

人乳头瘤病毒 18 型 L1-E6、L1-E7 嵌合基因表达载体的构建及表达

李 昂, 郑 瑾, 来宝长, 耿宜萍, 王 艳, 王一理*, 司履生*

(西安交通大学生命科学与技术学院肿瘤研究所, 陕西 西安 710061)

关键词: 人乳头瘤病毒 18 型; 表达载体; 定点突变

中图分类号: R373.9

文献标识码: A

摘要: 目的 构建 HPV 18 L1-E6、L1-E7 嵌合基因的表达载体, 并在 CHO 细胞中表达。方法 克隆 HPV 18 L1-E6 和 L1-E7 基因, 插入中介载体 pGEMT-Easy 中并测序鉴定。采用 PCR 定点突变法, 突变 L1-E6、L1-E7 基因序列中与转化作用相关的位点, 分别与 L1 基因连接后插入真核表达载体 pVAX1, 构建真核表达质粒 pVAX1-L1E6Mxx、-L1E7Mxx。用磷酸钙沉淀法, 转染 CHO 细胞, 以抗 HPV-18L1、抗 E6 和抗 E7 特异性单克隆抗体 (mAb) 做 ELISA 和免疫细胞化学法检测。结果 ELISA 检测显示, 转染各种 pVAX1-L1E6Mxx、-L1E7Mxx 融合蛋白表达质粒的细胞提取物的 P-N 值均 > 2.1; 免疫细胞化学检测, 在胞浆、胞核可见棕黄色颗粒。结论 所构建的 pVAX1-L1E6Mxx-E7Mxx 融合蛋白表达质粒, 可在转染细胞内表达相应的 L1-E6Mxx 和 L1-E7Mxx 蛋白, 为今后进行 DNA 疫苗的研究奠定了基础。

Construction of a recombinant expression vector of human papillomavirus type 18 L1-E6, L1-E7 and expression of the chimeric gene in CHO cells

LI Ang, ZHENG Jin, LAI Baichang, GENG Yiping, WANG Yan, WANG Yi-li, SI Lusheng

Institute for Cancer Research, School of Life Science and Technology College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Keywords: human papillomavirus type 18; expression vector; site-directed mutation

Abstract: **Aim** To construct eukaryotic expression vector of HPV18 L1-E6 and L1-E7 chimeric gene. **Methods** HPV18 L1, E6 and E7 genes were cloned respectively. The genes were

收稿日期: 2002 - 06 - 18; 修回日期: 2002 - 07 - 18

基金项目: 国家自然科学基金资助, No. 30070848

国家高技术研究发展计划 (863) 资助, No. 2001AA215221

作者简介: 李 昂 (1970-), 男, 辽宁沈阳市人, 主治医师, 博士生。

西安市雁塔区朱雀大街 205 号, Tel. (029) 5275429

导师。Email: drliangyj@sina.com

separately sequenced and identified by inserting into inter-vector pGEMT-Easy. The nucleotides within HPV 18 E6 and E7 genes, which are responsible for viral transforming activity, were mutated by PCR site-directed mutagenesis method. The correctly mutated E6 and E7 fragments were linked with and cloned into an eukaryotic expression vector pVAX1, HPV 18 L1 gene, generating 12 chimeric recombinant plasmids pVAX1-L1E6Mxx and pVAX1-L1E7Mxx were generated. CHO cells were transiently transfected with the individual construct by calcium phosphate precipitate method. Target protein expression in the lysate of the transfected cells were measured by ELISA and immunocytochemical staining, with HPV 18 L1-E6 and L1-E7-specific monoclonal antibodies. **Results** ELISA assays showed the P-N ratios in the cell lysate transfected with pVAX1-L1E6Mxx-L1E7Mxx chimeric recombinant plasmids were larger than 2.1. Immunocytochemical staining revealed brownish precipitant signal in cytoplasm and nuclei of the transfected cells. **Conclusion** Successful constructions of prophylactic and therapeutic DNA vaccine candidate plasmids lay solid foundation for future animal experiment and clinical trial.

