

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21720091152130

UDC _____

廈門大學

硕士学位论文

人肠道病毒 71 型的构象中和表位的定位研究

Localization of the Conformational Neutralizing Epitopes in
Human Enterovirus 71

李川

指导教师姓名: 葛胜祥 助理教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2012 年 5 月 日

论文答辩时间: 2012 年 6 月 日

学位授予日期: 2012 年 月 日

答辩委员会主席: 赵勤俭 教授

评阅人: 孙慧 教授

车小燕 研究员

2012 年 5 月

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）：

年 月 日

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）：

年 月 日

目 录

摘要.....	1
ABSTRACT	3
缩写词 (ABBREVIATIONS)	5
第一章 前言	7
1 EV71 的病毒学.....	7
1.1 分类学地位.....	7
1.2 基因组结构.....	9
1.3 病毒理化性质.....	12
2 EV71 流行病学.....	13
2.1 流行历史.....	13
2.2 血清流行病学.....	17
2.3 分子流行病学.....	17
2.4 流行特征.....	21
3 EV71 致病机制和治疗	23
3.1 复制周期和致病机制.....	23
3.2 临床症状.....	24
3.3 抗病毒药物.....	26
4 EV71 疫苗和表位研究	29
4.1 疫苗研究.....	29
4.2 中和表位研究.....	31
4.3 抗原性研究.....	33
5 本文的研究目的、思路和意义	34
第二章 材料与方.....	36
1 材料	36
1.1 主要仪器.....	36

1.2 细胞株、病毒株	36
1.3 试剂	37
1.4 常用溶液及培养基配制	37
2 方法	41
2.1 小鼠的免疫	41
2.2 融合杂交瘤的制备与筛选	42
2.3 杂交瘤细胞的培养	44
2.4 单抗腹水的诱导	45
2.5 单抗腹水的纯化	46
2.6 酶联免疫吸附分析 (ELISA)	46
2.7 细胞生物学实验方法	47
2.8 EV71 培养、浓缩纯化及逃逸病毒的筛选	48
2.9 EV71 酶联免疫斑点方法	50
2.10 分子克隆及蛋白表达相关操作	52
2.11 乳鼠接种病毒及单抗治疗	57
第三章 结果分析	58
1 EV71 单抗库的构建	58
1.1 免疫原的评价	58
1.2 EV71 单抗库的建立	62
1.3 本节小结	63
2 EV71 中和单抗盘的建立及分离株的抗原性分析	66
2.1 单抗代表株中和活性测定	68
2.2 单抗代表株对重组蛋白的反应性鉴定	68
2.3 单抗代表株的阻断分析	70
2.4 中和单抗盘的建立及分离株的抗原性分析	72
2.5 本节小结	73
3 EV71 逃逸病毒方法学的探索和建立	75
3.1 中和单抗 K8G2 的鉴定	75
3.2 逃逸病毒方法学的探索和建立	78
3.3 逃逸病毒鉴定 K8G2 表位	83
3.4 本节小结	86

4 EV71 构象类中和表位的定位	87
4.1 逃逸病毒的培养鉴定	87
4.2 逃逸病毒的抗原性鉴定	89
4.3 构象类中和表位的定位	91
4.4 本节小结	98
第四章 讨论	100
1 EV71 免疫优势区域和单抗的诊断应用	100
1.1 EV71 免疫优势区域	100
1.2 单抗的诊断应用	101
2 构象类中和表位及中和单抗应用	103
2.1 构象类中和表位	103
2.2 中和单抗分析病毒抗原性	105
2.3 中和单抗治疗病毒感染	106
3 逃逸病毒方法学	108
4 EV71 抗原性特点	109
小结与展望	112
参考文献	113
致谢	134
在学期间发表论文	136

