

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学 号: B200226009

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学  
博 士 学 位 论 文

戊型肝炎病毒中和表位研究

Analysis of HEV neutralization sites using monoclonal  
antibodies directed against a virus capsid protein

顾 颖

指导教师姓名: 李祺福 教授

夏宁邵 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2005年11月

论文答辩时间: 2006年1月

学位授予日期: \_\_\_\_\_ 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2005年11月



# 博士学位论文

## 戊型肝炎病毒中和表位研究

Analysis of HEV neutralization sites using monoclonal antibodies directed against a virus capsid protein

顾颖

导师：李祺福 教授、夏宁邵 教授

廈門大學

[ Xiamen University ]

2005 年 11 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
缩略词.....	5
前 言.....	8
1. 戊型肝炎病毒及其衣壳蛋白表位、抗体的研究进展.....	8
1.1. 戊型肝炎.....	8
1.2. 戊型肝炎病毒的生物学特性.....	13
2. 抗体与抗原的相互作用.....	29
2.1. 抗体及其空间结构.....	29
2.2. 抗体与抗原的相互作用.....	32
3. 噬菌体展示系统.....	40
3.1. 噬菌体展示系统基本原理及应用.....	40
3.2. 噬菌体展示肽库及其应用.....	41
4. 本论文研究的思路、目的和意义.....	43
材料与amp;方法.....	45
1. 材 料.....	45
1.1. 主要仪器.....	45
1.2. 主要试剂与材料.....	46
1.3. 常用溶液及培养基配制.....	47
2. 方 法.....	52
2.1. 基因克隆.....	52
2.2. 重组蛋白的表达与纯化.....	54
2.3. 重组蛋白性质的分析方法.....	57
2.4. 细胞实验.....	58
2.5. 杂交瘤融合制备MAb.....	59
2.6. MAb性质鉴定.....	62
2.7. 木瓜蛋白酶制备MAb Fab片段.....	64

2.8. 恒河猴感染实验 .....	64
2.9. 噬菌体随机 7 肽库的操作 .....	65
2.10. 生物传感器相关操作 .....	67
2.11. 分析型超速离心机相关操作 .....	69
2.12. 计算机辅助分析与设计 .....	70
<b>结果与分析 .....</b>	<b>71</b>
<b>第一部分 抗HEV ORF2 MAb及其Fab片段的制备.....</b>	<b>71</b>
1. MAb的筛选.....	71
2. MAb Fab片段的制备及纯化.....	75
<b>第二部分 HEV中和表位的鉴定及表位特征研究.....</b>	<b>76</b>
1. HEV MAb识别表位在NE2 蛋白上的空间位置关系.....	76
2. HEV 病毒外表面表位的鉴定 .....	79
3. MAb 8C11 和 8H3 的中和活性 .....	80
4. 中和表位 8C11 和 8H3 也是HEV的免疫优势表位.....	81
5. HEV衣壳蛋白上 8C11 表位的结合引发 8H3 表位的构象变化.....	83
6. 8C11、8H3 中和表位的形成区域.....	91
7. 溶液中中和MAb与NE2 蛋白相互作用的AU技术分析.....	92
<b>第三部分 HEV ORF2 中和表位模拟肽初步研究 .....</b>	<b>100</b>
1. 表位模拟肽的筛选及序列特征 .....	100
2. MAb 8H3 筛选到的模拟 7 肽的合成及结合活性检测.....	100
3. 表位模拟肽的克隆表达及活性鉴定 .....	101
<b>讨 论.....</b>	<b>105</b>
1. HEV衣壳蛋白的表位特征 .....	105
2. HEV免疫优势中和表位区域 .....	106
3. HEV两个中和表位与病毒感染机制的关系 .....	107
4. HEV衣壳蛋白中和表位间的构象诱导 .....	107
5. HEV感染的免疫学诊断 .....	109
6. HEV疫苗的质控 .....	110
7. HEV中和表位模拟肽的筛选 .....	110

8. 抗体片段的生物学意义 .....	111
9. AU技术分析HEV中和MAb与NE2 蛋白的相互作用 .....	113
小结与展望 .....	115
参考文献.....	117
致 谢.....	135
附 录.....	136
一. 在校期间发表论文 .....	136
二. 在校期间获得奖励 .....	138