人乳头瘤病毒 (HPV) 是能引起人类皮肤粘膜增生性病的一类 DNA 病毒, 其中某些高危型 (包括 HPV16 和 HPV18) 是人类绝大部分分子宫颈癌 (80%) 的重要启动因子, 还可能与人类其它癌症, 如喉癌^[1]、食管癌、口腔癌、鼻窦癌、膀胱癌及肺癌等有关。HPV18 是仅次于 HPV16 的高危型 HPV, 因其严重的危害性而日益成为国内外学者研究的重点。

近年来, HPV18 疫苗的研制和开发正日益受到关注。利用 HPV18 (主要是 L1) 作为疫苗, 对人类进行预防接种, 有可能对人类的 HPV18 相关性肿瘤 (如宫颈癌), 甚至食管癌和肺癌等严重危害人类生命的恶性肿瘤进行一级预防。已证实 HPV18 E6、E7 为肿瘤排斥抗原, 可诱发 CTL 产生, 利用其制备的疫苗可能对肿瘤具有治疗作用。因此, 本实验旨在通过基因克隆、定点突变和基因重组等技术, 构建 HPV18L1-E6、L1-E7 融合蛋白表达质粒, 并检测其在真核细胞中的表达, 为进一步研制同时具有预防及治疗性的 HPV18 DNA 疫苗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 pUC18-HPV18 全序列模板 (含 7 857 bp 的 HPV18 序列, 酶切位点为 *EcoR*), 为北京中国医学科学院肿瘤医院馈赠。PCR 采用 TaKaRa 公司的高保真酶和

Promega 公司的 *Taq* 酶。引物合成及测序由上海博亚生物技术公司完成。定点突变选用 TaKaRa 公司的 D401CA 点突变试剂盒和 Promega 公司的 wizard PCR DNA purification system A2180 纯化试剂盒。载体质粒分别选用 Promega 公司的 pGEM-T Easy Vector Systems 和 Invitrogen 公司的 pVAX1。抗 HPV18L1-E6、L1-E7 单克隆抗体 (mAb) 为 Neomarkers 公司产品。辣根过氧化物酶标记的小鼠二抗为 DAKO 公司的产品 (Mouse A-Mouse Ig/HRP P0161)。

1.2 方法

1.2.1 HPV18L1-E6 和 L1-E7 基因的克隆

以 pUC18-HPV18 为模板, 根据 GenBank 中 HPV18 的全序列 (GI: 9626069) 设计引物。L1 上游引入 *Hind* 酶切位点及 Kozak 序列 GCCACC; 下游去掉终止密码子 TAA, 并引入 *EcoR* 酶切位点。L1 上游引物的序列为 5'-CGC AAGCTT GCCACC ATG TGC CTG TAT ACA CGG GTC CT3; L1 下游引物的序列为 5'-CCC GATATC CTT CCT GGC ACG TAC ACG CAC AC-3。E7 上游去除起始密码子 ATG, 并引入 *EcoR* 酶切位点, 下游引入 *Xho* 酶切位点。E7 上游引物的序列为 5'-CAG GATATC CAT GGA CCT AAG GCA ACA TTG-3; E7 下游引物的序列为 5'-ACC CTCGAG TTA CTG CTG GGA TGC ACA CC-3。E6 上游去除起始密码子 ATG, 并引入 *EcoR* 酶切位点, 下游引入 *Xho* 酶切位点。E6 上游引物的序列为 5'-GGC GATATC GCG CGC TTT GAG GAT CCA AC-3; E6 下游引物的序列为 5'-CCC CTCGAG TTA TAC TTG TGT TTC TCT GCG TC3。

