

抗戊型肝炎病毒单克隆抗体识别表位的初步研究

熊君辉,郭清顺,葛胜祥,顾颖,陈毅歆,苗季,杜海莲,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:通过 Western blot、体外捕获 PCR、ELISA 阻断实验及合成的多肽库等方法,对 23 株抗戊型肝炎病毒(HEV)单克隆抗体(单抗)识别 HEV ORF2 表位的作用进行系统研究。结果显示,7 株线性单抗识别表位都位于 ORF2 aa408~458 之间,16 株构象型单抗识别表位都定位于 ORF2 aa459~606 之间,大部分构象型单抗识别表位都在天然病毒表面。对这些单抗识别表位系统地了解将为 HEV 疫苗、诊断、病毒受体和病毒感染机制等方面的研究提供重要工具。

关键词:戊型肝炎病毒(HEV);单克隆抗体(单抗,McAb);表位

中图分类号:R373; Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8721(2008)02-0083-05

戊型肝炎病毒是戊型肝炎的病原体,为无包膜的单股正链 RNA 病毒,大小约为 27~34nm,其表面有许多突起和缺刻结构。HEV 基因组有 3 个开放性阅读框(ORFs),其中 ORF2 编码 660 个氨基酸的病毒衣壳蛋白,现有研究表明 HEV 的主要中和表位区域集中在 ORF2 的 aa459~606 之间^[1]。在大肠杆菌中表达 HEV 衣壳蛋白 ORF2 aa394~606 片段(E2)可以自发形成以二聚体为基础的多种聚合形式,类似于 HEV 衣壳蛋白的装配过程^[2],且 E2 免疫恒河猴具有良好的保护性^[3]。本实验室曾以 E2 为抗原制备了几株抗 HEV 单克隆抗体,其中 8C11 和 8H3 在体外能够捕获天然 HEV,说明这两株单抗识别的表位位于 HEV 的表面;经恒河猴体内中和实验证明这两株单抗都具有中和活性,而且具有较明显的协同作用^[4]。另一项研究发现 8C11 与 HEV 的结合引发 HEV 衣壳的空间结构改变,导致 8H3 表位区域的充分暴露^[5]。E2 的 N 端延伸到 aa368 的重组蛋白 HEV 239 可以形成类病毒颗粒,其抗原性与 E2 基本一致,但免疫原性显著提高^[6]。以 HEV 239 作为疫苗已完成了 II 期临床试验,即将开始 III 期临床研究。何水珍等^[7]发现 HEV 239 可以阻断天然 HEV 对宿主细胞的吸附,提示 HEV 239 较好地模拟了 HEV 表面的空间结构。

本研究以 HEV 239 免疫并筛选出多株单抗,并对这一系列抗 HEV 单抗识别 HEV ORF2 抗原表位的作用进行系统研究,以期能为 HEV 疫苗、诊断、病毒受体和病毒感染机制等方面的研究提供有力的工具。

材料与方法

1 单抗 单抗 8C11、8H3、13D8、15B2 和 16D7 由 E2 抗原免疫 BALB/c 小鼠制备,参见文献^[4]。单抗 1A5、1E8、2G11、3B8、3G3、4C10、6F8、8E10、8G12、12A7、12F12、12G8、13G9、2G3、3G4、3G5、11E8 和 12A10 由 HEV 239 抗原制备的,方法与文献^[4]相近。

2 重组蛋白 重组蛋白 HEV 239 为大肠杆菌表达的 HEV ORF2 aa368~606, E2a^[1] 为大肠杆菌表达的 HEV ORF2 aa459~660。

3 免疫印迹实验(Western blot) E2a、HEV 239 及其沸水浴后的样品经 12%的 SDS-PAGE 电泳后转移到硝酸纤维素膜进行杂交;用 5%脱脂奶封闭 2h,加入一定比例稀释的单抗,反应 1h;用 TNT 洗膜 3 次,每次 10min;后加羊抗鼠碱性磷酸酶反应 1h;用 TNT 洗膜 3 次,每次 10min;用 NBT 和 BCIP 显色。

