

学校编码: 10384
学 号: B200426019

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

禽流感病毒 M2 重组多肽疫苗和 DNA 疫苗及
其粘膜免疫研究

Study on Vaccine of Recombinant Peptide and DNA Based
on Avian Influenza virus M2 and Mucosal Immunization

张 国 广

指导教师姓名: 李祺福 教授

陈 亮 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2007 年 6 月 29

论文答辩时间: 2007 年 8 月 4

学位授予日期:

答辩委员会主席: 陶 涛 教授

评 阅 人: _____

2007 年 7 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

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

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密 (), 在 年解密后适用本授权书。

2、不保密 ()

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名:

日期: 年 月 日

导师签名:

日期: 年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

中文摘要	1
Abstract	3
第一章 文献综述	7
1 禽流感病毒研究进展.....	7
1.1 禽流感病毒的分类、命名.....	7
1.2 禽流感的发生及危害.....	8
1.3 禽流感病毒的形态结构及其理化特性.....	10
1.4 禽流感病毒分子生物学研究进展.....	12
1.4.1 禽流感病毒的基因组.....	12
1.4.2 禽流感病毒的蛋白结构.....	12
1.5 禽流感病毒的复制.....	18
1.5.1 病毒粒子的吸附、侵入与脱壳.....	18
1.5.2 基因组的转录和复制.....	18
1.5.3 AIV 基因表达的调控.....	18
1.5.4 AIV 的装配与释放.....	19
1.6 禽流感与人禽流感.....	19
1.7 禽流感的防治.....	23
1.7.1 综合防治.....	23
1.7.2 疫苗接种.....	23
1.7.3 疫区的控制.....	24
1.8 禽流感疫苗研究进展.....	24
1.8.1 灭活全病毒疫苗.....	24
1.8.2 纯化组分疫苗.....	25
1.8.3 减毒活疫苗.....	26
1.8.4 重组亚单位疫苗.....	26
1.8.5 重组活载体疫苗.....	27
1.8.6 合成多肽疫苗.....	27
1.8.7 核酸疫苗.....	28
1.8.8 RNAi 疫苗.....	28
2 粘膜免疫研究进展.....	30
2.1 粘膜免疫系统基本组成.....	31
2.2 粘膜免疫系统的诱导与效应细胞.....	32

2.3 分泌型 IgA 作用.....	33
2.4 粘膜免疫的优点.....	34
2.5 粘膜疫苗佐剂.....	34
第二章 禽流感病毒 M2 蛋白及其膜外序列的多肽疫苗研究	37
1 前言.....	37
1.1 基于 M2 蛋白及其 M2e 表位的疫苗研究进展.....	37
1.2 本研究的目的是和内容.....	41
2 材料与方法.....	43
2.1 材料、载体、菌株、工具酶.....	43
2.2 主要试剂及溶液的配制.....	43
2.2.1 质粒抽提相关溶液.....	43
2.2.2 SDS-PAGE 相关溶液.....	43
2.2.3 Western blotting 相关溶液.....	44
2.2.4 ELISA 所用试剂.....	44
2.2.5 蛋白纯化相关试剂.....	45
2.2.6 其它相关溶液.....	45
2.3 引物设计和序列分析.....	45
2.4 M 基因的克隆.....	46
2.4.1 PCR 引物.....	46
2.4.2 病毒 RNA 提取.....	46
2.4.3 RT-PCR.....	46
2.4.4 M 基因的 TA 克隆.....	47
2.4.5 序列测定及分析.....	48
2.4.6 M2 基因及缺失跨膜区的 M2 基因的克隆.....	49
2.5 基于 M2 基因膜外序列的融合基因构建.....	49
2.5.1 M2e 比对及密码子优化.....	49
2.5.2 PCR 引物.....	49
2.5.3 M2eHBc 和 M2eHBc+融合基因片段的获得.....	50
2.6 原核表达载体的构建.....	50
2.6.1 pET32a- Δ M2 原核表达载体的构建.....	50
2.6.2 pMALc2x-M2eHBc 和 pMALc2x-M2eHBc+原核表达载体的构建.....	51
2.7 目的基因的诱导表达.....	51
2.7.1 缺失跨膜区的 M2 蛋白表达.....	51
2.7.2 M2eHBc 和 M2eHBc+融合蛋白表达.....	51
2.7.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)	51

