

戊型肝炎病毒衣壳蛋白中和表位间的构象诱导

张军, 顾颖, 欧山海, 王颖彬, 叶祥忠, 林鉴, 葛胜祥, 夏宁邵

(厦门大学 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005;

福建省医学分子病毒学研究中心, 厦门大学, 厦门 361005)

摘要: 重组蛋白 NE2 包含了戊型肝炎病毒(HEV)衣壳蛋白(pORF2)的 aa394~606 片段。在 NE2 上已鉴定出了 2 个 HEV 中和表位, 并获得了 3 个识别中和表位的单克隆抗体(MAb) 8C11、13D8 和 8H3。这 3 个 MAb 间的交叉阻断 ELISA 实验发现, 8C11 和 13D8 可以彼此完全阻断, 8H3 对 8C11 和 13D8 均不能阻断, 而 8C11 非但不能阻断 8H3, 反而显著增强了 8H3 与抗原的结合。用生物传感器进行的抗体与抗原结合的动力学分析也证实了这一现象。这些结果提示, 在 NE2 上 8H3 表位区域受到抗原上某些结构的掩盖, 而 8C11 与 NE2 的结合引起了抗原空间结构的改变, 导致了掩盖 8H3 表位的结构的去除和 8H3 表位的充分暴露。免疫捕获 RT-PCR 发现, 8C11 同样可以显著增强 8H3 对天然 HEV 病毒的捕获能力, 提示这种结合诱导的衣壳蛋白空间构象改变在天然 HEV 病毒颗粒上同样存在。

关键词: 戊型肝炎病毒; 中和表位; 单克隆抗体; 构象改变

中图分类号: R373 Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721(2004)02-0104-06

戊型肝炎病毒(HEV)是戊型肝炎的病原体, 为单股正链无包膜的 RNA 病毒, 电镜下大小约 27~34nm, 其表面有许多类似杯状病毒的凸起和缺刻结构^[1]。HEV 基因组包含 3 个开放读码框架(ORF), 其中 ORF2 编码病毒结构蛋白, 组成病毒衣壳, 为病毒的最外层, 因此推测其包含了病毒的细胞受体结合位点, 也是机体抗 HEV 保护性体液免疫应答的主要靶抗原^[2]。最近, 我们在大肠杆菌中表达了 HEV ORF2 的一个片段, 获得的重组蛋白(NE2)可自发形成以二聚体为基础的多种聚合形式, 类似于病毒衣壳蛋白的装配过程^[2]。NE2 免疫恒河猴可产生良好的保护性^[3]。从 NE2 蛋白制备的单克隆抗体(MAb)中筛选到 3 株能够直接捕获天然 HEV 的 MAb(8C11、13D8 和 8H3), 中和保护试验证实, 这 3 株单克隆抗体均识别中和表位^[4]。在用单克隆抗体进行相互阻断试验以了解所识别的表位区域的重叠情况时, 我们意外地发现单克隆抗体 8C11 与 NE2 抗原的结合不仅不会阻断 8H3 单克隆抗体的反应, 反而显著增强了单克隆抗体 8H3 与抗原的反应性。本研究进一步验证了这一现象, 并对这一现象的结构基础及其生物学含义进行了探讨。

材料与方法

- 1 重组抗原 NE2 的表达和纯化 参见文献^[2]。
- 2 单克隆抗体及其 Fab 片段的制备 抗 HEV 中和单克隆抗体 8C11、13D8 和 8H3 的制备和鉴定参见文献^[4]。纯化的单克隆抗体按文献^[5]以木瓜蛋白酶(Sigma 公司)消化后, 以 DEAE 柱层析纯化, 获得单克隆抗体的 Fab 片段。
- 3 阻断 ELISA 试验 以改良过碘酸钠法标记各单克隆抗体, 用 ELISA 法进行相互阻断试验。取每孔 0.05μg/ml NE2 包被的 ELISA 板, 分为 3 组, 每组分别加入 100μl 孔的不同单克隆抗体(分别以 20% 小牛血清 PBS 稀释至 ELISA 滴度为 10⁵), 另外 1 个孔中仅加入 20% 小牛血清 PBS 作为对照; 37℃ 孵育 30min; 吸弃液体, 在 3 组孔中分别加入 100μl 孔的 3 种不同的辣根过氧化物酶(HRP)标记的单克隆抗体(以 20% 小牛血清 PBS 稀释至 10³ ELISA 滴度); 37℃ 孵育 30min; 用 PBST 洗涤 5 次并扣干后, 加入显色剂, 37℃ 温育 15min, 2mol/L 硫酸 50μl 终止反应, 酶标仪上读取 OD_{450/620nm} 的读值。
- 4 抗体的结合动力学分析 采用 BIAcore X 生物传感器(BIAcore)。按操作说明将 NE2 抗原耦联于 CM-5 传感器芯片上。耦联前将 NE2 抗原以 pH5.5 的 10mmol/L 醋酸钠稀释至终浓度为 0.155mg/ml。芯片上第一个流动池耦联了 84RU 的 E2 抗原, 另一个流动池未耦联蛋白作为对照。将 20μl MAb 或 Fab 以 10μl/min 的流速流经芯片, 记录单克隆抗体与 NE2 抗原结合的动力学曲线。结合的 MAb 8C11、13D8、8H3 和 Fab 8H3 的浓度分别为 0.1mg/ml, 0.1mg/ml, 1.2mg/ml 和 0.25mg/ml。亲和常数测量时, 先以 HBS 缓冲

