

# 人乳头瘤病毒 18 型病毒样颗粒在大肠杆菌中的表达及免疫原性分析

谢明辉, 李少伟, 沈文通, 李仲艺, 庄玉娣, 莫小兵, 顾颖, 吴婷, 张军, 夏宁邵

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

**摘要:** 利用大肠杆菌表达系统可溶性表达人乳头瘤病毒 18 型(HPV18)L1 蛋白, 经过纯化和重组装过程获得 HPV18 病毒样颗粒(VLPs), 研究其免疫原性和诱发中和抗体生成的水平。首先, 提取 HPV18 的基因组 DNA, 通过 PCR 扩增获得 HPV18 L1 基因片段, 将其插入 pTrxFus 表达载体, 在大肠杆菌中可溶性表达 HPV18 L1 蛋白; 其次, 通过硫酸铵沉淀、离子交换层析和疏水相互作用层析获得高纯度的 HPV18 L1 蛋白, 而后透析去除预先加入的还原剂 DTT, 使 HPV18 L1 蛋白自发组装成 VLPs; 最后, 通过动态光散射技术和透射电子显微镜鉴定 HPV18 VLPs 的大小和形态, 利用假病毒细胞中和实验评价 HPV18 VLPs 在实验动物体内的免疫原性和中和抗体生成水平。结果表明, HPV18L1 蛋白可以在大肠杆菌表达系统中以可溶形式表达, 经过纯化的 HPV18L1 蛋白可以自发组装成为半径约为 29.34 nm、与 HPV 病毒外观相似的 VLP。该 VLPs 在小鼠体内的中和抗体半数有效剂量为 0.006  $\mu\text{g}$ , 在兔及山羊体内诱导中和抗体滴度高达  $10^7$ 。总之, 本研究利用原核表达系统可简便高效地获得具有高度免疫原性的 HPV18 VLPs, 为 HPV18 预防性疫苗的开发奠定了基础, 具有重要的应用意义。

**关键词:** 大肠杆菌表达系统, 人乳头瘤病毒 18 型, 病毒样颗粒, 免疫原性, 中和抗体

## Expression, purification and immunogenicity analysis of HPV type 18 virus-like particles from *Escherichia coli*

Minghui Xie, Shaowei Li, Wentong Shen, Zhongyi Li, Yudi Zhuang, Xiaobing Mo, Ying Gu, Ting Wu, Jun Zhang, and Ningshao Xia

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

**Abstract:** Here, we presented a method to bacterially express the major structural protein L1 of Human Papillomavirus type 18 (HPV18) as soluble form. We found that the purified L1 could self-assemble to virus-like particles (VLPs). Further, we investigated the immunogenicity and the induced level of neutralizing antibody using these VLPs. First, the genome of HPV18 was cloned from a patient in Xiamen. It was used as template for PCR amplification of HPV18 L1 gene. The resultant DNA fragment was inserted into expression vector pTrxFus and expressed in *Escherichia coli* GI724. Second, L1 protein was purified by ammonium sulfate

**Received:** March 18, 2009; **Accepted:** April 29, 2009

**Supported by:** National Natural Science Foundation (No. 30600106), National High Technology Research and Development Program (863 program) (No. 2006AA020905), the Project in National Engineering Research Center (No. 2005DC105006).

**Corresponding author:** Shaowei Li. E-mail: shaowei@xmu.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 30600106), 国家高技术研究发展计划重点项目(863 计划)(No. 2006AA020905), 国家工程中心技术研究建设项目(No. 2005DC105006)资助。

precipitation, ion-exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography; and the purified L1 was subjected to self-assembly to form VLPs with the removal of premixed reductant DTT. Finally, the size and morphology of these VLPs was investigated by Dynamic Light Scattering and Transmission Electronic Microscopy as 29.34 nm in hydrated radius and globular particles similar with native HPV18. The half effective dosage ( $ED_{50}$ ) and maximum level of neutralizing antibody elicitation were measured by vaccinations on mice, rabbit and goat using pseudovirus neutralization cell model. The results showed that the  $ED_{50}$  of HPV18 VLPs is 0.006  $\mu\text{g}$  in mice, and the maximum titer of neutralizing antibody elicited in rabbit and goat is up to  $10^7$ . As a conclusion, we can provide HPV18 VLPs with highly immunogenicity from prokaryote expression system, which may pave a new way for research and development of prophylactic vaccine for HPV18.

