

戊型肝炎病毒基因1型和基因4型中和表位区域分子差异研究

郭清顺,葛胜祥*,熊君辉,闫强,李少伟,顾颖,徐平东,史维国,张军,夏宁邵

(厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心,厦门大学 生命科学学院,福建 厦门 361005)

摘要:戊型肝炎病毒(HEV)根据易感宿主的差别可以分为两大类:一类只分离自人的H(Human)类,包括HEV-1和HEV-2;一类为人畜共患的Z(Zoonosis)类,包括HEV-3和HEV-4。本研究通过比较这两类HEV的ORF2 aa368~606区段,发现存在4个类保守的差异位点,均位于HEV的主要中和表位区域aa459~606,分别是aa483、aa492、aa497和aa599;对这四个位点进行定点替换突变,以一组能够捕获HEV-1和/或HEV-4的单克隆抗体比较各种突变体的免疫反应性,结果表明仅aa497的差异造成了这两类HEV中和表位构象的部分差异,提示aa497及其相关的病毒表面结构差异在H类和Z类HEV宿主选择中可能扮演重要角色。

关键词:戊型肝炎病毒;宿主差异;中和表位

中图分类号:R373 Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8721(2007)06-0454-05

戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus, HEV)至少可分为四个基因型,根据易感宿主的差别又可分为两大类:一类(H类)仅分离于人类,包括基因1型(HEV-1)和基因2型(HEV-2),迄今病因明确的大规模戊肝暴发流行均为此类HEV引起,流行区域限于公共卫生条件不好的热带、亚热带国家^[1],实验动物目前只成功地感染非人灵长类^[2,3];另一类(Z类)广泛分布于世界各地,包括基因3型(HEV-3)和基因4型(HEV-4),见于小规模流行和临床散发,至少感染多种哺乳动物,已从猪、鹿、驴等多种动物中分离到该毒株,并已有生食鹿肉和猪肉导致此类HEV感染的报道^[4-6]。目前的研究表明Z类HEV的主要天然宿主为猪^[7]。

HEV是一种小的无包膜正二十面体的单链正义RNA病毒,其基因组包含3个开放性读码框(ORF),其中ORF2编码主要结构蛋白,形成病毒衣壳,介导HEV与宿主细胞的特异性吸附。现有研究结果表明HEV的主要中和表位区域集中于ORF2的aa459~606之间^[8],并且也是主要介导HEV与嗜性细胞吸附的区域^[9]。本实验室在*E. coli*中表达HEV衣壳蛋白片段p239(aa368~606)形成的类病毒颗粒与戊肝患者恢复期血清及中

和单抗具有良好的反应性,作为疫苗具有良好的免疫原性和免疫保护性^[10,11],与宿主细胞具有和HEV类似的吸附特性^[9],说明p239较好地模拟了天然HEV病毒颗粒的表面空间结构。

本文以p239为基础,通过比较HEV H类和Z类在ORF2 aa368~606区段的异同,发现了4个类保守的差异位点,设计了由H类到Z类的定点突变和由Z类到H类部分位点的反突变,利用能体外捕获HEV的单克隆抗体研究这些位点氨基酸差异对HEV表面结构的影响,为从分子水平上寻找这两类HEV的宿主差异提供线索。

材料与方法

1 HEV基因 p239 编码基因来源于分离自新疆患者的HEV-1,在本研究中为H类基因代表;HEV-4 aa368~606区段编码基因J843和D66分别来源于我国戊肝病人的血清标本和猪的胆汁,在本研究中为Z类基因代表。

2 HEV单克隆抗体及性质共15株构象型单克隆抗体用来分析两类HEV的类保守差异,这些均能在体外捕获病毒,表明其识别位点均位于病毒表面。其中1A5、1E8、3B8、3G3、8C11、8H3等单抗对HEV-4的捕获能力明显要比对HEV-1的捕获能力弱。在恒河猴体内中和试验中已证实单抗8C11和8H3具有中和活性,其余单抗的中和活性尚未得到验证。

