

HPV16L1 核浆运输的动力学过程

杨 军^{1,2}, 王一理², 司履生^{2*}

(¹ 西安交通大学医学院附属第二医院病理科 西安 710004)

(² 西安交通大学生命科学与技术学院 癌症研究所 生物医学信息工程教育部重点实验室 西安 710061)

摘 要 利用增强型绿色荧光蛋白(Enhance green fluorescent protein, EGFP)标记不同的截短型 HPV16L1 蛋白(Human papillomavirus type 16 L1 protein, HPV16 L1),分析 HPV16L1 蛋白核定位信号(Nucleus location signal, NLS)的作用。构建重组 pFB-EGFP、pFB-EGFP-HPV16L1、pFB-EGFP-HPV16L1 Δ NLS 和 pFB-EGFP-NLS_{HPV16L1} p 转移载体;在 *DH10Bac* 宿主菌内经 Tn7 转座子介导的同源重组后转染 Sf-9 细胞,获得重组 Ac-EGFP、Ac-EGFP-HPV16L1、Ac-EGFP-HPV16L1 Δ NLS 和 Ac-EGFP-NLS_{HPV16L1} 杆状病毒,感染 Sf-9 昆虫细胞表达相应截短型 HPV16L1 融合蛋白;利用荧光显微镜和激光共聚焦显微镜观察不同融合蛋白的荧光特性和核浆转运动力学过程。结果发现 Ac-EGFP 杆状病毒感染的 Sf-9 细胞内明亮的绿色荧光均匀分布,重组 Ac-EGFP-HPV16L1 和 Ac-EGFP-NLS_{HPV16L1} 杆状病毒感染的 Sf-9 细胞,明亮的绿色荧光主要位于细胞核内,重组 Ac-EGFP-HPV16L1 Δ NLS 杆状病毒感染的 Sf-9 细胞,绿色荧光局限于细胞浆内,细胞核内无绿色荧光。说明 HPV16L1 蛋白羧基端的 23 个氨基酸(GKRKATPTTSSTSTAKRKRKRL)具有完全核定位作用,能引导 HPV16 L1 蛋白和 EGFP 突破核膜屏障进入 Sf-9 细胞核内。

关键词: 人乳头瘤病毒 16 型,核定位信号,核浆运输,增强型绿色荧光蛋白

中图分类号: R944 Q78 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2006)06-0917-05

HPV16 L1 蛋白(Human papillomavirus type 16 L1 protein, HPV16 L1)羧基端具有 2 个经典的核定位信号(Nucleus location signal, NLS):单组分 NLS(499 KRKKRK)和包含单组分 NLS 的双组分 NLS(484 KRKATPTTSSTSTA⁴⁹⁹ KRKKRK)^[1]。在 HPV16 感染晚期,合成于宿主细胞胞浆内的 L1 蛋白凭借其羧基端的 NLS(Nucleus location signal of Human papillomavirus type 16 L1 protein, NLS_{HPV16L1})通过经典的 Kap α 2/ β 1 通路被转运入核内完成子代病毒的组装。同时,在病毒感染早期病毒基因组 DNA 也很可能是与位于 HPV16L1 蛋白 NLS 区的 DNA 结合域结合而通过相同转运机制被转运入宿主细胞核,实现病毒的成功感染。因此, NLS_{HPV16L1} 在 HPV16 感染和子代病毒的成功组装中发挥关键性的作用^[2~6]。

为了更为直观地研究和理解 HPV16 L1 蛋白的入核机制,该研究利用分子生物学技术和荧光技术,将增强型绿色荧光蛋白(enhance green fluorescent protein, EGFP)基因^[7~10]分别与全长 HPV16L1 基因、删除 HPV16L1 基因 3'端 69bp(1447~1518bp,包含完