收稿日期: 2003-10-29; 修回日期: 2004-03-02

基金项目: 福建省科技重大项目(2002F013); 教育部跨世纪人才优秀培养计划

作者简介: 张军(1972-), 男, 副研究员, 研究分子病毒学。

通讯作者: 夏宁邵, 361005 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室(E-mail: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn)

液以 $10\mu\text{l}/\text{min}$ 的流速洗涤 100s, 然后以同样流速加入 $100\mu\text{l}$ 的 MAb 或 Fab。动力学分析重复 2 次。以 HBS 缓冲液系列稀释 MAb 8C11、13D8、8H3 以及它们的 Fab 片段, 每个抗体检测 5 个浓度。各 MAb/Fab 浓度范围分别为: $53.75 \sim 430\text{nmol}/\text{L}$ (MAb 8C11), $494 \sim 3956\text{nmol}/\text{L}$ (Fab 8C11), $58.75 \sim 470\text{nmol}/\text{L}$ (MAb 13D8), $1550 \sim 6200\text{nmol}/\text{L}$ (Fab 13D8), $290 \sim 11600\text{nmol}/\text{L}$ (MAb 8H3), $39.7 \sim 2333\text{nmol}/\text{L}$ (Fab 8H3)。在抗体结合期间, 芯片以 $50\text{mol}/\text{L}$ HCl 1min 再生。再生过程基本不影响芯片上 NE2 抗原与抗体的结合。

5 HEV 的免疫捕获 单克隆抗体以 pH9.6 的碳酸盐包被缓冲液稀释至 $1:1000$, 37°C 过夜包被 Eppendorf 管, PBS 洗涤 3 次后, 以 1.5ml 含 2% 牛血清白蛋白的 PBS 缓冲液 37°C 封闭 2h, 洗涤 3 遍。含 HEV 的粪便标本来自 HEV 实验感染 1 周的恒河猴, 以生理盐水制备成 10% 悬液。取适量悬液分别与 $1:10$ 、 $1:100$ 、 $1:1000$ 和 $1:10000$ 稀释的 MAb 8C11、 $1:100$ 稀释的 MAb 13D8 或稀释缓冲液 (PBS) 孵育, 37°C 2h。取 $500\mu\text{l}$ 加入抗体包被管中, 37°C 2h。洗涤 7 遍, 加入 $25\mu\text{l}$ ddH₂O 和 $750\mu\text{l}$ Trizol 试剂 (GIBCO) 提取 RNA, 溶于 $20\mu\text{l}$ 反转录缓冲体系中, 以引物 A3 ($5'-\text{GGCTCACCGGAGTGTTCCTTG}-3'$) 进行反转录。取 $2\mu\text{l}$ 反转录产物, 以引物 A3 和 A5 ($5'-\text{CTTTGATGACACCGTCTTCTCG}-3'$) 进行第 1 轮 PCR 扩增, 条件为 94°C 40s, 68°C 40s, 35 个循环。 $2\mu\text{l}$ 第 1 轮 PCR 扩增产物以引物 B5 ($5'-\text{GCCGAGCAAAAGGCATCCATG}-3'$) 和 B3 ($5'-\text{GTGTTTCTTCCAAAAACCTCGG}-3'$) 进行 35 个循环的第 2 轮 PCR 扩增 (94°C 40s; 56°C 40s; 72°C 80s)。

