

学校编码: 10384
学号: 21720091152085

分类号密级秘密
UDC _____

人乳头瘤病毒 L2 广谱表位疫苗的初步研究 厦门大学

厦门大学

硕士学位论文

人乳头瘤病毒 L2 广谱表位疫苗的初步研究

Preliminary study on broad-spectrum Human
Papillomavirus vaccine based on L2 cross-neutralizing
epitope

王大宁

指导教师姓名: 李少伟教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2012 年 5 月

论文答辩日期: 2012 年 6 月

学位授予日期: 2012 年 6 月

答辩委员会主席: 赵勤俭教授

评阅人: _

2012 年 6 月

厦门大学博硕士学位论文全文数据库

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):王大宁

2012年6月4日

厦门大学博硕士

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）：王大宁

2012年6月4日

摘要

宫颈癌是世界范围内妇女易患的第二大癌症，HPV 预防性疫苗已成为目前公认的预防宫颈癌发生的最有效手段。研究表明以 HPV L1 蛋白形成的 HPV VLP 疫苗免疫后产生的中和抗体具有型特异性，与宫颈癌有关的主要型别至少有 15 种。因此，扩大 HPV 疫苗的保护范围成为了预防性 HPV 疫苗的研制亟需解决的问题，所以有必要开发一种新型的，用 1~2 种抗原就能预防多型别 HPV 的广谱疫苗。

目前对 HPV 广谱疫苗的研究主要集中在 HPV L2 表位的研究，研究发现 HPV L2 蛋白上存在大量广谱表位，合成这些广谱表位免疫小鼠或者将广谱表位融合在蛋白免疫载体中形成嵌合蛋白免疫小鼠后，均能够产生交叉保护抗体。这些研究表明 HPV L2 具有发展为潜在的二代广谱疫苗的潜力。

本研究通过大肠杆菌表达获得较高纯度的 HPV16C50L2 蛋白后，将 HPV16C50L2 蛋白与弗氏佐剂混合后免疫小鼠，利用单克隆抗体筛选技术、ELISA 及 HPV 假病毒中和系统筛选到一株 HPV16L2 广谱抗体—14H6。该抗体对 HPV6、11、16、18、31、33、35、45、52、58、59 等 11 个型别假病毒均有较高滴度的中和作用。为了鉴定 14H6 抗体的广谱中和表位，构建了 HPV16L2 N 端、C 端梯度截断克隆，表达这一系列 HPV16L2 截断蛋白并与 14H6 抗体进行 western-blotting 分析，通过分析初步得出 14H6 表位位于 HPV16 L2 N 端 1-65 区间。为了进一步精确定位，将 HPV16 C50L2 N 端 1-65 氨基酸从 N 端到 C 端依次分成 7 段多肽进行合成，每段多肽为 15 个氨基酸。通过 Elisa 竞争法检测出 14H6 抗体与 HPV 16 C50L2 N 端 21-35 氨基酸有反应，然后将 21-35 氨基酸从左右两端往中间依次减少一个氨基酸，合成 18 段，利用 ELISA 竞争法最终确定 14H6 抗体表位的氨基酸序列：TCKQAGTCPP，位于 HPV16L2 N 端 21-30aa。

由于 14H6 抗体与 11 种假病毒均有中和作用，为了研究该段表位的保守性，利用计算机将数据库中 116 个不同型别的 HPV L2 序列比对分析。研究发现

14H6 表位在多个型别中氨基酸序列一致；比较高危型别的 HPV L2，发现 14H6 表位的 24 位和 25 位的氨基酸存在差异，其它位点同源性达到 80%以上，这些结果表明 14H6 表位为高度保守表位，具有研发为广谱疫苗的潜在能力。

