

中文图书分类号: Q7

密 级: 公开

UDC: 577

学 校 代 码: 10005



# 硕 士 学 位 论 文

MASTERAL DISSERTATION

论 文 题 目: 基于人乳头瘤病毒 16 型 L2 的  
新型宫颈癌预防性疫苗研究

论 文 作 者: 郭艳涛

学 科: 生物物理学

指 导 教 师: 周玉柏副研究员

论文提交日期: 2013 年 6 月

UDC: 577  
中文图书分类号: Q7

学校代码: 10005  
学 号: S201015035  
密 级: 公开

# 北京工业大学理学硕士学位论文

题 目: 基于人乳头瘤病毒16型L2的新型宫颈癌预防  
性疫苗研究

---

英文题目: THE STUDY OF NOVEL CERVICAL  
CANCER PROPHYLACTIC VACCINES  
BASED ON HPV16 L2

---

论 文 作 者: 郭艳涛  
学 科 专 业: 生物物理学  
研 究 方 向: 免疫学与病毒学  
申 请 学 位: 理学硕士  
指 导 教 师: 周玉柏副研究员  
所 在 单 位: 生命科学与生物工程学院  
答 辩 日 期: 2013年6月  
授 予 学 位 单 位: 北京工业大学

## 独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研 究成果。尽我所知,除了文中特别加以标注和致谢的地方外,论文中不包含其 他 人已经发表或撰写过的研究成果也不包含为获得北京工业大学或其它教育机 构 的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献 均 已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

签名: 郭艳涛

日期: 2013年06月08日

## 关于论文使用授权的说明

本人完全了解北京工业大学有关保留、使用学位论文的规定,即:学校有权 保留送交论文的复印件,允许论文被查阅和借阅;学校可以公布论文的全部或部 分内容,可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

(保密的论文在解密后应遵守此规定)

签 名: 郭艳涛

日 期: 2013年06月 08 日

导师签名: 周玉柏

日 期: 2013年06月 08 日

## 摘 要

宫颈癌是发病率仅次于乳腺癌的第二大妇科恶性肿瘤。目前的治疗措施主要是根据癌症分期选择进行手术及放化疗，但治疗费用高，易复发。大量流行病学数据表明，高危型人乳头瘤病毒（Human papillomavirus, HPV）与宫颈癌的发生密切关系，是导致宫颈癌的主要病因。因此，通过研发疫苗预防 HPV 的早期感染可能是目前降低宫颈癌发病率较为经济有效的策略。

目前，在欧美上市的宫颈癌预防性疫苗是基于 HPV 主要衣壳蛋白 L1 的病毒样颗粒（Virus-Like Particles, VLPs）亚单位疫苗，可诱导机体产生型别特异性的中和抗体，不同型别之间鲜有交叉保护，但若通过增加价位来扩大疫苗保护范围则会增加疫苗的安全风险。近来的研究发现，HPV 次要衣壳蛋白 L2 的 N 端区域含有保守的共同表位，能够诱导产生具有交叉保护效力的中和抗体，是很有前景的新一代宫颈癌预防性疫苗。然而，HPV L2 N 段多肽免疫原性普遍偏低，这制约了该疫苗的进一步应用。

本课题将蛋白转导域多肽（Protein transduction domain, PTD）作为多肽佐剂与不同的 HPV L2 N 端多肽片段以融合或混合的方式结合构建了一系列重组蛋白疫苗；同时，我们还构建了表达 HPV L2 N 段或全长蛋白的重组腺病毒疫苗，并通过动物实验对重组蛋白疫苗和重组腺病毒疫苗的免疫效果进行了系统评价。结果如下：（1）间接 ELISA 结果显示，各重组蛋白疫苗均可诱导产生特异性抗体，抗体滴度与疫苗抗原大小呈正相关。（2）假病毒颗粒中和实验显示，PTD 与 HPV L2 N 端多肽构成的融合蛋白可以诱导产生较高滴度的交叉中和抗体，且可明显提高中和抗体在总抗体中的比例。（3）含 HPV L2 全长基因的重组腺病毒既可诱导产生具有交叉保护效力的中和抗体，又可刺激产生特异性细胞免疫应答。

综上，融合表达 PTD 可显著提高 L2 N 段多肽的免疫原性，其体液免疫增强效果与疫苗抗原大小呈正相关。L2 重组腺病毒疫苗可刺激较好的细胞免疫应答，两种形式的疫苗结合使用将可提供更全面的保护效力。

**关键词：**HPV L2；PTD；重组腺病毒；宫颈癌；疫苗

## Abstract

Cervical cancer is the second leading cancer among women, trailing only breast cancer in incidence. Currently, the expensive surgical procedure and chemoradiotherapy are the primary clinical measurements for cervical cancer according to the phase of the disease. However, the bulk of patients still suffer a relapse leading to eventually mortality. Extensive body of evidence established the link between the high-risk types of Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Some types of HPVs are considered as the major etiological agents of the disease. Therefore, using the vaccine to prevent HPV infections would be a more cost-effective strategy to reduce the incidence of cervical cancer.

Two prophylactic HPV vaccines based on HPV L1 Virus-Like Particles (VLPs) have been licensed recently and can effectively protect against the infections of related types of HPVs. However, the protection effects of L1 vaccines have virus-types specific and can not neutralize non-cognate HPV types. While, to broaden the spectrum of protection by adding valences would increase the risk of occurring undesirable side-effects. Current evidences have shown that HPV minor capsid L2 N terminal region contains conserved common epitopes capable of inducing cross-neutralizing antibodies against various non-cognate pseudovirions. However, its lower immunogenicity limits the further application.

In this study, we constructed a series of recombinant peptide vaccines with PTD fusing or mixing with L2 N terminal peptides and recombinant adenovirus vaccines which contain HPV16L2 N terminal sequence or full-length gene. Then the humoral and cellular immunity are systematically evaluated. The experimental results: (1) Indirect ELISA assays shew that the recombinant peptide vaccines could induce specific antibodies and antibodies levels were positively correlated with peptides' size. (2) The pseudovirus neutralization assays indicated that PTD fused with L2 peptides induced high-titer of cross-neutralizing antibodies, and considerably increased the proportion of the neutralizing antibodies in the specific total antibodies. (3) The rAd5-HPV16L2 recombinant adenovirus could induce special cross-neutralizing antibodies and strong HPV16L2 specific cellular immune response.

In summary, PTD fused with L2 N terminal peptides can considerably improve their immunogenicity, and its humoral enhanced effect was positively correlated with peptides' size. The rAd5-HPV16L2 recombinant adenovirus could induce strong HPV16L2 specific cellular immune response. Combined immunization using the two types of vaccines would elicit better protective effects.

**Keywords:** HPV16L2, PTD, recombinant adenovirus, cervical cancer, vaccine

## 主要英文缩写词

| 缩写词           | 英文名称   | 中文名称                   |
|---------------|--|------------------------|
| Adv           | Adenovirus   | 腺病毒                    |
| Amp           | Ampicillin   | 氨苄青霉素                  |
| bp            | Base pair  | 碱基对                    |
| Cm            | Chloramphenicol  | 氯霉素                    |
| CTL           | Cytotoxic t-lymphocyte                                       | 细胞毒性 T 淋巴细胞            |
| CPE           | Cytopathic effect  | 细胞病变效应                 |
| DMEM          | Dulbecco's modified eagle medium                             | Dulbecco 优化的 Eagle 培养基 |
| DMSO          | Dimethyl sulfoxide   | 二甲基亚砷                  |
| dNTP          | Deoxynucleoside triphosphate                                 | 三磷酸脱氧核苷                |
| EDTA          | Ethylene diamino tetrecetic acid                             | 乙二胺四乙酸                 |
| ELISPOT       | Enzyme-linked immunospot assaay                              | 酶联免疫斑点法                |
| FBS           | Fetal bovine serum   | 胎牛血清                   |
| HPV           | Human papillomavirus   | 人乳头瘤病毒                 |
| HRP           | Horseradish peroxidase                                       | 辣根过氧化物酶                |
| IFN- $\gamma$ | Interferon- $\gamma$   | $\gamma$ -干扰素          |
| kb            | Kilobases  | 千碱基对                   |
| kD            | Kilodaltons  | 千道尔顿                   |
| OD            | Optical density  | 光密度                    |
| PAGE          | Polyacrylamide gel electrophoresis                           | 聚丙烯酰胺凝胶电泳              |
| PBS           | Phosphate buffered saline                                    | 磷酸盐缓冲液                 |
| PCR           | Polymerase chain reaction                                    | 多聚酶链式反应                |
| polyA         | Polyadenylic acid  | 多聚腺苷酸                  |
| rAdv          | Recombinant adenovirus                                       | 重组腺病毒                  |
| RCA           | Replication competent adenoviruses                           | 复制型腺病毒                 |
| rpm           | Revolutions per minute                                       | 每分钟转速                  |
| SDS           | Sodium dodecyl sulfate                                       | 十二烷基磺酸钠                |
| SDS-<br>PAGE  | Sodium dedecyl sulfate<br>Polyacrylamide gel electrophoresis | 十二烷基磺酸钠—聚丙烯酰胺<br>凝胶电泳  |
| SEM           | Standard error of the mean                                   | 平均数的标准误差               |
| VLP           | Virus-like particles   | 病毒样颗粒                  |
| WB            | Western blot   | 蛋白印迹                   |

---

# 目 录

|  |     |
|--|-----|
| 摘要                                     | I   |
| <b>Abstract</b>                        | III |
| 主要英文缩写词                                | V   |
| <b>第 1 章 绪论</b>                        | 1   |
| 1.1 HPV16 L2 及其研究现状                    | 1   |
| 1.1.1 HPV 与宫颈癌                         | 1   |
| 1.1.2 基于 L2 的疫苗研究进展                    | 2   |
| 1.1.3 方向和展望                            | 3   |
| 1.2 蛋白转导域 (PTD) 的研究进展                  | 3   |
| 1.3 本课题研究内容                            | 4   |
| 1.4 本课题技术路线                            | 5   |
| <b>第 2 章 HPV16 L2 重组蛋白疫苗的构建</b>        | 7   |
| 2.1 实验材料                               | 7   |
| 2.1.1 质粒和菌株                            | 7   |
| 2.1.2 工具酶及主要试剂                         | 7   |
| 2.1.3 主要仪器设备                           | 7   |
| 2.1.4 引物                               | 8   |
| 2.2 实验方法                               | 8   |
| 2.2.1 重组 HPV16 L2 蛋白构建                 | 8   |
| 2.2.2 重组 HPV16 L2 蛋白表达                 | 10  |
| 2.2.3 重组 HPV16 L2 蛋白纯化                 | 10  |
| 2.3 实验结果和讨论                            | 12  |
| 2.3.1 PCR 扩增重组 HPV16 L2 基因片段的的结果       | 12  |
| 2.3.2 重组 HPV16 L2 质粒的酶切鉴定和测序结果         | 12  |
| 2.3.3 重组 HPV16 L2 蛋白表达条件优化结果           | 12  |
| 2.3.4 重组 HPV16 L2 蛋白纯化结果               | 14  |
| 2.4 本章小结                               | 16  |
| <b>第 3 章 含 HPV16 L2h 基因的重组腺病毒疫苗的构建</b> | 17  |
| 3.1 实验材料                               | 17  |
| 3.1.1 质粒、细胞和菌株                         | 17  |
| 3.1.2 工具酶及主要试剂                         | 17  |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.1.3 主要仪器设备.....                       | 17        |
| 3.1.4 引物.....                           | 18        |
| 3.2 实验方法.....                           | 18        |
| 3.2.1 重组穿梭质粒 pDC316 的构建.....            | 18        |
| 3.2.2 重组腺病毒的包装.....                     | 20        |
| 3.2.3 重组腺病毒的鉴定.....                     | 21        |
| 3.2.4 重组腺病毒疫苗的大量扩增和纯化.....              | 21        |
| 3.2.5 重组腺病毒的滴度测定.....                   | 22        |
| 3.3 实验结果和讨论.....                        | 22        |
| 3.3.1 PCR 扩增 HPV16L2h 基因片段的结果.....      | 22        |
| 3.3.2 重组质粒 pDC316 的酶切鉴定结果.....          | 22        |
| 3.3.3 重组腺病毒的 HPV16L2h 基因和复制缺陷型的鉴定.....  | 23        |
| 3.3.4 重组腺病毒表达 HPV16L2h 相关蛋白水平的检测.....   | 25        |
| 3.3.5 重组腺病毒的滴度测定结果.....                 | 25        |
| 3.4 本章小结.....                           | 26        |
| <b>第 4 章 重组蛋白疫苗和重组腺病毒疫苗免疫效果的研究.....</b> | <b>27</b> |
| 4.1 实验材料.....                           | 27        |
| 4.1.1 细胞和疫苗.....                        | 27        |
| 4.1.2 主要试剂.....                         | 27        |
| 4.1.3 主要仪器设备.....                       | 27        |
| 4.1.4 实验动物.....                         | 28        |
| 4.2 实验方法.....                           | 28        |
| 4.2.1 免疫小鼠.....                         | 28        |
| 4.2.2 ELISA 和假病毒中和滴定检测体液免疫.....         | 29        |
| 4.2.3 ELISPOT 检测细胞免疫反应.....             | 30        |
| 4.3 实验结果和讨论.....                        | 32        |
| 4.3.1 体液免疫结果.....                       | 32        |
| 4.3.2 T 细胞表位肽预测结果.....                  | 35        |
| 4.3.3 细胞免疫结果.....                       | 35        |
| 4.4 本章小结.....                           | 37        |
| 结论.....                                 | 39        |
| 参考文献.....                               | 41        |
| 攻读硕士学位期间所申请的发明专利.....                   | 45        |
| 致谢.....                                 | 47        |



## 第 1 章 绪论

### 1.1 HPV16 L2 及其研究现状

#### 1.1.1 HPV与宫颈癌

人乳头瘤病毒（human papillomavirus, HPV）属乳多空病毒科的乳头瘤空泡病毒A属，是55nm大小的无包膜的双链DNA病毒。病毒基因组约8 000bp，分为功能不同的三个区，早期区（early region; E）、长控制区（long control region, LCR）和晚期区（late region; L）<sup>[1-3]</sup>。早期区约4 500bp，由6个开放读码框组成，其编码的相应早期蛋白主要参与病毒的DNA复制、转录和细胞转化等相关过程<sup>[4]</sup>。其中E1编码蛋白参与病毒DNA的复制起始位点和细胞DNA聚合酶特异性结合过程<sup>[5]</sup>；E2编码蛋白除了可以促进E1与病毒DNA的复制起始位点的结合，同时还参与抑制E6和E7基因的表达的相关过程<sup>[6]</sup>；E4编码蛋白主要参与调节病毒的复制和成熟过程，具有破坏宿主细胞构架的作用<sup>[7]</sup>；E5编码蛋白参与阻止感染人乳头瘤病毒的细胞凋亡过程<sup>[8]</sup>；E6编码蛋白通过与E6AP和PDZ蛋白家族成员的相互作用分别导致P53和PDZ蛋白的降解及增强端粒酶的活性最终导致细胞的癌变<sup>[9]</sup>；E7与Rb蛋白的相互作用，引起细胞周期的失控，最终导致上皮细胞的过度增殖而恶变<sup>[10]</sup>。介于L1和E6之间的长控制区约1 000bp，又称为上游调控（URR）或非编码区（NCR），含有包括启动子等在内的多个顺式作用元件，主要参与病毒复制、基因转录的相关调节过程<sup>[11]</sup>。晚期区（late region; L）约2 500bp，编码病毒的结构蛋白---主要衣壳蛋白L1和次要衣壳蛋白L2<sup>[12]</sup>。

1974年Zur Hausen首次在宫颈癌组织标本中检测到HPV DNA，并提出HPV感染可能与宫颈癌的发生密切相关<sup>[13]</sup>。大量流行病学资料显示，99.7%以上的宫颈癌活检标本中HPV的DNA检测呈阳性，证实了HPV感染与宫颈癌的发生和发展密切相关的假设<sup>[14]</sup>。根据HPV致癌性的高低可将HPV分为低危型和高危型两大类。其中低危型包括HPV6、11、40、42、43、44、54、61、72、81，研究认为低危型HPV的感染通常不会导致细胞的恶性病变，主要引起外生殖器尖锐湿疣、扁平疣和低度鳞状上皮内瘤变；高危型包括HPV16、18、26、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82，除可引起生殖器疣病外，主要是引起高度鳞状上皮内瘤变和宫颈癌的发生<sup>[15]</sup>，尤其是 HPV16、18、31 和 45 型，高达 80%的宫颈癌由这几种基因型引起<sup>[16]</sup>。

