

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学 号: 32620141150560

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

人免疫缺陷病毒 I 型基质蛋白单克隆抗体  
制备及其识别表位初步研究

Production and Epitope Mapping of Monoclonal Antibodies  
against Human Immunodeficiency Virus Type 1 Matrix

张峰

指导教师姓名: 夏宁邵 教授

顾 颖 副教授

专 业 名 称: 流行病学与卫生统计学

论文提交日期: 2017 年 04 月

论文答辩日期: 2017 年 05 月

学位授予日期: 2017 年 06 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2017 年 05 月

人免疫缺陷病毒Ⅰ型基质蛋白单克隆抗体制备及其识别表位初步研究

张峰

指导教师

夏宁邵教授

厦门大学

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（夏宁邵）课题（组）的研究成果，获得（本）课题（组）经费或实验室的资助，在（疫苗中心）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：张峰

2017年5月

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：张峰  
2017年5月

## 摘要

HIV-1 在全球流行传播，危害公众健康，目前仍无有效预防性疫苗，高效抗反转录病毒疗法可以抑制病毒复制，但不能彻底清除感染者体内的病毒。因此，针对 HIV-1 相关结构蛋白特性进行深入研究，对于 HIV-1 疫苗研发及新药研制具有重要意义。

研究表明 HIV-1 前体蛋白 (Gag, P55)，在病毒成熟过程中被蛋白酶逐步水解，可以形成未成熟中间体蛋白 (P41)，及病毒成熟期的基质蛋白 (Matrix, P17)、衣壳蛋白 (Capsid, P24) 和核衣壳蛋白 (Nucleocapsid, P9)，这些结构蛋白对病毒颗粒的正确组装及感染性病毒颗粒的形成具有重要意义。P17 位于 P55 的 N 端，在 HIV-1 病毒复制中具有重要作用：(1) 酰胺化修饰的 P17 可以介导 P55 靶向细胞膜，并多聚化，使病毒颗粒组装；(2) 在病毒颗粒成熟过程中，P17 可以促进包膜蛋白 (Envelope, Env) 三聚化，形成完整的具有感染性的病毒粒子；(3) 同时 P17 的 N 端含有核定位信号及核输出信号，在病毒复制早期阶段，辅助病毒核酸靶向细胞核；在病毒复制晚期，P17 引导核酸向细胞质运输。P17 可以靶向、结合细胞膜，又可以从包膜上解离，这种相反的功能表明 P17 结构具有多样性，但是针对 P17 在 HIV-1 成熟的不同阶段结构差异尚没有相关报道。基于单克隆抗体识别抗原表位的特异性，本研究尝试用单克隆抗体表征 P17 在病毒复制周期不同阶段的差异，并对 P17 相关表位进行分析。

本研究通过原核表达系统获得可溶性的重组蛋白 P17，通过还原性 SDS-PAGE 和分子筛分析显示其纯度达到 95%，在非还原型 SDS-PAGE 和 WB 中，P17 可以自组装为多聚体并与抗体具有较好的结合能力。同时 P17 与 1000 倍稀释后的 HIV-1 阳性血清有较好的反应性，表明本研究中重组蛋白 P17 可以正确折叠，具有较好生物活性，近似模拟天然结构。

使用重组蛋白 P17 免疫小鼠并筛选获得特异性单克隆抗体 36 株，依据实验结果将 36 株单克隆抗体分为三类：第一类抗体 22 株只能与 P17 发生反应；第二类抗体 9 株能与 P17、P41 发生反应；第三类抗体 5 株能够同时与 P17、P41 和 P55 发生反应。这三种重组蛋白 (P17、P41 和 P55) 都含有相同的 N 端 132 个

氨基酸，但与 36 株抗体反应性差异表明 P17、P41 和 P55 存在构象差异，特别是基质蛋白 N 端可以形成差异显著的表位。

为进一步探究 36 株抗体主要识别表位区段，本研究利用合成肽初步鉴定其识别表位，发现第二、三类抗体主要识别 41-55aa 位氨基酸，而第一类抗体与合成肽几乎无反应，说明其识别偏向于构象性表位。同时使用高盐离子、极端 pH、高温、DDT、蛋白酶 K 等处理 P17 蛋白，只有蛋白酶 K 对 HIV-1 非特异性水解及高温可以有效破坏 P17 结构，导致抗体不反应，表明重组蛋白 P17 性质稳定。

