

学校编码: 10384

密级\_\_\_\_\_

学 号: 21620060153316

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

模拟肽在高致病性禽流感病毒 H5N1 血凝素  
蛋白广谱中和表位研究中的应用

Application of Mimotope for Research on Broad-spectrum  
Neutralizing Epitopes of Hemagglutinin from Highly  
Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1

陈瑛炜

指导教师姓名: 夏宁邵 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2009 年 11 月

论文答辩时间: 2009 年 12 月

2009 年 11 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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 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）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 目 录

目 录.....	I
摘 要.....	1
Abstract.....	3
缩略词.....	6
第一章 前 言 .....	1
1.1 禽流感病毒概述 .....	1
1.1.1 禽流感病毒的病原学基础.....	1
1.1.1.1 病毒的分类与命名.....	1
1.1.1.2 病毒的形态与组成.....	2
1.1.1.3 病毒的编码蛋白.....	4
1.1.2 禽流感病毒的分布与流行.....	8
1.1.2.1 病毒的宿主.....	8
1.1.2.2 高致病性禽流感病毒.....	10
1.1.3 禽流感病毒的变异与进化.....	13
1.1.3.1 禽流感病毒的抗原性变异.....	13
1.1.3.2 禽流感病毒的进化.....	16
1.1.3.3 禽流感病毒的表位研究.....	18
1.1.4 禽流感病毒的预防与治疗.....	21
1.1.4.1 实验室诊断.....	22
1.1.4.2 疫苗.....	24
1.1.4.3 治疗药物.....	26
1.2 噬菌体展示肽库技术 .....	28
1.2.1 噬菌体展示的原理.....	28
1.2.1.1 噬菌体的生物学性质.....	28

1.2.1.2 噬菌体展示文库的构建.....	29
1.2.1.3 噬菌体展示文库的筛选.....	32
1.2.2 噬菌体展示肽库的应用.....	33
1.2.2.1 抗原表位定位.....	33
1.2.2.2 疾病的诊断.....	35
1.2.2.3 表位疫苗.....	36
1.2.2.4 其它应用.....	38
<b>1.3 抗原表位定位 .....</b>	<b>39</b>
1.3.1 抗原表位.....	39
1.3.1.1 B 细胞表位.....	39
1.3.1.2 T 细胞表位.....	41
1.3.2 抗原表位定位方法.....	42
1.3.2.1 抗原片段分析.....	43
1.3.2.2 X 射线晶体衍射.....	44
1.3.2.3 生物信息学预测.....	45
<b>1.4 本研究的目的地及意义 .....</b>	<b>50</b>
<b>第二章 材料与方法 .....</b>	<b>53</b>
<b>2.1 主要仪器 .....</b>	<b>53</b>
<b>2.2 主要试剂 .....</b>	<b>54</b>
2.2.1 菌株.....	54
2.2.2 质粒或基因.....	54
2.2.3 文库.....	55
2.2.4 酶类.....	55
2.2.5 流感病毒.....	55
2.2.6 鼠单克隆抗体.....	56
2.2.7 实验动物.....	57
2.2.8 其它试剂.....	57
<b>2.3 常用溶液及培养基配制 .....</b>	<b>57</b>

2.3.1 抗生素储备液的配制.....	57
2.3.2 大肠杆菌培养基的配制.....	57
2.3.3 细胞培养基的配制.....	58
2.3.4 鸡红血球溶液制备.....	58
2.3.5 分子生物学实验试剂配制.....	58
2.3.6 蛋白质实验试剂配制.....	59
2.3.7 酶联免疫吸附分析试剂配制.....	60
2.3.8 噬菌体展示系统试剂配制.....	60
<b>2.4 实验方法 .....</b>	<b>61</b>
2.4.1 分子生物学相关实验方法.....	61
2.4.2 蛋白质相关实验方法.....	64
2.4.3 ELISA 及免疫相关实验方法 .....	66
2.4.4 流感病毒相关实验方法.....	68
2.4.5 噬菌体展示系统相关实验方法.....	69
2.4.6 模拟肽性质评价方法.....	74
2.4.7 酵母表达 rHA1 突变体 .....	78
<b>第三章 结果与分析 .....</b>	<b>81</b>
<b>3.1 模拟肽应用于 H5N1 广谱中和抗体诊断的初步探索 .....</b>	<b>81</b>
3.1.1 亚肽库的构建和筛选.....	81
3.1.1.1 模拟肽点突变分析.....	81
3.1.1.2 亚肽库的构建.....	82
3.1.1.3 亚肽库的筛选.....	84
3.1.2 高亲和力模拟肽在诊断中的应用.....	97
3.1.2.1 高亲和力模拟肽融合蛋白的构建.....	97
3.1.2.2 高亲和力模拟肽融合蛋白的诊断初探.....	100
3.1.3 本节小结.....	106
<b>3.2 模拟肽应用于 H5N1 广谱中和表位定位的研究 .....</b>	<b>107</b>
3.2.1 13D4 抗体及其交叉阻断抗体的模拟肽.....	108