厦门大学博硕士论文摘要库

# CONTENT

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>3</b>
<b>Abbreviation</b> .....	<b>5</b>
<b>Perface</b> .....	<b>8</b>
1. Hepatitis E and the research about the virus' epitopes and MAb.....	8
2. The interaction of antigen and antibody.....	29
3. The phage display system and its applications.....	40
4. The thinkings, purposes and meanings of this research.....	43
<b>Materials and Methods</b> .....	<b>45</b>
1. Materials.....	45
2. Methods.....	52
<b>Results and Analysis</b> .....	<b>71</b>
1. Preparation of anti-HEV ORF2 MAbs and Fab fragments.....	71
2. Idetification and characters of the neutralization epitopes of HEV.....	76
3. The primary research about the peptides mimicking the neutralization epitopes of HEV ORF2.....	100
<b>Discussion</b> .....	<b>105</b>
<b>Brief Summary and Prospect</b> .....	<b>115</b>
<b>References</b> .....	<b>117</b>
<b>Acknowledgement</b> .....	<b>135</b>
<b>Appendix</b> .....	<b>136</b>



## 摘 要

戊型肝炎是发展中国家的一种主要的急性肠道传染病。其在孕妇感染者的病死率却可高达 20%，尤其是后 3 个月的妊娠晚期者最高可达 56%。1986~1988 年间我国新疆南部的 HEV 大流行造成了 12 万人发病，千余人死亡。目前，越来越多的证据表明戊型肝炎是一种人畜共患病。其危害日益被人们所重视。但由于至今尚未建立有效的 HEV 细胞培养模型或简便的病毒繁殖模型，国内外学者对戊型肝炎病毒的发病、致病机理和疫苗的研究都相对缓慢。

HEV 是一种无包膜二十面体对称结构 RNA 病毒，其主要免疫表位集中在病毒衣壳，由 ORF2 编码的单一蛋白。在大肠杆菌中表达的 ORF2 的一个片段(NE2)可以自发形成以二聚体为基础的多种聚合结构，二聚体蛋白与病人血清的反应性显著强于单体蛋白，提示二聚体蛋白形成了 HEV 的重要免疫优势表位。NE2 蛋白免疫恒河猴可以对 HEV 产生完全的保护性。本研究用分析超离技术测得 NE2 蛋白在溶液中主要形式的沉降系数为 2.65S，分子量为 46kDa，摩擦比为 1.69，提示为中度不对称性的二聚体形式。

基于上述研究结果，本研究用 NE2 抗原制备了多株单克隆抗体，其中 6 株对二聚体的反应性强于单体，提示识别构象型表位；2 株对二聚体、单体及变性蛋白的反应性相当，提示识别线性表位。进一步，我们通过体在体外用 MAb 进行 HEV 的免疫捕获 PCR，证实 MAb 8C11、13D8 和 8H3 能够直接捕获病毒，提示它们识别病毒颗粒表面的暴露结构。通过 ELISA 及生物传感器验证这三株 MAb 的交叉阻断实验发现，8C11 和 13D8 可以相互完全阻断，提示识别同一表位区域，而 13D8 对 8H3 不能阻断，8C11 非但不能阻断 8H3，而且对 8H3 的结合有显著增强作用。

利用 Biacore 生物传感器测定这 3 株 MAb 及其 Fab 的亲合常数 ( $K_D$ )，8C11 和 13D8 的  $K_D$  值均为 20nmol/L 左右，其 Fab 片段的  $K_D$  值较完整抗体有数十倍的提高，可解释为完整抗体的二价效应；MAb 8H3 的  $K_D$  值为 1 000nmol/L 左右，但其 Fab 的  $K_D$  值降低了  $10^5$ ，提示 Fab 可以更容易地接近抗原表位并与之结合，意味着 E2 抗原上的 8H3 表位被其他结构所部分遮盖，而 8C11 与抗原的结合可能引起了抗原空间结构的改变，从而去除了对 8H3 表位的遮盖，导致 8H3 与抗

