

学校编码: 10384  
学号: 200426158

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_  
UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

抗戊型肝炎病毒单克隆抗体识别表位的初  
步研究及戊型肝炎病毒基因 1 型和基因 4 型  
中和表位区域分子差异研究

The primary analysis of the epitopes of anti-HEV mAbs and  
the molecular differences between HEV-1 and HEV-4 in  
their neutralization regions

郭清顺

指导教师姓名: 夏宁邵 研究员

专 业 名 称: 生物化学

论文提交日期: 2007 年 06 月 19 日

论文答辩时间: 2007 年 08 月 02 日

学位授予日期: 2007 年 月 日

答辩委员会主席: 曾定教授  
评 阅 人: \_\_\_\_\_

2007 年 07 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产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于：

1. 保密（ ），在\_\_年解密后适用本授权书。
2. 不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

# 摘 要

戊型肝炎病毒 (HEV) 是戊型肝炎的病原体, 随着 HEV 流行病学研究的深入, 发现 HEV 的 4 个主要基因型存在着明显的易感宿主差异: 基因 1 型 (HEV-1) 和基因 2 型 (HEV-2) 仅分离于人类, 能导致大规模的戊肝爆发流行, 实验动物目前只成功感染非人灵长类, 而基因 3 型 (HEV-3) 和基因 4 型 (HEV-4) 人畜共患, 仅见于小规模流行和临床散发。我们将 HEV 分为两类: 包括 HEV-1/2 的 H (Human) 类和包括 HEV-3/4 的 Z (Zoonosis) 类。

首先我们通过 Western blot、体外捕获 PCR、ELISA 阻断实验及合成的多肽库对实验室制备的多株抗 HEV 单抗的识别表位进行系统的研究, 结果发现 12 株线性单抗识别的位都位于 ORF2 aa408-458 之间, 17 株构象型单抗识别表位都定位于 ORF2 aa459-606 之间, 其中 15 株的识别表位位于天然病毒表面。

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, 并且也是主要介导 HEV 与嗜性细胞吸附的区域。本研究通过比较这两类 HEV 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, 分别是 Ser483Thr、Val492Met、Ser497Thr 和 Ala599Gly。以能形成类病毒颗粒的 HEV 239 (ORF2 aa368-606) 为基础, 对这四个位点进行定点替换突变, 并以这 15 株能够捕获 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可能在 H 类和 Z 类 HEV 宿主选择中扮演重要角色。

**关键词:** 戊型肝炎病毒; 单克隆抗体 (单抗); 宿主差异; 中和表位

## Abstract

Hepatitis E virus (HEV) is the pathogen of hepatitis E. With the increasing knowledge of the molecular epidemiological study, HEV can be classified into two groups according to its compatible host: H (human) group and Z (zoonosis) group. 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.

Firstly, we systematically study the epitopes of 23 anti-HEV monoclonal antibodies which were previously generated in our laboratory with the use of western blot, capture-PCR, blocking ELISA and synthetic polypeptides. It is found that 12 mAbs recognized linear epitopes that located at aa408-458 of HEV ORF2 and 17 conformation-dependent mAbs, most of which recognized the surface epitopes of native HEV, located at aa459-606 of HEV ORF2. These mAbs provides good tools for the further studies of HEV.

The neutralization epitopes mostly centralize in HEV ORF2 aa459-606, which was proved to be the cellular adsorptive region. We analyze the amino acid sequences between ORF2 368 and 606. Four group-conserved sites, all of which located in the neutralization region of ORF2 were identified. They were Ser483Thr, Val492Met, Ser497Thr and Ala599Gly. Mutation analysis were then performed on these sites of HEV 239 which could form virus-like particles, and our results showed that the difference of the site of aa497 between H and Z groups was responsible for the maintenance of their group-specific immunodominant epitopes, probably through conformation-dependent epitope changes, while the other three sites didn't have apparent effects. Thus, analysis of the site Ser497Thr may help to understand the molecular mechanism of compatible host selection by H and Z groups of HEV.

