌在制备宫颈癌疾病疫苗上的用途。

11. 一种疫苗,包括权利要求6-8任一所述重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌。

一种针对宫颈癌具有免疫原性的蛋白及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,尤其涉及一种针对宫颈癌具有免疫原性的融合蛋白及其应用。

背景技术

[0002] 宫颈癌居于全球女性癌症发病率的第二位,是重要的公共健康问题。全球每年新发宫颈癌病例约50万,有27.3万人死于宫颈癌,其中约85%死亡病例发生在发展中国家,中国每年新增宫颈癌病例约有13.5万,占全球新发病例的1/3,因此中国也是宫颈癌高发国之一。当前,人乳头瘤病毒(HPV)已被证实是引起宫颈癌的主要病原,至少在99%宫颈癌患者组织内检测到HPV DNA。

[0003] 依据HPV的致癌危险性,分类为低危型和高危型。高度致癌危险的病毒主要包括HPV16、18、26、31、33、35、45、51、52、56、66等亚型,通常在高度鳞状上皮内病变(CIN2~3)中发现。其中HPV16、18可在绝大多数宫颈癌中发现,并且50%以上的宫颈癌患者由HPV16引起。2008年6月,历时5年的《中国妇女人乳头瘤病毒感染和宫颈癌流行病学调查》结果显示,HPV16和HPV18是导致中国妇女患子宫颈癌的最主要类型。

[0004] E7蛋白可以抑制Rb (retinoblastoma gene)的抑癌功能,从而以多种方式扰乱正常细胞周期,引起细胞周期的失控,导致细胞的过度增殖,细胞转化及恶变。E7是维持细胞转化和恶性癌变所必需的,因此E7常作为HPV血清学诊断抗原和宫颈癌治疗性疫苗研究的靶抗原。

[0005] 单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 是一种宿主谱广泛的兼性胞内菌。LM被巨噬细胞和其它吞噬细胞吞噬后,既能存在于吞噬体内,又能定居在细胞胞浆中,使LM运送的外源抗原可以同时进入MHC I类和MHC II类抗原提呈途径,从而诱导强烈的CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞免疫应答。这种独特的胞内生活史,使单增李斯特菌成为研究宿主和细菌相互作用及宿主免疫应答的模式细菌,尤其诱导强烈的CD8⁺T细胞免疫应答,其作为传染性疾病和肿瘤疾病疫苗载体具有广阔应用前景。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服现有技术中的缺陷,提供一种具有宫颈癌免疫原性的融合蛋白及其应用。

[0007] 本发明提供了一种针对宫颈癌具有免疫原性的融合蛋白,为在减毒重组李斯特菌中分泌表达的HPV16 E7的融合蛋白。

[0008] 所述融合蛋白具体为单核细胞增生性李斯特菌溶血素蛋白LLO与HPV16 E7的融合蛋白。

[0009] 所述HPV16 E7蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0010] 所述单核细胞增生性李斯特菌溶血素蛋白LLO的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0011] 所述减毒重组李斯特菌包含编码HPV16 E7蛋白的多核苷酸,所述编码HPV16 E7蛋

白的多核苷酸序列为SEQ ID NO.6。

[0012] 所述融合蛋白中,密码子优化的HPV16 E7蛋白插入于前述单核细胞增生性李斯特菌溶血素蛋白LLO的第37位和第38位氨基酸残基之间。

[0013] 进一步的,所述融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0014] 所述融合蛋白针对宫颈癌具有较强的免疫原性。

[0015] 本发明第二方面提供了一种多核苷酸,其编码所述融合蛋白。

[0016] 本发明的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。

[0017] 进一步的,所述多核苷酸中,编码HPV16 E7的基因序列为SEQ ID NO.6。

[0018] 所述多核苷酸可用于构建HPV16 E7的表达载体,并进一步构建表达HPV16 E7的宿主细胞。

[0019] 本发明第三方面提供了一种载体,其含有所述多核苷酸。

[0020] 本领域的技术人员熟知的方法能用于构建所述载体。这些方法包括重组DNA技术、DNA合成技术等。可将编码所述融合蛋白的DNA有效连接到载体中的多克隆位点上,以指导mRNA合成进而表达蛋白,或者用于同源重组。

[0021] 较佳的,所述载体为原核载体或穿梭质粒,如原核载体pMD-20T、穿梭质粒pKSV7等。

[0022] 本发明第四方面提供了一种宿主细胞,其被所述载体所转化。

[0023] 宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞。代表性例子有:大肠杆菌,链霉菌属;鼠伤寒沙门菌、李斯特细菌;真菌细胞如酵母;植物细胞;果蝇S2或Sf9的昆虫细胞;CHO,COs.293细胞、或Bowes黑色素瘤细胞的动物细胞等。

[0024] 其中,特别优选单核细胞增生性李斯特细菌(*Listeria monocytogenes*,以下简称为LM)。。

[0025] 进一步优选的,所述单核细胞增生性李斯特细菌的血清型为1/2a。如yzuLM4等。

[0026] 本发明第五方面提供了一种重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌,所述重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌的基因组中,整合有HPV16 E7基因,所述HPV16 E7基因的序列为SEQ ID NO.6,所述重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌能融合表达单核细胞增生性李斯特菌溶血素蛋白LLO与HPV16 E7的融合蛋白。

[0027] 进一步优选的,所述单核细胞增生性李斯特细菌的血清型为1/2a。如yzuLM4等。

[0028] 进一步的,所述编码HPV16 E7蛋白的基因重组整合于野生型单核细胞增生李斯特菌基因组DNA中hly基因的111位与154位碱基之间。

[0029] 进一步的,相比野生型单核细胞增生李斯特菌,本发明将野生型单核细胞增生李斯特菌hly基因的第112-153位碱基替换为HPV16 E7基因SEQ ID.6。亦即,本发明的重组减毒单核细胞增生李斯特菌中,野生型的hly编码基因被替换成了SEQ ID NO.3的融合蛋白的编码基因。

[0030] 本发明第六方面公开了所述重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌的构建方法,包括下列步骤:

[0031] 1) 合成密码子优化的HPV16 E7蛋白编码基因片段;从单核细胞增生李斯特菌株中

扩增出待插入位点的上游同源臂片段h1ya和下游同源臂片段h1yb;

[0032] 2) 将步骤1) 获得的密码子优化的HPV16 E7编码基因及上下游同源臂片段拼接成h1ya-HPV16 E7-h1yb融合片段并连接入穿梭质粒获得重组穿梭质粒;

[0033] 3) 将步骤2) 获得的重组穿梭质粒转化单核细胞增生性李斯特细菌, 经过抗性和温度双压力筛选, 再通过无抗性传代得到无抗性基因的重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌。

[0034] 进一步的, 步骤1) 中, 扩增获得的上游同源臂片段h1ya的序列为SEQ ID NO.4, 下游同源臂片段h1yb的序列为SEQ ID NO.5, HPV16 E7基因为SEQ ID NO.6。

[0035] 进一步的, 步骤1) 和3) 中所述单核细胞增生李斯特菌株的血清型为1/2a。如为单核细胞增生李斯特菌株yzuLM4等。

[0036] 进一步的, 步骤2) 可采用重叠衍生PCR技术(SOEing PCR) 拼接各片段, 再利用酶切位点将拼接片段插入穿梭载体中。

[0037] 进一步的, 步骤2) 中, 穿梭质粒可为pKSV7。拼接成的h1ya-E7-h1yb融合片段的序列为SEQ ID NO.7。

[0038] 本发明第六方面, 提供了所述的融合蛋白或其编码基因或所述重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌在制备宫颈癌疾病疫苗上的用途。

[0039] 进一步的, 所述重组细菌疫苗为针对宫颈癌疾病的治疗性疫苗。

[0040] 本发明第七方面, 提供了一种疫苗, 包括所述融合蛋白或所述重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌。

[0041] 所述疫苗中还可进一步包括佐剂。

[0042] 本发明利用单核细胞增生李斯特菌能在细胞吞噬体内存活, 同时也能从细胞吞噬体中“逃逸”出来, 进入细胞质繁殖, 诱发机体产生强烈的CD8⁺T细胞免疫应答的特性。利用同源重组技术, 将外源融合蛋白基因定点插入到载体生物基因组中。本发明惊奇的发现, 通过对HPV16 E7编码基因经过特定的优化, 获得的融合表达HPV16 E7抗原的疫苗相比未优化的融合表达HPV16 E7抗原的疫苗更能有效提高宿主对宫颈癌疾病的免疫保护效应, 其预防及治疗效果获得了进一步的提高, 为宫颈癌疫苗提供了新的思路。