Table of contents

Abstract.....	3
Abbreviations.....	5
Chapter 1 Introduction.....	7
1 Virology of EV71.....	7
2 Epidemiology of EV71	13
3 Pathology and Treatments of EV71.....	23
4 Vaccine and Antigenic study of EV71.....	29
5 The purpose and meaning of this research.....	34
Chapter 2 Materals and Methods.....	36
1 Materials.....	36
2 Methods.....	41
Chapter 3 Results and Analysis.....	58
1 Construction of antibody library.....	58
1.1 Selection of immunogen.....	58
1.2 Construction of antibody library.....	62
1.3 Summary.....	63
2 Establishment of anti-EV71 mAb panel and antigenic analysis of viral isolates.....	64
2.1 Neutralizing potent of antibody representatives.....	68
2.2 Reactivity against recombinant antigens of EV71.....	68
2.3 Blocking analysis against EV71.....	70
2.4 Anti-EV71 mAb panel and antigenic analysis of viral isolates.....	72
2.5 Summary.....	73
3 Establishing the methodology of escape mutants in EV71.....	75
3.1 Identification of K8G2.....	75
3.2 Platform of escape mutants.....	78

3.3 Identification of neutralizing epitope with escape mutants.....	83
3.4 Summary.....	86
4 Localize the conformational neutralizing epitopes of EV71.....	87
4.1 Cultivate the mutants with neutralizing mAbs.....	87
4.2 Antigenic analysis of escape mutants.....	88
4.3 Localize the conformational neutralizing epitopes of EV71.....	91
4.4 Summary.....	98
Chapter 4 Discussions.....	100
1 Immunogenic predominant sites of EV71 and relate mAbs.....	100
1.1 Immunogenic predominant sites of EV71.....	100
1.2 Usage of anti-EV71 mAb in diagnostics.....	101
2 Conformational epitopes and usage of neutralizing mAbs.....	103
2.1 Conformational dependent of antigenic sites.....	103
2.2 Antigenic analysis with neutralizing mAbs.....	105
2.3 Therapeutic mAb.....	106
3 Methodology of escape mutants.....	108
4 Antigenic character of EV71.....	109
Summary and future Prospects.....	112
Reference.....	113
Acknowledgements.....	134
Appendix.....	135

摘要

EV71 近年来在全球广泛流行，在中国大陆地区的流行形势尤其严重。其传染途径多样、隐形感染形势严重、传播速度快、感染致病机制复杂、致病重症患者和死亡患者数目较高。因此，迫切需要行之有效的疫苗和治疗药物来有效控制 EV71 的流行和感染。但目前有关 EV71 中和表位和抗原性的认识还十分不足，严重制约了疫苗和治疗药物的研究。本研究通过构建 EV71 特异的单克隆抗体库，进而建立了一套中和单抗盘，并应用于 EV71 抗原性质研究，为疫苗株的选择提供了新的评估工具；同时探索建立了逃逸病毒方法学以鉴定 EV71 构象中和表位，并系统地研究了 EV71 主要抗原性区域的组成和分布特征，为疫苗研制和抗体治疗奠定了基础。具体研究内容如下：

首先，利用分子进化分析和免疫原性分析方法，从 18 株 EV71 代表株中选择病毒株 Jiangsu 作为免疫原制备出 186 株 EV71 特异性单抗，为后续研究奠定了基础。

其次，对 EV71 单抗库进行了全面的性质鉴定，发现大量构象型中和单抗，通过鉴定中和单抗中和能力等性质，建立由 11 株代表株构成的抗 EV71 中和单抗盘（mAb panel）。

第三，为系统认识构象型中和单抗的表位结构特征，本研究探索了逃逸病毒鉴定 EV71 中和表位的可行性。以线性中和单抗 K8G2 为模型，探索建立逃逸突变相关的方法学，并证实利用逃逸突变分析方法对 K8G2 识别表位的鉴定结果与利用表位步移方法的鉴定结果基本一致，表明该方法用于鉴定 EV71 中和表位是有效可行的。

第四，利用已建立的逃逸病毒方法学平台，对单抗盘各代表性中和单抗识别表位进行系统鉴定。结合逃逸突变病毒与单抗的反应性变化和同源模建研究结果，确定了 EV71 三个主要的构象型中和表位区，分别是 Site 1（VP1: 215, 217, 218, 220; VP2: 141; VP3: 182），Site 2（VP1: 292; VP2: 223, 224, 225; VP3: 59, 60, 63, 64, 67, 74, 210）和 Site 3（VP1: 97, 99, 104, 108, 166, 167, 242），因而阐明了 EV71 构象型中和表位的定位、组成以及主要抗原性位点的分布规律，为 EV71 疫苗的

