

学校编码: 10384
学号: 20120051302055

分类号__密级__
UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

人乳头瘤病毒假病毒制备方法的优化
以及高通量中和实验检测系统的建立

Optimized Preparation Method of Pseudovirus for Human
Papillomaviruses and Establishment of a High-throughput
Neutralization Assay

郑 舟

指导教师姓名: 张 军 教 授
专 业 名 称: 细 胞 生 物 学
论文提交日期: 2008 年 07 月
论文答辩时间: 2008 年 07 月
学位授予日期: 2008 年 月

答辩委员会主席: 曾 定 教 授
评阅人: __

2008 年 7 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）：

年 月 日

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

目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
缩略词.....	5
前言.....	7
1. HPV 的概况.....	7
1.1. HPV 病毒结构.....	7
1.2. HPV 的分类.....	9
1.3. HPV 的致病机制.....	9
1.4. HPV 相关疾病.....	12
2. HPV 疫苗研究进展.....	14
2.1. HPV 治疗疫苗的研究进展.....	14
2.2. HPV 预防疫苗的研究进展.....	16
3. HPV 中和模型的研究进展.....	18
3.1. HPV 的体外扩增和感染模型.....	18
3.2. HPV 替代模型.....	21
3.3. HPV 假病毒感染模型.....	22
4. 本论文研究的思路、目的和意义.....	24
材料与方法.....	25
1. 材 料.....	26
2. 方 法.....	31
结果与分析.....	41

第一部分 HPV 假病毒构建系统的优化与假病毒组装机制探讨	41
1. HPV 假病毒构建系统的优化	41
1.1. 衣壳蛋白表达质粒转染比例的优化.....	41
1.2. 报告质粒转染比例的优化.....	43
1.3 磷酸钙转染体系的优化.....	43
1.4 假病毒构建效率比较.....	44
2. L2 蛋白在假病毒构建中的作用	45
3. HPV 杂合假病毒的构建	46
3.1 HPV 杂合假病毒的感染性.....	46
3.2 病毒滴度鉴定及中和实验.....	47
3.3 L2 氨基酸序列的同源性分析和疏水性分析.....	48
第二部分 β-gal 假病毒中和实验的建立与应用	50
1. 以 β-gal 为报告基因的 HPV 假病毒的构建	50
1.1 报告质粒的构建.....	50
1.2 β -gal 假病毒的鉴定.....	53
1.3 四型 HPV 假病毒的构建.....	54
2. β-gal 检测系统的优化	54
2.1 细胞固定液.....	54
2.2 x-gal 显色液.....	55
3. β-gal 假病毒的滴度鉴定和中和实验的应用	56
3.1 β -gal 假病毒滴度鉴定方法.....	56
3.2 β -gal 假病毒中和实验的应用.....	57
第三部分 HPV58、HPV52 假病毒中和实验的建立与应用	62
1. HPV58、HPV52 假病毒的构建	62
1.1 L1、L2 蛋白表达质粒的构建.....	62
1.2 HPV58、HPV52 假病毒的构建及鉴定.....	63
2. HPV58、HPV52 假病毒中和实验的应用	65
2.1 质粒 DNA 免疫诱导中和抗体.....	66
2.2 HPV58、HPV52 与 HPV16 的交叉中和.....	66

讨论.....	68
小结与展望.....	75
参考文献.....	77

厦门大学博硕士论文摘要库

CONTENTS

Abstract in Chinese	1
Abstract in English	3
Abbreviation	5
Preface	7
1. A survey of HPV	7
2. Advances in HPV vaccine development	14
3. Advances in HPV neutralization models	18
4. The thinking, purposes and meanings of this dissertation	24
Materials and Methods	25
1. Materials	26
2. Methods	31
Results and Analysis	40
part I Improvement of construction system of HPV pseudovirus and research on construction mechanism of HPV pseudovirus	40
1. Improvement of construction system of HPV pseudovirus	40
2. Function of L2 in construction of HPV pseudovirus	44
3. Construction of HPV heterozygous pseudovirion	45
part II Construction and application of β-gal pseudovirus-based neutralization assay	49
1. Construction of HPV pseudovirus taking β -gal gene	49
2. Improvement in detection assay for β -gal	53