结 果

1 抗 HEV 中和单克隆抗体间的相互阻断 ELISA

NE2 抗原包被的 ELISA 板反应孔中, 分别加入稀释缓冲液、饱和反应浓度的抗 HEV 中和单克隆抗体 8C11、13D8 或 8H3, 然后再加入过氧化物酶标记的单克隆抗体 8C11、13D8 或 8H3, 检测 3 株单克隆抗体间的交叉阻断效应 (图 1)。结果可见单克隆抗体 8C11 和 13D8 彼此几乎完全阻断。单克隆抗体 13D8 对 8H3 有少许阻断, 但 8C11 显著增强 8H3 的结合, 而 8H3 对 8C11 或 13D8 均不阻断。单克隆抗体 8H3 对自身仅有部分阻断。这些结果提示, 在 NE2 上有两个彼此分离的抗原结构域: 一个被单克隆抗体 8C11 和 13D8 所识别, 另一个被单克隆抗体 8H3 所识别。单克隆抗体 8C11 和 13D8 识别的表位彼此十分接近, 因此可以相互完全阻断。这 2 个单克隆抗体对 8H3 的阻断效应则明显不同, 这种区别难以用空间位阻来解释。为进一步了解这种异常现象, 我们用 NE2 抗原偶联的生物传感器芯片对这

3 株单克隆抗体与抗原结合的动力学过程进行了进一步分析。

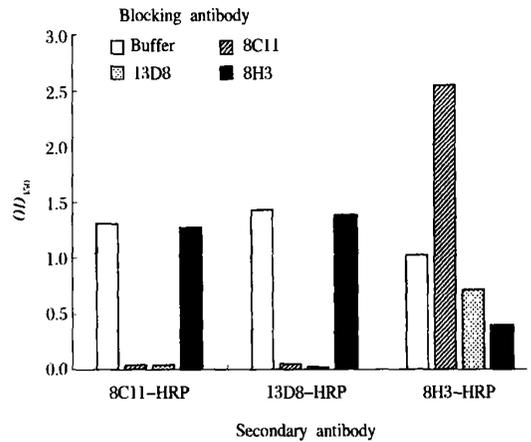


图 1 抗 HEV 中和单克隆抗体间的交叉阻断 ELISA
Figure 1 Cross-blocking ELISA among the anti-HEV neutralizing monoclonal antibodies

2 中和单克隆抗体及其 Fab 片段与 NE2 抗原结合的动力学分析

单克隆抗体或其 Fab 片段与 NE2 抗原芯片结合 1min 后, 以缓冲液洗涤 1min。所检测抗体与固化抗原的结合和解离过程如图 2, 可见 3 个单克隆抗体的结合曲线相近。在洗涤时 8C11 和 13D8 的解离十分缓慢 (图 2A, 2B), 但 8H3 的解离要快得多 (图 2C); 8H3 的 Fab 片段的解离也较为明显, 但较完整抗体为慢 (图 2D)。单克隆抗体 8H3 与抗原结合后的快速解离, 可以解释在 ELISA 阻断实验中 8H3 单克隆抗体对自身的低阻断率。

检测了多个浓度的抗体/Fab 片段与抗原的结合-解离曲线, 计算出了这 3 个单克隆抗体及其 Fab 片段与 NE2 抗原的结合动力学常数 (表 1)。8C11 和 13D8 完整抗体的结合动力学十分相似, 其结合率常数 (K_a)、解离率常数 (K_d) 和平衡解离常数 (K_D) 均相近。8C11 和 13D8 的 Fab 片段的 K_a 与完整抗体类似, 但其 K_d 以及 K_D 提高了 5~10 倍, 可能与完整抗体的二价效应有关。8H3 单克隆抗体的解离率与另 2 个抗体相近, 但其结合率降低了大约 100 倍, 因此其 k_D 相应的较 8C11 和 13D8 高了约 100 倍。这提示 8H3 与抗原的接触与 8C11 和 13D8 相比受到了限制。显然, 限制 8H3 完整抗体的结合的因素对于 8H3 的 Fab 片段几乎不起作用。与 8H3 完整抗体相比, 8H3 的 Fab 片段的结合率提高了大约 1000 倍, 同时其解离率降低了约 100 倍, 导致了其 k_D 降低了约 10^5 。这种结合动力学上的巨

