

中文图书分类号: Q78  
密 级: 公开  
UDC: 577  
学 校 代 码: 10005



# 硕士学位论文

## MASTERAL DISSERTATION

论 文 题 目: HPV16L1 食管癌疫苗免疫效果的研究

论 文 作 者: 方军

学 科: 生物化学与分子生物学

指 导 教 师: 周玉柏 副研究员

论文提交日期: 2014 年 6 月

UDC: 577  
中文图书分类号: Q78

学校代码: 10005  
学 号: S201115012  
密 级: 公开

# 北京工业大学理学硕士学位论文

题 目: HPV16L1 食管癌疫苗免疫效果的研究

英文题目: THE IMMUNOLOGICAL STUDY OF  
HPV16L1 ESOPHAGEAL CANCER  
VACCINES

论 文 作 者: 方军

学 科 专 业: 生物化学与分子生物学

研 究 方 向: 病毒学与药理学

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: 2014 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: 方军

日期: 2014 年 6 月 7 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: 方 军

日 期: 2014年6月7日

导师签名: 周玉柏

日 期: 2014年6月7日

## 摘要

全世界每年约有 30 万人死于食管癌。我国食管癌发病率居世界第一位,平均每年死亡 15 万人左右。调查资料显示,食管癌是多种因素长期协同作用所致的疾病,具体因素包括化学因素、环境因素、生物因素以及不良生活习惯等。越来越多的证据表明,人乳头瘤病毒 (Human papillomavirus,HPV)与食管癌的发生密切相关,是其重要的病毒学病因。因此,抗 HPV 的疫苗也能发挥防治食管癌的作用。

HPV 疫苗分为预防性和治疗性疫苗两种。预防性疫苗诱导机体产生中和抗体,对相应型别的高危类型的 HPV 预防率 100%,但是针对其他型别 HPV 无预防作用,也不能消除体内已感染的 HPV 的细胞,无治疗功能。治疗性疫苗则通过激活细胞免疫来特异性地清除被病毒感染的细胞及相应的癌细胞,达到治疗疾病的目的。目前,治疗性疫苗多集中于针对 E6/E7 为靶抗原,但是 E6/E7 为癌基因。虽可通过改造去除转化活性,但安全性仍存在隐患,且改造后的 E6/E7 免疫原性明显低于野生型。本课题组的前期研究发现,在食管癌组织及分离的细胞株中检测到 L1 蛋白的表达,这为以 L1 蛋白为靶抗原的治疗性疫苗的开发提供了实验依据,且 L1 为结构蛋白,安全性好是理想的候选疫苗的靶蛋白。

本课题组构建了含有 HPV16 L1 基因的重组 DNA、重组腺病毒和重组腺相关病毒疫苗,并用制备的疫苗序贯重复免疫小鼠,分别通过假病毒中和滴定和酶联免疫斑点法检测疫苗特异性体液及细胞免疫应答。结果显示,用活体基因导入仪免疫重组 DNA 疫苗与普通注射相比细胞免疫增强 5 倍。重组腺相关病毒、重组腺病毒、重组 DNA 疫苗单独免疫小鼠均可产生强烈的体液免疫和细胞免疫反应,但持续时间较短,末次免疫后 11 周检测不到特异性细胞和体液免疫反应。DNA、重组腺相关病毒、重组腺病毒疫苗序贯重复免疫组可诱导更强而持久的特异性体液及细胞免疫应答,虽然在加强免疫后反应呈下降趋势,但在免疫后期,其下降速率明显变慢,免疫反应保护效力可维持更长的时间,显示了序贯重复免疫反应策略的有效性。

**关键词:** 人乳头瘤病毒; 食管癌; 疫苗; 细胞免疫

## Abstract

There are over 300 thousand patients died of esophageal cancer worldwide every year. In our country, the morbidity of esophageal rank first in the world, approximately 150 thousand patients died per year. Investigation data show esophageal cancer may be caused by multifactorial synergy, including chemical factors, environmental factors, biological factors, genetic factors and the unhealthy living habits. Accumulating evidence shows that HPV is tightly associated with esophageal cancer, and considered as an important pathogenic factor of this disease. For this reason, anti-HPV vaccines could also be effectively prophylactic and therapeutic agents for esophageal cancer.

HPV vaccines are classified to either prophylactic vaccines or therapeutic vaccines. Prophylactic vaccines based on HPV L1 VLPs can induce neutralizing antibodies, providing 100% protective effect only for corresponding types of HPVs, while immunity for other HPVs is poor. Furthermore, prophylactic vaccines cannot clear the infected cells and have no curative effect. Therapeutic vaccines, in contrast, can only eliminate the infected cells and HPV-related tumors by inducing specific cellular immunological responses. At present, the target proteins are focused on E6/E7, but E6 and E7, as oncogenes, have potential carcinogenic risk. Although transformation activity can be removed by the gene mutation, the safety is not ideal. Further, the immunogenicity of mutant E6/E7 is much lower than their wild-type counterparts. Previous studies by our group detected the expression of L1 in esophageal cancer tissues and isolated cell lines. This finding provided the rational for developing therapeutic HPV L1 vaccines. Due to the potent immunogenicity and highly safe, HPV L1 is considered as an ideal target protein for novel HPV therapeutic vaccines.

In this study, the recombinant DNA, adenovirus and adeno-associated virus vaccines containing codon-modified HPV L1 gene were constructed, and mice were inoculated with the vaccines by repeat and sequential immunization regime. The specific humoral and cellular immunity was evaluated by pseudovirus neutralization assay and ELISPOT respectively. The results indicated that recombinant adeno-associated virus, adenovirus and DNA vaccines can induce specific humoral and cellular immune response in a short time and 11 weeks after the last immunization, specific immune responses were undetectable. Comparing with ordinary injection, gene transfer can further enhance the cellular immunity of recombinant DNA vaccine by 5 times. Combined immunization of mice with these vaccines by repeat and sequential regime can induce more potent and sustained specific humoral and cellular immunities. After the booster immunization the immune

response was decreased, but in the later phase of immunization, the decrease rate was slow, the protective efficacy can be maintained for a long period of time. It shows the sequential repeat immunization strategy is effective.

Keywords: HPV, esophageal cancer, vaccine, elispot

rAAV            Recombinant adeno-associated virus    重组腺相关病毒

IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$	$\gamma$ -干扰素
kb	Kilobases	千碱基对
kD	Kilodaltons	千道尔顿
AAV	Adeno-associated virus	腺相关病毒
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
VG	Vector genomes	病毒颗粒数
ITR	Inverted terminal repeated	反向末端重复序列
rAdv	Recombinant adenovirus	重组腺病毒
PVDF	Poly vinylidene fluoride	聚偏氟乙烯
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
rpm	Revolutions per minute	每分钟转速
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
SEM	Standard error of the mean	平均数的标准误差
VLPs	Virus-like particles	病毒样颗粒
RRS	Relative risk factors	相对危险因素
WB	Western blot	蛋白印迹
VLPs	Virus-like particles	病毒样颗粒
RRS	Relative risk factors	相对危险因素



摘要.....	I
Abstract.....	III
主要英文缩写词.....	V
第 1 章 绪论.....	1
1.1 HPV 及其研究现状.....	1
1.1.1 HPV 与相关疾病.....	1
1.1.2 HPV 疫苗研究进展.....	2
1.1.3 方向和展望.....	4
1.2 酶联免疫斑点反应.....	5
1.3 序贯重复免疫.....	7
1.4 本课题研究内容.....	7
1.5 技术路线.....	8
第 2 章 HPV16 L1 腺相关病毒和 DNA 疫苗的扩增纯化 .....	9
2.1 实验材料.....	9
2.1.1 质粒、细胞和菌株.....	9
2.1.2 工具酶及主要试剂.....	9
2.1.3 主要仪器设备.....	9
2.2 实验方法.....	10
2.2.1 重组 DNA 疫苗的扩增和纯化 .....	10
2.2.2 pAAV-16L1 重组质粒转化、提取和鉴定 .....	11
2.2.3 重组腺相关病毒包装和纯化.....	13
2.3 实验结果和讨论.....	16
2.3.1 pAAV-16L1 重组质粒酶切鉴定和测序结果 .....	16
2.3.2 pAAV-16L1 重组质粒表达蛋白鉴定 .....	17
2.3.3 纯化的 rAAV2/1-mod.HPV16L1 衣壳蛋白鉴定 .....	18
2.3.4 纯化的 rAAV2/1-mod.HPV16L1 电镜观察 .....	18
2.3.5 纯化的 rAAV2/1-mod.HPV16L1 滴度测定 .....	19
2.4 本章小结.....	19
第 3 章 重组疫苗免疫效果的研究 .....	21
3.1 实验材料.....	21
3.1.1 细胞和疫苗 .....	21
3.1.2 要试剂.....	21

3.1.3 主要仪器设备 .....	21
3.1.4 实验动物.....	22
3.2 实验方法.....	22
3.2.1 动物实验的设计 .....	22
3.2.2 多载体疫苗免疫反应的检测.....	24
3.3 实验结果和讨论.....	28
3.3.1 T 细胞表位肽 .....	28
3.3.2 活体基因导入仪与普通注射免疫效果比较.....	29
3.3.3 不同剂量重组腺病毒疫苗细胞免疫效果的比较.....	31
3.3.4 HPV16L1 单种疫苗接种诱导的细胞免疫反应 .....	31
3.3.5 HPV16L1 多载体疫苗接种诱导的细胞免疫反应 .....	33
3.3.6 HPV16L1 特异性细胞免疫反应的动态变化趋势 .....	36
3.3.7 HPV16L1 单种疫苗接种诱导的体液免疫反应 .....	38
3.3.8 HPV16L1 多载体疫苗接种诱导的体液免疫反应 .....	40
3.3.9 IIPV16L1 特异性体液免疫反应的动态变化趋势 .....	42
3.4 本章小结.....	44
结论.....	45
参考文献.....	47
攻读硕士学位期间的主要成果.....	51
致谢.....	53

## 第1章 绪论

### 1.1 HPV 及其研究现状

#### 1.1.1 HPV 与相关疾病

人乳头瘤病毒 (Human papillomavirus, HPV) 是一种噬上皮性DNA病毒, 呈无包膜的二十面体结构<sup>[1]</sup>, 基因组是双链环状DNA, 大小为7.2-7.8kb。HPV基因组编码区分为早期转录区、晚期转录区和非编码区。早期转录区称E区, 包括E1-E7基因。其中E1和E2调控病毒DNA复制, E3介导病毒RNA转录, E4负责细胞骨架重组, E5、E6、E7参与细胞转化。晚期转录区L区, 编码2个衣壳蛋白, 即主要衣壳蛋白L1和次要衣壳蛋白L2, 组成病毒的衣壳, 与病毒的增殖有关<sup>[2]</sup>。L1可单独或与L2共同在体外自行组装成病毒样颗粒 (Virus like particles, VLPs)。病毒非编码区主要参与病毒的转录与复制的调控。

目前, 已发现的HPV基因型有130多种<sup>[3]</sup>, 按其致癌特性分为高危型和低危型两类<sup>[4]</sup>。其中低危型的HPV (如HPV11、HPV6) 与人的生殖器湿疣的发生有关, 其致病机理是HPV感染细胞并进入细胞核之后, 可刺激细胞迅速地分裂, 并伴随着细胞的分裂病毒大量的增殖与传播, 从而形成特征性的乳头瘤结构。高危型HPV (如HPV16、HPV18) 与多种恶性肿瘤 (包括宫颈癌、食管癌、乳腺癌等) 有密切相关<sup>[5]</sup>, 其致病机理是HPV基因组和宿主DNA基因组发生整合, HPV的癌基因E6/E7编码的癌蛋白同宿主细胞的抑癌蛋白p53结合, 致使p53蛋白产物降解, 导致p53调控细胞周期的功能缺失, 从而正常细胞向肿瘤细胞转化, 最终导致组织癌变<sup>[6-8]</sup>。

宫颈癌在癌症死亡率中位居前列。全球每年新感染病例51万, 有28万人死于该病, 我国每年新增病例约13.15万, 占全球发病数量的四分之一。现已明确, 高危型HPV是宫颈癌的病因<sup>[9-13]</sup>。证据如下: (1) 在宫颈癌活检标本中可检测到HPV-DNA; (2) 通过病例对照组研究发现, 宫颈鳞癌多由HPV16型感染引起, 宫颈腺癌多由HPV18型感染引起, 数种高危型HPV引起宫颈鳞癌和腺癌的相对危险因子 (Relative risk factors, RRS) 大于70%<sup>[14]</sup>; (3) 群体研究表明, HPV感染女性的RRS约为100%。因此, 针对HPV的疫苗可用于防治宫颈癌

食管癌是严重威胁人类身体健康的常见恶性疾病。世界各国的发病率和死亡率差异很大。我国也是世界上食管癌高发地区之一, 山西、河北和河南三省交界的太行山地区的食管癌发病率和死亡率最高, 平均每年死亡大约15万人。调研资

料表明食管癌的致病因素包括化学、环境、生物、遗传因素以及不良生活习惯等<sup>[15]</sup>。1969年, 曾毅在食管癌高发地区河南林县成立实验室并建立了一个食管癌细胞株 (EC109), 并且在此株细胞中发现了HPV18的存在。上世纪80年代, syrjane提出了HPV导致食管鳞癌, 在形态学角度存在相关性的观点<sup>[16]</sup>。并且食管癌组织形态学改变与HPV导致的生殖器疣相似。后续的研究显示, 食管癌组织可检出HPV的核酸和蛋白的表达。然而, HPV检出率差异很大, 从0~100%均有研究报道。这可能是由样本的抽样调查方法, 样本量的大小, HPV检测方法上的差异所致。Gupta 等以 HPV L1 区基因作为引物序列的聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)技术研究印度食管癌与 HPV 关系显示: HPV阳性率为17/49(34.7%)。本课题组在全国各地开展的分子流行病学调查资料显示, 食管癌组织和细胞株中60~80%带有HPV不同亚型的病毒, 其中16, 18型可达60%左右; HPV18E6E7能诱发人胚食管正常上皮细胞永生化和癌变, 且促癌化合物、化学致癌物、三氧化二砷及放射线等均可加速HPV E6E7诱发的永生化细胞的癌变。综合以上结果, 我们得出结论, 食管癌的发生是一个多因素长期协同作用的结果, 但高危型HPV是食管癌的重要病毒学病因。因此研发针对HPV的疫苗不仅能防治宫颈癌, 也能预防和治疗食管癌。

#### 1.1.2 HPV 疫苗研究进展

HPV 疫苗分为预防性疫苗和治疗性疫苗。目前 HPV 预防性疫苗有两种产品已经上市销售, 2006 年默克公司研发的四价疫苗 (HPV6, 11, 16 和 18 的 VLPs) 被美国食品和药品监督管理局批准上市<sup>[17]</sup>; 2008 年葛兰素史克公司生产的二价疫苗 (HPV16、18 的 VLPs) 也被批准上市, 这两种预防性疫苗是由病毒衣壳蛋白 L1 组装成 VLPs。VLPs 具有与完整的 HPV 相同的抗原空间表位, 可诱导机体产生高滴度的血清中和抗体<sup>[18,19]</sup>, 从而阻止病毒感染。但是 L1 VLPs 疫苗具有型别特异性, 不同基因型的 L1 VLPs 疫苗之间交叉保护效果不理想。

近年来发现 L2 蛋白的 N 端有一段富含正电荷的氨基酸区域, 具有交叉中和表位, 该区域可以和带负电荷的 HPV 的核酸非特异结合, 促进 HPV 的核酸包装从而提高病毒的包装效率<sup>[20]</sup>。L2 蛋白不仅参与病毒的包装过程, 在病毒感染过程中还参与病毒颗粒的核定位<sup>[21]</sup>。同时研究表明, L2 蛋白的氨基酸序列高度保守, 可以在临床上常见的 HPV 各型别间产生广泛的交叉反应, 因此, 相比 L1 VLPs 而言 L2 疫苗能预防更多的高危型 HPV, L2 成为目前研究预防性 HPV 疫苗的热点之一<sup>[22-24]</sup>。虽然 L2 可诱导针对不同型别的 HPV 产生交叉性中和抗体。但其免疫原性与 L1 VLPs 疫苗相比较弱, 并且中和抗体滴度过低。因此, 目前的研究方向集中于提高 L2 疫苗的免疫原性<sup>[25]</sup>。