进一步研究抗体识别 P17 抗原的主要位点及可能的结合方式，本研究中分别选取三类抗体中的代表株，调取抗体 CDR 基因、进行同源模建和分子对接，初步获得抗原抗体结合的可能方式及关键氨基酸。同时，再虚拟氨基酸突变及实验验证，结果显示：第一类抗体识别的表位中，很大部分是 P17 所特有且很稳定的构象表位。第二及第三类抗体所识别的表位偏向于线性表位，表明这些抗体识别的表位在 P17、P41 和 P55 中具有通用性，在突变验证中只表现为抗原抗体反应活性降低。

结合相关报道，发现相比于衣壳蛋白和核衣壳蛋白，HIV-1 基质蛋白固有无序性高达 61.36%，特别是 N 端是高度无序区域，这些区域在 P17、P41 和 P55 可能存在显著变化，导致 P17 在 HIV-1 成熟的不同阶段具有不同空间结构，在 P55 靶向细胞膜时，酰胺化的 N 端是线性化表位，在成熟的 P17 中，N 端区域被周围氨基酸包裹隐藏，形成构象型表位。

综合上述结果，本研究探索 36 株 P17 特异性单克隆抗体与病毒成熟过程不同阶段蛋白反应差异，初步鉴定了抗体识别表位，认为 P17 在病毒复制周期存在显著构象差异。这些工作将为 HIV-1 基质蛋白相关研究及疫苗、药物研发提供参考。

**关键词：**HIV-1 基质蛋白 单克隆抗体 表位鉴定

## Abstract

HIV-1 is widely epidemic and threaten public health, but there is still no effective vaccine, and current antiviral drugs just suppress HIV-1 replication. Therefore, the most significant research in structural proteins of HIV-1 is important in development drugs and vaccines for eliminating this virus.

The HIV-1 precursor polyprotein (P55) is orderly cleavaged by the protease into immature intermediate protein (P41) and maturation proteins. The matrix (P17), capsid (P24) and nucleocapsid (P9) are the mature structure proteins, which are important for virus assembling and infection. The N-terminus of P55 is myristoylated matrix, it has 132aa, which possesses several important functions: (1) Matrix directs the precursor polyprotein (P55) targeting to the plasma membrane (PM); (2) Matrix recruits envelope protein and complex it into HIV-1; (3) The NSE and NLS signal of matrix influences RNA subcellular localization. The biological functions of the matrix (P17) involved in virus assembly, membrane binding, Gag targeting and Env incorporation. A site-directed mutagenesis of the matrix (P17) domain caused a significant decrease in the virous particle formation and viral infection.

In this dissertation, using *E.coli* expression system product recombinant protein P17, which the purity is about 95% in reducing SDS-PAGE and size exclusion chromatography. Intertrisingly, the P17 can assembly multi-polymers in non-reducing SDS-PAGE, and dilution 1000 times of HIV-1 poitive serum had performance reaction with P17. It means that recombinant protein P17 can fold correctly with biology activity.

The Balb/c was immunized by recombinant protein P17, and then we screened 36 strains mAbs. According to the result of indirect ELISA and Western blot, the 36 antibodies were divided into three classes: the first class including 22 antibodies react with P17 only; the second class 9 antibodies react with P17 and P41; the third class 5 antibodies react with p17, p41 and p55. Although, the P17, P41 and P55 have the same 132aa at the N-terminal, causing difference reactivity by P17 conformation changing.

Further exploring this discovery, synthetic peptides of P17 were used to mapping epitope of 36 antibodies. The results indicated that the second and third class antibodies recognized the peptide 41-55aa, however, the first class antibodies had weakly reactivity with peptides, it means that the epitope of the first class antibodies are structure dependent. Of course, using different conditions (NaCl, pH, high temperature, DDT, protease K) to test the stabilize of P17, only protease K and high temperature can destroy the structure and activity of P17.

To map the key amino acid of these antibodies, the CDR gen of some antibodies were cloned, and then we used the homology modeling, monoclonal docking and mutagenesis to study these antibodies' epitopes. The results indicated that the first class antibodies had not significantly reactivity decreased with a series of mutation P17. However, the others antibodies had weakly reactivity, almost 1000 times decreasing with mutation protein of P17.

From reported papers, the matrix of HIV-1 has highly intrinsic disorder about 61.36%, especially N-terminal of matrix has flexibility and structure variously in different period of HIV-1 life cycle, becoming special epitopes for immune system. In the early stage of virus life cycle, myristate and the basic domain of was exposed and formed a dominant targeting to plasma membrane. After maturation, the myristate P17 was hidden.