原结合的显著增强。沉降速度实验测得 8C11 和 8H3 的沉降系数分别为 6.21S 和 6.37S；NE2 过量的溶液中，中和 MAb 8C11 和 NE2 结合牢固，复合物的沉降系数为 7.59S，未见游离的 8C11 分子，而 8H3 亲和力较低呈可逆结合，复合物的沉降系数为 9.64S，*c(s)* 分布中有显著的 8H3 游离组分。病毒捕获 PCR 证实了 8C11 对 8H3 结合的增强作用同样存在与天然 HEV，而不仅仅是在重组抗原 NE2 上的假象。用 8C11、8H3 分别以及联合孵育 HEV，再感染恒河猴，结果 8C11 和 8H3 均可中和 HEV 的感染性和致病性，而且二者有明显的协同中和作用，证实 8C11 和 8H3 均识别病毒中和表位。进一步研究上述两个中和表位，我们用 MAb 和恒河猴感染系列血清及戊型肝炎患者血清进行了阻断实验，结果表明中和表位 8C11 和 8H3 的抗体产生早、持续时间长，在机体抗 HEV 免疫应答中居重要地位，是免疫优势表位。

本研究中，我们从 NE2 蛋白制备出的多株 MAb 中成功鉴定出三株中和 MAb，分别识别 HEV ORF2 上的两个不同免疫优势的中和表位区域，从而为 HEV 疫苗、诊断、病毒感染机制等相关研究提供了重要的工具。

关键词：戊型肝炎病毒；单克隆抗体；中和表位

## ABSTRACT

Hepatitis E Virus (HEV) has emerged to be one of the significant pathogens of acute hepatitis, and it often causes epidemic outbreaks. The large epidemic, which occurred in South Xinjiang of China, in 1986~1988, consisted of ~120 000 cases of hepatitis. More than 1 000 patients died in that outbreak. HEV is a non-enveloped RNA virus with an isosahedral capsid which consists of a single structural protein encoded by ORF2. A peptide (NE2) of pORF2 expressed in *E.coli* was found to naturally form several oligomer forms based on homodimer. The protein was recognized more strongly by convalescent human serum in dimeric form than in monomeric form. The result shows that the significant immuno-predominant epitopes of HEV are present in dimeric form of the protein. Immunization with NE2 protein may prevent experimental infection of rhesus monkeys with HEV. NE2 protein in solutions was characterized in XL-A analytical ultracentrifuge. The predominant component has sedimentation coefficient as 2.65S, molecular weight as 46kDa, friction ratio as 1.69, which is verified dimeric form with medium asymmetry in solutions.

Eight monoclonal antibodies (MAbs) raised by NE2 protein were characterized. Thereinto, 6 MAbs react with the homodimers more strongly than the monomers, which suggests that they recognize specific conformational epitopes of HEV. Another 2 MAbs react with the monomers equal to the homodimers, which suggests that they recognize some linear epitopes of HEV. Furthermore, MAb 8C11, 13D8 and 8H3 were found to be able to immune-capture HEV, which shows that they recognize some exposed structure located on the surface of HEV capsid. Cross blocking ELISA tests reveal that epitopes recognized by 8C11 and 13D8 might be located in such close proximity as for the antibodies to inhibit binding of one another in a reciprocal manner., but 8H3 recognizes a distinct epitope. It was noted that the binding between NE2 protein and 8H3 can be enhanced by the pre-binding of 8C11. The equilibrium dissociation constants ( $K_D$ ) of these three MAbs and their Fab fragments were determined by BIAcore biosensor. The  $K_D$  values of 8C11 and 13D8 were both about 20nmol/L, but the  $K_D$  values of their Fab fragments were increased by ten folds, presumably because of valence effects. The  $K_D$  value of 8H3 was 1 000nmol/L. Compared with the native antibody, the  $K_D$  value of the 8H3 Fab fragment was