HPV 治疗性疫苗通过激活细胞免疫来特异性地清除被 HPV 感染的细胞。目前治疗性疫苗主要有以下几种形式:

(1) 活载体疫苗可分为细菌性载体疫苗和病毒性载体疫苗两类。细菌性载体疫苗有李斯特菌乳酸链球菌、植物乳杆菌和沙门菌等这几类载体疫苗<sup>[26,27]</sup>。病毒性载体疫苗有腺病毒载体疫苗、腺相关病毒载体疫苗、安卡拉痘病毒载体疫苗、慢病毒载体疫苗。TA-HPV 是一种重组牛痘疫苗, 表达 HPV16/18 的 E6 和 E7, II 期临床试验表明, 其免疫效果很好<sup>[28]</sup>。

腺相关病毒 (Adeno-associated virus, AAV) 属依赖病毒属的微小病毒科, 是无包膜单链线状 DNA 复制缺陷型病毒, 外包二十面体衣壳蛋白, 直径 20nm,<sup>[29]</sup> 重组腺相关病毒载体具有无致病性、免疫原性低、长期表达外源基因、可整合到染色体中、宿主范围广、基因组结构简单和理化性质稳定能转染分裂和非分裂细胞等显著特点, 被认为是最具发展潜力载体<sup>[30]</sup>。流行病学资料表明, 世界上大多数人曾经感染过 2 型 AAV<sup>[31]</sup>。人体内普遍存在 AAV2 抗体, 因此用重组 AAV2 作载体安全性有保证。为避免机体对 AAV2 载体的排斥反应, 目前多采用其他血清型的 AAV 作为载体。重组 AAV2/1 是一种杂合载体, 即使用 AAV2 的反向末端重复序列 (Inverted terminal repeated, ITR) 以及全部或部分 AAV2 的 rep 蛋白, 只是换上血清 1 型 AAV 的 cap 蛋白, 就可以得到具有 1 型的感染特征的杂合重组 AAV 载体, 提高对组织细胞的感染效率和治疗基因的表达水平。Liu<sup>[11]</sup>等把 Hsp70 和 HPV16 E7 基因构建到腺相关病毒载体上, 用该疫苗免疫小鼠后产生了良好的细胞免疫反应和体液免疫反应, 并且抑制了肿瘤生长。由于 AAV 载体不会诱导产生强的针对 AAV 感染细胞的 CTL 反应, 所以基因的表达可以持续很长时间, AAV 感染的骨骼肌细胞中基因的持续表达甚至超过 1.5 年。

腺病毒 (Adenovirus, Adv) 是一种线性无包膜双链DNA病毒, 在自然界中广泛分布。病毒颗粒直径为70-100nm, 呈20面立体对称结构。腺病毒能够感染分裂期和静止期细胞, 可在一些高度分化的细胞中增殖, 并能高效的复制和表达其基因。腺病毒载体容量大, 并可高效感染哺乳动物细胞, 能够获得高滴度的病毒。腺病毒对免疫功能低下的人群感染机会较大, 容易在居住密集的人群中引起急性发热性呼吸道疾病的暴发流行<sup>[32]</sup>。接种腺病毒疫苗后, 可获得黏膜免疫、体液免疫和细胞免疫在内的全面免疫<sup>[33]</sup>。腺病毒载体疫苗免疫机体后产生保护性中和抗体滴度高、速度快、时间持久, 并且腺病毒疫苗容易制备, 重组腺病毒基因不与受体细胞基因组发生整合, 具有良好的生物安全性<sup>[34]</sup>。

(2) DNA疫苗是指将编码抗原的基因构建在质粒载体上, 然后用携带目的基因的质粒免疫动物, 外源目的基因在动物体内表达, 激活动物的免疫系统, 从而诱导机体产生特异性的细胞免疫和体液免疫反应<sup>[35,36]</sup>。将含有HPV16型E7基因

构建在相应的表达质粒上, 用该DNA疫苗免疫小鼠后, 再用TC-1肿瘤细胞攻击小鼠后, 小鼠的成瘤率比未用该疫苗免疫降低50%<sup>[37]</sup>。DNA疫苗具有纯度高、易于制备、稳定性好, 并且不会产生针对DNA载体的中和抗体, 可以重复免疫<sup>[38]</sup>。然而普通肌肉注射存在缺陷, 肌细胞摄取DNA的效率极低, 肌细胞表面缺乏APCs激活T细胞的共刺激分子, 而肌肉组织中专职的APCs相对较少, 因此若要诱导有效的免疫应答, 需注射大量的DNA。为提高人体对DNA疫苗的免疫反应, 目前常采用体外电穿孔技术免疫DNA。

(3) 肽段疫苗该类疫苗安全、易于制作, 但免疫原性较弱, 且有主要组织相容性复合体 (Major histocompatibility complex, MHC) 限制, 一般要和佐剂一起使用才有效<sup>[39]</sup>。在HPV的E6、E7蛋白中, 已发现多个能激发细胞毒性的T细胞 (Cytotoxic t-lymphocyte, CTL) 的抗原表位。HPV16E7多肽仅能对有限的患者有效<sup>[40]</sup>, 可采用一些与其它HLA组织型有亲和性的较长的多肽片段。

(4) 治疗性蛋白疫苗安全不受MHC限制, 但该类疫苗免疫原性不高。治疗性融合蛋白疫苗E7可同时作用于5种高危型HPV, 该疫苗与受体的激动剂联合用药, 可刺激由于HPV致癌的小鼠产生细胞免疫反应<sup>[41]</sup>。Qian<sup>[42]</sup>改造的HPV16 E6/E7/Hsp70融合蛋白, 去除了E6和E7中分别与p53和pRb结合的位点, 在动物实验中对表达HPV16 E6、E7的TC-1肿瘤病患有显著的预防、治疗和抗转移作用。

(5) 树突状细胞 (Dendritic Cells, DC) 是人体内功能最强而且是唯一递呈蛋白质抗原并致敏初始T细胞的抗原递呈细胞, 是连接先天性免疫和后天性免疫的桥梁, 以DC为基础的肿瘤疫苗可显著诱导机体的抗肿瘤反应, 被认为是最佳的肿瘤治疗手段。用带有HPV16E6E7基因的重组腺病毒载体转染DC制备基因修饰的DC疫苗, 诱导CTL致使CaSki细胞出现凋亡<sup>[43]</sup>。Santin<sup>[44]</sup>等使用经HPV16、18型E7抗原冲击致敏的自体DC来免疫10例宫颈癌患者, 全部患者都产生了CD4<sup>+</sup>T细胞反应, 8名患者产生了不同数量的针对E7的特异性CD8<sup>+</sup>T细胞。

### 1.1.3 方向和展望

从目前的研究资料看, 基于HPV疫苗研制取得可喜的成果, 有很多已经处于临床实验阶段, 但是各种疫苗均有其缺点。

目前, 治疗性疫苗多集中于针对E6/E7为靶抗原, 但是E6/E7为癌基因。虽可通过改造去除转化活性, 但安全性仍存在隐患, 且改造后的E6/E7免疫原性明显低于野生型。本课题组的前期研究发现, 在食管癌组织及分离的细胞株中检测到L1蛋白的表达, 这为以L1蛋白为靶抗原的预防及治疗性疫苗的开发提供了实验依据, 且L1为结构蛋白, 安全性好是理想的候选疫苗的靶蛋白。

考虑到HPV各个疫苗的不同作用原理及其局限性, 研究中可采用不同疫苗序

贯重复免疫达到取长补短的效果。并且需进一步研究疫苗免疫反应的细胞学和分子生物学机制,采取适当的措施提高疫苗的免疫原性。治疗性HPV疫苗相对于传统治疗的巨大优势,目前存在的问题会逐步得到解决,因此治疗性疫苗具有很好的应用前景。

## 1.2 酶联免疫斑点反应

随着酶联免疫斑点技术(Enzyme-linked Immunospot Assay, ELISPOT)在生物学中广泛的应用,在体外检测各种细胞因子研究有了新的突破。以往研究免疫应答反应时常采用酶联免疫吸附法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测体液中游离的细胞因子(Cytokine, CK)或抗体,但用此检测方法不能准确的反映体内抗体的水平。80年代,国外研究者根据ELISA技术的基本原理,发明了固相的ELISPOT,可以在活细胞水平下检测CK或抗体。ELISPOT目前主要用于疫苗研究,自身免疫病研究、诊断,器官移植,免疫系统研究。

ELISPOT检测使单细胞分泌产物可视化,且敏感度高,比传统的ELISA最高达1000倍。一百万个细胞中只要有一个细胞分泌细胞因子,依然可以检测出。ELISPOT用较少的样本量就可以测试多种不同的抗原物质的反应。另外使用淋巴细胞做完ELISPOT实验,细胞的功能依然保存完好,可继续做下游实验。

ELISPOT 检测技术原理是将抗原或者特异性单抗预先包被在贴有聚偏氟乙烯(Polyvinylidene fluoride, PVDF)膜或硝酸纤维素膜的96孔板上,将一定量的抗原和免疫细胞加入微孔中,此时T细胞受抗原刺激后开始分泌细胞因子,预包被在PVDF薄膜上特异抗体捕获细胞因子。置于37℃含5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养16小时。微孔中的细胞被移除清洗后,被捕获的细胞因子可进一步使用生物素标记的二次抗体来标志,然后酶标亲和素再与生物素结合,最后再加入显色底物进行化学酶联显色,可在有相应抗体、细胞因子的位置产生约10-20mm大小有色斑点。每个斑点代表一个产生细胞因子的细胞。可直接在显微镜下人工计数或通过ELISPOT读板仪器对斑点进行计数。具体的实验原理和步骤如下图1-1所示,转自(<http://www.blood-com.cn/>)。

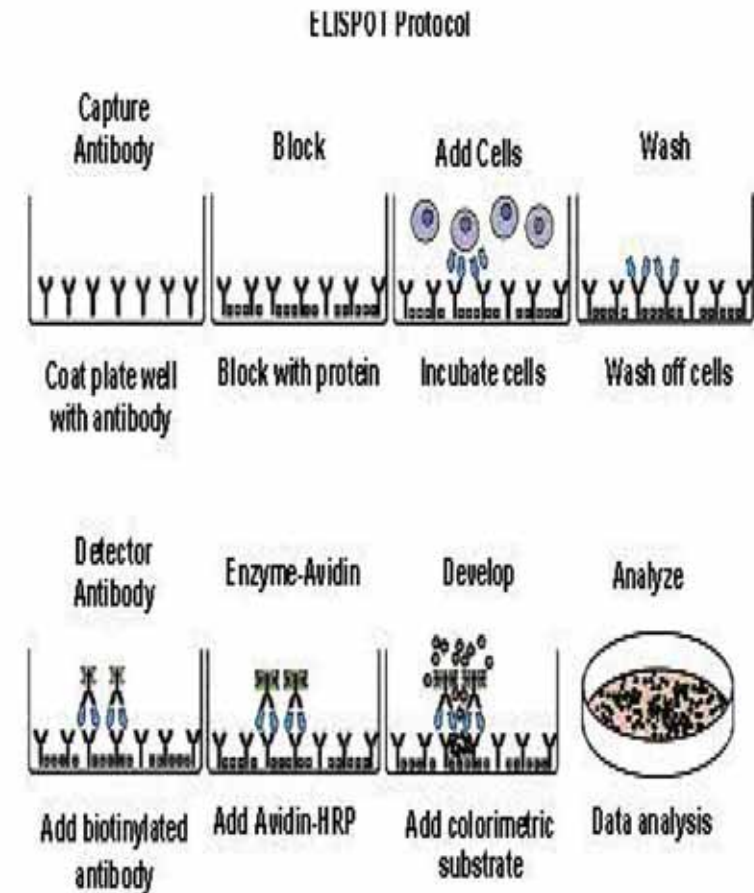


图1-1 ELISPOT实验步骤

Figure 1-1 ELISPOT assay procedure

### 1.3 序贯重复免疫

研究发现免疫动物时使用一种疫苗只免疫一次效果不足,再次使用同种或不同的疫苗免疫可增强疫苗的效果。序贯免疫有两种,一种为数次免疫使用同一疫苗;另一种为在加强免疫时使用的疫苗与初免的不同<sup>[45,46]</sup>。传统的序贯免疫接种使用同一种疫苗重复接种,可诱导机体产生针对载体自身的免疫反应,导致免疫效果在一段时间内迅速下降。我们发现,应用多载体疫苗可以克服此缺点。因此,我们采用不同载体加强策略来避免载体特异性免疫反应对疫苗效果的影响。获得更强而持久的特异性体液及细胞免疫应答,同时可将针对载体自身的免疫反应降至最低。冯霞等用携带HIVgp120基因的重组腺相关病毒和重组腺病毒疫苗联合免疫BALB/c小鼠,可在小鼠体内诱导特异性的细胞免疫应答和体液应答反应,并且使用两种疫苗的效果比单独使用一只疫苗效果好。而且采用DNA疫苗、rSeV疫苗、rAd5疫苗这3种疫苗联合免疫所诱导产生的细胞斑点数目是任意两种疫苗诱导的3-5倍<sup>[47]</sup>。

### 1.4 本课题研究内容

食管癌是多种因素所致的疾病,主要由化学因素、环境因素、生物因素以及不良生活习惯。近些年研究数据表明,人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV) 16 和 18 型是中国人食管癌发生的重要致病因素。因此,研发 HPV 疫苗可有效降低肿瘤的发病率及死亡率。

第一,通过分子生物学、细胞生物学等方法大量扩增和纯化HPV16L1基因的重组DNA疫苗和重组腺相关病毒疫苗。

第二,用重组DNA疫苗、重组腺相关病毒疫苗、重组腺病毒疫苗序贯重复免疫小鼠后检测细胞免疫和中和抗体滴度效果。

### 1.5 技术路线

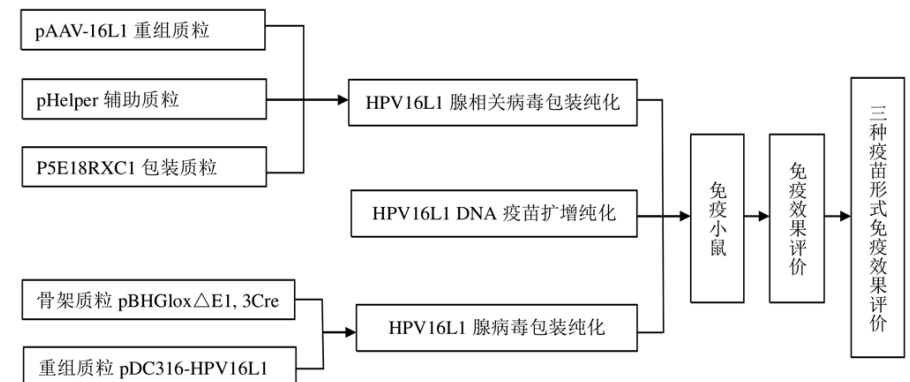


图1-2 本课题研究的技术路线

Figure1-2 Road map of this study

第 2 章 HPV16 L1 腺相关病毒和 DNA 疫苗的扩增纯化

2.1 实验材料

2.1.1 质粒、细胞和菌株

含密码子优化型HPV16L1基因的重组质粒命名为pAAV-16L1、P5E18RXC1包装质粒、pHelper辅助质粒、pVR-HPV16 L1质粒（DNA疫苗）以及HEK293细胞均由本室保存。大肠杆菌DH5α购自于天根生化科技（北京）有限公司。rAdv-16L1腺病毒疫苗由深圳源兴生物科技有限公司扩增纯化。

2.1.2 工具酶及主要试剂

限制性内切酶EcoR I和Hind III购自NewEnglandBiology公司，DNAMarker购自北京博迈德科技发展有限公司，质粒DNA小提试剂盒购自天根生化科技有限公司。QuickShuttle-293<sup>TM</sup>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Gibco公司。预染蛋白Marker购自于Fermentas公司。羊抗小鼠IgG抗体（Anti-MOUSEIgG（H&L）（GOAT）Antibody IRDye700DX）购自Rockland公司。Midi质粒中提试剂盒、Endofree Giga质粒大提试剂盒购自于QIAGEN公司。腺相关病毒纯化试剂盒（Biomiga ViraTrap<sup>TM</sup> Adeno-associated Virus Purification Maxiprep Kit）、腺相关病毒滴度测定试剂盒（CellBiolab, INCQuickTiter<sup>TM</sup> AAVQuantitationKit）购自Biomiga公司。