研制提供了重要的理论基础。

关键词：肠道病毒 71 型 中和抗体 构象中和表位 逃逸病毒 抗原性位点

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Discovered in 1969, enterovirus 71 has been recognized as a frequent pathogen of hand-foot-and-mouth disease (HFMD) associated with severe neurological sequelae in a small proportion of cases. There has been a significant increase in EV71 epidemic activity throughout the Asia-Pacific region since 1997. Recent HFMD epidemic in mainland China have been associated with high case-fatality rates. So the primary task nowadays is to develop antiviral agents to ameliorate the severity of neurological disease and vaccine to control epidemics. However, effective vaccine has not been available due to the limited knowledge about antigenicity, neutralizing epitopes and antigenic structure of EV71. In current report, we constructed the EV71-specific monoclonal antibody library with hybridoma technique, followed by the establishment of anti-EV71 neutralizing mAb panel, as well as the methodology escape mutant to localize conformational epitopes. Using escape mutants analysis and neutralizing monoclonal antibody, we characterized the antigenic structure of EV71 as three main conformational sites. Findings from this study provide necessary resources and effective approaches for vaccine development, and also highlight the dominance of conformational-dependent epitopes in EV71.

Firstly, we selected a viral strain isolated in Jiangsu province as the immunogen for antibody preparation, and constructed an EV71-specific monoclonal antibody library containing 186 clones, followed by the identification of reactivites, epitopes recognized and neutralizing potent against Jiangsu.

Secondly, we established anti-EV71 neutralizing antibody panel containing 11 clones from 5 groups according to the neutralizing potent against 18 natural isolates of different regions and genotypes.

Thirdly, we explored the methodology of escape mutants using relate experience applied in other enterovirus with some improvements. Taking the linear neutralizing antibody K8G2 as an example, we indentified K8G2-related neutralizing sites

successfully, proving that it is useful in localizing conformational epitopes of EV71.

Fourthly, we gained a library of neutralizing escape mutants using methodology explored earlier with single neutralizing antibody, and further analyzed the mutational representatives with neutralizing test, to elucidate the antigenic disparities between different mutants and parental virus, as well as antigenic sites recognized by each neutralizing antibody. The antigenicity, conformational neutralizing epitopes and main antigenic sites of EV71 were clarified with the combinations of escape mutant analysis, neutralizing test and molecular modeling.

Keywords: Enterovirus 71(EV71) Disease (HFMD) Neutralizing Antibody
Conformational Neutralizing Epitope Escape Mutants Antigenic Sites

缩写词 (Abbreviations)

- HFMD: Hand, foot and mouth disease, 手足口病
- EV: enterovirus, 肠道病毒
- EV71: Enterovirus 71, 肠道病毒 71 型
- CV : Cocksackievirus, 柯萨奇病毒
- CA16: Cocksackievirus A16, 柯萨奇病毒 16 型
- CVB3: Cocksackievirus B3, 柯萨奇病毒 3 型
- ECHO: Echovirus: 埃柯病毒
- UTR: Untranslated Region, 非编码区
- ORF: Open reading frame, 开放阅读框
- AFP: Acute flaccid paralysis, 迟缓性麻痹
- VLP: Virus Like Particle, 类病毒颗粒
- IFN: Interferon, 干扰素
- Kan: Kanamycin, 卡那霉素
- Amp: Ampicillin, 氨苄青霉素
- bp: base pair, 碱基对
- kb: kilo base pair, 千碱基对
- kD: kilo Daltons, 千道尔顿
- FBS: Fetal Bovine Serum, 胎牛血清
- DNA: Deoxyribonucleic Acid, 脱氧核糖核酸
- RNA: Ribonucleic Acid, 核糖核酸
- TCID₅₀: Tissue culture infective dose, 半数组织感染剂量
- ELISPOT: enzyme linked immunospot assay, 酶联免疫斑点法
- ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay, 酶联免疫吸附实验
- RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction, 反转录聚合酶链式反应
- PH: hydrogen ion concentration, 氢离子浓度指数
- 2Apro: 2A proteinases, 2A 蛋白酶
- 3C/3CDpro: 3C/3CD proteinases, 3C/3CD 蛋白酶