**Key words:** hepatitis E virus (HEV); monoclonal antibody (mAb); host difference; neutralization epitope.

# 目 录

中文摘要	I
英文摘要	II
前言	1
1. HEV的形态及理化性质	1
2. HEV的基因组结构	1
2.1. ORF1	2
2.2. ORF2	2
2.3. ORF3	3
3. HEV的分类	3
4. HEV的研究模型和HEV的复制	4
4.1. HEV的细胞培养模型	4
4.2. HEV的动物感染模型	4
4.3. HEV的复制	5
5. 戊型肝炎的流行病学	5
5.1. 戊型肝炎流行模式及地区分布	5
5.2. HEV的传播方式	6
5.3. 戊型肝炎是一种人畜共患病	7
6. HEV的变异性及分子流行病学	7
6.1. HEV的基因型	7
6.2. HEV的基因亚型	8
6.3. 基因差异	9
7. 戊型肝炎的临床症状及感染进程	10
8. 戊型肝炎的诊断	11
8.1. 免疫电镜和免疫荧光镜检 (IFM)	11
8.2. HEV的分子生物学检测	11
8.3. 检测抗HEV抗体的酶免疫试验 (EIAs)	12

9. 戊型肝炎疫苗的研制	15
9.1. 真核细胞表达的重组蛋白	15
9.2. 原核细胞表达的重组蛋白	16
10. 本论文研究的目的和意义	16
<b>材料与amp;方法</b>	<b>17</b>
1. 材料	17
1.1. 主要仪器	17
1.2. 主要材料	17
1.3. 常见溶液配置	19
2. 方法	21
<b>结果与分析</b>	<b>25</b>
<b>第一部分 抗戊型肝炎病毒单克隆抗体识别表位的初步研究</b>	<b>25</b>
1. 单抗识别表位的构象依赖性	25
2. 线性单抗识别表位的确定	26
3. 构象型单抗初步定位	27
4. 构象型单抗间的相互阻断	29
5. 单抗对HEV的捕获作用	30
<b>第二部分：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</b>	<b>31</b>
1. HEV ORF2 aa368-606区段的保守性差别位点的分析	32
2. HEV ORF2 aa368-606区段的类差别位点的定点突变及理化性质分析	34
3. HEV 239及各种突变体表达纯化及理化性质分析	35
4. 各突变体与单抗的反应性	37
<b>讨论</b>	<b>39</b>
1. HEV 239上的识别表位	39
2. HEV 239中和表位分析	39

3. 线性单抗识别表位分析·····	40
4. HEV-1和HEV-4中和表位区域差异研究的意义·····	40
5. HEV ORF2 aa497导致HEV-1和HEV-4中和表位区域差异的方式探讨·····	41
6. 戊肝只有一种血清型的分析·····	42
7. PCR扩增各突变体的片段经验·····	42
结论与展望·····	44
参考文献·····	45
在校期间发表的论文·····	54
致谢·····	55

厦门大学博士论文摘要库

# 前 言

戊型肝炎病毒 (HEV) 是一种小的无包膜正二十面体的单链正义 RNA 病毒, 引发戊型急性病毒性肝炎。

早在 20 世纪 50 年代, 在印度就暴发过因水源污染而致的急性肝炎的流行。由于当时缺乏特异性的病原学诊断方法, 其病因一直不明确<sup>[1]</sup>。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, 对该次流行进行回顾性调查发现, 患者血清内缺乏甲型肝炎病毒感染的指标, 表明有另一种能引起流行性肝炎的病原存在<sup>[2, 3]</sup>。

1983 年前苏联学者 Balayan 等<sup>[4]</sup>应用免疫电镜技术 (IEM) 首先在一位志愿者的粪便中发现了病毒样颗粒, 并将这种病毒性肝炎称为急性传染性非甲非乙型肝炎 (enterically transmitted non-A non-B hepatitis, ET-NANBH)。