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
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
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
细胞培养箱	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

2.2 实验方法

2.2.1 重组 DNA 疫苗的扩增和纯化

- （1）用 pVR-HPV16 L1 甘油菌在 Kana 抗性平皿上划线，37 °C 过夜培养后，挑单菌落接种到 3 mL Kana 抗性的 LB 培养基中，37 °C 剧烈振荡培养 8~12 h，然后按照 1: 1 000 的比例接种 3 L 含 Kana 的 LB 培养基中，于 37 °C 振荡培养 12 h。
- （2）4 °C，6 000g，离心 15 min 沉淀菌体，然后将上清倒掉。
- （3）向沉淀的菌体中加入 125 mL 的 P1，并且重悬菌体。
- （4）加入 125 mL 的 P2，上下翻转 4-6 次，让其完全混匀，并且在常温下孵育 5min。
- （5）加入 125 mL 的 P3，上下翻转 4-6 次，让其完全混匀，并且在冰上孵育 30min。
- （6）20 000g，4 °C 离心 30 min，然后取上清。再次 20 000g，4 °C 离心 15 min，取上清。
- （7）向柱子中加入 75 mL 的 QBT 缓冲液平衡，在重力的作用下流出。
- （8）将第 6 步的上清液加入柱子中，在重力的作用下流出。
- （9）加入总体积 600 mL 的 QC 缓冲液，洗柱子。在重力的作用下流出。
- （10）再用 100 mL 的 QF 洗脱缓冲液洗柱子，并将流出的液体用离心管收集。
- （11）向含有 DNA 的离心管中加入 70 mL 的室温异丙醇以沉淀 DNA。15 000g，4 °C 离心 30 min，将上清倒掉。



(12) 加入 10 mL 的乙醇洗 DNA, 15 000g, 4 °C 离心 10 min, 再将上清轻轻地倒掉。

(13) 在生物安全柜中将沉淀的 DNA 用 15-20 min 进行风干, 再次将 DNA 溶解在合适的缓冲液中。并测质粒的纯度和质量。测量之后用不含内毒素的纯水将质粒稀释为 1 µg /µL, 放入-20 °C 冰箱储存。

## 2.2.2 pAAV-16L1 重组质粒转化、提取和鉴定

### 2.2.2.1 pAAV-16L1 重组质粒转化

取 10 µL pAAV-16L1 重组质粒加入 50 µL DH5α 感受态细胞中, 冰浴 30 min, 热激 90 s, 再冰浴 1 min。然后补加 900 µL 的大肠杆菌培养基, 160 r/min 37 °C 振荡培养 45 min。800 r/min 离心 1 min, 吸取上清留置 100 µL 的菌液, 重悬 100 µL 转化之后的感受态细胞, 用移液器将其移入含有 Amp 的 LB 琼脂平板培养基上。用涂布棒快速地涂匀, 然后将平板倒置放入 37 °C 恒温箱中培养 14 h。

### 2.2.2.2 小提 pAAV-16L1 重组质粒

(1) 用 10 µL 枪头分别挑取 10 个白色的单菌落, 放入 3 mL 含 Amp 的 LB 培养基 160 r/min、37 °C 振荡培养 12 h。

(2) 将培养 12 h 的 3 mL 菌液加入离心管中, 以 12 000 rpm 离心 1 min, 去上清。

(3) 柱平衡: 取 500 µL 的平衡液加入吸附柱 CP4 中, 12 000 rpm 离心 1 min, 将离心收集的废液倒掉, 再次将吸附柱放入收集管中。

(4) 取 500 µL 含有 RNaseA 的溶液 P1 加入留有大肠杆菌沉淀的离心管中, 使用移液器反复上下吹打将大肠杆菌沉淀, 使其悬浮。

(5) 取 500 µL 的溶液 P2 加入离心管, 轻轻的上下翻转数次使菌体裂解完全。取 700 µL 的溶液 P3 加入离心管, 立即上下翻转数次, 使溶液充分混匀, 此时离心管中出现了白色絮状沉淀。12 000 rpm 离心 10 min, 沉淀聚集在离心管底部。

(6) 用移液器吸取离心管中的上清将其加入另一个干净的离心管, 如果含有沉淀, 再次离心去沉淀。之后将上清液加入吸附柱 CP4 中。将吸附柱置于收集管中。

(7) 12 000 rpm 离心 1 min, 将收集管中的液体倒掉, 再次将吸附柱 CP4 置于收集管中。

(8) 将 500 µL 去蛋白液 PD 加入吸附柱 CP4, 12 000 rpm 离心 1 min, 将收集管中的液体倒掉, 再将吸附柱 CP4 置于收集管中。

(9) 将 600 µL 含有无水乙醇的漂洗液 PW 加入吸附柱 CP4 中, 12 000 rpm

离心 1 min, 将收集管中的液体倒掉, 再次将吸附柱 CP4 置于收集管中。

(10) 再取 600 µL 漂洗液 PW 加入吸附柱 CP4 中, 12 000 rpm 离心 1 min, 将收集管中的液体倒掉。

(11) 再次将吸附柱 CP4 置于收集管中, 12 000 rpm 离心 5 min, 将吸附柱中残留的漂洗液去除完全。

(12) 将吸附柱放入一个干净的离心管中, 取 50 µL 的洗脱缓冲液 TB 悬空滴加吸附柱中, 室温静置 5 min, 12 000 rpm 离心 1 min 将质粒溶液收集到离心管中。

### 2.2.2.3 酶切鉴定 pAAV-16L1 重组质粒

使用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 对 pAAV-16L1 重组质粒进行双酶切消化鉴定。酶切体系组成为: pAAV-16L1 重组质粒 5 µL, NEBuffer 2.5 µL, *EcoR* I 和 *Hind* III 各 1 µL, BSA 0.2 µL, H<sub>2</sub>O 10.5 µL。37 °C 水浴酶切消化 2 h。加 4 µL 5×DNA loading buffer 至酶切产物中并混匀, 用移液器取 5 µL 的酶切产物加入琼脂糖凝胶孔中, 在 110 V 恒压水平电泳 25 min。

### 2.2.2.4 pAAV-16L1 重组质粒转染

按照康碧全的 Quickshuttle 说明书进行转染前的准备, 取两只 EP 管, 一只 EP 管中加入 10 µg pAAV-16L1 质粒和 100 µL 0.9% NaCl 生理盐水中, 另一只 EP 管中加入 20 µL Quickshuttle 转染试剂和 100 µL 0.9% NaCl 生理盐水中, 从细胞培养箱中取出, 细胞成层 70%, 然后将细胞培养基吸出、用 PBS 进行润洗、胰酶消化, 将质粒和转染试剂混匀之后加入 5 mL DMEM 细胞培养基中, 再将细胞培养基加至细胞培养瓶中。然后放置细胞培养箱中培养 72 h, 之后进行细胞的收获, 用移液管移去细胞培养基, PBS 润洗两遍, 再用已灭菌的细胞刮将 HEK293 细胞刮下, 加入 20 µL RIPA 细胞裂解液进行冲洗, 用移液器将其移入 EP 管中。裂解 30 min 之后, 12 000 r/min 离心 10 min, 离心之后取上清。

### 2.2.2.5 Western 鉴定重组质粒 pAAV-16L1 表达蛋白

(1) 电泳 (Electrophoresis): 配制 SDS-PAGE 凝胶, 配制 15 % 的浓缩胶和 15 % 分离胶。

(2) 样品处理: 将适量的 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液加入蛋白样品。沸水浴加热 5 min, 使蛋白变性完全。

(3) 上样与电泳: 待样品冷却至室温, 将蛋白样品上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内。把电压设置为 110 V, 将时间设定为 90 min。当溴酚蓝指示剂到达胶的底端处, 即可停止电泳。

(4) 转膜 (Transfer): 使用硝酸纤维素膜进行转膜, 用 34 V 电压转膜 40 min。

(5) 封闭 (Blocking): 转膜完毕后, 立即将蛋白膜放置 Western 洗涤液中, 漂洗 5 min, 洗去膜上的转膜液。洗尽洗涤液, 加入 Western 封闭液, 放在摇床上慢慢摇动, 室温封闭 60 min。

(6) 一抗孵育 (Primary antibody incubation): 用 PBST 配制 5% 脱脂奶粉, 然后 8 mL 的 5% 脱脂奶粉加入 0.008 mL 一抗 HPV16L1, 将膜放入一抗溶液中, 在摇床上震荡反应 1 h。然后加入适量 PBST, 在摇床上震荡清洗 10 min, 清洗 3 次。

(7) 二抗孵育 (Secondary antibody incubation): 每 8 mL, 5% 脱脂奶粉中加入 0.002 mL 羊抗小鼠 IgG 抗体, 将膜放入二抗溶液中, 在摇床上避光震荡反应 1 h。然后加入适量 PBST, 在摇床上避光震荡清洗 10 min, 清洗 3 次。

(8) 将膜置于 PBST 溶液中, 然后用 Odyssey 红外影像分析仪检测 pAAV-16L1 蛋白。

## 2.2.3 重组腺相关病毒包装和纯化

### 2.2.3.1 中提 pAAV-16L1 重组质粒、P5E18RXC1 包装质粒、pHelper 辅助质粒

(1) 分别用 pAAV-16L1 重组质粒、P5E18RXC1 包装质粒、pHelper 辅助质粒所对应甘油菌在 3 个 Amp 抗性平板上划线, 然后用枪头分别挑取单菌落加入各自对应的 LB 培养基中, 160 r/min、37 °C 振荡培养 14 h。按照 1:1 000 的比例分别接种到 3 瓶 100 mL 的 LB 培养基中, 于 37 °C 振荡培养 14 h。

(2) 6 000g, 离心 15 min, 4 °C 沉淀菌体。然后将上清倒掉。

(3) 向沉淀的菌体中加入 10 mL 的 P1, 并重悬菌体。

(4) 加入 10 mL 的 P2, 上下翻转 4-6 次, 让其完全混匀, 并且在常温下孵育 5 min。

(5) 加入 10 mL 的 P3, 上下翻转 4-6 次, 让其完全混匀, 并且在冰上孵育 20 min。

(6) 20 000g, 4 °C 离心 30 min, 然后取上清。再次 20 000g, 4 °C 离心 15 min, 取上清不要有蛋白沉淀。

(7) 用 10 mL 的 QBT 缓冲液平衡柱子, 让其在重力的作用下流出。

(8) 将第 6 步的上清加入柱子中, 让其在重力的作用下流出。

(9) 加入 2×30 mL 的 QC 缓冲液, 洗柱子。在重力的作用下流出。

(10) 再用 15 mL 的 QF 洗脱缓冲液洗柱子, 用离心管收集流出的液体。

(11) 向含有 DNA 的离心管中加入 10.5 mL 的室温异丙醇以沉淀 DNA。15 000 g, 4 °C 离心 30 min, 小心的将上清倒掉。

(12) 加入 5 mL 的乙醇洗 DNA, 15 000 g, 4 °C 离心 10 min, 再将上清轻轻的倒掉。

(13) 在生物安全柜中将沉淀的 DNA 用 5-10 min 时间进行风干, 再将 DNA 溶解在合适的缓冲液中。并用分光光度计测质粒的纯度和质量。测量之后将上述三个质粒用不含内毒素的纯水分别稀释为 1 μg/μL, 放入 -20 °C 冰箱储存。

### 2.2.3.2 HEK293 细胞复苏

从液氮罐取出所需的 HEK293 细胞, 将冻存管放入到 37 °C 的水浴锅中迅速解冻, 并不断地摇动, 使管中的液体快速融化。约 1-2 min 完全融化后, 用酒精棉球擦拭冻存管外壁, 放入生物安全柜。用移液器将冻存管液体加至 15 mL 的离心管, 补加细胞培养基至 5 mL, 500 g 离心 5 min。吸取上清放入废液缸, 再加入 5 mL 培养基进行重悬。用已灭菌移液管将重悬的细胞培养基加至 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶。将细胞培养瓶放置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱中进行培养。

### 2.2.3.3 HEK293 细胞传代培养

上述 HEK293 细胞成层之后, 进行传代。首先打开生物安全柜的紫外灯灭菌 30 min, 预热 DMEM 细胞培养基。从细胞培养箱中取出已成层的细胞放入生物安全柜。从细胞培养瓶中吸取细胞培养基加入废液缸, 用 5 mL PBS 进行润洗, 再加 1 mL 的胰酶进行消化, 消化 1 min 之后将胰酶吸出。然后放置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱中消化 1 min。再将细胞培养瓶取出并加入 15 mL 细胞培养基, 用移液管反复吹打混匀。分别吸取 5 mL 细胞培养基分置于 3 个 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中。最后将 3 个培养瓶中的细胞培养基摇匀, 放置于细胞培养箱中进行培养。

### 2.2.3.4 HEK293 细胞冻存

预先配制冻存液, 冻存液为 10% 的 DMSO+90% 胎牛血清, 上述的 HEK293 细胞成层之后, 用移液管吸取细胞培养基, 用 PBS 润洗两遍, 再用胰酶进行消化。用冻存液悬浮细胞, 将预冷的冻存液加入消化完全的细胞中, 用移液管轻轻吹打混匀。每支冻存管中加入 1 mL 冻存液, 密封后标记冻存细胞名称和冻存日期。将冻存管依次放入细胞冻存盒中 4 °C, 1 h; 然后转到 -20 °C, 2 h; -80 °C, 16 h; 再将冻存的细胞放入液氮罐。

### 2.2.3.5 重组腺相关病毒包装

(1) 培养 10 瓶 75 cm<sup>2</sup> HEK293 细胞, 待细胞成层 70% 之后进行转染实验。

(2) 分别配制 A、B 转染液各 10 瓶: A 液 32 μg pHelper、16 μg pAAV-16L1、16 μg P5E18RXC1 和 0.9% NaCl 生理盐水共 500 μL。B 液为 120 μL 的 20 μL Quickshuttle 转染试剂和 0.9% NaCl 生理盐水共 500 μL。

(3) 移去细胞培养基, 用 PBS 进行润洗、胰酶消化, 将 A、B 液加进一个 EP 管中混匀, 随后将其加入 20 mL 的 DMEM 中, 再转入已消化完全的细胞中。



(4) 将细胞培养瓶放置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养中, 培养 72 h。

重组腺相关病毒具体包装过程如下图 2-1 所示 (转自 cell labs 主页:  
http://www.cellbiolabs-cn.com/aaav-helper-free-packing-system.html)。

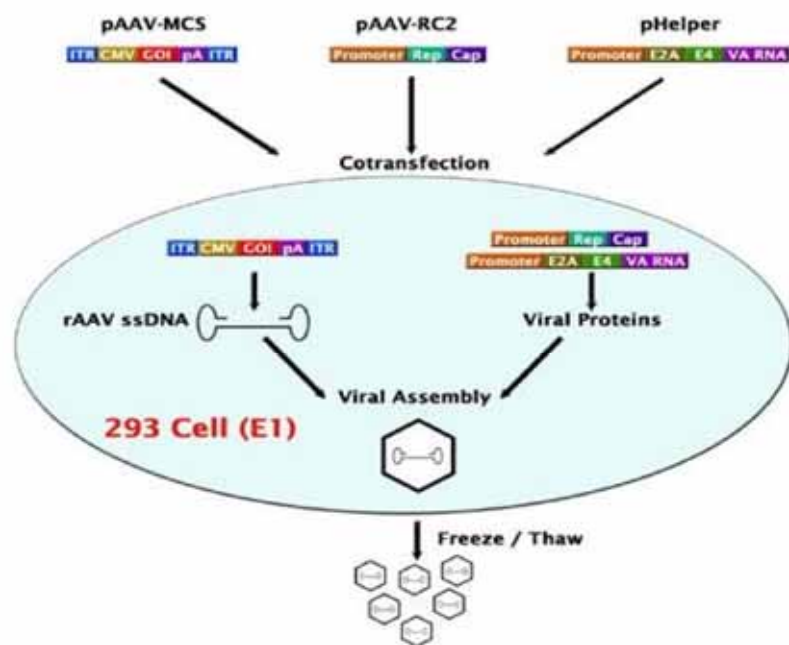


图2-1 三质粒共转染293细胞构建重组腺相关病毒示意图

Figure 2-1 Construction scheme of rAAV by cotransfection of three plasmids to 293 cells

