

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620141152522

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

戊型肝炎病毒中和模型的建立与应用

Establishment and application of neutralizing models
against Hepatitis E virus

蔡 薇

指导教师姓名: 夏宁邵 教授

郑子峥 副教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2017年04月

论文答辩日期: 2017年05月

学位授予日期: 2017年 月

答辩评委会主席:

评 阅 人:

2017年05月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心)课题(组)的研究成果,获得(国家自然科学基金面上项目(81571996),校长基金(20720150137),基本科研业务费(2012121050))课题(组)经费或实验室的资助,在(国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要	I
Abstract	III
缩略词	V
第一章 前言	1
1 戊型肝炎概述	1
1.1 戊型肝炎病毒的发现	1
1.2 戊型肝炎的流行情况概述	1
1.3 戊型肝炎的发病进程	3
2 戊型肝炎病毒概况	4
2.1 戊型肝炎病毒的病毒粒子	4
2.2 戊型肝炎病毒的基因组及其所编码的蛋白	4
2.3 戊型肝炎病毒的基因型	6
3 戊型肝炎疫苗的研究进展	8
3.1 来源于杆状病毒-昆虫细胞表达系统的戊肝疫苗的相关研究	9
3.2 来源于大肠杆菌表达系统的戊肝疫苗的相关研究	10
4 戊型肝炎病毒的研究模型	11
4.1 戊型肝炎病毒的动物感染模型	11
4.2 戊型肝炎病毒的细胞培养模型	12
4.3 HEV 类病毒颗粒 (Virus-like particle, VLP) 的研究模型	13
5 戊型肝炎病毒的中和实验方法	14
5.1 基于 real-time PCR 检测	14

5.2 免疫荧光斑点计数检测 (IFA)	16
6 本论文研究思路、目的与意义	17
第二章 材料与方法	19
1 材料	19
1.1 主要仪器	19
1.2 主要耗材	20
1.3 常用质粒、菌株、细胞和实验动物	21
1.4 主要试剂	22
1.5 培养基及实验用溶液配制	23
2 方法	26
2.1 分子克隆	26
2.2 戊型肝炎衣壳蛋白表达和纯化	28
2.3 蛋白性质鉴定	29
2.4 单克隆抗体的制备和纯化	31
2.5 Real-time PCR 检测技术	33
2.6 常规细胞生物学实验方法	34
2.7 戊型肝炎病毒细胞模型实验方法	36
2.8 戊型肝炎病毒体外生产方法	37
第三章 结果与分析	38
第一部分 戊型肝炎病毒中和模型的建立	38
1 类病毒颗粒吸附模型的建立	38
1.1 类病毒颗粒的荧光标记摸索	38
1.2 偶联生物素的类病毒颗粒的性质鉴定	41
1.3 类病毒颗粒的加入量确定	43

2 戊型肝炎病毒感染模型的建立	46
2.1 感染性克隆的构建	46
2.2 病毒体外生产系统摸索	47
2.3 病毒感染条件的摸索	51
3 第一部分小结	54
第二部分 戊型肝炎病毒中和模型的应用	55
1 戊型肝炎病毒及类病毒颗粒中和模型的相关性验证	55
1.1 两种模型评估结果的比较	55
1.2 类病毒颗粒中和模型应用于 HEV 血清评估的可行性	57
2 应用类病毒颗粒中和模型探究血清中和滴度和 IgG 水平的关系	58
3 应用 HEV 中和模型初步探究 Kernow 病毒的免疫逃逸	61
3.1 Kernow 逃逸突变的发现.....	61
3.2 病毒的加入量确定	62
3.3 Kernow 的免疫逃逸验证.....	64
4 第二部分小结	66
第四章 讨论	68
1 类病毒颗粒中和模型应用于评估 HEV 特异性抗体和血清的中和	68
2 血清的中和抗体和病毒清除之间的关系	68
3 戊肝病毒免疫逃逸机制探究	69
第五章 小结与展望	71
参考文献	72
致谢	86
在学期间发表文章	87