**Keywords:** *Escherichia coli*, human papillomavirus type 18, virus-like particles, immunogenicity, neutralizing antibody

人乳头瘤病毒 18 型(Human Papillomavirus type 18, HPV18)属于乳头瘤病毒科 A 组, 为小双链 DNA 病毒, 可以通过人体间的密切接触传播, 能引起肛生殖器粘膜的恶性肿瘤。分子流行病学调查证实, 某些型别 HPV 的持续感染与宫颈癌发生密切相关, 其中在 70% 以上的宫颈癌患者中可检出 HPV16、HPV18 感染<sup>[1]</sup>。HPV16 型多见于宫颈鳞癌, 而宫颈腺癌中常以 HPV18 型为主<sup>[2]</sup>。因此, 一种安全有效的 HPV16 与 HPV18 二价疫苗可以大大减少妇女中宫颈癌的发病率, 具有良好的社会效益和市场前景。

由于 HPV18 带有致癌基因, 且缺乏有效的 HPV 体外培养繁殖系统<sup>[3]</sup>, 因此传统的减毒疫苗及灭活疫苗形式难以适用于 HPV18 疫苗。目前, 基因工程疫苗为 HPV 疫苗研究的主要方向, 其中的病毒样颗粒(Virus-like particles, VLPs)疫苗具有不含病毒核酸, 不具致癌性, 保留了天然病毒颗粒大部分中和表位, 以及高度的免疫原性等优点而成为主要研究目标。目前已上市的 2 种 HPV 疫苗均采用真核表达系统来源的 VLP 形式。

本研究采用大肠杆菌表达系统高效可溶性地表达 HPV18 L1 蛋白, 利用离子交换、疏水相互作用层析充分去除核酸和细菌内毒素等杂质制备高纯度的蛋白, 并且通过体外组装获得具有高度免疫原性的 HPV18 VLP, 为研制 HPV18 的预防性疫苗奠定了良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

HPV18 阳性阴道分泌物标本由厦门 174 医院提供。本研究使用的 pTrxFus 原核表达载体和宿主菌 GI724 购自 Invitrogen 公司。pMD18-T 克隆载体、Taq 酶、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶均购自

TaKaRa 公司。蛋白分子量 Marker 购自 PIERCE 公司。FPLC 层析系统及层析介质为美国 GE 公司产品。克隆用的 *E. coli* 菌株 DH5 $\alpha$  为本室保存, 针对 HPV18 L1 蛋白的鼠多抗血清由本实验室自行制备。

### 1.2 HPV18 全基因组 DNA 的提取

将带有 HPV18 阳性阴道分泌物的棉拭子, 放入备有 1 mL 含蛋白酶 K(200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA)的样品管中, 充分漂洗并将棉拭子贴壁挤干。55 $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 h, 95 $^{\circ}\text{C}$  灭活 10 min, 2000 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  $\mu\text{L}$  水溶解沉淀后-20 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 非融合表达载体 pTrxFus-HPV18-L1 的构建