### 2.2.3.6 重组腺相关病毒纯化

(1) 待 72 h 之后, 对于成层的转染细胞, 用灭菌的移液管移去细胞培养基, 然后每瓶各加入 3-5 mL 的 PBS, 用细胞刮将成层的细胞刮下。将细胞收集到 50 mL 的离心管中。

(2) 350 g、10 min 离心沉淀细胞, 弃上清将细胞沉淀在 -80 °C 的冰箱保存。

(3) 用 10 mL 的结合缓冲液重悬细胞沉淀, 确保重悬之后没有细胞团的聚集。

(4) 加入 100 μL, 100×核酸酶缓冲液和 15 μL 的核酸酶, 放入 37 °C 摇床中震荡培养并孵育 30-60 min。

(5) 600 g 离心 15 min 收集含腺相关病毒原液的上清。用 0.45 μm 的滤膜进一步纯化上清。

(6) 将离子柱放入 50 mL 的离心管中, 然后 400 g 离心 1 min。固定柱子然后拧开底部阀门让液体在重力的作用下流出。用 4 mL 的 ddH<sub>2</sub>O 和 8 mL 的结合缓冲液平衡柱子。

(7) 将第 6 步的上清装柱并在重力的作用下从柱子中流出。收集流出液体重新过柱以确保病毒颗粒完全结合在柱子上。

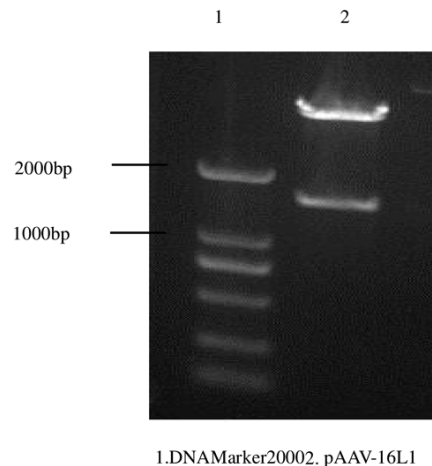
(8) 用 10 mL 的结合缓冲液洗柱子并重复操作一次。可在重力的作用下或者 400 g, 离心 5 min 操作下进行。

(9) 用 4 mL 的洗脱缓冲液洗脱腺相关病毒。纯化出的病毒需要用脱盐柱去掉高盐缓冲液, 用于下游的实验。将收集到的纯化腺相关病毒命名为 rAAV2/1-mod.HPV16L1 储存在 -80 °C 的冰箱。

## 2.3 实验结果和讨论

### 2.3.1 pAAV-16L1 重组质粒酶切鉴定和测序结果

pAAV-16L1 重组质粒经 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切后, 理论上切割出 HPV16L1, 1 500bp 左右目的片段, 实验结果如图 2-2 所示, 重组质粒双酶切后目的片段与理论值相符。将 pAAV-16L1 重组质粒送华大测序, 测序结果表明目的基因正确构建在载体上。



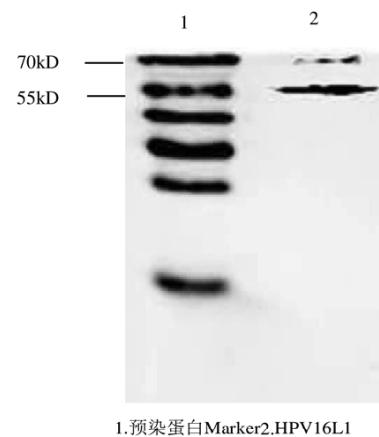
1.DNAMarker20002. pAAV-16L1

图 2-2 pAAV-16L1质粒酶切消化鉴定

Figure 2-2 Identification of pAAV-16L1 plasmid by restriction enzymes digestion.

## 2.3.2 pAAV-16L1 重组质粒表达蛋白鉴定

pAAV-16L1 重组质粒转染 293 细胞，72 h 之后进行细胞收获，裂解获得蛋白，然后进行 WB 实验，鉴定外源 HPV16L1 蛋白是否表达，实验结果如图 2-3 所示，HPV16L1 蛋白大小为 55KD 与预期一致。



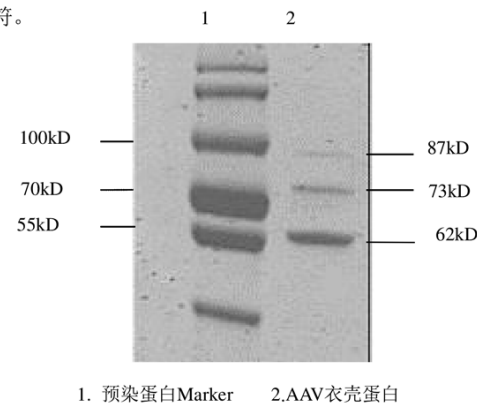
1. 预染蛋白Marker 2. HPV16L1

图2-3 Western Blot检测重组pAAV-16L1质粒在293细胞的表达

Figure 2-3 Detection of recombinant pAAV-16L1 plasmid expression in 293 cell by Western blot.

## 2.3.3 纯化的 rAAV2/1-mod.HPV16L1 衣壳蛋白鉴定

腺相关病毒的 CAP 基因编码衣壳蛋白，其转录从 p40 启动子开始，编码 3 个结构蛋白 VP1、VP2、VP3 大小为 87kD、73kD、62kD，在成熟的病毒颗粒中比例为 1:1:10。实验结果如图 2-4 所示，经 SDS-PAGE 检测其这三个结构蛋白大小与预期相符。



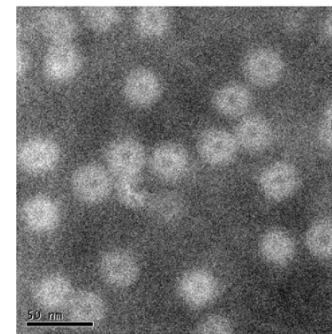
1. 预染蛋白Marker 2. AAV衣壳蛋白

图2-4 SDS-PAGE鉴定rAAV2/1-mod.HPV16L1衣壳蛋白

Figure 2-4 Detection of the capsid protein of rAAV2/1-mod.HPV16L1 by SDS-PAGE.

## 2.3.4 纯化的 rAAV2/1-mod.HPV16L1 电镜观察

取 20  $\mu$ L 纯化后的 rAAV2/1-mod.HPV16L1 病毒悬液置于支持膜上，用 2% 磷钨酸负染 3~5 min，吸去多余的染色液，室温静置，在电镜下观察，观察病毒的形态结果如图 2-5 所示，可见直径约 20 nm 的病毒颗粒存在。

图2-5 纯化的rAAV2/1-mod.HPV16L1电镜观察 ( $\times 52\,000$ )Figure 2-5 Electron micrographs of purified rAAV2/1-mod.HPV16L1 ( $\times 52\,000$ )

### 2.3.5 纯化的 rAAV2/1-mod.HPV16L1 滴度测定

使用 CellBiolabs,INCQuickTiter™ AAVQuantitationKit 腺相关病毒滴度测定试剂盒对重组腺相关病毒进行滴度测定。通过测定腺相关病毒中 DNA 分子含量即其荧光染料发光值确定腺相关病毒含量。按照说明书中的公式计算得到 rAAV2/1-mod.HPV16L1 病毒的滴度约为  $5 \times 10^{12}$ vg。

## 2.4 本章小结

本章鉴定重组 pAAV-16L1 质粒可以在 HEK293 细胞内高效的表达 HPV16L1 蛋白。同时利用 HEK293 细胞/三质粒共转染法包装 rAAV2/1-mod.HPV16L1（腺相关病毒疫苗）。用腺相关病毒纯化试剂盒按照说明书操作纯化出重组腺相关病毒疫苗。用腺相关病毒滴度测定试剂盒按照其说明书计算出腺相关病毒疫苗的滴度。使用 QIAGEN 公司去内毒素大提试剂盒 EndoFree Plasmid Giga Kit 大提 pVR-HPV16 L1 质粒，得到了足量的纯度（OD 260/280 值在 1.80 左右）无内毒素重组质粒（DNA 疫苗），可用于免疫动物。

第 3 章 重组疫苗免疫效果的研究

用制备的重组 DNA、重组腺相关病毒、重组腺病毒疫苗序贯重复免疫小鼠，通过假病毒中和滴定检测疫苗的体液免疫效果，并使用酶联免疫斑点法检测疫苗的细胞免疫效果。

3.1 实验材料

3.1.1 细胞和疫苗

重组DNA疫苗、重组腺病毒疫苗及重组腺相关病毒疫苗由本课题组构建。含有HPV16L1、L2基因的质粒shell16L1、shell16L2，表达分泌型碱性磷酸酶由美国National CancerInstitute-NIH的JohnT. Schiller博士惠赠，HEK293细胞由本室保存。

3.1.2 主要试剂

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。Quick Spot小鼠IFN- $\gamma$ ELISPOT预包被试剂盒、EZ-Sep™ Mouse1X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。实验设计的多肽由北京中科亚光生物科技有限公司合成。

3.1.3 主要仪器设备

仪器名称	厂家
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
细胞培养箱	Thermo 公司
生物安全柜	Thermo Fisher Scientific 1389 型
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
TERESA 活体基因导入仪	上海塔瑞莎公司

3.1.4 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，委托中国中医科学院中药研究所实验动物中心饲养。

3.2 实验方法

3.2.1 动物实验的设计

3.2.1.1 重组腺病毒疫苗免疫小鼠剂量的测定

将 4~6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠随机分 4 组，每组 10 只小鼠。对照组 10 只，在第 0、3 周均注射 100  $\mu$ L PBS。实验组分为高、中、低剂量 3 组，第 0 周用 100  $\mu$ g/只 HPV16L1DNA 疫苗肌肉注射初次免疫，第 3 周免疫 rAd5-HPV16L1 剂量分别为 1 $\times$ 10<sup>9</sup> vg/只、1 $\times$ 10<sup>8</sup> vg/只、1 $\times$ 10<sup>7</sup> vg/只。免疫一周后对小鼠眼球采血，然后用颈椎脱臼法将其处死，摘取小鼠的脾脏，血液室温静置 60 min 后，3000 r/min 离心 1 min，收集血清 100  $\mu$ L，分装两份，每份 50  $\mu$ L，置-75  $^{\circ}$ C 保存。

3.2.1.2 活体基因导入仪与普通注射方式免疫效果比较

将 4~6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠随机分 2 组，每组 10 只小鼠。HPV16L1DNA 疫苗免疫使用的剂量为 100  $\mu$ g/只，第 0 周用 HPV16L1DNA 疫苗初次免疫，第 3 周用 HPV16L1DNA 疫苗加强免疫。第一组用普通肌肉注射方式免疫，第二组用活体基因导入仪肌肉注射方式免疫。免疫一周之后的操作同上。

3.2.1.3 单种疫苗免疫方案

将4~6周龄的雌性BALB/c小鼠分为4组，重组腺病毒疫苗组20只、重组腺相关病毒疫苗组10只、重组DNA疫苗组25只、对照组25只。具体免疫程序见表3-1。对照组PBS使用剂量为100  $\mu$ L/只，重组腺病毒疫苗使用剂量为1 $\times$  10<sup>8</sup>vg/只，重组腺相关病毒疫苗使用剂量为5 $\times$ 10<sup>10</sup>vg/只，DNA疫苗免疫使用剂量为100  $\mu$ g/只。第0周用相应的疫苗肌肉注射初次免疫，第3周用同种疫苗加强免疫。重组DNA疫苗组、PBS对照组分别在第4周、6周、9周、15周、25周，重组腺病毒疫苗组分别在第4周、9周、15周、25周，重组腺相关病毒疫苗组分别在第4周、9周，每次处死5只进行检测。

表 3-1 单种重组疫苗免疫方案  
Table3-1 Immunization programs of one single recombinant vaccine

类别	免疫 (0 周)	免疫 (3 周)
对照组	PBS	PBS
DNA 疫苗组	DNA (16)	DNA (16)
腺相关病毒疫苗组	AAV (16)	AAV (16)
腺病毒疫苗组	Adv (16)	Adv (16)

#### 3.2.1.4 多载体疫苗联合免疫方案

将4~6周龄的雌性BALB/c小鼠分为4组, 重组DNA疫苗 (HPV16L1 DNA) 和重组腺病毒疫苗 (rAdv-HPV16L1) 联合免疫组40只、混合重组DNA疫苗 (HPV16L1 DNA 和HPV18L1 DNA疫苗)+混合重组腺病毒疫苗(rAdv-HPV16L1 和rAdv-HPV18L1疫苗) 联合免疫组40只、重组DNA疫苗+重组腺病毒疫苗+重组腺相关病毒疫苗 (rAAV2/1-mod.HPV16L1) 联合免疫组40只、对照组PBS 40只。具体免疫程序见表3-2。对照组PBS使用剂量为100  $\mu$ L/只, 重组腺病毒疫苗 (rAdv-HPV16L1) 使用剂量为 $1 \times 10^8$  vg/只, 重组腺病毒疫苗 (rAdv-HPV18L1) 使用剂量为 $1 \times 10^9$  vg/只, 重组腺相关病毒疫苗使用剂量为 $5 \times 10^{10}$  vg/只, 重组DNA疫苗 (HPV16L1 DNA) 和重组DNA疫苗 (HPV18L1 DNA) 使用的剂量各为100  $\mu$ g/只。各组小鼠分别在第0周、第3周、第6周、第9周、第14周免疫相应的疫苗, 并且PBS对照组、重组DNA疫苗+重组腺相关病毒疫苗+重组腺病毒疫苗联合免疫组在第24周再加强免疫。分别在第4周、6周、7周、9周、10周、14周、15周、25周每组各取5只小鼠眼球采血, 然后用颈椎脱臼法将其处死, 摘取小鼠的脾脏, 血液室温静置60 min后, 3 000 r/min离心1 min, 收集血清100  $\mu$ L, 分装两份, 每份50  $\mu$ L, 置-75  $^{\circ}$ C保存。

表 3-2 多载体重组疫苗联合免疫方案  
Table3-2 Immunization programs of multiple recombinant vaccines

类别	免疫 0 周	免疫 3 周	免疫 6 周	免疫 9 周	免疫 14 周	免疫 24 周
对照组	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
DNA 疫苗+腺病毒疫苗组	DNA (16)	DNA (16)	Adv (16)	Adv (16)	Adv (16)	
混合 DNA 疫苗+混合腺病毒疫苗组	DNA (16+18)	DNA (16+18)	Adv (16+18)	Adv (16+18)	Adv (16+18)	
DNA 疫苗+腺相关病毒疫苗+腺病毒疫苗组	DNA (16)	DNA (16)	AAV (16)	AAV (16)	Adv (16)	Adv (16)

### 3.2.2 多载体疫苗免疫反应的检测

#### 3.2.2.1 T细胞表位肽预测

本研究依据生物信息学的方法预测 HPV16L1 的 T 细胞表位肽, 本次实验所用的 BALB/c 小鼠的 MHC I 类抗原为 H-2K<sup>d</sup>, 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> 分别预测长度为9 肽和10 肽的 HPV16L1T 细胞表位肽, 选择这两个网站得分均比较高的多肽, 确定11 条 T 细胞表位肽, 见表 3-3。

表3-3 HPV16 L1的T细胞表位肽预测结果  
Table 3-3 T cell epitope prediction of HPV16 L1

Number	Sequence	Length	Score	Source
1	LPSEATVYL	9	50	Bimas
2	YYHAGTSRL	9	880	Bimas
3	QYRVFRIHL	9	800	Bimas
4	FYNPDTQRL	9	880	Bimas
5	DYKQTQLCL	9	800	Bimas
6	EPYGSDSLFF	10	640	Syf
7	EYDLQFIFQL	10	520	Bimas
8	TYIHSMNSTI	10	760	Bimas
9	TYRFVTSQAI	10	800	Bimas
10	TPPAPKEDPL	10	700	Syf
11	KYTFWEVNL	9	800	Bimas