Reyes 等<sup>[5]</sup>通过 cDNA 文库筛选到一个命名为 ET1.1、含有一段 1.3kb 的非人和猴基因的 cDNA 克隆, 对各个地方爆发的 ET-NANBH 的粪便中提取的 cDNA 与克隆 ET1.1 进行杂交分析表明全球 ET-NANBH 的病原大致相同。次年, 第一个 ET-NANBH 的病原的全序列发表, 并命名为 HEV<sup>[6]</sup>。

下面从 HEV 分子生物学、流行病学、检测试剂和疫苗等方面的研究进展进行综述。

## 1 HEV 的形态及理化性质

通过免疫电镜观察到 HEV 是大小约为 27-34nm 的球形颗粒, 其表面有许多类似于杯状病毒的突起和缺刻结构<sup>[7]</sup>。推测 HEV 病毒颗粒可能为 T=3 的二十面体结构, 由 60 个形态亚单位组成, 每个形态亚单位由一个 HEV 结构蛋白同源二聚体构成。

HEV 病毒颗粒在氯化铯中的浮密度为 1.35~1.40g/cm<sup>3</sup>, 沉降系数为 183S, HEV 储存于 -70℃ 与 +8℃ 之间不稳定, 液氮中则极为稳定<sup>[8]</sup>。在酸性和弱碱性环境中较稳定, 可存在于肝内胆汁和胆囊内胆汁中<sup>[9]</sup>。

## 2 HEV 的基因组结构

1991 年首次报道了 HEV 的全基因序列, 其基因组为线性单股正链的 RNA, 全长大约为 7.2kb<sup>[6, 10, 11]</sup>, 5'端有帽子结构<sup>[12]</sup>, 3'端有 poly (A) 尾巴, 其间包含

3 个开放性读码框架（图 1）。

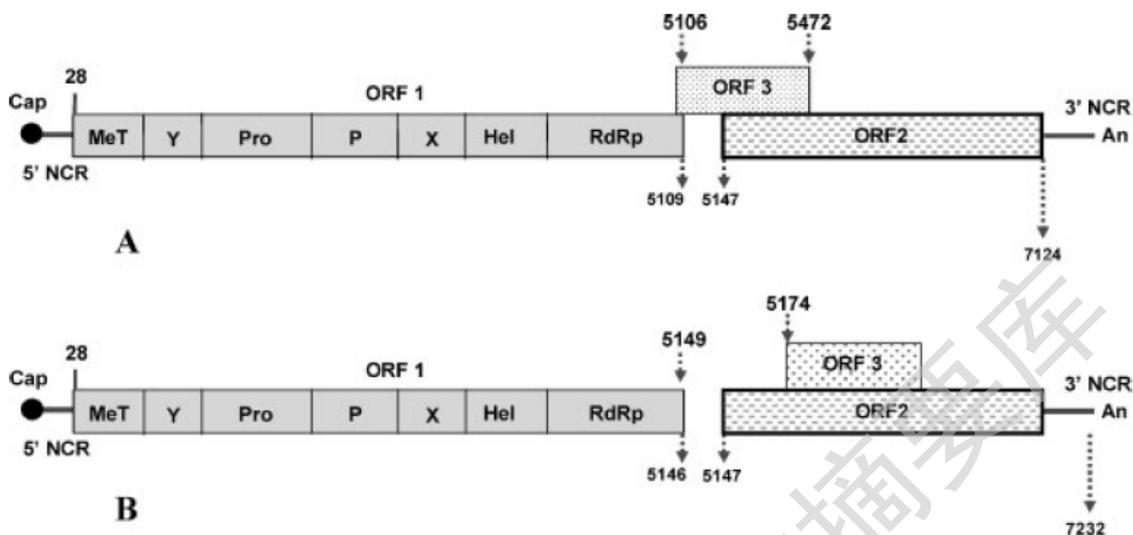


图 1 HEV 基因组

Fig 1 Genomic organization of HEV(A) in genotype 1-3 and (B) in genotype 4

## 2.1 ORF1

ORF1于病毒基因组5'端27bp的非编码区之后开始，全长5079bp（所有的数据来自于缅甸株的原型株）。ORF1编码大约1693aa的非结构蛋白，这些蛋白具酶活性，涉及病毒的复制和病毒蛋白的成熟。保守结构域分析表明ORF1有多个酶活性区：RNA依赖的RNA聚合酶（RdRP）区、RNA螺旋酶区、木瓜蛋白酶样的半胱氨酸蛋白酶区、甲基转移酶区、两个未知功能的X区和Y区。在X区之前有一个富含脯氨酸的高变绞链区，其碱基和氨基酸序列在不同地域分离的HEV株中同源性很小。这样的高变区通常见于某些病毒的结构蛋白当中，用以逃避宿主的免疫反应。