根据 HPV18 基因组序列 EF202155, 分别设计正向引物 H18NF: 5'-catatgtgcctgtatacacgg-3' (下划线所示为 *Nde* I 酶切位点), 反向引物 H18CR: 5'-gtcgactttactctctggcagctacac-3' (其中下划线所示为 *Sal* I 酶切位点), 以 HPV18 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 57 $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。以 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 并且回收扩增片段。将该片段命名为 18L1, 将其插入 pMD18-T 载体中, 获得重组载体 pMD18-T-18L1。以该重组载体转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 转化克隆经基因测序确认(上海生工公司)。

pMD18-T-18L1 经 *Nde* I/*Sal* I 酶切处理获得 18L1 基因片段接入同样酶切处理的 pTrxFus 载体, 连接产物转化大肠杆菌 GI724 感受态细胞, 酶切鉴定获得非融合表达载体 pTrxFus-18L1。

### 1.4 HPV18-L1 的表达与纯化

取 1  $\mu\text{L}$  的 pTrxFus-18L1 质粒(0.15 mg/mL)转化

40  $\mu\text{L}$  感受态大肠杆菌 GI724, 挑取单克隆菌落至含 4 mL 氨苄抗性液体 IMC 培养基的试管中, 30°C、220 r/min 振荡培养 10 h 后转接种至 500 mL 氨苄抗性 IMC 培养基中, 30°C、220 r/min 振荡培养。当  $OD_{600}$  值达 0.7 时, 加入 L-色氨酸(Trp)至终浓度为 0.6 mmol/L, 25°C 诱导培养 8 h。

离心收集菌体, 按 1 g 菌体对应 10 mL 裂解液 (20 mmol/L Tris 缓冲液, pH 7.2, 300 mmol/L NaCl) 的比例重悬菌体。以超声破碎菌体后, 离心获得菌体裂解上清。留取少量菌体裂解上清进行 SDS-PAGE 检测, 往菌体裂解上清中加入饱和硫酸铵至 25% 饱和度, 于 4°C 静置 1 h。待充分沉淀后, 离心收集沉淀。以 1/10 裂解上清体积的 10 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 8.0), 300 mmol/L NaCl 重悬沉淀, 充分搅拌后, 离心留取上清。采用美国 GE 公司生产的 AKTA explorer 100 制备型液相层析系统进行一步纯化。纯化所用层析介质为: SP Sepharose 4 Fast Flow。以 10 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 8.0), 100 mmol/L NaCl 的条件上样, 10 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 8.0), 300 mmol/L NaCl 洗脱杂蛋白, 10 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 8.0), 500 mmol/L NaCl 洗脱目的蛋白。将阳离子交换色谱纯化步骤中洗脱的目的蛋白样品补充 NaCl 至 2 mol/L, 继续进行疏水相互作用层析纯化, 所用介质为 Butyl Sepharose 4 Fast Flow。以 2 mol/L NaCl (pH 8.0) 条件上样, 500 mmol/L NaCl 洗脱杂蛋白, 200 mmol/L NaCl 洗脱目的蛋白。收集上述表达纯化过程中不同阶段的目的蛋白样品, 并且进行常规的 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测, 用于的检测抗体为针对 HPV18 L1 特异的小鼠多抗。

### 1.5 HPV18 病毒样颗粒的组装

将经过疏水相互作用层析纯化后的目的蛋白中补充 DTT 至终浓度为 100 mmol/L, 置于室温充分反应 10 h。而后将目的蛋白透析至 10 倍体积的 PBS 中, 充分去处还原剂 DTT, 使得目的蛋白组装为病毒样颗粒(VLPs)。

## 1.6 HPV18 VLPs 的形态学检测及其免疫原性测定

### 1.6.1 动态光散射分析

HPV18 VLPs 样品经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后, 使用 DynaPro MS/X 型动态光散射仪(含温度控制器)(美国 Protein Solutions 公司)测量其颗粒水化半径以及

组装率。

### 1.6.2 透射电镜观察

HPV18 VLPs 经 2% 磷钨酸 (pH 7.0) 负染, 固定于喷炭的铜网上。用 JEM2100 透射电镜(日本电子公司)设定放大倍率为 50 000 倍, 观察颗粒。