#### 3.2.2.2 ELISPOT 检测细胞免疫反应

##### 脾细胞准备

(1) 在超净工作台内对小鼠进行摘眼球取血, 然后颈椎脱臼法将其处死。将其浸泡在 75%的酒精中, 进行取脾操作。

(2) 在生物安全柜中将小鼠翻转之后, 用灭菌过的镊子和小剪刀将小鼠左侧腹部外皮剪开, 然后换另外一套镊子和小剪刀将内皮剪开, 可见脊柱处腹壁下有暗红色长条状脏器, 即为脾脏, 先用剪刀将其结缔组织剪断, 再用镊子将小鼠的脾脏取出。

(3) 将小鼠的脾脏放入 200 目细胞筛网上, 再取 4 mL EZ-Sep™ Mouse 1X 淋巴细胞分离液加入 35 mm 的细胞培养皿。而后将细胞筛网放在培养皿上, 并让淋巴细胞分离液浸润小鼠的脾脏。再用注射器的活塞轻轻的上下研磨小鼠的脾脏, 使分离的小鼠脾细胞透过筛网进入淋巴细胞分离液中。

(4) 将含有小鼠脾细胞的淋巴细胞分离液, 用移液器将其吸入 15 mL 的离

心管中，再向淋巴细胞分离液上层补加 0.5 mL 的 EZ-Culture™ 无血清培养基。

(5) 800 g 离心 30 min，离心之后淋巴细胞层为一层乳白色的絮状物，上层为无血清的细胞培养基。下面一层为含有红细胞碎片的淋巴细胞分离液。

(6) 小心的将淋巴细胞层吸出放入 15 mL 的离心管中，然后补加 10 mL 的培养基。250 g 离心 10 min，之后将上清倒掉，加入 1 mL 的 EZ-Culture™ 无血清培养基。

(7) 取 10  $\mu$ L 含有淋巴细胞的培养基，稀释 100 倍即加入 990  $\mu$ L 细胞培养基，进行细胞计数。

(8) 细胞计数后，从第 6 步中取出  $2 \times 10^6$  个细胞加入 1.5 mL 的 EP 管中，补加培养基至 1 mL，使细胞的浓度为  $2 \times 10^6$  个/mL。

#### 冻存脾淋巴细胞

(1) 标记细胞冻存管。预先将冻存管、冻存盒、重悬液、冻存液放入 4  $^{\circ}$ C 层析柜中预冷。

(2) 对需要冻存的脾淋巴细胞进行计数，在 4  $^{\circ}$ C，800 g 条件下离心 10 min。

(3) 去掉上清，用细胞重悬液对细胞沉淀进行重悬，并将细胞浓度调整为  $2 \times 10^7$  cells/mL，轻轻地吹打混匀脾淋巴细胞。

(4) 将冰浴过的细胞冻存液加入混匀的脾淋巴细胞中，调整细胞浓度为  $1 \times 10^7$  cells/mL。

(5) 每只预冷过的细胞冻存管中加入 1 mL 的细胞悬液，密封冻存管。

(6) 将分装有细胞悬液的冻存管放入 4  $^{\circ}$ C 预冷的细胞冻存盒中，并将冻存盒置-75  $^{\circ}$ C 冰箱中。

(7) 冰浴 16 h 之后，将冻存管转移到液氮中保存。

(8) 记录好细胞冻存管在液氮罐中的位置。

#### 细胞铺板及刺激

(1) 预包被板的活化：取 200  $\mu$ L EZ-Culture™ 无血清培养基加入各细胞孔中，室温静置 10 min 后将培养基倒掉，并在灭菌的吸水纸上拍干。

(2) 加入细胞悬液：细胞浓度调整为  $2 \times 10^6$  个/mL 悬液，取 100  $\mu$ L 此细胞悬液，将其加入对应的实验孔中，另设置三个阳性对照孔，并且每孔加入的细胞数为  $1 \times 10^5$  个，再设置三个只加细胞悬液的阴性对照孔，设置一个只加细胞培养基的背景负对照孔。

(3) 加入多肽刺激物，各实验孔加入 10  $\mu$ L 的多肽，并且多肽的终浓度为 8  $\mu$ g/mL。用 PBS 稀释 PHA 干粉，调整其浓度为 25  $\mu$ g/mL，取 10  $\mu$ L PHA 加入阳性对照孔。背景负对照孔和阴性对照孔不需要加刺激物。

(4) 孵育：将样品和刺激物加入后，盖上板盖。将其放入 37  $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub>

细胞培养箱中培养 16 h。

#### 培养后操作

(1) 裂解细胞：倒掉板子中的细胞及培养基。并且加入预先冰冷的去离子水，每孔中 200  $\mu$ L，然后放置 4  $^{\circ}$ C 冰箱中 10 min，在低渗条件下对残存的细胞进行裂解。

(2) 洗板：倒掉孔内的去离子水，用移液器取 1  $\times$  Washing buffer，每孔加入 200  $\mu$ L，反复洗涤 7 次。每次停留时间为 60 s。洗涤之后在吸水纸上拍干。

(3) 检测抗体孵育：在各实验孔中加入一定浓度的生物素标记的抗体稀释液，每孔加入 100  $\mu$ L。置于 37  $^{\circ}$ C 细胞培养箱中孵育 1 h。

(4) 洗板：倒掉板子中的液体，用移液器取 1  $\times$  Washing buffer，每孔加入 200  $\mu$ L，反复洗涤 7 次。洗涤之后在吸水纸上拍干。

(5) 酶联亲和素孵育：在各实验孔中加入一定浓度的酶标亲和素标记的抗体稀释液，每孔加入 100  $\mu$ L。置于 37  $^{\circ}$ C 细胞培养箱中孵育 1 h。

(6) 洗板：倒掉孔内的液体，用移液器取 1  $\times$  Washing buffer，每孔加入 200  $\mu$ L，反复洗涤 7 次。每次停留时间为 60 s。洗涤之后在吸水纸上拍干。

(7) 显色：按照说明书步骤配制 AEC 显色液，然后将其加入各实验孔，100  $\mu$ L/孔。在 37  $^{\circ}$ C 孵箱中避光静置 15 min 做显色，

(8) 终止显色：倒掉板子中的液体，将底座揭开，用自来水将正反面及底座洗涤 5 遍，终止显色。最后将板子放置于室温阴凉处，当晾干之后将底座合上。

(9) 用读板仪器对 ELISPOT 板进行斑点计数，计数之后做统计分析。

#### 3.2.2.3 假病毒中和滴定测定 HPV16L1 特异性的中和抗体

##### 假病毒包装及制备

(1) 使用 QIAGEN 公司中提试剂盒 QIAGEN Plasmid Midi Kit 按照说明书操作步骤提取含有 HPV16L1 基因的质粒 shell16L1、含有 HPV16L2 基因的质粒 shell16L2、含 SEAP 基因的质粒。提取质粒后用分光光度计测定质量和纯度。将质粒稀释为 1  $\mu$ g/ $\mu$ L。提取的质粒储存于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱。

(2) 培养 1 瓶 75 cm<sup>2</sup> HEK293 细胞，待细胞成层 80% 之后进行转染实验。

(3) 分别配制 A、B 转染液各 1 瓶：A 液 20  $\mu$ g HPV16L1、20  $\mu$ g HPV16L2、20  $\mu$ g SEAP 质粒和 0.9% NaCl 生理盐水共 500  $\mu$ L。B 液为 120  $\mu$ L 的 Quickshuttle 转染试剂和 0.9% NaCl 生理盐水共 500  $\mu$ L。

(4) 移去细胞培养液，用 PBS 进行润洗、胰酶消化，将 A、B 液加进一个 EP 管中混匀，将其加入 20 mL 的含 10% FBS 的 DMEM 中，再将 DMEM 加入消化后的细胞中。



(5) 细胞培养瓶放置于 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中, 培养 48 h。在生物安全柜中移去细胞培养基, 用 PBS 润洗一遍, 用胰酶将细胞消化下, 用 10 mL DMEM 培养基重悬细胞, 然后转至 15 mL 离心管中。

(6) 1 000g, 5 min, 4 ℃离心收集细胞, 然后将上清倒掉, 再用 0.5 mL DPBS-Mg 重悬细胞, 转至带螺口盖的 1.5 mL 的 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 000g, 5 min, 4 ℃离心收集细胞。用与沉淀等体积的裂解缓冲液重悬细胞, 加入 500 μl 的细胞裂解液。细胞裂解物在 37 ℃细胞培养箱中孵育 16 h, 在孵育的前 2 h 中应上下倒置混合 3 次。

(7) 将将孵育成熟的细胞裂解物在冰上预冷 5 min, 再加入一定体积的 5M NaCl 使盐浓度达到 850 mM, 然后在冰上孵育 30 min。6 000 g, 5 min, 离心收集上清在生物安全柜中将其转至新的 EP 管中, -75 ℃保存。

假病毒滴度的测定

预先铺HEK293细胞于96孔细胞培养板中, 每孔加入 $2 \times 10^4$ 个细胞/100 μL。然后置于37 ℃, 5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养8 h。用无血清不含酚红的DMEM将HPV16型假病毒按照1 000、2 000、4 000、8 000、16 000倍数进行稀释。每孔补加100 μL假病毒稀释液。将96孔培养板置于37 ℃, 5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养72 h。再取40 μL细胞培养上清, 将其加入新的相对应的96孔板中, 加入20μL 0.05%CHAPS, 加入200 μL显色底物, 室温避光孵育4 h, Bio-Rad 550型酶标仪测定405 nm波长下的OD值。结果标准: 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。此次包装的HPV16型假病毒的滴度测定结果为2 000。

假病毒中和滴度的测定

预先铺HEK293细胞于96孔细胞培养板中, 每孔加入 $2 \times 10^4$ 个细胞/100 μL。然后置于37 ℃, 5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养8 h。用无血清不含酚红的DMEM将HPV16型假病毒稀释为1 000倍。用无血清不含酚红的DMEM将小鼠血清分别按照相对应的倍数进行稀释。然后取50 μL的稀释假病毒和50 μL的稀释后的血清混匀。96孔细胞培养板置于37 ℃, 5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养72 h。再取40 μL细胞培养上清, 加入与其位置相对应的新96孔板中, 65 ℃热失活30 min, 然后在冰上孵育2-5 min。每孔加入20 μL 0.05%CHAPS, 加入200 μL显色底物, 室温避光孵育4 h, Bio-Rad 550型酶标仪测定405 nm波长下的OD值。结果标准: 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。

### 3.3 实验结果和讨论

#### 3.3.1 T 细胞表位肽

第4周取实验组免疫DNA疫苗的小鼠, 用颈椎脱臼法将其处死, 摘取小鼠的脾脏, 做ELISPOT反应, 将计数的细胞加入细胞孔中, 之后加入相应的多肽, 每条多肽的终浓度为8 μg/mL。11条多肽分别刺激相同的5只小鼠的脾细胞, 每条多肽设置5个复孔。再设置一个混合多肽, 每条多肽的浓度为2 μg/mL。然后放入细胞培养箱中培养16 h。培养之后洗板, 然后斑点计数, 发现编号为16-2多肽刺激效果最好, 虽然其它多肽也可以刺激细胞免疫反应, 但是与编号16-2多肽细胞斑点数目相比还是有差距的。并且16-2多肽的细胞免疫免疫效果与全肽相差很小。故编号16-2的多肽即34位置点的多肽, 细胞免疫刺激效果最好。结果如表3-4, 图3-1所示。

表3-4 HPV16 L1的T细胞表位确定  
Table 3-4 T cell epitope definition of HPV16 L1

Number	Sequence	Length	Score	Spots per $1 \times 10^5$ splenocytes
1	LPSEATVYL	9	50	480 ± 147
2	YYHAGTSRL	9	880	1242 ± 43
3	QYRVFRIHL	9	800	808 ± 153
4	FYNPDTQRL	9	880	741 ± 159
5	DYKQTQLCL	9	800	748 ± 132
6	EPYGSDSLFF	10	640	743 ± 49
7	EYDLQFIFQL	10	520	910 ± 47
8	TYIHSMNSTI	10	760	868 ± 59
9	TYRFVTSQAI	10	800	681 ± 150
10	TPPAPKEDPL	10	700	833 ± 70
11	KYTFWEVNL	9	800	624 ± 50

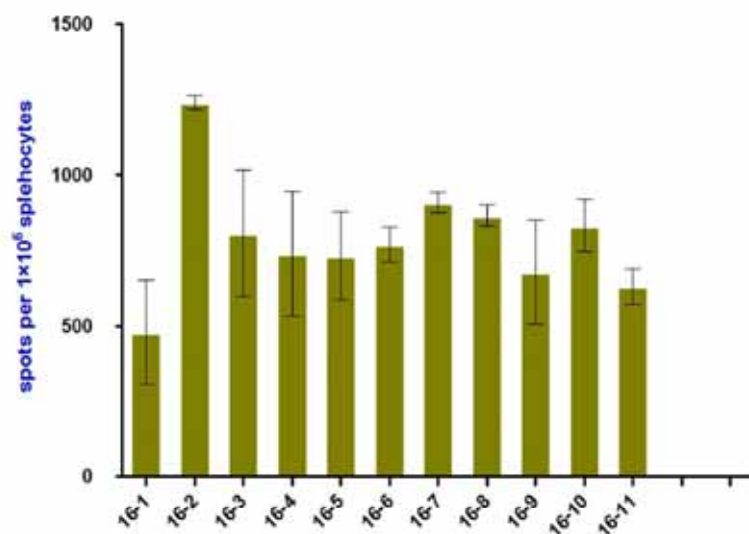


图3-1 HPV16L1T细胞表位的确定

Figure 3-1 T cell epitope identification of HPV16L1

## 3.3.2 活体基因导入仪与普通注射免疫效果比较

活体基因导入仪是一种将基因高效导入动物体内的装置,运用计算机及微电子技术,通过控制特定的电路产生大小合适的脉冲电流,使受体细胞的通透性迅速的改变,增强核酸等物质进入细胞的效率。从而提高核酸的转染率并增强药物免疫作用的效果。本实验在注射DNA疫苗时用活体基因导入仪导入小鼠肌肉内,通过与普通注射方式比较,如图3-2、3-3所示,用DNA诱导仪免疫小鼠可以产生2000个左右斑点,而用普通注射方式只能产生400个左右的细胞斑点,由此可知用DNA诱导仪能显著的提高细胞的免疫效果。

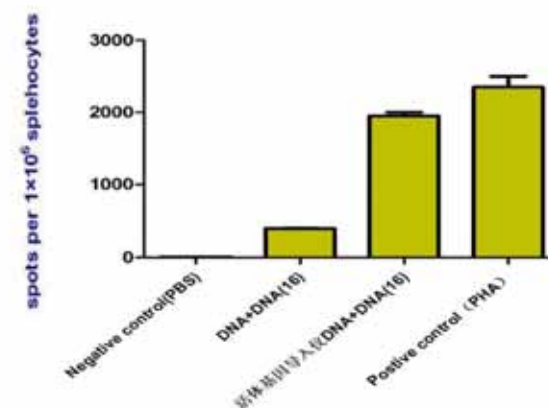


图3-2 活体基因导入仪和普通注射方式免疫DNA疫苗的ELISPOT结果

Figure3-2 ELISPOT results of gene transfer and ordinary injection immune DNA vaccine

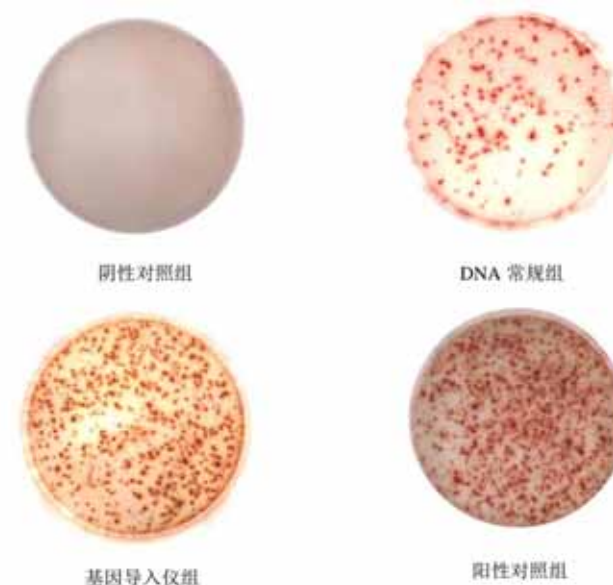


图3-3 ELISPOT检测图片

Figure3-3 Graphs of ELISPOT test



## 3.3.3 不同剂量重组腺病毒疫苗细胞免疫效果的比较

检测结果如图 3-4 所示, 高剂量重组腺病毒疫苗可诱导产生细胞斑点数目为 1 400, 而中剂量重组腺病毒疫苗可诱导产生 1 350 个细胞斑点, 低剂量重组腺病毒疫苗可诱导产生 950 个细胞斑点。故免疫  $10^8$ vg 剂量的 rAdv 显著高于  $10^7$ vg 剂量的免疫效果 (T 检验,  $P<0.05$ ), 与  $10^9$ vg 剂量相差很小, 因此, 用  $10^8$ vg 剂量 rAdv 免疫小鼠。