4 线性单抗表位的定位 根据 HEV 239 合成重叠 10 个氨基酸的 15 肽肽库共 46 条。以 0.05mol/L 碳酸盐包被缓冲液(pH9.5)将每条多肽分别稀释成 1μg/mL,每孔 100μl 包被于微孔板,37℃ 吸附过夜;用含有 0.02% Tween-20 的 PBS(PBST)洗涤 1 遍,每孔 200μl 5%的牛血清白蛋白 37℃ 封闭 2h;将封闭液甩干后,加入需要检测的单抗 37℃ 反应 30min,用 PBST 洗涤 5 次并扣干;每孔加入 100μl HRP 标记的羊抗鼠 IgG 37℃ 反应 30min;PBST 洗涤 5 次并扣干,加入显色剂,37℃ 温育 10min,终止,读取 OD_{450/620nm} 的读值。

5 ELISA 阻断实验 以改良过碘酸钠法标记各单抗,用

收稿日期:2007-06-04;修回日期:2007-11-25

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);福建省科技创新项目(2006F3124)。

作者简介:熊君辉(1980-),男,博士研究生。

通讯作者:夏宁邵,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: nsxia@xmu.edu.cn

ELISA 法进行相互阻断试验。取每孔 0.05μg/mL HEV 239 包被的 ELISA 板,分为多组,每组两孔,一孔为阻断孔,加入 100μl 的不同单抗(分别以 20%小牛血清 PBS 稀释至 ELISA 滴度为 1:10⁵),另 1 孔为对照孔,仅加入 100μl 20%小牛血清 PBS;37 孵育 30min;吸弃液体,每组分别加入 100μl/孔辣根过氧化物酶标记的不同单抗(以 20%小牛血清 PBS 稀释至 OD 在 1.0~1.5 之间);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;计算阻断率(阻断率 = 1 - 阻断孔 OD 值/对照孔 OD 值),阻断率大于 50%为阻断阳性。

6 捕获 PCR 用 PB 缓冲液(pH7.4)以 1:500 稀释单抗,500μl 包被到经紫外照射 30min 的 Eppendorf 管中,37 水浴过夜;1ml PBST 洗涤 1 次后用含有 0.5% 的 Casein 和 2% 的 Gelatin 的 PBS 37 封闭 2h;用 PBS 将含 HEV 的恒河猴粪便标本(包括基因 1 型 xm25 和基因 4 型 xm33)稀释成 10% 的悬液,并通过 RT-PCR 定两种基因型的粪便悬液滴度,在 10⁵ 滴度 PCR 水平上各加 500μl 到 Eppendorf 管中,37 温浴 2h;用 800μl PBST 洗 10 次;然后进行 HEV RNA 的提取和 RT-PCR,参见文献^[8]。

结 果

1 单抗识别表位的构象依赖性

HEV 239 在 SDS-PAGE 上能呈现出聚体依赖性的构象型表位,样品经沸水浴后解聚成单体,只保留线性表位的活性,通过沸水浴与否的 HEV 239 免疫印迹活性可以判断单抗表位的构象依赖性(图 1)。结果 7 株单抗 2G3、3G4、3G5、11E8、12A10、

15B2 和 16D7 对沸水浴与否的 HEV 239 具有相似的反应性,为线性单抗;另 16 株单抗只对未经沸水浴的 HEV 239 二聚体具有强的反应性,表明其识别表位的构象依赖性,这些单抗为:1A5、1E8、2G11、3B8、3G3、4C10、6F8、8C11、8E10、8G12、8H3、12A7、12F12、12G8、13D8 和 13G9。

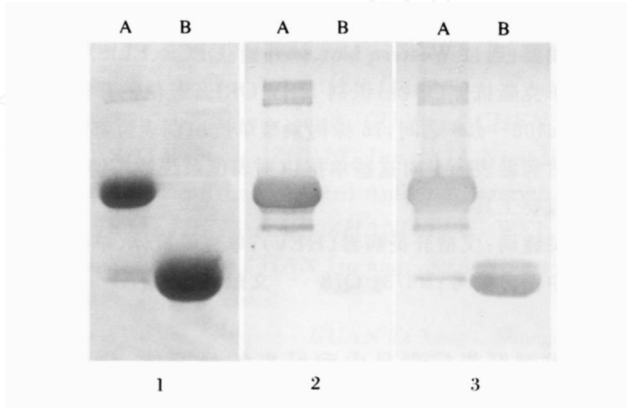


图 1 免疫印迹实验分析单抗的构象依赖性
Figure1 Conformational dependency analysis of anti-HEV McAbs through Western blot
A. HEV239; B. Boiled HEV239;1. SDS-PAGE;2. WB of conformational-dependent McAb 1A5;3. WB of linear McAb 3G5.