当前治疗性疫苗主要是基于早期基因编码的蛋白，如E6、E7，而宫颈癌预

防性疫苗主要是应用基因工程技术开发多价的HPV L1病毒样颗粒（Virus-Like Particles, VLPs）疫苗<sup>[17]</sup>。目前，治疗性HPV疫苗主要有重组载体疫苗、多肽和蛋白疫苗、树突细胞和DNA疫苗等类型，大多还处于临床研究阶段，同时，由于HPV E6和E7等是主要的致癌蛋白，用其作为疫苗存在潜在的致癌风险，因此基于E6、E7的宫颈癌治疗性疫苗研发受到了严重制约。而预防性疫苗方面，由美国默克公司研发的四价疫苗（HPV6/11/16/18/）及英国葛兰素公司开发的二价疫苗（HPV16/18）已经在欧美多国批准上市，上述两种疫苗均可诱导机体产生高滴度的血清中和抗体<sup>[19]</sup>。然而，L1 VLP疫苗诱导的中和抗体具有型别特异性，不同基因型的L1 VLP疫苗之间没有或仅有微弱的交叉保护。因此，这些预防性疫苗的保护范围十分局限。近来研究发现，不同型别的HPV次要衣壳蛋白（HPV L2）的N端具有一些保守的共同表位能够诱导产生针对不同HPV型别的交叉中和抗体。因此，HPV L2疫苗是目前宫颈癌预防性疫苗研究的新热点。

### 1.1.2 基于L2的疫苗研究进展

HPV次要衣壳蛋白（minor capsid protein）L2的编码基因位于晚期区，其与HPV主要衣壳蛋白（major capsid protein）L1组成病毒的蛋白衣壳，研究表明L2肽段的N端有一段富含带正电荷的氨基酸区域，该区域可以和带负电荷的HPV DNA非特异结合，促进HPV DNA的包装从而提高了病毒的包装效率<sup>[20]</sup>。除了参与病毒的包装过程，研究结果还显示L2在病毒感染过程中也发挥着重要作用，L2蛋白与靶细胞相应受体结合诱导了靶细胞内吞作用，从而使病毒颗粒进入靶细胞，病毒颗粒进入靶细胞后在低pH条件下蛋白衣壳解离释放出L2-HPV DNA复合体，该复合体中的L2蛋白N-端氨基酸表位与Syntaxin-18受体结合，受体将L2-HPV DNA复合体转运至细胞核内，从而促进病毒颗粒的核定位<sup>[21]</sup>。同时研究发现，L2蛋白的氨基酸序列高度保守，可以在临床常见的HPV各型别间产生广泛的交叉反应，同时这些保守的共同表位多为线性的，因此，相比于L1 VLP而言L2疫苗的生产成本较为低廉<sup>[22-24]</sup>。

虽然L2的N端多肽片段可诱导产生交叉中和抗体，但相比L1 VLPs疫苗，L2疫苗诱导产生的中和抗体滴度偏低，这制约了该疫苗的进一步应用。因此，提高L2N端多肽片段免疫原性是决定此类疫苗能否进入实用化阶段的重要因素。国内外对此进行了大量研究，并取得了一定的进展。Ivonne R等将HPV16 L2交叉中和表位重复串联插入到大肠杆菌硫氧还蛋白（Trx），小鼠免疫结果显示，免疫小鼠的血清中产生了较高滴度的交叉中和抗体，可有效中和HPV16、18、58、45和31假病毒颗粒<sup>[25]</sup>。Kondo等发现HPV16 L2含有多个中和抗原表位，对不同型别的HPV具有不同的中和效力，比如抗血清（抗-P18/38）可以中和

HPV18型假病毒；抗血清（抗-P56/75）可以中和HPV18，31和45型假病毒；抗血清（抗-P61/75）和抗血清（抗-P64/81）可以中和HPV18和58型假病毒；抗血清（抗-P96/115）可以中和HPV31和58型假病毒<sup>[26]</sup>。同时研究还发现3种抗体的混合物所产生的交叉中和作用强于单独使用一种抗体。Palmer选用重组烟草花叶病毒（recombinant tobacco mosaic virus, rTMV）作为载体展示L2的中和表位，免疫结果显示血清中的交叉中和抗体滴度得到了显著性的提升<sup>[27]</sup>。Alphs通过将L2肽段与Toll样受体2（Toll-like receptor-2 TLR2）的配体相偶联从而提高了L2肽段的免疫原性<sup>[28]</sup>。

### 1.1.3 方向和展望

从目前的研究资料可知，人们在提升L2肽段免疫原性上做了很多努力并且得到了一定的研究进展。但是，相比于已经上市两种L1 VLPs疫苗，L2疫苗诱导产生的中和抗体滴度还达不到相应的要求，此外，L2疫苗诱导产生交叉中和抗体滴度也不是很高导致交叉保护效力依旧偏低。在前人的基础之上，提高HPV L2肽段免疫原性仍然需要新的思路。

## 1.2 蛋白转导域（PTD）的研究进展

1988年，Green和Frankel首次发现HIV-1（1型人类免疫缺陷病毒）的反式激活蛋白（transactivator protein, Tat）能主动穿过细胞膜进入细胞内部<sup>[29-30]</sup>。1994年，Fawell进一步研究发现，Tat可将其共价结合的异源蛋白转移到细胞内<sup>[31]</sup>。1997年，Vives发现，Tat蛋白的一个富含碱性氨基酸的多肽片段与蛋白转导功能相关并将其命名为蛋白转导域（Protein transduction domain, PTD）。迄今为止，人们已经发现了很多蛋白转导域，其中只有三个具有高效的转导能力，它们分别来自于HIV-1 Tat、果蝇同源异型转录因子ANTP和单纯疱疹病毒1型（HSV1）VP22转录因子<sup>[32-34]</sup>。Tat PTD是一个富含碱性氨基酸的多肽，长度大约在9~11氨基酸，该片段能将与之连接的多肽、蛋白质及DNA高效快速地导入细胞内<sup>[35]</sup>，同时Tat PTD不含有HIV的功能不会诱导靶细胞产生病变<sup>[36]</sup>，因此其应用价值在医学研究领域已受到广泛关注。

目前，关于Tat PTD的转导机制尚不明确。研究发现，不同的PTD都富含精氨酸和赖氨酸，这些带有强正电荷的碱性氨基酸，可能直接与带负电荷的细胞膜通过静电吸引直接结合，从而引发相应穿膜过程<sup>[37]</sup>。但是，直接用多聚精氨酸做为转导肽替代物时，转导能力却随着多聚精氨酸延长而呈现出一种先增强后减弱的趋势，这个结果一定程度上推翻了前面静电吸引的假说<sup>[38]</sup>。人们又提

出了多位点结合模式的假说，该假说认为载脂蛋白和胆固醇在转导过程中扮演了重要角色，但是还是缺乏具有说服力的实验数据<sup>[39]</sup>。此外，有研究表明转导过程与细胞表面表达的粘多糖有关系<sup>[40]</sup>。但是，这些假说具体的机理还是无法用实验来验证，因此，Tat PTD的转导机制仍需进一步研究。

虽然转导机制尚不清楚，Tat PTD转导能力的应用效果已经得到了许多研究的验证。陈晓华等研究表明，PTD-HBcAg的融合蛋白可以提高细胞的免疫反应和体液免疫反应，从而诱发强大的特异性CTL活性和提升HBV转基因小鼠的治疗作用<sup>[41]</sup>。Tat PTD的转导不依赖于受体、通道、能量及胞吞作用也得到了相关实验的验证<sup>[42-43]</sup>。相比于传统蛋白转导方法如脂质体法，Tat PTD的蛋白转导有其显著的优越性，在医学界其应用价值已经得到了公认，但在应用过程中Tat PTD仍然存在诸多亟待解决的问题，首先是Tat PTD的半衰期还无法确定，虽然转导过程中PTD需要量很少，但残留的多余PTD在体内的残留时间和残留的PTD对细胞的是否有影响都需要进一步的探讨。其次是Tat PTD在细胞内的定位还不是很明确，目前相关的文献报道还没有明确当PTD携带药物进入细胞内后不同的定位是否对细胞产生不良影响。再次是Tat PTD的自身免疫原性，PTD相对于人体细胞而言是一种外来的抗原，在其进入细胞后是否引起相应免疫应答，在哪一步产生免疫应答还需要进一步的实验来验证。总之，Tat PTD的应用在以后的医学研究中会产生重大的意义的，但是我们在应用这一新技术前应该将安全问题放在首位。

### 1.3 本课题研究内容

本课题研究内容主要分为以下两个部分：

第一，通过分子生物学、细胞生物学等方法分别构建PTD与HPV16L2 N端片段融合或混合形式的重组蛋白疫苗和含有密码子优化型HPV16L2 N端片段及全长基因（HPV16L2h）的重组腺病毒疫苗。

第二，用上述L2疫苗免疫小鼠，通过ELISA、假病毒颗粒中和实验以及酶联免疫斑点法（ELISPOT）检测相应疫苗的特异性体液及细胞免疫效果。

### 1.4 本课题技术路线

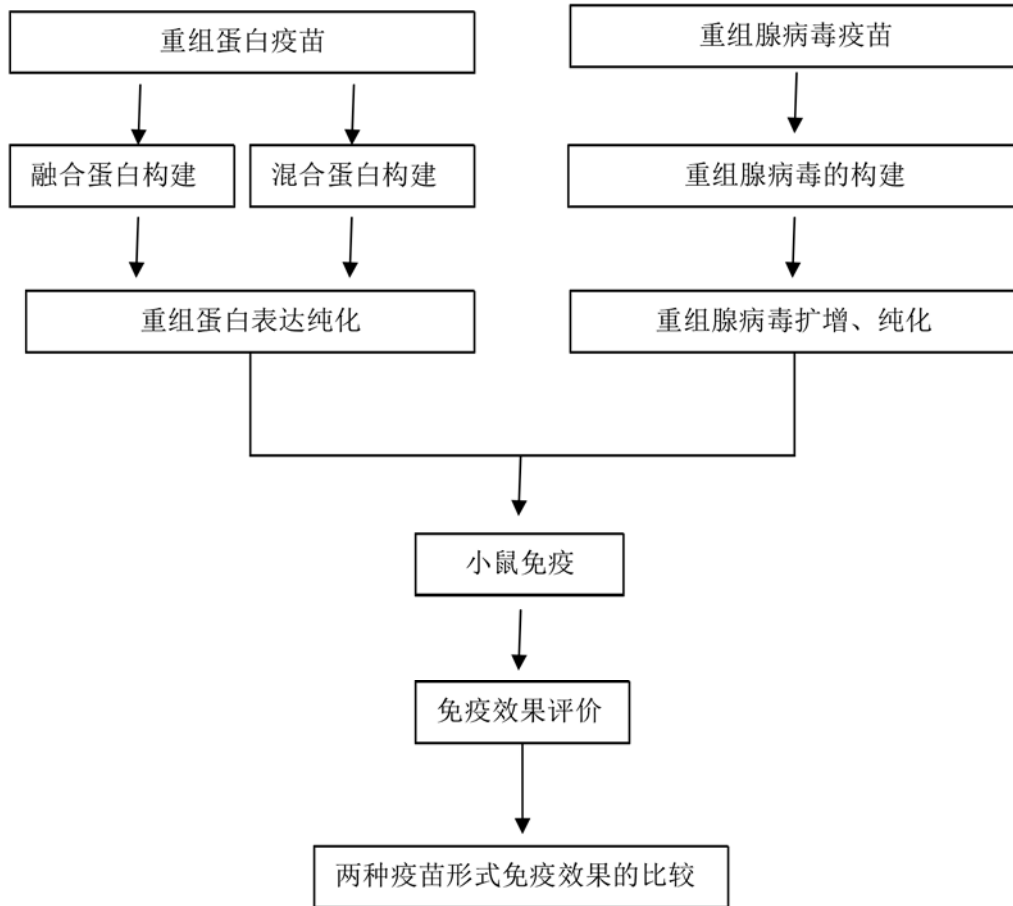


图 1-1 本课题研究的技术路线  
Figure1-1 Road map of this study



## 第 2 章 HPV16 L2 重组蛋白疫苗的构建

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 质粒和菌株

大肠杆菌DH5 $\alpha$  购于自天根生化科技（北京）有限公司, 大肠杆菌ROSETTA（DE3）购自北京鹏林生物技术有限公司。含pET-22b、pUC-HPV16L2质粒的甘油菌由本课题组保存。

#### 2.1.2 工具酶及主要试剂

限制性内切酶*Xho* I和*Nde* I购自于 NewEngland Biology公司, T4 DNA连接酶和DNA A-Tailing Kit购自宝生物工程（大连）有限公司, DNA Marker购自北京博迈德科技发展有限公司。普通DNA纯化试剂盒、pfuDNA聚合酶、dNTP、质粒DNA小提试剂盒均购自天根生化科技（北京）有限公司。琼脂糖凝胶回收试剂盒购自杭州博日科技有限公司。预染蛋白Marker 购自Fermentas公司。小鼠抗 HPV16 L2单抗购自于Abcam公司。羊抗小鼠IgG 抗体（Anti-MOUSE IgG（H&L）（GOAT）Antibody IRDye700DX）购自于Rockland 公司。BCA蛋白定量试剂盒购自普莱利基因技术有限公司。其它分析纯试剂由本实验室提供。

#### 2.1.3 主要仪器设备

| 仪器名称                  | 厂家                |
|-----------------------|-------------------|
| 台式高速冷冻离心机             | Thermo 公司         |
| 高速冷冻离心机（Avanti-J25）   | 贝克曼库尔特商贸（中国）有限公司  |
| 台式微型离心机               | Eppendorf 公司      |
| 恒温水浴锅（HX-1050 型）      | 北京博医康实验仪器         |
| 金属浴                   | Thermo 公司         |
| 恒温摇床（DDH2-300 型）      | 江苏太仓市实验设备厂        |
| 恒温培养箱（DHP-9052 型）     | 上海一恒科技有限公司        |
| 凝胶成像系统（4400 型）        | Alpha Innotech 公司 |
| DNA 电泳仪及电泳槽（DYCP-31C） | 北京市六一仪器厂          |
| 蛋白电泳仪（PowerPac 3000）  | Bio-Rad 公司        |

|                               |                       |
|-------------------------------|-----------------------|
| 半干式碳板转印槽、垂直电泳槽                | Bio-Rad 公司            |
| 微量移液器                         | Eppendorf 公司          |
| PCR 仪 ( 2720 thermal cycler ) | Applied biosystems    |
| Odssey 远红外影像分析仪               | LI-COR Biosciences 公司 |
| 超净工作台 (WT-1ND 型)              | 北京王堂蓝翼科技有限公司          |
| 高压细胞破碎仪 (APV-2000)            | Apv (中国) 有限公司         |
| 纯化仪 (纯化柱 (HisTrap FF))        | GE 公司                 |
| 恒温磁力搅拌器 (X85-2)               | 上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司       |
| 透明门立式冷藏柜 (SC-329GB)           | 青岛海尔特种电冰柜有限公司         |
| 低温冰箱                          | Thermo 公司             |

#### 2.1.4 引物

实验所需引物由上海英骏生物技术有限公司合成, 序列如下:

F-L2-1: 5'-ACTCTACATATGCGACACAAACGTTCTGC-3'

R-88: 5'-TAGACTCGAGAGGAGCAAGTGTATCTGTAG-3'

R-88-PTD-1: 5'-ATTACGCCGCACGCGCATAAGGAGCAAGTGTATCT-3'

R-88-PTD-2: 5'-ATTACTCGAGCGCACGCGCCTGACGCGCCGCCGCACG  
CGCAT AAG-3'

R-200: 5'-TAATCTCGAGTGTATCCATAGGAATTTCTT-3'

R-200-PTD-1: 5'-ATTACGCCGCACGCGCATATGTATCCATAGGAATT-3'

R-200-PTD-2: 5'-TTACTCGAGCGCACGCGCCTGACGCGCCGCCGCACGC  
GCAT ATG-3'

R-L2-1: 5'-TACGCTTCATAGGCAGGATTATCATAGGT-3'

F-L2-2: 5'-CCGCTACCTATGATAATCCTGCCTATGAAG-3'

R-L2-2: 5'-TTAACTCGAGCTAGGCAGCCAAAGAGACAT-3'

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 重组 HPV16 L2蛋白构建

2.2.1.1 PCR分别扩增重组HPV16 L2基因片段 以含HPV16 L2基因的pUC-HPV16 L2为模板, PCR扩增HPV16 L2基因片段。PCR反应体系如下:

|               |             |
|---------------|-------------|
| 模板pUC-HPV16L2 | 0.5 $\mu$ L |
| 上游引物          | 1 $\mu$ L   |



|                                 |             |
|---------------------------------|-------------|
| 下游引物                            | 1 $\mu$ L   |
| 10 $\times$ Pfu Reaction Buffer | 5 $\mu$ L   |
| dNTP                            | 4 $\mu$ L   |
| ddH <sub>2</sub> O(双蒸水)         | 35 $\mu$ L  |
| Pfu DNA 聚合酶                     | 1 $\mu$ L   |
| DMSO                            | 2.5 $\mu$ L |

PCR 参数设置为：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min，94 $^{\circ}$ C 30 s，58 $^{\circ}$ C 1 min，72 $^{\circ}$ C 2 min（扩增 L2 N 端 1-88 和 1-200 的多肽片段时的延伸时间为 1 min），25 cycles，72 $^{\circ}$ C 5 min。