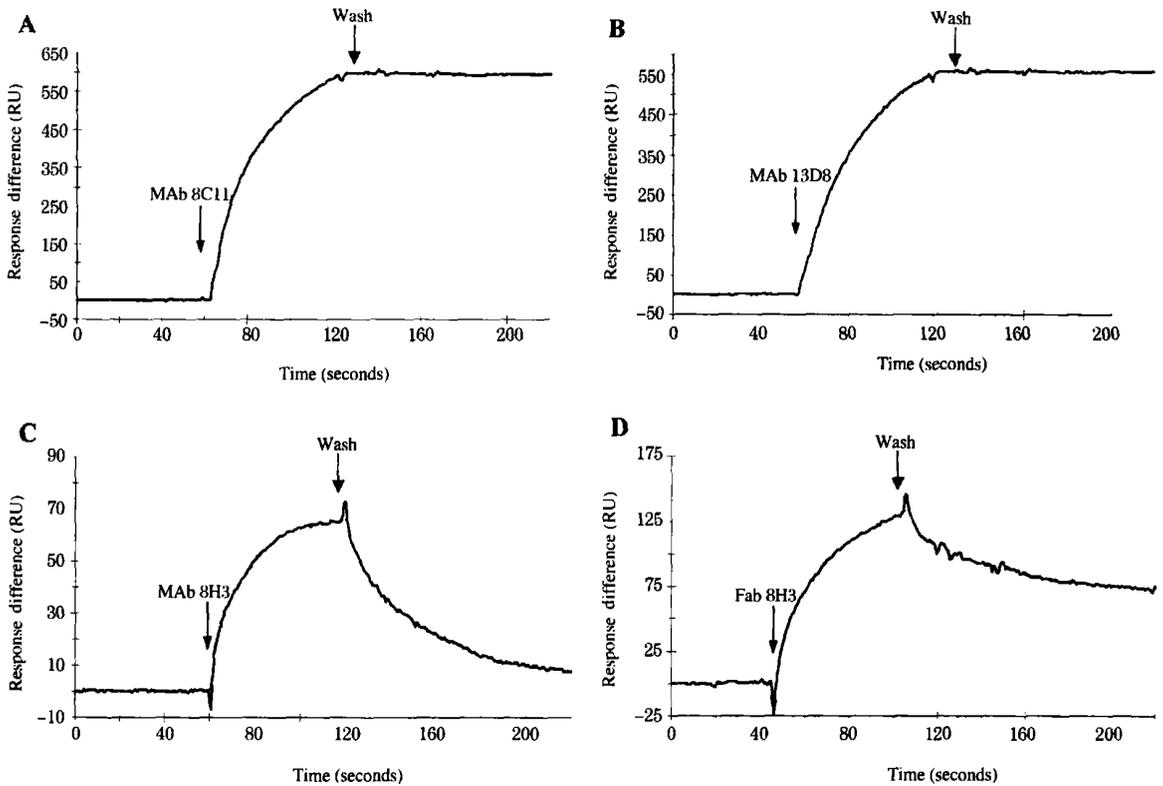


图 2 抗 HEV 单克隆抗体的结合曲线
Figure 2 Anti-HEV MAb binding curves

表 1 抗 HEV 中和单克隆抗体及其 Fab 片段与 NE2 抗原的结合动力学参数

Table 1 Binding kinetics of HEV specific neutralizing monoclonal antibodies and the Fabs with NE2 antigen

MAb	$K_a (M^{-1}s^{-1})$	$K_d (s^{-1})$	$K_D (M)$
8C11	2×10^4	5×10^{-4}	2×10^{-8}
8C11 Fab	8×10^3	5×10^{-3}	6×10^{-7}
13D8	1×10^4	2×10^{-4}	2×10^{-8}
13D8 Fab	2×10^4	6×10^{-3}	3×10^{-7}
8H3	1×10^2	3×10^{-4}	2×10^{-6}
8H3 Fab	2×10^5	4×10^{-6}	2×10^{-11}

K_a , Association rate constant; K_d , Dissociation rate constant; K_D , Equilibrium dissociation constant.

大差别显然不能以多价效应所解释。更可能的是, 这种差别是由于抗原的三维立体结构造成的, 在这种空间结构中 8H3 的表位为其它结构所部分掩盖, 造成了其与完整抗体接触时的巨大空间位阻, 但却难以阻碍体积更小的 Fab 片段的与表位的接触。

3 中和单克隆抗体 8C11 和 13D8 对中和单克隆抗体 8H3 的结合动力学过程的影响

为进一步了解单克隆抗体 8C11 和 13D8 对单克隆抗体 8H3 的结合动力学的不同影响, 在单克隆抗体 8H3 或其 Fab 片段与 NE2 芯片结合之前, 先分