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract.....	III
Abbreviations	V
Chapter 1. Introduction	1
1 Overview of hepatitis E.....	1
1.1 Discovery of hepatitis E virus (HEV).....	1
1.2 Epidemiological characteristics of hepatitis E.....	1
1.3 The symptoms and complications of hepatitis E.....	3
2 Overview of hepatitis E virus	4
2.1 Virion of hepatitis E virus	4
2.2 Genome and proteome of hepatitis E virus	4
2.3 Genotype of hepatitis E virus	6
3 Development of the prophylactic vaccines against hepatitis E virus.....	8
3.1 Research of vaccines against HEV expressed in baculovirus-insect cells	9
3.2 Research of vaccines against HEV expressed in E.coli	10
4 Research model of hepatitis E virus	11
4.1 Animal model of HEV	11
4.2 Cell model of HEV	12
4.3 Virus-like particle (VLP) model of HEV	13
5 Neutralization assay of HEV	14
5.1 Detection based on real-time PCR.....	14
5.2 Detection based on immunofluorescence foci assay (IFA)	16
6 The purpose and significance of this study	17

Chapter 2. Materials and Methods	19
1 Materials	19
1.1 Instruments	19
1.2 Main supplies.....	20
1.3 Plasmids, strains, cell lines and animals.....	21
1.4 Reagents.....	22
1.5 Medium and experimental solution	23
2 Methods.....	26
2.1 Molecular cloning.....	26
2.2 Protein expression and purification	28
2.3 Identification of protein characteristics	29
2.4 Preparation and purification of mAbs	31
2.5 Method of Real-time PCR.....	33
2.6 Cell biology methods.....	34
2.7 Methods of HEV based on cell model.....	36
2.8 HEV production in vitro	37
Chapter 3. Results and Analysis.....	38
Part 1 Establishment of HEV neutralizing model	38
1 Establishment of VLP adsorption model	38
1.1 Fluorescence labelling of VLP	38
1.2 Identification of biotio-conjugated VLP.....	41
1.3 Determination of input of VLP	43
2 Establishment of HEV infection model	46
2.1 Construction of infectious clone.....	46
2.2 Exploration of HEV production system	47
2.3 Exploration of HEV infectious conditions	51

3 Summary of part 1	54
Part 2 Application of HEV neutralizing model.....	55
1 Linear regression of HEV model and VLP model.....	55
1.1 Comparison of the two assays	55
1.2 The feasibility of evaluation of sera neutralization using VLP model.....	57
2 Linear regression of neutralization titres and IgG level of sera	58
3 Study of immune escape of Kernow using HEV model	61
3.1 Discovery of Kernow immune escape.....	61
3.2 Determination of viral input	62
3.3 Demonstration of Kernow immune escape	64
4 Summary of part 2	66
Chapter 4 Discussion	68
1 Evaluation of HEV mAbs and sera based on VLP neutralization assay	68
2 The relation of neutralization mAb of sera and virus clear	68
3 The mechanism of immune escape of HEV	69
Chapter 5 Conclusion and prospect.....	71
References.....	72
Acknowledgements	86
Published papers.....	87

摘要

戊型肝炎（Hepatitis E, HE）是由戊型肝炎病毒（Hepatitis E virus, HEV）所引起的病毒性肝炎。近年来，HEV 已逐渐成为全球范围内引发急性病毒性肝炎的主要原因之一。孕妇与老年人是主要高危人群，戊型肝炎病例的病死率约为 0.2~4%，孕妇感染 HEV 的病死率可高达 10~25%。HEV 是单股正链 RNA 病毒，基因组全长 7.2 kb，包含 3 个开放阅读框（Open Reading Frame, ORF），其中 ORF2 负责编码戊型肝炎病毒唯一的衣壳蛋白，共包含 660 个氨基酸，该蛋白参与了病毒组装及病毒与细胞的相互作用。基于戊肝病毒 ORF2 重组表达了可以自组装成类病毒颗粒的截短蛋白 p239（a.a. 368-606），能够展示天然病毒的免疫优势中和表位，可用于研究 HEV 的早期入胞进程。