本实验室研究已证明 HPV16 L1 DE 环、HPV16 L1 a4 环、HBcore、CRM197/389/A 等蛋白免疫载体具有很好的展示能力。为了研究 14H6 表位的免疫原性及不同蛋白载体展示效果，将 14H6 表位以核心十肽为中心依次向两端增加一个或两个氨基酸形成 10 肽、12 肽、14 肽、16 肽、18 肽、20 肽、22 肽、26 肽、30 肽，把这些短肽融合在上述蛋白载体中。利用计算机模拟蛋白载体融合表位肽结构发现，14H6 表位肽主要展示在蛋白载体表面，可作为疫苗免疫原的候选。各种融合蛋白表达纯化后经 SDS-PAGE、Western-Blotting、ELISA 检测表明纯度较高且反应性强，电镜观察表明 HPV16L1 及 HBcore 融合表位肽后可以形成颗粒，可以进行免疫实验。将融合蛋白与氢氧化铝佐剂混合免疫小鼠，进行免疫原性分析。ELISA 检测免疫第八周血清显示了较高的 L2 抗体滴度，在 10^5 — 10^6 左右；假病毒中和检测显示融合蛋白具有诱导交叉中和抗体的能力，对 HPV11、16、18、45、52、58、59 假病毒均具有中和作用，可作为开发新型广谱 HPV 疫苗的候选！

综上所述，本研究成功地筛选出一株 HPV 16 L2 广谱中和抗体并鉴定出抗体表位，计算机分析表明该表位为高度保守表位。将 14H6 表位融合在三种不同蛋白免疫载体中，HPV 假病毒细胞中和实验检测表明融合蛋白具有良好的免疫反应性，且具有诱导交叉中和抗体的免疫原性，为 HPV L2 广谱疫苗研究奠定了基础。

关键词：人乳头瘤病毒；L2 蛋白；广谱中和抗体；疫苗

Abstract

Cervical cancer is the second most prevalent cancer among women worldwide. Recent years, with the relationship between high-risk HPV infection and cervical cancer gradually clarified, HPV prophylactic vaccine has become the most effective methods to prevent cervical cancer. Presently Merck's Gardasil® (HPV6/11/16 / 18 quadrivalent vaccine) and GlaxoSmithKline's Cervarix™ (HPV16/18 bivalent vaccine) have become available in the market. However, according to the current epidemiological investigation, the cervical cancer which is caused by HPV16/18 infection only accounts for about 70% of the total number of cases. And at least 15 types of HPV viruses could cause the cervical cancer; therefore, expanding the protective range of the HPV vaccine has become the urgent problem of developing prophylactic HPV vaccines. It is necessary to develop a new kind of HPV broad-spectrum vaccine which contains one or two types of antigens to prevent multi-type HPV infection.

In recent years, the research of broad-spectrum vaccine is focusing on the following areas: multi-type HPV vaccines, HPV broad-spectrum epitope vaccines, HPV multi-epitope vaccines, HPV L2 vaccines and so on. The recent research shows that a number of epitopes on the L2 protein recognized by antibodies are proved to be significant cross-type reactivity and cross-neutralizing activity to intact virions or PsVs. These indicate that there is a significant scope for investigating the potential of L2-based immunogens as broad-spectrum second-generation vaccines against HPV.

In our research, a broad-spectrum and monoclonal antibody-14H6 was screened and required from mice immunized with HPV16C50L2 protein as an immunogen. The mAb 14H6 can neutralize 11 types of pseudoviruses: HPV6, HPV11, HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV45, HPV52, HPV58 and HPV59. The neutralizing titers of this monoclonal antibody anti-HPV11, HPV16 and HPV35

pseudovirions could reach 10240, while neutralizing several other types pseudovirions except HPV6 and 31 the titers are about 1000.

In this study, we have constructed and expressed a series of N-terminal or C-terminal gradient truncate HPV16 L2 recombinant proteins. Through the immunization analysis of the fusion protein reaction with this mAb 14H6, it preliminarily infers that the main epitopes of 14H6 are located in 1-65 amino acids at the N-terminal of HPV16 L2. Then the N-terminal 1-65 amino acids of HPV16 C50L2 are divided into seven peptides from the N terminal to C terminal in turn. Each peptide contains 15 amino acids and is detected by competition ELISA. The results show that the mAb 14H6 epitopes are located in the 21-35 amino acids at the N-terminal of HPV16L2. In order to confirm the precise position of the 14H6 epitopes, we synthesized 18 clones by reducing one amino acid a time from both sides of 21-35 amino acids to the middle. Through the competition ELISA, we finally confirm that the 14H6 epitopes are the 10- peptide sequences: TCKQAGTCPP, which located in the 21-30 amino acids at the N-terminal of HPV16 L2. Moreover, the comparative analysis of HPV L2 sequences by computer and database shows that the 14H6 epitopes are much highly conserved.