用高保真酶扩增 HPV18L1, PCR 反应体系为 50 μ L。循环参数: 95 预变性 5 min, 94 变性 50 s, 55 复性 50 s, 72 延伸 90 s, 共 35 个循环后, 再 72 延伸 10 min。用普通 *Taq* 酶扩增 HPV18-E6、L1-E7, PCR 反应体系为 50 μ L。循环参数: 95 预变性 5 min, 94 变性 1 min, 50 复性 1 min, 72 延伸 50 s, 30 个循环后, 再 72 延伸 10 min。PCR 产物经低熔点胶纯化、回收, 用 pGEM-T Easy 载体进行 T/A 克隆。以连接产物转化 DH5 宿主菌, 涂碟, 进行 X-gal/ IPTG 蓝白斑筛选。挑选阳性克隆, 以碱裂解法提取质粒, 酶切鉴定, 鉴定阳性的克隆进行测序分析。

1.2.2 HPV18L1-E6、E7 基因定点突变

以 E6、E7 基因序列为模板, 根据引入的突变点, 设计合成变异导入引物 and 对应 PCR 用引物。在参照模板设计引物时, 对应 PCR 用引物的 5 端第 1 个碱基的互补碱基, 必须与变异导入引物的 5 端的第 1 个碱基相邻。

E7 点突变引物的设计: 第 1 个突变点为 27Cys Gly: E7M27 上游引物的序列为 5'-GTT GAC CTT CTA G GT CAC GAG CA-3; 下游引物的序列为 5'-CGG AAT TTC ATT TTG GGG C-3。第 2 个突变点为 65Cys Gly: E7M65 上游引物的序列为 5'-G TTG TGT ATG G GT TGT AAG TGT G-3; 下游引物的序列为 5'-AT TGT GTG ACG TTG TGG TTC GGC-3。第 3 个突变点为 98Cys Gly: E7M98 上游引物的序列为 5'-CTG TCC TTT GTG G GT

CCG TGG TGT-3; 下游引物的序列为 5'-GGT GTT CAG AAA CAG CTG CTG GAA TG-3。

E6 点突变设计: 第 1 个突变点为 52Lys Gly: E6M52 上游引物的序列为 5'-CA TTT AAA GAT GGA TTT GTG GTG TAT AGA-3; 下游引物的序列为 5'-C AAA TTC AAA TAC CTC TGT AAG TTC CAA-3。第 2 个突变点为 68Cys Gly: E6M68 上游引物的序列为 5'-GCA TGC CAT AAA G GT ATA GAT T-3; 下游引物的序列为 5'-AGC ATG GGG TAT ACT GTC TCT A-3。第 3 个突变点为 138Cys Gly: E6M138 上游引物的序列为 5'-TAT AGA GGC CAG G GC CAT TCG TG-3; 下游引物的序列为 5'-GTG CCC AGC TAT GTT GTG AAA TCG T-3。

PCR 反应液的组成为 100 μ L 体系, 循环参数: 94 变性 30 s, 55 复性 30 s, 72 延伸 5 min, 36 个循环后, 再 72 延伸 10 min。PCR 扩增产物再进行下列步骤: 10 g/L 低熔点胶凝胶电泳, 切取目的条带, 用 Wizard 试剂盒回收目的 DNA 片段。进行末端平滑及 5 端磷酸化处理 (Blunting Kination 反应), 即将回收的 DNA 片段与试剂盒中的 Blunting Kination 混合酶混合, 37 反应 20 min, 反应溶液用苯酚/氯仿抽提, 2.5 倍体积的乙醇沉淀, 用 20 μ L TE buffer 溶解。连接反应: 即取 5 μ L 上述溶液加入等量的连接溶液, 混匀后于 16 反应 1 h。取全量反应液转化 100 μ L 的 DH5 感受态细胞, 依次进行扩增、提质粒、酶切鉴定及阳性克隆的测序。用已突变的 E6Mxx 和 E7Mxx 序列为模板, 重复上述步骤, 最终可将 3 个突变点引入 1 条 E6Mxx 和 E7Mxx 序列中。

1.2.3 HPV18L1-E6Mxx、HPV18L1-E7Mxx 的构建

分别将已构建并经测序鉴定的 pGEM-T-L1 用 *Hind* / *EcoR* 双酶切, 将 pGEM-T-E6Mxx、pGEM-T-E7Mxx 用 *EcoR* / *Xho* 双酶切, 真核表达载体 pVAX1 用 *Hind* / *Xho* 双酶切。低熔点胶回收酶切片段后, 以 T4 连接酶连接, 构建重组质粒 pVAX1-L1E6Mxx 和 pVAX1-L1E7Mxx。