In summary, we obtained 36 antibodies that react with different period protein of HIV-1. This results demonstrated matrix (P17) had obviously structure flexibility and changing. Our works can provide some information for further researching at vaccine and new drugs discovery.

**Keywords:** HIV-1; Matrix; Monoclonal antibody; Epitope mapping



<b>中文摘要</b> .....	<b>I</b>
<b>英文摘要</b> .....	<b>III</b>
<b>第一部分 前言</b> .....	<b>1</b>
<b>1 HIV 介绍</b> .....	<b>1</b>
1.1 HIV-1/AIDS 的发现与流行 .....	1
1.2 HIV 起源 .....	2
1.3 HIV-1 基本特征 .....	4
1.4 人免疫缺陷病毒 (HIV-1) 的生活周期 .....	9
<b>2 基质蛋白</b> .....	<b>11</b>
2.1 基质蛋白结构 .....	11
2.2 基质蛋白生物学功能 .....	12
2.3 基质蛋白免疫学功能 .....	14
<b>3 研究意义和思路</b> .....	<b>15</b>
<b>第二部分 材料与方法</b> .....	<b>17</b>
<b>1 实验材料</b> .....	<b>17</b>
1.1 主要设备 .....	17
1.2 实验用菌株、质粒、实验动物、软件 .....	17
1.3 免疫及检测相关蛋白 .....	18
1.4 HIV-1 感染性病毒株及阳性血清 .....	18
1.5 常用试剂 .....	19
1.6 其它常用耗材 .....	19
<b>2 试验方法</b> .....	<b>19</b>
2.1 常用液体配制方法 .....	19
2.2 常规分子生物学实验方法 .....	22
2.3 重组蛋白原核表达 .....	23
2.4 蛋白纯化 .....	24

2.5 小鼠免疫及抗体滴度监测.....	26
2.6 小鼠单克隆抗体筛选.....	26
2.7 间接 ELISA 抗体亲和力检测.....	28
2.8 单克隆抗体 CDR 区基因调取 .....	29
<b>第三部分 实验结果与分析.....</b>	<b>33</b>
1 重组蛋白 P17 原核表达纯化及活性分析 .....	33
2 HIV-1 P17 单克隆抗体筛选及初步分析.....	36
3 合成肽鉴定单克隆抗体表位 .....	41
4 HIV-1 P17 抗原稳定性研究.....	45
5 HIV-1 P17 抗体 CDR 区调基因.....	49
6 抗体同源模建及分子对接 .....	50
7 定点突变验证抗体结合位点 .....	53
8 HIV-1P17 功能定位及固有无序性预测.....	57
<b>讨 论 .....</b>	<b>59</b>
1 重组蛋白 P17 表达纯化及活性研究 .....	59
2 P17 单克隆抗体筛选及表位鉴定.....	59
3 P17 蛋白固有无序性及功能区定位.....	60
4 P17 构象变化相关研究.....	61
5 HIV-1 病毒复制周期中 P17 构象变化.....	62
<b>结 论 .....</b>	<b>63</b>
<b>展 望 .....</b>	<b>65</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>66</b>
<b>附 录 .....</b>	<b>74</b>
<b>致 谢 .....</b>	<b>75</b>

## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>III</b>
<b>Section I Preface</b> .....	<b>1</b>
<b>1 HIV introduction</b> .....	<b>1</b>
1.1 Discovery and epidemiology of HIV-1/AIDS .....	1
1.2 Origin of HIV .....	2
1.3 Features of HIV-1 .....	4
1.4 Life cycle of HIV-1 .....	9
<b>2 Matrix</b> .....	<b>11</b>
2.1 Matrix structure.....	11
2.2 Biology function of matrix.....	12
2.3 Imune function of matrixi .....	14
<b>3 The objectives and significance</b> .....	<b>15</b>
<b>Section II Materials and Methods</b> .....	<b>17</b>
<b>1 Materials</b> .....	<b>17</b>
1.1 Instrument .....	17
1.2 Strains, plasmids, animals, software .....	17
1.3 Proteins of immune and testing.....	18
1.4 HIV-1 virus strains and positive serum .....	18
1.5 Reagents .....	19
1.6 Others materials .....	19
<b>2 Methods</b> .....	<b>19</b>
2.1 Solutions .....	19
2.2 Molecular biology experiment method .....	22
2.3 Prokaryotic expression recombinant proteins .....	23
2.4 Protein purification .....	24
2.5 Mice immune and serum monitor .....	26
2.6 Monoclonal antibody screening .....	26
2.7 Indirect ELISA testing .....	28