整 NLS)的截短型 HPV16L1 Δ NLS 基因及仅包含 NLS_{HPV16L1} 的基因片段融合,并应用杆状病毒表达系统,观察 EGFP 标记的不同截短型 HPV16L1 蛋白在 Sf-9 细胞中核浆运输的动力学过程,为阐明 NLS_{HPV16L1} 相关生物特性提供证据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞株:pGEM-T-HPV16 质粒(含 HPV16L1 基因)由本室构建并保存^[11]。杆状病毒表达系统 pFastBacTM HTb 转移载体, *DH10Bac* 宿主菌, Sf-9 细胞源自 Invitrogen 公司,由中国预防医学科学院病毒学研究所董小平教授馈赠。昆虫细胞 Grace's 培养基、Cellfectin 购于 GIBCO 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器:RNase、*Xba* I、*Hind* III、*Nco* I、*Sal* I 限制性内切酶购自宝生物(大连)有限公司、抗 HPV16 L1 单克隆抗体购自 Neomarker 公司、HRP-IgG 购自 DAKO 公司。PCR beads 购于 Phamasia 公司。倒置荧光显微镜由 Nikon 公司生产,激光共

基金项目:国家自然科学基金(30300305)

* 通讯作者:Tel:86-29-82655429;Fax:86-29-82655499;E-mail:slusheng@yahoo.com

作者简介:杨 军(1972-),男,西安人,主治医师,病理学博士,主要从事肿瘤生物学和肿瘤病毒学研究。E-mail:yangjundr@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-02-27;修回日期:2006-04-17;接受日期:2006-06-15

聚焦显微镜由 Leica 公司生产。

有限公司合成。

1.1.3 引物 :PCR 引物(表 1)由上海博亚生物技术

表 1 PCR 引物

Primer	Sequence(restricted endonuclease X 5' ~ 3')
Forward EGFP(P1)	CATG <u>CCATCG</u> GAATGGT GAGCAAGGCGGAG(<i>Nco</i> I)
Reverse EGFP(P2)	GCGC <u>GTCGAC</u> GGCTTGTACAGCTCGT(<i>Sal</i> I)
Forward wt HPV16LI(P3)	GCGC <u>AAGCTT</u> GCCACCATGTCTCTTTGGCTGCC(<i>Hind</i> III)
Reverse wt HPV16LI(P4)	CAGCTTACGTTTTTTTTCGGTTAGC
Reverse HPV16LI△NLS(P5)	GAC <u>AAGCTT</u> TCCTAATCTAAATTTTGGTTGGCC(<i>Hind</i> III)
Reverse EGFP-NLSHPV16LI(P6)	GCG <u>GTCGAC</u> GGCAGCTTACGTTTTTTGCGTTTACGAGTTGTAGAGGTAGATG AGTGCTGGCTGTAGCTTTTCCTTTCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG(<i>Sal</i> I)

Endonuclease digestion sites are underlined.

1.2 重组 pFast-Bac 转移载体的构建

利用分子克隆技术 ,分别构建重组 pFastBac-TM HTb 转移载体 (以下简称 pFB-转移载体):重组 pFB-EGFP、pFB-EGFP-HPV16LI、pFB-EGFP-HPV16LI△NLS、pFB-EGFP-NLS_{HPV16LI} 转移载体(图 1)。具体步骤如下 :利用 P1、P2 引物从 pEGFP 质粒中扩增 EGFP 基因将其克隆入 pFB 转移载体 *Nco* I、*Sal* I 酶切位点之间 ,获得重组 pFB-EGFP 转移载体 ;将经双酶切 pGEM-T-HPV16 质粒获得的 HPV16LI 基因和 EGFP 基因 ,依次克隆入 pFB 转移载体 *Xba* I、*Hind* III 酶切位点之间和 *Nco* I、*Sal* I 酶切位点之间 ,得到 pFB-EGFP-HPV16LI 转移载体 ;利用 P1、P5 引物从 pFB-EGFP-HPV16LI 转移载体扩增截短型 EGFP-HPV16LI△NLS 融合基因(删除 NLS) ,并将其克隆入 pFB 转移载体 *Nco* I、*Hind* III 酶切位点之间 ,获得重组 pFB-EGFP-HPV16LI△NLS 转移载体 ;用