附图说明

[0043] 图1是pKSV7-h1ya-E7-h1yb的Xba I与Kpn I双酶切及PCR电泳图;

[0044] M: λ -14Marker

[0045] L: DL2000Marker

[0046] 1: PCR结果

[0047] 2: pKSV7-E7-hly双酶切结果。

[0048] 图2是重组细菌的鉴定结果;

[0049] 1: DL2000Marker

[0050] 2: LM4 Δ hly::E7-1 PCR产物。

[0051] 图3是蛋白水平检测目的基因的表达

[0052] M: 预染marker

[0053] 123: LM4 Δ hly::E7-1的分泌蛋白

- [0054] 4:LM4的分泌蛋白。
- [0055] 图4是分泌融合蛋白LLO-HPV16 E7的溶血活性检验
- [0056] PBS:PBS对照组
- [0057] LM4 Δ hly:单核细胞增生李斯特菌yzuLM4 Δ hly组
- [0058] LM4 Δ hly::E7-1:E7密码子优化的重组减毒菌组。
- [0059] LM4 Δ hly::E7:表达HPV16 E7抗原的重组李斯特菌
- [0060] 图5是重组菌对C57BL/6小鼠诱导产生的细胞因子的结果。
- [0061] PBS:PBS对照组
- [0062] LM4 Δ hly:单核细胞增生李斯特菌yzuLM4 Δ hly组
- [0063] LM4 Δ hly::E7-1:E7密码子优化的重组减毒菌组。
- [0064] LM4 Δ hly::E7:表达HPV16 E7抗原的重组李斯特菌
- [0065] 图6淋巴细胞增殖实验
- [0066] PBS:PBS对照组
- [0067] LM4 Δ hly:单核细胞增生李斯特菌yzuLM4 Δ hly组
- [0068] LM4 Δ hly::E7-1:E7密码子优化的重组减毒菌组。
- [0069] LM4 Δ hly::E7:表达HPV16 E7抗原的重组李斯特菌
- [0070] 图7细胞毒性T淋巴细胞实验
- [0071] PBS:PBS对照组
- [0072] LM4 Δ hly:单核细胞增生李斯特菌yzuLM4 Δ hly组
- [0073] LM4 Δ hly::E7-1:E7密码子优化的重组减毒菌组。
- [0074] LM4 Δ hly::E7:表达HPV16 E7抗原的重组李斯特菌
- [0075] 图8免疫治疗效力评价:治疗36天时各免疫组小鼠肿瘤大小的测定
- [0076] PBS:PBS对照组
- [0077] LM4 Δ hly:单核细胞增生李斯特菌yzuLM4 Δ hly组
- [0078] LM4 Δ hly::E7-1:E7密码子优化的重组减毒菌组。
- [0079] LM4 Δ hly::E7:表达HPV16 E7抗原的重组李斯特菌
- [0080] 图9免疫治疗效力评价:各免疫组小鼠肿瘤大小的动态测定
- [0081] PBS:PBS对照组
- [0082] LM4 Δ hly:单核细胞增生李斯特菌yzuLM4 Δ hly组
- [0083] LM4 Δ hly::E7-1:E7密码子优化的重组减毒菌组。
- [0084] LM4 Δ hly::E7:表达HPV16 E7抗原的重组李斯特菌

具体实施方式

- [0085] 本发明实施例采用了下列技术方案:
- [0086] 首先,从公司合成密码子优化的HPV16 E7基因序列命名为E7-1,序列如下 (SEQ ID NO:6):
- [0087]

```
Catggtgatacaccaacattacatgaatataatgtagatttacaaccagaaacaacagatttatattggtatgaaca  
attaaatgatagtagtgaagaagaagatgaaattgatggtccagcaggtcaagcagaaccagatcgtgcacattata
```

atattgttacatTTTgttgtaaagtgtgatagtagtacattacgtttatgtgttcaaagtacacatgttgatattcgtacattagaagatttattaatgggtacattaggtattgtttgtccaattttagtagtcaaaaacca

[0088] 从单核细胞增生李斯特菌株yzuLM4中扩增出hly上游片段和下游片段,经胶回收后得到的hlya-HPV16 E7-hlyb融合片段与pMD-20T(TaKaRa公司)载体连接,转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,经PCR与双酶切验证正确的阳性克隆送至南京金斯瑞公司并测序;将测序正确的阳性克隆进行提取质粒,进而双酶切,回收目的片段,再与穿梭载体pKSV7连接,转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,经PCR与双酶切验证正确,将阳性质粒电转化至yzuLM4感受态细胞,通过抗性和温度双压力筛选,再通过无抗性传代得到无抗性基因的同源重组单核细胞增生李斯特菌。该菌为一种重组减毒菌LM4 Δ hly::E7-1。该菌可在正常生活情况下表达E7-LL0蛋白。

[0089] 构建重组减毒菌具体方法主要包括下列步骤:

[0090] 1.用PCR技术扩增出目的基因E7-1以及hly基因待插入位点的上下游同源片段hlya、hlyb。所用到的引物如下:

[0091] 正义E7F:5' -AAAGAAAATTCAATTTACATGGTGATACACCAACATT-3' (SEQ ID NO.8) 反义E7R:5' -GTGTTTCTTTTCGATTGGTGGTTTTTGACTACAAATTG-3' (SEQ ID NO.9) 回收长为327bp的E7-1基因。

[0092] 正义hlyaF:5' -CACGGGTACCAGGTTTGTGTGTCAGGTAGAGC-3' (SEQ ID NO.10) 反义hlyar:5' -TGTTGGTGTATCACCATGTGAAATTGAATTTCTTTAT-3' (SEQ ID NO.11) 回收长为543bp的hlya片段。

[0093] 正义hlybF:5' -ATTTGTAGTCAAAAACCACCAATCGAAAAGAAACACGC-3' (SEQ ID NO.12) 反义hlybR:5' -CTAGTCTAGAACTGAGATATATGCAGGAGG-3' (SEQ ID NO.13) 回收长为750bp的hlyb片段。

[0094] 2.然后利用SOEing PCR技术将三者拼接起来,再利用酶切位点将拼接片段插入穿梭载体pKSV7中。

[0095] hlya片段和E7-1基因SOEing PCR拼接为hlya-E7-1的方法:采用hlyaF、E7-1R引物对纯化的hlya片段、E7-1基因进行SOEing PCR拼接。回收长为816bp的hlya-E7片段。

[0096] hlya-E7片段和hlyb片段SOEing PCR拼接为hlya-E7-1-hlyb的方法:采用hlyaF、hlybR引物对纯化的hlya-E7片段、hlyb进行SOEing PCR拼接。回收长为1548bp的hlya-E7-1-hlyb片段。

[0097] hlya-E7-1-hlyb片段插入穿梭载体pKSV7的方法:将回收的hlya-E7-1-hlyb片段用Xba I、KpnI酶双酶切,同时用Xba I、Kpn I双酶切穿梭载体pKSV7,然后将hlya-E7-1-hlyb片段与载体进行连接。

[0098] 3.经电转化将重组质粒pKSV7-hlya-E7-1-hlyb导入单核细胞增生李斯特菌,在抗生素和温度双重选择压力下实现同源重组,再通过无抗性传代得到无抗性基因的重组减毒单核细胞增生性李斯特细菌。

[0099] 其次,将获得的重组减毒菌LM4 Δ hly::E7-1分泌蛋白进行Western-blotting实验。一抗为鼠兔蛋白E7阳性血清,二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG,显色剂为DAB和ECL,结果显示LM4 Δ hly::E7-1分泌的蛋白与E7阳性血清发生特异性的免疫学反应。

[0100] 同时,对获得的重组减毒菌LM4 Δ hly::E7-1的安全性进行初步评价,结果表明所

获得的重组减毒菌LM4 Δ hly::E7-1与yzuLM4菌株相比较,其毒性明显下降,表明其在安全性方面是可靠的。

[0101] 进一步的,对获得的重组减毒菌LM4 Δ hly::E7-1的免疫保护性方面进行了评价,结果表明所获得的重组减毒菌LM4 Δ hly::E7-1能够诱导荷瘤小鼠产生较强的免疫保护效应,且更倾向于Th1型的免疫应答;与对照组PBS组、LM4 Δ hly::E及LM4 Δ hly组相比较,重组减毒菌LM4 Δ hly::E7-1可显著抑制肿瘤生长。

