

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级   保密  

学号: 21620110153948

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

水痘-带状疱疹病毒疫苗新型免疫分析方法的建立及 ORF7 蛋白功能域的初步研究

Development of Novel Immunoassays for Varicella Zoster Virus (VZV) Vaccine and Preliminary Study on Functional Domain of ORF7 protein

刘 剑

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: 2016 年 4 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2016 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,该学位论文为夏宁邵课题组的研究成果,获得 863 计划项目“ORF7 基因敲除的减毒水痘活疫苗等几种新疫苗的研发”(课题编号:2012AA02A408)课题经费的资助,在厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程中心完成。

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 2021 年 7 月 1 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.....	VII
Abstract.....	X
缩略词.....	XIII
<b>第一章 前言</b> .....	1
<b>1.1 水痘及带状疱疹</b> .....	1
1.1.1 水痘.....	1
1.1.2 带状疱疹.....	1
<b>1.2 水痘-带状疱疹病毒</b> .....	2
1.2.1 水痘-带状疱疹病毒的发现历史.....	2
1.2.2 水痘-带状疱疹病毒的分类学地位.....	3
1.2.3 水痘-带状疱疹病毒的分子流行病学.....	6
1.2.4 水痘-带状疱疹病毒的病毒结构特征.....	8
1.2.5 水痘-带状疱疹病毒的致病机制.....	11
<b>1.3 水痘-带状疱疹病毒疫苗</b> .....	15
1.3.1 Oka 疫苗株.....	15
1.3.2 水痘疫苗.....	16
1.3.3 带状疱疹疫苗.....	18
1.3.4 其他疫苗形式的研究进展.....	20
<b>1.4 水痘-带状疱疹病毒的免疫学检测</b> .....	23
1.4.1 水痘-带状疱疹病毒的体液免疫检测.....	23
1.4.2 水痘-带状疱疹病毒的细胞免疫检测.....	28
<b>1.5 水痘-带状疱疹病毒研究的关键技术进展</b> .....	31
1.5.1 水痘-带状疱疹病毒基因重组技术的进展.....	31
1.5.2 人鼠嵌合模型在 VZV 病毒基因功能研究的进展.....	38
<b>1.6 本论文的研究目的及意义</b> .....	44
<b>第二章 材料与方</b> .....	46

<b>2.1 材料</b> .....	46
2.1.1 主要设备 .....	46
2.1.2 主要试剂与耗材 .....	47
2.1.3 常用溶液的配制 .....	49
<b>2.2 方法</b> .....	58
2.2.1 分子克隆 .....	58
2.2.2 蛋白表达及纯化 .....	67
2.2.3 动物实验及单抗制备 .....	71
2.2.4 抗原及抗体的分析 .....	74
2.2.5 基因重组系统 .....	76
2.2.6 细胞生物学实验 .....	81
<b>第三章 结果与分析</b> .....	87
<b>3.1 水痘-带状疱疹病毒新型免疫分析技术体系的建立</b> .....	87
3.1.1 VZV 膜蛋白抗原、抗体的制备 .....	87
3.1.2 VZV gE 抗原定量方法的建立及其在疫苗抗原质控中的应用 .....	93
3.1.3 基于阻断 ELISA 的 VZV 中和抗体检测方法的建立 .....	99
3.1.4 基于 gE 双抗原夹心法的血清抗体定量检测方法的建立 .....	108
3.1.5 水痘疫苗血清评价经典方法 (gpELISA 法) 的分析 .....	117
3.1.6 豚鼠细胞免疫检测平台的建立 .....	122
3.1.7 小结 .....	130
<b>3.2 VZV ORF7 功能域的初步研究</b> .....	131
3.2.1 SW102-gal K 基因重组系统的建立 .....	131
3.2.2 VZV ORF7 功能域的初步研究.....	137
3.2.3 小结 .....	152
<b>第四章 讨论</b> .....	153
4.1 VZV 疫苗免疫原性的评价方式 .....	153
4.2 新型水痘减毒活疫苗的研究.....	159
4.3 重组 VZV 作为病毒载体用于外源蛋白的表达 .....	162
4.4 VZV 单克隆抗体用于 VZV 感染预防和治疗的前景 .....	164
<b>小结与展望</b> .....	167
<b>参考文献</b> .....	170