HEV 侵染宿主后，机体被激发的抗体免疫反应有效性需要基于中和实验进行评估。传统的 HEV 中和检测方法有 real-time PCR 以及免疫荧光斑点计数（immunofluorescence foci assay, IFA），real-time PCR 通过定量检测吸附细胞的病毒的 RNA，灵敏度高，但是操作繁琐，重复性不好；IFA 可以检测到病毒入胞后的中和，但是时间成本高，病毒来源少。本研究建立了基于生物素偶联 p239（p239-b）结合偶联链亲和素的 APC 进行荧光标记，并用流式细胞仪进行检测的高通量中和模型，可以应用于 HEV 特异性抗体和血清的中和检测。

基于 p239 的中和模型主要应用于评估抗体对于 HEV 类病毒颗粒的吸附阻断，没有涉及到抗体对病毒入胞后的作用，因此我们需要建立基于 HEV 真病毒的中和模型用于评估抗体对病毒吸附、入胞、复制整个过程的中和作用。传统的 IFA 中和检测方法由于病毒体外感染效率不高，灵敏度低，阳性细胞数计数结果波动大，本研究中我们首次利用复制率较高的 HEV 基因 3 型 Kernow 病毒建立了中和模型。Kernow 中和模型评估的结果显示与类病毒颗粒模型具有较好的相关性，并且利用 Kernow 中和模型证明了 HEV 感染和疫苗免疫产生的中和抗体基本都是针对于 p239 的表位，阐明了类病毒颗粒中和模型可以应用于 HEV 抗体和血清的中和评估。

应用类病毒颗粒中和模型评估结果显示恒河猴血清 IgG 水平和抗体中和滴

度有较好的相关性，说明血清的中和抗体绝大多数是 IgG。但是，机体对于抗原激发的 IgM 应答也会影响血清的中和抗体滴度，说明血清的中和抗体也有一部分是 IgM。此外，对于 IgG 水平相当的疫苗免疫血清和病毒感染血清，病毒感染血清的中和抗体所占比例比疫苗免疫血清更高，也就是说，病毒感染相对于疫苗免疫的方式会激发机体更有效地产生中和抗体。

我们在评估 HEV 特异性抗体对于 Kernow 病毒的中和实验中，意外地发现已知的 HEV 中和抗体 8G12 无法中和 Kernow，分析发现是由于病毒的 554 位点突变导致的，这个位点的突变还会引起病毒在人血清中的免疫逃逸，在人群中具有潜在的威胁性。

综上所述，本研究建立了新型的高通量的类病毒颗粒中和模型，为 HEV 特异性抗体和血清的中和评估提供了一种新的检测手段。但是该模型仅限于评估抗体阻断类病毒颗粒吸附细胞的能力，对于涉及到病毒入胞后的复制过程，需要依赖于 Kernow 的中和模型，但是 Kernow 中和系统存在耗时长，病毒产量较低等缺点，不适用于大规模的中和检测实验。这两个中和检测模型优势互补，根据不同的实验需要进行选择，有利于 HEV 临床研究相关工作的开展。

关键词：戊型肝炎病毒；类病毒颗粒；中和检测

Abstract

Hepatitis E (HE) is a viral hepatitis caused by hepatitis E virus (HEV). In recent years, HEV has gradually become one of the most important causes of acute viral hepatitis in the world. Pregnant women and the elderly are the main high-risk groups. The mortality rate ranges from 0.2% to 4% among the hepatitis E cases. However, pregnant women with HEV infection may have a case-fatality rate of 10–25%. HEV is a non-enveloped virus with a single-stranded RNA genome. The 7.2-kb viral genome contains three open reading frames (ORFs), of which ORF2 exclusively encodes a major viral capsid protein 660 amino acids in length that is responsible for virion assembly and attachment to host cells. p239 which is expressed from a.a. 368–606 of HEV pORF2 can self-assemble into virus-like particles (VLP). p239 presents the immune-dominant neutralization epitopes as native HEV particles and can be used for HEV early entry study.