### 1.6.3 动物免疫效果评价

1) HPV-18 假病毒中和模型的建立: 将 293FT 细胞(Invitrogen 公司)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  $\mu\text{L}$  分别与 50  $\mu\text{L}$  稀释于 10% DMEM 的 HPV-18 假病毒液 (moi=0.1) 混合, HPV-18 假病毒颗粒制备方法参见文献[5]。将上述混合物 4°C 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°C 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)  $\times 100\%$ 。

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被视为具有中和能力。

2) HPV18 VLPs 免疫小鼠的半数有效剂量 ( $ED_{50}$ ) 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, HPV18 VLPs 与自制的铝佐剂混合, 起始剂量为 0.100  $\mu\text{g}$ /只, 3 倍梯度稀释, 共 5 个剂量组, 另设 1 个佐剂组作为阴性对照, 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 ( $ED_{50}$ ) 的计算。

3) HPV18 VLPs 免疫兔诱发的中和抗体滴度: 实验动物为经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) 2 只, 以 HPV18 VLPs 进行免疫。初免时, HPV18 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 100  $\mu\text{g}$ /只, 此后分别于 4、10 周各加强一次, 加强免疫剂量为 50  $\mu\text{g}$ /只, 每周抽取外周

静脉血, 分离血清, 按上述方法检测中和抗体滴度。

4) HPV18 VLPs 免疫羊诱发的中和抗体滴度: 实验动物为经上述中和实验鉴定其血清无中和能力的雄性山羊 2 只, 以 HPV-18 L1 VLP 进行免疫。初免时, HPV-18 L1 VLP 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, 此后分别于 4、10、18 周各加强 1 次, 加强免疫剂量为 0.5 mg/只。每周抽取外周静脉血, 分离血清, 按上述方法检测中和抗体滴度。

## 2 结果

### 2.1 HPV18 L1 蛋白的表达与纯化

如图 1 所示, HPV18 L1 蛋白主要以可溶形式表达于大肠杆菌菌体裂解上清中(泳道 1), 蛋白分子量约为 55 kD。目的蛋白经过硫酸铵沉淀初纯步骤之后, 纯度有了明显的提高(泳道 2)。进一步经过阳离子交换及疏水相互作用层析纯化之后, 目的蛋白的纯度达到了 98%以上(泳道 4)。

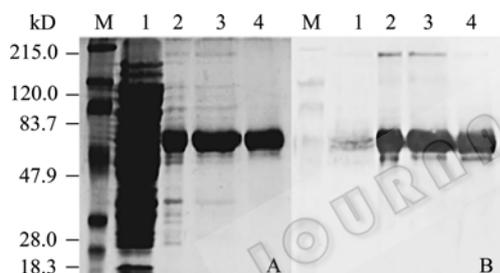


图 1 HPV18 L1 表达与纯化的 SDS-PAGE 和 Westem blotting 分析

Fig. 1 SDS-PAGE and Westem blotting analysis for HPV18 L1 in different purification steps. (A) SDS-PAGE (10%, reduced). (B) Westem blotting. M: molecular marker; 1: supernatant of bacterial lysate; 2: amino sulfate precipitation; 3: cation ion-exchange chromatography; 4: hydrophobic interaction chromatography.

### 2.2 HPV18 VLPs 的颗粒性分析

动态光散射分析结果见图 2, HPV18 VLPs 在溶液中呈现为较均一的单一组分, 水化分子动力学半径为 29.38 nm, 分散度为 21.3%, 颗粒组装率接近 100%, 无明显的亚单位(五聚体)组分存在。HPV18 VLPs 的半径与 HPV18 天然病毒颗粒相近。

透射电镜观察结果见图 3, HPV18 VLPs 在视野中呈现为均一的、半径 30 nm 左右的球状空心颗粒, 大小与 HPV18 天然病毒颗粒相近, 视野中未见游离