别以单克隆抗体 8C11 或 13D8 与其结合(图 3)。与直接与 NE2 结合的曲线(图 2D)相比, 8C11 单克隆抗体显著增强了 8H3(图 3A) 及其 Fab 片段(图 3C) 与 NE2 芯片的结合, 并显著降低了复合物的解离。而 13D8 则抑制了 8H3 单克隆抗体或其 Fab 与抗原的结合(图 3B、3D)。与直接结合相比, 8C11 的预结合增强了 8H3 完整抗体及 Fab 片段的结合率(图 3E), 并降低了它们的解离率(图 3F)。这一现象提示, 8C11 与 NE2 抗原的结合可能消除了掩盖 8H3 表位的因素, 使 8H3 完整抗体和 Fab 抗体具有了相似的表位接触机会。13D8 对 8H3 完整抗体或其 Fab 片段的抑制相似, 导致了相应结合率的降低(图 3E), 但对复合物的解离率却几乎没有影响(图 3F)。

4 中和单克隆抗体 8C11 和 13D8 对中和单克隆抗体 8H3 与 HEV 病毒颗粒结合的影响

将 1 份 HEV 实验感染猴的血清阳转前 HEV RNA 阳性的粪便标本, 稀释至可被兔抗 HEV 血清和单克隆抗体 8C11 捕获 RT-PCR 检出, 但不能被单克隆抗体 8H3 捕获 RT-PCR 检出的浓度。分别与稀释缓冲液、13D8 或系列稀释的单克隆抗体 8C11 孵育后, 分别加入以单克隆抗体 8H3 或 8C11