## 2.2 ORF2

ORF2与ORF1相隔41nt，开始于5147位碱基，终止于3'端poly(A)尾上游65bp处，含1980nt，编码660aa的多肽，推测为病毒主要结构蛋白，组成病毒衣壳。ORF2蛋白在N端有一个典型的信号肽序列，其后是一个富含精氨酸的结构域，这一强正电区域被认为与病毒组装过程中的基因组RNA衣壳化有关。ORF2上有三个N-糖基化位点，Asn-137、Asn-310和Asn-562，在各毒株间高度保守，其中Asn-310为主要糖基化位点。以ORF2转染哺乳动物细胞COS、人肝癌细胞Huh-7、HepG2，表达出88kD糖蛋白，在胞浆和胞膜上均可见到<sup>[13]</sup>。对这些糖基化位点

进行突变,并不影响PORF2定位于细胞膜,而去除信号肽序列后则PORF2仅见于胞浆,提示PORF2的移位,而非糖基化,为蛋白细胞表面定位所必需。另一个值得注意的是,用具备翻译修饰功能的体外转录翻译体系进行PORF2的体外翻译,翻译出的88kD的gpORF2除单体外,还可见明显的二聚体形式,说明gpORF2有自发形成同源二聚体的倾向,病毒衣壳的子粒很可能即是由gpORF2的同源二聚体组成。Li等<sup>[14]</sup>通过缺失突变发现形成ORF2正常结构和功能的关键性区域为aa459-606,aa394-458和aa606-660是两个二者择一的影响ORF2形成同源二聚体的区域,而aa368-398是ORF2形成颗粒的关键性氨基酸。

### 2.3 ORF3

ORF3是一个小的读码框,位于ORF1的末端。ORF3在5'端与ORF1重叠1nt,3'端与ORF2重叠328nt。在基因4型HEV中,ORF3的位置与基因1型有所差别<sup>[15]</sup>。ORF3共含369个碱基,编码一个123aa的小肽,分子量约13.5kDa。在哺乳动物细胞中表达的PORF3仅见于胞浆中,无糖基化,无信号肽,是一个细胞骨架相关磷酸蛋白,其Ser-80由细胞有丝分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)磷酸化<sup>[16]</sup>,目前推测其作为一个反式激活元件<sup>[13]</sup>,能通过抑癌基因101介导 $\alpha$ 微球蛋白分泌增加<sup>[17]</sup>。此蛋白靠近N端的一半有两个非常疏水的区域,可能形成能与细胞膜结合的 $\alpha$ 螺旋。磷酸化的pORF3被发现与肝细胞骨架结合,进而与ORF2核衣壳蛋白形成复合物,表明此蛋白在病毒颗粒组装的过程中可能扮演了细胞骨架锚定位点的角色。

## 3 HEV 的分类

ET-NANBH的病原在用免疫电镜初次观察到后就被估计是一种RNA病毒,并被建议归类到细小病毒科<sup>[18]</sup>。后来发现ET-NANBH病原的免疫原性和生物物理性质与细小病毒没有明显关系。1988-1998年间HEV被暂时的分类到杯状病毒科。与无包膜的杯状病毒相比,HEV颗粒稍许小一点,表面形态如刺突和缺痕更精细一些,但在蔗糖中的沉降系数和浮力密度相似。此外,HEV基因组的非结构区在前而结构区在后的排列方式在杯状病毒科也有发现<sup>[19]</sup>。然而,HEV的ORF3的位置、ORF2的长度以及ORF1中功能蛋白结构域的排列方式均与杯状病毒不同。HEV非结构区的系统进化分析也不支持将HEV分类到杯状病毒科<sup>[20]</sup>。