3 引物及PCR定点突变本研究中所用的突变引物(表1)包括两部分:第一部份是由H类到Z类4个位点的突变引物,以p239的核酸序列为模板进行设计,包括4个位置的氨基酸突变;第二部分是由Z类到H类的497位氨基酸突变引物,以D66和J843为模板设计。引物由上海英骏生物公司合成。以p239的497位氨基酸突变为例,PCR程序为:先

收稿日期:2007-06-04;修回日期:2007-07-16

基金项目:863计划(2005DFA30820);国家自然科学基金(30500092);国家自然科学基金(30600106);福建省科技重大专项(2004YZ01-1)。

作者简介:郭清顺(1981-),男,硕士研究生。

通讯作者:葛胜祥,361005 厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心。E-mail: sxge@xmu.edu.cn

以 S497TF 和 p239R0 为引物,94 预变性 5min;94 变性 30s,53 复性 30s,72 延伸 40s,25 个循环;72 延伸 5min 扩增出 p239S497TR,胶回收 PCR 产物。然后以第一轮

PCR 扩增产物 p239S497TR 为第二轮 PCR 的下游引物,以 p239F0 为上游引物,按同样的程序扩增得到目的片段。其他片段的扩增方法与此相同或相近。

表 1 突变所用引物

Table 1 Primers used for site-specific mutagenesis

Character	Name	Sequences *
p239 upstream primer	p239F0	CATA TGA TA GCGCTTACCTGT
p239 downstream primer	p239R0	GAA TTCTTA GGGGGCTAAAACA GCA
p239 mutant primer at aa483	S483TF	CGAA GA GCCGTAA GTGGTC TGGTCA TACTC TCG A GCGGTGA GA GAAA G
p239 mutant primer at aa492	V492MF	CTTCGACCGGCCA ATG TA TGCTCTGACTCTGTGACC
p239 mutant primer at aa497	S497TF	CTTCGACCGGCCA GTCTA TGCTCTGAC TACT GTGACCTTGGTTAA TGTTG
p239 mutant primer at aa599	A599GR	GAA TTCTTA GGGGGCTAAAAC ACCCGCGGAAATAGAG
D66 & J843 upstream primer	SF0	CATA TGATTGCGCTAACTCTGTT
D66 & J843 downstream primer	SR0	GAA TTCTTA GGGGGCTAAAACA GCA
D66 mutant primer at aa497	D66SF	AA TCCTA TGTA TGT YCTGAC TCT GTGACA TTTGTAA TGTAG
J843 mutant primer at aa497	J843SF	AACCCTA TGTA TGT TCTGAT TCT GTGACGTTGTCAT GTG

*: Mutant sites on the primers are boxed

4 构建表达质粒 将 PCR 产物连入 pMD18-T 载体中,转化 DH5,提取质粒鉴定正确后用 *NdeI*/*EcoRI* 切下片段,连入 pTO-T7 载体并转化到 ER2566 中进行表达。

5 重组蛋白的表达、纯化与复性 重组蛋白主要以包涵体的形式表达。包涵体主要溶于 4mol/L 尿素中,取 4mol/L 尿素中的样品透析到 PBS 中复性,再经分子筛 HPLC 纯化。

6 动态光散射实验 动态光散射实验专用的石英比色皿用 0.22μm 微孔滤膜过滤的超纯水反复冲洗 20 遍以上,待测样品经 15 000g,4 离心 15min,用微量进样器移取 12μl 的样品至比色皿中,待恒温器稳定至预定温度(一般为 25)时,将比色皿放入恒温样品架进行测量,入射激光波长为 824.0nm,使用 Regulation 算法计算,溶剂为 PBS,根据需要设置数据过滤参数和分析分辨率。