在校期间的科研成果.....197

致谢.....199

厦门大学博硕士论文摘要库

**CONTENTS**

<b>Abstract in Chinese</b> .....	VII
<b>Abstract in English</b> .....	X
<b>Abbreviation</b> .....	XIII
<b>Chapter 1 Preface</b> .....	1
<b>1.1 Varicella and herpes zoster</b> .....	1
1.1.1 Varicella .....	1
1.1.2 Herpes zoster.....	1
<b>1.2 Varicella-zoster virus</b> .....	2
1.2.1 Discovering history of varicella-zoster virus.....	2
1.2.2 Taxonomy of varicella-zoster virus .....	3
1.2.3 Molecular epidemiology of varicella-zoster virus .....	6
1.2.4 Structural characteristics of varicella-zoster virus.....	8
1.2.5 Pathogenesis of varicella-zoster virus.....	11
<b>1.3 Varicella-zoster virus vaccine</b> .....	15
1.3.1 Oka vaccine virus strain.....	15
1.3.2 Varicella vaccine .....	16
1.3.3 Herpes zoster vaccine .....	18
1.3.4 Other forms of varicella-zoster virus vaccine .....	20
<b>1.4 Evaluation of immunity specific for varicella-zoster virus</b> .....	23
1.4.1 Evaluation of humoral immunity specific for VZV.....	23
1.4.2 Evaluation of cellular immunity specific for VZV .....	28
<b>1.5 Key technologies in the research of varicella-zoster virus</b> .....	31
1.5.1 Genetic recombination of VZV genome.....	31
1.5.2 VZV gene function research in mouse-human xenograft .....	38
<b>1.6 Purpose and significance of this study</b> .....	44

<b>Chapter 2 Materials and methods</b> .....	46
<b>2.1 Materials</b> .....	46
2.1.1 Instruments.....	46
2.1.2 Reagents.....	47
2.1.3 Preparation of solvents.....	49
<b>2.2 Methods</b> .....	58
2.2.1 Molecular cloning .....	58
2.2.2 Expression and purification of proteins .....	67
2.2.3 Animal experiments and antibodies preparation.....	71
2.2.4 Analysis of antigens and antibodies .....	74
2.2.5 Manipulation of gene recombination system.....	76
2.2.6 Experiments in cell biology .....	81
<b>Chapter 3 Results and analysis</b> .....	87
<b>3.1 Development of a novel immunoassays system for Varicella Zoster Virus</b> .87	
3.1.1 Preparation of VZV membrane proteins and antibodies.....	87
3.1.2 A monoclonal antibody-based VZV glycoprotein E quantitative assay and its application on antigen quantitation in VZV vaccine.....	93
3.1.3 Serological evaluation of immunity to the varicella-zoster virus based on a novel competitive ELISA .....	99
3.1.4 Quantitative evaluation of immunity to varicella zoster virus with a novel double antigen sandwich ELISA .....	108
3.1.5 Analysis of the classical varicella vaccine evaluation method (gpELISA).....	117
3.1.6 Methods to evaluate VZV-specific cellular immunity in guinea pig .....	122
3.1.7 Brief summary .....	130
<b>3.2 Priliminary study on functional domain of ORF7 protein</b> .....	131
3.2.1 Establishment of an efficient BAC recombineering using galK selection .....	131
3.2.2 Priliminary study on functional domain of ORF7 protein.....	137
3.2.3 Brief summary .....	152
<b>Chapter 4 Discussion</b> .....	153
<b>4.1 Methods to evaluate the immunogenicity of VZV vaccine</b> .....	153
<b>4.2 Development of novel live attenuated VZV vaccine</b> .....	159



<b>4.3 Recombinant varicella-zoster as platforms for expression of foreign antigens.....</b>	<b>162</b>
<b>4.4 Prospect of application of mono-clonal antibody in prevention and treatment of VZV infection.....</b>	<b>164</b>
<b>Summary and prospect.....</b>	<b>167</b>
<b>References.....</b>	<b>170</b>
<b>Publications.....</b>	<b>197</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>199</b>