[0102] 实施例1基因工程菌的构建

[0103] 1.1引物的设计

[0104] 根据公司合成的密码子优化的HPV16 E7基因序列(SEQ ID.6)分别设计一对特异性的引物E7F、E7R,引物由北京六合华大基因合成。

[0105] 根据单核细胞增生李斯特菌yzuLM4的基因组DNA的LLO上下游序列分别设计一对特异性的引物,引物由北京六合华大基因合成,采用引物为h1yaF、h1yaR;h1ybF、h1ybR。

[0106] 1.2目的基因的PCR扩增、产物回收以及克隆载体的构建

[0107] 采用天根细菌基因组DNA提取试剂盒提取单核细胞增生李斯特菌株yzuLM4基因组DNA,并从公司合成密码子优化的E7基因序列,分别以其为模板,以E7F、E7R;h1yaF、h1yaR, h1ybF、h1ybR为引物进行PCR扩增。PCR反应体系为25 μ L:

[0108]	灭菌超纯水:	17.35 μ L
	10 \times 高保真酶 Buffer:	2.5 μ L
	上游引物 (100 μ mol/L):	1 μ L
	下游引物 (100 μ mol/L):	1 μ L
[0109]	高保真 DNA 聚合酶 (5U/ μ L):	0.15 μ L
	dNTP (2.5mmol/L):	2 μ L
	细菌基因组模板或质粒:	1 μ L

[0110] PCR反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性5min,94 $^{\circ}$ C变性30s,56 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,1min,1min,30个循环,72 $^{\circ}$ C再延伸10min。PCR产物用浓度为1%的琼脂糖凝胶电泳分离,用百泰克多功能DNA纯化回收试剂盒回收327bp,543bp,750bp的DNA片段后,以E7、h1ya回收片段为模板,h1yaF、E7R作为引物进行PCR扩增,PCR反应体系为25 μ L:

[0111]	灭菌超纯水:	15.35 μ L
	10 \times 高保真酶 Buffer:	2.5 μ L
	上游引物 (100 μ mol/L):	1 μ L
	下游引物 (100 μ mol/L):	1 μ L
	高保真 DNA 聚合酶 (5U/ μ L):	0.15 μ L
	dNTP (2.5mmol/L):	2 μ L
	回收片段模板:	各 1.5 μ L

[0112] PCR反应条件为:94℃预变性5min,94℃变性30s,56℃退火30s,72℃延伸1min,30个循环,72℃再延伸10min。PCR产物用浓度为1%的琼脂糖凝胶电泳分离,用百泰克多功能DNA纯化回收试剂盒回收816bp的DNA片段后以hlyb、hlya-E7-1回收片段为模板,hlybF、hlybR作为引物进行PCR扩增,PCR反应体系为25 μ L:

灭菌超纯水:	15.35 μ L
10 \times 高保真酶 Buffer:	2.5 μ L
上游引物 (100 μ mol/L):	1 μ L
[0113] 下游引物 (100 μ mol/L):	1 μ L
高保真 DNA 聚合酶 (5U/ μ L):	0.15 μ L
dNTP (2.5mmol/L):	2 μ L
回收片段模板:	各 1.5 μ L

[0114] PCR反应条件为:94℃预变性5min,94℃变性30s,56℃退火30s,72℃延伸2min,30个循环,72℃再延伸10min。PCR产物用浓度为1%的琼脂糖凝胶电泳分离,用百泰克多功能DNA纯化回收试剂盒回收1548bp的DNA片段分别与pMD-20T载体在16℃金属浴条件下连接过夜,转化DH5 α 感受态细胞,通过PCR与双酶切验证来筛选阳性克隆。将得到的阳性克隆送至南京金斯瑞测序,测序正确的质粒命名为pMD-20T-hlya-E7-1-hlyb。

[0115] 其中,pMD-20T-hlya-E7-hlyb的测序结果如SEQ ID NO.14,均符合预期。

[0116] 1.3穿梭载体pKSV7-hlya-E7-1-hlyb的构建与鉴定

[0117] pMD-20T-hlya-E7-1-hlyb经Xba I与Kpn I双酶切后,酶切产物用浓度为1%的琼脂糖凝胶电泳分离,用百泰克多功能DNA纯化回收试剂盒回收1548bp的DNA片段后,与pKSV7载体在16℃金属浴条件下连接过夜,转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,通过PCR与双酶切验证来筛选阳性克隆,结果见图1。验证正确的质粒命名为pKSV7-hlya-E7-1-hlyb。

[0118] 1.4重组菌LM4 Δ hly::E7-1的构建

[0119] 采用电转化的方法(2200v、5ms)将重组穿梭质粒pKSV7-hlya-E7-1-hlyb转化感受态yzuLM4。接种于BHI培养基,在温度(42℃)和红霉素(10 μ g/ml)双重选择压力下连续传过8代以实现同源重组,使目的基因定点整合进细菌基因组DNA中。再在无选择压力条件下传12代以脱去穿梭质粒。将菌液稀释后涂布到BHI平板上30℃培养长出单菌落,再将单菌落转种至含有红霉素(10 μ g/ml)的BHI平板上30℃培养。挑取在BHI平板上生长、转种后不再生长的单菌落,提取基因组后进行PCR鉴定,鉴定为阳性的克隆即为重组菌LM4 Δ hly::E7-1。

[0120] PCR反应的引物为:

[0121] hlya+:5-CCGTATTCTGCTTCTAGTTGTTGG-3 (SEQ ID NO.15)

[0122] hlyb+:5-ACCTCCGTAAATTACGGCTTTGAAG-3 (SEQ ID NO.16)

[0123] PCR反应体系(25 μ l)为:

灭菌超纯水:	17 μ L
10 \times PCR Buffer:	2.5 μ L
上游引物 (100 μ mol/L):	1 μ L
[0124] 下游引物 (100 μ mol/L):	1 μ L
Taq 酶 (3U/ μ L):	0.5 μ L
dNTP (2.5mmol/L):	2 μ L
细菌基因组模板:	1 μ L

[0125] PCR反应条件为:94 $^{\circ}$ C5min;94 $^{\circ}$ C30s,55 $^{\circ}$ C30s,72 $^{\circ}$ C2min,28个循环;72 $^{\circ}$ C10min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测大小应为1548bp,见图2。

[0126] 由图2结果可知,目的基因片段成功的定点整合到单核细胞增生李斯特菌yzuLM4基因组中,且在无抗压力传代下,成功脱去了质粒,得到了无抗性的重组减毒菌LM4 Δ hly::E7-1。

[0127] 重组减毒菌LM4 Δ hly::E7的构建:

[0128] 合成HPV16 E7基因序列及其特异引物:

[0129] HPV16 E7的基因序列 (SEQ ID NO.17):

[0130]

```
atgcatggagatacacctacattgcatgaatataatgtagatttgaaccagagacaactgatctctactgttatga
gcaattaaatgacagctcagaggaggaggatgaaa tagatgggtccagctggacaagcagaaccggacagagcccatt
acaatattgtaacctttgttgcaagtgtgactctacgcttcggttggtgctgtaaaagcacacacgtagacattcgt
actttggaagacctgttaatgggcacactaggaattgtgtgccccatctgttctcagaaacataa
```

[0131] PCR扩增目的基因HPV16 E7的引物为:

[0132] 正义:5' -AAAGAAAATTCAATTTCAatggagatacacctacatt-3' (SEQ ID NO.18) 反义:5' -GTGTTTCTTTTCGATTGGTGGTGGTTTCTGAGAACAGA-3' (SEQ ID NO.19) 其余步骤及所用体系均同LM4 Δ hly::E7-1的构建,最终获得重组减毒菌LM4 Δ hly::E7。减毒菌yzuLM4 Δ hly的构建(参考Yuelan Yin,Chenju Zhang,Hui Dong,Zhongwei Niu,Zhiming Pan,Jinlin Huang,Xinan Jiao*.Protective immunity induced by a LLO-deficient *Listeria monocytogenes*.*Microbio*.54 (4):175-183,2010文献的记载构建)