近来发现HEV基因组的排列方式和使用方式和风疹病毒(有包膜的RNA病

毒，目前属于披膜病毒科， $\alpha$ 病毒属）与甜菜坏死黄脉病毒（一种植物病毒，披膜病毒科Furoviridae属）相似，因此有人建议将其归于风疹病毒族 $\alpha$ 病毒亚组<sup>[21]</sup>。

HEV后来被单独归为HEV类病毒属<sup>[22]</sup>，目前归为Hepeviridae科Hepevirus属（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/8threportICTV>）。

## 4 HEV 的研究模型和 HEV 的复制

### 4.1 HEV 的细胞培养模型

最近发表的细胞培养试验是取HEV感染的灵长类的高度异质化肝细胞在加有生长因子和激素的无血清培养基中培养。复制的检测采用链特异性RT-PCR技术，在培养细胞中同时检测到正链和负链的HEV-RNA，培养基中可检测到正链HEV-RNA，表明有病毒样颗粒释放到培养上清中。在此HEV感染的细胞中观察不到细胞病变。之后，原代肝细胞能被上述细胞培养上清中的病毒感染，并可检测到HEV-RNA的复制，一株抗HEV核衣壳蛋白的中和性单抗能够阻断肝细胞的感染<sup>[23]</sup>。

一株新分离的中国株HEV在相对较高浓度的MgCl<sub>2</sub>（30mM）和pH7.2时在A549细胞（人肺癌细胞）中短时间培养获得成功。细胞病变（细胞变圆和单层破坏）在与病毒孵育后2天可见，并可被急性期抗HEV抗体中和<sup>[24]</sup>。

Panda等<sup>[25]</sup>将全长的HEV cDNA克隆到pSGI载体中，其体外转录的RNA可感染HepG2细胞，传代6次后用链特异性PCR能检测到病毒的复制。

### 4.2 HEV 的动物感染模型

#### 4.2.1 非人灵长类动物感染模型

1983年Balayan等<sup>[4]</sup>应用免疫电镜（IEM）从ET-NANBH患者的粪便中发现直径为27~30nm的圆形病毒样颗粒（VLPs），用该患者的粪悬液感染2只食蟹猴后均发生肝炎，第1次建立了戊肝的动物模型。

此后，Kane等<sup>[18]</sup>的研究表明狨猴在感染HEV后的排毒量在异柠檬酸脱氢酶升高前和高峰期内最多。此后HEV被证实能在食蟹猴和狨猴中连续传代，传代后其潜伏期较稳定，致病性也未因连续传代而增强<sup>[7]</sup>。Nanda等<sup>[26]</sup>在攻毒后11~28天收集恒河猴的肝组织、胆汁和血清，发现这些标本中均有HEV正链RNA，唯独肝组织中还同时存在负链RNA复制中间体，证明HEV在肝内复制。

总体而言，灵长类动物对HEV普遍易感，且以恒河猴、食蟹猴尤胜。在实验

性恒河猴、食蟹猴戊肝模型中，由于发生病毒血症，肝脏能复制HEV并分泌入胆汁和粪便，具有急性肝炎生化学和组织学的特征并产生抗HEV抗体因而适合于作为疫苗免疫预防的动物模型。

#### 4.2.2 家猪动物感染模型

Balayan等<sup>[27]</sup>给4只幼猪分别静脉注射1.5ml和口服2.0ml 10%的戊肝病人粪悬液；另2只猪同样静脉接种，但于接种前夜在4℃条件下，将粪悬液与含有HEV抗体的恢复期血清中和，在接种前将其置于37℃下2h；1只猪接种正常人（HEV阴性）粪悬液。结果前4只猪中有3只猪发生HEV感染，接种后3~4周在皮肤出现特征性的黄疸，以腋下和巩膜为明显。在病程第14和37天取肝组织标本检查，见急性肝炎改变，而用经血清中和的粪悬液和正常人的粪悬液接种的3只猪在37d观察期内均未见黄疸或ALT升高，肝组织检查正常，粪便VLPs为阴性。这说明家猪对HEV易感。家猪来源充足，尤其是特征性黄疸的出现，在非人灵长类动物戊肝模型中也未见报道，这对戊肝研究具有一定的价值。但猪与人的种系差距较大，其研究结果也有待于深化。