In order to develop an epitope vaccine, we have fused these short peptides to some carrier proteins, such as the DE loop of HPV16 L1, the $\alpha 4$ loop of HPV16 L1, HBcore149 and CRM197/389/A etc. After expression and purification, these fusion proteins are evaluated by SDS-PAGE, Western-Blotting and ELISA. The results show that they have the higher purity and reactivity. And by observation with electron microscopy, we can find that the HPV16L1 and HBcore149 proteins are also becoming particles after fusion with epitope peptides, so these fusion proteins can be worth using in the immunization experiments. Then the mixture of fusion proteins and the alum adjuvant was used to immunize the mouse to evaluate its immunogenicity. After several weeks, the mouse serum immunized with the fusion protein is detected by ELISA. The results show the antibody titer of anti-L2 proteins in 8-weeks serum is

about 105—106. The following neutralizing assay against pseudovirions prove the mouse immunized with the fusion proteins can produce cross-protective antibodies and these antibodies possess the capacity to neutralize HPV11、16, 18, 45, 52, 58, 59 pseudovirions.

Key words: Human papillomavirus; L2 protein; broad-spectrum neutralizing antibodies; vaccine

廈門大學博碩

缩写词

- Amp: Ampicillin, 氨苄青霉素
AUC: Analytical Ultracentrifugation, 分析型超速离心技术
APCs: Antigen Presenting Cells, 抗原呈递细胞
bp: base pair, 碱基对
BPV: Bovine Papillomavirus, 牛乳头瘤病毒
CDR: Complementarity Determining Region, 抗原互补决定区
CHT II: Calcium Hydroxyapatite II, II型羟基磷灰石介质
CIN: Cervical Intraepithelial Neoplasia, 宫颈上皮内瘤样病变
CTL: Cytotoxic T Lymphocyte, 细胞毒 T 淋巴细胞
DC: Dendritic Cell, 树突状细胞
DLS: Dynamic Light Scattering, 动态光散射
DNA: Deoxyribonucleic Acid, 脱氧核糖核酸
ELISA: Enzyme-linked ImmunoSorbant Assay, 酶联免疫吸附测定
FDA: Food and Drug Administration, 美国食品及药品管理局
GAM-AP: 标记碱性磷酸酶的羊抗鼠抗体
GAM-HRP: 标记辣根过氧化物酶的羊抗鼠抗体
GFP: Green Fluorescent Protein, 绿色荧光蛋白
HPLC: High Performance Liquid Chromatography, 高效液相色谱
HPV: Human Papillomavirus, 人乳头瘤病毒
HRP: Horseradish Peroxidase, 辣根过氧化物酶
ICTV: International Committee on the Taxonomy of Viruses, 国际病毒学分类委员会
Kan: Kanamycin, 卡那霉素
kDa: kilo Daltons, 千道尔顿
NK: Natural Killer, 自然杀伤细胞
NMR: Nuclear Magnetic Resonance, 核磁共振
ORF: Open Reading Frame, 开放阅读框
PDB: Protein Data Bank, 蛋白质数据库
pRb: Retinoblastoma Tumor Suppressor Gene, 视网膜母细胞瘤抑制基因
RNA: Ribonucleic Acid, 核糖核酸
SAS: Solvent Accessible Surface, 溶剂可及化表面积
SPFF: Sp SepharoseTM Fast Flow, 阳离子交换层析介质
SV: Sedimentation Velocity, 沉降速度
TEM: Transmission Electron Microscopy, 透射电子显微镜
Th: Helper T lymphocyte, 辅助 T 淋巴细胞
URR: Upstream Regulatory Region, 上游调节区
VLPs: Virus-Like Particle(s), 类病毒颗粒

目录

摘要.....	I
缩写词.....	VI
目录.....	VII
Contents	X
第一章前言	1
1 HPV 简介.....	1
1.1 HPV 研究概况	1
1.2 HPV 的基因组	2
1.3 HPV 早期蛋白	3
1.4 HPV 晚期蛋白	4
1.5 HPV 分型	11
1.6 HPV 的感染及流行病学	12
2 HPV 疫苗研究.....	15
2.1 HPV 预防性疫苗研究进展.....	15
2.2 HPV 第二代疫苗发展趋势	16
3 表位疫苗的设计及研究策略	18
3.1 表位疫苗	18
3.2 抗原表位筛选及鉴定方法	18
3.3 表位展示载体	19
3.4 表位疫苗设计与优化	20
4 载体展示技术研究	20
4.1 类病毒样颗粒 (VLPs) 展示载体	21