P1、P6 引物从 pEGFP 质粒中获得 EGFP-NLS_{HPV16LI} 融合基因片段 ,将其插入 pFB 转移载体 *Nco* I、*Sal* I 酶切位点之间 ,获得 pFB-EGFP-NLS_{HPV16LI} 转移载体。以上重组载体均经双酶切、PCR 及基因测序证实构建正确。

1.3 重组 Bacmid DNA 的制备

分别用重组 pFB-EGFP、pFB-EGFP-HPV16LI、pFB-EGFP-HPV16LI△NLS、pFB-EGFP-NLS_{HPV16LI} 转移载体转染 *DH10Bac* 感受态细胞 ,经 *Luria Agar* 选择性培养基筛选白色单克隆菌斑。具体方法参照 GIBCO 公司 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统操作手册。碱解法提取重组 Bacmid DNA ,用相应 PCR 引物鉴定阳性重组体 , - 20℃ 备用。

1.4 收获重组杆状病毒

在 35mm 培养皿中 ,用 Grace's 完全培养基 27℃ 培养 Sf-9 细胞至少 1h ;将 A 液(5μL 重组的 Bacmid DNA 加入 95μL 灭菌去离子水)与 B 液(6μL *Cellfectin* 加入 94μL 灭菌去离子水)轻轻混匀 ,室温放置 30min ;用无血清、无抗生素的 TNM-FH 洗涤 Sf-9 细胞 3 次 ,逐滴加入 AB 混合液 ,共培养 3d ,500 × g 离心 10min ,收集培养上清 ,4℃ 避光保存。具体方法参照 GIBCO 公司杆状病毒表达系统操作手册。

1.5 倒置荧光显微镜观察

27℃ 培养 Sf-9 细胞至 80% 细胞融合时 ,弃上清 ,加入 5 ~ 6mL 维持培养液 ,再加入重组杆状病毒毒种 400μL/瓶 ,继续培养 ,并利用倒置荧光显微镜分别在 4h、8h、12h、24h、36h、48h、72h、96h 观察融合蛋白在 Sf-9 细胞内转运的动力学过程。

1.6 激光共聚焦显微镜观察

2000 × g 离心 10min ,收集接毒后培养 3d 的 Sf-9 细胞 ,取 10μL 涂片置激光共聚焦显微镜下 ,蓝光 (~ 395nm)激发 ,观察融合蛋白的表达和荧光特性。

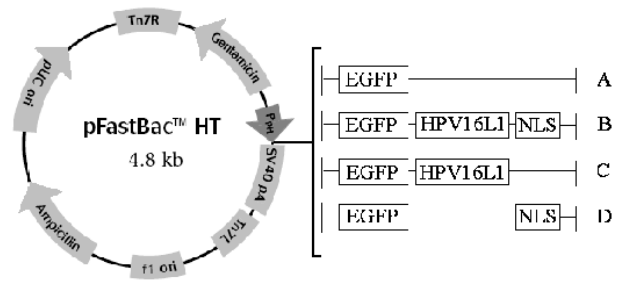


图 1 重组 pFB 转移载体构建模式图

Fig. 1 Schematic maps of cloning EGFP tagged various truncated HPV16LI genes into pFB vector. A : Cloning EGFP gene into pFB plasmid to generate recombinant pFB-EGFP vector ; B : Cloning EGFP-HPV16LI fusion gene (within NLS_{HPV16LI}) into pFB plasmid to generate recombinant pFB-EGFP-HPV16LI vector ; C : Cloning EGFP-HPV16LI△NLS fusion gene (without NLS_{HPV16LI}) into pFB plasmid to generate recombinant pFB-EGFP-HPV16LI△NLS vector ; D : Cloning EGFP-NLS_{HPV16LI} fusion gene (with NLS_{HPV16LI}) into pFB plasmid to generate recombinant pFB-EGFP-NLS_{HPV16LI} vector.

