

学校编码：10384
学号：32620141150578

分类号____密级____
UDC_____

厦门大学
硕士 学位 论文

轮状病毒 VP4 截短蛋白多聚化及其免疫保护性研究

Multimerization and protective efficacy of rotavirus VP4
truncated proteins

贾连智

指导教师姓名： 葛胜祥 副教授

李廷栋 老师

专业名称： 转化医学

论文提交日期： 2017 年 05 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

轮状病毒 VP4 截短蛋白多聚化及其免疫保护性研究

贾连智

指导教师

葛胜祥 副教授 李廷栋 老师

厦门大学

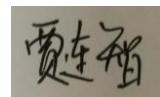
厦门大学博硕士论文摘要库

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()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()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):



2017 年 5 月 26 日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

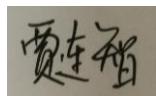
本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

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)：



2017 年 5 月 26 日

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

轮状病毒是全球范围内引起 5 岁以下婴幼儿腹泻的主要病原体，在全球每年由于轮状病毒感染导致的死亡病例高达 40-60 万。疫苗是预防轮状病毒感染及发病最有效的途径，目前已经有两种轮状病毒疫苗（Rotateq 和 Rotarix）在全球范围内推广使用，70 多个国家已经将轮状病毒疫苗纳入免疫规划。随着轮状病毒疫苗的推广，轮状病毒导致的年死亡病例由 40-60 万下降到 20 万左右。但是目前的轮状病毒疫苗存在地区有效性差异大、会诱发小儿肠套叠等问题，因此更加安全、有效的轮状病毒亚单位疫苗的研究对于进一步降低轮状病毒导致的发病率和死亡率具有重要意义。VP4 作为刺突蛋白，介导了轮状病毒的吸附和入胞过程，其抗体可以阻断轮状病毒的吸附和入胞过程，是轮状病毒基因工程亚单位疫苗一种重要的候选抗原。

本课题组在前期研究中发现 N 端起始于 26 位氨基酸、C 端终止于 476 位氨基酸的 VP4 截短蛋白在大肠杆菌中以可溶形式表达，其在铝佐剂条件下的免疫原性显著高于 VP8-1 (aa26-231)。本研究拟探究影响 26-476 蛋白免疫批间差的原因，并对 26-476 高聚体的形成条件及其性质初步评价，并把轮状病毒 VP4 多聚化推广至其他基因型 VP4 蛋白，以期获得均一性、稳定性较好，免疫原性强、免疫保护性高的 VP4 重组蛋白候选疫苗。

本研究首先在免疫佐剂的选用、内毒素含量、二硫键三个方面探究了影响 26-476 蛋白免疫原性的原因，发现免疫佐剂及内毒素对蛋白的免疫原性存在一定的影响，但并不是主要因素，但是二硫键的形成可使其形成高聚体，从而显著增强其免疫原性及免疫保护性。然后，我们对 26-476 高聚体的形成条件进行探究证实盐离子浓度对 26-476 高聚体的形成存在直接关系，而 pH 是形成高聚体大小的关键因素。利用 TEM、AUC、HPLC、DSC 等分析技术对不同高聚体的形态大小及热稳定性进行分析，证实了 26-476 高聚体是大小均一、热稳定性良好、形态不规则的颗粒状聚合物。并对高聚体的抗原性、免疫原性、免疫中和活性进行了探究，发现 TB8.0 及 TB8.8 条件下形成的高聚体很好的保持了表面中和表位的完整性，其三种性质均得到了加强。最后，我们把 VP4 形成高聚体推广至包

括人源毒株在内的其他基因型毒株后，发现 VP4-26-476 (LLR) 形成高聚体的条件对于不同基因型的 VP4 截短蛋白高聚体的制备具有通用性。

综上所述，本研究获得了均一的 VP4 截短蛋白的高聚体，该高聚体大小均匀、热稳定性良好，相比三聚体具有更高的抗原性、免疫原性及免疫中和活性，为未来 VP4 基因工程亚单位疫苗的研制提供了更广阔的思路。

关键词： 轮状病毒 基因工程疫苗 VP4 高聚体 中和抗体 免疫保护性

Abstract

Rotavirus is a major pathogen that causes diarrhea in infants and young children under 5 years of age worldwide, with 40 to 60 million deaths worldwide due to rotavirus infection. Vaccine is the most effective way to prevent rotavirus infections. Two rotavirus vaccines (Rotateq and Rotarix) are now available worldwide, and more than 70 countries have included rotavirus vaccines in immunization programs. With the promotion of rotavirus vaccines, the number of rotavirus-induced deaths become from 40-60 million to 20 million or so. However, the current rotavirus vaccine has significant regional differences in efficacy, and could induce intussusception and other safety issues, so a more safe and effective study of rotavirus subunit vaccine is important for further reducing rotavirus-induced morbidity and mortality. VP4, as a spike protein, mediates rotavirus adsorption and cellular entry process. VP4 antibody can block the two processes, rotavirus genetic engineering subunit vaccine is an important candidate antigen.