---

2.8 CDR gen cloned of monoclonal antibody.....	29
<b>Section III Results and Analysis.....</b>	<b>33</b>
<b>1 Production of P17 and activity analysis .....</b>	<b>33</b>
<b>2 Screening and analysis of Monoclonal antibody .....</b>	<b>36</b>
<b>3 Epitope mapping of Monoclonal antibody .....</b>	<b>41</b>
<b>4 Antigen stability testing of P17 .....</b>	<b>45</b>
<b>5 CDR gene cloned of monoclonal antibody.....</b>	<b>49</b>
<b>6 Homologous molding and molecular docking .....</b>	<b>50</b>
<b>7 Mutagenesis analysis.....</b>	<b>53</b>
<b>8 Intrinsic disorder of matrix.....</b>	<b>57</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>59</b>
<b>1 Purified and active analysis of matrix.....</b>	<b>59</b>
<b>2 Screening and epitope mapping of monoclonal antibody .....</b>	<b>59</b>
<b>3 Intrinsic disorder and function localization of matrix .....</b>	<b>60</b>
<b>4 Conformation changing of P17 .....</b>	<b>61</b>
<b>5 P17 conformation changing in life cycle of HIV-1 .....</b>	<b>62</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>63</b>
<b>Prospect.....</b>	<b>65</b>
<b>Reference.....</b>	<b>66</b>
<b>Appendix.....</b>	<b>74</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>75</b>

## 英文缩略词

缩写	英文全称	中文名称
aa	Amino Acid	氨基酸
Ab	Antibody	抗体
Ag	Antigen	抗原
bp	Base Pair	碱基对
CA	Capsid	衣壳蛋白
CB	Carbonate Buffer	碳酸盐缓冲液
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
CDR	Complementarity Determining Region	互补决定区
DMSO	Dimethyl-sulfoxide	二甲基亚砷
dNTP	Deoxynucleoside Triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
DNA	Deoxyribonucleic Acid	脱氧核糖核酸
DTT	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbant Assay	酶联免疫吸附试验
Env	Envelope Glycoprotein	膜糖蛋白
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
Gag	Major Structural Protein	主要结构蛋白
GAM	Goat Anti-Mouse	羊抗鼠
HIS	Histidine	组氨酸
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
Ig	Immunoglobulin	免疫球蛋白
IN	Integrase	整合酶
Kan	Kanamycin	卡那霉素
Kb	kilobases	千碱基
kD	Kilo Daltons	千道尔顿
MA	Matrix	基质蛋白
mAb	Monoclonal Antibody	单克隆抗体

---

mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
MW	Molecular Weight	分子量
NC	Nucleocapsid	核衣壳蛋白
PDB	Protein Data Bank	蛋白质数据库
PEG	Polyethylene Glycol	聚乙二醇
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride	苯甲磺酰氟
PR	Protease	蛋白酶
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核酸
RT	Reverse Transcriptase	逆转录酶
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	十二烷基磺酸钠
SIV	Simian Immunodeficiency Virus	猴免疫缺陷病毒
SIVcpz	SIV of chimpanzees	黑猩猩免疫缺陷病毒
SU	Surface Glycoprotein	表面糖蛋白
TM	Transmembrane Glycoprotein	跨膜糖蛋白
WB	Western Blot	免疫印迹实验

## 第一部分 前言

### 1 HIV 介绍

#### 1.1 HIV-1/AIDS 的发现与流行

20 世纪 80 年代初，欧美部分国家陆续报道由于某种感染导致患者的免疫功能进行性降低，主要表现为患者全身性淋巴结肿大、发生机会性感染（例如卡氏肺囊虫性肺炎）和罕见肿瘤。实验检测发现这些患者全身 CD4<sup>+</sup>淋巴细胞数进行性减少。1981 年 6 月，美国疾病预防控制中心通报了 5 名男性同性恋发生卡氏肺囊虫性肺炎，这种感染在正常人群中非常少见<sup>[1]</sup>。随后，在血友病和接受输血的患者及这些高危人群的家属中也发现类似免疫功能缺陷的病例。1983 年，法国科学家蒙塔尼报道，他们从感染者的淋巴结组织中分离出一种病原体，通过电子显微镜（TEM）鉴定，发现病原体呈现类似逆转录病毒样形状，他们将其命名为淋巴腺病相关病毒<sup>[2]</sup>。同年，盖洛教授也报道了一种新病毒人类嗜 T 细胞病毒 III<sup>[3]</sup>，加州大学里维教授也分离到一种艾滋病相关病毒<sup>[4]</sup>。通过比较分析这三种病毒，发现它们在整体形态结构、基因和细胞嗜性具有一些共同的特点，1986 年 6 月国际病毒分类学会，将这种病毒统一命名为人类免疫缺陷病毒（Human Immunodeficiency Virus, HIV）<sup>[5]</sup>，可以攻击人体的免疫细胞，使感染者免疫功能进行性降低，即就是获得性免疫缺陷综合征（Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS），在感染者疾病进展的过程中，患者最终会发生机会性感或/和罕见肿瘤而死亡。蒙塔尼团队在 1986 年又报道了 HIV-2<sup>[2, 6]</sup>。