### 4.3 HEV的复制

对HEV的复制的认识在很大程度上只能依靠对其他的正链RNA病毒进行类比<sup>[28]</sup>。HEV的主要靶细胞是肝细胞，但在动物试验表明肝外组织如外周血单核细胞、脾、淋巴结和小肠都有HEV的复制<sup>[29]</sup>。HEV的正链RNA在感染细胞内被翻译为对病毒复制极为重要的非结构的蛋白前体，并在翻译的同时或在翻译后由病毒蛋白酶和/或宿主蛋白酶识别并处理，其产物包括一个RdRp，RdRp的活性只能在复制的早期检测到，可能参与到负链RNA和正链RNA的合成<sup>[25]</sup>。HEV基因组RNA的复制可能起始于poly（A）尾巴上的茎环结构<sup>[30]</sup>。复制的结果除了产生完整的正链病毒RNA外，还产生了只含有ORF2的亚基因组<sup>[31]</sup>。

## 5 戊型肝炎的流行病学

### 5.1 戊型肝炎流行模式及地区分布

HEV有两种流行模式：一种是由粪便污染水源引起的大规模暴发流行，主要发生在不发达国家和地区如印度、尼泊尔和缅甸等；另一种是由于个人及公共卫生不良导致的散发流行，在全世界范围内广泛存在（图2）。

我国是戊肝的高流行区之一，自1982发现戊肝病例以来至今已报道了11次戊

肝爆发流行。最大的一次爆发流行于1986年9月至1988年4月发生在新疆南部的和田、喀什和克孜勒苏三地州，波及23个县市，持续20多个月，共发病119280例，死亡近千人，对人民的生命健康造成了严重危害，并引起了社会广泛关注<sup>[32]</sup>。