厦门大学博硕士论文摘要库

## 摘要

水痘-带状疱疹病毒 (Varicella-Zoster Virus, VZV) 是水痘和带状疱疹的病原体。VZV 具有高度传染性, 初次感染可引发水痘, 并可潜伏于患者背根神经节, 在年老或免疫力低下时可能激活导致带状疱疹, 具有严重的危害性。接种疫苗是预防 VZV 感染的有效方式, 但目前使用的 VZV 减毒活疫苗株 v-Oka 仍具有感染和潜伏人神经系统的能力, 安全隐患不容忽视, 因此, 亟需研制更为安全有效的新型疫苗。高效、精确的免疫分析技术体系是研制新型疫苗的重要基础。VZV 是一种基因组约 125Kb, 拥有 70 个 ORF, 包括 9 种外膜蛋白的复杂疱疹病毒, 尽管发现较早, 但由于其病毒结构和抗原组成的复杂性, 目前对于 VZV 的主要保护性抗原和免疫效应的认识仍有许多不足, 导致当前的疫苗免疫分析方法存在检测体系复杂、检测对象不清晰和效率低下等缺点, 难以满足新型疫苗研制和评价的需求。为此, 本研究重点开展 VZV 疫苗新型免疫分析技术体系的研究, 探索建立疫苗主要保护性抗原和抗体的分析方法并应用于新型疫苗研究, 本研究同时开展 VZV 新型皮肤和神经毒力因子 ORF7 的主要结构功能域鉴定, 为新型 VZV 疫苗的研究提供基础和支持。

VZV 膜蛋白是疫苗的主要免疫原, 本研究首先探索构建可靶向 VZV 膜蛋白的单克隆抗体库。本研究应用杆状病毒或 *E.coli* 表达系统获得了病毒 8 种膜蛋白的重组抗原, 结合使用全病毒颗粒等策略免疫小鼠, 筛选获得了 216 株膜蛋白单抗, 建立了可识别包括 gE、gB、gH 等 8 种 VZV 包膜蛋白的单抗库。gE 抗原是 VZV 疫苗最重要的保护性抗原。本研究从获得的 70 株 gE 单抗中筛选获得一组单抗(4A2/4H10-HRP), 首次建立了基于双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)的 gE 抗原定量检测试剂, 该方法具有灵敏度高 (1.95 ng/mL)、特异性好的优点, 可应用于疫苗抗原活性的快速监测。本研究结果还显示, 病毒培养过程及成品苗中的 gE 抗原量与病毒滴度具有良好的相关性, 该方法可有效弥补传统空斑实验耗时长的缺点, 可有效提高疫苗制备工艺优化效率。

本研究开展了新型 VZV 抗体检测方法的研究。FAMA 方法是目前 VZV 血清抗体检测的“金标准”方法, 但存在操作复杂、通量低和结果判定主观的缺点,

难以满足新型疫苗研制的需求。本研究即探索建立新型的 VZV 中和抗体检测方法，通过对已建立的 VZV 单抗库进行中和及病毒捕获能力分析，本研究首次建立了一种基于阻断 ELISA 原理的 VZV 中和抗体检测方法，其由 VZV 皮层蛋白 ORF9 单抗（8H6，用于捕获）及识别优势中和表位的 gE 单抗（1B11，用于标记）组成检测配对，可用于定性检测血清中的 VZV 中和抗体。相比经典 FAMA 法，该方法的检测灵敏度为 95.60%，特异性为 99.77%，两种方法检测一致性为 97.61%。该方法具有快速、高通量的优点，可为大规模开展 VZV 血清流行病学调查和新型 VZV 疫苗研究提供重要支持。本研究同时应用杆状病毒表达系统表达、纯化获得重组 gE 抗原并建立一种基于双抗原夹心 ELISA 原理的可用于 VZV 血清抗体定量检测的方法。该方法与经典 FAMA 法相比，灵敏度为 95.08%，特异性 100%，检测线性范围为 11.25-360 mIU/mL。并可克服经典 gpELISA 方法存在的总膜蛋白（gps）原料获得困难、成分复杂和批次差异大的问题。此外，为支持新型 VZV 疫苗研究，本研究建立了豚鼠重要细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-2 的检测方法，TNF- $\alpha$  检测方法检测灵敏度为 7.8 pg/mL，IL-2 检测方法检测灵敏度为 0.39 pg/mL，上述检测方法可为以豚鼠为动物模型评价 VZV 疫苗的细胞免疫反应激活能力提供必要的检测技术平台。