自 HIV-1 发现以来，该病毒迅速在全球蔓延扩散，据 WHO 报道，截至 2016 年底，全球现存感染 3500 万，新发感染 210 万，病毒相关死亡 110 万。截至 2015 年底，我国现患者约 85 万。艾滋病流行导致局部地区人均寿命大幅度降低，严重威胁人类健康。全球科学家对该病毒及疾病进行了多方面研究报道，为艾滋病的预防和治疗提供了多种方式，高效抗反转录病毒治疗在一定程度上可以抑制病毒复制，并且需要患者坚持服药，但目前无法彻底清除感染者体内的病毒。有效

预防性疫苗保护易感人群，及高效抗病毒疗法清除感染者体内病毒将是遏制 HIV-1 全球流行的有效武器。

## 1.2 HIV 起源

30 年以来，科学家尝试探索该病毒起源，在各种非人灵长类动物（包括非洲绿猴、乌白眉猴、山魈和黑猩猩）中发现一些类似的病毒，但这些病毒不会使宿主致病，大多表现为持续感染状态，通过比较 HIV 与其他逆转病毒核酸序列，目前认为在 30-100 年前 HIV 从非人灵长类通过跨物种传播进入到人群中（如图 1）<sup>[7]</sup>。

目前初步确认，HIV-1 来自黑猩猩<sup>[8]</sup>。HIV-1 某个亚型由于跨物种传播到特定人群中，然后再衍生出其他亚型，包括重组病毒的形成。SIVcpz 与 HIV-1 的 M 组和 N 组核酸序列相似性达到 80%<sup>[9, 10]</sup>。SIVcpz 是多种 SIV 重组形式，SIVcpz、SIV 和 HIV-1 都具有 Vpu 基因功能区域<sup>[11]</sup>。此外，还有人感染猿类逆转录病毒的病例<sup>[12]</sup>，支持 HIV-1 起源于黑猩猩，但这种机制仍不清楚，中间可能还需要其他因素促进 SIVcpz 进化到 HIV-1<sup>[13]</sup>。基于全球大量实地调查研究，其中非洲地区包含有 HIV-1 病毒的全部亚型，认为 HIV-1 病毒的发源地是非洲<sup>[14]</sup>。比较 SIVgor 病毒（可以感染大猩猩）和 HIV-1 的 O 组病毒的核酸序列，发现它们之间具有较高相似性，推测 O 组病毒可能来自大猩猩<sup>[15]</sup>。目前认为 M 组病毒起源于刚果，喀麦隆的东南部是 N 组和 O 组病毒的发源地<sup>[16]</sup>。

在 HIV-2 的七个组中，有 5 个可能起源于乌白眉猴，病毒 E 和 F 组来自于塞拉利昂株<sup>[17]</sup>，G 组与利比亚株具有较大关系<sup>[18]</sup>，流行较广的 A 组和 B 组则起源于象牙海岸的乌白眉猴<sup>[19-21]</sup>。

对非洲地区约 35 种非人灵长类的 SIV 病毒核酸序列进行遗传进化分析<sup>[22]</sup>，目前可以确认 HIV-1 是由病毒多次跨物种传播，从黑猩猩传播到人群中，而 HIV-2 是感染乌白眉猴的病毒跨物种传播到人群形成<sup>[18]</sup>。在进化树中，遗传距离表明不同灵长类的 SIV 起源、进化及变异关系，HIV-1 与 HIV-2 基因组结构及排列非常相似<sup>[11]</sup>，但遗传关系并不近，二者的序列差异大于 55%，在抗原方面也存在显著差异（如图 2）。实验发现，HIV-1 和 HIV-2 病毒包膜糖蛋白与感染者血清反应存在显著差异，HIV-2 感染者血清与 HIV-1 的 Gag 蛋白和 Pol 蛋白存在部分程度



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库