不同 L2 片段 PCR 扩增所用引物如下：

| 蛋白名称            | 上游引物          | 下游引物                    |
|-----------------|---------------|-------------------------|
| HPV16L2-88      | F-L2-1        | R-88                    |
| PTD-HPV16L2-88  | F-L2-1        | R-88-PTD-1、R-88-PTD-2   |
| HPV16L2-200     | F-L2-1        | R-200                   |
| PTD-HPV16L2-200 | F-L2-1        | R-200-PTD-1、R-200-PTD-2 |
| HPV16L2         | F-L2-1、F-L2-2 | R-L2-1、R-L2-2           |

其中，蛋白 HPV16L2-88 和 HPV16L2-200 的基因通过一步 PCR 的方法就可以获得；蛋白 PTD-HPV16L2-88 和 PTD-HPV16L2-200 的基因通过两步 PCR 的方法获得，第一步利用上游引物和第一段下游引物扩增得到在相应长度 L2 基因 C 端偶联部分 PTD 基因的 DNA 片段，第二步利用上游引物和第二段下游引物扩增得到在相应长度 L2 基因 C 端偶联全部 PTD 基因的 DNA 片段，第二段下游引物含有 PTD 的全部基因；蛋白 HPV16L2 的基因中有两个密码子需要突变，因此需要两步 PCR 的方法获得其基因，第一步分别利用引物 F-L2-1 配对 R-L2-1 和引物 F-L2-2 配对 R-L2-2 获得两段位点突变的 HPV16L2 部分基因，第二步是上步两段部分基因为模板利用引物 F-L2-1 配对 R-L2-2 扩增获得两个基因位点突变的 HPV16L2 全长基因。

PCR 反应产物进行凝胶核酸电泳检测。检测正确后利用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物。

2.2.1.2 重组 HPV16 L2 基因片段与 T 载体的连接 分别将 PCR 扩增得到的 HPV16 L2 基因片段连接到 pMD18-T 载体上用以保存 PCR 产物并确保较高的酶切效率。第一步利用 DNA A-Tailing Kit 在 PCR 产物 3' 末端加 A。按说明书取 20  $\mu$ L PCR 产物，加入 10 $\times$ A-Tailing Buffer 5  $\mu$ L，dNTP 4  $\mu$ L，A-Tailing Enzyme 0.5  $\mu$ L，补 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu$ L，置于金属浴 72  $^{\circ}$ C 反应 20 min，然后冰上静置 2 min。然后取 4  $\mu$ L 上述 3' 末端加 A 的 PCR 产物，加入 pMD18-T Vector 1  $\mu$ L，然后加入 5  $\mu$ L Solution

I, 16°C反应2 h。

2.2.1.3 T载体连接产物的转化 将2.2.1.2全部的连接产物(10 μL)加入至20 μL DH5α感受态细胞中,冰中静置30 min。金属浴42°C热激90 s,冰中静置2 min。然后加入500 μL LB培养基,150 r/min 37°C振荡培养45 min。12 000 r/min离心1 min,弃去大部分上清剩余约100 μL的上清,重悬已转化好的感受态细胞,用涂布棒将重悬液均匀涂到含有X-Gal、IPTG、Amp的LB琼脂平板培养基上。平板上液体被吸收后倒置于37°C恒温箱培养12~16 h。

2.2.1.4 小提并双酶切重组T载体和pET-22b质粒 挑取筛选平板上的白色单菌落,接种到3 mL Amp抗性的LB培养基中,190 r/min 37°C振荡培养过夜。按小提试剂盒说明书步骤小提质粒,然后使用限制性内切酶*Xho* I和*Nde* I对重组T载体和pET-22b质粒双酶切。酶切体系为:质粒30 μL, NEBuffer 2 5 μL, *Xho* I和*Nde* I各1 μL, BSA 0.5 μL, 补ddH<sub>2</sub>O至50 μL, 37°C水浴酶切3 h。酶切产物加入5.5 μL 10×DNA loading buffer,混匀,1%琼脂糖凝胶110 V恒压水平电泳。切取含有目的条带的琼脂糖凝胶,使用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的DNA。然后取1 μL回收的产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

2.2.1.5 HPV16 L2片段和pET-22b质粒的连接 适量的2.2.1.4中酶切回收的HPV16 L2片段和pET-22b质粒,依次加入10×T4 Ligase buffer 2 μL, T4连接酶1 μL, 补H<sub>2</sub>O至20 μL, 16°C连接3 h。

2.2.1.6 连接产物的转化 将2.2.1.5的连接产物(20 μL)加入至20 μL DH5α感受态细胞中,冰中静置30 min,金属浴42°C热激90 s,再在冰中静置2 min,加入500 μL LB培养基,150 r/min 37°C振荡培养45 min。12 000 r/min离心1 min,弃去部分上清剩余大约100 μL的上清,重悬已完成转化的感受态细胞,用涂布棒将重悬液均匀涂到含有Amp的LB琼脂平板培养基上。待平板上液体被吸收后倒置于37°C恒温箱培养12~16 h。

2.2.1.7 小提并鉴定重组质粒 分别挑取平板上的单菌落接种到3 mL Amp抗性的LB培养基中,190 r/min 37°C振荡培养过夜。按小提试剂盒说明书步骤小提质粒,然后使用限制性内切酶*Xho* I和*Nde* I对重组pET-22b质粒进行双酶切鉴定。鉴定正确后送北京华大基因测序。测序结果正确的重组pET-22b质粒分别命名为p-HPV16L2-88、p-PTD-HPV16L2-88、p-HPV16L2-200、p-PTD-HPV16L2-200、p-HPV16L2。

## 2.2.2 重组HPV16L2蛋白表达

2.2.2.1 重组质粒的转化 将2.2.1.7测序正确的重组质粒(10 μL)分别加入至20 μL ROSETTA (DE3) 表达细胞中,冰中静置30 min,金属浴42°C热激90 s,再在

冰中静置2 min, 加入500  $\mu$ L LB 培养基, 150 r/min 37 $^{\circ}$ C 振荡培养45 min。12 000 r/min离心1 min, 弃去大部分上清剩余大约100  $\mu$ L的上清, 重悬已完成转化的感受态细胞, 用涂布棒将重悬液均匀涂到含有Cm、Amp的LB琼脂平板培养基上。待平板上液体被吸收后倒置于37 $^{\circ}$ C恒温箱培养12~16 h。

**2.2.2.2 重组蛋白的表达条件的优化** 分别挑取平板上的单菌落接种到3 mL Cm、Amp抗性的LB培养基中, 190 r/min 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。取850  $\mu$ L过夜培养物加入150  $\mu$ L的灭菌后的100%甘油, 混匀后放到-75 $^{\circ}$ C冰箱保存菌种, 分别命名为r-HPV16L2-88、r-PTD-HPV16L2-88、r-HPV16L2-200、r-PTD-HPV16L2-200、r-HPV16L2。将剩余的过夜培养物分别平均分为5等份分别接入10 ml Cm、Amp抗性的LB培养液中, 进行最佳表达时间和最佳诱导物浓度的筛选, 190 r/min 37 $^{\circ}$ C 振荡2~3 h以上, 至OD<sub>600</sub>=0.6-1.0。分别在5等份中加入0.000 ml、0.001 ml、0.005 ml、0.010 ml、0.050 ml IPTG (1 M/L) 至终浓度0 mM、0.1 mM、0.5 mM、1 mM、5 mM, 190 r/min 37 $^{\circ}$ C 诱导表达6 h, 每1 h取0.5 ml菌液作为样品。表达完后, 将所取样品12 000 r/min离心1 min, 弃去上清, 细胞沉淀用上样缓冲液重悬后进行SDS-PAGE检测, 确定最佳的诱导表达条件。

**2.2.2.3 重组蛋白的大量表达** 取5种重组蛋白的冻存甘油菌在含有Cm、Amp的LB琼脂平板培养基上划线, 倒置于37 $^{\circ}$ C恒温箱培养12~16 h。分别挑取平板上的单菌落接种到50 mL Cm、Amp 抗性的LB培养基中, 190 r/min 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。将过夜培养物分别接入5 000 ml Cm、Amp抗性的LB培养液中, 190 r/min 37 $^{\circ}$ C 振荡培养2~3 h, 至OD<sub>600</sub>=0.6~1.0。分别加5 ml IPTG (1M/L) 诱导表达3 h, 表达完后6 000 r/min 4 $^{\circ}$ C离心30 min, 弃去上清, 细胞沉淀冻存于-80 $^{\circ}$ C备用。

### 2.2.3 重组HPV16L2蛋白纯化

**2.2.3.1 细胞破碎** 按1 g 细胞沉淀溶解于10 ml 结合缓冲液(20 mM Tris, 500 mM NaCl, 20m M 咪唑, 8 M 尿素, pH8.0) 的比例进行重悬, 重悬液置冰水浴中备用。首先使用超纯水清洗高压均质仪去除残留的乙醇, 随后加入适量的结合缓冲液对系统管路进行润洗。倒入预冷好的细胞重悬液, 以1 100bar左右压力破碎菌体。破碎过程重复两次。随后将菌体破碎液置7 000 r/min 4 $^{\circ}$ C离心25 min, 收集上清进行后续纯化。

**2.2.3.2 蛋白纯化** 按以下步骤进行纯化, 每一步纯化过程都要收集样品进行SDS-PAGE 鉴定:

1、用5个柱床体积的超纯水淋洗纯化柱(HisTrap FF), 去除20%的乙醇, 流速为5 ml/min。

- 2、用 5 个柱床体积的洗脱液淋洗纯化柱，流速为 5 ml/min。
- 3、用 20 个柱床体积的结合缓冲液平衡纯化柱，流速为 5 ml/min。
- 4、破碎离心后收集的上清液上样，流速为 1 ml/min。
- 5、用结合缓冲液淋洗纯化柱，流速为 5 ml/min，直到吸收曲线稳定在基线，一般至少 5 个柱床体积。
- 6、用 10 个柱床体积的洗脱缓冲液（20 mM Tris，500 mM NaCl，500 mM 咪唑，8 M 尿素，pH8.0）进行线性梯度，收集洗脱峰即为目的蛋白，流速为 1 ml/min。

2.2.3.3 蛋白透析 经过纯化的蛋白溶液中含有高浓度的尿素需要经过透析以降低尿素在溶液当中的浓度。透析袋用超纯水沸水煮 10 min，再用超纯水洗净，将纯化后的蛋白溶液装入到处理好的透析袋当中，放到含有 5 L PBS 的大烧杯中，再将大烧杯放到层析柜中的磁力搅拌器上，4℃搅拌透析过夜。第二天早晨换液，中午再换液，透析三次。透析完成后回收透析袋中的溶液，12 000 r/min 离心 1 min，将上清液分装到无菌的 EP 管中，-75℃保存。

## 2.3 实验结果和讨论

### 2.3.1 PCR扩增重组HPV16L2基因片段的结果

以含HPV16L2基因的pUC-HPV16L2为模板，以相应成对的引物为上、下游引物进行PCR反应，应该得到大小约为264、600、1 422 bp 三种不同大小重组DNA片段，实验结果如图 2-1所示，与预期一致。

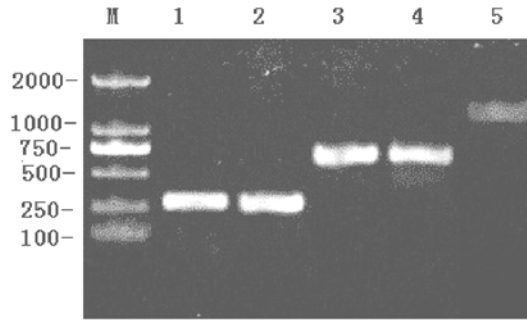
### 2.3.2 重组HPV16L2质粒的酶切鉴定和测序结果

使用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Nde* I 对重组HPV16L2质粒进行双酶切，双酶切分别得到大小约为264、600、1 422 bp 的小片段和约5 400 bp 的大片段，实验结果如图 2-2所示，与预期一致。双酶切鉴定正确后的质粒送华大公司进行测序，测序结果表明不同的重组HPV16L2基因片段正确地插入到了质粒pET-22b中。

### 2.3.3 重组HPV16L2蛋白表达条件优化结果

将验证正确的重组p-HPV16L2-200质粒分别转化进大肠杆菌表达细胞进行蛋白表达。蛋白表达量的多少主要由表达细胞、诱导表达时间和诱导物浓度三项条件决定，分别对这三个条件优化，蛋白表达完成后使用SDS-PAGE对表达效果进行鉴定，结果如下图 2-3、2-4和2-5所示，目的重组蛋白的大小大约为34 kD。结果说明重组蛋白的最佳表达条件是：使用大肠杆菌ROSETTA

(DE3) 表达细胞在 1 mM 的 IPTG 条件下诱导表达 3 h 可以达到最优的表达效果。



M. DNA Marker 2000 1. HPV16L2-88 2. PTD-HPV16L2-88 3. HPV16L2-200  
4. PTD-HPV16L2-200 5. PTD-HPV16L2

图 2-1 PCR 扩增 重组HPV16L2基因片段

Figure 2-1 Amplification of HPV16L2 by PCR

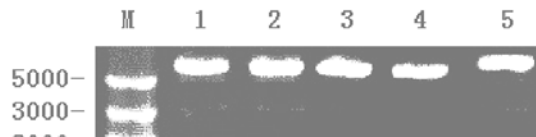


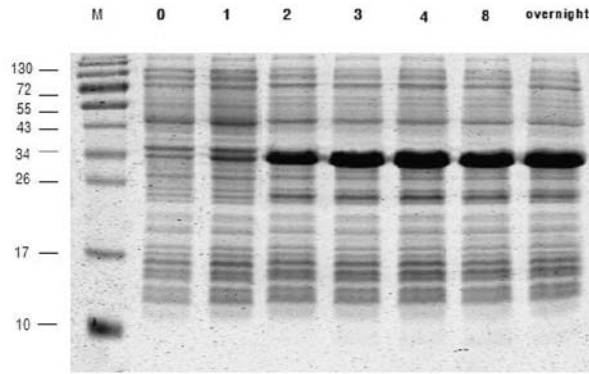
图2-3 重组HPV16L2蛋白表达系统优化

Figure 2-3 Expression cell optimization of recombinant HPV16L2 protein by SDS-PAGE.

密 级：公开  
UDC：577  
学 校 代 码：10005



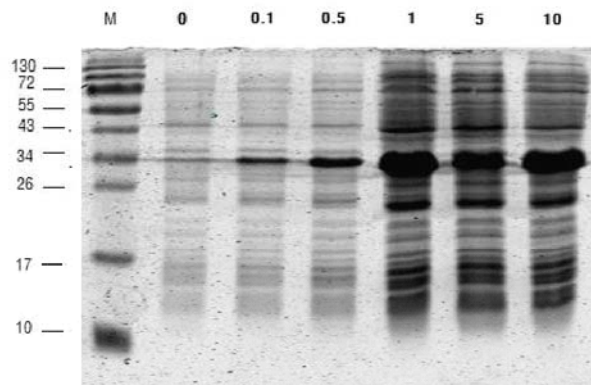
硕士学位论文  
MASTERAL DISSERTATION



M. 预染蛋白 Marker 2. 0、1、2、3、4、8、overnight 诱导表达时间

图 2-4 重组HPV16L2蛋白表达时间优化

Figure 2-4 Time optimization of recombinant HPV16L2 protein expression by SDS-PAGE.



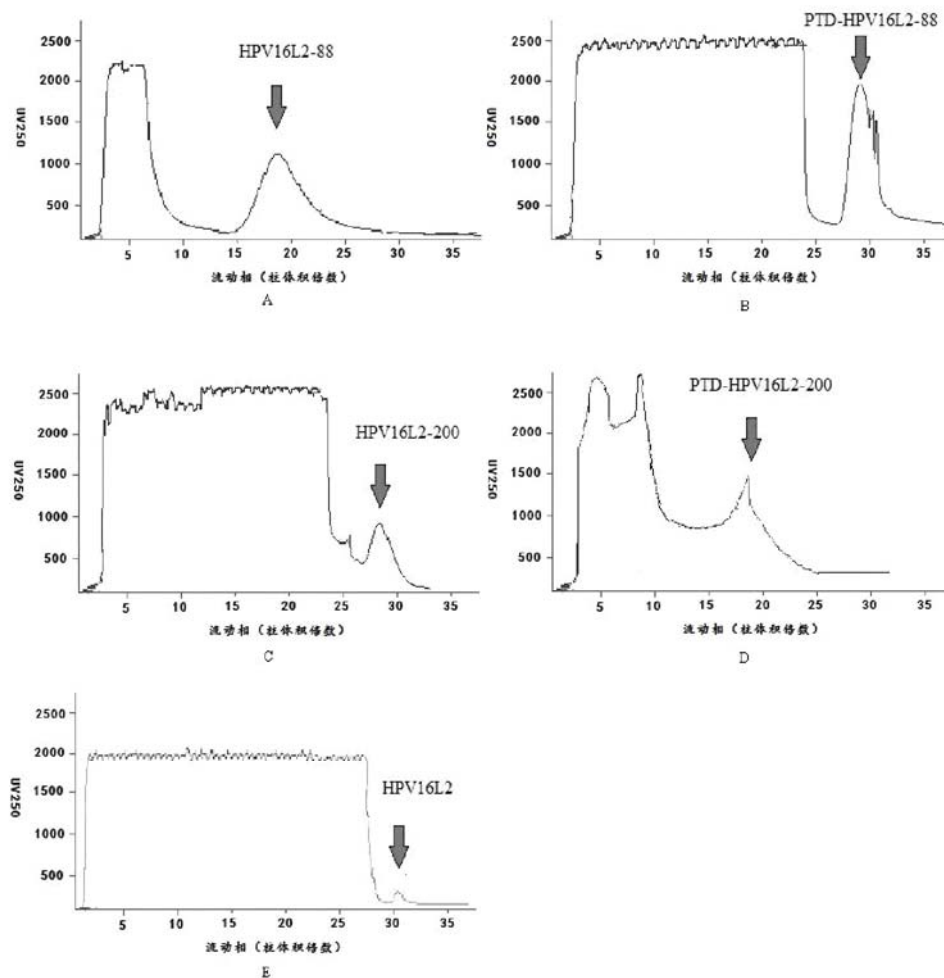
M. 预染蛋白 Marker 2. 0、0.1、0.5、1、5、10 (mM/L) 诱导物浓度

图 2-5 重组HPV16L2蛋白表达诱导浓度优化结果

Figure 2-5 Expression induced concentration optimization of recombinant HPV16L2 protein by SDS-PAGE.