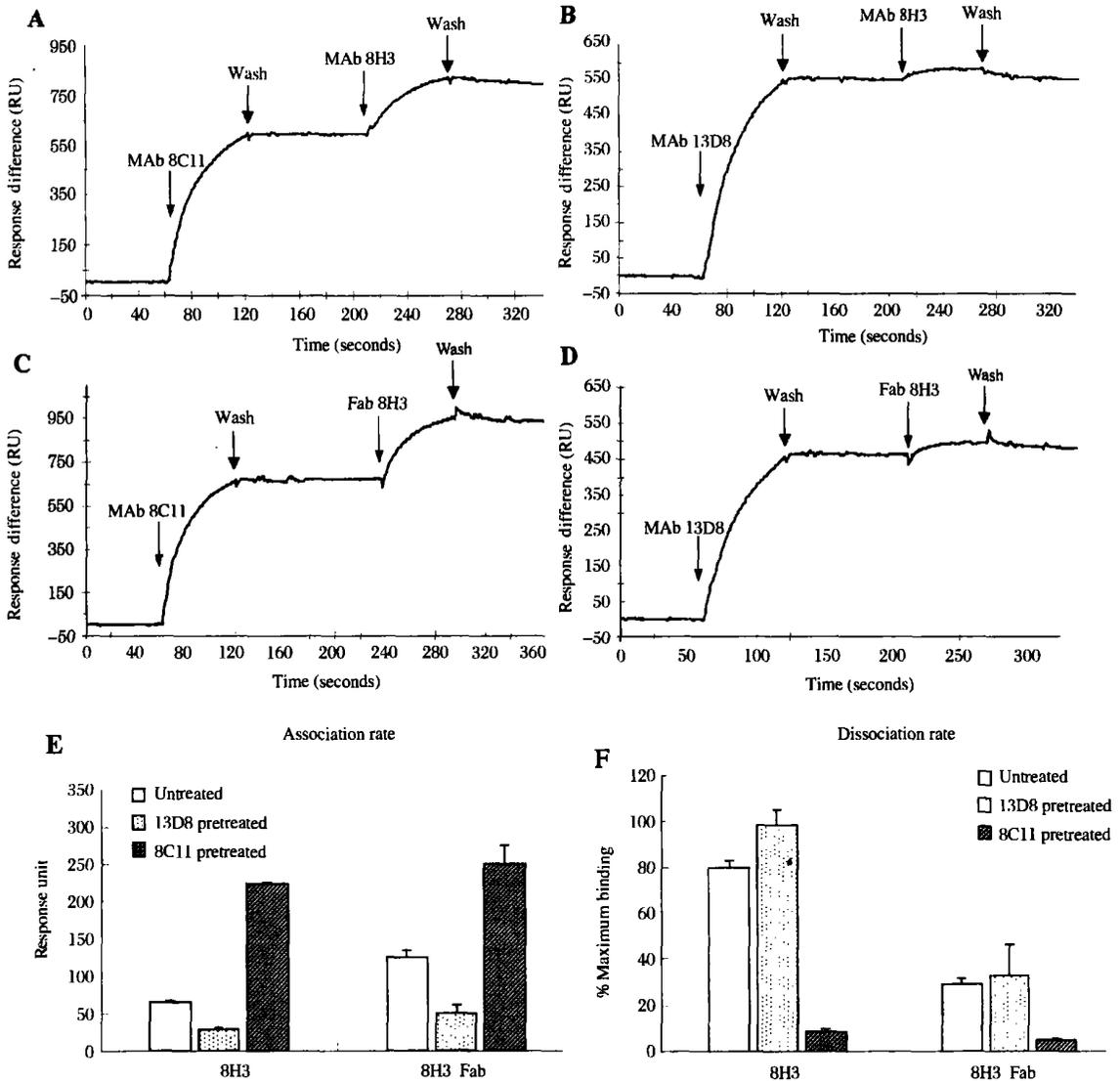


图 3 单克隆抗体 8C11 和 13D8 对 8H3 与 NE2 抗原的结合和解离的影响

Figure 3 Effects of monoclonal antibodies 8C11 and 13D8 on binding and dissociation of 8H3 with NE2 antigen

包被的 Eppendorf 管, 以 RT-PCR 检测被捕获的病毒(图 4)。无包被抗体对照对孵育与否的病毒均不能捕获(图 4, 第 2、7 道)。单克隆抗体 8C11 对病毒的捕获可被自身阻断(图 4, 第 5 道)。抗 NE2 多抗和 8C11 均能直接捕获病毒(图 4, 第 3、4 道)。8H3 不能直接捕获未孵育病毒、13D8 孵育病毒和以较低浓度 8C11 单克隆抗体孵育的病毒(图 4, 第 6、11、10 道), 但却可以捕获以较高浓度 8C11 单克隆抗体孵育的病毒(图 4, 第 8、9 道)。这一结果提示与重组 NE2 抗原的情况相似, 8C11 单克隆抗体与 HEV 病毒颗粒的结合同样增强了 HEV 病毒颗粒表面 8H3 表位的暴露。

讨 论

对 3 株识别中和表位的单克隆抗体 8C11、13D8 和 8H3 进行的交叉阻断 ELISA 实验发现, 单克隆抗体 8C11 和 13D8 识别相同的表位区域, 而 8H3 识别另一个表位区域。单克隆抗体 8C11 与 NE2 抗原的结合不仅不会阻断 8H3 单克隆抗体的反应, 反而显著增强了单克隆抗体 8H3 与抗原的反应性。动力学研究显示, 8C11 和 13D8 的动力学特征十分相似, 但 8H3 的解离率与 8C11 或 13D8 相近, 但其结合率较后二者低约 100 倍。这种差别提示 8H3 表位在 NE2 抗原上暴露不充分, 其与抗体的结合受到

其它空间结构的阻碍。奇怪的是这种对天然 8H3 抗体的阻碍对于 8H3 抗体的 Fab 片段却几乎不存在。进一步的研究发现, 8C11 与 NE2 抗原的结合可能导致了抗原空间结构的改变, 这种改变消除了

抗原上对 8H3 表位的掩盖结构, 使 8H3 天然抗体具有与 Fab 片段相近的表位接触机会。而 13D8 则对 8H3 的天然抗体和 Fab 片段均有一定的空间位阻。