[0133] 实施例2蛋白水平检测目的基因的表达

[0134] 接种实施案例1中所构建的LM4 Δ hly::E7-1至BHI液体培养基,37 $^{\circ}$ C摇床培养15小时后取1ml菌液,离心去除菌体、收集培养上清液。用TCA沉淀法得到的分泌的蛋白并进行SDS-PAGE电泳,电泳结束后,取出凝胶,量出长与宽,并剪出比胶的长与宽各短0.5cm的NC膜,剪出比胶的长与宽各短1cm的滤纸,将它们浸泡于转移缓冲液中,按滤纸—滤纸—凝胶—NC膜—滤纸—滤纸的结构,转移到电转仪中,转印结束后,取出NC膜,置于1%BSA—PBS封闭液中,封闭过夜。用含0.05%Tween20的PBS (PBST) 室温振荡洗3次,用封闭液按1:500稀释鼠免蛋白E7阳性血清作为一抗,室温振摇3h;用PBST洗5次,每次5min;用封闭液按1:3000稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG作为二抗,室温振摇1h;用PBST洗5次,每次5min;最后将NC膜分别浸于DAB (3,3-二氨基联苯胺) 溶液中显色和ECL (化学发光底物) 显色,用蒸

馏水冲洗终止反应,结果见图3。

[0135] 由图3结果可以看出,用鼠免蛋白E7阳性血清作为一抗有66kDa左右的目的条带,表明目的片段E7得到了正确的表达。

[0136] 实施例3重组菌安全性评价

[0137] 3.1分泌融合蛋白LLO-E7的溶血活性检验

[0138] 分别接种实施案例1中所构建的LM4 Δ hly::E7-1、LM4 Δ hly::E7、yzLM4 Δ hly至定量体积的BHI液体培养基,37℃摇床培养15小时后取1ml菌液,离心去除菌体、收集培养上清液。调整上清液OD600至相同大小后,取60 μ l上清液用PBS (pH 6.0) 从原液到27等倍梯度稀释后加入到加入到V形96孔血凝板中,再向各孔中加入20 μ L 1%山羊红细胞悬液,混匀,置于37℃温箱作用1小时后观察溶血情况,以50%红细胞发生溶血的孔的稀释度判为溶血效价。以PBS作为对照组。结果见图4。

[0139] 结果表明,单核细胞增生李斯特菌yzuLM4组的溶血活性在25左右,具有较强的溶血活性,而重组减毒菌LM4 Δ hly::E7-1溶血效价在23左右,溶血活性大大降低。使其在安全性上得到了保障。为该重组减毒菌后续的发展提供了安全基础。

[0140] 实施例4重组菌的免疫保护效应的评价

[0141] 4.1小鼠免疫

[0142] 按照实施例3.1中方法制备细菌,腹腔免疫6-8周龄雌性C57BL/6荷瘤小鼠,LM4 Δ hly::E7-1和对照菌株LM4 Δ hly::E7的免疫剂量为 5×10^8 CFU/只,每组6只,同时设定PBS磷酸缓冲液(100 μ L/只),免疫阴性对照组,LM4 Δ hly组,剂量为 2.15×10^8 CFU/只。第一次免疫一周后进行第二次免疫,二免7天后扑杀小鼠,进行相关免疫学试验。

[0143] 4.2小鼠脾脏淋巴细胞的制备

[0144] 将各小鼠摘取眼球采血后脱颈处死,生物安全柜内无菌取出小鼠脾脏,置于盛有3-5mL冰浴培养基(CM)的平皿中,用磨砂玻片钝端充分挤压、研磨脾细胞,使其分散成单细胞悬液;经200目铜网过滤后,4℃,1000rpm离心10min,弃掉上清,用2-3mL红细胞裂解液重悬沉淀以裂解红细胞,37℃作用3-5min,加入2倍体积的PBS终止;4℃,1000rpm离心10min,去上清,用新鲜的CM重悬并离心洗涤细胞两次,最终将细胞重悬于CM中,台盼兰染色后计数,调整细胞浓度至 1×10^7 个细胞/mL,冰浴备用。

[0145] 4.3夹心ELISA定量检测特异性IFN- γ 和IL-4细胞因子

[0146] 4.3.1细胞培养上清制备

[0147] 将上述制备的各组小鼠脾脏细胞悬液调整至 1×10^6 个/50 μ L加至96孔细胞板中,再分别加入50 μ L用CM稀释的E7₄₉₋₅₇多肽(10 μ g/mL)进行刺激,同时设立阴性对照(未刺激细胞),试验中各种处理均设3个复孔,37℃,5%CO₂培养箱培养48h。4℃,1000rpm离心5min,收集细胞培养上清备用。

[0148] 4.3.2夹心ELISA试验

[0149] 于试验前一天取ELISA板分别包被抗小鼠IFN- γ mAb及IL-4mAb,2 μ g/mL,100 μ L/孔,4℃过夜;次日PBST(磷酸盐吐温缓冲液)洗5遍,加入含1%BSA的PBS于37℃封闭2h;PBST洗5遍,加入各待检测细胞上清,100 μ L/孔,同时加入商品化标准品重组鼠IFN- γ 、IL-4分别从2000和4000pg/mL开始做系列倍比稀释作为标准曲线对照,室温静置反应3小时;PBST洗5遍,分别加入对应的生物素化检测抗体IFN- γ -biotin mAb、IL-4-biotin mAb,1 μ g/mL,

100 μ L/孔,室温放置1h;PBST洗5遍,用含1%BSA的PBS 1:1000稀释链亲和素标记的辣根过氧化物酶(streptavidin HRP),100 μ L/孔,室温放置30min;PBST洗7遍,加入TMB底物显色,2M H₂SO₄终止,酶联免疫阅读仪读取OD₄₅₀值,根据绘制的标准曲线计算各组细胞上清中IFN- γ 和IL-4细胞因子的含量(pg/mL)。

[0150] 结果如图5所示:

[0151] 在对PBS阴性对照组、缺失株LM4 Δ hly、表达E7的重组菌株LM4 Δ hly::E7-1和LM4 Δ hly::E7小鼠进行两次免疫后,取出相应免疫组小鼠的脾脏细胞,在体外分别用E7₄₉₋₅₇多肽进行刺激和孵育培养后,对脾脏细胞分泌产生的IFN- γ 和IL-4含量测定结果显示:1)PBS阴性对照组和缺失株LM4 Δ hly分泌的这两种细胞因子的含量极低,而表达E7的重组菌株LM4 Δ hly::E7-1分泌上述两种细胞因子的水平极高,这说明LM4 Δ hly::E7-1免疫小鼠后诱导小鼠产生了针对原癌蛋白E7的特异性免疫应答。2)重组减毒菌LM4 Δ hly::E7-1组的IFN- γ 分泌水平(1000pg/mL)显著高于IL-4的分泌水平(250pg/mL),这表明重组菌所诱导的免疫应答类型更倾向于Th1型的免疫应答,即细胞免疫应答。3)LM4 Δ hly::E7-1免疫组的IFN- γ 分泌水平与LM4 Δ hly::E7免疫组呈现显著性差异。综上所述,LM4 Δ hly::E7-1免疫小鼠后具有诱导小鼠产生针对原癌蛋白E7的Th1型细胞免疫应答,诱导E7多肽特异性的细胞应答的强度显著高于LM4 Δ hly::E7,该重组疫苗对于宫颈癌疾病的治疗具有潜在的应用价值。

[0152] 4.4淋巴细胞增殖实验

[0153] 将制备的各实验组小鼠脾脏单细胞悬液用培养基调整浓度至 5×10^4 个/50 μ L,加入96孔细胞板中,相应孔中加入50 μ L E7₄₉₋₅₇多肽(终浓度为10 μ g/mL)进行刺激,同时设立阴性对照(未刺激细胞)。每组均设置3个复孔,然后将细胞板置37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养48h。48h后向各试验孔中加入10 μ L BrdU标记液,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养12h。4 $^{\circ}$ C、1000rpm、8min离心,去除标记液,60 $^{\circ}$ C恒温箱中放置1h,彻底去除孔中剩余水分。200 μ L/孔加入fixdenat,37 $^{\circ}$ C孵育30min后去除fixdenat。100 μ L/孔加入anti-BrdU-POD工作液,37 $^{\circ}$ C孵育90min后去除工作液。PBS洗涤3次,100 μ L/孔加入底物,37 $^{\circ}$ C显色,显色完毕后25 μ L/孔加入1M的H₂SO₄终止反应,OD₄₅₀检测吸光度。