1.2.4 转染 CHO 细胞 磷酸钙共沉淀法转染 CHO 细胞。

将经多次传代培养的处于对数生长期的 CHO 细胞消化后, 以 1×10^9 /L 的密度加入放置有盖玻片的培养板中。使细胞长至 50%~70% 满底, 转染前 4 h 换入新鲜培养液 4 mL。分别将构建好的真核表达质粒 10 μ L (约含质粒 10~30 μ g) 溶于 220 μ L 无菌去离子水中, 逐滴加入 2 \times HBS 250 μ L, 再缓慢加入 2 mol/L CaCl_2 30 μ L, 轻轻振荡混匀, 室温静置 15~40 min。将磷酸钙质粒混合悬液缓慢加入培养板中, 37 孵育 4~6 h 后吸出原有培养液, 重新加入新鲜培养液, 48 h 后收获细胞进行检测。

1.2.5 ELISA 检测

将转染 48 h 后的 CHO 细胞用 PBS 洗 3 次, 加入 400 mL 裂解液 (50 mol/L Tris-HCl pH7.5、150 mmol/L NaCl、1% NP-40、5 g/L 叠氮钠及 1 mmol/L PMSF) 冰浴 30 min, 以 12 000 r/min 离心 15 min。取上清作为包被抗原, 用直接 ELISA 法进行检测。操作步骤同常规方法, 于 490 nm 波长下测光吸光度 (A) 值。

1.2.6 融合蛋白表达的免疫组化检测 取出培养板中的细胞爬片,以 PBS 洗 2 次,依次用 40 g/L 多聚甲醛固定 5 min, PBS 湿化 5 min,加 3 ml/L H₂O₂ 15 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min.加 25 ml/L 的小牛血清于 37 湿盒中封闭 25 min 后,分别加入抗 L1、抗 E6 和抗 E7 mAb,于 4 湿盒中孵育过夜, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min.再加入辣根过氧化物酶标记的二抗于 37 湿盒中孵育 60 min, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min.然后依次进行 DAB 显色、苏木素复染及封片,于光镜下观察。

2 结果

2.1 HPV18L1-E6、-E7 基因的克隆 以 T-A 法将 PCR 产物克隆至中介载体 pGEMT-Easy 中测序鉴定。HPV18L1 序列共有 5 个点突变,多位于 3 端。其中 3 个突变点在多个样本的测序中重复出现,考虑为 HPV18 模板变异,另 2 个突变点未造成氨基酸变异。HPV18L1-E6、L1-E7 基因的测序结果与 GenBank 中的序列完全相同。

2.2 HPV18L1-E6、L1-E7 基因点突变的鉴定 L1-E6、L1-E7 基因序列经点突变后,分别得到 5 个突变株(图 1)。

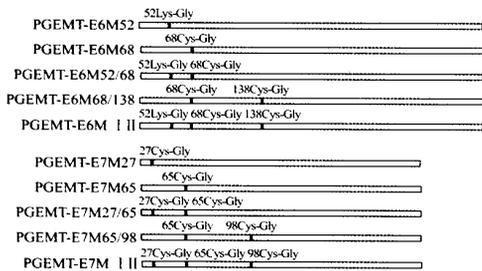


图 1 E6、E7 基因 PCR 定点突变导入的氨基酸的替换
Fig 1 Substitution of amino acid introduced via site-directed mutation of E6 and E7 genes

2.3 融合基因真核表达质粒的构建 将未突变的 E6、E7 也与 pVAXI-L1 连接作为对照株,共构建 12 株融合基因的真核表达质粒,分别为: E6 组: pVAXI-L1E6; pVAXI-L1E6M52; pVAXI-L1E6M68; pVAXI-L1E6M52/68; pVAXI-L1E6M68/138; pVAXI-L1E6M (图 2)。E7 组: pVAXI-L1E7; pVAXI-L1E7M27; pVAXI-L1E7M65; pVAXI-L1E7M27/65; pVAXI-L1E7M65/98; pVAXI-L1E7M (图 3)。