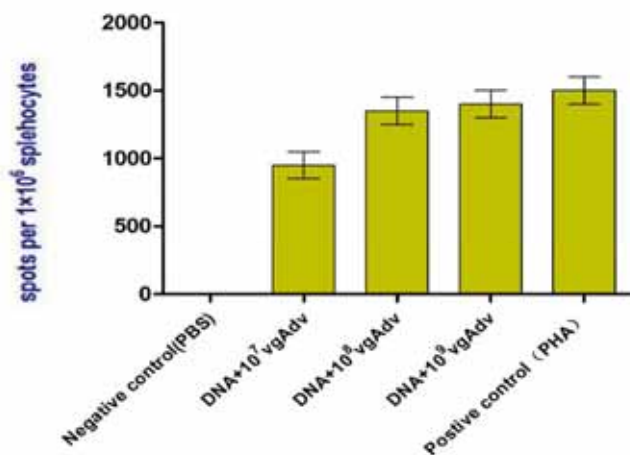


图3-4 重组腺病毒疫苗免疫剂量的确定  
Figure 3-4 Identification the dose of rAdv vaccine

## 3.3.4 HPV16L1 单种疫苗接种诱导的细胞免疫反应

## 3.3.4.1 重组腺相关病毒疫苗诱导的细胞免疫反应

分别在第 4 周、第 9 周处死 AAV 疫苗组, 分离脾淋巴细胞, 进行细胞免疫反应检测。检测结果如图 3-5 所示, 第四周重组腺相关病毒疫苗的诱导产生的细胞斑点数目为 1 634, 第九周重组腺相关病毒疫苗的诱导产生的细胞斑点数目为 367。

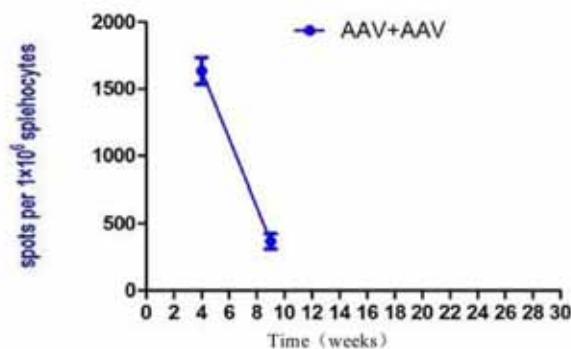


图3-5 HPV L1重组AAV疫苗免疫的ELISPOT结果  
Figure 3-5 ELISPOT results of immunization group using HPV L1 rAAV vaccine

## 3.3.4.2 重组腺病毒疫苗诱导的细胞免疫反应

分别在第 4、9、15、25 周处死重组腺病毒疫苗组, 分离脾淋巴细胞, 进行细胞免疫反应检测。检测结果如图 3-6 所示, 第 4 周重组腺病毒疫苗诱导产生的细胞斑点数目为 2 487, 第 9 周重组腺病毒疫苗诱导产生的细胞斑点数目为 540, 第 15 周重组腺病毒疫苗诱导产生的细胞斑点数目为 250, 第 25 周重组腺病毒疫苗诱导产生的细胞斑点数目为 90。

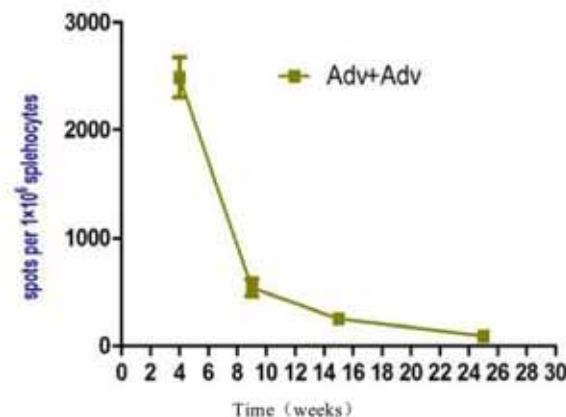


图3-6 HPV L1重组腺病毒疫苗免疫的ELISPOT结果  
Figure 3-6 ELISPOT results of immunization group using HPV L1 rAdv vaccine

## 3.3.4.3 重组DNA疫苗诱导的细胞免疫反应

分别在第4、6、9、15、25周处死重组DNA疫苗组，分离脾淋巴细胞，进行细胞免疫反应检测。检测结果如图3-7所示，第4周DNA疫苗诱导产生的细胞斑点数目为2070，第6周DNA疫苗诱导产生的细胞斑点数目为445，第9周DNA疫苗诱导产生的细胞斑点数目为283，第15周DNA疫苗诱导产生的细胞斑点数目为70，第25周DNA疫苗诱导产生的细胞斑点数目为45。

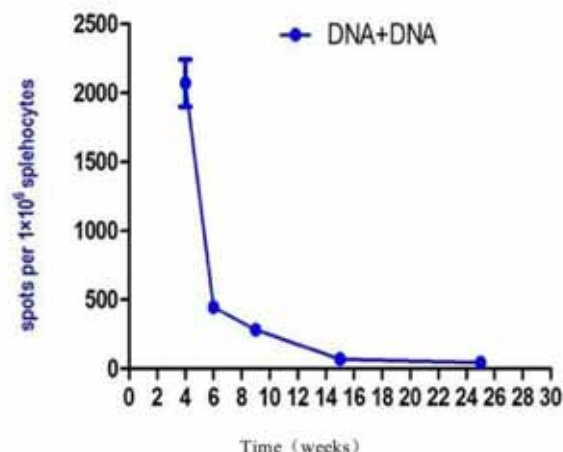


图3-7 HPV L1 DNA疫苗免疫的ELISPOT结果

Figure 3-7 ELISPOT results of immunization group using HPV L1 DNA vaccine

## 3.3.5 HPV16L1多载体疫苗接种诱导的细胞免疫反应

## 3.3.5.1 重组DNA和重组腺病毒疫苗联合免疫组诱导的细胞免疫反应

分别在第4、6、7、9、10、14、15、25周处死重组DNA和重组腺病毒疫苗组，分离脾淋巴细胞，进行细胞免疫反应检测。检测结果如图3-8所示，第4周DNA+DNA疫苗诱导产生的细胞斑点数目为2070，第6周DNA+DNA疫苗诱导产生的细胞斑点数目为445，第7周DNA+DNA+Adv(16)疫苗诱导产生的细胞斑点数目为2126，第9周DNA+DNA+Adv(16)疫苗诱导产生的细胞斑点数目为1503，第10周DNA+DNA+Adv+Adv(16)诱导产生的细胞斑点数目为1329，第14周DNA+DNA+Adv+Adv(16)诱导产生的细胞斑点数目为980，第15周DNA+DNA+Adv+Adv+Adv(16)疫苗诱导产生的细胞斑点数目为1142，第25周DNA+DNA+Adv+Adv+Adv(16)疫苗诱导产生的细胞斑点数目为845。

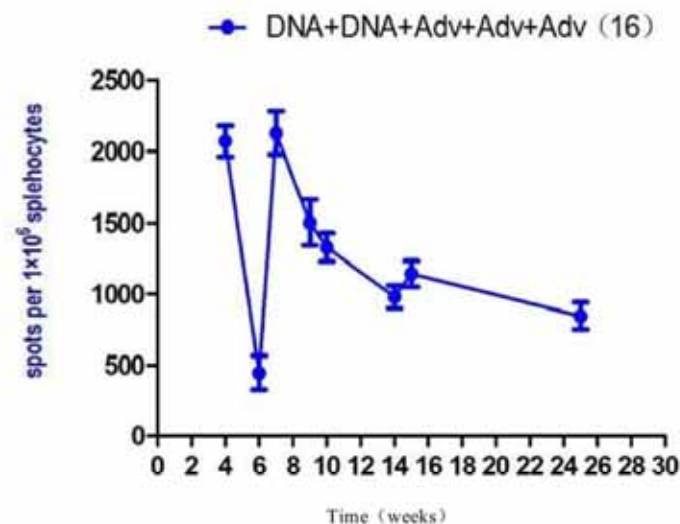


图3-8 HPV L1重组DNA疫苗和重组腺病毒疫苗联合免疫的ELISPOT结果

Figure 3-8 ELISPOT results of combined immunization group using HPV L1 DNA and rAdv vaccines

## 3.3.5.2 混合重组DNA和重组腺病毒疫苗联合免疫组诱导的细胞免疫反应

分别在第4、6、7、9、10、14、15、25周处死重组DNA和重组腺病毒疫苗组，分离脾淋巴细胞，进行细胞免疫反应检测。检测结果如图3-9所示，第4周混合DNA(16+18)疫苗诱导产生的细胞斑点数目为1757，第6周混合DNA(16+18)疫苗诱导产生的细胞斑点数目为257，第7周混合DNA+DNA+Adv(16+18)疫苗诱导产生的细胞斑点数目为1843，第9周混合DNA+DNA+Adv(16+18)疫苗诱导产生的细胞斑点数目为1766，第10周混合DNA+DNA+Adv+Adv(16+18)疫苗诱导产生的细胞斑点数目为2003，第14周混合DNA+DNA+Adv+Adv(16+18)疫苗诱导产生的细胞斑点数目为1712，第15周混合DNA+DNA+Adv+Adv(16+18)诱导产生的细胞斑点数目为2412，第25周混合DNA+DNA+Adv+Adv+Adv(16+18)诱导产生细胞斑点数目为1012。

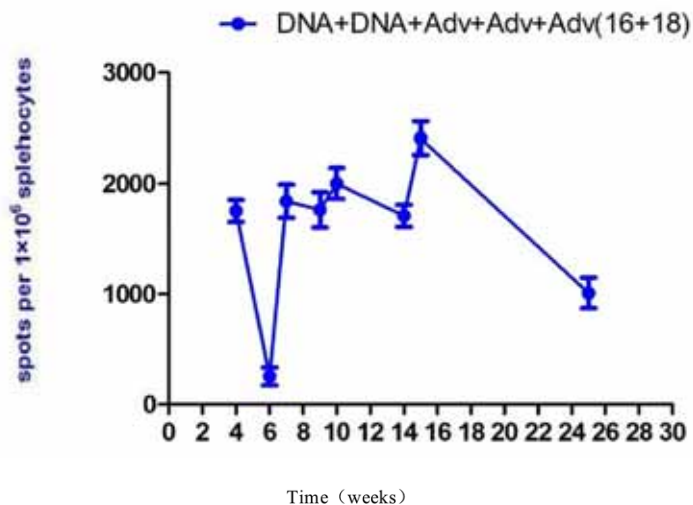


图3-9 HPV L1混合重组DNA疫苗和重组腺病毒疫苗联合免疫的ELISPOT结果

Figure 3-9 ELISPOT results of combined immunization group using mixture HPV L1 DNA and rAdV vaccines

### 3.3.5.3 重组DNA、腺相关病毒和腺病毒疫苗联合免疫组诱导的细胞免疫反应

分别在第4、6、7、9、10、14、15、25周处死重组DNA、重组腺相关病毒和重组腺病毒疫苗组，分离脾淋巴细胞，进行细胞免疫反应检测。检测结果如图3-10所示，第4周DNA+DNA疫苗诱导产生的细胞斑点数目为2070，第6周DNA+DNA疫苗诱导产生的细胞斑点数目为445，第7周DNA+DNA+AAV(16)疫苗诱导产生的细胞斑点数目为1598，第9周DNA+DNA+AAV(16)疫苗诱导产生的细胞斑点数目为1423，第10周DNA+DNA+AAV+AAV(16)疫苗诱导产生的细胞斑点数目为1750，第14周DNA+DNA+AAV+AAV(16)疫苗诱导产生的细胞斑点数目为735，第15周DNA+DNA+AAV+AAV+Adv(16)疫苗诱导产生的细胞斑点数目为1545，第25周DNA+DNA+AAV+AAV+Adv+Adv(16)诱导产生的细胞斑点数目为1745。

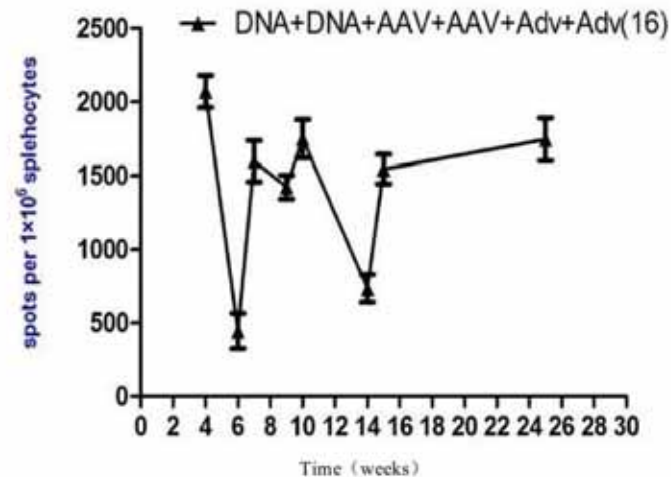


图3-10 HPV L1混合重组DNA、腺相关病毒和腺病毒疫苗免疫的ELISPOT结果

Figure 3-10 ELISPOT results of combined immunization group using mixed HPV L1 DNA, rAAV and rAdV vaccines

### 3.3.6 HPV16L1 特异性细胞免疫反应的动态变化趋势

单种疫苗免疫两次之后，在相应的时间点处死小鼠检测细胞免疫反应，发现细胞免疫反应呈下降趋势。在第4周对三种疫苗的免疫效果进行比较发现，重组腺病毒疫苗组的细胞免疫效果高于重组DNA疫苗组和重组相关病毒疫苗组。在第9周时检测发现，各疫苗的细胞免疫效果均下降明显，这表明单种疫苗的保护效力持续时间较短，需要给予反复刺激来维持在一个稳定的水平。在第15周检测时发现各疫苗组诱导的细胞免疫反应已经很微弱，几乎观察不到细胞的斑点数目。

多载体疫苗序贯重复免疫小鼠，免疫两针DNA疫苗后，第4周、6周分别处死检测发现疫苗下降速率很快，当再次免疫腺病毒疫苗之后细胞免疫虽然也呈下降趋势但是下降速率明显减慢。与免疫之前相比，免疫反应之后细胞免疫反应呈升高趋势，后期检测发现细胞免疫反应维持在稳定的较高的水平。混合重组DNA疫苗(16+18)+混合重组腺病毒疫苗(16+18)的细胞免疫效果比重组DNA疫苗(16)+重组腺病毒疫苗(16)高。

混合重组DNA疫苗(16+18)+混合重组腺病毒疫苗(16+18)、重组DNA疫苗(16)+重组腺病毒疫苗(16)，免疫第三针重组腺病毒疫苗之后，隔10周仍检测到产生较高的细胞免疫效果。如图3-11、图3-12所示。

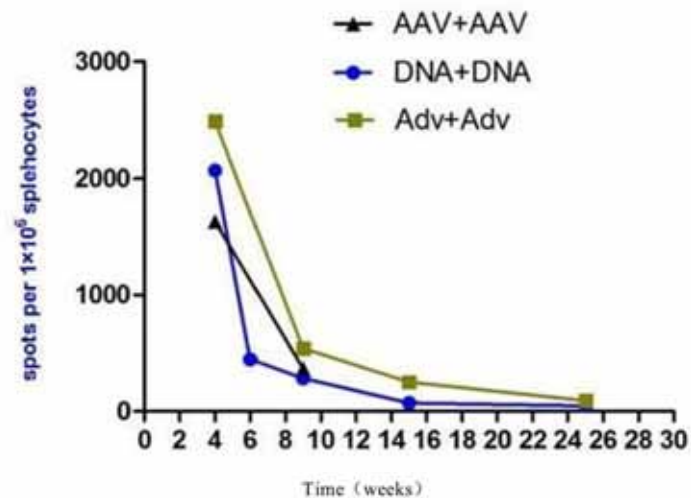


图3-11 HPV L1单种疫苗免疫的ELISPOT结果

Figure 3-11 ELISPOT results of groups immunized with DNA, rAAV and rAdv respectively