[0154] 图6结果显示,在E7₄₉₋₅₇多肽刺激下,LM4 Δ hly::E7-1免疫组与LM4 Δ hly::E7免疫组相比,能够诱导小鼠淋巴细胞显著性增殖($P < 0.05$),说明重组菌LM4 Δ hly::E7-1诱导小鼠细胞毒性T淋巴细胞杀伤活性显著好于LM4 Δ hly::E7。

[0155] 4.5细胞毒性T淋巴细胞(CTL)实验

[0156] 无菌取各实验组小鼠脾脏制备单细胞悬液,将其分为A和B两等份;A组细胞(CFSE^{high})用10 μ g/mL E7₄₉₋₅₇多肽刺激,37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养箱中培养45min;离心弃上清后用含5 μ M CFSE的PBS缓冲液重悬细胞,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养15min进行染色。此时,B组细胞(CFSE^{low})用含0.5 μ M CFSE的PBS缓冲液进行染色,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养15min进行染色。15min后,A、B两组分别加入5倍体积的预冷培养基终止反应,室温作用5min。将A组细胞及B组细胞1:1比例混合,以 1×10^7 细胞尾静脉注射各实验组小鼠。15h后,取各实验组小鼠的脾脏制备单细胞悬液,用适量的1%BSA的PBS重悬细胞,FACS分析A组细胞(CFSE^{high})和B组细胞(CFSE^{low})的细胞数量变化。细胞毒性T淋巴细胞的特异性杀伤率计算:特异性杀伤率 = $100 - (100 \times (\%CFSE^{high} \text{ immunized} / \%CFSE^{low} \text{ immunized}) / (\%CFSE^{high} \text{ control} / \%CFSE^{low} \text{ control}))$ 。

[0157] 图7结果显示,LM4 Δ hly::E7-1组和LM4 Δ hly::E7组荷瘤小鼠体内的CFSE^{high}峰均要显著低于CFSE^{low}峰,说明重组菌均能诱导荷瘤小鼠产生较强的E7特异性的CTL活性,LM4 Δ hly::E7-1免疫组产生的E7特异性的CTL效应高于LM4 Δ hly::E7组,而PBS组和LM4 Δ hly组小鼠体内没有产生特异性的CTL活性。通过杀伤率公式计算,LM4 Δ hly::E7-1产生的E7特异性杀伤效率为68.73%,LM4 Δ hly::E7产生的E7特异性杀伤效率为58.96%,LM4 Δ hly::E7-1杀伤效率比LM4 Δ hly::E7提高9.77%。

[0158] 4.6二次免疫后小鼠肿瘤大小

[0159] 各组实验小鼠第一次免疫一周后进行第二次免疫,二免7天后扑杀小鼠,解剖小鼠,取每只小鼠肿瘤,进行拍照。结果如图8所示。

[0160] LM4 Δ hly组及PBS组的小鼠,随时间的推移肿瘤逐渐生长,至第36天时,两组中所有小鼠因肿瘤过大而死亡;而免疫组小鼠经过疫苗LM4 Δ hly::E7-1及LM4 Δ hly::E7免疫治疗后,部分小鼠体内肿瘤完全消除,剩余小鼠则肿瘤生长缓慢(图9),LM4 Δ hly::E7-1免疫组与LM4 Δ hly::E7免疫组相比,表现出更显著的治疗性作用。

[0161] 以上的实施例是为了说明本发明公开的实施方案,并不能理解为对本发明的限制。此外,本文所列出的各种修改以及发明中方法、组合物的变化,在不脱离本发明的范围和精神的前提下对本领域内的技术人员来说是显而易见的。虽然已结合本发明的多种具体优选实施例对本发明进行了具体的描述,但应当理解,本发明不应仅限于这些具体实施例。事实上,各种如上所述的对本领域内的技术人员来说显而易见的修改来获取发明都应包括在本发明的范围内。

序 列 表

<110> 扬州大学
 <120> 一种针对宫颈癌具有免疫原性的蛋白及其应用
 <130> 143530
 <160> 19
 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Human papillomavirus
 <400> 1

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
 1 5 10 15
 [0001] Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
 20 25 30
 Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
 35 40 45
 Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
 50 55 60
 Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
 65 70 75 80
 Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
 85 90 95
 Lys Pro

<210> 2
 <211> 513
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> 融合蛋白中的 LLO 蛋白序列

<400> 2

Lys Ile Met Leu Val Phe Ile Thr Leu Ile Leu Ile Ser Leu Pro Ile

1 5 10 15

Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys Glu Asn

20 25 30

Ser Ile Ser Ser Met Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr

35 40 45

Ile Gln Gly Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly

50 55 60

Asp Ala Val Thr Asn Val Pro Pro Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn

65 70 75 80

Glu Tyr Ile Val Val Glu Lys Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn

85 90 95

[0002]

Ala Asp Ile Gln Val Val Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly

100 105 110

Ala Leu Val Lys Ala Asn Ser Glu Leu Val Glu Asn Gln Pro Asp Val

115 120 125

Leu Pro Val Lys Arg Asp Ser Leu Thr Leu Ser Ile Asp Leu Pro Gly

130 135 140

Met Thr Asn Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser

145 150 155 160

Asn Val Asn Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys

165 170 175

Tyr Ala Gln Ala Tyr Pro Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp

180 185 190

Glu Met Ala Tyr Ser Glu Ser Gln Leu Ile Ala Lys Phe Gly Thr Ala

195 200 205

Phe Lys Ala Val Asn Asn Ser Leu Asn Val Asn Phe Gly Ala Ile Ser

210	215	220	
Glu Gly Lys Met Gln Glu Glu Val Ile Ser Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr			
225	230	235	240
Asn Val Asn Val Asn Glu Pro Thr Arg Pro Ser Arg Phe Phe Gly Lys			
	245	250	255
Ala Val Thr Lys Glu Gln Leu Gln Ala Leu Gly Val Asn Ala Glu Asn			
	260	265	270
Pro Pro Ala Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu			
	275	280	285
Lys Leu Ser Thr Asn Ser His Ser Thr Lys Val Lys Ala Ala Phe Asp			
	290	295	300
Ala Ala Val Ser Gly Lys Ser Val Ser Gly Asp Val Glu Leu Thr Asn			
305	310	315	320
Ile Ile Lys Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala			
	325	330	335
[0003] Lys Asp Glu Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp			
	340	345	350
Ile Leu Lys Lys Gly Ala Thr Phe Asn Arg Glu Thr Pro Gly Val Pro			
	355	360	365
Ile Ala Tyr Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile			
	370	375	380
Lys Asn Asn Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp			
385	390	395	400
Gly Lys Ile Asn Ile Asp His Ser Gly Gly Tyr Val Ala Gln Phe Asn			
	405	410	415
Ile Ser Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Pro Glu Gly Asn Glu Ile Val			
	420	425	430
Gln His Lys Asn Trp Ser Glu Asn Asn Lys Ser Lys Leu Ala His Phe			
	435	440	445
Thr Ser Ser Ile Tyr Leu Pro Gly Asn Ala Arg Asn Ile Asn Val Tyr			

Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys
 115 120 125
 Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp
 130 135 140
 Lys Tyr Ile Gln Gly Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr
 145 150 155 160
 His Gly Asp Ala Val Thr Asn Val Pro Pro Arg Lys Gly Tyr Lys Asp
 165 170 175
 Gly Asn Glu Tyr Ile Val Val Glu Lys Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln
 180 185 190
 Asn Asn Ala Asp Ile Gln Val Val Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr
 195 200 205
 Pro Gly Ala Leu Val Lys Ala Asn Ser Glu Leu Val Glu Asn Gln Pro
 210 215 220
 Asp Val Leu Pro Val Lys Arg Asp Ser Leu Thr Leu Ser Ile Asp Leu
 [0005] 225 230 235 240
 Pro Gly Met Thr Asn Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala Thr
 245 250 255
 Lys Ser Asn Val Asn Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn
 260 265 270
 Glu Lys Tyr Ala Gln Ala Tyr Pro Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr
 275 280 285
 Asp Asp Glu Met Ala Tyr Ser Glu Ser Gln Leu Ile Ala Lys Phe Gly
 290 295 300
 Thr Ala Phe Lys Ala Val Asn Asn Ser Leu Asn Val Asn Phe Gly Ala
 305 310 315 320
 Ile Ser Glu Gly Lys Met Gln Glu Glu Val Ile Ser Phe Lys Gln Ile
 325 330 335
 Tyr Tyr Asn Val Asn Val Asn Glu Pro Thr Arg Pro Ser Arg Phe Phe
 340 345 350