4.2 乳头瘤病毒 VLP 作为免疫载体蛋白研究进展.....	22
4.3 乙肝核心抗原—HB core 作为免疫载体蛋白研究进展.....	23
4.4 CRM197 作为免疫载体蛋白研究进展.....	25
4.5 细菌表面展示系统	25
4.6 噬菌体展示系统	26
5 蛋白质同源模建	27
6 本研究目的和意义	28
第二章材料与amp;方法	30
1 实验仪器	30
2 实验材料	31
2.1 菌株、质粒、基因、实验动物	31
2.2 常用试剂	32
2.3 工作站和软件	33
2.4 常见溶液及培养基的配制	33
3 实验常用方法	37
3.1 常规分子生物学生物学实验方法	37
3.2 蛋白质的诱导表达和纯化方法	40
3.3 单克隆抗体制备.....	45
3.4. 抗体性质研究实验方法	51
3.5. 同源模建与分子对接	53
第三章结果与分析	55
第一部分 HPV16 L2 广谱中和抗体 14H6 筛选及表位鉴定	55
1 HPV16 L2 广谱中和抗体筛选及抗体性质分析.....	55
2 HPV16 L2 广谱中和抗体—14H6 表位定位.....	58
3 第一部分小结	63
第二部分：14H6 表位同源性分析及融合不同免疫载体的结构模拟	64
1 HPV16 L214H6 表位同源性分析.....	64

2 HPV16 L1/HBcore/CRM197/389/A 融合 14H6 表位肽设计示意图.....	65
3 HPV16L1-DEloop/ α 4loop 融合 14H6 表位结构模拟.....	68
4 第二部分小结	70
第三部分：HPV16 L2 广谱中和抗体 14H6 表位展示	72
1 HPV16 L1 融合 14H6 表位肽.....	72
2 HBcore 融合 14H6 表位肽.....	79
3 CRM197/389/A 融合 14H6 表位肽.....	83
4 HBcore/HPV16 L1/CRM 融合蛋白免疫原性分析.....	88
5 第三部分小结	94
讨论.....	95
1 HPV L2 表位研究及筛选方法	95
2 HPV L2 表位筛选方法	95
3 抗原表位的研究	95
4 表位展示设计	96
5 蛋白展示载体	97
6 第二代 HPV 预防性疫苗	98
小结与展望	100
参考文献	102
致谢.....	111
附录.....	111

Contents

Abstract in Chinses.....	I
Abstract in English.....	III
Abbreviations.....	V
Chapter 1:Preface	1
1 Introduction of HPV.....	1
1.1 The research background of HPV.....	1
1.2 HPV genomic.....	2
1.3 The early proteins of HPV.....	3
1.4 The later proteins of HPV.....	4
1.5.HPV types.....	10
1.6 HPV infection.....	12
2 HPV Vaccine.....	14
2.1 HPV prophylactic vaccine.....	14
2.2 The second-generation HPVvaccines.....	16
3 The design and research strategy of epitope vaccine.....	18
3.1 epitope vaccine.....	18
3.2 epitope screening and identification methods.....	18
3.3 Epitope display vectors.....	19
3.4 Epitope vaccine design and optimization.....	19
4 Researching of vectors display technology.....	20
5 Homology modeling of protein.....	26
6 The purpose and meaning of this research	27
Chapter 2:Materials and Methods.....	29
1 Instrument.....	29
2 Meterials and Reagents.....	30
3 Methods	36

Chapter 3: Results and Analysis.....	53
One: HPV16 L2 broad-spectrum antibody screening and epitopes research	53
1 HPV16 L2 broad-spectrum analysis and antibody screening and antibody	53
2 HPV16 broad-spectrum neutralizing antibody epitopes identification	56
3 Summary of Part 1.....	61
Two: The structural simulation of epitope peptide fusion of different carriers.....	64
Three: HPV16 L2 epitope display the broad-spectrum in different carriers.....	70
1 HPV16 L1 fusion 14H6 epitope peptide.....	70
2 HBcoreore fusion 14H6 epitope peptide.....	77
3 CRM197/389/A fusion 14H6 epitope peptide.....	81
4 Research of HBcore/HPV16 L1/CRM fusion protein immunogenicity.....	86
5 Summary of Part 3.....	92
Discussion.....	94
Summary and prospect.....	99
Reference.....	101
Acknowledgements.....	96
Appendix.....	98