2.4 HPV18L1-E6Mxx、L1-E7Mxx 融合蛋白的检测 ELISA 检测:以未经转染的 CHO 细胞裂解物为阴性对照,显示各种 HPV18L1-E6Mxx、L1-E7Mxx 融合蛋白表达质粒转染的 CHO 细胞裂解物的 P-N 比值均 > 2.1,提示在瞬时哺乳细胞转染条件下,各种融合蛋白的表达质粒均可表达 HPV18L1 蛋白。免疫细胞化学法检测:12 种融合基因真核表达质粒转染的 CHO 细胞经免疫细胞化学染色证实,可见特异性蛋白的表达,阳性细胞胞浆内出现大小不等的棕黄色颗粒,约占细胞总数的 20%(图 4)。

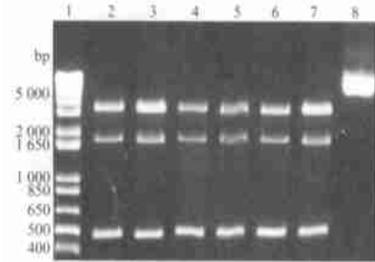


图 2 重组质粒 pVAXI-L1E6Mxx 的酶切鉴定
Fig 2 Restrictive enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pVAXI-L1E6Mxx
1: DNA marker 1kb LADDER™; 2-7: The segments of pVAXI, L1 and E6Mxx cut with HindIII / EcoRI / XhoI 3.0 kb, 1 710 bp and 483 bp, respectively; 8: pVAXI-L1E6Mxx (about 5.2 kb).

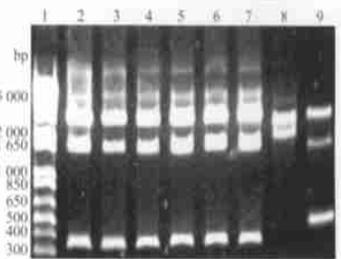


图 3 pVAXI-L1E7Mxx 重组质粒酶切鉴定
Fig 2 Restrictive enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pVAXI-L1E6Mxx
1: DNA marker 1kb LADDER™; 2-7: The segments of pVAXI, L1 and E7Mxx cut with HindIII / EcoRI / XhoI 3.0 kb and 324 bp, respectively; 8: pVAXI-L1E7Mxx cut with HindIII and XhoI, 3.0 kb and 2 034 bp, respectively; 9: The segments of pVAXI, L1 and E6Mxx cut with HindIII / EcoRI / XhoI 3.0 kb, 1 710 bp and 483 bp, respectively.

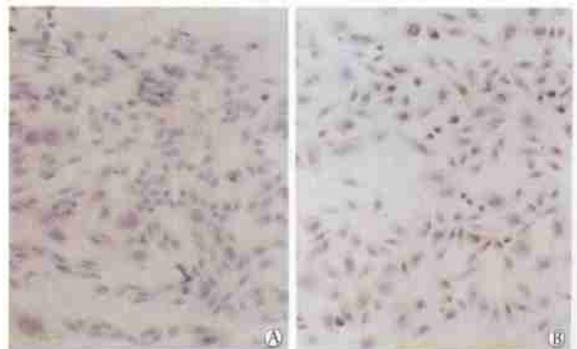


图 4 HPV18L1-E6Mxx 和 L1-E7Mxx 在融合蛋白在 CHO 细胞中的表达
Fig 4 Expression of fusion proteins HPV18L1-E6Mxx and L1-E7Mxx in CHO cells (IHC staining, ×100)
A: Negative control; B: Positive expression.