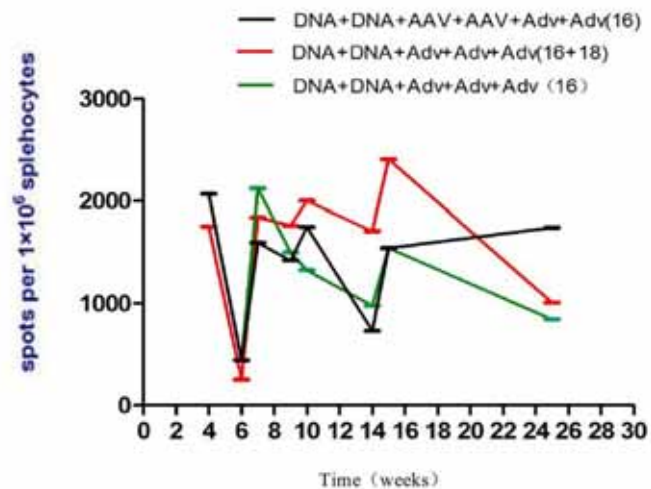


图3-12 HPV L1多载体疫苗免疫的ELISPOT结果

Figure 3-12 ELISPOT results of groups immunized with multiple HPV L1 vaccines

## 3.3.7 HPV16L1 单种疫苗接种诱导的体液免疫反应

## 3.3.7.1 重组腺相关病毒疫苗诱导的体液免疫反应

分别在第4周、第9周处死 AAV 疫苗组, 收集血清, 进行假病毒中和试验。检测结果如图 3-13 所示, 第4周重组腺相关病毒疫苗的中和抗体滴度为 3 200, 第9周重组 AAV 疫苗的中和抗体滴度为 1 100。

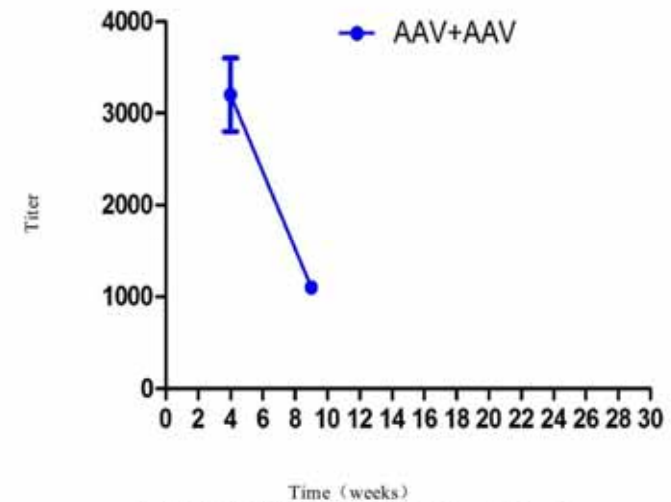


图3-13 重组腺相关病毒疫苗免疫组血清中和抗体滴度

Figure 3-13 The neutralizing antibody titers of immunization group using rAAV vaccine

## 3.3.7.2 重组腺病毒疫苗诱导的体液免疫反应

分别在第4、9、15、25周处死重组腺病毒疫苗组, 收集血清, 进行假病毒中和试验。检测结果如图 3-14 所示, 第4周重组腺病毒疫苗的中和抗体滴度为 1 280, 第9周重组腺病毒疫苗的中和抗体滴度为 160, 第15周重组腺病毒疫苗的中和抗体滴度为 80, 第25周重组腺病毒疫苗的中和抗体滴度为 20。



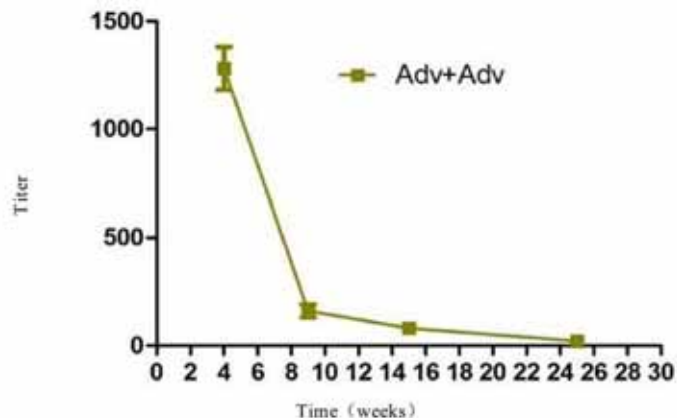


图3-14 免疫重组腺病毒疫苗组血清中和抗体的滴度

Figure3-14 The neutralizing antibody titers of immunization group using rAdV vaccine

## 3.3.7.3 重组DNA疫苗诱导的体液免疫反应

分别在第4、6、9、15、25周处死重组DNA疫苗组，收集血清，进行假病毒中和试验。检测结果如图3-15所示，第4周重组DNA疫苗的中和抗体滴度为800，第6周重组DNA疫苗的中和抗体滴度为320，第9周重组DNA疫苗的中和抗体滴度为200，第15周重组DNA疫苗的中和抗体滴度为40，第25周重组DNA疫苗的中和抗体滴度为20。

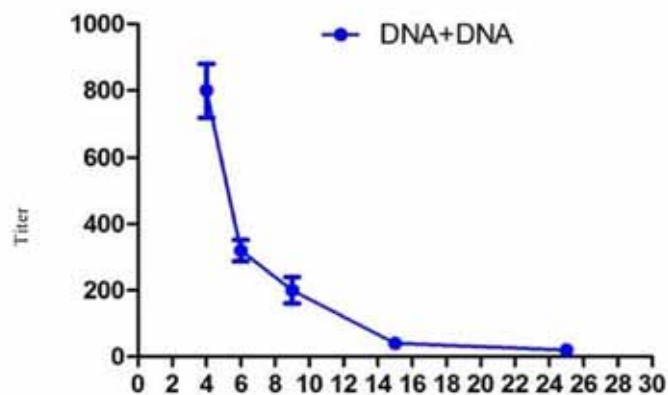


图3-15 重组DNA疫苗免疫组血清中和抗体滴度

Figure3-15 The neutralizing antibody titers of immunization group using DNA vaccine

## 3.3.8 HPV16L1 多载体疫苗接种诱导的体液免疫反应

## 3.3.8.1 重组DNA和重组腺病毒疫苗联合免疫组诱导的体液免疫反应

分别在第4、6、7、9、10、14、15、25周处死重组DNA和重组腺病毒疫苗组，收集血清，进行假病毒中和试验操作。检测结果如图3-16所示，第4周重组DNA疫苗的中和抗体滴度为800，第6周重组DNA疫苗的中和抗体滴度为320，第7周DNA+DNA+Adv(16)疫苗的中和抗体滴度为1280，第9周DNA+DNA+Adv(16)疫苗的中和抗体滴度为640，第10周DNA+DNA+Adv+Adv(16)疫苗的中和抗体滴度为4800，第14周DNA+DNA+Adv+Adv(16)疫苗的中和抗体滴度为2800，第15周DNA+DNA+Adv+Adv+Adv(16)疫苗的中和抗体滴度为4800。第25周DNA+DNA+Adv+Adv+Adv(16)疫苗的中和抗体滴度为2400。

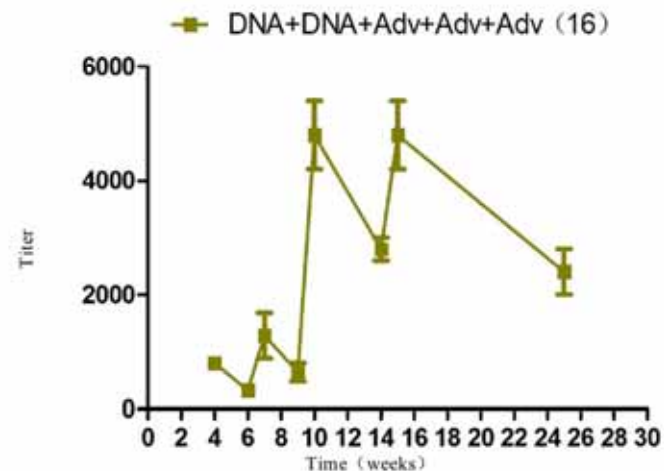


图3-16 DNA和重组腺病毒疫苗联合免疫组血清中和抗体滴度

Figure3-16 The neutralizing antibody titers of combined immunization group using DNA and rAdV vaccines

## 3.3.8.2 混合重组DNA和重组腺病毒疫苗联合免疫组诱导的体液免疫反应

分别在第4、6、7、9、10、14、15、25周处死重组DNA和重组腺病毒疫苗组，收集血清，进行假病毒中和试验操作。检测结果如图3-17所示，第4周混合重组DNA(16+18)疫苗的中和抗体滴度为1280，第6周混合DNA(16+18)疫苗的中和抗体滴度为640，第7周混合DNA+DNA+Adv(16+18)疫苗混合

DNA+DNA+Adv (16+18) 疫苗的中和抗体滴度为 1 600, 第 9 周混合 DNA+DNA+Adv (16+18) 疫苗的中和抗体滴度为 1 280, 第 10 周混合 DNA+DNA+Adv+Adv (16+18) 疫苗的中和抗体滴度为 5 120, 第 14 周混合 DNA+DNA+Adv+Adv (16+18) 疫苗的中和抗体滴度为 3 200, 第 15 周混合 DNA+DNA+Adv+Adv+Adv (16+18) 疫苗的中和抗体滴度为 6 400, 第 25 周混合 DNA+DNA+Adv+Adv (16+18) 疫苗的中和抗体滴度为 2 560。

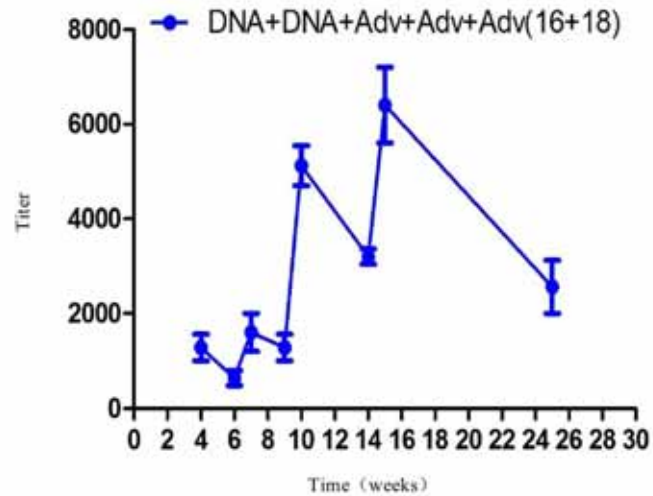


图3-17 混合的重组DNA和重组腺病毒疫苗联合免疫组血清中和抗体滴度

Figure 3-17 The neutralizing antibody titers of combined immunization group using mixed DNA and rAdV vaccines

### 3.3.8.3 重组DNA、腺相关病毒和腺病毒疫苗联合免疫组诱导的体液免疫反应

分别在第 4、6、7、9、10、14、15、25 周处死重组 DNA、重组腺相关病毒和重组腺病毒疫苗组, 收集血清, 进行假病毒中和试验操作。检测结果如图 3-18 所示, 第 4 周重组 DNA 疫苗的中和抗体滴度为 800, 第 6 周重组 DNA 疫苗的中和抗体滴度为 320, 第 7 周 DNA+DNA+AAV (16) 疫苗的中和抗体滴度为 3 200, 第 9 周 DNA+DNA+AAV (16) 疫苗的中和抗体滴度为 2 560, 第 10 周 DNA+DNA+AAV+AAV (16) 的中和抗体滴度为 7 200, 第 14 周 DNA+DNA+AAV+AAV (16) 疫苗的中和抗体滴度为 4 800, 第 15 周 DNA+DNA+AAV+AAV+Adv (16) 疫苗的中和抗体滴度为 5 120, 第 25 周 DNA+DNA+AAV+AAV+Adv+Adv (16) 疫苗的中和抗体滴度为 6 400。

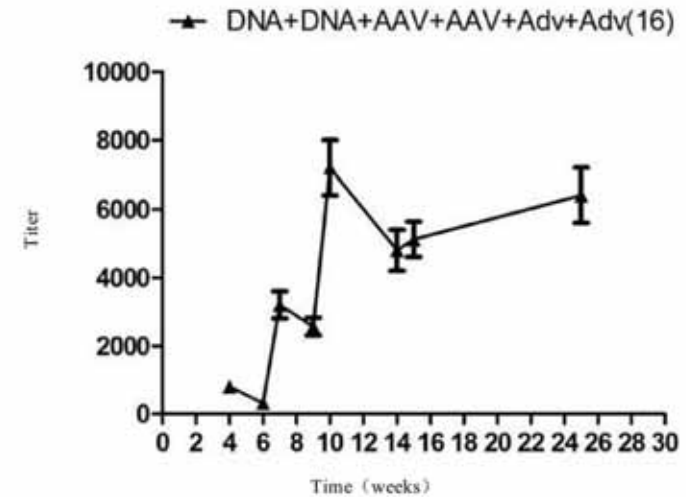


图3-18 免疫重组DNA、重组腺相关病毒和重组腺病毒疫苗联合免疫组血清中和抗体滴度  
Figure 3-18 The neutralizing antibody titers of combined immunization group using DNA, rAAV and rAdV vaccines

### 3.3.9 HPV16L1 特异性体液免疫反应的动态变化趋势

单种疫苗免疫两针之后, 在相应的时间点处死小鼠检测体液免疫反应, 发现体液免疫反应呈下降趋势, 且下降的速率快于多载体疫苗序贯重复组。并且重组腺相关病毒疫苗组诱导的体液免疫反应高于重组腺病毒组和重组 DNA 疫苗组。

多载体疫苗序贯重复免疫小鼠, 在免疫之前和之后分别处死免疫相应疫苗的小鼠, 与免疫之前相比, 免疫之后体液免疫反应呈升高趋势, 虽然在免疫之后体液免疫呈下降趋势, 但是下降速率明显减慢。后期检测发现体液免疫反应稳定在较高的水平。在 0 周、3 周免疫两针重组 DNA 疫苗, 第 6 周用重组腺病毒疫苗或者重组腺相关病毒疫苗免疫之后, 体液免疫反应上升趋势明显, 当再加强一针重组腺病毒疫苗或者重组腺相关病毒疫苗之后, 体液免疫上升趋势依然很明显。这说明重组腺病毒疫苗和重组腺相关病毒疫苗在免疫时, 用序贯重复免疫的有效性。免疫两针重组 DNA 疫苗, 再免疫两针重组腺相关病毒疫苗, 发现体液免疫滴度高达 7200, 这与单独免疫两针重组腺相关病毒疫苗组相比, 体液免疫水平升高一倍多, 这表明用 DNA 初免, 再用重组腺相关病毒疫苗次免, 能显著增强体液免疫水平。混合免疫组即先用重组 DNA (16 型) 和 DNA (18 型) 混合疫苗免疫, 再用重组腺病毒 (16 型) 和腺病毒 (18 型) 混合疫苗免疫, 发现混合

疫苗组的体液免疫均高于免疫 16 型别组，为疫苗的研发提供了一个新的思路。分别如图 3-19、图 3-20 所示。

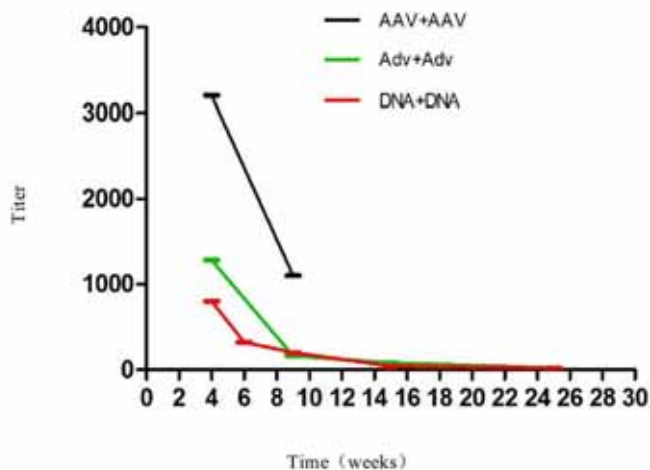


图3-19 单种重组疫苗免疫组血清中和抗体滴度

Figure3-19 The neutralizing antibody titers of immunization groups using DNA,rAAV and rAdV respectively