7 蛋白印迹实验(Western blot) 样品经 12% 的 SDS-PAGE 后转移到硝酸纤维素膜进行杂交;用 5% 脱脂奶封闭 2h,加 HEV 患者恢复期血清,反应 1h;用 TNT 洗膜 3 次,每次 10min;后加羊抗人碱性磷酸酶反应 1h;用 TNT 洗膜 3 次,每次 10min;用 NBT 和 BCIP 显色。

8 酶联免疫吸附实验(ELISA) 将纯化过的各种重组蛋白按 0.2μg/mL 稀释到碳酸盐缓冲液中,每孔包被 100μl,37 包被 2h,37 封闭 2h 后抽干,各种单抗按一定的比例稀释,确定一个合适的稀释度后加样,37 反应 30min,洗板,加

HRP 标记的抗鼠 IgG 二抗,37 反应 30min,洗板,37 显色 15min,450nm/620nm 读值;也可使用 HRP 标记的单抗,即将酶标单抗稀释到一定的比例,直接加 100μl 到已包被好的板孔中,37 反应 30min,洗板,37 显色 15min,450nm/620nm 读值。

结 果

1 HEV ORF2 aa368 ~ 606 区段的保守性差别位点的分析

从 GenBank 中获取含 ORF2 aa368 ~ 606 区段的 HEV 核苷酸序列共 109 条,基因分型表明其中 34 条为基因 1 型,1 条为基因 2 型,36 条为基因 3 型,38 条为基因 4 型(表 2)。在 MEGA3.1 软件中将这些序列 aa368 ~ 606 区段的核苷酸翻译成氨基酸并进行比对,在此区段内共有 8 个基因型保守的差别位点,其中 4 个为“类”保守差异位点,均位于 HEV 的主要中和表位区域 aa459 ~ 606 之间,以从 H 类到 Z 类变异来描述,分别为 Ser483 Thr、Val492 Met、Ser497 Thr 和 Ala599 Gly(表 3)。

表 2 109 条 HEV 核苷酸序列的基因型分析结果

Table 2 Genotyping of 109 nucleotide sequences of HEV

Genotype	Sample number	GenBank accession number
HEV-1	34	AF065061, AY230202, AF051351, AF051352, AY204877, AF444002, M80581, AF444003, L25547, L25595, AF141652, D11093, NC001434, L08816, M94177, D11092, X98292, U40044, AF185822, U22532, AF076239, AF459438, AF051830, AF058684, AH006999, X99441, AF124407, AR207633, M73218, D90274, D10330, E17107, E17109, DQ079624,
HEV-2	1	M74506
HEV-3	36	AB248521, AB248522, AB248520, AF455784, AB074918, AB089824, AB074920, AF060669, AX181883, DQ079627, DQ079625, AF060668, AX181808, AF082843, AY575859, AY575857, AY575858, DQ079632, AB222184, AB073912, AY115488, AB236320, AB222183, DQ079630, DQ079629, AB222182, AB091394, AB246676, AP003430, DQ079626, AB189070, AB189071, AB189072, AB189073, AB189074, AB189075

HEV-4	38	AB193178, AB193177, AB200239, AB099347, AB091395, AB193176, AB097812, AB220971, AB09781, AB082545, AB080575, AB220979, AB220976, AB220977, AB161717, AB220975, AB220978, AB074917, AB220973, AB161718, AB161719, AB220972, DQ079628, DQ450072, DQ079631, AB108537, AB220974, AB074915, AF151962, AF151963, AB197673, AB197674, AJ272108, AY594199, DQ294630, DQ279091, AY723745, AB253420
-------	----	---

* :D11092 is the primitive template of p239.