2 线性单抗识别 HEV 抗原表位的确定

分别以覆盖 HEV 239 全长的 46 条 15 肽为包被抗原,通过 ELISA 分别与上述 7 株线性单抗反应,结果显示这些线性单抗识别的表位都位于 HEV ORF2 aa408~458 之间(图 2)。

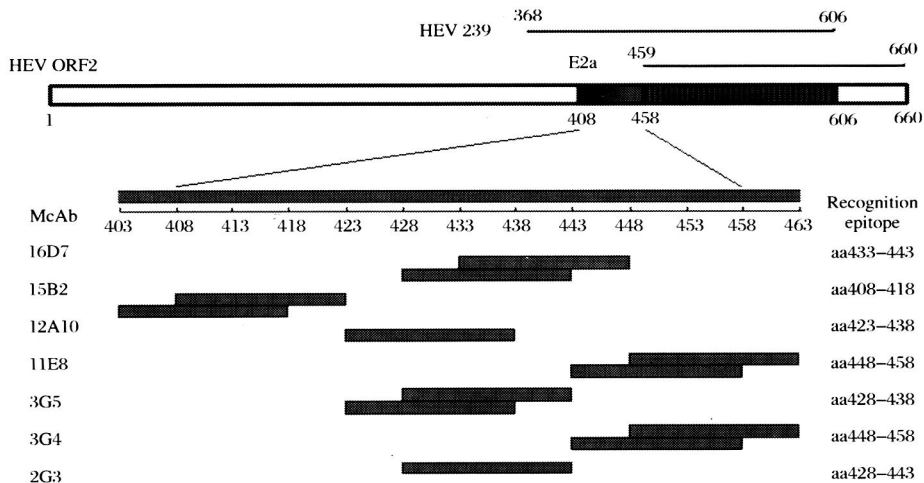


图 2 HEV ORF2 上的线性单抗识别区域

Figure 2 The recognition domain of linear McAbs on HEV ORF2

The polypeptides recognized by linear McAbs were showed and the cross-reactive sites were recognition epitopes of McAbs. aa 459 - 606(the vertical line region) was the recognition epitope of conformation-dependent McAbs.

3 构象型单抗识别 HEV 抗原表位的初步定位

李少伟等^[1]发现中和单抗 8C11 与 HEV 239 和 E2a 的聚体都有明显的反应,说明 8C11 的识别表位位于 HEV 239 和 E2a 的重叠部分 aa459 ~ 606。我们将所有构象型单抗与 HEV 239 和 E2a

进行 Western blot 反应,结果显示所有构象型单抗的反应模式与 8C11 相同,说明所有构象型单抗识别的表位与 8C11 一样位于 aa459 ~ 606 之间(表 1)。

表 1 单抗性质汇总

Table 1 The character of anti-HEV McAbs

McAbs	Western blot		E2a	Type ^{&}	Capture-PCR	
	Boiled HEV 239	Unboiled HEV 239			HEV-1	HEV-4
8E10	-	+	+	C	+	+
12A7	-	+	+	C	+	+
12F12	-	+	+	C	+	+
4C10	-	+	+	C	+	+
8G12	-	+	+	C	+	+
12G8	-	+	+	C	+	+
13G9	-	+	+	C	+	+
1A5	-	+	+	C	+	-
1E8	-	+	+	C	+	-
3B8	-	+	+	C	+	-
3G3	-	+	+	C	+	-
8C11	-	+	+	C	+	-
8H3	-	+	+	C	+	-
13D8	-	+	+	C	+	-
6F8	-	+	+	C	-	-
2G11	-	+	+	C	-	-
12A10	+	+	-	L	+	-
2G3	+	+	-	L	-	-
3G4	+	+	-	L	-	-
3G5	+	+	-	L	-	-
11E8	+	+	-	L	-	-
15B2	+	+	-	L	-	-
16D7	+	+	-	L	-	-

&. L. Linear McAb; C. Conformation-dependent McAb.