2.8	原核表达重组蛋白纯化及浓度测定.....	52
2.9	表达产物的抗原性分析.....	52
2.10	纯化表达蛋白的交叉抗原性检测.....	53
2.11	电镜观察原核表达的融合蛋白.....	54
2.12	免疫小鼠.....	54
2.13	抗体效价检测.....	54
2.13.1	血清收集方法.....	54
2.13.2	HBcAg 抗体检测.....	54
2.13.3	M2 特异性抗体效价检测.....	55
3	结果与分析.....	56
3.1	M 基因 RT-PCR 扩增和重组载体 pMD18T-M 鉴定.....	56
3.2	M 基因序列比对及分子进化分析.....	56
3.3	缺失跨膜区的 M2 基因扩增及 pET32a- Δ M2 鉴定.....	59
3.4	M2e 与 HBcAg 融合基因的扩增及原核表达载体鉴定.....	60
3.5	融合蛋白的表达及蛋白表达形式分析.....	62
3.5.1	pET32a- Δ M2 表达分析.....	62
3.5.2	pMALc2x-M2eHBc 和 pMALc2x-M2eHBc+表达分析.....	63
3.6	原核表达的融合蛋白抗原性分析.....	64
3.7	融合蛋白的交叉反应性检测.....	66
3.8	电镜观察结果.....	67
3.9	抗体效价检测.....	68
3.9.1	抗血清中 HBcAg 抗体.....	68
3.9.2	抗血清中 M2 抗体效价.....	68
4	讨论.....	70
4.1	M 基因的克隆与序列分析.....	70
4.2	融合基因的构建.....	70
4.3	外源基因的原核表达.....	70
4.4	病毒样颗粒.....	71
4.5	融合蛋白交叉抗原性及抗体效价.....	72
第三章	LTB 的克隆与表达及其与 M2eHBc+蛋白的粘膜免疫研究.....	74
1	前言.....	74
1.1	LT 与 CT 的结构与功能.....	74
1.2	LT 和 CT 的粘膜免疫佐剂研究.....	76
1.3	LT 与 CT B 亚单位的免疫佐剂研究.....	78
1.4	本研究的目的是和内容.....	81

2 材料与amp;方法.....	83
2.1 材料、载体、菌株、工具酶.....	83
2.2 LT 基因的克隆.....	83
2.2.1 PCR 模板制备、引物设计及 PCR 扩增.....	83
2.2.2 LT 基因的 TA 克隆.....	84
2.3 LTB 的原核表达载体构建.....	84
2.3.1 LTB PCR 引物合成、PCR 扩增.....	84
2.3.2 pET32a-LTB 原核表达载体构建.....	84
2.4 LTB 亚单位与 M2eHBc+的融合表达载体构建.....	84
2.5 目的基因的诱导表达.....	85
2.6 表达产物抗原性分析.....	85
2.7 体外 GM1-ELISA 检测.....	86
2.8 电镜观察原核表达的融合蛋白 LBM2eHBc+.....	86
2.9 小鼠免疫接种.....	86
2.10 抗体效价检测.....	86
2.10.1 免疫血清及肠分泌液制备.....	86
2.10.2 血清抗原特异性 IgG 效价检测.....	87
2.10.3 肠分泌液中抗原特异性 IgA 检测.....	87
3 结果与分析.....	88
3.1 LT 全长基因的克隆及序列分析.....	88
3.2 pET32a-LTB 原核表达载体构建.....	88
3.3 pMALc2x-LBM2eHBc+原核表达载体的构建.....	89
3.4 融合蛋白的表达及蛋白表达形式.....	90
3.4.1 pET32a-LTB 的表达.....	90
3.4.2 pMALc2x-LBM2eHBc+的原核表达.....	91
3.5 重组蛋白的抗原性分析.....	92
3.6 重组蛋白的 GM1-ELISA.....	94
3.7 电镜观察结果.....	94
3.8 抗体效价检测.....	95
3.8.1 血清 M2 特异性 IgG 检测结果.....	95
3.8.2 肠冲洗液 M2 特异性 IgA 检测结果.....	96
4 讨论.....	98
4.1 原核表达系统中目的蛋白的可溶性表达.....	98
4.2 LTB 对共免疫原的粘膜佐剂活性.....	99
第四章 M2eHBc+融合基因的 DNA 疫苗免疫研究.....	102