在前期研究中，我们与合作实验室首次发现了 VZV ORF7 是病毒感染皮肤和神经的双毒力决定因子，ORF7 基因缺失的毒株具有发展为新型减毒活疫苗株的潜力，但目前对于 ORF7 的结构和功能域特征仍缺乏了解。为此，本研究开展了 ORF7 结构功能域的初步研究。研究结果显示，重组及天然 ORF7 抗原可形成二聚及多聚体，应用半胱氨酸突变、截短表达等策略发现二硫键形成并非 ORF7 多聚体形成的原因，ORF7 多聚体形成的决定区域位于该蛋白的核心区域（35-167 aa）。本研究进一步应用 SW102-galK 基因重组系统构建了 7 种 ORF7 基因突变或截短的重组 VZV 毒株，并分析其体外增殖特征及对人背根神经节（DRG）和皮肤嵌合小鼠的感染能力，结果显示 ORF7 的 N 端区域（1-65 aa）是影响病毒皮肤及神经嗜性的关键区域，也是影响病毒生长速度的重要区域，ORF7 多聚体形成区域与病毒生长和对皮肤及神经毒性没有显著联系。

综上所述，本研究建立了一个可对多种 VZV 重要抗原和抗体进行分析的新型免疫分析技术体系，初步确定了 VZV 新型皮肤和神经毒力因子 ORF7 的主要

结构功能域，上述结果可为进一步开展 VZV 新型疫苗研究提供重要的理论和技术支持。

**关键词：**水痘-带状疱疹病毒 疫苗质控 血清学检测 酶联免疫吸附试验 基因重组

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

Varicella-zoster virus (VZV) is the causative agent for varicella and herpes zoster (HZ). VZV is highly contagious and primary infection of the virus causes varicella. During varicella, VZV will establish life-long latency in the sensory ganglia, in the situation of aged or immunocompromised, latent virus might reactivate and result in herpes zoster. Vaccination is the most effective way to prevent VZV infection, however, current live attenuated vaccine virus v-Oka strain retains its neurovirulence and might lead to significant security issue. Thus, an effective and safer vaccine is urgent needed. Efficient and accurate immunoassay system is important for development of new vaccine. VZV is a complex herpesvirus and has a 125 KB DNA genome, the genome includes 70 ORFs and 9 membrane proteins. VZV was identified long time ago, however, due to the complexity of the structure and immunogenic determinant of VZV, current immunoassays is complex, uncertain and low efficiency, which could not fulfill the demand of development and evaluation of new vaccine. Thus, the study focused on developing novel immunoassay system for VZV vaccine, aimed to develop methods to analyze the major protective antigens of vaccine and corresponding antibodies. Furthermore, the study characterized the functional domains of ORF7 protein, to support the development of novel VZV vaccine.

Membrane proteins are the major immunogenic antigen of VZV vaccine, the study sought to obtain a collection of monoclonal antibodies (mAbs) specific for these membrane proteins. The study obtained 8 membrane proteins using baculovirus and *E.coli* expression system. After immunization of mice with recombinant membrane proteins, cell-free virus and VZV gPs, the study obtained a collection of mAbs specific for 8 membrane proteins including gE, gB and gH. gE protein is one of most important protective antigen. The study established a double mAbs sandwich ELISA to quantitative determine the content of gE protein, the two mAbs (4A2/4H10) were selected from the collection of 70 anti-gE mAbs by several rounds of pairing

experiment. The established method is highly sensitive and specific, it could be used to monitor the antigenicity of vaccine rapidly. The content of gE protein showed a reasonably good correlation with virus titer in the experiment of virus growth kinetics and lyophilized vaccine monitoring. The quantitative ELISA may serve as a complementary method for titering, which could be used to improve the efficiency of vaccine preparation process.