2 结果

2.1 重组 pFB 转移载体的构建

PCR 鉴定结果证实:利用 P1、P2 引物从重组 pFB-EGFP、pFB-EGFP-HPV16L1、pFB-EGFP-HPV16L1 Δ NLS 和 pFB-EGFP-NLS_{HPV16L1} 转移载体中均可扩增出 EGFP 基因,用 P1、P4 引物从 pFB-EGFP-HPV16L1 和 pFB-EGFP-NLS_{HPV16L1} 转移载体中能分别扩增出 EGFP-HPV16L1 和 EGFP-NLS_{HPV16L1} 基因,用 P3、P5 引物从 pFB-EGFP-HPV16L1 和 pFB-EGFP-HPV16L1 Δ NLS 转移载体中能分别扩增出截短型 HPV16L1 Δ NLS 基因;DNA 测序证实重组 pFB-EGFP-HPV16L1、pFB-EGFP-HPV16L1 Δ NLS 转移载体 *Sal* I、*Xba* I 酶切位点之间的核苷酸序列(5'-CCGTCGACGAGCTCACTAGTCGCGGCCGCTTTCGAATCT-3')所编码的 13 肽(PSTSSLVAAAFES)作为 linker 将 EGFP 蛋白融合于 HPV16 L1 蛋白或截短型 HPV16L1 Δ NLS 蛋白的氨基端,而重组 pFB-EGFP-NLS_{HPV16L1} 转移载体中 NLS_{HPV16L1} 则直接融合于 EGFP 蛋白的羧基端。

2.2 重组杆状病毒的获得

重组杆状病毒感染的 Sf-9 细胞培养 48h 后出现典型的细胞病理变化:细胞肿胀,尤其是细胞核肿胀显著,并出现折光性颗粒,细胞贴壁不良。收获培养上清,分成小份作为重组杆状病毒毒种,分别命名为重组 Ac-EGFP、Ac-EGFP-HPV16L1、Ac-EGFP-HPV16L1 Δ NLS、Ac-EGFP-NLS_{HPV16L1} 杆状病毒,4℃ 避光保存备用。

2.3 融合蛋白在 Sf-9 细胞内转运的动力学过程

在荧光显微镜下,重组杆状病毒感染 4h 时,少数 Sf-9 细胞内便可见微弱的绿色荧光出现,细胞核和细胞浆内的荧光强度无明显差异。感染 8h 时,细胞内可见到绿色荧光的 Sf-9 细胞数目增多,且荧光强度明显增强,重组 Ac-EGFP-HPV16L1 和 Ac-EGFP-NLS_{HPV16L1} 杆状病毒感染的 Sf-9 细胞核内绿色荧光强度均强于细胞浆内绿色荧光强度;重组 Ac-EGFP-HPV16L1 Δ NLS 杆状病毒感染的 Sf-9 细胞,绿色荧光位于细胞浆内,核内无荧光;重组 Ac-EGFP 杆状病毒感染的 Sf-9 细胞内绿色荧光分布均匀。此后,在 12h、24h、36h、48h、72h 观察时,发现可见到绿色荧光的 Sf-9 细胞持续增多,最终 80%~90% 的 Sf-9 细胞内均可见到耀眼的绿色荧光,且重组 Ac-EGFP-HPV16L1 和 Ac-EGFP-NLS_{HPV16L1} 杆状病毒感染的 Sf-9

细胞,绿色荧光主要聚集于细胞核内,而重组 Ac-EGFP-HPV16L1 Δ NLS 杆状病毒感染的 Sf-9 细胞,绿色荧光呈花环状滞留于细胞浆内;重组 Ac-EGFP 杆状病毒感染的 Sf-9 细胞内绿色荧光仍旧分布均匀;在感染 96h 时,Sf-9 细胞开始死亡,重组 Ac-EGFP 杆状病毒感染的 Sf-9 细胞裂解,培养上清可见绿色荧光,而其余 3 组死亡 Sf-9 细胞碎片仍旧可见绿色荧光,并一直持续到 120h 以后,培养上清才可见淡淡的绿色荧光。