CNS: central nervous system, 中枢神经系统

cDNA: Complementary DNA, 互补 DNA

mRNA: Messenger RNA, 信使 RNA

IFA: Immuno fluorescence Assay, 免疫荧光实验

CPE: Cytopathic effect, 致细胞病变效应

RSV: Respiratory Syncytial Virus, 呼吸道合胞病毒

HCV: Hepatitis C virus 人 C 型肝炎病毒

HAV: Hepatitis A virus 人 A 型肝炎病毒

DMSO: Dimethyl Sulfoxide, 二甲亚砜

FBS: Fetal Bovine Serum, 胎牛血清

GAM: Goat Anti-Mouse, 山羊抗小鼠

RAM: Rabbit Anti-Mouse, 兔抗小鼠

HRP: Horseradish Peroxidase, 辣根过氧化物酶

IIFA: Indirect immunofluorescent assay, 间接免疫荧光检测

Ig: Immunoglobulin, 免疫球蛋白

Kan: Kanamycin, 卡那霉素

kD: kilo Daltons, 千道尔顿

mAb: Monoclonal Antibody, 单克隆抗体

MW: Molecular Weight, 分子量

PCR: Polymerase Chain Reaction, 聚合酶链式反应

PEG: Polyethylene Glycol, 聚乙二醇系列

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, 反转录聚合酶链式反应

SAS: Saturated ammonium sulfate, 饱和硫酸铵

WB: Western Blotting, 蛋白印迹实验

BCR: B cell receptor, B 细胞受体

WHO: World Health Organization, 世界卫生组织

第一章 前言

EV71 自 1969 年在美国加利福尼亚从脑炎患者标本分离鉴定以来, 与 CA16 交替流行, 成为手足口病主要的病原体之一。与 CA16 不同, EV71 感染会导致重症病例和一定的死亡率, 如脑膜炎、脑炎、迟缓性麻痹、急性心肺功能失调等, 其中肺水肿等并发重症的死亡率较高。我国于 2008 年 3 月爆发了 EV71 的流行以来, 全国各地都不断有新的感染者和重症病例的出现。卫生部于 2008 年 5 月将 EV71 列入传染病防治法规定的丙类传染病, 并成立了紧急防控工作组。根据国家 CDC 公布的数据, 截止 2011 年 12 月底, 全国各地的出现的 HFMD 病例一共有 508,855 例, 其中死亡病例有 1,893 例, 严重的疫情引起了社会广泛的关注。当前迫切需要有效的 EV71 疫苗。虽然目前已有多种形式的 EV71 疫苗处于研发阶段, 但由于对 EV71 不同分离株的抗原性差异及中和表位的认识不足, 使 EV71 疫苗的研制相对于疫情的发展较为滞后。因此, 本研究将通过建立 EV71 特异性中和单抗为基础, 进一步利用中和单抗研究 EV71 的抗原性质、鉴定 EV71 的中和表位的特征, 为以期较全面地认识 EV71 的抗原性表位区的分布规律和特点, 为 EV71 疫苗的研制提供理论基础和技术指导。

1 EV71 的病毒学

1.1 分类学地位

EV71 是小 RNA 病毒科 (*Picornaviridae*) 肠道病毒属的成员之一。人类肠道病毒属有众多抗原性不同的小 RNA 病毒组成, 其分类传统可靠的方法主要是通过毒间接 IFA 和病毒抗血清的中和实验来进行^[1,2]。研究发现其血清型主要与其衣壳蛋白的 C 端相关^[3,4]。因而通常按照其遗传特征将人肠道病毒分为 A、B、C、D 四个不同的基因型^[4-6]。其中 A 型肠道病毒是引起手足口病 (hand-foot and mouth disease, HFMD) 的最常见病原, 而最重要的成员就是 EV71 和 CA16 (图 1) ^[7,8]。