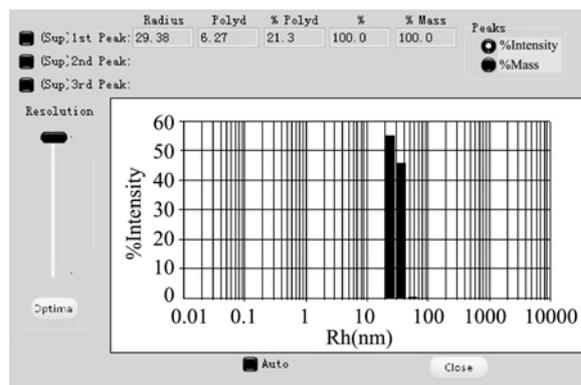


图 2 HPV18 VLPs 的动态光散射分析

Fig. 2 Dynamic light scattering analysis for HPV18 VLPs. Rh: hydrated dynamic radius; Polyd: polydiversity; %Polyd: percentage of polydiversity of the interest component; %Inten: percentage of intensity distribution; %Intensity: selected for the calculation.

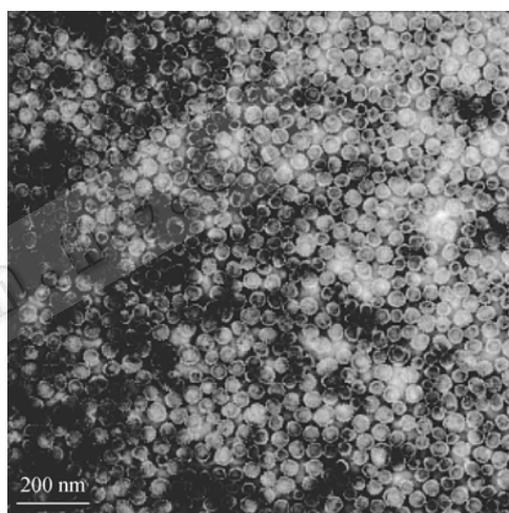


图 3 HPV18 VLPs 的透射电子显微检镜观察

Fig. 3 Transmission electron micrograph of HPV18 VLPs.

的亚单位(五聚体)组分, 与动态光散射技术测得的结果一致。

### 2.3 HPV18 VLPs 在小鼠体内的半数有效剂量测定

HPV18 VLPs 的半数有效剂量测定实验结果如表 1, 大于 0.033  $\mu\text{g}$  的剂量可使 100% 的小鼠中和抗体阳转, 小于 0.001  $\mu\text{g}$  的剂量未能诱发小鼠中和抗体阳转, 0.011  $\mu\text{g}$  和 0.004  $\mu\text{g}$  剂量的阳转率分别为 70% 和 30%, Reed-Muench 法计算的  $\text{ED}_{50}$  值为 0.006  $\mu\text{g}$ , 提示本研究获得的 HPV18 VLPs 具有较好的免疫原性。

### 2.4 HPV18 VLPs 诱发兔的中和抗体滴度

如图 4, 在初次免疫 1 周后, 兔血清中的中和抗

表1 HPV18 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 HPV18 VLPs in mice

Dose (μg)	Positive	Total	Rate of seroconversion (%)	ED <sub>50</sub> (μg)
0.100	10	10	100	0.006
0.033	10	10	100	
0.011	7	10	70	
0.004	3	10	30	
0.001	0	10	0	
0.001	0	10	0	
0.000	0	10	-	

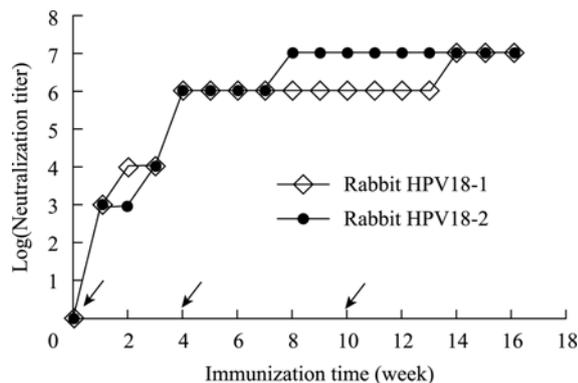


图4 HPV18 VLPs 免疫兔的中和抗体生成曲线

Fig. 4 Induced neutralizing antibody in rabbits immunized with HPV18 VLPs. Arrow: immunization time point.