表 3 HEV ORF2 aa368 ~ 606 区段中型保守的差异位点

Table 3 Conserved difference within aa368-606 region of HEV ORF2 among different genotypes

Group	Genotype	Sample number	Conserved amino acids and their sites *							
			435	483	492	497	509	517	569	599
H	HEV-1	34	Glu	Ser	Val	Ser	Ala	Thr	Leu	Ala
	HEV-2	1	Asp	Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Ile	Ala
Z	HEV-3	36	Asp	Thr	Met	Thr	Ala	Ser	Ile	Gly
	HEV-4	38	Glu	Thr	Met	Thr	Gly	Ser	Ile	Gly

* : Sites on ORF2 of D11092 and group-conserved differences are marked in bold

2 HEV ORF2 aa368 ~ 606 区段的保守性差别位点的定点突变及理化性质分析

以 p239 为基础,用 PCR 定点突变的方式获得的由 H 类到 Z 类的单点或多点突变体,具体情况见表 4。各重组突变体表达后均主要溶解在 4mol/L 尿素中,复性纯化后以动态光散射仪检测平均水化半径,结果显示均形成与 p239 VLPS 大小类似的类病毒颗粒。SDS-PA GE 分析主要以二聚体的形式

表 4 p239、p239_{D66}、p239_{J843} 及各种突变体

Table 4 p239, p239_{D66}, p239_{J843} and the recombinant mutants

Recombinant proteins	Mutant sites *				Average radius (nm)
	A Ser483 Thr	B Val492Met	C Ser497 Thr	D Ala599 Gly	
p239	-	-	-	-	13. 25
p239 _{D66}	+	+	+	+	13. 45
p239 _{J843}	+	+	+	+	13. 06
pA	+	-	-	-	13. 08
pB	-	+	-	-	13. 19
pC	-	-	+	-	13. 21
pD	-	-	-	+	12. 53
pAB	+	+	-	-	14. 53
pAC	+	-	+	-	12. 78
pAD	+	-	-	+	13. 59
pBC	-	+	+	-	12. 84
pBD	-	+	-	+	13. 79
pCD	-	-	+	+	14. 73
pABC	+	+	+	-	14. 13
pACD	+	-	+	+	12. 74
pBCD	-	+	+	+	13. 12
pABCD	+	+	+	+	13. 95
D66 _{T497S}	+	+	-	+	12. 87
J843 _{T497S}	+	+	-	+	13. 14

* : “+” indicates that the recombinant protein has the mutant site while “-” indicates it doesn't contain the mutant site.

存在,表明各点的突变均对重组蛋白的理化性质和高级结构没有明显的影响。同时表达了 HEV-4 同一区段的重组蛋白 p239_{D66} 和 p239_{J843} 为对照。

用 1 份戊肝患者恢复期血清检测各突变体与 p239 免疫反应性的差异。Western blotting 结果表明各突变体与此份患者恢复期血清的反应模式和强度与 p239、p239_{D66} 及 p239_{J843} 相比没有明显的差异(图 1),依然以二聚体及多聚体的反应活性为主。

3 各突变体与单抗的反应性

用 15 株能捕获 HEV-1 和/或 HEV-4 的单抗对等量 p239、p239_{D66}、p239_{J843} 及各 p239 突变体进行 ELISA 检测,结果 6 株能同时捕获 HEV-1 和 HEV-4 的单抗对 p239、p239_{D66} 及 p239_{J843} 反应性相当(OD 值变化在 2 倍的范围内),而另 9 株单抗(包括 6 株仅能捕获 HEV-1 的单抗及 3 株能同时捕获 HEV-1 和 HEV-4 的单抗)与 p239_{D66} 和 p239_{J843} 的反应性明显低于 p239(OD 值至少下降 4 倍)。

在对 p239 的 4 个“类”保守差异位点的 aa483 (A)、aa492(B)、aa497(C)和 aa599(D)进行突变后,发现所有包含 aa497 位点突变的突变体与上述 9 株单抗的反应性均明显下降到与 p239_{D66}、p239_{J843} 相当的水平,而其他 3 个位点的突变体与这些单抗的反应性无明显改变。