3.2.1.1 交叉阻断单抗的选取.....	108
3.2.1.2 各单抗模拟肽的筛选及评价.....	109
3.2.2 模拟肽在 HA 上的表位定位.....	115
3.2.2.1 表位预测的模板及方法的选择.....	115
3.2.2.2 表位定位的结果.....	116
3.2.3 HA1 蛋白的突变验证.....	122
3.2.3.1 HA1 突变蛋白的表达.....	122
3.2.3.2 HA1 突变蛋白的抗体反应谱及位点分析.....	124
3.2.4 本节小结.....	130
<b>第四章 讨论 .....</b>	<b>132</b>
<b>4.1 噬菌体展示亚肽库用于分子进化 .....</b>	<b>132</b>
<b>4.2 模拟肽用于禽流感抗体诊断的探索 .....</b>	<b>133</b>
<b>4.3 模拟肽用于抗原表位定位的可行性 .....</b>	<b>136</b>
<b>4.4 广谱中和单抗 13D4 的表位分析 .....</b>	<b>139</b>
<b>小结及展望 .....</b>	<b>143</b>
<b>参 考 文 献 .....</b>	<b>145</b>
<b>在学期间的科研成果.....</b>	<b>158</b>
<b>致 谢.....</b>	<b>160</b>

## Content

<b>Content</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>3</b>
<b>Abbreviation</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Preface</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Avian influenza virus</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Pathology of avian influenza virus .....	1
1.1.1.1 Classification and naming.....	1
1.1.1.2 Morphology and component.....	2
1.1.1.3 Encoding protein.....	4
1.1.2 Distribution and transmission of avian influenza virus .....	8
1.1.2.1 Host of virus.....	8
1.1.2.2 Highly pathogenic avian influenza virus .....	10
1.1.3 Variation and evolution of avian influenza virus .....	13
1.1.3.1 Antigenic variation.....	13
1.1.3.2 Evolution.....	16
1.1.3.3 Epitope research.....	18
1.1.4 Prevention and therapy of avian influenza virus.....	21
1.1.4.1 Diagnostics.....	22
1.1.4.2 Vaccine .....	24
1.1.4.3 Antivirus drugs.....	26
<b>1.2 Phage display peptide library</b> .....	<b>28</b>
1.2.1 Principle of phage display.....	28
1.2.1.1 Biological property of phage .....	28
1.2.1.2 Construction of phage display library .....	29

1.2.1.3 Screening of phage display library .....	32
1.2.2 Application of phage display peptide library .....	33
1.2.2.1 Epitope mapping .....	33
1.2.2.2 Diagnostics.....	35
1.2.2.3 Epitope vaccine.....	36
1.2.2.4 Others.....	38
<b>1.3 Epitope mapping.....</b>	<b>39</b>
1.3.1 Epitope.....	39
1.3.1.1 B cell epitope .....	39
1.3.1.2 T cell epitope.....	41
1.3.2 Methods of epitope mapping .....	42
1.3.2.1 Antigen fragment .....	43
1.3.2.2 X-ray crystallography .....	44
1.3.2.3 Bioinformatic prediction.....	45
<b>1.4 Purpose and significance of the research.....</b>	<b>50</b>
<b>2 Materials and methods .....</b>	<b>53</b>
<b>2.1 Instruments.....</b>	<b>53</b>
<b>2.2 Materials.....</b>	<b>54</b>
<b>2.3 Preparation of solution and medium .....</b>	<b>57</b>
<b>2.4 Methods.....</b>	<b>61</b>
<b>3 Results and analysis .....</b>	<b>81</b>
<b>3.1 Primary exploration of mimotope application on diagnostics of H5N1 broad spectrum antibody .....</b>	<b>81</b>
3.1.1 Construction and screening of sub-libraries .....	81
3.1.1.1 Site-direct mutation of mimotope .....	81
3.1.1.2 Construction of sub-libraries.....	82