In the previous study, VP4 truncated protein with N-terminal amino acid at position 26 and C-terminal amino acid at position 476 was expressed in soluble status in Escherichia coli, and its immunogenicity with aluminum adjuvant is significantly higher than VP8-1 (aa26-231). In this study, we investigated the reasons for the effect of 26-476 protein immunization, evaluated the formation conditions and properties of 26-476 polymers preliminarily, and introduced the multimerization to other genotype VP4 protein. In order to obtain high immunoprotective VP4 recombinant protein with uniformity, stability, immunogenicity to be the rotavirus candidate vaccine.

In this study, we first explored the immunogenicity of 26-476 with different adjuvants, endotoxin and disulfide bond. It was found that immune adjuvant and endotoxin had some influence on the immunogenicity of protein, but not major factors. 26-476 could become polymer because of the formation of disulfide bonds, which significantly enhance the immunogenicity and immunoprotection. Then we

investigated the formation conditions of the 26-476 polymer. It was confirmed that the salt ion concentration was directly related to the formation of the 26-476 polymer, whereas pH was a key factor in the size of the polymer. The morphological size and thermal stability of different polymers were analyzed by TEM, AUC, HPLC and DSC. It was confirmed that the 26-476 polymer was uniform in size and in thermal stability but irregular in morphology. And the antigenicity, immunogenicity, immuno-neutralizing activity of the polymer were investigated. It was found that the polymers formed with TB8.0 and TB8.8 maintained the integrity of the surface epitope. Its three properties have been strengthened. Finally, we introduced the multimerization to other genotypic strains, including human strains, and found that the formation conditions for VP4 truncated protein polymers of different genotypes is versatile.

In conclusion, this study obtained homogeneous polymer of VP4 truncated protein, the polymer size uniformity, well thermal stability, compared with the trimer which has a higher antigenicity, immunogenicity and immunity neutralizing activity. It provides a great idea for the VP4 gene engineering subunit vaccine development.

Key words: Rotavirus; Genetic engineering vaccine; VP4 polymer; Neutralizing antibody; Immunoprotectivit

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
缩略词（Abbreviation）	vii
第一章 前言	1
1. 轮状病毒结构	1
1.1. 轮状病毒形态与性质概述.....	1
1.2. 轮状病毒基因组概述	2
1.3. 轮状病毒蛋白组成	2
2. 轮状病毒分类及命名	7
3. 轮状病毒流行病学	8
3.1. 轮状病毒流行的季节性特征	8
3.2. 轮状病毒的地域性流行及流行趋势变化	9
4. 轮状病毒感染、致病及免疫机制.....	12
4.1. 轮状病毒感染过程及治病机制	12
4.2. 轮状病毒免疫机制	12
4.3. 轮状病毒免疫相关性因素	13
5. 轮状病毒动物模型研究	15
6. 轮状病毒疫苗发展	16
6.1. 轮状病毒疫苗概况	16
6.2. 轮状病毒减毒疫苗研究进展	17
6.3. 轮状病毒的基因工程疫苗研究进展	20
7. 本研究目的及意义	23
第二章 材料与方法	24
1. 材料.....	24
1.1. 仪器	24