3. Titer evaluation of β -gal pseudovirus and application of β -gal pseudovirus-based neutralization assay	56
part III Construction and application of pseudovirus-based neutralization assay for HPV58 and HPV52	61
1. Construction of HPV58 and HPV52 pseudovirus	61
2. Application of pseudovirus-based neutralization assay for HPV58 and HPV52.....	64
Discussion	67
Brief summary and prospect	74
References.....	76

摘要

人乳头瘤病毒（HPV）能够引起包括宫颈癌在内的多种生殖道疾病，严重危害人类健康。HPV 具有严格的宿主特异性和组织分化依赖性，难以通过常规组织培养方法扩增，也难以从病变组织中分离获得足够的病毒。因此建立简便、高效的 HPV 体外感染模型是发展 HPV 预防疫苗与治疗药物的迫切需要。近来研究发现 HPV 假病毒可用于在体外有效模拟 HPV 的感染，以此基础建立的中和实验方法具有较突出准确、便捷的优点，在 HPV 预防疫苗、中和抗体研究中显示出巨大的应用潜力。HPV 假病毒中和实验方法的广泛使用需要进一步提高假病毒构建效率，同时能够满足高通量检测的需要。本实验室已应用磷酸钙多质粒共转染方法在 293FT 细胞中建立了构建 HPV 假病毒的方法，本研究以此为基础，进一步对 HPV 假病毒构建体系进行系统改进和优化，建立了更为高效且适合高通量检测的 HPV 中和实验方法。

建立简便高效、高通量的假病毒中和实验检测方法对提高实验效率，满足大规模抗体检测的需要具有十分重要的意义。同时，建立多个型别的 HPV 假病毒中和实验模型为具有高保护力的多价疫苗的开发提供了全面的中和抗体评价体系。

本研究首先探讨了在 HPV 假病毒构建体系中优化质粒转染比例以及磷酸钙转染条件对假病毒构建效率的影响。结果显示，在该体系中不同的 HPV 结构蛋白表达质粒转染比例对于假病毒构建效率有显著影响，HPV 主要结构蛋白 L1 的表达水平是影响构建效率的主要因素，L2 表达质粒的用量过高或过低均不利于假病毒的构建。报告质粒的用量对假病毒构建效率的影响相对较小。综合比较显示，在该体系中 L1 和 L2 表达质粒和报告质粒以合适比例（1:1/10:1/2）进行共转染可获得较理想的构建效率。同时通过优化磷酸钙转染试剂的用量和 DNA 在磷酸钙溶液中浓度获得了较优的转染条件。通过优化改进，本研究建立了更为高效的 HPV 假病毒大量制备方法，在 HPV16、HPV18、HPV6、HPV11 假病毒构建中的应用结果显示相比原方法可显著提高构建效率 10~20 倍。为 HPV 假病毒中和实验的规模化应用提供了有利条件。

为适应高通量检测的需要，本研究通过改进报告基因及检测方法建立了新型的 HPV 假病毒中和实验体系。本研究选择半乳糖苷酶作为报告基因，构建了携带

优化后的半乳糖苷酶表达元件的 HPV 假病毒，研究结果显示，假病毒感染后的细胞加入显色底物后可呈现显著的蓝色，并且该标记可为酶联免疫图像分析系统（Elispot）所检测。酶联免疫图像分析系统可对显色后的 96 孔细胞培养板进行连续快速的自动扫描并计数，满足了高通量检测的需要。本研究进一步对显色方法进行优化，提高了检测效率。通过综合应用优化的半乳糖苷酶报告基因表达元件与酶联免疫图像分析系统，本研究建立新型的可满足高通量检测要求的 HPV 假病毒中和实验方法。本研究应用该方法对四型 HPV 中和单抗的鉴定结果表明，半乳糖苷酶假病毒中和实验方法与目前应用的 EGFP 假病毒中和实验方法的检测灵敏度相当，同时新方法还具有可自动连续检测、操作简便、结果显示直观的优点，可更好地满足大规模中和抗体检测实验的需要。本研究应用该方法鉴定获得了 2 株 HPV16 中和单抗，3 株 HPV18 中和单抗，以及 HPV6 和 HPV11 中和单抗各 5 株；同时对本中心生产的 HPV16、HPV18、HPV6 和 HPV11 四价 VLP 疫苗的抗体保护性进行了评价，为临床实验阶段所需疫苗的合适剂量提供了参考。