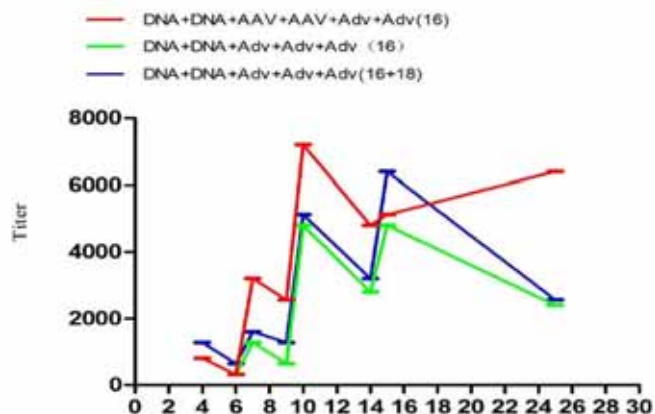


图3-20 多载体疫苗联合免疫组血清中和抗体滴度

Figure3-20 The neutralizing antibody titers of combined immunization groups using multiple vaccines

### 3.4 本章小结

在本章实验中,按照序贯重复免疫相应的疫苗,并在相应的时间点处死小鼠,收集血清做假病毒中和滴定试验,取脾细胞做 ELISPOT 检测试验。结果发现:

(1) HPV16L1 的 T 细胞表位肽是 16-2 (YYHAGTSRL),能刺激 T 细胞分泌 IFN- $\gamma$  的多肽。

(2) 最佳的重组腺病毒疫苗使用剂量为  $1 \times 10^8$  vg/只,能产生较好的细胞免疫反应。

(3) 使用活体基因导入仪免疫重组 DNA 疫苗与普通注射方式相比,能诱导小鼠产生强烈的细胞免疫反应。

(4) 重组腺相关病毒、腺病毒、DNA 疫苗免疫小鼠均产生强烈的体液免疫和细胞免疫反应。单种疫苗的体液免疫效果:重组腺相关病毒疫苗高于重组腺病毒疫苗和重组 DNA 疫苗。单种疫苗的细胞免疫效果:重组腺病毒疫苗高于重组 DNA 疫苗和重组腺相关病毒疫苗。

(5) 重组 DNA 疫苗免疫后保护效力逐渐减弱,但在加强免疫重组腺病毒或重组腺相关病毒疫苗后,免疫效果升高,并且在多次免疫后达到较高值。

(6) 混合重组 DNA 疫苗、重组腺病毒疫苗序贯重复免疫,加强免疫之后,细胞免疫效果会升高,免疫第三针重组腺病毒疫苗之后,隔 10 周仍检测到产生较高的细胞免疫效果。

(7) 通过与单种疫苗免疫对比可发现,发现用两种或者三种不同的疫苗重复序贯免疫,能诱导小鼠产生更好的细胞、体液免疫反应效果。

## 结论

本文通过分子生物学和细胞生物学的方法,利用三质粒共转染包装重组腺相关病毒,用腺相关病毒试剂盒纯化出腺相关病毒疫苗。用去内毒素的大提质粒试剂盒纯化出 DNA 疫苗。腺病毒疫苗由深圳源兴生物科技有限公司扩增纯化。设置预实验测定重组腺病毒疫苗的最佳免疫剂量。然后用这三种疫苗序贯重复免疫小鼠。免疫之后对小鼠进行细胞免疫检测试验和用小鼠的血清做假病毒中和实验。得出以下结论:

- (1) 重组质粒 pAAV-16L1 可以在 293 细胞内高效的表达 HPV16L1 蛋白。
- (2) 免疫重组 DNA 疫苗时,使用活体基因导入仪免疫产生的细胞斑点数目能达到 2 000 左右,而用普通注射方式免疫小鼠只产生 400 个细胞斑点。
- (3) 通过设置三组高、中、低剂量小鼠实验来,研究最佳的重组腺病毒疫苗使用剂量,发现用重组腺病毒疫苗剂量  $1 \times 10^8$  vg/只,能产生较好的细胞免疫反应。
- (4) 通过网站预测 HPV16L1 的 T 细胞表位肽,并送公司合成 11 条多肽,然后分别验证这 11 条多肽的刺激效果,发现虽然 11 条多肽均能刺激细胞产生细胞免疫反应,但是相比较而言 16-2 (YYHAGTSRL),能刺激 T 细胞分泌更多的 IFN- $\gamma$ 。因此我们推测 16-2 (YYHAGTSRL) 是 HPV16L1 的 T 细胞表位肽。
- (5) 重组腺相关病毒、重组腺病毒、重组 DNA 疫苗免疫小鼠均产生强烈的体液和细胞免疫反应。疫苗的体液免疫效果:腺相关病毒疫苗高于腺病毒疫苗和 DNA 疫苗。疫苗的细胞免疫效果:腺病毒疫苗高于 DNA 疫苗和腺相关病毒疫苗。
- (6) 混合重组 DNA 疫苗 (16+18) +混合重组腺病毒疫苗 (16+18) 的体液免疫和细胞免疫效果均比重组 DNA 疫苗 (16) +重组腺病毒疫苗 (16) 好。
- (7) 混合重组 DNA 疫苗 (16+18) +混合重组腺病毒疫苗 (16+18)、重组 DNA 疫苗 (16) +重组腺病毒疫苗 (16),免疫第三针重组腺病毒疫苗之后,隔 10 周仍检测到产生较高的细胞免疫效果和体液免疫效果。
- (8) 用重组 DNA 疫苗初免、重组腺相关病毒疫苗加强免疫,最后用腺病毒疫苗再次免疫,不仅能产生良好的体液免疫反应效果,而且能产生良好的细胞免疫效果。
- (9) 采用序贯重复免疫小鼠,并长期监测小鼠的免疫效果,在免疫之前处死一批小鼠,在免疫之后一周处死另一批小鼠发现,发现小鼠的体液和细胞免疫效果均升高。

(10) 通过与单种疫苗免疫对比可发现,发现用两种或者三种不同的疫苗序贯重复免疫,能诱导小鼠产生更好的细胞、体液免疫反应效果。

(11) 重组 DNA、重组腺相关病毒、重组腺病毒疫苗序贯重复免疫组,虽然在加强免疫后反应呈下降趋势,但在免疫后期,其下降速率明显变慢,免疫反应保护效力可维持更长的时间,显示了序贯重复免疫反应策略的有效性。



## 参考文献

- [1] HORRY T, MONIE A, GRAVITTR P. Molecular epidemiology of human papillomavirus[J]. *Formos Med Assoc*, 2008, 107(3): 198-217.
- [2] DOORBAR J. Molecular biology of human papillomavirus infection ancervical[J]. *Clinical Science*, 2006, 110: 525-538.
- [3] BERNARD HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses[J]. *Journal of clinical virology*, 2005, 32: 1-6.
- [4] JANE J, K I, SUE J GOLDIE. Health and Economic Implications of HPV Vaccination in the United States[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359: 821-832.
- [5] COTHRAN MM, WHITE JP. Adolescent behavior and sexually transmitted diseases: the dilemma of human papillomavirus[J]. *Health Care Woman Int*, 2002, 23(3): 306-315.
- [6] 王丽萍. 高危型HPV DNA病毒负荷量与宫颈病变的研究[J]. *中国医师杂志*. 2011, 13(12): 1682-1683.
- [7] STEBEN M, DURATE-FRANCO E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology[J]. *Gynecologic Oncology*, 2007, 107: 12-23.
- [8] MUNOZ N, HERNANDEZ-SUAREZ G, MENDEZ F. Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(7): 1184-1190.
- [9] BOSCH FX, LORINCZ A, MUFLOZ N, *et al.* The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer[J]. *Clin Pathol*, 2002, 55: 244-265.
- [10] MUOZ N, BOSCHF X, DE SANJOS S, *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirustypes associated with cervical cancer[J]. *New England Journal of Medicine*. 2003, 348(6): 518- 527.
- [11] MATOVINA M, SABOL I, GRUBISIC G, *et al.* Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesion[J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 113(1): 120-128.
- [12] 李淑英. 人乳头瘤病毒与食管癌病原学关系的Meta分析[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*. 2009, 23(2): 85-87.
- [13] WALBOOMERS JM, JACOBS MV, MANOS MM, *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J]. *Pathol*, 1999, 189(1): 12-19.
- [14] TOH Y, OKI E, OHGAKI, *et al.* Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: molecular mechanisms of carcinogenesis[J]. *Int J Clin Oncol*, 2010, 15(2): 135-144.
- [15] GUPTA N, BARWAD A, RAJWANSHI A, *et al.* Prevalence of human papillomavirus in esophageal carcinomas: a polymerase chain reaction-based study[J]. *Acta Cytol*, 2012, 56(1): 80-84.
- [16] LAWRENCES, OWENK, WILBYB, *et al.* Willoughby Evaluation of the intramuscular

- administration of Cervarix<sup>TM</sup> vaccine on fertility, pre- and post-natal development in rats[J]. *Reproductive Toxicology*, 2011, 31: 111-120.
- [17] IVONNER, ANGELOB, NADIAM, *et al.* Potent anti-HPV immune responses induced by tandem repeats of the HPV16L2(20-38) peptide displayed on bacterial thioredoxin[J]. *Vaccine*, 2009, 27: 1949-1956.
- [18] SYRJANEN K, PYRHONEN S, AUKEE S. Squamous cell papilloma of the esophagus: a tumor probably caused by human papilloma virus (HPV)[J]. *Diagnostic histopathology published in association with the Pathological society of Great Britain and Ireland*, 1982, 5(4): 291-296.
- [19] JULIANNE G, ALLISON N, IRENE S. Monitoring the safety of quadrivalent human papill-omavirus vaccine: Findings from the Vaccine Safety Datalink[J]. *Vaccine*, 2011, 9L 8279-8284.
- [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] SEWELL DA, PANZK, PATERSON Y. Listeria-based HPV-16 E7 vaccines limit autochthonous tumor growth in a transgenic mouse model for HPV-16 transformed tumors[J]. *Vaccine*, 2008, 26 (41): 5315-5320.
- [26] MACIAG PC, RADULOVIC S, ROTHMAN J. The first clinical use of a live-attenuated listeria monocytogenes vaccine: a phase I safety study of Lm-LL0-E7 in patients with advanced carcinoma of the cervix[J]. *Vaccine*, 2009, 27(30): 3975-3983.
- [27] KAUFMANN AM, STERN PL, RANKIN EM, *et al.* Safety and immunogenicity of TA-HPV, a recombinant vaccinia virus expressing modified human papillomavirus (HPV)-16 and HPV-18 E6 and E7 genes, in women with progressive cervical cancer[J]. *Clinical cancer research*, 2002, 8(12): 3676-3685.
- [28] GONCALVES M A. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector[J]. *Virol*, 2005, 2: 43-59.
- [29] MAGUIRE AM, SIMONELLI F, PIERCE EA, *et al.* Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis[J]. *The new England journal Medicine*, 2008, 358(21): 2240-2248.
- [30] CALCEDO R, VANDENBERGHE LH, GAO G, *et al.* Worldwide epidemiology of

- neutralizing antibodies to adeno-associated viruses[J]. Infect Dis, 2009, 199(3): 381-90.
- [31] KEVIN LR, ANTHONY W, HAWKSWORTH, *et al.* Vaccine-preventable adenoviral respiratory illness in US military recruits, 1999-2004[J]. Vaccine, 2006, 24(15): 2835-2842.
- [32] XIANG ZQPS, ERTL HCJ. Induction of genital immunity by DNA priming and intranasal booster immunization with a replication-defective adenoviral recombinant[J]. J Immunol, 1999, 162: 6716-6723.
- [33] MCCONNELL MJ, IMPERIALE MJ. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy[J]. Human gene therapy, 2004, 15(11): 1022-1033.
- [34] KENDRA MV, NATASHA G, HEESUM K, *et al.* B5-deficient vaccinia virus as a vaccine vector for the expression of a foreign antigen in vaccinia immune animal[J]. Virology, 2007, 361(2): 356-363.
- [35] SHAWN B, CENAIN T, SYLVIA V, *et al.* A single HBS AG DNA vaccination in combination with electroporation elicits long-term antibody responses in sheep[J]. Bioelectrochemistry, 2007, 70(2): 269-274.
- [36] 田厚文, 韩立群, 任皎. HPV16 型 E7 复制型 DNA 疫苗诱发的抗肿瘤免疫反应[J]. 病毒学报, 2003 19(1): 6-10.
- [37] HUANG CF, MONIE A, WENG WH, *et al.* DNA vaccines for cervical cancer[J]. American journal of translational research, 2010, 2(1): 75-83.
- [38] RAJESH, ABHISHEK KS, ESMA S Y, *et al.* SA-4-1BBL as the immunomodulatory component of a HPV-16E7 protein based vaccine shows robust therapeutic efficacy in a mouse cervical cancer model[J]. Vaccine, 2010, 28: 5794-5802.
- [39] ZWAVLING S, FERREIRA MOTA SC, NOUTA J, *et al.* Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides[J]. J. J, 2002, 1: 350-358.
- [40] WICK DA, WEBB JR. A novel, Broad spectrum therapeutic HPV vaccine targeting the E7 proteins of HPV16, 18, 31, 45, and 52 that elicits potent E7-specific CD8<sup>+</sup> cell immunity and regression of large, established, E7-expressing TC-1 tumors[J]. Vaccine, 2011, 29(44): 7857-7866.
- [41] TANG J, YIN R, TIAN Y, *et al.* A novel self-assembled nanoparticle vaccine with HIV-1 Tat49-57/HPV E749-57 fusion peptide and GM-CSF DNA elicits potent and prolonged CD8<sup>+</sup> cell-dependent anti-tumor immunity in mice[J]. Vaccine, 2012 30(6): 1071-1082.
- [42] Elloitt G, O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein[J]. Cell, 1997, 88 (2): 223-233.
- [43] 焦庆, 易发平, 汪长东. HPV16E6E7 基因修饰树突状细胞疫苗诱导 CTL 致 CaSki 细胞凋亡体外实验研究[J]. 中国免疫学, 2011, 27(2): 115-119.
- [44] SANTIN AD, BELLONE S, PALMIERI M, *et al.* Human papillomavirus type 16 and 18 E7-pulsed dendritic cell vaccination of stage IB or IIA cervical cancer patients: a phase I escalating-dose trial[J]. Journal of virology, 2008, 82(4): 1968-1979.

- [45] KAUFMANN SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis[J]. Nature (review), 2001, 1(10): 20-30.
- [46] 王锦彤. 序贯免疫策略用于结核疫苗研究的进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2006, 34(2): 43-45.
- [47] 冯霞, 余双庆, 陈国敏. 含 HIV gp120 基因的重组腺相关病毒和重组腺病毒疫苗联合免疫的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2004, 18(4): 312-315.

## 攻读硕士学位期间的主要成果

1 发明专利：用于食管癌防治的 HPV16,18L1 重组 DNA 疫苗.(发明人：周玉柏，曾毅，方军；申请号：201410035942.3)

## 致 谢

本论文是在导师周玉柏完成的悉心指导下顺利完成的，导师渊博的知识，严谨的科学态度，孜孜不倦的教诲，给我以人生的启迪，不断激励着我前进，在此深表感谢！

衷心感谢曾毅院士、李泽琳教授，在学习生活中给予大量的帮助和无微不至的关怀！两位先生平易近人的生活态度和为科学奉献终生的精神使我终生铭记！

感谢沈思嗣、肖向茜、艾萍、吕岫华等老师在工作上给予的指导和帮助！

感谢郭艳涛、程江、刘海庭、李莉莉、王鹤蓉、赵晨、吴同超、何一苇、王世华、侯雪莹等同学在工作、生活中对我的关心和帮助。正是大家无私的帮助和鼎力的支持才使本文的研究工作得以圆满的完成！

在此对所有给予我帮助而无法一一提及的老师 and 同学，致以最诚挚的谢意。最后我要感谢我的亲人，他们在我求学的生涯中默默地支持和理解给了我前进的动力。