A method for evaluating neutralization is needed to assess an effective immune response of host against the virus after HEV infection. The traditional methods for evaluating neutralizing antibody titres against HEV are real-time PCR and the immunofluorescence foci assay (IFA). The neutralizing assay based on real-time PCR calculates the quantities of virus by detecting RNA, which are highly sensitive but operationally complicated and poorly repeatable. IFA ensures that neutralization post-attachment can be tested. However, it is time-consuming and lack of viral source. In this study, we developed a novel high-throughput neutralizing assay based on biotin-conjugated p239 and staining with allophycocyanin-conjugated streptavidin (streptavidin APC) using flow cytometry. Using this method, we quantitatively evaluated the neutralization of HEV-specific antibodies and sera.

The neutralization assay based on p239 was used to evaluate adsorption blocking. However, neutralization post-attachment can't be tested. Therefore, a neutralization model based on HEV was established to evaluate neutralization of antibodies against viral adsorption, entry and replication. Tradition IFA neutralizing assay was insensitive because of inefficient replication of virus, resulting in fluctuation of the assays. We firstly took advantage of highly replicated HEV genotype 3 Kernow to establish a novel neutralizing assay. A linear regression analysis indicated that there was a high degree of correlation between IFA and the VLP assay. Using the IFA neutralizing assay, we

also proved that the major neutralizing antibodies present in sera recognized determinants on p239. Therefore, we were able to quantitatively evaluate the neutralization of HEV antibodies and sera using the VLP neutralization model.

The anti-HEV IgG level had good concordance with the neutralizing titres of macaque sera using VLP neutralizing model. It indicated that IgG represented the major neutralizing antibodies in sera. However, the neutralization titres of the sera were also influenced by anti-HEV IgM responses. Further analysis also indicated that, the proportions of neutralizing antibodies in the infected macaques' sera were higher than in the vaccinated macaques with the same anti-HEV IgG levels. Thus, the infection more efficiently stimulated neutralizing antibody responses.

While evaluating the neutralization of HEV-specific antibodies against Kernow, we found that Kernow couldn't be neutralized with 8G12. It was caused by virus mutation at the site of 554. Furthermore, virus could escape from recognizing of immune system via virus mutation of this site, which might be risk in the population.

In conclusion, a novel, high-throughput neutralizing assay based on VLP was developed in this study. Using this method, we could evaluate neutralization of HEV-specific antibodies and sera, which provided a new detection method for HEV diagnosis. However, it could only test adsorption blocking of antibodies. IFA based on Kernow was used to ensure that neutralization post-attachment could be tested. But it was not adapted to high-throughput experiment for time-consuming and low virus production. These two neutralization assays have complementary advantages and will be useful in HEV research.

Key words: Hepatitis E virus; Virus-like particle; Neutralizing assay

缩略词

a.a.: Amino acid, 氨基酸

Amp: Ampicillin, 氨苄青霉素

bp: Base pair, 碱基对

DNA: Deoxyribonucleic acid, 脱氧核糖核酸

DNase: Deoxyribonuclease, 脱氧核糖核酸酶

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, 四乙酸二氨基乙烯

ELISA: Enzyme-linked immunosorbant assay, 酶联免疫吸附测定

ET-NANBH: Enterically transmitted non-A non-B hepatitis, 肠道非甲非乙型肝炎

FBS: Fetal bovine serum, 胎牛血清

FCM: Flow cytometry, 流式细胞仪

FITC: Fluorescein isothiocyanate, 异硫氰酸荧光素

GAM-HRP: HRP-labelled goat anti mouse secondary antibody conjugate, 标记有辣根过氧化物酶的羊抗鼠抗体