1 前言.....	102
1.1 DNA 疫苗.....	102
1.1.1 DNA 疫苗的发展及其优点.....	102
1.1.2 DNA 疫苗诱发机体产生免疫保护的机制.....	103
1.1.3 加强 DNA 免疫效应的策略.....	104
1.1.4 DNA 疫苗与其它疫苗的二次免疫（初免-加强）策略.....	104
1.2 DNA 疫苗与粘膜免疫.....	105
1.3 禽流感病毒 DNA 疫苗的研究.....	107
1.4 本研究的目的是与内容.....	108
2 材料与方法.....	109
2.1 实验材料.....	109
2.2 主要试剂及溶液的配制.....	109
2.2.1 质粒大量抽提所需试剂配制.....	109
2.2.2 细胞培养及转染相关试剂配制.....	109
2.2.3 T 细胞增殖试验相关试剂配制.....	110
2.3 pcDNA3-LTB、pcDNA3-M2eHBc+及 pcDNA3-LBM2eHBc+构建.....	110
2.4 转染及免疫用质粒的制备及浓度纯度测定.....	111
2.4.1 转染及免疫用质粒的制备.....	111
2.4.2 质粒浓度及质粒纯度测定.....	112
2.5 体外转染哺乳动物细胞.....	112
2.6 免疫小鼠.....	113
2.7 IgG 和 IgA 抗体效价检测.....	113
2.8 T 细胞增殖试验.....	114
2.8.1 小鼠脾脏淋巴细胞分离.....	114
2.8.2 T 细胞增殖试验（MTT 法）.....	114
3 结果与分析.....	115
3.1 DNA 疫苗相关载体的构建.....	115
3.2 体外转染 Western blotting 分析.....	115
3.3 DNA 疫苗抗体检测结果.....	116
3.3.1 血清 IgG-M2 检测结果.....	116
3.3.2 肠洗液 IgA-M2 检测结果.....	117
3.4 T 细胞增殖的试验结果.....	118
4 讨论.....	121
第五章 毕氏酵母表达的 LBM2eHBc+重组基因多肽疫苗及其抗原性分析.....	124
1 前言.....	124

2 材料与amp;方法.....	127
2.1 材料.....	127
2.2 毕氏酵母表达所用各种试剂与溶剂的配制.....	127
2.3 LBM2eHBc+融合基因毕氏酵母表达载体的构建.....	128
2.4 LBM2eHBc+融合基因转化毕氏酵母 GS115.....	129
2.4.1 GS115 感受态的制备.....	129
2.4.2 重组表达载体 pPIC9K-LBM2eHBc+线性化.....	129
2.4.3 表达载体 pPIC9K-LBM2eHBc+ 转化 GS115 感受态细胞.....	129
2.5 LBM2eHBc+融合基因在毕氏酵母 GS115 中的表达.....	130
2.5.1 转化子的 PCR 快速鉴定.....	130
2.5.2 阳性转化子的 Dot-ELISA 鉴定.....	130
2.5.3 酵母整合的 PCR 分析.....	130
2.5.4 融合基因在酵母中的表达.....	131
2.6 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析及 Western-blotting 分析.....	131
3 结果与分析.....	132
3.1 酵母表达载体的构建.....	132
3.2 转化 GS115 阳性克隆的 PCR 鉴定及 Dot-ELISA 鉴定.....	132
3.3 PCR 分析外源基因在酵母中的整合.....	134
3.4 外源基因的诱导表达.....	134
3.5 表达蛋白的 Western blotting 分析.....	135
4 讨论.....	136
结论与展望.....	139
其它研究工作.....	141
参考文献.....	142
缩略词.....	157
致谢.....	158