2.4 激光共聚焦显微镜观察

在激光共聚焦显微镜下,~395nm 蓝光激发,4 种不同重组杆状病毒感染的 Sf-9 细胞内均可见绿色荧光,且其最大发射峰~509nm。重组 Ac-EGFP 杆状病毒感染的 Sf-9 细胞内明亮的绿色荧光分布均匀,重组 Ac-EGFP-HPV16L1 和 Ac-EGFP-NLS_{HPV16L1} 杆状病毒感染的 Sf-9 细胞,耀眼的绿色荧光主要积聚于细胞核内,细胞浆内也可见绿色荧光;重组 Ac-EGFP-HPV16L1 Δ NLS 杆状病毒感染的 Sf-9 细胞,耀眼的绿色荧光呈花环状滞留于细胞浆内,细胞核内

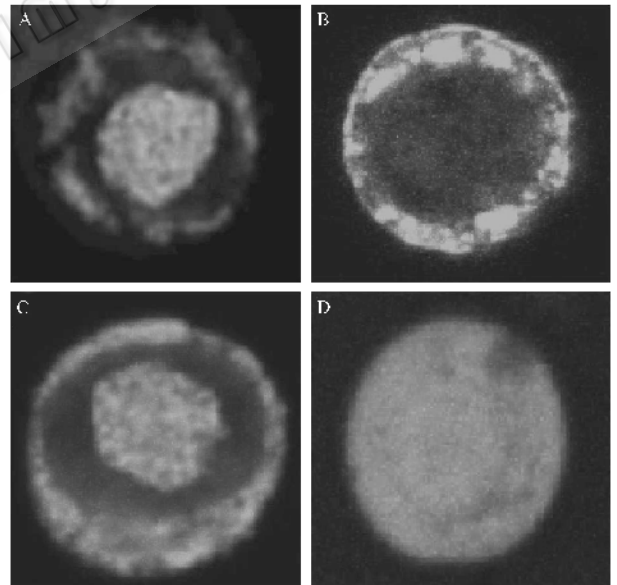


图 2 激光共聚焦显微镜观察 EGFP 标记不同融合蛋白在 Sf-9 细胞内的表达和定位(1000 \times)

Fig.2 Photographic images of Sf-9 cells transfected with recombinant baculoviruses expression of various EGFP tagged truncated HPV16L1 fusion proteins. The intracellular localization of the EGFP fluorescence was visualized by laser confocal microscopy. Nuclear import of the fusion proteins can be mediated by the NLS HPV16. A: EGFP-HPV16L1 protein can be mainly concentrated in the nuclear; B: EGFP-HPV16L1 Δ NLS can be location in the cytoplasm; C: EGFP-NLS_{HPV16L1} can be concentrated in the nuclear; D: EGFP alone can be distributed throughout the cell(1000 \times).

无绿色荧光(图2)。

3 讨论

NLS 是广泛存在于真核细胞大多数核内蛋白和某些病毒蛋白质结构中富含 Arg、Lys 并在一级结构上十分保守的氨基酸序列,在帮助细胞核蛋白穿越核孔复合物(nuclear pore complex, NPC)^[12]突破核膜屏障完成核浆运输和引导某些病毒组分向宿主细胞核内转运的过程中起信号作用。能够通过 NPC 运输的大分子物质一般必须具备 NLS^[13~16]。

该研究应用激光共聚焦显微镜观察发现,EGFP 标记的不同截短型 HPV16L1 融合蛋白,其荧光特性(如激发光波长和发射光波长)与 EGFP 相同,说明在上述融合蛋白中 EGFP 维持了原有空间构象和荧光特性。利用倒置荧光显微镜对不同截短型 HPV16L1 蛋白在 Sf-9 细胞内转运动力学过程的观察发现:NLS_{HPV16L1} 能够引导 EGFP-HPV16L1 融合蛋白和 EGFP-NLS_{HPV16L1} 蛋白在表达之后被顺利转运入细胞核内;而删除 NLS_{HPV16L1} 的截短型 EGFP-HPV16L1 Δ NLS 融合蛋白则始终滞留于 Sf-9 细胞浆内。从实时动力学的角度证实了 NLS_{HPV16L1} 的核定位作用。