第一章前言

1 HPV 简介

1.1 HPV 研究概况

随着生物学技术的飞速发展，许多病毒与疾病的关系逐渐被人们所认知。就人乳头瘤病毒（Human Papillomavirus, HPV）而言，自 1981 年 Gissmann, L., Wolnik, L 等人从人生殖器粘膜疣中分离出首个嗜黏膜型 HPV（HPV6 型），在 1983 年，又从相同的病变组织中分离得到 HPV11^[1-2]，从此，HPV 与生殖系统疾病被紧密联系起来；尤其是德国科学家 Zur Hausen 在 1983 和 1984 年成功地从宫颈癌组织中分离出 HPV16 和 HPV18^[3-4]，进一步阐明了 HPV 感染与女性宫颈癌的密切关系。这一发现使 HPV 的研究引起了前所未有的重视，吸引众多的研究者对 HPV 的预防与治疗展开研究。而 zur Hausen 也因为这一重大研究成果获得了 2008 年医学与生理学诺贝尔奖。

人乳头瘤病毒为乳头瘤病毒科（Papillomaviridae）乳头瘤病毒属，是无包膜的闭环双链 DNA 病毒。HPV 结构简单，仅由病毒蛋白衣壳和核心单拷贝的病毒基因组 DNA 构成。从电镜下可以看到，HPV 为直径约 55nm 的球形病毒颗粒，经进一步的结构重建可以得到该病毒颗粒为 T=7 的正二十面体(图 1)。

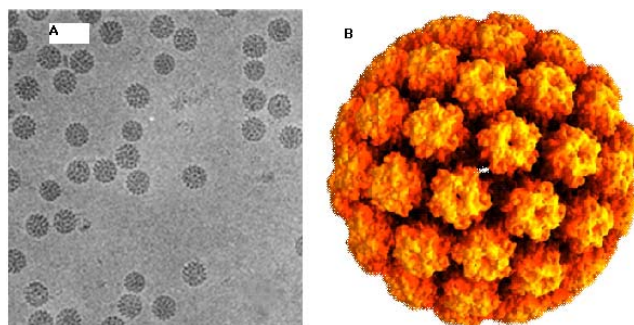


图 1. HPV VLP 电镜图片 (A) ^[5]和 HPV VLP 三维结构图片 (B) ^[6]

Fig.1 TEM of HPV (A) and Three-dimensional reconstructions of HPV(B)

1.2 HPV 的基因组

人乳头瘤病毒基因组由闭合环状双链 DNA 分子构成，各型 HPV 基因组 DNA 长度在 7200-8000bp 之间。HPV 基因组可以分 3 个主要部分：早期区 (early region, ER)，主要编码非结构蛋白 (E1-E7)；晚期区 (late region, LR)，编码两个衣壳蛋白 (L1、L2)；非编码区，长调控区 (long control region, LCR)。基因组结构如图 2 所示，HPV 基因组所编码各蛋白的定位和功能可归纳为表 1。

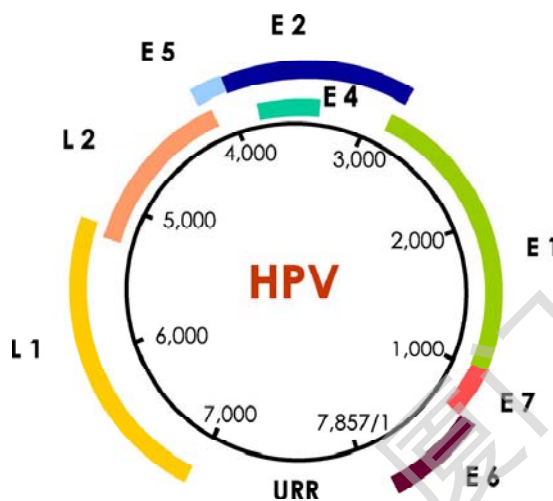


图 1.HPV 基因组结构图^[7]

Fig.2 Scheme of HPV genomic structure

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.

廈門大學博碩