The study have developed several novel immunoassays for VZV vaccine. The fluorescent-antibody-to-membrane-antigen (FAMA) assay was regarded as “gold standard” indication for immunity to varicella, however, this method is labor-intensive, low throughput and subjective. The assay could not fulfill the requirement of developing new VZV vaccine. In this study, neutralization test, blocking ELISA, capture ELISA, quantitative real-time PCR and pairing experiment were performed and a pair of mAbs was selected to establish a competitive ELISA. The capture mAb (8H6) is specific for tegument protein ORF9, while the labeling mAb (1B11) is specific for gE membrane protein. The established method could be used to qualitative determine neutralizing antibody in serum. In comparison to the FAMA test, the established method showed a sensitivity of 94.7%, a specificity of 99.77% and a coincidence rate of 97.19%. The established method would provide important support for seroepidemiology and novel vaccine development. Based on recombinant gE expressed by baculovirus expression system, this study established a double antigen sandwich ELISA to quantitative determine VZV-specific antibody in serum. In comparison to the FAMA test, the established double antigen sandwich ELISA showed a sensitivity of 95.08%, a specificity of 100% and a detection linearity interval of 11.25 mIU/mL to 360 mIU/mL. To evaluate VZV-specific cellular immunity in guinea pig, the study established double antibody sandwich ELISAs for quantitative evaluation of guinea pig TNF- $\alpha$  and IL-2, detection limit of assay for TNF- $\alpha$  was found to be 7.8 pg/mL, while detection limit of the assay for IL-2 was 0.39 pg/mL.

In previous study, we and collaborator found VZV ORF7 is a novel skin- and neuro-tropic factor, virus with ORF7 deleted is a novel live attenuated vaccine

candidate, however, understanding of the structure and functional domain of ORF7 is still limited. The study carried out research on characterization of functional domain of ORF7. This study found pORF7 could form dimer and polymer, this study used strategy of cysteine mutation, truncated protein expression to characterize the determinant of ORF7 polymer. The result showed the determinant of ORF7 polymer locates on the core region of ORF7 protein (35-167 aa), it is intermolecular interaction rather than disulfide bond facilitates the formation of polymer. Furthermore, this study constructed 7 recombinant Oka with ORF7 gene mutation or truncated using SW102-galK gene recombination system and analyzed the growth rate, skin- and neuro-tropism of these recombinant virus. The study found N terminal of ORF7 is important for skin- and neuro-tropism, growth rate, while formation of ORF7 polymer showed no significant relationship with these characteristics.

In conclusion, the study has established a novel immunoassays system for evaluation of VZV vaccine, characterized the functional domain of ORF7 that determine the skin- and neuro-tropism, these results will provide important support for further study on novel VZV vaccine.

**Keywords:** Varicella-zoster virus; Quality control; Serological evaluation; ELISA; Gene recombination system

## 缩 略 词

aa: amino acid, 氨基酸

AcMNPV: autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus, 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒

AP: alkaline phosphatase, 碱性磷酸酶

AmP: ampicillin, 氨苄青霉素

APC: antigen presenting cell, 抗原递呈细胞

ARPE: acute retinal pigment epithelial cell, 急性视网膜色素上皮细胞

AUS: upstream activating sequence, 上游激活序列

BAC: bacterial artificial chromosome, 细菌人工染色体

BCIP: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate, 5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐

Bp: base pair, 碱基对

CCR4: CC-chemokine receptor 4, CC类趋化因子受体4

CD: cluster of differentiation, 分化抗原簇

CHO: Chinese hamster ovary, 中国仓鼠卵巢癌细胞

CLA: cutaneous leukocyte antigen, 皮肤白细胞抗原

Cm: chloramphenicol, 氯霉素

CMV: cytomegalovirus, 巨细胞病毒

DNA: deoxyribonucleic acid, 脱氧核苷酸

DDT: dithiothreitol, 二硫苏糖醇

DOG: 2-deoxy-galactose, 2-脱氧-半乳糖

DRG: dorsal root ganglion, 背根神经节

DTT: dithiothreitol, 二硫苏糖醇

EBV: Epstein-Barr virus, 埃-巴二氏病毒 (EB病毒)

ED: enzyme diluent, 酶稀释液

EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid, 乙二胺四乙酸

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, 酶联免疫吸附测定



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.