3.1.1.3 Screening of sub-libraries .....	84
3.1.2 Application on diagnostics of high affinity mimotope .....	97
3.1.2.1 Constructin of fusion protein of high affinity mimotope.....	97
3.1.2.2 Diagnostics by high affinity mimotope.....	100
3.1.3 Brief summary .....	106
<b>3.2 Mimotope application on epitope mapping of H5N1 broad spectrum neutralizing epiotpe .....</b>	<b>107</b>
3.2.1 Mimotope of 13D4 and cross-blocking antibodies.....	108
3.2.1.1 Selection of cross-blocking antibodies .....	108
3.2.1.2 Screening and assessment of mimotope.....	109
3.2.2 Mimotope mapping on HA .....	115
3.2.2.1 Template and methods for prediction.....	115
3.2.2.2 Resultls of epitope mapping.....	116
3.2.3 Mutation of HA1 protein .....	122
3.2.3.1 Expression of HA1 protein .....	122
3.2.3.2 Analysis of HA1 mutation .....	124
3.2.4 Brief summary .....	130
<b>4 Discussion.....</b>	<b>132</b>
<b>4.1 Molecular evolution by phage display peptide sub-libraries.....</b>	<b>132</b>
<b>4.2 Exploration on diagnostics of neutralizing antibody of avian influenza virus by mimotope.....</b>	<b>133</b>
<b>4.3 Feasibilty of epitope mapping by mimotope .....</b>	<b>136</b>
<b>4.4 Epitope analysis of broad spectrum antibody 13D4.....</b>	<b>139</b>
<b>Brief summary and prospect .....</b>	<b>143</b>
<b>References .....</b>	<b>145</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>160</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 摘要

自 2003 年以来, H5N1 病毒在全球范围内持续流行并多次致人死亡, 新的变异毒株不断产生, 成为流感疫苗药物研制及诊断开发的巨大障碍。本实验室利用 1997 年至 2006 年间在东南亚各地区不同宿主中分离到的多个禽流感病毒 H5N1 代表株免疫小鼠, 制备 H5 单克隆抗体库。本研究选用的 8H5、13D4、20H2、17E6、8G9 和 4A7 等抗体对 41 株 H5N1 代表株都有很强的中和活性; 13D4 抗体对 Clade 1, 2.1, 2.2 和 2.3.4 等引发人类疾病的 H5N1 病毒感染的实验动物均具备高效和广谱的治疗能力, 提示了 HA 上可能存在保守的广谱中和表位。

本研究利用噬菌体展示肽库, 筛选获得与广谱中和单抗 8H5 特异结合的模拟肽, 其中 125 模拟肽 (DTPLTTAALRLV) 具有稳定的 8H5 活性和病毒竞争性, 第 2 (T)、4 (L)、5 (T) 和 9 (L) 位具有较高的保守性。以 125 模拟肽为核心, 构建噬菌体展示亚肽库, 通过多种突变组合, 促进 125 模拟肽的亲合力的成熟和结构、功能的完善, 探索模拟肽在 H5 抗体诊断中的应用。构建亚肽库 12MH I ~ V, 通过各亚库的筛选结果全面分析了 125 模拟肽序列, 获得与 8H5 结合的模拟肽的特征序列(E/D)T(P/A/Q/E)LTXX(A/G)L(K/R)XX, 得到各位点的作用关系和允许替代的氨基酸。建立了利用亚肽库进行多肽分子进化并分析氨基酸相互作用的方法, 可以快速的应用于多肽的亲合力提高或功能的成熟。获得一组高亲和力序列及亲和力提高两个数量级的模拟肽 V-1b (ETPLTIAGLKLK), 亲和力达到 nM 级。高亲和力的模拟肽与病毒竞争性高于 125 模拟肽, 在 HI 实验中可阻断近年 5 个 H5N1 代表毒株与 8H5 抗体的结合, 广谱性和阻断能力相对于 125 模拟肽明显提高; 免疫血清与病毒点杂交呈阳性, 与天然病毒有交叉反应; 说明噬菌体展示亚肽库的构建及筛选不仅可获得亲和力提高的多肽, 还可能促进多肽功能和结构的完善, 获得与天然 HA 表位更为接近的模拟肽。构建 V-1b 的 HBc、239 和 GFP 融合蛋白, 分别检测鸡血清样本, 在检测样本中, 该模拟肽融合蛋白可特异的检出 H5 HA 抗体阳性血清, 并可区分出具有广谱 HI 抗体的血清样本。模拟肽诊断应用的探索为血清中和抗体的临床检测提供了新的手段, 可作为 H5 HA 抗体检测的有益补充; 也为评价疫苗诱导广谱中和抗体的能力提供新的思路。