### 2.3.4 重组HPV16L2蛋白纯化结果

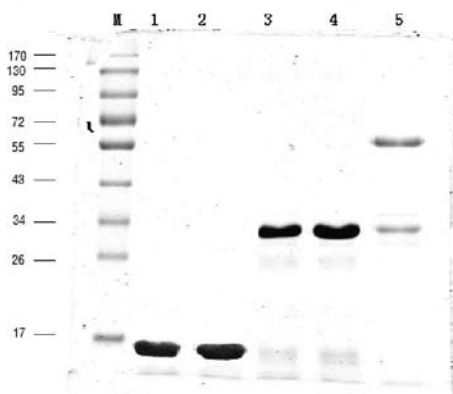
在最佳的蛋白表达条件下进行大量蛋白表达，获得足够量蛋白后使用 AKTA purifier 进行纯化，结果见图 2-6。纯化后进行 SDS-PAGE 和 Western-Blotting 进行验证，验证结果见图 2-7、2-8。使用 Quantity One 软件和 BCA 蛋白定量法对纯化后的蛋白进行纯度和总蛋白浓度进行鉴定，总蛋白浓度乘以目的蛋白的纯度即得到目的蛋白的有效浓度。从结果鉴定可以得到的重组蛋白 HPV16L2-88、PTD-HPV16L2-88、HPV16L2-200、PTD-HPV16L2-200、HPV16L2 的纯度分别达到了 99.1%、98.9%、95.4%、93.7%、86.9%，总蛋白浓度分别达到了 1 626.1 mg/ml、1 709.2 mg/ml、1 660.6 mg/ml、1 570.3 mg/ml、606.2 mg/ml。



A. HPV16L2-88纯化色谱图 B. PTD-HPV16L2-88纯化色谱图 C. HPV16L2-200纯化色谱图  
D. PTD-HPV16L2-200纯化色谱图 E. HPV16L2纯化色谱图

图 2-6 重组蛋白AKTA purifier纯化色谱图

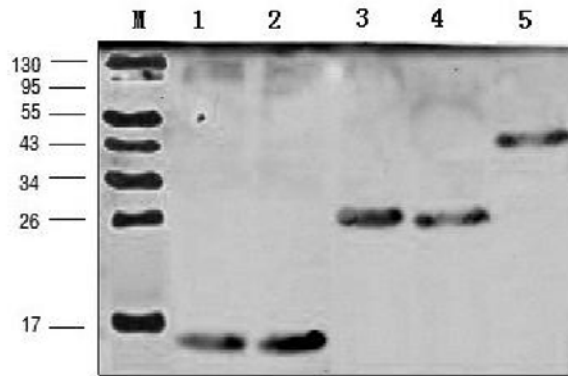
Figure 2-6 Chromatogram of recombinant protein purification by AKTA purifier.



M. 预染蛋白 Marker 1. HPV16L2-88 2. PTD-HPV16L2-88 3. HPV16L2-200  
4. PTD-HPV16L2-200 5. PTD-HPV16L2

图 2-7 重组HPV16L2蛋白纯化SDS-PAGE电泳结果

Figure 2-7 Result of recombinant HPV16L2 protein purification by SDS-PAGE.



M. 预染蛋白 Marker 1. HPV16L2-88 2. PTD-HPV16L2-88 3. HPV16L2-200  
4. PTD-HPV16L2-200 5. PTD-HPV16L2

图 2-8 重组HPV16L2蛋白纯化Western-Blotting结果

Figure 2-8 Result of recombinant HPV16L2 protein purification by Western-Blotting.

## 2.4 本章小结

本章中利用分子生物学、细胞生物学和蛋白纯化等技术成功构建并纯化得到了不同的重组HPV16L2蛋白疫苗。经过优化，最佳表达条件是：使用大肠杆菌ROSETTA（DE3）表达细胞在1mM的IPTG条件下诱导表达3 h。纯化后的各重组蛋白HPV16L2-88、PTD-HPV16L2-88、HPV16L2-200、PTD-HPV16L2-200、HPV16L2的纯度分别为99.1%、98.9%、95.4%、93.7%、86.9%，SDS-PAGE电泳结果显示，纯化后的蛋白含有一些杂蛋白，使用了其他常规方法还是无法去除，通过Western-Blotting结果可以看到这些杂蛋白并不是特异性的蛋白，推断可能是表达系统中的蛋白，后续的实验改进过程中还应进一步优化纯化条件。通过BCA法测定的目蛋白的有效浓度分别达到了1 611.5 mg/ml、1 609.4 mg/ml、1 584.2 mg/ml、1 471.4 mg/ml、526.8 mg/ml。重组蛋白纯度和浓度上达到了动物免疫的要求，可以进行蛋白免疫。



## 第3章 含HPV16 L2h基因的重组腺病毒疫苗的构建

### 3.1 实验材料

#### 3.1.1 质粒、细胞和菌株

含有HPV16L2h基因的shell16L2h质粒由本课题组保存。Admax系统pDC316穿梭质粒、pBHGlox $\Delta$ E1,3Cre骨架质粒、含有野生型Ad5 E1基因的pXC-1质粒以及HEK293细胞均由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所惠赠。大肠杆菌DH5 $\alpha$ 购自于天根生化科技（北京）有限公司。重组腺病毒rAd-EGFP由本课题组保存。

#### 3.1.2 工具酶及主要试剂

限制性内切酶*Eco*R I和*Hind* III购自NewEngland Biology公司，T4 DNA连接酶和DNA A-Tailing Kit 购自宝生物工程（大连）有限公司，DNA Marker购自北京博迈德科技发展有限公司。普通DNA纯化试剂盒、pfuDNA聚合酶、dNTP、质粒DNA小提试剂盒均购自天根生化科技（北京）有限公司。琼脂糖凝胶回收试剂盒购自杭州博日科技有限公司。QuickShuttle-293转染试剂购自北京康碧泉生物科技有限公司。DMEM培养基、胎牛血清FBS、青链霉素均购自于Gibco公司。预染蛋白Marker购自于Fermentas公司。小鼠抗HPV16 L2单抗购自Abcam公司。羊抗小鼠IgG抗体（Anti-MOUSE IgG（H&L）（GOAT）Antibody IRDye700DX）购自Rockland公司。质粒提取试剂盒（Midi）购自于QIAGEN公司。腺病毒纯化试剂盒（Biomiga ViraTrap<sup>TM</sup> Adenovirus Purification Miniprep Kit）购自Biomiga公司。腺病毒滴定试剂盒（TCID<sub>50</sub>）购自本元正阳基因技术有限公司。

#### 3.1.3 主要仪器设备

| 仪器名称              | 厂家           |
|-------------------|--------------|
| 台式高速冷冻离心机         | Thermo 公司    |
| 台式微型离心机           | Eppendorf 公司 |
| 恒温水浴锅（HX-1050 型）  | 北京博医康实验仪器    |
| 金属浴               | Thermo 公司    |
| 恒温摇床（DDH2-300 型）  | 江苏太仓市实验设备厂   |
| 恒温培养箱（DHP-9052 型） | 上海一恒科技有限公司   |

|                             |                                 |
|-----------------------------|---------------------------------|
| 凝胶成像系统 (4400 型)             | Alpha Innotech 公司               |
| DNA 电泳仪及电泳槽 (DYCP-31C 型)    | 北京市六一仪器厂                        |
| 蛋白电泳仪 (PowerPac 3000)       | Bio-Rad 公司                      |
| 半干式碳板转印槽、垂直电泳槽              | Bio-Rad 公司                      |
| 微量移液器                       | Eppendorf 公司                    |
| PCR 仪 (2720 thermal cycler) | Applied biosystems              |
| Odyssey 远红外影像分析仪            | LI-COR Biosciences 公司           |
| 超净工作台 (WT-1ND 型)            | 北京王堂蓝翼科技有限公司                    |
| 恒温磁力搅拌器 (X85-2)             | 上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司                 |
| 胞培养箱                        | Thermo 公司                       |
| 生物安全柜                       | Thermo Fisher Scientific 1389 型 |
| 分光光度计 (22331)               | Eppendorf 公司                    |
| 低温冰箱                        | Thermo 公司                       |

#### 3.1.4 引物

实验所需引物由上海英骏生物技术有限公司合成, 序列如下:

L2F: 5'-TATAGAATTCATGAGGCACAAGAGGAGCGC-3'

L2R-88: 5'-TATTAAGCTTTCAGGGGGCCAGGGTGTCGG-3'

L2R-200: 5'-ATTCAAGCTTTCAGGTGTCCATGGGGATCT-3'

L2R: 5'-TATCAAGCTTTCAGGCGGCCAGGCTCACGT-3'

RCF: 5'-CCTGCGAGTGTGGCGGTA AAA-3'

RCR: 5'-CACAAAGGGCGTCTCCAAGTT-3'

## 3.2 实验方法

### 3.2.1 重组穿梭质粒 pDC316的构建

3.2.1.1 PCR 扩增HPV16L2h基因片段 以含HPV16L2h基因的shell16L2h质粒为模板, HPV16L2h基因是经过人缘化改造的HPV16L2基因, 分别PCR扩增HPV16L2h-88、HPV16L2h-200、HPV16L2h基因片段。PCR反应体系如下:

|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| shell16L2h                      | 1 $\mu$ L |
| L2F                             | 1 $\mu$ L |
| 下游引物                            | 1 $\mu$ L |
| 10 $\times$ Pfu Reaction Buffer | 5 $\mu$ L |

|                    |              |
|--------------------|--------------|
| dNTP               | 4 $\mu$ L    |
| ddH <sub>2</sub> O | 34.5 $\mu$ L |
| Pfu DNA 聚合酶        | 1 $\mu$ L    |
| DMSO               | 2.5 $\mu$ L  |

PCR 参数设置为：94℃ 预变性 5 min，94℃ 30 s，58℃ 1 min，72℃ 2 min（扩增长度为 88 和 200 的相关基因时的延伸时间为 1 min），25 cycles，72℃ 5 min。PCR 产物进行凝胶电泳检测。检测正确后使用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物。

构建不同腺病毒疫苗所使用的引物如下：

| 名称           | 上游引物 | 下游引物    |
|--------------|------|---------|
| HPV16L2h-88  | L2F  | L2R-88  |
| HPV16L2h-200 | L2F  | L2R-200 |
| HPV16L2h     | L2F  | L2R     |

3.2.1.2 HPV16L2h 基因片段与 T 载体的连接 将 PCR 扩增得到的不同大小的 HPV16L2h 基因片段连接到 pMD18-T 载体上。第一步利用 DNA A-Tailing Kit 在 PCR 产物 3' 末端加 A。按说明书取 20  $\mu$ L PCR 产物，加入 10×A-Tailing Buffer 5  $\mu$ L，dNTP 4  $\mu$ L，A-Tailing Enzyme 0.5  $\mu$ L，补 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu$ L，置于金属浴 72℃ 反应 20 min，然后冰上静置 2 min。取 4  $\mu$ L 上述 3' 末端加 A 的 PCR 产物，加入 pMD18-T Vector 1  $\mu$ L，然后加入 5  $\mu$ L Solution I，16℃ 反应 2 h。

3.2.1.3 T 载体连接产物的转化 将 2.2.1.2 全部的连接产物（10  $\mu$ L）加入到 20  $\mu$ L DH5 $\alpha$  感受态细胞中，冰中静置 30 min。金属浴 42℃ 热激 90 s，冰中静置 2 min。然后加入 500  $\mu$ L LB 培养基，150 r/min 37℃ 振荡培养 45 min。12 000 r/min 离心 1 min，弃去大部分上清剩余大约 100  $\mu$ L 的上清，重悬已完成转化的感受态细胞，用涂布棒将重悬液均匀涂到含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 LB 琼脂平板培养基上。平板上液体被吸收后倒置于 37℃ 恒温箱培养 12~16 h。

3.2.1.4 小提并双酶切重组 T 载体和 pDC316 质粒 分别挑取筛选平板上的白色单菌落，接种到 3 mL Amp 抗性的 LB 培养基中，190 r/min 37℃ 振荡培养过夜。按小提试剂盒说明书步骤小提质粒，然后使用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 分别对重组 T 载体和 pDC316 质粒双酶切。酶切体系为：质粒 30  $\mu$ L，NEBuffer2 5  $\mu$ L，*EcoR* I 和 *Hind* III 各 1  $\mu$ L，BSA 0.5  $\mu$ L，补 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu$ L，37℃ 水浴酶切 3 h。酶切产物中加入 5.5  $\mu$ L 10×DNA loading buffer，混匀，1% 琼脂糖凝胶 110 V 恒压水平电泳。切取含有目的条带的琼脂糖凝胶，使用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的条带。回收产物进行琼脂糖凝胶电泳检测回收效果。

3.2.1.5 HPV16L2h 片段和 pDC316 质粒的连接 连接体系为：取适量的 2.2.1.4 中酶

切回收的不同大小的HPV16L2h片段和pDC316质粒，加入10×T4 Ligase buffer 2  $\mu\text{L}$ ，T4连接酶1  $\mu\text{L}$ ，补ddH<sub>2</sub>O至20  $\mu\text{L}$ ，16°C连接3 h。

3.2.1.6 连接产物的转化 将2.2.1.5全部的连接产物（20  $\mu\text{L}$ ）全部加入至20  $\mu\text{L}$  DH5 $\alpha$ 感受态细胞中，冰中静置30 min，金属浴42°C热激90 s，再在冰中静置2 min，加入500  $\mu\text{L}$  LB培养基，150r/min 37°C振荡培养45min。12 000r/min离心1 min，弃去大部分上清剩余大约100  $\mu\text{L}$ 的上清，重悬已转化的感受态细胞，用涂布棒将重悬液均匀涂到含有Amp的LB琼脂平板培养基上。平板上液体被吸收后倒置于37°C恒温箱培养12~16 h。

3.2.1.7 小提并鉴定重组质粒 分别挑取平板上的单菌落接种到3 mL Amp抗性的LB培养基中，190 r/min 37°C振荡培养过夜。按小提试剂盒说明书步骤小提质粒，然后使用限制性内切酶*EcoR* I和*Hind* III对重组pDC316质粒进行双酶切鉴定，鉴定正确后送北京华大基因测序。测序结果正确的重组pDC316质粒命名为pDC316-HPV16L2h-88、pDC316-HPV16L2h-200、pDC316-HPV16L2h。

### 3.2.2 重组腺病毒的包装

3.2.2.1 中提重组穿梭质粒和骨架质粒 使用QIAGEN公司中提试剂盒 QIAGEN Plasmid Midi Kit 分别提取重组质粒pDC316-HPV16L2h-88、pDC316-HPV16L2h-200、pDC316-HPV16L2h和pBHGlox $\Delta$ E1,3Cre骨架质粒，具体操作步骤见试剂盒说明书。质粒提取后用取2  $\mu\text{L}$ 的纯化产物测定浓度和纯度，其余纯化产物冻存于-30°C冰箱保存。

3.2.2.2 293细胞的共转染 使用含10% FBS和1%双抗的DMEM培养基培养HEK293细胞，培养条件为5% CO<sub>2</sub> 37°C恒温培养。按以下步骤使用重组穿梭质粒和骨架质粒共转染293细胞：将新鲜消化的293细胞接种到75cm<sup>2</sup>细胞培养瓶中，加入15 mL完全培养基，根据康碧泉QuickShuttle-293转染试剂说明进行转染：分别将40  $\mu\text{g}$ 的pDC316-HPV16L2h-88、pDC316-HPV16L2h-200、pDC316-HPV16L2h质粒、pBHGlox $\Delta$ E1,3Cre质粒和100  $\mu\text{L}$ 转染试剂稀释到400  $\mu\text{L}$ 生理盐水中。根据包装腺病毒的不同将上述溶液分别进行合并混匀。将混合物直接加入到细胞培养基中，轻摇细胞培养瓶以混匀。将细胞培养瓶移至37°C 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中进行培养。