3 讨论

HPV L1(型晚期蛋白)是乳头瘤病毒的主要衣壳蛋白,单独即可在体外组装成病毒样颗粒,并能刺激体液免疫产生中和抗体,因此被认为是最理想的预防性疫苗候选成分。L1 蛋白一般分为 N 端、C 端和中间 3 个区段。N 端在

一定程度上没有型特异性;中间段对 L1 构象的稳定性具有影响;C 端具有核定位信号,可参与病毒的感染过程。研究表明,C 端的最后一段肽链对 L1 集合形成 VLP 并不是必需的^[2],甚至 C 端缺失 86 个氨基酸残基的 HPV11,仍可与正常的 L1 一样能形成五聚体。因此,本实验设计将 E6、E7 片段连接在 L1 的 C 端组成嵌合蛋白,以降低蛋白重组对 L1 蛋白预防性免疫作用的影响。

在 HPV18 恶性转化中,起关键作用的是其两个早期蛋白 E6 和 E7。E7 蛋白可通过与 Rb 家族相互作用使细胞周期失控,DNA 大量合成并丧失 DNA 复制的保真度;E6 则通过结合并降解 p53,阻止 DNA 的修复或阻止细胞进入程序性死亡。

HPV18 E6、E7 作为肿瘤排斥抗原,可诱导产生 CTL,其病毒性抗原的免疫识别和呈递,则是由 HLA-A、E 类抗原分子决定。研究发现,HPV 的 E6、E7 含有与 HLA-A2 结合的关键序列,可由 HLA-A2 分子呈递给 CTL,若限制性 HLA-A2 的缺失,可使 HPV 相关的肿瘤细胞逃逸免疫监视^[3]。另外,只有肿瘤特异性抗原 E7 和 B7-CD28 分子共同在肿瘤细胞表面表达,才能激活 T 细胞^[4]。因此,DNA 疫苗的设计,既要充分考虑嵌合蛋白的转化活性,又必须考虑其免疫原性。

体外表达的 E6 蛋白含有 157 个氨基酸残基,主要结构是两个锌指结构,每个锌指结构的基础是两个 $cys-x-x-cys$,间隔 29 个氨基酸残基。一般根据功能不同将其结构分为 5 个区:即 C 端(1~31aa)、锌指区(32~68aa)、中央区(连接区 69~104aa)、锌指区(105~141aa)和 C 端(142~157aa)。研究发现,E6 的 N 端主要与蛋白的稳定性有关,N 端发生缺失突变会显著影响蛋白在体外的半衰期^[5]。锌指区和锌指区都是病毒转化活性和引起蛋白反式激活所必需的,均与蛋白间的相互作用有关^[6]。许多资料证实,C 端含有大多数的抗原表位。Nakagawa 等^[7]详细研究了 E6 蛋白各位点与人肾胚细胞转化和 p53 失活的关系,发现除锌指结构外,L-52 突变对其影响也非常显著。因此,本实验选择 L-52、第 1 锌指区的 C-68 和第 2 锌指区的 C-138 作为突变点,在尽可能不影响蛋白稳定性和免疫原性的前提下,彻底去除其转化活性。

E7 蛋白为全长 105 个氨基酸残基的酸性蛋白,是 HPV18 的主要转化蛋白。E7 蛋白分为 3 个功能区:1、2 区与腺病毒 E1A 的第 1、2 保守区高度同源;3 区为 1 个锌指区(锌指位于 AAs65~68、98~101)。2 区中的 LXCXE 位点(25~29aa)被认为是结合 Rb1 的关键位点。研究表明,Cys-27 突变可明显降低 E7 蛋白对猴 CA-1 细胞系的转化活性^[8],但并不影响人角化细胞的永生性^[9],而锌指区的突变则可完全破坏 E7 蛋白的转化和永生性能力。E7 蛋白可能是以二体的形式存在,此二聚体以 $cys-x-x-cys$ 基序与 Zn 结合^[10],1 个锌指突变会减弱 Zn 结合能力,缩短半衰期,降低稳定性,丧失其转化性;而 2 个锌指突变则彻底失去与 Zn 的结合,引起半衰期的严重缩短,完全丧失其转化性,并有可能丧失抗原性。因此,本实验分别选择 C-27、C-65 和 C-98 作为突变点,共获得 5 个突变株,拟从中选择免疫性最