中文摘要

禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)能感染几乎所有的野生及饲养禽类,引起禽类尤其是饲养禽类的死亡, AIV 的流行给养禽业造成了严重的经济损失。1997 年在香港发现 H5N1 亚型禽流感病毒突破生物屏障直接感染人,使人们认识到 AIV 对于人类公共卫生的重要性。疫苗接种是预防和控制 AIV 流行的主要措施之一,但 AIV 突变频率高、亚型多,给疫苗的研制带来困难。AIV 的 M2 蛋白是病毒囊膜上的蛋白之一,具有亚型间高度的保守性,是理想的交叉保护性疫苗的候选抗原。AIV 主要是经过动物呼吸道等粘膜系统传染,具有诱导机体粘膜和系统应答能力的疫苗对于禽流感的防治具有重要的意义。大肠杆菌不耐热肠毒素(Heat-labile enterotoxin, LT)是目前研究较多的粘膜佐剂之一,尤其是其 B 亚单位不具有 LT 的肠毒素毒性,但仍然保持较好的粘膜佐剂活性。本研究基于 M2 基因及其 M2e 表位与大分子载体 HBcAg (Hepatitis B core antigen, HBcAg) 构建融合基因,利用融合基因制备多肽和 DNA 疫苗,并对疫苗免疫效果进行了研究,同时研究了 LTB 亚基对多肽和 DNA 疫苗的佐剂效应。主要结果如下:

- 1) 利用 RT-PCR 从一株福建分离的 AIV H5N1 毒株中克隆了其 M 基因,序列比对结果表明与人源分离株遗传距离较远,从 M 基因上扩增得到完整的 M2 基因,利用 OE-PCR (Overlap extension PCR) 得到缺失跨膜区的 Δ M2, 将 Δ M2 进行原核表达。利用 OE-PCR 分别将 M2e 表位融合到大分子载体 HBcAg 的 N 端和主要免疫优势区 (Major immunodominant region, MIR), 构建融合基因 M2eHBc 和 M2eHBc+, 进行了原核表达。上述原核表达蛋白具有抗原性、亚型间交叉识别能力、M2eHBc 和 M2eHBc+还具有体外自主包装成 VLP (Virus-like particles, VLP) 颗粒的能力,肌肉注射免疫小鼠后均能诱导小鼠产生 M2 特异性抗体,其中 M2eHBc+蛋白免疫效果显著优于其它免疫组;
- 2) 从大肠杆菌 195 毒株中克隆出 LT 基因,并对其 B 亚基进行了原核表达,表达的重组 LTB 蛋白具有抗原性和体外 GM1 结合活性。将 LTB 基因与 M2eHBc+融合进行了原核表达,表达出的 LBM2eHBc+蛋白能与 M2 蛋白抗体发生免疫识别,能自主包装成 VLP 颗粒,具有体外 GM1 结合活性;

- 3) 动物免疫试验表明, 与阴性对照比 M2eHBc+蛋白通过粘膜途径免疫小鼠能诱导一定的系统和粘膜应答, 表达的 LTB 蛋白与 M2eHBc+蛋白混合通过粘膜途径免疫小鼠能显著增强机体的血清 IgG 应答, 诱导较强的粘膜 IgA 应答, 表明所表达的 LTB 蛋白具有很强的粘膜佐剂活性。表达的 LBM2eHBc+融合蛋白通过粘膜途径免疫小鼠引起的机体免疫系统应答水平与 M2eHBc+混合 LTB 免疫组相似, 且对粘膜 IgA 的诱导能力优于混合组;
- 4) 将 M2eHBc+与 pCDNA3 载体连接构建 pCDNA3-M2eHBc+ DNA 疫苗, 转染 293 细胞, 能表达出抗原蛋白且该蛋白具有抗原性, DNA 疫苗肌肉注射免疫小鼠后能诱导机体产生较强的抗原特异性抗体和 T 细胞增殖应答;
- 5) LTB 质粒与 pCDNA3-M2eHBc+ DNA 疫苗等量混合, 或 LTB 基因与 pCDNA3-M2eHBc+融合构建的 DNA 疫苗肌肉注射免疫小鼠, 与单独 pCDNA3-M2eHBc+ DNA 疫苗肌肉注射组比, 能显著增强 DNA 疫苗的细胞免疫应答, 对体液 IgG 应答的佐剂效应不明显; 通过滴鼻途径免疫时能显著刺激机体粘膜 IgA 分泌;
- 6) 研究了 DNA 疫苗和蛋白疫苗的初免/加强策略, 结果表明在 DNA 疫苗两次免疫后用一次相同抗原的蛋白疫苗加强免疫, 可以显著增强机体系统 IgG 应答, 且对 DNA 疫苗诱导的 T 细胞应答影响不显著;
- 7) 将 LBM2eHBc+融合基因构建酵母表达载体 pPIC9K-LBM2eHBc+, 转化 GS115 表达菌, 筛选出能分泌表达 LBM2eHBc+蛋白的转基因酵母株, Western Blotting 分析该蛋白具有抗原性。