3.2.2.3 重组腺病毒的收获 转染后9天后，用橡胶细胞刮刮下细胞，800 r/min离心5 min，弃上清，用2 mL无菌PBS重悬细胞沉淀；-20°C和37°C反复冻融5次；3 000 r/min离心10 min，吸取上清，即为原代病毒，分别命名为rAd-HPV16L2h-88、rAd-HPV16L2h-200、rAd-HPV16L2h，-70°C保存备用。用0.5 mL原代病毒上清接种于5 mL无血清培养的HEK293细胞，37°C 5%CO<sub>2</sub>孵育1 h，然后加入含

2%小牛血清的DMEM维持液（10 ml）并观察细胞病变。观察结果显示，被感染的293细胞出现细胞肿胀、圆缩等典型的细胞病变。

### 3.2.3 重组腺病毒的鉴定

**3.2.3.1 重组腺病毒中HPV16L2h基因和复制缺陷型的鉴定** 取原代重组腺病毒上清50  $\mu$ L加入2  $\mu$ L蛋白酶K（20 mg/mL），55 $^{\circ}$ C水浴1 h，然后再煮沸10 min，取5  $\mu$ L并稀释10倍，然后以原液、稀释10倍两个浓度梯度作为 PCR 反应的模板，shell16L2h质粒作为阳性对照，rAd-EGFP作为阴性对照。以L2F为上游引物分别配对不同的下游引物，按94 $^{\circ}$ C预变性5 min；然后94 $^{\circ}$ C 30 s，58 $^{\circ}$ C 1 min，72 $^{\circ}$ C 2 min进行25个循环；最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min。PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

重组腺病毒中RCA的检测，取原代重组腺病毒上清50  $\mu$ L加入2  $\mu$ L蛋白酶K（20 mg/mL），55 $^{\circ}$ C水浴1 h，然后再煮沸10 min，取5  $\mu$ L并稀释10倍，然后以原液、稀释10倍和稀释100倍三个浓度梯度作为 PCR 反应的模板，将含有野生型Ad5 E1基因的pXC-1质粒作为阳性对照，阴性对照的模板为1  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O，以RCF和RCR引物，按94 $^{\circ}$ C预变性5 min；然后94 $^{\circ}$ C 30 s，58 $^{\circ}$ C 1 min，72 $^{\circ}$ C 90 s进行25个循环；最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min。PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

**3.2.3.2 Western-Blotting检测重组腺病毒的HPV16L2h相关蛋白表达** 75cm<sup>2</sup>细胞培养瓶中加入适量原代重组腺病毒感染293细胞，至细胞完全病变时，移除培养基，用PBS冲洗一遍细胞，加入约800  $\mu$ L的细胞裂解液（50 mM Tris-HCl（pH8.0），150 mM NaCl，1% Triton X-100，100  $\mu$ g/mL PMSF（临用前加入）），用无菌的细胞刮刮下细胞，细胞裂解完全后收集到1.5 mL Eppendorf 管，12 000 r/min离心10min。以未感染病毒的细胞作为对照，取离心后的上清进行SDS-PAGE蛋白电泳，然后采用半干转法将蛋白转至硝酸纤维素（NC）膜上；以小鼠抗HPV16L2单克隆抗体为一抗，羊抗小鼠IgG抗体（Anti-MOUSE IgG（H&L）（GOAT）Antibody IRDye 700 DX）为二抗，进行Western-Blotting实验，最后用Odyssey 远红外影像仪进行分析。

### 3.2.4 重组腺病毒疫苗的大量扩增和纯化

**3.2.4.1 重组腺病毒的大量扩增** 取原代病毒0.5 mL接种于密度为90%以上的HEK293细胞，37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub>培养，每日观察细胞病变（Cytopathic effect, CPE），直至大部分HEK293细胞病变后，按3.2.2.3方法收集病毒，病毒液保存于-75 $^{\circ}$ C备用。传代病毒到第三代时，第三天即观察到明显的细胞病变，绝大部分正常

细胞变圆皱缩，出现串珠样甚至葡萄簇样变化，说明此代的病毒滴度已经较高，可以收集病毒保存于-75℃备用。

3.2.4.2 重组腺病毒的纯化 使用Biomiga ViraTrap™ Adenovirus Purification Miniprep Kit腺病毒纯化试剂盒对重组腺病毒进行纯化。具体实验步骤见Biomiga ViraTrap™ Adenovirus Purification Miniprep Kit使用手册。纯化后的重组腺病毒保存于-75℃。

### 3.2.5 重组腺病毒的滴度测定

TCID<sub>50</sub>实验的基础是应用极限稀释法使HEK293细胞出现病变从而估计滴度。准备10 mL含10%胎牛血清的DMEM重悬细胞，将细胞浓度调至 $1 \times 10^5$ /mL，接种于96孔细胞培养板，每孔加入100μl。细胞贴壁后将上清弃去。病毒的稀释：第一管中加入0.9 ml含10%胎牛血清的DEME，其余则加入1.8 mL。第一管中加入0.1 ml病毒原液。上下抽吸5次使他们混匀。每一次稀释后都更换吸头。从第一管中吸取0.2 ml加入第二管。重复这个稀释步骤直到最高稀释度，稀释度依次为 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-11}$ 。96孔板的每一排10孔作为一个稀释度。11，12列不加病毒作为阴性对照。实验孔每孔加入0.1 ml不同稀释度病毒。把96孔板放在37℃孵箱培养10天，观察病变。只要有一个小孔出现一个细胞病变，此孔即作为阳性对待，如果不易判断可跟阴性对照做比较。最后按公式 $T=10^{1+d(s-0.5)}$ 计算病毒的滴度（d为稀释度的对数值，s为病变比例的和）。

## 3.3 实验结果和讨论

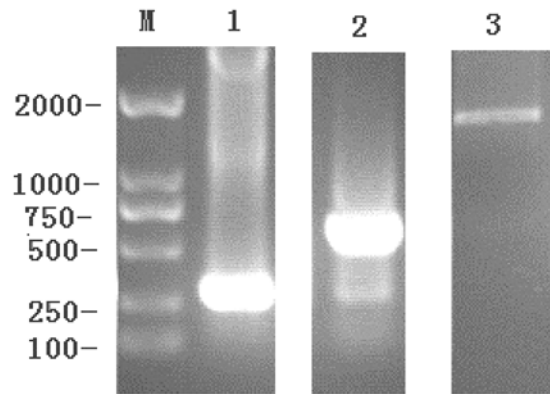
### 3.3.1 PCR 扩增 HPV16L2h基因片段的的结果

以含码子优化的HPV16L2h基因的shell16L2h为模板，分别PCR扩增HPV16L2h-88、HPV16L2h-200、HPV16L2h基因片段，应该得到大小约为264、600、1 422 bp的不同HPV16L2h片段，实验结果如图3-1所示，与预期一致。

### 3.3.2 重组质粒 pDC316的酶切鉴定结果

分别使用限制性内切酶*EcoR*I和*Hind*III对重组pDC316质粒进行双酶切，双酶切应该得到264、600、1 422 bp的小片段和约3 913 bp的大片段。实验结果如图3-2所示，与预期一致。双酶切鉴定正确后的重组pDC316质粒送华大公司进行测序，测序结果表明HPV16L2h-88、HPV16L2h-200、HPV16L2h基因片段正

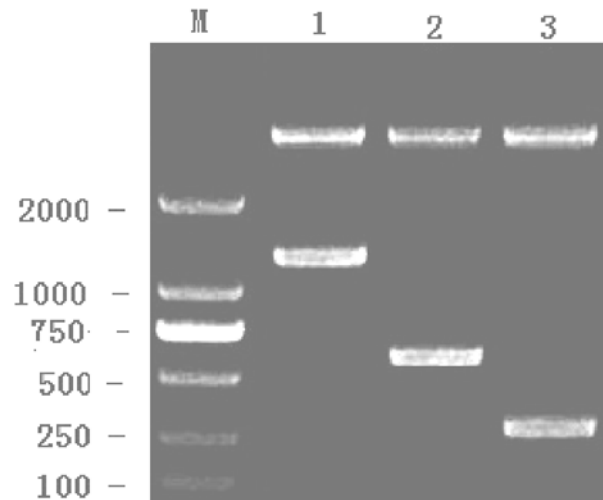
确地插入到了质粒pDC316中。



M. DNA Marker 2000 1. HPV16L2h-88 2. HPV16L2h -200 3. HPV16L2h

图 3-1 PCR 扩增 HPV16L2h 基因片段

Figure 3-1 Amplification of HPV16L2h by PCR



M. DNA Marker 2000 1. HPV16L2h-88 2. HPV16L2h -200 3. HPV16L2h

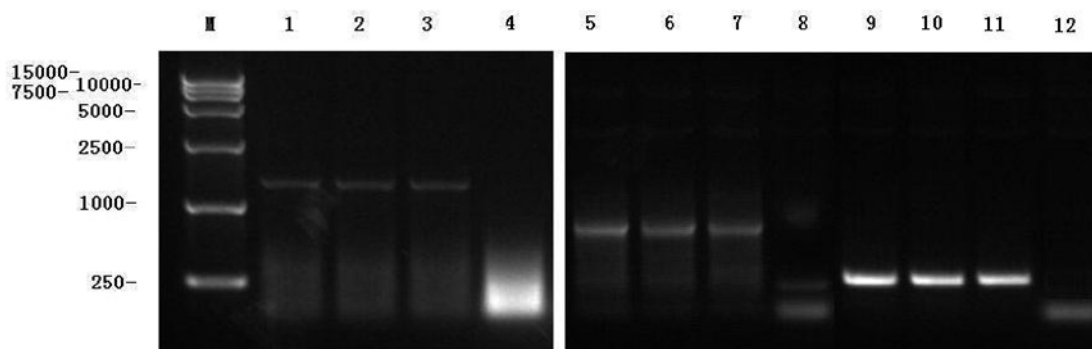
图3-2 重组质粒 pDC316-HPV16L2h 的双酶切鉴定

Figure 3-2 Identification of recombinant plasmids pDC316-HPV16L2h by restriction enzymes digestion

### 3.3.3 重组腺病毒的 HPV16L2h 基因和复制缺陷型鉴定

3.3.3.1 重组腺病毒中 HPV16 L2h 基因的鉴定 以经蛋白酶K消化过的两个浓度梯度的病毒上清为模板分别PCR扩增 HPV16L2h-88、 HPV16L2h-200、 HPV16L2h 基因片段, shell16L2h质粒作为阳性对照, rAd-EGFP作为阴性对照, 电泳结果如图 3-3所示, 所有的病毒上清都可以经PCR扩增分别得到大小约为264、 600、 1422 bp的 HPV16L2h 片段, 说明 HPV16L2h 基因已经插入到了腺病毒的基因组中。

3.3.3.2 重组腺病毒复制缺陷型的鉴定 以经蛋白酶K消化过的三个浓度梯度的病毒上清为模板，将含有野生型Ad5 E1基因的pXC-1质粒作为阳性对照，空白作为阴性对照，以RCF和RCR为引物进行PCR反应检测RCA，琼脂糖凝胶电泳结果如下图 3-4所示，以含有野生型Ad5 E1基因的质粒pXC-1为模板的阳性对照有大约 1 000 bp左右的条带出现，而病毒上清都没有此条带，说明构建的重组腺病毒为复制缺陷型的，不含有 RCA。

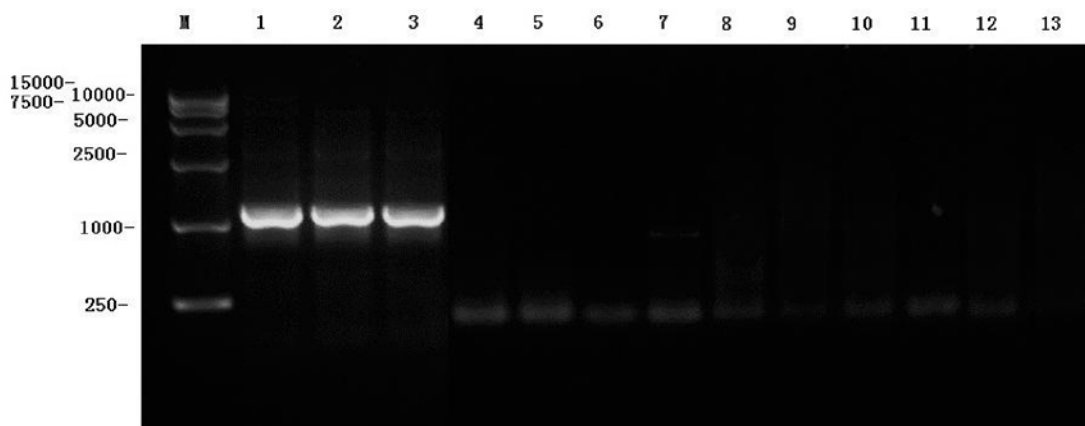


M. DNA Marker 15000

1-4. 病毒 rAd5-HPV16L2h上清的原液、10 倍稀释、阳性对照和阴性对照的 PCR 产物  
5-8. 病毒 rAd5-HPV16L2h-200上清的原液、10 倍稀释、阳性对照和阴性对照的 PCR 产物  
9-12. 病毒 rAd5-HPV16L2h-88上清的原液、10 倍稀释、阳性对照和阴性对照的 PCR 产物

图 3-3 重组腺病毒中 HPV16L2h基因的检测

Figure 3-3 Detection of HPV16L2h gene in the recombinant adenovirus



M. DNA Marker 15000 1-3.以 pXC-1 为模板的 PCR 产物，作为阳性对照

4-6. 病毒 rAd5-HPV16L2h上清的原液、10 倍稀释、100 倍稀释的 PCR 产物  
7-9. 病毒 rAd5-HPV16L2h-200上清的原液、10 倍稀释、100 倍稀释的 PCR 产物  
10-12. 病毒 rAd5-HPV16L2h-88上清的原液、10 倍稀释、100 倍稀释的 PCR 产物  
13. 阴性对照

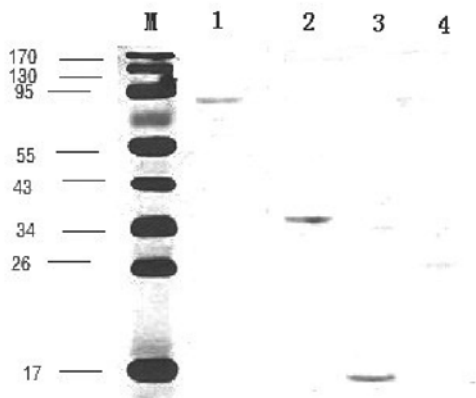
图 3-4 重组腺病毒中 RCA 复制型病毒的检测

Figure 3-4 Replication Competent Adenoviruses detection in recombinant adenovirus.



### 3.3.4 重组腺病毒表达HPV16L2相关蛋白水平的检测

取原代重组腺病毒感染HEK 293细胞，观察到细胞病变十分明显，大部分细胞脱落，收集细胞。Western-Blotting检测病毒感染细胞HPV16L2h相关蛋白表达。实验结果如图 3-5所示，相对于正常的HEK 293细胞，重组腺病毒rAd5-HPV16L2h感染的HEK 293细胞有明显的HPV16L2表达。



M. 预染蛋白 Marker 1. rAd5-HPV16L2h转染的 293 细胞 2. rAd5-HPV16L2h-200转染的 293 细胞 3. rAd5-HPV16L2h-88转染的 293 细胞 4.未转染的 293 细胞

图 3-5 重组腺病毒感染细胞蛋白表达的Western Blot检测

Figure 3-5 Detection of HPV16L2 protein by Western Blot in 293 cells infected with the recombinant adenovirus.