体滴度即有明显上升; 经过 4 周的加强免疫后, 中和抗体的滴度即能达到  $10^6$  的较高水平; 经过 10 周时再次加强免疫, 2 只实验兔均可达到  $10^7$  的中和抗体滴度。

### 2.5 HPV18 VLPs 诱发山羊的中和抗体滴度

在初次免疫 3 周后, 山羊血清中的中和抗体滴度可达  $10^5$ ; 经过 4、10、18 周时的加强免疫后, 实验山羊的中和抗体滴度可达  $10^7$ (图 5)。兔和山羊的

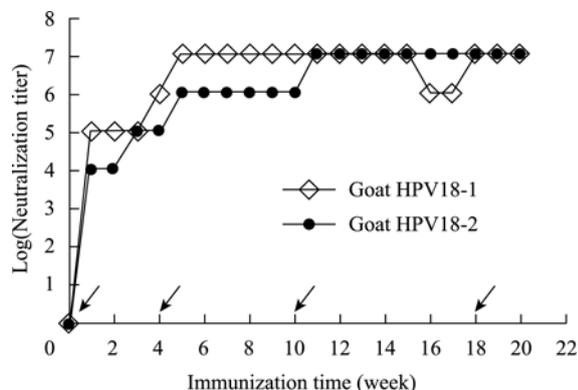


图5 HPV18 VLPs 免疫山羊的中和抗体生成曲线

Fig. 5 The induced neutralizing antibody in goats immunized with HPV18 VLPs. Arrow: immunization time point.

免疫实验提示, HPV18 VLPs 可诱导动物产生高滴度的中和抗体, 显示其作为预防性疫苗的潜质。

## 3 讨论

研究表明, 针对 HPV 病毒的保护性抗体主要为构象抗体, 只有具有完整天然构象的 HPV L1 蛋白才可以有效地诱导中和抗体的产生<sup>[5]</sup>。而真核表达系统中所表达 HPV L1 蛋白大多维持了其天然构象, 无需经过目的蛋白的体外复性步骤, 即可以组装成与天然病毒类似的病毒样颗粒<sup>[6-8]</sup>。目前, 已上市的 Merck HPV 四价疫苗 Gardasil 以及 GSK 二价 HPV 疫苗 Cervarix 均采用真核表达系统。其中 Gardasil 采用酿酒酵母表达系统<sup>[9]</sup>, 而 Cervarix 采用了昆虫杆状病毒表达系统<sup>[10]</sup>。

虽然真核表达系统具有上述优点, 但是一般存在产率低、生产成本高、纯化困难等问题。因此, 有众多研究者尝试利用成熟、廉价、安全的大肠杆菌表达系统进行 HPV 疫苗的研究。但是由于大肠杆菌中所表达的 HPV L1 蛋白主要以包涵体的形式存在<sup>[11]</sup>, 由包涵体体外再折叠和重组成为具有与天然构象类似的病毒样颗粒过程较为复杂和低效, 目的蛋白损失大、得率低, 难以应用于疫苗的研制。

本研究主要利用大肠杆菌表达系统以可溶形式表达 HPV18 L1 蛋白, 避开包涵体的复性过程; 采用去除核酸的离子交换层析和去除内毒素的疏水相互作用层析进行纯化, 这些纯化方法易于进行规模放大, 为疫苗研制奠定基础; 获得的纯化样品进行重组, 最终可获得大量、均一的病毒样颗粒。