关键词: 禽流感病毒; M2 蛋白; 热不稳定毒素 B 亚单位; 疫苗

Abstract

Avian influenza virus (AIV) can infect almost all wild bird and domestic poultries and especially lead to the death of poultry. Severe economic loss for the poultry industry was brought because of the AIV prevalence. In 1997, H5N1 subtype of AIV was isolated from flu patient in Hong Kong, the subtype ultimately caused several patients dead, and it was the first time reported that H5N1 AIV overcrossed interspecies barrier and infected human. AIV has become a threat to human and greatly engage the attention of public health. Although the vaccine immunization was one of the important methods to prevent AIV reoccurrence, it is very difficult to develop ideal vaccine which can provide protection against all subtypes of AIV that has high frequent antigenic variation of HA and NA gene. The M2 protein of AIV, a potential candidate antigen for avian influenza vaccine with cross-protection, is a transmembrane protein and high evolutionary conservative in different subtypes. Because AIV infected animals through the respiratory and digestive tract, it was important that AIV vaccine could elicit animals mucosal and system responses. Heat-labile enterotoxin (LT) has been regarded as one of the most powerful mucosal adjuvant, which eliciting strong immunoresponse to co-administered antigens. Especially LTB, without LT toxin, hold mucosal adjuvant activity of LT. In this study, fused genes based on M2 and M2e with the large carrier molecular HBcAg were constructed. The vaccines of peptide and DNA based fused genes were obtained, and immune effects and LTB mucosal adjuvant activity were primarily studied simultaneity. Following was the mainly research results:

- 1) M gene of a strain AIV isolated from Fujian province was cloned by RT-PCR and sequenced. The results of phylogenetic analysis of M gene with other 10 strains isolated from China including a strain from human in 1997 in Hong Kong showed that there was significant different between Fujian strain and Hong Kong human strain in heredity. M2 gene was amplified from M and then the Δ M2 was

constructed by the deletion of transmembrane segment (26-49aa) M2 by OE-PCR. The fused gene of M2eHBc and M2eHBc+ were constructed by insertion of M2e epitope into the N-terminus or/and MIR of HBcAg. The protein of Δ M2, M2eHBc and M2eHBc+ were expressed by the optimization of codons systems, and the purified proteins could react with M2 antibody and H5, H9, H7 standard positive serum, M2eHBc and M2eHBc+ with the ability of self-assembly of VLP particle. The M2-antibodies came from mice vaccinate with the 3 proteins respectively by intramuscular, and the M2eHBc+ immune effect significantly surpassed Δ M2 and M2eHBc immune groups.

- 2) The LTB gene was amplified from LT which cloned from *Escherichia coli* 195, and LTB protein expression and purity were performed. The purified LTB protein could react with CT antibody and have the activity of GM1-ELISA. LTB gene was inserted into the N-terminus of M2eHBc+, and then the fused protein, LBM2eHBc+, was expressed and purified. The purified LBM2eHBc+ protein with the ability of self-assembly of VLP particle and the activity of GM1-ELISA could react with M2 antibody.
- 3) M2eHBc+ protein immunization alone resulted in a poor systemic IgG and mucosal IgA response by intranasal and oral routes, and supplementation of LTB protein resulted in substantial stimulation of the serum IgG level and in induction a strong IgA response by intranasal route. The result demonstrated that nontoxic LTB provided a potential promising immunoadjuvant for application in AIV subunit vaccine. The immune effect of LBM2eHBc+ protein in mice by mucosal route was essentially the same as that of the M2eHBc+ supplement LTB, but surpassed the latter in inducing mucosal IgA response.
- 4) The pCDNA3-M2eHBc+ DNA vaccine was constructed by fused M2eHBc+ gene into the eukaryotic expression vector pCDNA3. Western blot analysis was employed to confirm the fused gene expression in transferred 293 cell. Specific M2 antibody and T cell proliferation was detected in the immunized mice by intramuscular injection route.
- 5) pCDNA3-LBM2eHBc+ DNA vaccine or pCDNA3-M2eHBc+ DNA vaccine with

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