4 构象型单抗间的相互阻断

对 16 株构象型单抗进行交叉阻断实验,结果显示:除 8H3 单抗仅对另 2 株单抗有阻断外,其余 15 株单抗均至少可阻断 9 株以上其他单抗,同时除 8H3 和 12F12 仅被 8 株单抗阻断外,其余 14 株单抗至少能被另外 10 株单抗所阻断,提示除 8H3 单抗识别表位稍偏远一些外,另 15 株单抗的识别表位在空间上相互聚集(图 3);另外 8H3 的活性除了能被 8C11 明显增强外,还能被 3B8 增强。

5 单抗对 HEV 的捕获作用

23 株单抗分别包被 Eppendorf 管,分别对 1 株基因 1 型 HEV 和 1 株基因 4 型 HEV 进行捕获 PCR 实验,结果 16 株构象型单抗中有 14 株能捕获病毒,提示 aa459 ~ 606 形成的免疫优势构象表位主要位于天然 HEV 表面,其中 7 株能同时捕获基因 1 型 HEV 和基因 4 型 HEV(表 1)。另外,有一株线

性单抗(12A10)也能捕获病毒,提示该单抗识别的 aa423 ~ 438 区域也暴露于病毒表面。

讨 论

本研究发现所有线性单抗识别表位都位于 ORF2 aa408 ~ 458 之间的区域,而构象单抗识别表位区域都位于 ORF2 aa459 ~ 606 之间,提示 HEV 239 存在两个表位集中区域,aa408 ~ 458 主要以线性展开形式存在;而 aa459 ~ 606 为二聚体相互作用的折叠区域,形成众多由不连续氨基酸组成的构象型表位,该区域单抗绝大多数可捕获病毒,提示 aa459 ~ 606 形成的折叠结构存在于病毒外表面。HEV 239 可以形成二聚体为基础的类病毒颗粒类。

线性单抗 12A10 同样可捕获病毒,提示其识别的 aa423 ~ 438 区域也暴露于病毒表面。何水珍

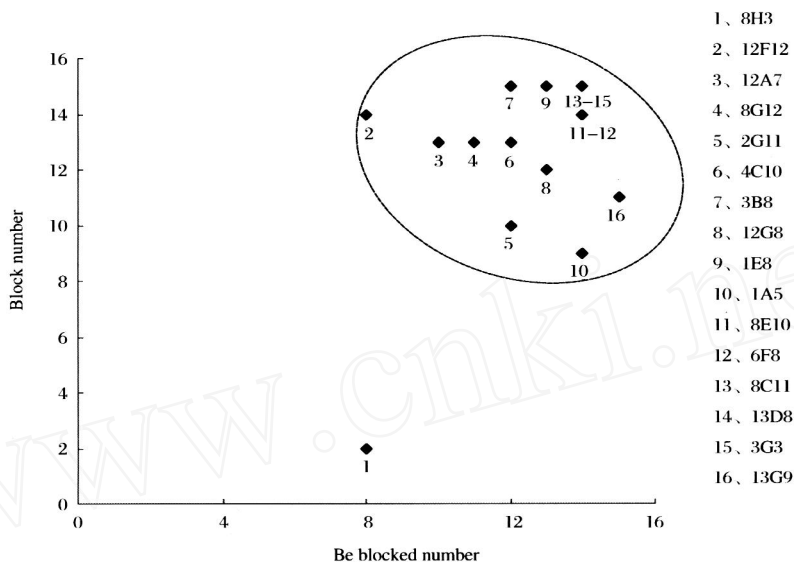


图 3 构象型单抗间的相互阻断

Figure 3 Blocking results among conformational anti-HEV McAbs

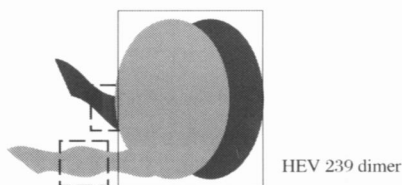


图 4 图示 HEV 239 识别表位区域

Figure 4 Graphical presentation of HEV 239 recognition epitopes

等^[6]发现 12A10 同样可以阻断 HEV 239 对细胞的吸附,缺失 aa424~438 区域之后对细胞的吸附能力有所减弱,提示该区域可能参与 HEV 与细胞的吸附过程。

Xing 等^[9]对 HEV VLP 的冰冻电镜分析显示, HEV 表面具有明显的突出、凹穴结构。由于 aa459~606 折叠结构形成了免疫优势表位以及相应单抗绝大多数都具有捕获病毒能力,该区域可能是 HEV 表面突出部分的重要成分。

14 株能捕获病毒的单抗中,有 7 株可捕获基因 4 型 HEV,提示基因 1 型 HEV 和基因 4 型 HEV 表面具有很大的相似性,与目前认为 HEV 仅有一种血清型一致。然而,还另有 7 株单抗仅能捕获基因 1 型 HEV,这是由于不同病毒株间的差异还是型之间的差异尚有待于进一步确证。

参考文献:

[1] 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.