佳的安全株。

HPV 的种属特异性十分严格,在人体组织中的含量也极微,而且无法在体外繁殖,因而不可能用 HPV 病毒颗粒制备活疫苗进行人群免疫。基因工程技术的应用成为解决这一问题的关键。DNA 免疫作为一种新的有效免疫策略,已在不同的动物模型中得到证实,它具有安全、简易和储存运输方便的特点。更重要的是,它能诱导针对免疫原的细胞和体液免疫应答,可用于传染性疾病的预防以及恶性肿瘤和自身免疫性疫病的治疗。近来,已有多种 DNA 疫苗(如 HIV-1、疟疾等)开始进入各期临床试验^[11-14]。

本实验选用了一种专为研制 DNA 疫苗而设计的表达载体 pVAX1,并具有在许多哺乳细胞中高水平瞬时表达目的蛋白的特性。pVAX1 已通过美国 FDA 认证,可用于 DNA 疫苗的研制。以重组质粒转染 CHO 细胞系后,可检测到 L1 蛋白以及 E6、E7 蛋白的表达,表明我们构建的 HPV18L1-E6、L1-E7 融合表达质粒,可有效地表达插入的外源性融合蛋白。本实验为进一步研制对 HPV18 具有预防及治疗性的 DNA 疫苗提供了可能。

参考文献:

- [1] 李 晓,吴能定,徐如君,等. 间接法原位 PCR 检测喉鳞癌组织 HPV 感染[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, 16(1): 45-48.
- [2] Chen Y, Ghim SJ, Jenson AB, et al. Mutant canine oral papillomavirus L1 capsid proteins which form virus-like particles but lack native conformational epitopes[J]. *J Gen Virol*, 1998, 79 (Pt9): 2137-2146.
- [3] Cromme FV, Meijer CJ, Snijders PJ, et al. Analysis of MHC class I and II expression in relation to presence of HPV genotypes in pre-malignant and malignant cervical lesions[J]. *Br J Cancer*, 1993, 67 (6): 1372-1380.
- [4] Chen L, Linsley PS, Hellstrom KE. Costimulation of T cells for tumor immunity[J]. *Immunol Today*, 1993, 14(10): 483-486.
- [5] Grossman SR, Mora R, Laimins LA. Intracellular localization and DNA-binding properties of human papillomavirus type 18 E6 protein expressed with a baculovirus vector[J]. *J Virol*, 1989, 63(1): 366-374.
- [6] Kanda T, Watanabe S, Zanma S, et al. Human papillomavirus type 16 E6 proteins with glycine substitution for cysteine in the metal-binding motif[J]. *Virology*, 1991, 185(2): 536-543.
- [7] Nakagawa S, Watanabe S, Yoshikawa H, et al. Mutational analysis of human papillomavirus type 16 E6 protein: transforming function for human cells and degradation of p53 *in vitro*[J]. *Virology*, 1995, 212(2): 535-542.
- [8] Watanabe S, Kanda T, Sato H, Furuno A, et al. Mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 functions[J]. *J Virol*, 1990, 64(1): 207-214.
- [9] Jewers RJ, Hildebrandt P, Ludlow JW, et al. Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes[J]. *J Virol*, 1992, 66(3): 1329-1335.
- [10] McIntyre MC, Frattini MG, Grossman SR, et al. Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding[J]. *J Virol*, 1993, 67(6): 3142-3150.
- [11] Bowers M. DNA and other technologies for HIV vaccines[J]. *BE-TA*, 1998, 9-12, 28.
- [12] Tadokora K, Koizumi Y, Miyagi Y, et al. Rapid and wide-reaching delivery of HIV-1 env DNA vaccine by intranasal administration [J]. *Viral Immunol*, 2001, 14: 159-167.
- [13] Ferry G. First DNA malaria vaccine on trial in Africa[J]. *Curr Biol*, 2000, 10(22): R810-811.
- [14] Doolan DL, Hoffman SL. DNA-based vaccines against malaria: status and promise of the Multi-Stage Malaria DNA Vaccine Operation[J]. *Int J Parasitol*, 2001, 31(8): 753-762.