HPV58 和 HPV52 是中国较为流行的高危 HPV 型别，但一直以来研究较少。建立 HPV58 和 HPV52 假病毒中和实验模型对于研究 HPV58 和 HPV52 以及预防疫苗的开发具有重要意义。我们将 HPV58 和 HPV52 的衣壳蛋白表达序列进行密码子人源化优化后，克隆到表达载体上，与报告质粒分别共转染 293FT 获得了感染性的 HPV58 和 HPV52 假病毒。将质粒通过尾静脉高压注射方式免疫小鼠，成功在小鼠体内诱导了高滴度的 HPV58 和 HPV52 的中和性抗体。Western blotting 结果显示这两型假病毒在约 55KD 处均具有 L1 蛋白活性。多抗血清交叉中和实验表明 HPV58 和 HPV52、HPV16 和 HPV58 之间存在一定水平的抗体交叉保护，而 HPV16 和 HPV52 之间没有可检测的抗体交叉保护性。

关键词：人乳头瘤病毒；假病毒；中和实验

ABSTRACT

Infection of Human papillomavirus (HPV) is the cause of various diseases of genital tract, including cervix cancer, which is the second most common cancer leading to death in women. HPV's infection has host specificity, moreover, completed life cycle of HPV relies on differentiation of epithelial cells. Absence of applicable cell culture systems for infectious virus and limited virus particles obtained from patients' tissues restrict research on HPV and development of HPV vaccine. Convenient and efficient infection models of HPV in vitro are necessary for development of prophylactic vaccine and therapeutic agents of HPV. In recent years, people use pseudovirus to imitate HPV and construct pseudovirus-based neutralization assay for HPV, which displays a enormous applied potential in detection of neutralizing antibodies and development of prophylactic vaccine.

Cotransfection of plasmids with codon-optimized genes is proved more convenient and higher-yield in producing pseudovirion than other systems, which has been constructed in our lab. To evaluate the protection providing by HPV prophylactic vaccine to animals or human, a great deal pseudovirion and a rapid, simple and convenient, high-throughput neutralization assay is required. To satisfy need of development of multivalent HPV vaccine, developing pseudovirus-based neutralization assay for other HPV types is necessary.

In construction of pseudovirus by cotransfection of plasmids, appropriately lowering transfected mole ratio of L2 expression plasmid and reporter plasmid enhances expression of L1, which is positive correlative to construction efficiency of pseudovirus under certain conditions. The optimized transfected ratio may be 1:1/10:1/2 of L1、L2 expression plasmids and reporter plasmid. Modified transfected mole ratios of plasmids、optimal DNA concentration in calcium phosphate solution and appropriate volume of calcium phosphate solution contribute to a 10~20 times higher efficiency in construction of HPV16、HPV18、HPV6 and HPV11 pseudovirion.

To satisfy the need of high-throughput assay for neutralizing antibodies, considering the conditions in our lab, we constructed a new neutralization assay based on pseudovirion encapsidating β -gal expression plasmid. We utilized Elispot

reader to scan 96 wells cell culture plates and display automatic counting result of cells transduced by pseudovirion every well, what remarkably enhance efficiency of neutralization assay for HPV. The method of x-gal staining was improved to further enhance the efficiency. The new neutralization assay for HPV has high specificity, a wide detection range and similar sensitivity comparing to that of EGFP pseudovirus-based neutralization assay, moreover, it's low-cost in reagents and easy to operate.

The neutralization efficiency of HPV16, HPV18, HPV6 and HPV11 monoclonal antibodies generated in our lab were then evaluated by the new pseudovirus-base neutralization assay. All these neutralizing mAbs can be used to thoroughly elucidate the neutralizing epitopes of HPV and evaluate the quality of HPV vaccines. To investigate a suitable dose of candidate VLP-mixed vaccine of HPV16/18/6/11, sixty mice were vaccinated with serial diluted HPV16/18/6/11 VLP mix and the ED₅₀ was identified to be HPV16 0.017 μ g/mL, HPV18 0.017 μ g/mL, HPV6 0.025 μ g/mL, HPV11 0.067 μ g/mL, which will guide us in the determination of an appropriate dose of mix vaccine in clinical trial studies.