HAV: Hepatitis A virus, 甲型肝炎病毒

HE: Hepatitis E, 戊型肝炎

HEV: Hepatitis E virus, 戊型肝炎病毒

HPLC: High performance liquid chromatography, 高效液相色谱

HRP: Horseradish peroxidase, 辣根过氧化物酶

IgG: Immunoglobulin G, 免疫球蛋白 G

IgM: Immunoglobulin M, 免疫球蛋白 M

Kan: Kanamycin, 卡那霉素

kb: Kilo base pair, 千碱基对

kD: Kilo daltons, 千道尔顿

mAb: Monoclonal antibody, 单克隆抗体

mRNA: Messenger ribonucleic acid, 信使核糖核酸

OD: Optical densities, 光密度

ORF: Open reading frame, 开放阅读框

PBS: Phosphate-buffered saline, 磷酸盐缓冲液

PBST: PBS+0.5% (wt/vol) Tween 20, 洗涤液

PCR: Polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应

RdRP: RNA-dependent RNA polymerase, RNA 依赖的 RNA 聚合酶

RNA: Ribonucleic acid, 核糖核酸

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, 聚丙烯酰胺凝胶电泳

VLP: Virus-like particle, 类病毒颗粒

WB: Western blotting, 蛋白印迹实验

第一章 前言

1 戊型肝炎概述

1.1 戊型肝炎病毒的发现

印度新德里在 1955 年至 1956 年期间暴发了由于水源污染导致的急性肝炎，当时普遍认为是由甲型肝炎病毒（Hepatitis A Virus, HAV）引发的。多年之后，Feinstone^[1]等在回顾性研究中指出，当时发现的患者血清中缺乏 HAV 相应的感染指标，提示有可能存在其他的传染性病原体。1980 年，利用特异性识别甲肝和乙肝血清学的检测手段依旧无法检测到新德里和克什米尔（1978-1979）流行的急性肝炎病原体，至此，人们逐渐认识到存在新的病毒性肝炎病原体，并将其命名为非甲非乙型肝炎（enterically transmitted non-A non-B hepatitis, ET-NANBH）病毒^[2,3]。前苏联科学家 Balayan^[4]等在 1983 年第一次获得了该病毒的病原学鉴定，有一名志愿者在与 ET-NANBH 患者粪便样本接触之后，出现急性肝炎症状，并且对该名志愿者的粪便和血清样本进行免疫电镜观察，发现了一种直径为 27-34nm 的无包膜的病毒颗粒。该病毒颗粒可以感染食蟹猴并引起急性肝炎症状。1990 年，Reyes^[5]成功地从被 ET-NANBH 患者粪便样本中的病毒感染了的非人灵长类动物胆汁样品内分离到该病原体，并获得了其基因组克隆测序结果，至此正式将其命名为戊型肝炎病毒（Hepatitis E virus, HEV）。

1.2 戊型肝炎的流行情况概述

戊肝病毒主要有两种流行方式^[6]：一种方式是在发展中国家由水源污染等引发的大规模暴发流行；另一种是在发达国家由于个人的卫生习惯等引起的散发流行（图 1-1）。

在许多发展中国家，戊肝病毒感染是一个严重的公共卫生问题。20 世纪以来，有报道过多次的戊肝大暴发，包括中国^[7,8]、印度^[9]、尼泊尔、巴基斯坦、印尼、泰国、缅甸、黎巴嫩、埃塞俄比亚^[10]、苏丹、索马里、乍得、墨西哥^[11]以及乌干达^[10]等。近年来戊肝暴发的较大规模的地区是在乌干达北部，累计 3218 个发病人数。尼泊尔比瑞那葛地区 2014 年 4-5 月也发生戊肝暴发流行，造

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库