根据抗体的广谱中和特点, 本研究以 13D4 抗体为核心, 筛选 13D4 及与之

交叉阻断的 H5 广谱中和抗体——8H5、20H2、8G9、17E6 和 4A7 的模拟肽，通过计算机预测各抗体模拟肽定位，获得交叉区域实现对 HA 广谱中和表位的定位。筛选多个类型的噬菌体肽库，获得总数为 133 个的针对各个抗体的模拟肽序列。各个序列的相对反应活性、特异性及组内抗体的交叉反应性检测发现，三组抗体——13D4/20H2、8H5/17E6 和 8G9/4A7 的模拟肽之间具有交叉反应。选择 Pep-3D-Search 方法及 Mapitope 方法分别在 H5 HA 蛋白上预测表位，交叉区域包含了 HA 头部的受体结合区及茎部“Cluster 300”的保守区域。通过酵母表达系统构建并表达 18 个 HA1 突变蛋白，其中 8 个保持了活性。在针对 47 株抗体的反应中，S120 突变明显影响 26 株抗体的结合，S128 突变明显影响 18 株抗体的结合。H28、S84、S120、S128 和 K307 的突变对 13D4 和 20H2 与 HA1 的结合活性均有显著影响。其中 H28 和 K307 的突变使 13D4 和 20H2 与 HA1 的结合活性下降至 12~30%，对其他抗体的结合无明显影响。“Cluster 300”的缺失对 44 株抗体的 HA1 结合活性有显著影响。该研究发现 13D4 与 20H2 与 HA 的结合极易受到结构变化的影响，该特点对其保守中和表位的研究有重要意义。同时首次预测了“Cluster 300”（aa275~aa311）的保守区域，该区域对维持抗体的结合结构有重要作用，可能参与了 13D4 等抗体的广谱中和表位。

通过上述研究，我们建立噬菌体展示系统研究小分子多肽的平台；首次将该系统与高致病性禽流感 H5N1 HA 广谱中和单抗结合，研究 HA 蛋白的广谱中和表位；获得一系列针对广谱中和单抗的模拟肽，评价了这些模拟肽在传染性疾病的诊断及抗原表位定位中应用的可行性；获得了高亲和力模拟肽用于 H5 HA 广谱中和抗体检测的研究，并初步获得 H5 HA 广谱中和表位可能的相关区域。该研究结果对认识 H5N1 病毒的突变机制，疫苗和药物的设计与研制，以及禽流感大规模流行的防控有重要意义。

**关键词：**H5N1 血凝素蛋白 广谱中和表位 模拟肽 噬菌体展示 抗体

## Abstract

Avian influenza virus H5N1 has spread worldwide and led to mortality in humans since 2003. New strains with high variation keep generating which challenges the development of vaccine, drugs and diagnostics. In our lab, a large panel of H5-reactive mAbs was generated by immunizing mice with distinct viruses isolating from regions in Asia and belong to different clades from 1997 to 2006. The mouse monoclonal antibodies(mAb) 8H5, 13D4, 20H2, 17E6, 8G9 and 4A7 used in the research had strong neutralization to 41 strains of H5N1 representative viruses. One of the mAbs 13D4 has been demonstrated to protect mice against lethal challenge by 4 H5N1 strains representing the current major genetic populations in humans, clades 1, 2.1, 2.2, and 2.3.4. It indicated the conserved broad-spectrum epitope on hemmagglutinin(HA).

In the research, phage display peptide libraries were applied to screen mimotopes to 8H5mAb. The mimotope 125(DTPLTTAALRLV) had stable activity to 8H5 and competition to viruses with conserved site on 2(T), 4(L), 5(T) and 9(L). To improve the affinity of peptides and optimize the structure and function, the phage display sub-libraries basing on 125 mimotope were constructed to make various mutation combinations. The sub-libraries 12MH I ~ V were constructed and the sequence of 125 mimotope was analyzed according to the selection results. The characteristic of sequence binding to 8H5 was drawn as (E/D)T(P/A/Q/E)LTXX(A/G)L(K/R)XX which also showed the flexibility in each position. The method of peptide evolution by phage display peptide sub-library was constructed to analyze the interaction of amino acids in peptide. It could be conveniently applied on peptide maturation. A group of high affinity peptide was obtained and the affinity of mimotope V-1b(ETPLTIAGLKLK) increased two orders of magnitude with KD of nM. The high affinity peptides were more competitive to virus than 125 mimotope and blocked 5 strains of H5N1 representative virus binding to 8H5 in HI test. The spectrum and blocking activity was significantly improved. The antiserum from phagotope



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.

厦门大学博硕士论文摘要库