HPV58 and HPV52 are popular high-risk HPV in China, popularity of HPV58 is second to that of HPV18, but little has been studied about the two types since always. Construction of HPV58 and HPV52 pseudovirion help to research on HPV58, HPV52 and development of corresponding vaccine. Codon-optimized expression plasmids of capsid protein and reporter plasmid are cotransfected to 293FT cells, successfully generating high titer infectious pseudovirion of HPV58 and HPV52 respectively. Expression of 58L1 and 52L1 in cells was detected by Western blotting. Immunizing codon-optimized 58L1 and 52L1 expression plasmids induced neutralizing antibody in mice which can neutralize infection of pseudovirion respectively. We found cross neutralization phenomena exists between HPV16 and HPV58, HPV58 and HPV52, but not between HPV52 and HPV16.

Key words: Human Papillomavirus; Pseudovirus; Neutralization assay

ABBREVIATION (缩略词)

- PV: Papillomavirus, 乳头瘤病毒
- HPV: Human Papillomavirus, 人乳头瘤病毒
- CRPV: Cottontail Rabbit Papillomavirus, 棉尾兔乳头瘤病毒
- BPV: Bovine Papillomavirus, 牛乳头瘤病毒
- COPV: Canine Oral Papillomavirus, 犬口腔乳头瘤病毒
- LCR: Long Control Region, 长控制区
- ORF: Open Reading Frame, 开放阅读框
- VLP: Virus Like Particle, 类病毒颗粒
- HSPG: Haparan Sulfate Proteoglycans, 硫酸乙酰肝素蛋白聚糖
- NLS: Nuclear Localization Signal, 核定位信号
- PML: Promonocytic Leukemia Protein, 急性早幼粒白血病蛋白
- CIN: Cervical Intraepithelial Neoplasia, 宫颈上皮内瘤变
- E6AP : E6 associated protein, E6 相关蛋白
- pRb: Retinoblastoma Tumor Suppressor Gene, 抗癌抑制因子
- CDK: Cyclin-dependent Kinase, 细胞周期蛋白激酶
- CA: Condyloma Acuminatum, 尖锐湿疣
- DC: Dendritic Cell, 树突状细胞
- CTL: Cytotoxic T Lymphocyte, 杀伤性 T 淋巴细胞
- ISCAR: Immunostimulatory Carrier, 免疫刺激载体
- LAMP-1: Lysosomal-associated Membrane Protein Type 1, 溶酶体相关 I 类膜蛋白
- AAV : Adeno-associated Virus, 腺相关病毒
- MVA: Modified Vaccinia Virus Ankara, 改造安卡拉痘苗病毒
- SCID: Severe Combined Immunodeficiency Mice, 严重联合免疫缺陷小鼠
- SFV: Semliki Forest Virus, 塞姆利基森林病毒
- EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein, 增强型绿色荧光蛋白
- SEAP: Secreted Alkaline Phosphatase 分泌性碱性磷酸酶
- 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
- mAb: monoclonal antibody, 单克隆抗体
- MHC: Major Histocompatible Complex, 主要组织相容性复合物
- MOI: Multiplicity of Infection, 感染复数
- MW: Molecular Weight, 分子量
- Ori: Origin, 复制起始位点
- SV40: Simian vacuolating virus, 猿空泡病毒 40
- FBS: Fetal Bovine Serum, 胎牛血清
- FCM: Flow Cytometry, 流式细胞仪
- HRP: Horseradish Peroxidase, 辣根过氧化物酶
- RNA: Ribonucleic Acid, 核糖核酸
- HLA: Human Leucocyte Antigen, 人类白细胞抗原
- RLU: Relative light units, 相对光单位

前言

1. HPV 的生物学

乳头瘤病毒 (papillomavirus, PV) 的宿主范围很广, 几乎包括所有的哺乳动物和鸟类。常见的 PV 包括人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV)、棉尾兔乳头瘤病毒 (cottontail rabbit papillomavirus, CRPV)、牛乳头瘤病毒 (bovine papillomavirus, BPV)、犬口腔乳头瘤病毒 (canine oral papillomavirus, COPV) 等, 同属于乳头瘤病毒科 (*Papillomaviridae*)。人们对于 HPV 与宫颈癌以及湿疣等疾病的相关性认识始于 19 世纪 70 年代, 后来随着分子生物学技术的不断发展, 在 1983 和 1984 年成功地从宫颈癌组织中分离出 HPV16^[1]和 HPV18^[2]病毒株, 之后对 HPV 的研究进入了一个快速发展的时期。至今, 已被分离和鉴定的 HPV 型别有 100 多种^[3]。