Gly Lys Ala Val Thr Lys Glu Gln Leu Gln Ala Leu Gly Val Asn Ala	355	360	365	
Glu Asn Pro Pro Ala Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val	370	375	380	
Tyr Leu Lys Leu Ser Thr Asn Ser His Ser Thr Lys Val Lys Ala Ala	385	390	395	400
Phe Asp Ala Ala Val Ser Gly Lys Ser Val Ser Gly Asp Val Glu Leu	405	410	415	
Thr Asn Ile Ile Lys Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly	420	425	430	
Ser Ala Lys Asp Glu Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu	435	440	445	
Arg Asp Ile Leu Lys Lys Gly Ala Thr Phe Asn Arg Glu Thr Pro Gly	450	455	460	
[0006] Val Pro Ile Ala Tyr Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala	465	470	475	480
Val Ile Lys Asn Asn Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala Tyr	485	490	495	
Thr Asp Gly Lys Ile Asn Ile Asp His Ser Gly Gly Tyr Val Ala Gln	500	505	510	
Phe Asn Ile Ser Trp Asp Glu Ile Asn Tyr Asp Pro Glu Gly Asn Glu	515	520	525	
Ile Val Gln His Lys Asn Trp Ser Glu Asn Asn Lys Ser Lys Leu Ala	530	535	540	
His Phe Thr Ser Ser Ile Tyr Leu Pro Gly Asn Ala Arg Asn Ile Asn	545	550	555	560
Val Tyr Ala Lys Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Thr	565	570	575	
Val Ile Asp Asp Arg Asn Leu Pro Leu Val Lys Asn Arg Asn Ile Ser	580	585	590	

Ile Trp Gly Thr Thr Leu Tyr Pro Lys Tyr Ser Asn Ser Val Asp Asn
 595 600 605

Pro Ile Glu
 610

- <210> 4
- <211> 525
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- <223> 上游同源臂 hlya 序列
- <400> 4

[0007]

```

aggtttggtg tgtcaggtag agcggacatc cattgttttg tagttacaga gttctttatt 60
ggcttattcc agttattaag cgaatatget tttccgccta atgggaaagt aaaaaagtat 120
aaaataaaac agagtaataa aactaatgtg cgttgcaa attccttata caaaatggcc 180
ccctcctttg attagtatat tcctatctta aagtgaactt tatggtgagg cattaacatt 240
tgттаacgac gataaaggga cagcaggact agaataaagc tataaagcaa gcatataata 300
ttgcgtttca tctttagaag cgaatttegc caatattata attatcaaaa gagaggggtg 360
gcaaacggta tttggcatta ttaggttaaa aaatgtagaa ggagagtga acccatgaaa 420
aaaataatgc tagtttttat tacacttata ttagttagtc taccaattgc gcaacaaact 480
gaagcaaagg atgcactgc attcaataaa gaaaattcaa ttcca 525
    
```

- <210> 5
- <211> 732
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- <223> 下游同源臂 hlyb 序列
- <400> 5

```

ccaategaaa agaaacacgc ggatgaaate gataagtata tacaaggatt ggattacaat 60
    
```

aaaaacaatg tattagtata ccacggagat gcagtgacaa atgtgcccgc aagaaaaggt 120
 tacaagatg gaaatgaata tattgtttgt gagaaaaaga agaaatccat caatcaaaat 180
 aatgcagaca tteaagttgt gaatgcaatt tegagcctaa cctatccagg tgctctcgta 240
 aaagcgaatt cggaattagt agaaaatcaa ccagatgttc tcctgtaaa acgtgattca 300
 ttaacactca gcattgattt gccaggtatg actaatcaag acaataaaat cgttgtaaaa 360
 aatgccacta aatcaaacgt taacaacgca gtaaatacat tagtggaaag atggaatgaa 420
 aaatatgctc aagcttatcc aaatgtaagt gcaaaaattg attatgatga cgaaatggct 480
 tacagtgaat cacaattaat tgcgaaattt ggtacagcat ttaaagctgt aaataatagc 540
 ttgaatgtaa acttcggcgc aatcagtgaa gggaaaatgc aagaagaagt cattagtttt 600
 aaacaaatth actataacgt gaatgttaat gaacctacaa gaccttccag atttttcgge 660
 aaagctgtta ctaaagagca gttgcaagcg cttggagtga atgcagaaaa tcctcctgca 720
 tatatctcaa gt 732

<210> 6

<211> 291

[0008]

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 优化的 HPV 16 E7 编码序列

<400> 6

catggtgata caccaacatt acatgaatat atgttagatt tacaaccaga aacaacagat 60
 ttatattggt atgaacaatt aatgatagt agtgaagaag aagatgaaat tgatgggtcca 120
 gcaggtcaag cagaaccaga tcgtgcacat tataatattg ttacattttg ttgtaaatgt 180
 gatagtacat tacgtttatg tgttcaaagt acacatgttg atattcgtac attagaagat 240
 ttattaatgg gtacattagg tattgtttgt ccaatttgta gtcaaaaacc a 291

<210> 7

<211> 1548

<212> DNA

<213> Artificial

[0009]

<220>

<223> hlya-E7-hlyb 融合片段序列

<400> 7

```

aggtttgtg tgtcaggtag agcggacatc cattgitttg tagttacaga gttctttatt      60
ggcttattcc agttattaag cgaataatgct tttccgccta atgggaaagt aaaaaagtat      120
aaaataaaac agagtaataa aactaatgtg cgttgcaaat aattcttata caaaatggcc      180
ccctcccttg attagtatat tcctatctta aagtgacttt tatgttgagg cattaacatt      240
tgtaaacgac gataaagga cagcaggact agaataaage tataaagcaa gcatataata      300
ttgcgittca tctttagaag cgaatttgcg caatattata attatcaaaa gagaggggtg      360
gcaaacggta tttggcatta ttaggttaaa aatgtagaa ggagagtga acccatgaaa      420
aaaataatgc tagtttttat tacacttata ttagttagtc taccaattgc gcaacaaact      480
gaagcaaagg atgcatctgc attcaataaa gaaaattcaa tttcacatgg tgatacacca      540
acattacatg aatatatgtt agatttacaa ccagaaacaa cagatttata ttgttatgaa      600
caattaaatg atagtagtga agaagaagat gaaattgatg gtccagcagg tcaagcagaa      660
ccagatcgtg cacattataa tattgttaca ttttgttgta aatgtgatag tacattacgt      720
ttatgtgttc aaagtacaca tgttgatatt cgtacattag aagatttatt aatgggtaca      780
ttaggtattg tttgtccaat ttgtagtcaa aaaccaccaa tcgaaaagaa acacgeggat      840
gaaatcgata agtatataca aggattgatg tacaataaaa acaatgtatt agtataccac      900
ggagatgcag tgacaaatgt gccgccaaga aaaggttaca aagatggaaa tgaatatatt      960
gttgtggaga aaaagaagaa atccatcaat caaataatg cagacattca agttgtgaat      1020
gcaatttcga gcctaacctc tccaggtgct ctcgtaaaag cgaattcgga attagtagaa      1080
aatcaaccag atgttctccc tgtaaaacgt gattcattaa cactcagcat tgatttgcca      1140
ggtatgacta atcaagacaa taaaatcggt gtaaaaaatg ccactaaatc aaacgttaac      1200
aacgcagtaa atacattagt ggaaagatgg aatgaaaaat atgetcaagc ttatccaaat      1260
gtaagtgcaa aaattgatta tgatgacgaa atggcttaca gtgaatcaca attaattgcg      1320
aaatttggta cagcatttaa agctgtaa atagcttga atgtaaactt cggegcactc      1380
agtgaaggga aaatgcaaga agaagtcatt agttttaaac aaatttacta taactgtaat      1440
gttaatgaac ctacaagacc ttccagatct ttcggcaaac ctgttactaa agagcagttg      1500
caagegcttg gagtgaatgc agaaaatcct cctgcatata tctcaagt      1548