动物免疫实验中, 本研究采用测定免疫临界量的半数有效剂量法来衡量 HPV18 VLP 的免疫原性, 使用的是可用于人用疫苗的铝佐剂, 结果低于  $0.01 \mu\text{g}$ , 显示了良好应用前景; 大动物实验包括兔和羊的免疫实验则采用弗氏佐剂, 主要是研究 HPV18 VLP 在动物体内能达到的最高中和滴度, 结果为  $10^7$ , 为日后疫苗免疫时的中和抗体所能产生的饱和水平提供依据。本试验将进一步用铝佐剂配制的疫苗对灵长类动物(恒河猴)进行免疫规律的研究和中和抗体生成的评价, 以期为人用疫苗的剂量和免疫程序提供有用数据。

## REFERENCES

- [1] Cain JM, Howett MK. Preventing cervical cancer. *Science*, 2000, **288**(5472): 1753–1755.
- [2] Pilch H, Gunzel S, Schaffer U, *et al.* The presence of HPV DNA in cervical cancer: Correlation with clinico-pathologic parameters and prognostic significance: 10 years experience at the Department of Obstetrics and Gynecology of the Mainz University. *Int J Gynecol Cancer*, 2001, **11**(1): 39–48.
- [3] Bonnez W, Rose RC, Da Rin C, *et al.* Propagation of human papillomavirus type 11 in human xenografts using the severe combined immunodeficiency (SCID) mouse and comparison to the nude mouse model. *Virology*, 1993, **197**(1): 455–458.
- [4] Lu WX, Cheng T, Li SW, *et al.* Establishment and application of human papillomavirus type 16 pseudovirions neutralization assay. *Chin J Biotech*, 2006, **22**(6): 990–995.  
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*, 2006, **22**(6): 990–995.
- [5] Christensen ND, Kreider JW, Cladel NM, *et al.* Monoclonal antibody-mediated neutralization of infectious human papillomavirus type 11. *J Virol*, 1990, **64**(11): 5678–5681.
- [6] Berg M, Gambhira R, Siracusa M, *et al.* HPV16 L1 capsid protein expressed from viable adenovirus recombinants elicits neutralizing antibody in mice. *Vaccine*, 2007, **25**(17): 3501–3510.
- [7] Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*, 1993, **67**(1): 315–322.
- [8] Rose RC, Bonnez W, Reichman RC, *et al.* Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: *in vivo* and *in vitro* assembly of viruslike particles. *J Virol*, 1993, **67**(4): 1936–1944.
- [9] Villa LL, Costa RL, Petta CA, *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. *Lancet Oncol*, 2005, **6**(5): 271–278.
- [10] Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, *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**(9518): 1247–1255.
- [11] Kelsall SR, Kulski JK. Expression of the major capsid protein of human papillomavirus type 16 in *Escherichia coli*. *J Virol Methods*, 1995, **53**(1): 75–90.

快 讯

## 细菌能预见未来

据 6 月 17 日的《自然》杂志报道, 研究人员发现微生物的基因网络连接可以预知下一连串系列事件, 在事件发生之前就开始变成新的状态, 比如酒酵母在发酵过程中, 糖以及酸性的改变, 酒精度升高, 酵母的生活环境变热。科学家发现当酒酵母感觉到了热度之后, 他们开始激活能对付下一阶段变热的基因。更长远的分析表明这种可预见的、早期的反应, 是增加微生物存活几率的一个适应性进化。

看来微生物能通过对未来事件的预知产生进化来增加其存活率的情况。研究人员相信这是基因的条件反射, 这可能对许多微生物来说是一个普遍的、能增加存活率的进化适应过程, 甚至可能发生在高级有机生物的细胞内, 包括人类。科学家相信, 这也可能有特殊的含义, 例如生产生物燃料的酵母工厂, 当他们得到了基因的能力, 来为他们下一阶段的程序做好准备时, 工作效率就会大大提高。

来源: 科技日报

2009-06-23