1.1. HPV 的病毒结构

HPV 是一种无包膜的, 小分子双链环状 DNA 病毒, 病毒衣壳由主要衣壳蛋白 L1 和次要衣壳蛋白 L2 构成, 在电镜下大小 55nm, 呈二十面体结构。

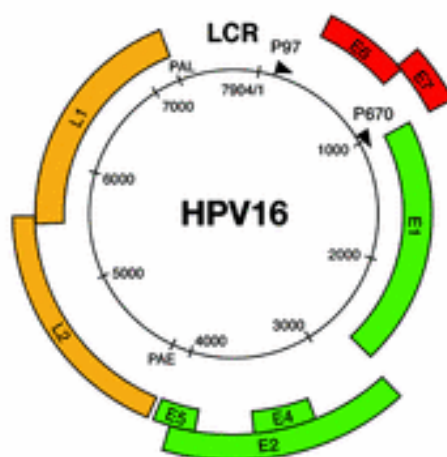


图 1: HPV16 基因组结构图^[4]

Fig.1: Scheme of HPV16 genomic structure

HPV 的基因组约 8Kb。其中较典型的 HPV16 的基因组结构如图 1 所示, 包括长控制区 (long control region, LCR), 编码早期非结构蛋白 (E1~E7) 的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 和编码晚期结构蛋白 (L1 和 L2) 的 ORF。HPV 的早期蛋白负责基因组的复制、转录、翻译, 细胞的转化以及病毒颗粒的组装等。E1 以六聚体形式存在, 是一种 ATP 酶以及解旋酶^[5], 识别 HPV 复制起始位点, 在 E2 蛋白辅助下, 与 DNA 聚合酶 α 亚基结合并起始病毒基因的复制^[6,7]。E2 以二聚体的形式存在, 在病毒 DNA 复制和基因转录调节方面发挥重要功能。当细胞中 E2 浓度下降时, E2 激活早期基因的表达; E2 浓度升高时, 通过抑制一些转录因子的作用可降低病毒蛋白表达, 通过这种机制将细胞中的病毒拷贝控制在一定数量内^[8]。E6 和 E7 是癌蛋白, 分别与细胞内抗癌抑制因子 p53、pRb 作用, 诱导细胞癌变^[9]。E4、E5 蛋白在病毒增殖期才开始表达, E5 可以与细胞内多种生长因子受体结合, 影响细胞信号途径和正常的细胞生活周期, 促使细胞增殖, 分化延缓^[10], E4 蛋白与细胞周期的调控有关^[11,12]。E3 的功能目前还不清楚。

HPV 衣壳是由 72 个 L1 蛋白五聚体构成的 T=7 的二十面体结构, 一个病毒粒子上含有 360 个 L1 蛋白单体^[13,14], L1 蛋白单体和五聚体结构如图 2 所示。体外表达的 L1 蛋白可自组装或与 L2 蛋白共组装成类病毒颗粒 (virus like particle, VLP), 组装的过程可非特异的包裹小于 8Kb 的环状 DNA。电镜下 VLP 的大小、形状均与天然病毒颗粒相似^[15,16]。在溶液中存在 DTT、2-巯基乙醇或者低盐浓度的条件下, VLP 会重新解聚成五聚体, 这说明五聚体组装成 VLP 同时存在离子键和二硫键的作用^[17,18]。L2 蛋白位于 L1 构成的 VLP 上, 每个病毒粒子上含有 12 个或更多拷贝的 L2 蛋白^[19,20]。目前已鉴定出 L2 蛋白上存在两个与 L1 的作用位点, 一个位于 129~246 号氨基酸之间, 另一个位于 C 末端, 384~460 号氨基酸之间, 两个位点对于核酸包裹均有显著影响^[21]。C 末端的结合位点存在疏水作用区, 这种强疏水作用使得 L1 蛋白和 L2 蛋白结合在一起, 若在该区域引入负电荷的氨基酸, 则 L1 与 L2 的相互作用将被阻断^[22]。

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摘要库