同时,该研究还发现无论是 EGFP 标记的完整 HPV L1 蛋白还是仅携带 NLS_{HPV16L1} 的 EGFP 融合蛋白在 Sf-9 细胞内的转运都是一个持续的过程,并最终聚集于 Sf-9 细胞核内,而删除 NLS_{HPV16L1} 的截短型 EGFP-HPV16L1 Δ NLS 融合蛋白却一直滞留于细胞浆内。Sf-9 细胞在感染 96h 之后开始死亡,单纯的 EGFP 很容易地便被释放至培养上清之中,而包含 NLS_{HPV16L1} 的 EGFP-HPV16L1 融合蛋白和 EGFP-NLS_{HPV16L1} 融合蛋白及删除 NLS_{HPV16L1} 的截短型 EGFP-HPV16L1 Δ NLS 融合蛋白则均与 Sf-9 细胞碎片具有较强的结合能力,而不能被轻易释放至培养上清之中。推测除了已知由于 HPV16 L1 蛋白羧基端的 NLS 区具有 DNA 结合能力^[5]而可能与 Sf-9 细胞 DNA 结合之外,截短型 HPV16L1 Δ NLS 蛋白仍可能具有和 Sf-9 细胞核内分子如核基质 Nuclear matrix 相互作用的能力。

寻找安全、有效并能成功突破细胞核膜屏障,实现外源蛋白的成功细胞核内投送的途径和方法,一直是生物治疗与研究领域中的热点。控制真核细胞胞浆和胞核之间物质交换 NPC,在进化过程中非常保守,无论是酵母还是哺乳类细胞,其核孔复合物的结构均非常相似,且转运蛋白也具有很高的同源

性^[12] NLS 在不同生物中可以发挥相同作用。因此,利用 NLS 实现外源分子跨膜运输具有十分重要的前景^[17],也为核靶向药物的设计提供了新的思路,具有重要的医药学价值^[18]。该研究发现 NLS_{HPV16L1}(⁴⁸⁴KRKAtpttsstta⁴⁹⁹KRKKRK)具有核定位功能,能够引导 EGFP 进入 Sf-9 细胞核内,说明 NLS_{HPV16L1} 可以作为通用靶向药物输送系统(或称靶向制剂 Targeting drug delivery system, TDDS)的药物载体用于肽类靶向药物的核内投送。此外,由于病毒 NLS 结构具有一定的同源性并共享相似或相同的核浆转运机制,因此,将 NLS_{HPV16L1} 作为预防和治疗各种病毒感染的通用靶标,同样也是一个值得重视的新领域。

参 考 文 献

- [1] Zhou J, Doorbar J, Sun XY, *et al.* Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 L1 protein. *Virology*, 1991, **185**(2): 625 - 632.
- [2] Smith AE, Helenius A. How viruses enter animal cells. *Science*, 2004, **304**(5668): 237 - 412.
- [3] Whittaker GR, Helenius A. Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology*, 1998, **246**(1): 1 - 23.
- [4] Nelson LM, Rose RC, Moroianu J. Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem*, 2002, **277**(26): 23958 - 23964.
- [5] Touze A, Mahe D, El Mehdaoui S, *et al.* The nine C-terminal amino acids of the major capsid protein of the human papillomavirus type 16 are essential for DNA binding and gene transfer capacity. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **189**(1): 121 - 127.
- [6] Chook YM, Blobel G. Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, **11**(6): 703 - 715.
- [7] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, **263**(5148): 802 - 805.
- [8] Yang F, Moss LG, Phillips GN, *et al.* The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 1996, **14**(10): 1246 - 1251.
- [9] Dunder M, McNally JG, Cohen J, *et al.* Quantization of GFP-fusion proteins in single living cells. *J Struct Biol*, 2002, **140**(1-3): 92 - 99.
- [10] Skosyrev VS, Rudenko NV, Yakhnin A, *et al.* EGFP as a fusion partner for the expression and organic extraction of small polypeptides. *Protein Expr Purif*, 2003, **27**(1): 55 - 62.
- [11] 郑滨, 王健伟, 姜惠英, 等. 利用昆虫-杆状病毒表达系统表达人乳头瘤病毒 16 型 L1 蛋白. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2001, **15**(4): 314 - 316.
- [12] Davis LI. The nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem*, 1995, **64**: 865 - 896.
- [13] Pon IK, Jans DA. Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation? *Traffic*, 2005, **4**(3): 173 - 186.