免疫捕获 RT-PCR 结果表明, 与重组抗原相

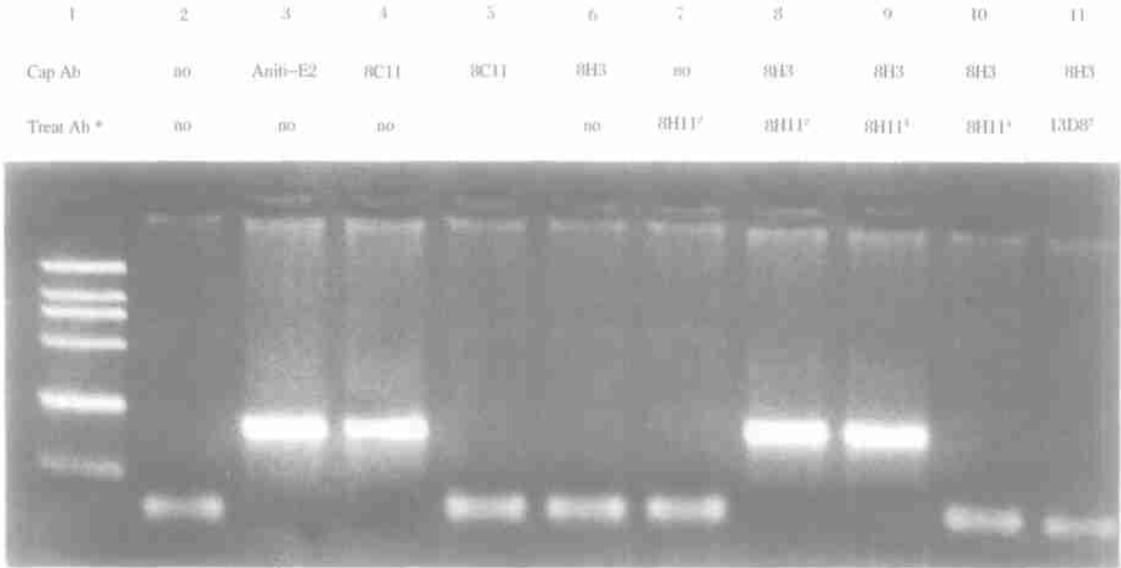


图 4 单克隆抗体 8C11 和 13D8 对 8H3 的病毒免疫捕获的影响

Figure 4 Effects of 8C11 and 13D8 on HEV immune capture by 8H3

* . Number on the right superscript is the ten fold dilution time of MAb.

似, 8C11 对 8H3 表位的诱导增强效应在天然 HEV 病毒颗粒上同样存在。单克隆抗体 8H3 对 HEV 免疫捕获能力较 8C11 或 13D8 的差距提示在 HEV 天然病毒表面 8H3 表位可能同样被其它结构所掩盖, 与 NE2 抗原相似。由于中和表位区域通常与病毒细胞受体结合部位重叠, 因此有理由认为 HEV 识别宿主细胞第一受体的区域是 8C11/13D8 表位区域而非 8H3 表位区域。单克隆抗体 8C11 与 HEV 衣壳蛋白的结合可能引起了衣壳蛋白空间构象的改变, 这种改变导致了 8H3 表位的充分暴露, 并可能导致病毒的细胞第二受体与 8H3 表位区域的结合, 增强了病毒与细胞的结合。病毒通过不同中和位点对宿主细胞吸附可能进一步地引起宿主细胞膜的改变, 导致了病毒的穿入。这一假设与人类免疫缺陷病毒(HIV)和脊髓灰质炎病毒(PV)的情况类似。天然 HIV 上的化学因子受体结合位点被病毒的 V2 可变环所遮盖, 而 gp120 膜蛋白与宿主细胞的 CD4 受体的结合改变了 gp120 的空间结构, 暴露出了病毒的化学因子受体结合位点, 改变了病毒蛋白的保守核心, 引起病毒与宿主细胞结合的亲和力的提高^[6-8]。PV 与宿主细胞的结合也改变了病毒衣壳的结构特征, 使病毒衣壳蛋白 VP4 和 VP1 的 N 端

向外突出^[9,10]。

根据这些现象, 我们推测 HEV 进入宿主细胞的过程可能包含了 2 个步骤: 首先, 宿主细胞与病毒的 8C11 表位区域结合, 引起病毒衣壳蛋白的构象改变, 暴露出了 8H3 表位区域; 随后暴露出的 8H3 表位区域作为第二受体结合位点与细胞成分进一步相互作用, 可能增强了病毒与细胞的结合并使病毒穿入得以完成。对这一假设的进一步验证, 以及对 HEV 上 8C11 表位区域与 8H3 表位区域的进一步研究, 对于阐明 HEV 与细胞的相互作用机制、HEV 细胞受体的分离鉴定等均具有重要的意义。

已有众多证据提示, 重组 NE2 抗原模拟了 HEV 病毒衣壳的主要表面结构特征: (1) NE2 抗原自身能形成类似于 HEV 衣壳蛋白组装过程中间体的同源多聚体结构^[2]; (2) 抗 NE2 抗体在病毒感染的早期即已出现, 并一直以较高水平持续多年^[11-13]; (3) NE2 免疫恒河猴可产生良好的保护性^[3]; (4) 抗 NE2 多抗能中和 HEV 对恒河猴的感染性^[3]; (5) 从 NE2 上鉴定出了 2 个构象依赖性的中和表位, 同时也是机体抗 HEV 免疫应答的免疫优势表位^[4]。本研究又进一步发现 NE2 抗原具有与天然 HEV 病毒颗粒类似的结合诱导的构象改变现

象。这些结果意味着 NE2 抗原可以作为 HEV 病毒衣壳蛋白的近似物, 在诊断、疫苗以及受体分离、病毒感染机制研究等许多方面发挥重要的作用。最近, 我们在 NE2 基础上进一步表达出了 HEV 类病毒颗粒(HEV 239), 同样具有良好的 8C11 和 8H3 活性, 并且同样具有构象诱导改变的现象, 该蛋白在动物实验中显示出了很好的免疫原性和保护性, 具有成为疫苗的良好前景^[14,15]。

参考文献:

[1] Purcell R H, Emerson S U. Hepatitis E virus [A]. Knipe D M, Howley P M, Griffin D E, et al. eds. Fields Virology [M]. 4th ed. Vol 2. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2001. 3051- 3061.