### 3.3.5 重组腺病毒的滴度测定结果

使用 TCID<sub>50</sub> (50%组织细胞感染量) 方法测定纯化后的重组腺病毒的滴度。以rAd5-HPV16L2h的滴定实验为例，结果中“●”表示阳性，以“○”表示阴性，A~H表示重组腺病毒稀释梯度 (10<sup>-4</sup>~10<sup>-11</sup>)，1~10表示每个稀释度10次重复，11~12列是未感染重组腺病毒的细胞作为阴性对照，如下图 3-6

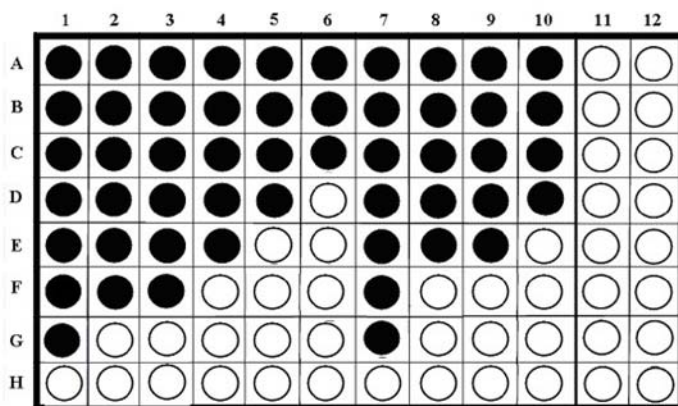


图 3-6 TCID50 方法测定 rAd5-HPV16L2h 的滴度结果

Figure 3-6 Titers determination of the rAd5-HPV16L2h using TCID50

从结果可以得到显色结果是： $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$ 及 $10^{-4}$ 的稀释度均显色（全阳性）； $10^{-7}$ 的稀释度9个孔有显色细胞； $10^{-8}$ 的稀释度7个孔有显色细胞； $10^{-9}$ 的稀释度4个孔有显色细胞； $10^{-10}$ 的稀释度2个孔有显色细胞； $10^{-11}$ 的稀释度无显色（全阴性）。计算TCID<sub>50</sub>：对于100 $\mu$ l样品， $d=\log_{10}$  稀释度=1（对于10倍的稀释度而言）， $s$ =阳性比率之和（从第一个10倍稀释度开始）=1+1+1+1+1+1+0.9+0.7+0.4+0.2+0=8.2，因此滴度 $T=10^{1+d(s-0.5)}=10^{1+1\times(8.2-0.5)}=10^{8.7}/100\ \mu\text{l}=10^{9.7}$  IU/ml= $10^9$  PFU/ml。因此纯化后的重组腺病毒 rAd5-HPV16L2h的滴度为 $10^9$  PFU/ml。使用同样的方法测定 rAd-HPV16L2h-88、rAd-HPV16L2h-200 的滴度为  $1.3\times 10^9$  PFU/ml、 $9.9\times 10^8$  PFU/ml。

### 3.4 本章小结

本章中使用AdMax腺病毒包装系统成功包装出了含密码子优化型HPV16L2h基因的重组腺病毒rAd-HPV16L2h-88、rAd-HPV16L2h-200、rAd5-HPV16L2h，并成功扩增和纯化了重组腺病毒rAd-HPV16L2h-88、rAd-HPV16L2h-200、rAd5-HPV16L2h。纯化后的重组腺病毒rAd-HPV16L2h-88、rAd-HPV16L2h-200、rAd5-HPV16L2h的滴度分别为 $1.3\times 10^8$  PFU/ml、 $9.9\times 10^7$  PFU/ml、 $10^8$  PFU/ml，得到了足量的重组腺病毒疫苗。经鉴定重组腺病毒在DNA水平和蛋白水平均能高效表达相应的外源的基因，且重组腺病毒为复制缺陷型。

## 第4章 重组蛋白疫苗和重组腺病毒疫苗免疫效果的研究

### 4.1 实验材料

#### 4.1.1 细胞和疫苗

重组蛋白疫苗和重组腺病毒疫苗由本研究构建。含有HPV16L1基因的质粒shell16L1、含有HPV16L2基因的质粒shell16L2、含有HPV18L1/L2基因的质粒shell18、含有HPV31L1/L2基因的质粒shell31、含有HPV45L1/L2基因的质粒shell45和含有HPV58L1/L2基因的质粒shell58质粒由美国 National Cancer Institute-NIH的John T. Schiller博士惠赠，pEGFP由本室保存。HEK293FT细胞购自 Invitrogen 公司。

#### 4.1.2 主要试剂

转染试剂QuickShuttle-293购自北京康碧泉生物科技有限公司。DMEM培养基、RPMI-1640培养基、胎牛血清 FBS、青链霉素均购自于Gibco公司。96孔酶标板、ELISA包被液、ELISA洗涤液和ELISA终止液购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。羊抗小鼠IgG-HRP购自北京成文免疫化学研究室。TMB底物显色试剂盒（可溶型）购自北京康为世纪生物科技有限公司。Quick Spot小鼠 FN- $\gamma$  ELISPOT预包被试剂盒、EZ-Sep™ Mouse 1X易得小鼠淋巴细胞分离液、EZ-Culture™ ELISPOT专用无血清培养基购自深圳达科为生物技术有限公司。实验中设计的多肽由北京中科亚光生物科技有限公司合成。

#### 4.1.3 主要仪器设备

| 仪器名称                  | 厂家                |
|-----------------------|-------------------|
| 台式微型离心机               | Eppendorf 公司      |
| 恒温水浴锅（HX-1050 型）      | 北京博医康实验仪器         |
| 恒温摇床（DDH2-300 型）      | 江苏太仓市实验设备厂        |
| 恒温培养箱（DHP-9052 型）     | 上海一恒科技有限公司        |
| 凝胶成像系统（4400 型）        | Alpha Innotech 公司 |
| DNA 电泳仪及电泳槽（DYCP-31C） | 北京市六一仪器厂          |
| 蛋白电泳仪（PowerPac 3000）  | Bio-Rad 公司        |
| 半干式碳板转印槽、垂直电泳槽        | Bio-Rad 公司        |

|                  |                                 |
|------------------|---------------------------------|
| 微量移液器            | Eppendorf 公司                    |
| Odyssey 远红外影像分析仪 | LI-COR Biosciences 公司           |
| 超净工作台 (WT-1ND 型) | 北京王堂蓝翼科技有限公司                    |
| 恒温磁力搅拌器 (X85-2)  | 上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司                 |
| 胞培养箱             | Thermo 公司                       |
| 生物安全柜            | Thermo Fisher Scientific 1389 型 |
| 分光光度计 (22331)    | Eppendorf 公司                    |
| 低温冰箱             | Thermo 公司                       |
| 550 型酶标仪         | Bio-Rad 公司                      |
| ELISPOT 读板机      | 美国 CTL 公司                       |

#### 4.1.4 实验动物

4~6周龄BALB/c雌性的小鼠 (H-2K<sup>d</sup>) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 委托北京大学第一医院动物中心 (伦理审查决议号J201157) 和中国中医科学院中药研究所实验动物中心饲养。

## 4.2 实验方法

### 4.2.1 免疫小鼠

4.2.1.1 重组蛋白疫苗免疫小鼠 将4~6周龄的雌性BALB/c小鼠随机分10组, 每组组各8只小鼠。PBS作为对照免疫使用的剂量为100  $\mu$ L/只; PTD、HPV16L2-88、HPV16L2-200和PTD-HPV16L2融合蛋白 (即PTD-HPV16L2-88和PTD-HPV16L2-200) 疫苗使用PBS稀释浓度至1 000 mg/ml, 免疫使用的剂量为100  $\mu$ l/只, 使蛋白疫苗的有效剂量为100  $\mu$ g/只; HPV16L2疫苗使用PBS稀释浓度至500 mg/ml, 免疫使用的剂量为200  $\mu$ L/只使蛋白疫苗的有效剂量为100  $\mu$ g/只; PTD 和 HPV16L2 混合蛋白 (即 PTD:HPV16L2-88=1:1、PTD:HPV16L2-88=9:1和PTD:HPV16L2-200=18:1, 皆为质量比) 疫苗使用PBS稀释至总蛋白浓度为1000 mg/ml, 免疫使用的剂量为100  $\mu$ l/只, 使总蛋白蛋白的有效剂量为100  $\mu$ g/只, 将上述剂量的重组HPV16L2蛋白疫苗分别与完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂充分混合, 各组疫苗在0周初次免疫使用完全弗氏佐剂混合疫苗于小鼠背部皮下注射, 2、4周加强免疫使用不完全弗氏佐剂混合疫苗于小鼠背部皮下注射。动物免疫具体规程见表4-1。第二次加强免疫后一周对小鼠眼球采血, 然后

用颈椎脱臼法将其处死，血液室温静置30 min后，3 000 r/min离心5 min，收集血清，分装小份置-75℃保存。

4.2.1.2 重组腺病毒疫苗免疫小鼠 将4~6周龄的雌性BALB/c小鼠随机分5组，每组各10只小鼠。分别为PBS对照组、rAd-EGFP对照组、重组腺病毒rAd5-HPV16L2h-88、重组腺病毒rAd5-HPV16L2h-200、重组腺病毒rAd5-HPV16L2h。使用剂量为 $1 \times 10^8$  PFU/只，肌肉注射，初次免疫后2周进行加强免疫。于加强免疫后1周摘取小鼠的脾脏并收集各组小鼠血清，血液室温静置30 min后，3 000 r/min离心5 min，收集血清，分装小份置-75℃保存。

#### 4.2.2 ELISA和假病毒中和滴定检测体液免疫

4.2.2.1 ELISA检测总抗体 用包被缓冲液将抗原（HPV16L2）稀释至蛋白质含量为10  $\mu$ g/mL。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加0.1 mL蛋白稀释液，4℃过夜。第二天弃去板内溶液，用洗涤缓冲液洗5次，每次10 min。洗涤后，使用100%胎牛血清（FBS）进行封闭，37℃封闭2 h，用洗涤缓冲液洗5次，每次10 min。洗涤后，使用稀释液（洗涤液+10%FBS）按设计依次稀释待检样品，每孔加入0.1 mL稀释好的样品（同时做空白孔，阴性对照孔及阳性对照孔），置37℃孵育1 h，用洗涤缓冲液洗5次，每次10 min。洗涤后，于各反应孔中加入新鲜稀释的酶标抗体（1:500）0.1 mL，37℃孵育1 h，用洗涤缓冲液洗5次，每次10 min。洗涤后，于各反应孔中加入临时配制TMB底物溶液0.1 mL，37℃避光显色15 min。每孔加入0.05 mL 2M硫酸，终止反应10 min。使用ELISA检测仪测定每孔450nm处的OD值，阳性的判定：OD值大于阴性对照OD值的2.1倍，即为阳性。

4.2.2.2 中提HPV16、18、31、45和58型假病毒质粒 使用QIAGEN公司中提试剂盒QIAGEN Plasmid Midi Kit 提取含有HPV16L1基因的质粒shell16L1、含有HPV16L2基因的质粒shell16L2、含有HPV18L1/L2基因的质粒shell18、含有HPV31L1/L2基因的质粒shell31、含有HPV45L1/L2基因的质粒shell45和含有HPV58L1/L2基因的质粒shell58质粒，具体操作步骤见试剂盒说明书。质粒提取后分别取1  $\mu$ L，使用分光光度计测定浓度和纯度。提取的质粒冻存于-30℃冰箱。

4.2.2.3 HPV16、18、31、45和58型假病毒的制备 按文献报道的方法（Buck. J. Virol. 2004, 78: 751-757.）制备HPV16、18、31、45和58型假病毒颗粒。培养HEK293FT细胞所用的培养基为含10% FBS 和1%双抗的DMEM培养基，培养条件为37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养。将新鲜消化的HEK293FT细胞接种到75cm<sup>2</sup>细胞培养瓶中，加入15 mL完全培养基，根据康碧泉QuickShuttle-293转染试剂说明进行转染：分别将40  $\mu$ g的假病毒质粒和100  $\mu$ L转染试剂稀释到400  $\mu$ L生理盐

水中。根据包装假病毒型别的不同分别合并上述溶液并混匀。将上述混合物直接加入到细胞培养基中，轻摇细胞培养瓶以混匀。将细胞培养瓶移至37℃、5%CO<sub>2</sub>孵箱中进行培养。转染后48 h，胰酶消化并收集细胞，如果有悬浮状态的细胞则通过1 200 r/min离心5 min，收集沉淀。使用10 mL DMEM完全培养基重悬细胞，充分收集瓶中细胞。离心，弃上清，用0.5 mL DPBS-Mg重悬细胞，转至带螺口盖的1.5 ml EP管中，用0.5 mL DPBS-Mg冲洗原管，将冲洗液加入硅化离心管中。1 200 r/min离心5 min，收集沉淀。用合适体积的裂解缓冲液（DPBS-Mg补加0.4% Brij58，0.2% Benzonase，临用前配制）重悬细胞，使其细胞密度为1 × 10<sup>9</sup>个/ml，细胞沉淀占终体积的1/3至1/2。将细胞裂解物37℃孵育至少16 h，在孵育的头2 h应上下倒置混合数次。上述操作及所用试剂应保证无菌。将孵育完全的细胞裂解物置于冰上预冷5 min，加入一定体积的5M NaCl使盐浓度达到850 mM，冰上孵育20 min。4 000 r/min，5 min，离心收集上清转移至新的EP管中，-70℃保存。

4.2.2.4 假病毒的滴定 预先6小时铺HEK293FT细胞于96孔细胞培养板中，每孔细胞数为2 × 10<sup>4</sup>个/100 μL。使用无血清DMEM分别将HPV16、HPV18、HPV31、HPV45和HPV58型假病毒按照1 000、2 000、4 000、8 000、16 000进行稀释。每孔加入100 μL假病毒稀释液。将细胞培养板置于37℃，5%CO<sub>2</sub>的孵箱中培养72 h。取40 μL细胞培养上清，按顺序加入新的96孔板中，加入20 μL 0.05% CHAPS，加入200 μL显色底物，室温避光孵育2 h，Bio-Rad 550型酶标仪测定405nm波长下的OD值。结果判定：假病毒滴度定义为OD值大于阴性对照OD值5倍的血清最大稀释度。本次包装的HPV16、HPV18、HPV31、HPV45和HPV58型假病毒的滴度结果：2 000、8 000、8 000、8 000和8 000。

4.2.2.5 假病毒中和滴定 预先6 h铺HEK293FT细胞于96孔细胞培养板中，每孔细胞数为2 × 10<sup>4</sup>个/100 μL。使用无血清DMEM分别将HPV16、HPV18、HPV31、HPV45和HPV58假病毒稀释1 000倍；使用无血清DMEM分别将血清按照40、80、160、320、640、1 280和3 560倍进行稀释。分别取60 μL血清和相应的60 μL假病毒混合均匀后4℃静置1 h。吸取100 μl的假病毒与血清混合物加入预先已铺好细胞的培养板对应孔中，置于37℃、5% CO<sub>2</sub>的孵箱中培养72 h。取40 μl细胞培养上清，按顺序加入新的96孔板中，加入20 μl 0.05% CHAPS，加入200 μL显色底物，室温避光2 h，Bio-Rad 550型酶标仪测定405nm波长下OD值。结果判定：中和滴度定义为OD值小于阴性对照OD值50%的血清最大稀释度。

#### 4.2.3 ELISPOT 检测细胞免疫反应

4.2.3.1 ELISPOT实验刺激物的准备 本实验选用PHA为阳性对照，由于目前并没

有HPV16L2的T细胞表位肽的相关文献报道，因此本研究选择通过生物信息学的方法来预测HPV16L2的T细胞表位肽。使用网站[http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)和<http://www.syfpeithi.de/home.htm>提供的算法<sup>[41]</sup>，预测HPV16L2的T细胞表位肽，综合分析比较后对选择6条多肽委托北京中科亚光生物科技有限公司合成，纯度为95%。

**4.2.3.2 脾细胞准备** 重组腺病毒第二次加强免疫后两周对小鼠进行摘眼球取血，然后用颈椎脱臼法将其处死，处死后的小鼠浸入75%的乙醇中浸泡5 min。后续实验都在生物安全柜中操作，剪开小鼠左侧腹部外皮，可见脾脏为暗红色长条状脏器，用另一支镊子取出小鼠脾脏。在35 mm培养皿中加入4 mL EZ-Sep™ Mouse 1X 淋巴细胞分离液，在200目细胞筛网上用橡胶制的注射器活塞轻轻研磨小鼠脾脏，使得脾细胞均匀的分散到细胞分离液中。把含有脾脏细胞的分离液转移到15 mL离心管中，轻轻覆盖上大约0.5 mL的1640培养基。2 000 r/min离心30 min。离心结束后中间为白色分层即为淋巴细胞层，小心吸出淋巴细胞层弃去其他液体，加入10 mL 1640培养基洗涤一次，1 100 r/min离心10 min。弃去上清，然后加入EZ-Culture™ ELISPOT专用无血清培养基重悬细胞，并进行细胞计数。

**4.2.3.3 细胞上板和加刺激物** 在生物安全柜中撕开用铝膜密封包装的预包被板。每孔加入200 μL的RPMI-1640培养基，室温静置10 min左右，弃去培养基。用EZ-Culture™ ELISPOT专用无血清培养基把细胞稀释到 $3 \times 10^6$ 个/mL，按照实验设计将稀释好的细胞加入到各孔中，每孔100 μL。把PHA和预测的多肽配成10 × 工作液，每孔加入10 μL相应刺激物。PHA的终浓度为2.5 μg/mL，只加单独一条肽的孔中多肽终浓度为6 μg/mL，加入6条肽组成的肽池的孔中每条多肽的终浓度为6 μg/mL。不加任何刺激物的孔作为负对照。加完所有的样品之后，盖上板盖，放入37℃、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱，培养18~24 h。

**4.2.3.4 ELISPOT检测** 倾倒入孔内的细胞及培养基。每孔加入200 μL冰冷的去离子水，4℃冰箱冰浴10 min（低渗法裂解细胞）。每孔用200 μL 1 × Washing buffer洗涤5~7次，每次30~60 s。最后在吸水纸上扣干液体。每孔加入100 μL稀释好的生物素标记的抗体，37℃孵育1 h。每孔用200 μL 1 × Washing buffer洗涤5次，每次30~60 s。最后在吸水纸上扣干液体。每孔加入100 μL稀释好的酶标亲和素，37℃孵育1 h。每孔用200 μL 1 × Washing buffer洗涤5次，每次30~60 s。最后在吸水纸上扣干液体。照试剂配制说明，配好AEC显色液。每孔加入100 μL的显色液，室温避光静置15~45 min。待斑点生长到适合的大小之后，以去离子水洗涤2遍，终止显色过程。将板倒扣在吸水纸上，拍干水分之后取下保护层，室温静置10~30 min，让膜自然晾干。斑点计数，做统计分析。