- [14] Fahrenkrog B , Koser J , Aebi U . The nuclear pore complex : a jack of all trades ? *Trends Biochem Sci* 2004 **29** (4) :175 - 182 .
- [15] Nigg EA . Nucleocytoplasmic transport : signals , mechanisms and regulation . *Nature* , 1997 **386** (6627) :779 - 787 .
- [16] Weis K . Regulating access to the genome : nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle . *Cell* 2003 **113** (4) :441 - 451 .
- [17] Dean DA . Nuclear transport : an emerging opportunity for drug targeting . *Adv Drug Deliv Rev* 2003 **55** (6) :699 - 702 .
- [18] Jans DA , Chan CK , Huebner S . Signals mediating nuclear targeting and their regulation : application in drug delivery . *Med Res Rev* , 1998 **18** (4) :189 - 223 .

The dynamic process of of HPV16L1 nucleocytoplasmic transport

YANG Jun^{1 2} , WANG Yi-li² , SI Lv-sheng^{2*}

(¹ Department of Pathology , Second Hospital of Medical College , Xi'an Jiaotong University , Xi'an 710004 , China)

(² The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education , Institute for Cancer Research , School of Life Science & Technology , Xi'an Jiaotong University , Xi'an 710061 , China)

Abstract: In order to analyse the role of nucleus location signal of Human papillomavirus type 16 L1 protein (NLS_{HPV16L1}), the various truncated HPV 16 L1 protein were tagged by enhance green fluorescent protein (EGFP). After the EGFP gene and various truncated HPV16 L1 genes (HPV16 L1 , HPV16L1 Δ NLS and NLS_{HPV16L1} gene segment) were obtained , they were cloned into the baculovirus pFastbac-Hb transfer vector to constructe the recombinanted pFB-EGFP , pFB-EGFP-HPV16L1 , pFB-EGFP-HPV16L1 Δ NLS and pFB-EGFP-NLS_{HPV16L1} transfer vectors . Through Tn7 transposon-mediated site-specific *in vivo* transposition , the foreign gene expression cassette was integrated into a baculovirus shuttle vector (bacmid). Then the various bacmid DNA were used to transform *DH10Bac* to generate recombinant Ac-EGFP , Ac-EGFP-HPV16L1 , Ac-EGFP-HPV16L1 Δ NLS and Ac-EGFP-NLS_{HPV16L1} baculoviruses respectively . After Sf-9 cells were transfected with the recombinant baculoviruses respectively , the intracellular localization of the EGFP tagged fusion proteins containing various truncated of HPV16L1 in Sf-9 cells were visualized by fluorescence microscopy and laser confocal microscopy . The green fluorescence was mainly congregated in the nuclei of Sf-9 cells transfected with the recombinant Ac-EGFP-HPV16L1 and Ac-EGFP-NLS_{HPV16L1} baculoviruses . The green fluorescence was resorted as a wreath in the cytoplasm of Sf-9 cells transfected with the recombinant Ac-EGFP-HPV16L1 Δ NLS baculoviruses at all times . The green fluorescence was spreaded through the nuclei and cytoplasm of Sf-9 cells transfected with the recombinant Ac-EGFP baculoviruses . The data suggest that the NLS_{HPV16L1} (NLS of HPV16L1) should has the full function . It plays an important role in the nuclear import of HPV L1 protein . EGFP could be mediated and transported into the nuclei of Sf-9 cells by the NLS_{HPV16L1} also . It is feasible that the NLS_{HPV16L1} could be used as targeting drug carrier in Targeting drug delivery system (TDDS) .

Keywords: Human papillomavirus type 16 (HPV16) ; Nucleus location signal (NLS) ; Nucleocytoplasmic transport ; Enhanced green fluorescent protein (EGFP)