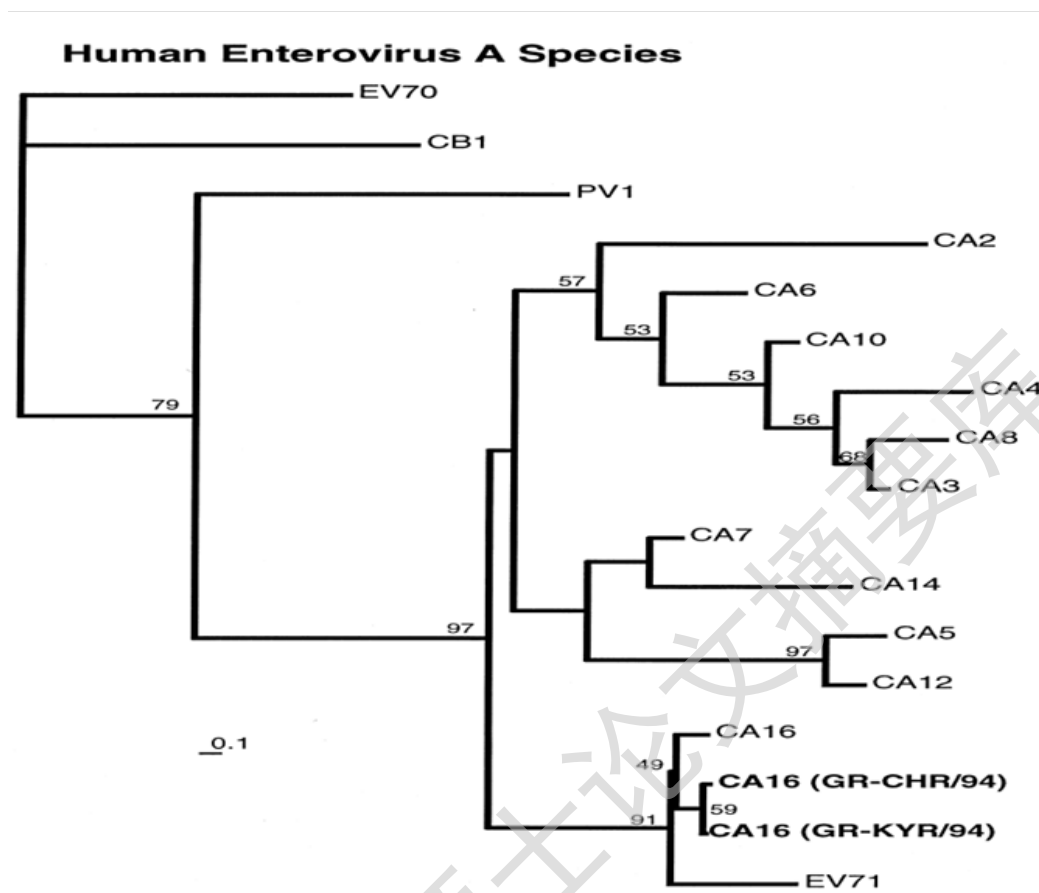


图 1 人 A 型肠道病毒基于 VP1-C 端的进化树^[4]。

Fig. 1 Phylogenetic tree depicting genetic relationship between human enterovirus A.

人肠道病毒按照血清型可分为以下四种：（1）脊髓灰质炎病毒（Poliovirus），一共有三个血清型，感染后主要引起脊髓灰质炎和偶尔引起无菌性脑膜炎；（2）柯萨奇病毒（Coxsackieviruses, CV），按照对新生小鼠的致病性分为 CA 和 CB 两类，各自包括 24 个血清型和 6 个血清型。CA 能广泛引起小鼠的骨髓肌肌炎和坏死。CB 是常见的人类病原体，可引起急性或慢性的心肌炎、胰腺炎、肌炎等病症，其感染新生小鼠产生的病症与感染人类比较类似，经常导致其患胰腺炎^[9]。（3）埃可病毒（Echovirus），主要感染人而对新生小鼠不致病，其相应的症状与 CB 类似。（4）新肠道病毒（Enterovirus, EV），如 EV68-71,73-102 等。根据 1976 年国际病毒命名委员会做的规则，将已发现的肠道病毒命名为三类病毒：Poliovirus, Coxsackievirus 和 Echovirus，一共分 67 个血清型。三者都属于肠道病毒属，而新发现的肠道病毒统称为新肠道病毒，主要包括 EV60-71, 73-102 等（表 1）。

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.

厦门大学博硕士学位论文摘要库