[2] 李少伟, 张军, 何志强, 等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 片段的聚合现象研究 [J]. 生物工程学报, 2002, 18: 463- 467.

[3] 葛胜祥, 张军, 黄果勇, 等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 多肽对恒河猴的免疫保护研究 [J]. 微生物学报, 2003, 43(1): 35- 42.

[4] 顾颖, 葛胜祥, 黄果勇, 等. 戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体的鉴定 [J]. 病毒学报, 2003, 19: 217- 223.

[5] Harlow E, Lane D. Monoclonal Antibodies [A]. Harlow E, Lane D eds. Antibodies: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998. 627- 269.

[6] Allan J S. Receptor-mediated activation of immunodeficiency viruses in viral fusion [J]. Science, 1991, 252: 1322- 1323.

[7] Sattentau Q J, Moore J P, Vignaux F, et al. Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding [J]. J Virol, 1993, 67: 7383- 7393.

[8] Trkola A, Dragic T, Arthos J, et al. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its coreceptor CCR-5 [J]. Nature, 1996, 384: 184- 187.

[9] Fricks C E, Hogle J M. Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding [J]. J Virol, 1990, 64: 1934- 1945.

[10] Moscufo N, Yafal A G, Rogove A, et al. A mutation in VP4 defines a new step in the late stages of cell entry by poliovirus [J]. J Virol, 1993, 67: 5075- 5078.

[11] 葛胜祥, 张军, 彭耿, 等. 基于多聚化重组抗原的检测戊型肝炎病毒 IgM 与 IgG 抗体的 ELISA 的建立及初步评估 [J]. 病毒学报, 2003, 19(1): 78- 86.

[12] 李新兰, 任晖, 梁新海, 等. 戊型肝炎患者十年后血清抗病毒抗体的检测 [J]. 地方病通报, 2002, 17(3): 14- 17.

[13] Zhang J, Ge S X, Huang G Y, et al. Evaluation of antibody based and nucleic acid based assays for diagnosis of hepatitis E virus infection in a rhesus monkey model [J]. J Med Virol, 2003, 71(4): 518- 526.

[14] 何志强, 张军, 李少伟, 等. 颗粒化重组戊型肝炎病毒衣壳蛋白及其抗原性与免疫原性 [J]. 生物工程学报, 2004, 20(2): 125- 131.

[15] 张军, 李益民, 李少伟, 等. 大肠杆菌重组颗粒性戊型肝炎疫苗对恒河猴的免疫保护 [J]. 病毒学报, 2004, 20(1): 1- 6.

Induced Conformational Changes between the Neutralizing Epitopes of Hepatitis E Virus Capsid Protein

ZHANG Jun, GU Ying, OU Shan-hai, WANG Ying-bing, YE Xiang-zhong,

LIN Jian, GE Sheng-xiang, XIA Ning-shao

(The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Recombinant antigen NE2, comprising aa 394-606 of the capsid protein of hepatitis E virus (HEV), is believed to model the important structural feature of the virus particle. Recently, two neutralizing epitopes of HEV had been identified on NE2 by three neutralization monoclonal antibodies (MAbs), 8C11, 13D8 and 8H3. Cross-blocking assay showed that 8C11 and 13D8 blocked each other almost completely, but 8H3 could not block these two monoclonal antibodies. However, instead of blocking, 8C11 enhanced significantly the binding of 8H3 with the NE2 antigen. Kinetic studies using a biosensor showed that the NE2 antigen has limited access by the native antibody but not the smaller Fab. Similarly as blocking ELISA, biosensor assay showed that the binding of 8C11 could significantly enhance the binding of antigen with native antibody 8H3 as well as 8H3 Fab. Immune capture of virus also showed similar result that pre-incubation of 8C11 with virus enhanced significantly the binding of 8H3 with the virus. These results suggested that the 8H3 epitope is partially masked on the surface of HEV virion, and the binding of 8C11 epitope site might induce the conformational changes on the capsid protein, which unmasks the 8H3 epitope site.

Key words: hepatitis E virus; neutralizing epitope; monoclonal antibody; conformational change