[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(4): 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): 36-43.

[4] Zhang J, Gu Y, Ge S X, et al. Analysis of hepatitis E virus neutralization sites using monoclonal antibodies directed against a virus capsid protein[J]. Vaccine, 2005, 23(22): 2881-2892.

[5] 张军, 顾颖, 欧山海, 等. 戊型肝炎病毒衣壳蛋白中和表位间的构象诱导[J]. 病毒学报, 2004, 20(2): 104-109.

[6] Li S W, Zhang J, Li Y M, et al. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates[J]. Vaccine, 2005, 23(22): 2893-2901.

[7] 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.

[8] 葛胜祥, 郭清顺, 李少伟, 等. 基因 1 型戊型肝炎病毒高灵敏度通用引物的设计和初步应用[J]. 病毒学报, 2005, 21(3): 181-187.

[9] Xing L, Kato K, Li T, et al. Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual-domain T = 1 particle presenting native virus epitopes[J]. Virology, 1999, 265(1): 35-45.

The Preliminary Analysis of the Recognition Epitopes of Anti-HEV Monoclonal Antibodies on HEV ORF2

XIONG Jun-hui, GUO Qing-shun, GE Sheng-xiang, GU Ying, CHEN Yi-xin, MIAO Ji, DU Hai-lian,
SHI Wei-guo, ZHANG Jun, XIA Ning-shao

(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development of Infectious Disease and
College of Life Science of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Western blot, capture-PCR, blocking ELISA and synthetic polypeptides were used to systematically study the recognition epitopes on HEV ORF2 of 23 anti-HEV monoclonal antibodies (McAbs) which were previously generated in our laboratory directed against HEV ORF2. Results showed that seven McAbs recognized linear epitopes that located at aa408-458 of HEV ORF2 and 16 conformation-dependent McAbs, most of which recognized the surface epitopes of native HEV, located at aa459-606 of HEV ORF2. The systematical study of the recognition epitopes of anti-HEV McAbs on HEV ORF2 provides important information for the investigation of virus receptor and HEV infection mechanism, as well as its vaccine and diagnostics development.

Key words: hepatitis E virus (HEV); monoclonal antibody (McAb); epitope

Corresponding author: XIA Ning-shao, E-mail: nsxia@xmu.edu.cn

“病毒性肝炎:成就与挑战”国际研讨会

International Conference on Viral Hepatitis: Past Accomplishments and Unfulfilled Quests (ICVH2008)

“病毒性肝炎:成就与挑战”国际研讨会 (ICVH2008) 经教育部批准将于 2008 年 4 月 15 日至 17 日在福建厦门举行 (<http://nidvd.xmu.edu.cn/icvh2008.asp>)。此次会议由中国生物技术发展中心主办,由厦门市科技局、厦门大学、国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心、中国微生物学会病毒学专业委员会联合承办。会议由乙肝病毒发现者之一、美国科学院院士 Harvey J. Alter 担任大会主席,会议邀请在各型肝炎病毒的发现及预防领域做出重大贡献的科学家 Stephen M. Feinstone, John L. Gerin 等做特邀报告。会议将回顾 60 年多来人类与病毒性肝炎斗争中取得的标志性成果,探讨现有科技水平下病毒性肝炎研究依然面临的关键

科学和实践问题,预测病毒性肝炎研究发展的趋势,探讨发展中国家新发肝炎研究与防治策略,为未来病毒性肝炎基础及防治研究指引方向。会议将采取主题演讲与圆桌讨论相结合的方式,提供一个与世界各国科学家面对面交流的机会。欢迎在病毒性肝炎领域从事基础研究、临床研究、公共卫生、生物医药产业等方面的科学家、临床医生、卫生防疫工作者、企业技术骨干及科技决策部门、医疗卫生决策部门管理人员参加本次会议并投稿,会议论文一律用英文书写,把在病毒性肝炎研究领域取得的最新研究结果和技术方法等的论文和摘要,以 WORD 电子文档形式, E-mail 至 hldu@xmu.edu.cn 和 jwshih@xmu.edu.cn)。