```

	<210> 8	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 8	
	aaagaaaatt caatttcaca tggatgataca ccaacatt	38
	<210> 9	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> 引物	
[0010]	<400> 9	
	gtgtttcttt tcgattggtg gtttttgact acaaattg	38
	<210> 10	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 10	
	cacgggtacc aggtttgttg tgtcaggtag agc	33
	<210> 11	
	<211> 38	
	<212> DNA	

<213> Artificial	
<220>	
<223> 引物	
<400> 11	
tgttggtgta tcaccatgtg aaattgaatt ttctttat	38
<210> 12	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 引物	
<400> 12	
atttgtagtc aaaaaccacc aatcgaaaag aaacacgc	38
[0011]	
<210> 13	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 引物	
<400> 13	
ctagtctaga acttgagata tatgcaggag g	31
<210> 14	
<211> 1677	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> pMD-20F hlya-E7-hlyb 质粒序列	

[0012]

<400> 14

tgaattcgag	ctcggtagcc	ggggatccga	ttcacgggta	ccaggtttgt	tgtgtcaggt	60
agageggaca	tecattgttt	tgtagttaca	gagttcttta	ttggcttatt	ccagttatta	120
agegaatatg	cttttccgcc	taatgggaaa	gtaaaaaagt	ataaaataaa	acagagtaat	180
aaaactaatg	tgcgttgcaa	ataattctta	tacaaaatgg	ccccctcctt	tgattagtat	240
attectatct	taaagtgact	tttatgttga	ggcattaaca	tttgtaaagc	acgataaagg	300
gacagcagga	ctagaataaa	gctataaagc	aagcatataa	tatttgcgtt	catctttaga	360
agegaatttc	gccaatatta	taattatcaa	aagagagggg	tggcaaaegg	tatttggcat	420
tattaggtta	aaaaatgtag	aaggagagtg	aaacccatga	aaaaaataat	gctagttttt	480
attacactta	tattagttag	tctaccaatt	gcgcaacaaa	ctgaagcaaa	ggatgcatct	540
gcattcaata	aagaaaatte	aatttcacat	ggtgatacac	caacattaca	tgaatatatg	600
ttagattttac	aaccagaaac	aacagattta	tattgttatg	aacaattaaa	tgatagtagt	660
gaagaagaag	atgaaattga	tggccagca	ggteaagcag	aaccagatcg	tgcacattat	720
aatattgtta	cattttgttg	taaatgtgat	agtacattac	gtttatgtgt	tcaaagtaca	780
catgttgata	ttegtacatt	agaagattta	ttaatgggta	cattaggtat	tgtttgtcca	840
attttagtgc	aaaaaccacc	aatcgaaaag	aaacacgcgg	atgaaatcga	taagtatata	900
caaggatttg	attacaataa	aaacaatgta	ttagtatacc	acggagatgc	agtgacaaat	960
gtgcccga	gaaaaggtta	caaagatgga	aatgaatata	ttgttgtgga	gaaaaagaag	1020
aaatccatca	atcaaaataa	tgcagacatt	caagttgtga	atgcaatttc	gagcctaacc	1080
tatccaggtg	ctctcgtaaa	agcgaattcg	gaattagtag	aaaatcaacc	agatgttctc	1140
cctgtaaaac	gtgattcatt	aacactcagc	attgatttgc	caggtatgac	taatcaagac	1200
aataaaaatcg	ttgtaaaaaa	tgccactaaa	tcaaacgtta	acaacgcagt	aaatacatta	1260
gtggaaagat	ggaatgaaaa	atatgetcaa	gettatccaa	atgtaagtgc	aaaaattgat	1320
tatgatgacg	aaatggctta	cagtgaatca	caattaattg	cgaaatttgg	tacagcattt	1380
aaagctgtaa	ataatagctt	gaatgtaaac	ttcggcgcaa	tcagtgaagg	gaaaatgcaa	1440
gaagaagtca	ttagttttta	acaaattttac	tataacgtga	atgttaatga	acctacaaga	1500
ccttccagat	ttttcggcaa	agctgttact	aaagagcagt	tgeaagcget	tggagtgaat	1560
gcagaaaaatc	ctctgcata	tatctcaagt	tctagactag	aatccatatg	actagtagat	1620
cctctagagt	cgacctgeag	gcatgcaagc	tttcccctat	agtgtaacct	aaatagc	1677

	<210> 15	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 15	
	ccgtattcct gcttctagtt gttgg	25
	<210> 16	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> 引物	
[0013]	<400> 16	
	acctecgtaa attacggett tgaag	25
	<210> 17	
	<211> 297	
	<212> DNA	
	<213> Human papillomavirus	
	<400> 17	
	atgcatggag atacacctac attgcatgaa tatatgttag atttgcaacc agagacaact	60
	gatctctact gttatgagca attaaatgac agctcagagg aggaggatga aatagatggt	120
	ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag	180
	tgtgactcta egettccggtt gtgcgtacaa agcacacacg tagacattcg taectttggaa	240
	gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg tgecccatct gttctcagaa accataa	297
	<210> 18	

[0014]