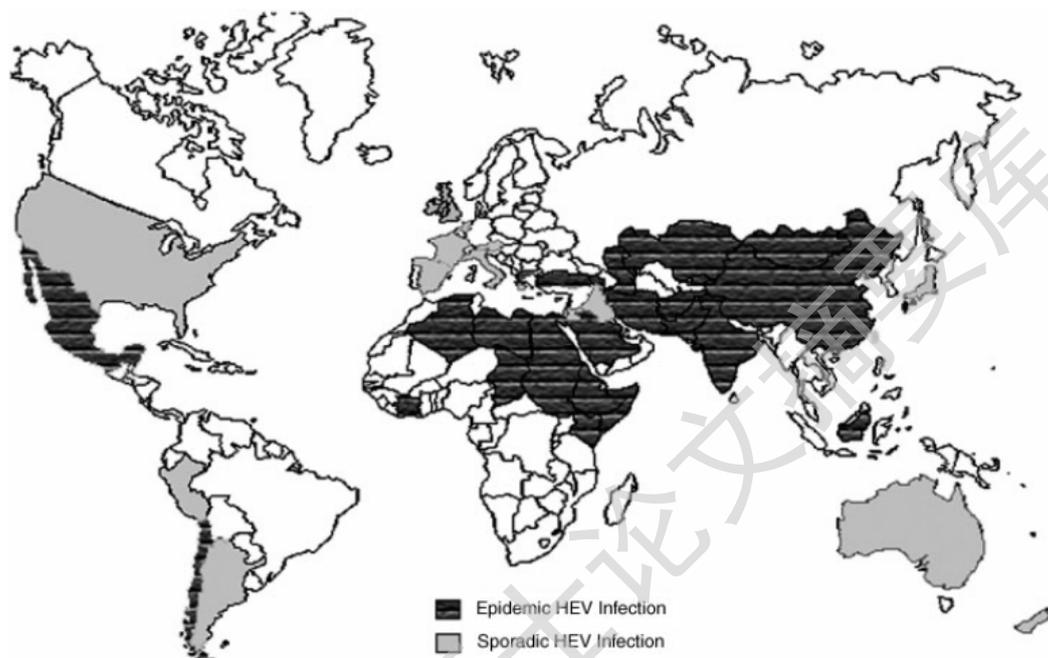


图2 戊型肝炎病毒的地理分布

Fig 2 Geographical distribution of HEV

## 5.2 HEV的传播方式

HEV最重要的传播方式为粪口途径，主要是通过饮用被HEV污染过的水源<sup>[33-35]</sup>，而且存在一定的剂量效应，Corwin等<sup>[36]</sup>发现在印度尼西亚，居住于河流上游的居民罹患率要高于下游居民，可能是因为在这条狭窄的、水流缓慢的河流上游病毒浓度较高。另外，在降水稀少地区由于病毒不被稀释，其散发感染危险性似乎也更高。

除污染的水源外，直接食用未熟透的感染HEV的动物脏器也是HEV粪口传播的途径之一。日本由于其生食的饮食习惯报道了多起食用动物脏器导致集体罹患戊型急性肝炎的事件<sup>[37-40]</sup>。

母婴垂直传播的可能性不大，因为HEV感染的病毒血症一般较短。有报道也局限于怀孕7-9个月患病的孕妇<sup>[41]</sup>。

输血传播的可能性不大，但确实存在。最直接的证据是2006年Boxall等<sup>[42]</sup>

发现一名本土感染HEV的戊型肝炎献血者将急性肝炎传播给了受血者。在两名受血者中，受血较多的一名在受血35天后罹患了急性戊型肝炎，分离自献血者和受血者体内的HEV序列分析表明导致二者肝炎的HEV是一致的。

### 5.3 戊型肝炎是一种人畜共患病

1990年Balayan等<sup>[27]</sup>首次用HEV感染家猪获得成功，并由此提出猪可能是HEV自然循环中的一环。1997年Meng等<sup>[43]</sup>首次从美国的猪血清中分离到猪HEV的野毒株，并发现其碱基序列与此前公布的两个美国戊肝患者感染的HEV株的同源性高达92%。最近日本多人通过进食野猪肉、野鹿肉及其脏器感染动物源HEV而罹患急性戊型肝炎，成为猪HEV感染人并致病的直接证据<sup>[39]</sup>，目前认为猪是HEV的主要贮存宿主<sup>[44]</sup>。

戊肝作为一种人畜共患病已成为人们的共识，并认为动物源性HEV是散发性戊肝的病因之一。

## 6 HEV的变异性及分子流行病学

### 6.1 HEV的基因型

HEV的基因序列相对稳定，尤其是编码衣壳蛋白的ORF2。各地毒株在ORF2氨基酸序列上的高度同源性造成了HEV血清学上的相似性，目前多数看法认为世界各地HEV均为同一血清型，在各基因型病毒间的交叉保护实验也证实了这一点。

编码衣壳蛋白的基因变异可能引起病毒表面抗原表位的变化，从而导致血清型的差异，因此，科学家们最早用结构蛋白编码区（ORF2）进行基因分型。为了确定HEV的基因型，Fankhauser等提议采用一个大体与Norwalk病毒相似的分类标准<sup>[45]</sup>，即将ORF2区的核酸变异不超过20%的分离株归为一个基因型。根据这个标准，HEV至少可分为4个主要的基因型：分离于疫区的各株可归为基因1型（HEV-1，亚洲和非洲的分离株）；基因2型（HEV-2）为与墨西哥株类似的一群，除墨西哥株<sup>[46]</sup>之外，还包括尼日利亚株<sup>[47]</sup>；从美国、部分欧洲国家（意大利、希腊、西班牙等）和阿根廷的急性戊肝患者中分离的HEV株<sup>[48-51]</sup>与疫区的各分离株相距较远（变异度>20%），是为基因3型（HEV-3）；基因4型（HEV-4）由最近在中国发现的新的分离株<sup>[52]</sup>组成，对台湾株的序列分析表明其也属此型<sup>[47]</sup>。此外，在猪中分离到了一些新的HEV株<sup>[34, 53-56]</sup>，分属HEV-3和HEV-4。四种