increased by about 1 000 fold, which suggests that the 8H3 epitope is partially masked, allowing access by the smaller Fab fragment rather than by the larger native antibody. So the enhancement of 8H3 binding with NE2 antigen caused by 8C11 might be clarified that the allosteric effect on NE2 protein, elicited by the binding of 8C11, can unmask the 8H3 epitope. The sedimentation coefficient of 8C11 and 8H3 were 6.21S and 6.37S, respectively. Further SV analysis indicates that 8C11-NE2 complex (7.59S) is so tightly associated that no free 8C11 rest in solutions; on the contrary, 8H3-NE2 complex (9.64S) dissociate so easily that free 8H3 is detectable in c(s) distributions. The RT-PCR tests of immune-captured HEV shows that binding to native HEV virion of 8H3 can also enhanced by pre-incubation of 8C11, being equal to recombinant E2 protein. The experimental rhesus monkeys were challenged with HEV pre-incubated by 8C11 and 8H3 in individual or combined manner. And the result shows that both 8C11 and 8H3 can neutralize HEV infectivity and pathogenicity, i.e. they recognize the neutralizing epitopes of HEV.

Key words: Hepatitis E Virus; Monoclonal Antibody; Neutralization Epitope.

**ABBREVIATION (缩略词)**

- ALT: 丙氨酸氨基转氨酶, 转氨酶
- Amp: Ampicillin, 氨苄青霉素
- AST: 天冬氨酸转氨酶
- AU: Analytical Ultracentrifugation, 分析型超速离心技术
- BIA: Biospecific Interaction Analysis, 生物特异相互作用分析
- BSA: Bovine Serum Albumin, 牛血清白蛋白
- CDR: Complementarity-Determining Region, 抗体互补决定区
- CMD: carboxymethyl dextran, 羧甲基葡聚糖
- CMV: Cytomegalovirus, 巨细胞病毒
- CPL: Circular Polarization of Luminescence, 圆偏振激发光谱
- cryo-EM: cryo-Electron Microscopy, 冰冻蚀刻电子显微镜
- Da: Dalton, 道尔顿
- DMSO: dimethyl sulfoxide, 二甲亚砜
- DTT: 1,4-Dithiothreitol, 二硫苏糖醇
- EDC: 1-Ethyl-3(3-Dimethyl-Aminopropyl) Carbodiimide, 1-乙基-3(3-二甲基-氨基丙基)碳二亚胺
- ER: endoplasmic reticulum, 内质网
- ET-NANBH: Enterically Transmitted Non-A Non-B Hepatitis, 急性传染性非甲非乙型肝炎
- ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 酶联免疫吸附测定
- FDA: Food and Drug Administration, 美国食品及药物管理局
- GAM: Goat Anti-Mouse, 山羊抗小鼠
- GFC: Gel Filtration Chromatography, 凝胶过滤层析
- GST: Glutathion S-Transferase, 谷胱甘肽 S-转移酶
- HAMA: Human Anti-Mouse Antibody, 人抗鼠抗体
- HE: Hepatitis E, 戊型肝炎 (戊肝)
- HEV: Hepatitis E virus, 戊型肝炎病毒

HA : Hepatitis A, 甲型肝炎 (甲肝)  
HAV: Hepatitis A virus, 甲型肝炎病毒  
HB: Hepatitis B, 乙型肝炎 (乙肝)  
HBV: Hepatitis B virus, 乙型肝炎病毒  
HIV: Human Immunodeficiency Virus, 艾滋病毒  
HRP: Horseradish Peroxidase, 辣根过氧化物酶  
HPLC: High Performance Liquid Chromatography, 高效液相色谱  
IEM: ImmunoElectron Microscopy, 免疫电镜  
Ig: Immunoglobulin, 免疫球蛋白  
kDa: kilo Daltons, 千道尔顿  
Kan: Kanamycin, 卡那霉素  
KC: kupffer cell, 枯否细胞  
MAb: Monoclonal Antibody, 单克隆抗体, 单抗  
MAPK: mitogen activited protein kinase, 蛋白激酶  
MD: Molecular Dynamics, 分子动力学  
MW: Molecular Weight, 分子量  
NHS: N-Hydroxysuccinimide, N-羟基琥珀酰亚胺  
NMR: Nuclear Magnetic Resonance, 核磁共振  
NCBI: National Center for Biotechnology Information, 美国国家生物技术信息中心  
ORF: Open Reading Frame, 开放读码框架  
PCR: polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应  
PDB: Protein Data Bank, 蛋白质数据库  
PEG: Polyethylene Glycol, 聚乙二醇系列  
PV: Poliomyelitis Virus, 脊髓灰质炎病毒  
RdRP: RNA-directed RNA polymerase, RNA 依赖的 RNA 聚合酶  
RF: replicative form, 双链环状的复制型  
RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction, 反转录聚合酶链式反应  
S: Sedimentation Coefficient, 沉降系数  
sIgA: secrete-IgA, 分泌型 IgA  
SE: Sedementation Equilibrium, 沉降平衡