当 p239_{D66} 和 p239_{J843} 的 497 位 Thr 突变为 H 类的 Ser 时,其与这 9 株单抗的反应性增强到与 p239 相当(表 5)。这些结果提示 497 位氨基酸在 HEV-1 和 HEV-4 衣壳中和表位区域的空间结构差异中扮演重要角色。

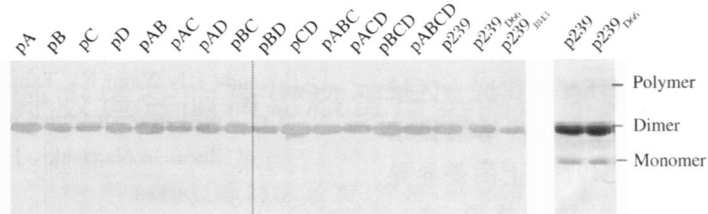


图 1 p239、p239_{D66}、p239_{I843} 及各突变体与患者血清的 Western blot

Figure 1 The reactivity of p239 and its mutants with a convalescent patient's serum by Western blot

表 5 单克隆抗体与各种重组突变体的反应模式

Table 5 Reactive pattern of the McAbs against various recombinant proteins[#]

McAbs	Capture PCR *	p239 (HEV-1)	p239 (HEV-4)				p239 mutants																
			D66	J843	D66 _{T497S}	J843 _{T497S}	A	B	D	AB	AD	BD	C	AC	BC	CD	ABC	ACD	BCD	ABCD			
8C11	1																						
8H3	1																						
1A5	1																						
1E8	1																						
3B8	1																						
3G3	1																						
8E10	1,4																						
12A7	1,4																						
12F12	1,4																						
1D5	1,4																						
4C10	1,4																						
8G12	1,4																						
9F7	1,4																						
12G8	1,4																						
13G9	1,4																						

: “ ” represents that the recombinant proteins had similar reactivity with McAbs and “ ” represents that the reactivity had a great decrease compared with p239.

* : “ 1 ” and “ 4 ” represent HEV-1 and HEV-4, respectively.

讨 论

虽然 HEV 仅有一个血清型,不同基因型 HEV 感染的血清对各型病毒具有几乎完全相同的保护性,来源于不同基因型的 HEV ORF2 抗原对不同型病毒感染的血清的检出符合率接近 100%,但 HEV-1/HEV-2 与 HEV-3/HEV-4 之间依然存在着明显的宿主选择差异。HEV-1/HEV-2 仅能从人类中分离,且难以感染猪;而 HEV-3/HEV-4 除了从人类中分离到外,在猪及其他一些非人哺乳动物中也可大量分离到。目前研究发现,HEV 的中和表位主要集中于 ORF2 的 aa459~606 之间。由于中和表位区域往往和病毒受体的结合部位重叠,因此对 HEV-1/HEV-2 和 HEV-3/HEV-4 间这一区段的比较有可能对理解这一宿主选择差异的机制有所帮助。

对 GenBank 上现有的全部 HEV ORF2 aa459

~606 区域序列进行比对,结果显示有 4 个“类”保守的差异位点(表 3)。以来源于 HEV-1 的 aa459~606 区段的 p239 蛋白为基础,对这 4 个位点进行单位点突变和多位点组合突变,并利用 6 株仅能捕获 HEV-1 的单抗和 9 株能同时捕获 HEV-4 的单抗进行检测。发现 6 株 HEV-1 捕获单抗对 p239 及 aa497 位未改变的 p239 突变体的反应性明显强于来源于 HEV-4 的 p239_{D66} 和 p239_{I843} 及 aa497 位突变的 p239 突变体;当 p239_{D66} 和 p239_{I843} 的 aa497 位 Thr 突变为 Ser 时,其与这 6 株单抗的反应性能增强到与 p239 相当的水平,提示这 6 株单抗识别表位区域结构在 HEV-1 和 HEV-4 间存在着某些差异(表 5)。对多种 p239 突变体及 p239、p239_{D66} 和 p239_{I843} 的反应性均相同的 6 株单抗均能同时捕获 HEV-1 和 HEV-4,提示这 6 株单抗识别的表位区域结构在 HEV-1 和 HEV-4 间几乎完全相同(表 5)。另有 3 株单抗虽然可同时捕获 HEV-1 和 HEV-4,但对 aa497 位突变敏感,与仅能捕获 HEV-