基因型的代表株分布为缅甸株、墨西哥株、美国株和中国变异株。目前，将鸡HEV归为基因5型<sup>[57]</sup>。

## 6.2 HEV的基因亚型

Lu等<sup>[57]</sup>通过HEV全基因组和ORF2 5'端301bp的片段（根据M73218，5944nt-6294nt）并综合其他4个片段将HEV在4个基因型的基础上进一步分为24个基因亚型（图3）。

HEV-1包含1a、1b、1c、1d、1e等5个亚型。1a主要分离于尼泊尔<sup>[58-61]</sup>、印度<sup>[62-64]</sup>、缅甸<sup>[11, 65]</sup>、巴基斯坦<sup>[66]</sup>等南亚地区。1b主要分离于中国西北部<sup>[65, 67, 68]</sup>，而归于此亚型的巴基斯坦分离株<sup>[69]</sup>被认为是从中国输入的。1c主要分离于中国<sup>[70, 71]</sup>、吉尔吉斯斯坦<sup>[72, 73]</sup>、乌兹别克斯坦<sup>[72]</sup>，同时也是尼泊尔<sup>[60]</sup>另一个流行分支，而在印度<sup>[62]</sup>以非主流株存在。1d分离于摩洛哥和阿尔及利亚<sup>[72, 74]</sup>，1e分离于乍得<sup>[75]</sup>、纳米比亚<sup>[76]</sup>、埃及<sup>[77]</sup>、中非、苏丹和阿尔及利亚<sup>[78]</sup>，这两个亚型代表了非洲的分离株，在进化上与亚洲各株距离较远。

HEV-2包含2a和2b两个亚型。2a仅有基因2型原型株墨西哥株一株，2b分离自非洲的尼日利亚和乍得。

HEV-3分为3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、3h、3i、3j等10个亚型。3a主要分离自美国<sup>[49, 54, 79-81]</sup>、日本<sup>[82-86]</sup>、荷兰<sup>[53]</sup>、韩国<sup>[87]</sup>、西班牙<sup>[81]</sup>等地。此亚型日本株相互聚集，与分离自其他地区的序列有较大的不同，被认为是日本本土分离株，至少在日本流行10年以上<sup>[84]</sup>。韩国分离的序列与美国高度近似，被认为是从美国输入的。3b几乎全部分离自日本<sup>[40, 82, 86, 88-95]</sup>，此亚型在日本至少从1982年就在流行。3c分离自荷兰5个不同的猪场粪便标本<sup>[48]</sup>。3d分离自台湾猪，鉴于台湾本土病人和猪大部分为HEV-4感染，此亚型被认为是从外输入的<sup>[96]</sup>。3e分离于日本<sup>[97, 98]</sup>、英国<sup>[99, 100]</sup>、法国<sup>[81]</sup>、希腊<sup>[50]</sup>、西班牙<sup>[81]</sup>等地，3f分离自西班牙<sup>[101]</sup>、希腊<sup>[50]</sup>、荷兰<sup>[53]</sup>等地，3h分离于意大利<sup>[50]</sup>和新西兰<sup>[56]</sup>，这3个亚型代表了欧洲大陆流行的HEV毒株。3g分离自中亚吉尔吉斯斯坦猪<sup>[73]</sup>。3i分离自奥地利<sup>[51]</sup>、阿根廷的人和猪<sup>[102]</sup>，3j分离自加拿大<sup>[103]</sup>、澳大利亚和墨西哥，前者主要流行于南美，后者可能是北美除3a亚型外的另一流行亚型。

HEV-4分为4a、4b、4c、4d、4e、4f、4g等7个亚型。4a主要流行于中国大陆<sup>[15, 52, 68, 104]</sup>和中国台湾<sup>[96, 105]</sup>等地。4b除了中国大陆和台湾，还分离于印度尼西亚

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