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 18

aaagaaaatt caatttcaca tggagataca cctacatt

38

<210> 19

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 19

gtgtttcctt tegattggtg gtggtttctg agaacaga

38

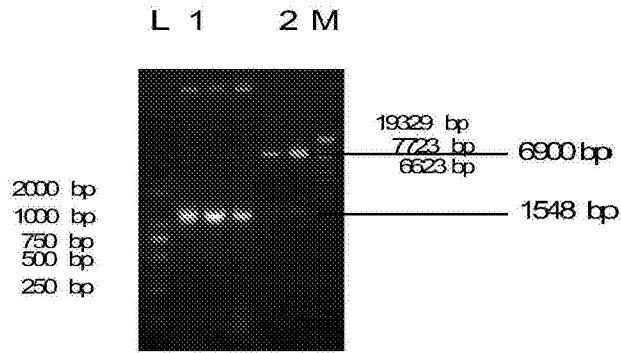


图1

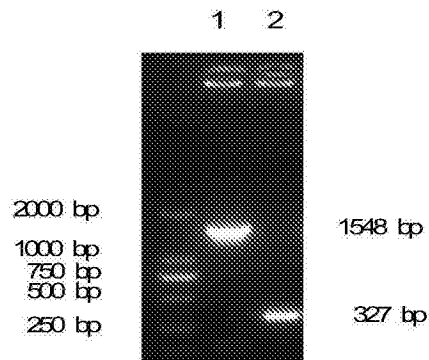


图2

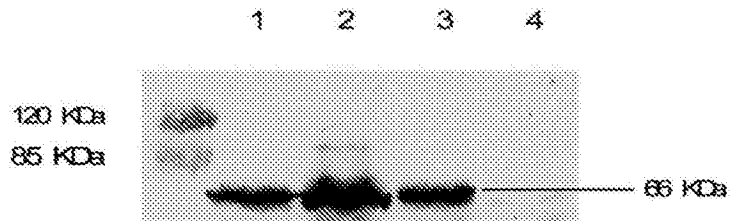


图3

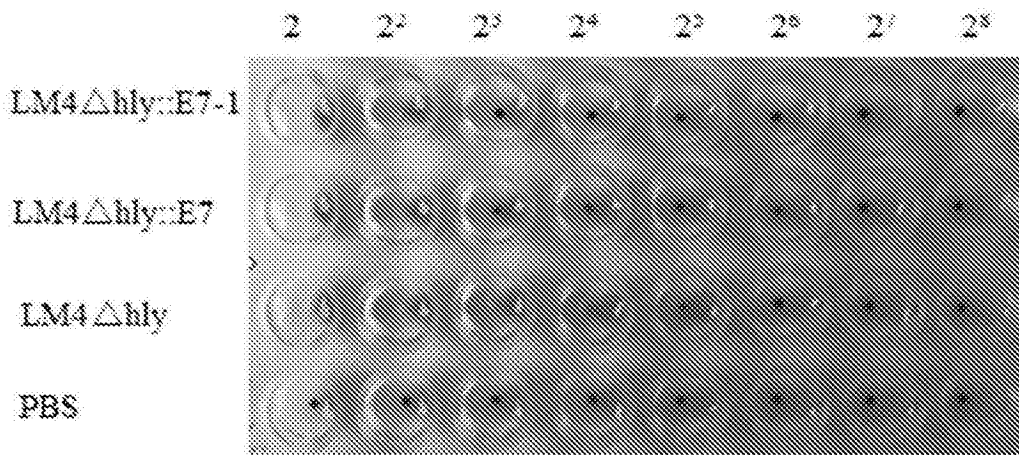


图4

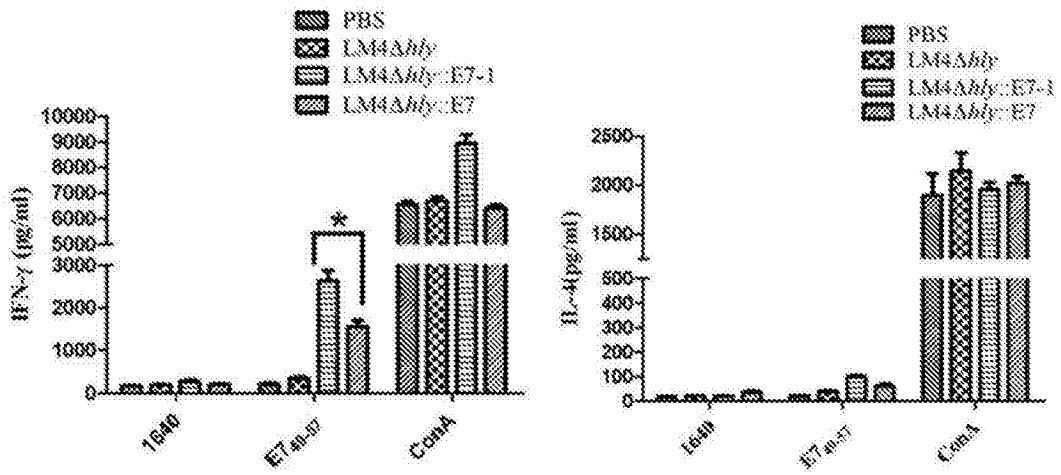


图5

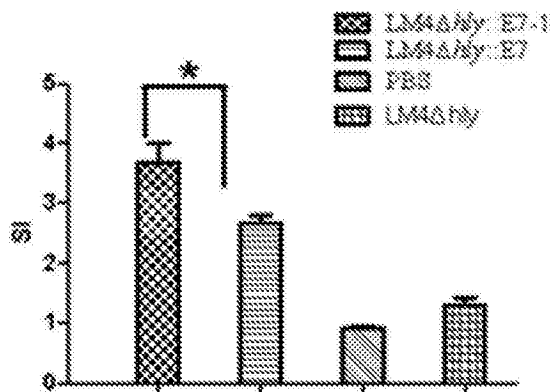


图6

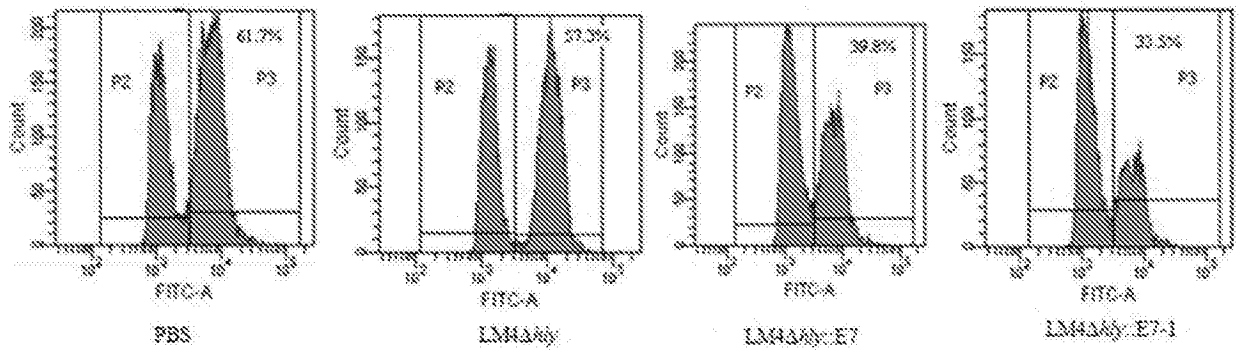


图7

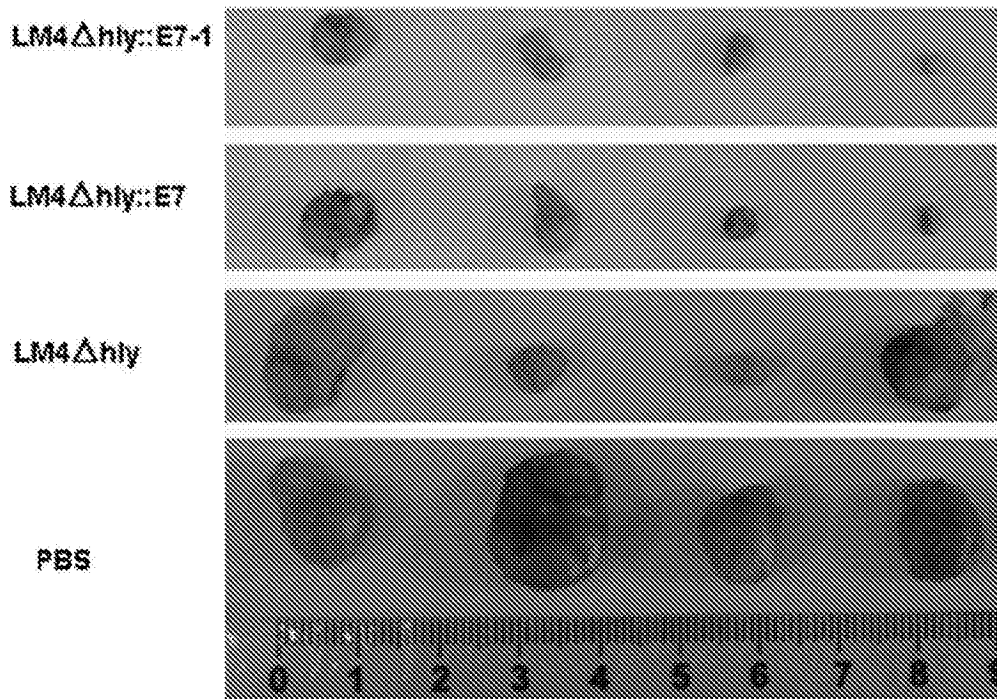


图8

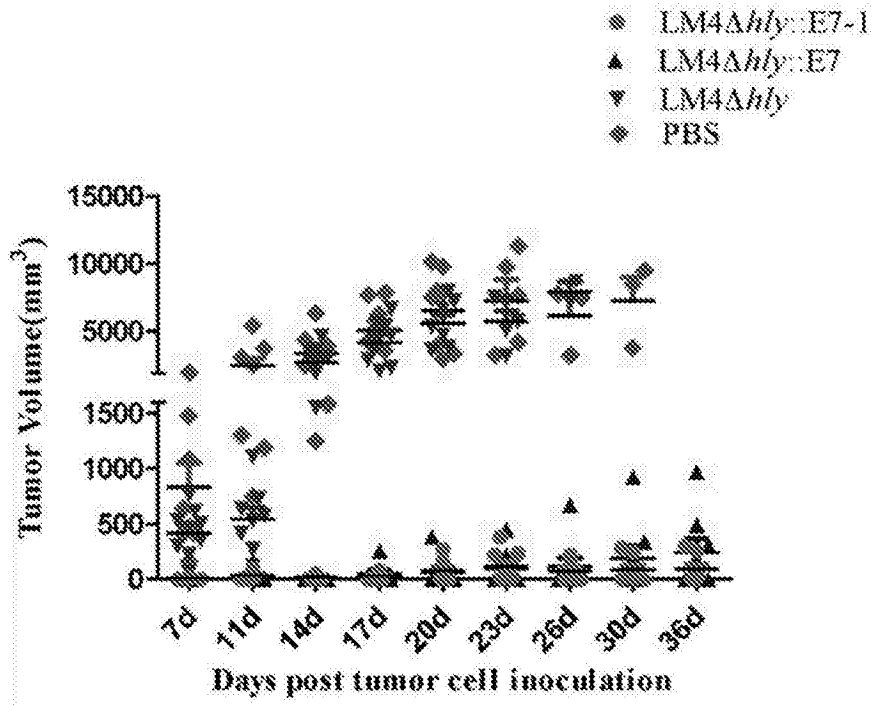


图9