SOC: Small Outer Capsid Protein, 小外壳蛋白

SPR: Surface Plasmon Resonance, 表面等离子共振

SPW: Surface Plasma Wave, 表面等离子体波

SRP: Signal recognition particles, 信号肽识别蛋白

SV: Sedimentation Velocity, 沉降速度

T: thymidine, 胸腺嘧啶核苷

TCV: Turnip Crinkle Virus, 芜菁甘蓝皱纹病毒

TBSV: Tomato Bushy Stunt Virus, 番茄丛矮病毒

TEM: Transmission Electron Microscopy, 透射电子显微镜

Tet: tet-racycline, 四环素

VLP(s): Viral-Like Particle(s), 类病毒颗粒

WB: Western Blotting, 蛋白质印迹实验

厦门大学博硕士论文摘要库

## 前 言

揭开人类与自然作斗争的历史，从天花到霍乱，从艾滋到 SARS，最简单的病毒竟戏谑着最高级的人类。疫苗的出现成为人类战胜病毒的武器，天花仅存于实验室，许多病毒感染在疫苗面前嘎然而止，人们发现了是中和抗体这枚病毒中和表位的“印章”扮演着重要的角色。于是，抗原中和表位的研究成为了生命科学研究领域的热点之一，获得诺贝尔奖的单克隆抗体技术更是将人类对表位的认识引向了前所未有的高度，抗原抗体依赖于表位的相互作用、空间构象及其相应的机制成为了免疫学和分子病毒学的研究主题。

### 1. 戊型肝炎病毒及其衣壳蛋白表位、抗体的研究进展

戊型肝炎临床症状与甲型肝炎类似，是由戊型肝炎病毒引发的<sup>[5,6]</sup>急性胃肠道疾病<sup>[7]</sup>；HEV是一种小的无包膜正二十面体的单链正义RNA病毒，属于戊型肝炎病毒科戊型肝炎病毒属。

#### 1.1. 戊型肝炎

1955年至1956年，在南亚印度地区就暴发过因水源污染导致的急性肝炎流行<sup>[8]</sup>。由于当时缺乏特异性病原学诊断方法，其病因一直不明确。直到80年代初建立了甲型肝炎和乙型肝炎的特异性诊断方法后，对该次肝炎流行进行了回顾性调查发现，患者血清内缺乏甲型肝炎病毒或乙型肝炎病毒感染的相应指标，表明有另一种能引起流行性肝炎的病原存在<sup>[9,10]</sup>，称为急性传染性非甲非乙型肝炎。1983年前苏联学者Balayan等<sup>[11]</sup>用免疫电镜技术首先在一位志愿感染者的粪便中发现了病毒样颗粒。1990年Reyes等<sup>[12]</sup>用ET-NANBH患者粪便悬液中的病毒样颗粒感染非人灵长类动物，用胆汁作为VLPs来源，克隆获得病毒基因组后，ET-NANBH病毒得到了最终鉴定，被命名为戊型肝炎病毒。

##### 1.1.1. 戊型肝炎的流行病学特点

戊肝主要是在卫生条件差的地区大规模的水源相关型暴发流行<sup>[8,10,13]</sup>；经粪口途径传播；感染率在15~40岁青壮年间最高；流行期间的病死率为0.2%~4%，孕妇感染者的病死率可高达10%~20%（尤其是在怀孕6~9个月的孕妇，中死亡率



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库