## 4.3 实验结果和讨论

### 4.3.1 体液免疫结果

4.3.1.1 间接ELISA检测HPV16L2特异性抗体 末次免疫后一周摘眼球取血，分离血清。使用间接ELISA法检测血清中L2总抗体（IgG）水平。结果见图4-1，L2蛋白疫苗各实验组均诱导出特异性L2抗体，抗体滴度与L2抗原大小呈正相关，对于L2（1-88）肽段，PTD无论是融合还是混合均未显示出明显的免疫增强效应，而L2（1-200）肽段，PTD融合表达可显著提高L2肽段的体液免疫效果，这提示，PTD免疫增强效果与L2肽段的大小也呈正相关。

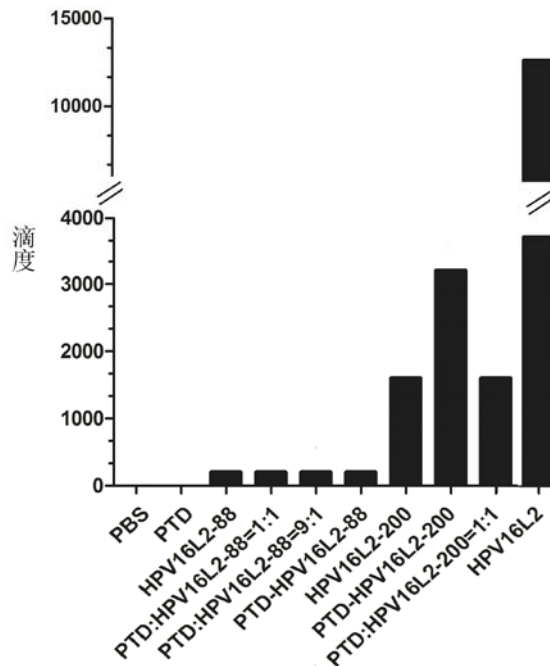


图4-1 间接ELISA法检测HPV16L2特异性抗体的结果

Figure 4-1 Result of HPV16L2 special antibodies by indirect ELISA

4.3.1.2 HPV16型假病毒的中和实验 使用无血清DMEM将HPV16假病毒颗粒稀释1000倍用于检测各疫苗实验组血清中HPV16中和抗体的水平。结果见图4-2，融合蛋白疫苗（PTD-HPV16L2-88和PTD-HPV16L2-200）、混合蛋白疫苗（PTD:HPV16L2-200=1:1）及HPV16L2-200和HPV16L2组免疫小鼠均诱导产生HPV16的中和抗体，融合表达的PTD可显著提高相应L2肽段的中和抗体滴度，而PTD混合组中，仅有L2（1-200）组显示出一定的增强效果，这提示混合PTD并非增强L2肽段免疫原性的有效策略。HPV16L2全长蛋白诱导出最高滴度的中和抗体，这是否意味着L2 C段多肽（200-474）中还存在着未发现的中和表位或仅是由于大蛋白提高抗原稳定性所致还需要后续实验加以区分。另外，PTD与L2全长蛋白融合是否能进一步提高其中和抗体滴度还有待后续实验的证明。



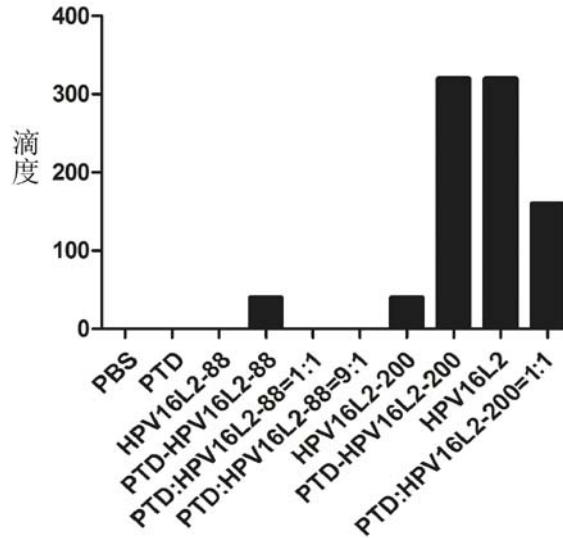


图 4-2 HPV16 型假病毒中和实验

Figure 4-2 HPV16 pseudovirus neutralization assay

4.3.1.3 HPV18、HPV31、HPV45和HPV58型假病毒的交叉中和实验 使用无血清DMEM将HPV18、HPV31、HPV45和HPV58假病毒分别稀释1 000倍用于检测各组小鼠血清中针对相应HPV型别的交叉中和抗体。结果见图4-3，融合蛋白疫苗（PTD-HPV16L2-88和PTD-HPV16L2-200）、混合蛋白疫苗（PTD:HPV16L2-200=1:1）及HPV16L2-200和HPV16L2组免疫小鼠都可以产生中和非同源假病毒（HPV18、HPV31、HPV45和HPV58）的交叉中和抗体，但各疫苗组针对不同HPV型别的中和抗体滴度存在显著差异，PTD融合L2各肽段组除个别HPV型别外普遍增强了疫苗的交叉保护效力。中和抗体在总抗体中的比例可作为衡量体液免疫“质量”的一个指标，因此，我们还计算了各疫苗组血清中和抗体在总抗体中的比例，结果见图4-4，PTD融合蛋白（PTD-HPV16L2-88和PTD-HPV16L2-200）的比例分别为20%和10%，而HPV16L2全长蛋白的比例仅有2.5%，这提示PTD融合蛋白疫苗可有效提高体液免疫应答的“质量”。而PTD混合疫苗组除PTD:HPV16L2-200=1:1（比例为10%）外，其余混合疫苗组（PTD:HPV16L2-88=1:1、PTD:HPV16L2-88=3:1）因未检测到HPV16中和抗体故该比例为0。

4.3.1.4 腺病毒免疫的交叉中和实验 使用无血清DMEM将HPV16、HPV18、HPV31和HPV45假病毒分别稀释1 000倍用于检测免疫完成后收集的血清中相应的交叉中和抗体，结果见图4-5，仅有含全长L2基因的重组腺病毒疫苗可诱导产生中和同源和非同源假病毒（HPV16、HPV18、HPV31和HPV45）的交叉中和抗体，但针对各HPV型别的交叉中和抗体滴度均不及L2全长蛋白疫苗。

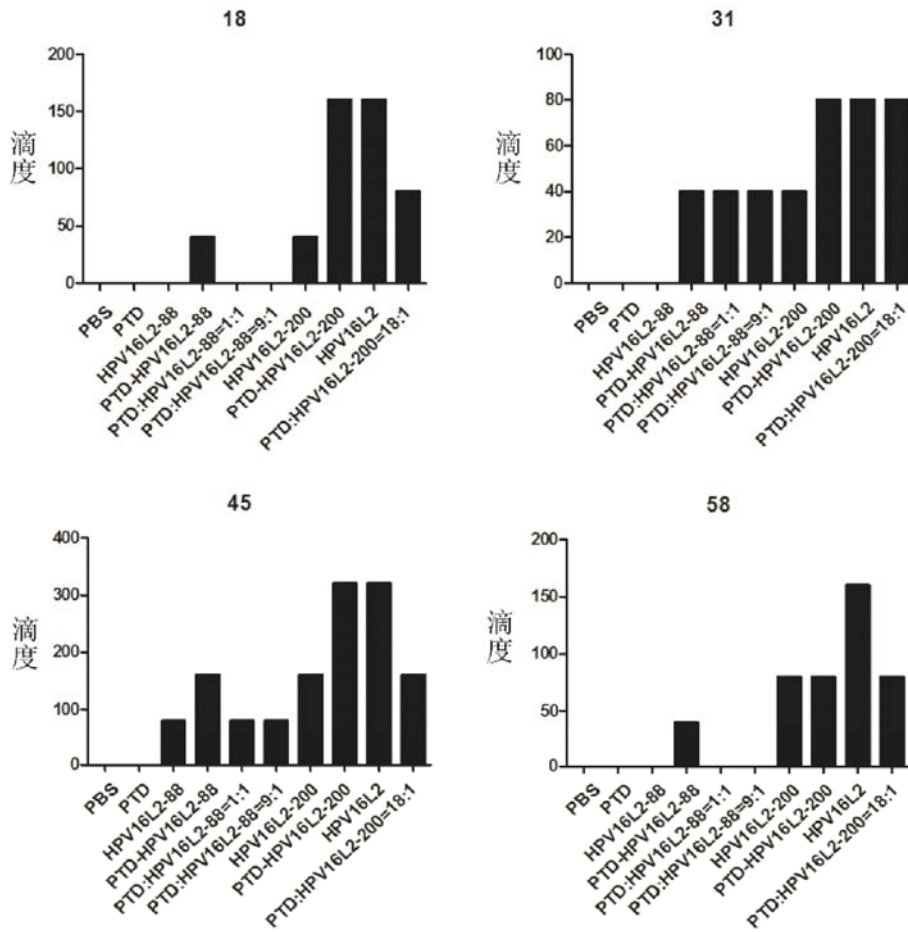


图 4-3 HPV18、HPV31、HPV45和HPV58型假病毒交叉中和实验

Figure 4-3 HPV18、HPV31、HPV45和HPV58 pseudovirus cross-neutralization assay

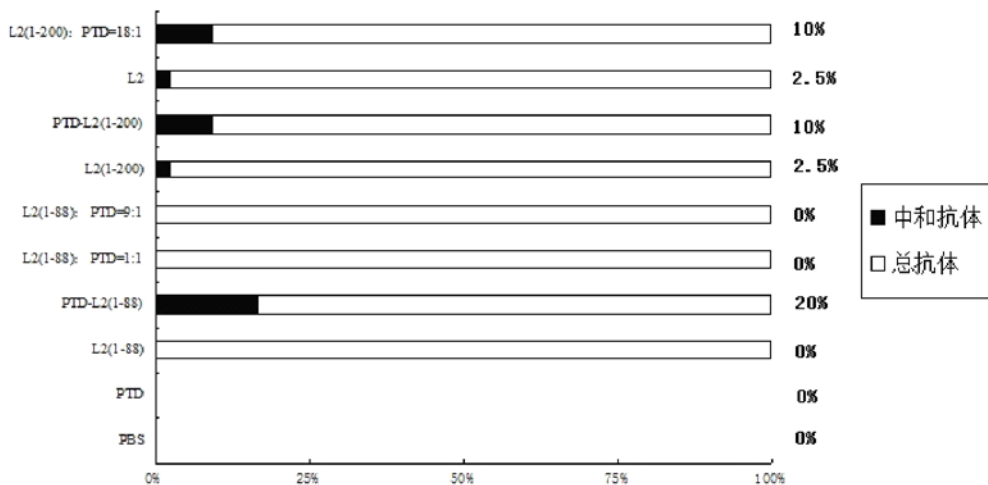


图 4-4 HPV16L2中和抗体在总抗体当中的比例

Figure 4-4 The proportion of the HPV16L2 neutralizing antibodies in the the total antibodies

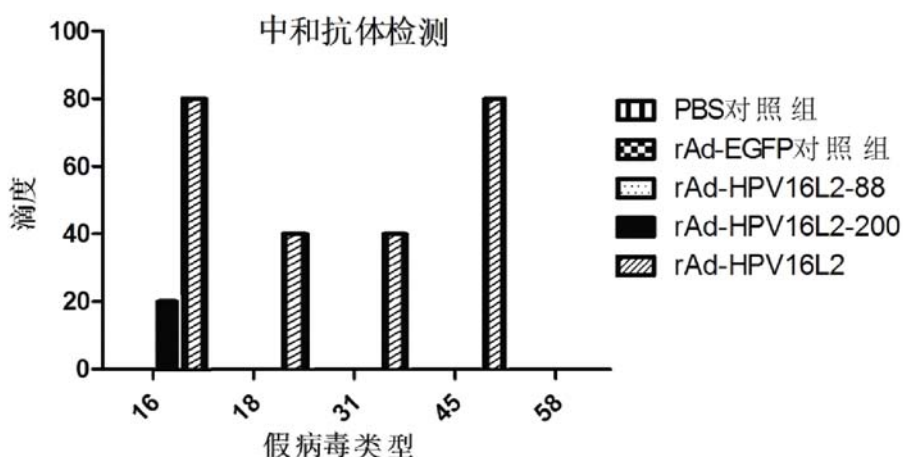


图 4-5 HPV假病毒检测重组腺病毒交叉中和实验结果

Figure 4-5 HPV pseudovirus cross-neutralization assay results of recombinant adenovirus

#### 4.3.2 T细胞表位肽预测结果

本课题通过生物信息学的方法预测了HPV16L2的T细胞表位肽，本次实验购买的BALB/c小鼠的MHC I类抗原为H-2K<sup>d</sup>，预测时选择的网站为[http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)（Bimas）和<http://www.syfpeithi.de/home.htm>（Syf），分别预测长度为9肽和10肽的HPV16L2 T细胞表位肽，综合两个网站的数据进行分析比较后，针对于HPV16L2确定了6条T细胞表位肽，见表4-1。

表 4-1 HPV16 L2 的 T 细胞表位肽预测结果

Table 4-1 T cell epitope prediction of HPV16 L2

| Number | Start Position | Sequence   | Length | Score    | Source |
|--------|----------------|------------|--------|----------|--------|
| 1      | 392            | GYIPANTTI  | 9      | 5760.000 | Bimas  |
| 2      | 446            | FYLHpSYMYL | 10     | 5760.000 | Bimas  |
| 3      | 241            | AFVTTPTKL  | 9      | 2764.800 | Bimas  |
| 4      | 266            | LYFSsNDNSI | 10     | 3456.000 | Bimas  |
| 5      | 180            | HFTLSSSTI  | 9      | 960.000  | Bimas  |
| 6      | 71             | GYIPLGTRP  | 9      | 21       | Syf    |

#### 4.3.3 细胞免疫结果

4.3.3.1 T细胞表位肽的筛选 为确定网站预测的6条T细胞表位肽中刺激T细胞分泌IFN- $\gamma$ 效果最好的多肽，选择实验组中5只小鼠的脾淋巴细胞分别加入6条HPV16L2的T细胞表位肽，对每条肽设置一个复孔。进行ELISPOT检测见图4-6，编号为1和2的多肽刺激产生了的斑点较多，并且与其他4条的肽的刺激效果存在显著差异（ $P < 0.05$ ），因此可以确定1和2即为HPV16L2的T细胞表位。同时结

果显示，HPV16L2的T细胞表位主要为与L2的C端。

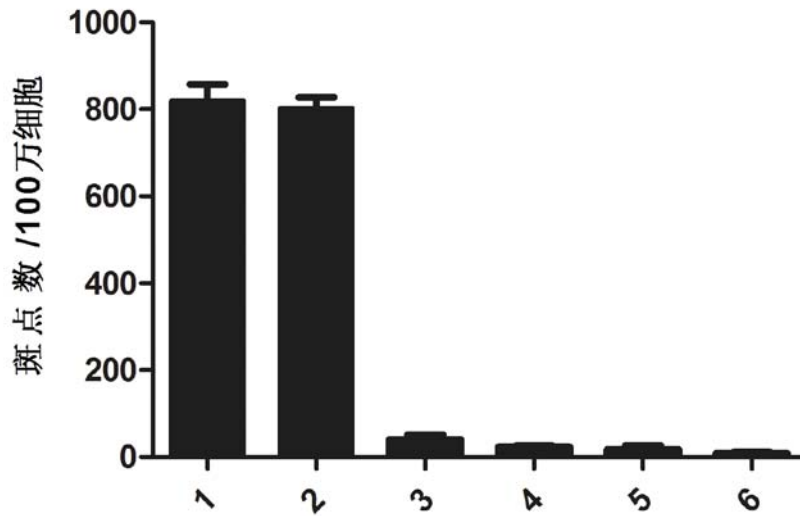


图4-6 HPV16L2 T细胞表位的确定

Figure 4-6 Identification of HPV16L2 T cell epitope

4.3.3.2 重组疫苗的免疫结果 小鼠在重组蛋白疫苗第二次加强免疫后一周和重组腺病毒加强免疫后一周取脾进行ELISPOT检测，检测时使用的刺激肽为编号为1的预测多肽（每条单肽终浓度6 g/ml）。ELISPOT检测结果如4-7和4-8，可以看出，重组腺病毒疫苗rAd5-HPV16L2-88、rAd5-HPV16L2-88、重组蛋白疫苗PTD-HPV16L2-200和重组蛋白疫苗HPV16L2并未诱导产生特异性细胞免疫，与对照组不存在统计学上的差异。而含有密码子优化型HPV16L2全长基因的重组腺病毒疫苗rAd5-HPV16L2h则诱导出强烈的特异性细胞免疫应答，ELISPOT斑点数均值可达870/10<sup>6</sup>细胞。