1.2. 菌种和质粒	25
1.3. 病毒细胞及实验动物	25
1.4. 常用试剂及耗材	25
1.5. 其他试剂及耗材	26
2. 方法.....	26
2.1. 常用溶液及培养基配制	26
2.2. 常规分子生物学实验	29
2.3. 常规细胞生物学实验	36
2.4. 轮状病毒感染滴度检测	35
2.5. 重组蛋白纯化及性质鉴定实验	36
2.6. 动物实验方法	41
2.7. 统计方法	44
第三章 结果与分析	45
1. 羊轮状病毒 VP4 截短蛋白免疫原性影响因素研究.....	45
1.1. VP4 截短蛋白 VP4-26-476 (LLR) 的表达与纯化	45
1.2. 内毒素对蛋白 VP4-26-476 (LLR) 免疫保护性的影响	47
1.3. 二硫键对蛋白 VP4-26-476 (LLR) 免疫保护性的影响	49
1.4. 佐剂对蛋白 VP4-26-476 (LLR) 免疫保护性的影响	49
1.5. 小结	58
2. 羊轮状病毒 VP4 形成高聚体最适氨基酸区段的研究	58
2.1. 羊轮状病毒 VP4 截短蛋白的表达纯化	58
2.1. 羊轮状病毒 VP4 截短蛋白高聚体制备鉴定	60
3. VP4 高聚体制备条件优化及性质研究.....	61
3.1. 理化条件对 VP4 高聚体的研究	61
3.2. VP4 高聚体理化性质研究	63
3.3. VP4 高聚体抗原性研究	65
3.4. VP4 高聚体的免疫原性分析	67
3.5. 小结	68
4. 其他基因型 VP4-26-476 高聚体研究	69
4.1. 其他基因型 VP4-26-476 表达纯化	69
4.2. 其他基因型 VP4-26-476 高聚体制备	71

第四章 讨论	75
1. 中和抗体水平是 VP4 亚单位疫苗免疫保护相关性的重要指标.....	75
2. VP4 截短蛋白形成高聚体的机制	76
3. 不同基因型 VP4-26-476 蛋白形成高聚体条件的差异.....	78
4. VP4 高聚体作为新一代亚单位疫苗的优势以及局限性	79
第五章 总结与展望	81
1. 总结.....	81
2. 展望.....	81
参 考 文 献	82
致 谢	100

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	II
Abbreviation.....	vii
Chapter 1 Preface.....	1
1. Structures of rotavirus.....	1
1.1. Characteristics of rotavirus.....	1
1.2. Genomes of rotavirus	2
1.3. Protein of rotavirus	2
2. Classification and name of rotavirus.....	7
3. Rotavirus epidemiology.....	8
3.1. Rotavirus seasonal epidemics.....	8
3.2. Rotavirus regional popular and Trends of rotavirus	9
4. Rotavirus infection, pathogenicity and immune mechanisms.....	12
4.1. Rotavirus infection mechanisms and pathogenesis	12
4.2. Rotavirus immunization protection mechanisms	12
4.3. Rotavirus correlates of protection	13
5. Animal models of rotavirus infection.....	15
6. Rotavirus vaccines progress	16
6.1. Rotavirus vaccines overview	16
6.2. Rotavirus attenuated live vaccines	17
6.3. Rotavirus genetic engineering vaccines	20
7. The purpose and significance of this study.....	23
Chapter 2 Materials and methods.....	24
1. Meterial.....	24
1.1. Instrument.....	24

1.2.	Strains and plasmids.....	25
1.3.	Virus cells and experimental animals	25
1.4.	Reagents and consumables in common use	25
1.5.	Other reagents and consumables	26
2.	Methods.....	26
2.1.	Common solutions and media preparation	26
2.2.	Conventional molecular biology experiments.....	29
2.3.	Conventional cell biology experiments	36
2.4.	Detection of rotavirus TCID ₅₀	35
2.5.	The recombinant protein characterization experiment.....	36
2.6.	Animal experimental method	41
2.6.	Statistical method	41
Chapter 3 Results and analysis.....	45	
1.	VP4-26-476 (LLR) immune affecting factors reasearch	45
1.1.	Expression and purification of VP4-26-476 (LLR)	45
1.2.	Relationship of Endotoxin and protection.....	47
1.3.	Relationship of Disulfide bond affect and protection.....	49
1.4.	Relationship of adjuvant and protection.....	49
1.5.	Summary	58
2.	Opitimal structure domain of VP4 polymers.....	58
2.1.	LLR VP4 protein preparation.....	58
2.2.	LLR VP4 polymers preparation and analysis.....	60
3.	VP4-26-476 (LLR) polymers preparation and characterization	61
3.1.	VP4-26-476 (LLR) polymers preparation.....	61
3.2.	Physico-chemical characteristics of VP4 polymers	63
3.3.	Reaction analysis of polymers and antibodies	65
3.4.	Immunoprotective analysis of polymers	67
3.5.	Summary	68
4.	Characterizaton of VP4 polymers from other genotypes.....	69
4.1.	Other genotypes VP4-26-476 protein preparation	69
4.2.	Other genotypes VP4-26-476 polymers reasearch	71

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 for delivery details.

厦门大学博硕士论文全文数据库