1 的单抗类似(表 5)。值得注意的是 9 株对 aa497 位突变敏感的单抗与相应突变的反应性仅仅是降低而非完全消失,提示 HEV-1 和 HEV-4 在这一区域上的结构差异并不是十分显著的。这些结果提示 HEV-1 和 HEV-4 在 ORF2 的 aa497 位上的差异导致了其衣壳表面中和表位区域的结构差异,这一“类”保守的结构差异是否与这两类 HEV 的宿主差异有关,是影响这两类 HEV 对不同宿主细胞吸附能力还是影响了病毒吸附之后的后续感染步骤,值得进一步的研究。

参考文献:

- [1]Emerson S U, Purcell R H. Hepatitis E virus[J]. *Rev Med Virol*, 2003, 13(3): 145-154.
- [2]Balayan M S, Andjaparidze A G, Savinskaya S S, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route[J]. *Intervirology*, 1983, 20(1): 23-31.
- [3]Bradley D W, Krawczynski K, Cook E H, et al. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: serial passage of disease in cynomolgus macaques and tamarins and recovery of disease-associated 27- to 34-nm virus-like particles[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(17): 6277-6281.
- [4]Matsuda H, Okada K, Takahashi K, et al. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar[J]. *J Infect Dis*, 2003, 188(6): 944.
- [5]Masuda J I, Yano K, Tamada Y, et al. Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan[J]. *Hepatol Res*, 2005, 31(3): 178-183.
- [6]Tei S, Kitajima N, Takahashi K, et al. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings[J]. *Lancet*, 2003, 362(9381): 371-373.
- [7]Zheng Y, Ge S, Zhang J, et al. Swine as a principal reservoir of hepatitis E virus that infects humans in eastern China[J]. *J Infect Dis*, 2006, 193(12): 1643-1649.
- [8]Li S W, Zhang J, He Z Q, et al. Mutational analysis of essential interactions involved in the assembly of hepatitis E virus capsid[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(5): 3400-3406.
- [9]何水珍, 郑子峥, 吴婷, 等. 戊型肝炎病毒细胞吸附模型的建立及病毒吸附区域初步研究[J]. *病毒学报*, 2006, 22(6): 426-430.
- [10]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): 262-268.
- [11]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.

The Molecular Differences between Genotype 1 and Genotype 4 of HEV in Their Neutralization Region

GUO Qing-shun, GE Sheng-xiang, XIONG Jun-hui, YAN Qiang, LI Shao-wei,

GU Ying, XU Ping-dong, SHI Wei-guo, ZHANG Jun, XIA Ning-shao

(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: HEV is classified into H (human) group and Z (zoonosis) group according to its compatible host. H group contains genotype 1 and genotype 2 HEV isolates which infect human only; Z group contains genotype 3 and genotype 4 HEV isolates which infect both human and animals. After analysis of amino acid sequences between ORF2 aa368 and aa606, four group-conserved sites that were all located in the neutralization region of ORF2 were identified. They are aa483, aa492, aa497 and aa599. Mutation analysis and capture PCR were then performed on these sites with a group of monoclonal antibodies. Results showed that the difference of the aa497 between H and Z groups was responsible for the maintenance of their group-specific immunodominant epitopes, probably through confirmation-dependent epitope changes. Thus, aa497 and its related change on the surface structure of HEV may play important roles in host selection by H and Z groups of HEV.

Key words: hepatitis E virus (HEV); host difference; neutralization epitope

Corresponding author: GE Sheng-xiang, Email: sxge@xmu.edu.cn