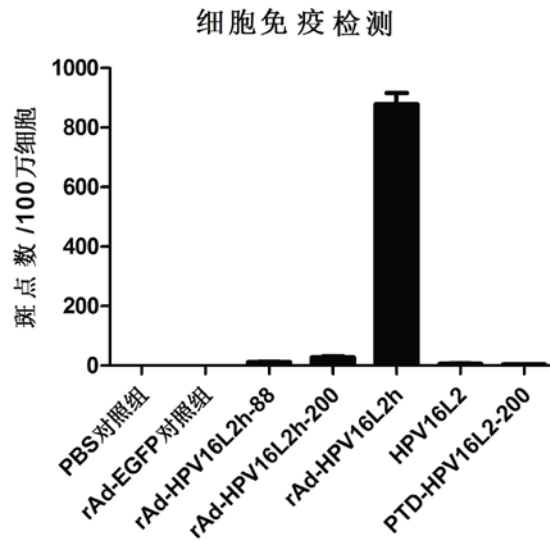


图4-7 重组腺病毒刺激特异性细胞免疫的结果

Figure 4-7 The results of special cellular immune induced by recombinant adenovirus

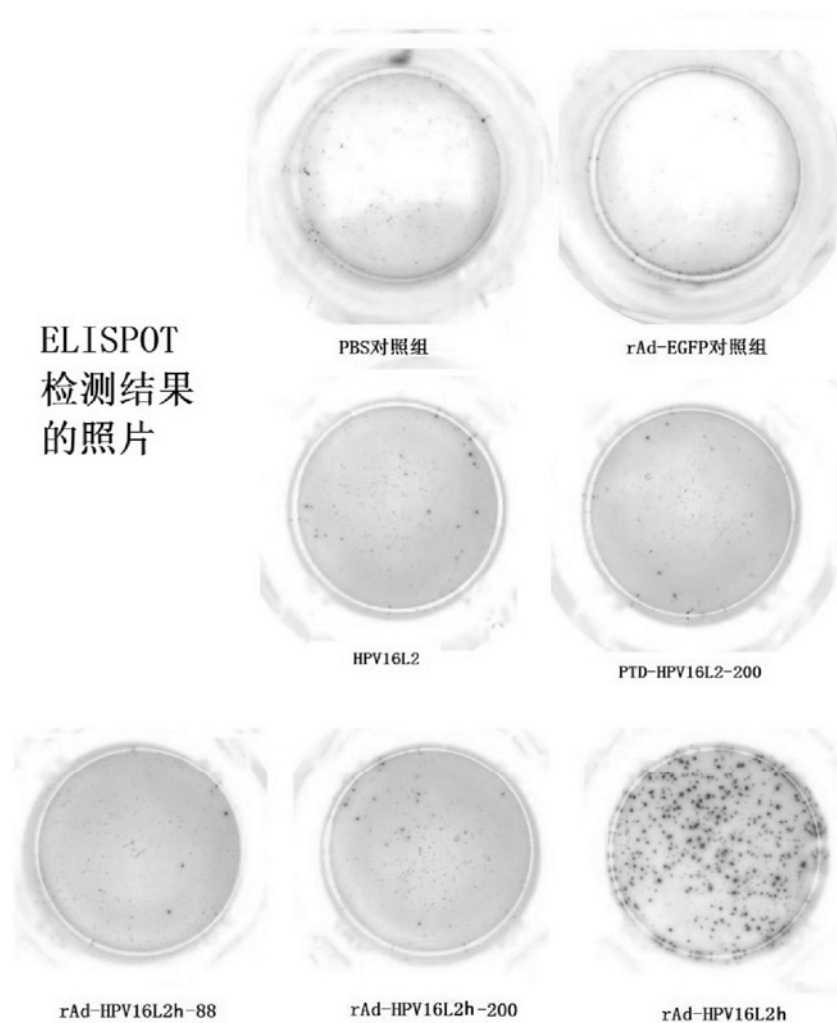


图4-8 ELISPOT 检测照片  
Figure 4-8 Photos of ELISPOT

#### 4.4 本章小结

本章使用制备的重组蛋白疫苗和重组腺病毒疫苗分别免疫小鼠，并使用假病毒中和滴定检测体液免疫效果，使用ELISPOT方法检测细胞免疫效果。结果发现：

(1) 间接ELISA检测结果显示，各重组蛋白疫苗均可诱导产生特异性L2血清抗体，抗体滴度与抗原大小呈正相关性。

(2) 不同蛋白疫苗诱导产生的中和抗体水平差异较大，PTD融合L2各肽段组除个别HPV型别外普遍增强了疫苗的交叉保护效力；PTD与HPV16L2 N端片段混合疫苗没有或仅能诱导滴度很低的中和抗体。

(3) 相对于L2全长蛋白疫苗诱导产生的中和抗体在总抗体中的比例(2.5%)，PTD与HPV16L2 N端片段融合蛋白疫苗可显著提高特异性抗体的“质

量”，中和抗体比例提升至10%~20%。

(4) rAd5-HPV16L2h重组腺病毒疫苗可以诱导产生针对HPV16，HPV18，HPV31和HPV45的中和抗体，滴度分别达到了80、80、40、80，但针对各HPV型别的交叉中和抗体滴度均不及L2全长蛋白疫苗。。

(5) rAd5-HPV16L2h重组腺病毒疫苗可以诱导产生强烈的HPV16L2特异性的细胞免疫反应，ELISPOT斑点数平均值为870/10<sup>6</sup>细胞。

## 结 论

本文中依据分子生物学、细胞生物学等方法分别构建了两种融合蛋白（PTD-HPV16L2-88和PTD-HPV16L2-200）、三种混合蛋白（PTD:HPV16L2-88=1:1、PTD:HPV16L2-88=9:1和PTD:HPV16L2-200=18:1）以及HPV16L2-88、HPV16L2-200和HPV16L2蛋白等9种不同形式重组蛋白疫苗，以及含有HPV16L2 N段及全长基因的重组腺病毒疫苗，并通过动物实验对上述各疫苗的体液及细胞免疫应答进行了系统评价，得出以下结论：

（1）重组蛋白使用大肠杆菌ROSETTA（DE3）表达系统在1mM的IPTG条件下诱导表达3h可以达到最佳的表达效果。

（2）间接ELISA结果显示，不同的重组蛋白疫苗均可诱导产生特异性血清抗体，抗体滴度与L2抗原大小呈正相关，对于L2（1-88）肽段，PTD无论是融合还是混合均未显示出明显的免疫增强效应，而L2（1-200）肽段，PTD融合表达可显著提高L2肽段的体液免疫效果，这提示，PTD免疫增强效果与L2肽段的大小呈正相关。PTD与L2全长蛋白融合是否能进一步提高其血清抗体滴度还有待后续实验的证明。

（3）融合蛋白疫苗（PTD-HPV16L2-88和PTD-HPV16L2-200）、混合蛋白疫苗（PTD:HPV16L2-200=18:1）及HPV16L2-200和HPV16L2组免疫小鼠都可以产生中和非同源假病毒（HPV18、HPV31、HPV45和HPV58）的交叉中和抗体，但各疫苗组针对不同HPV型别的中和抗体滴度存在显著差异，PTD融合L2各肽段组除个别HPV型别外普遍增强了疫苗的交叉保护效力。中和抗体在总抗体中的比例可作为衡量体液免疫“质量”的一个指标，各免疫组计算结果显示，虽然L2全长蛋白疫苗诱导产生的总抗体水平明显高于其他实验组，但中和抗体比例仅有2.5%；而PTD与L2N端片段融合蛋白疫苗诱导产生的总抗体水平虽然远不及L2全长蛋白疫苗的水平，但其中的中和抗体比例却提升至10%~20%，这提示PTD与L2N端片段融合蛋白疫苗诱导产生的抗体“质量”明显优于L2全长蛋白疫苗。

（4）rAd5-HPV16L2h重组腺病毒疫苗可以诱导产生针对HPV16，HPV18，HPV31和HPV45的交叉中和抗体，但是中和抗体水平远远低于重组蛋白疫苗。而rAd5-HPV16L2h-88和rAd5-HPV16L2h-200重组腺病毒疫苗均未能诱导产生明显的交叉中和抗体。

（5）rAd5-HPV16L2h重组腺病毒疫苗可诱导产生强烈的HPV16L2特异性的细胞免疫反应，ELISPOT检测特异性斑点数不低于870/10<sup>6</sup>细胞。而rAd5-

HPV16L2h-88 和 rAd5-HPV16L2h-200 重组腺病毒疫苗及 PTD-HPV16L2-200 和 HPV16L2 全长重组蛋白疫苗均未能诱导产生特异性的细胞免疫应答。

(6) 综上，重组蛋白疫苗及重组腺病毒疫苗在免疫效果上存在互补关系，二者结合使用将能提供更为全面的保护效力。



## 参 考 文 献

- [1] Markowitz L E, Dunne E F, Saraiya M, et al. Quadrivalent human papilloma virus vaccine: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP) [R]. Atlanta: U. S. CDC-MMWR, 2007.
- [2] Wang Q, Griffin H, Southern S, et al. Functional analysis of the human papilloma virus type 16 E1-E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization[J]. J Virol, 2004, 78 (2): 821-833.
- [3] Maj L E, Hervé D. HPV detection methods and genotyping techniques in screening for cervical cancer[J]. Annales de Pathologie, 2012, 32 (6): 15-23.
- [4] Ha L V, Andrew G, Sikora, et al. HPV-induced oropharyngeal cancer, immune response and response to therapy[J]. Cancer Letters, 2010, 228 (2): 149-155.
- [5] Park P. The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus replication and associates with the viral E1 helicase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 8700-8704.
- [6] Frattini M G. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA 1994, 91: 12398-12402.
- [7] Chye L T, Jayantha G, Deborah L. HPV-18 E2-E4 chimera: 2 new spliced transcripts and proteins induced by keratinocyte differentiation[J]. Virology, 2012, 429 (1): 47-56.
- [8] Mi-Kyung K, Hee S K, Su-Hyeong. Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment[J]. Biochemical Pharmacology, 2010, 80 (12): 1930-1935.
- [9] 赵思成, 骆丹. HPV E6 蛋白及其在致癌过程中作用的靶蛋白[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009 (2): 225-228.
- [10] 靳华, 王飞. HPV E7 基因在细胞周期中的作用[J]. 中国医学文摘, 2011 (28): 12-13.
- [11] Lace M J, Isacson C, Anson J R, et al. Up stream regulatory region alterations found in human papillomavirus type 16 (HPV-16) isolates from cervical carcinomas increase transcription, ori function, and HPV immortalization capacity in culture[J]. J Virol, 2009, 83: 7457-7466.
- [12] Chai L P, Françoise T. Human papillomavirus proteins as prospective therapeutic targets[J]. Microbial Pathogenesis, 2013, 58: 55-65.
- [13] Rachel R, Alison F, Sam H. Human Papillomavirus Integration and its Role in Cervical Malignant Progression[J]. The Open Clinical Cancer Journal, 2011, 5: 1-7.
- [14] Walboomers J M, Jacobs M V, Manos M M, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J]. Journal of Pathology, 1999, 189 (1): 12-19.

- [15] Bolhassani A, Mohit E, Rafati S. Different Spectra of Therapeutic Vaccine Development Against HPV Infections[J]. *Hum Vaccin*, 2009, 5 (10): 671-689 .
- [16] Munoz N, Bosch F X, Sanjos D S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer[J]. *New England Journal of Medicine* 2003, 348 (6): 518-527.
- [17] Su J H, Wu A, Scotney E, et al. Immunotherapy for Cervical Cancer: Research Status and Clinical Potential. *BioDrugs*, 2010, 24 (2): 109-129.
- [18] Julianne G, Allison N, Irene S. Monitoring the safety of quadrivalent human papillomavirus vaccine: Findings from the Vaccine Safety Datalink[J]. *Vaccine*, 2011, 9: 8279-8284.
- [19] Lawrence S, Owen K, Wilbyb, et al. Willoughby Evaluation of the intramuscular administration of Cervarix™ vaccine on fertility, pre- and post-natal development in rats[J]. *Reproductive Toxicology*, 2011, 31: 111-120.
- [20] Sigrid C, Holmgren, Nicole A, et al. The Minor Capsid Protein L2 Contributes to Two Steps in the Human Papillomavirus Type 31 Life Cycle[J]. *Virology*, 2005, 79: 3938-3948.
- [21] Pereira R, Hitzeroth II, Rybicki E P. Insights into the role and function of L2, the minor capsid protein of papillomaviruses[J]. *Arch Virology*, 2009, 154: 187-197.
- [22] Kawana K, Matsumoto K, Yoshikawa H, et al. A surface immunodeterminant of Human Papillomavirus type 16 minor capsid protein L2[J]. *Virology*, 1998, 245: 353-359.
- [23] Kawana K, Yoshikawa H, Taketani Y, et al. Common neutralization epitope in minor capsid protein L2 of Human Papillomavirus types 16 and 6[J]. *Virology*, 1999, 73: 6188-6190.
- [24] Inga I, Hitzeroth, Jo-Ann S, et al. Immunogenicity of an HPV-16 L2 DNA vaccine[J]. *Vaccine*, 2009, 27: 6432-6434.
- [25] Ivonne R, Angelo B, Nadia M, et al. Potent anti-HPV immune responses induced by tandem repeats of the HPV16 L2 (20-38) peptide displayed on bacterial thioredoxin[J]. *Vaccine*, 2009, 27: 1949-1956.
- [26] Kondo K, Ishii Y, Ochi H, et al. Neutralization of HPV16, 18, 31 and 58 pseudovirions with antisera induced by immunizing rabbits with synthetic peptides representing segments of the HPV16 minor capsid protein L2 surface region[J]. *Virology*, 2007, 358: 266-272.
- [27] Palmer K E, Benko A, Doueette SA, et al. Protection of rabbits against cutaneous PV infection using recombinant tobacco mosaic virus containing L2 capsid epitopes[J]. *Vaccine*, 2006, 24: 5516-5525.
- [28] Hannah A, Ratish G, Balasubramanyam K, et al. Protection against heterologous human papillomavirus challenge by a synthetic lipopeptide vaccine containing a broadly cross-neutralizing epitope of L2[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(15): 5850-5855.

- [29] Green M, Loewenstein P M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein[J]. *Cell*, 1988, 55 (6): 1179-1188.
- [30] Frankel A D, Pabo C O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus[J]. *Cell*, 1988, 55 (6): 189-1193.
- [31] Fawell S, Seery J, Daikh Y, et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91 (2): 664-668.
- [32] Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the nucleus[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272 (25): 16010-16017.
- [33] Derossi D, Joliot A H, Chassaing G, et al. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269 (14): 10444-10450.
- [34] Elloit G, O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein[J]. *Cell*, 1997, 88 (2): 223-233.
- [35] Frankel D, Pabo O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus[J]. *Cell*, 1988, 55 (6) : 1189-1193.
- [36] Ho A, Steven R, Schwarze, et al. Synthetic Protein Transduction Domains: Enhanced Transduction Potential in Vitro and in Vivo[J]. *Cancer Res*, , 61: 474-477.
- [37] Console S, Marty C, Garcia-Echeverria C, et al. Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (37): 35109-35114.
- [38] Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, et al. Arginine-rich peptides: An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (8): 5836-5840.
- [39] Prochiantz A. Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12 (4): 400-406.
- [40] Derossi D, Chassaing G, Prochiantz A. Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery [J]. *Trends Cell Biol*, 1998, 8 (2): 84-87.
- [41] Chen X H, Lai J L, Pan Q C, et al. The delivery of HBcAg via Tat-PTD enhances specific immune response and inhibits Hepatitis B virus replication in transgenic mice[J]. *Vaccine* 2010, 28: 3913-3919.
- [42] Derossi D, Calvet S, Trembleau A, et al. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271 (30): 18188-18193.
- [43] Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus[J]. *J Biol*

Chem, 1997, 272 (25): 16010-16017.

## 攻读硕士学位期间所申请的发明专利

1. 曾毅,周玉柏,郭艳涛,李泽琳. 重组 HPV16L2 蛋白疫苗及其制备方法: 中国,201210054370.4 [P].2012-09-26. (发明专利进入实审)
2. 周玉柏,曾毅,郭艳涛,李泽琳,李劲涛. HPV16L2 重组腺病毒疫苗的制备方法: 中国, 201310111951.1 [P].2013-04-02. (发明专利已受理)



## 致 谢

值此论文完成之际，衷心感谢导师周玉柏副研究员的悉心指导和殷切关怀！

衷心感谢曾毅院士，先生严谨的治学态度和宽厚的长者风范使我终生难忘！感谢李泽琳教授在我的学习和生活中给予的指导和无微不至的关怀！

感谢杨怡姝老师、艾萍老师、刘伟老师在工作上给予的指导和帮助！

感谢程江、王晓雯、黄剑、徐婷婷、方军、刘海庭、何一苇、侯雪莹等同学在工作、学习中对我的帮助和关心。正是大家无私的帮助才使本文的研究工作得以及时完成！

在此对所有关心和帮助过我的老师和同学一并致以最诚挚的谢意。最后我要感谢我的家人，他们的支持和理解给了我最大的动力。