

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21620101152384

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

基于大肠杆菌可溶性表达的戊型肝炎病毒  
样颗粒的体外组装及其应用

Assembly of hepatitis E virus-like particles from bacterially  
expressed soluble precursor

王楠

指导教师姓名: 葛胜祥 副教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2013 年 6 月

论文答辩日期: 2013 年 6 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2013 年 6 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈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其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

## 摘要

戊型肝炎病毒 (Hepatitis E virus, HEV) 是一种无包膜的 RNA 病毒, 主要可引起急性戊型肝炎 (Hepatitis E, HE), 会造成消化道相关的食欲不振、恶心、呕吐等症状, 严重的患者甚至会发生肝衰竭乃至死亡, 尤其在育龄期妇女、慢性肝病患者、老年人和婴幼儿中有着较高的病死率, 是一种严重威胁人类健康的病原体, 引起了众多研究者的关注。

由于缺乏有效的 HEV 细胞培养模型, 对 HEV 的病毒颗粒组装、感染机制研究和疫苗开发主要是通过各种外源表达系统进行的。HEV ORF2 aa112-606 编码的蛋白 (p495) 可在昆虫细胞中体内组装成等二十面体对称的病毒样颗粒 (Virus Like Particle, VLP), 但体外重组装和利用大肠杆菌表达系统获得该蛋白片段的病毒样颗粒等未见报道, 体外组装可控制核酸的包裹, 从而制备具有感染和入胞能力的假病毒, 可用于病毒-细胞相互作用、病毒入胞机制、病毒受体研究和疫苗效力评价, 本研究在课题组成功研制世界上第一个重组戊型肝炎疫苗 p239 的基础上, 利用原核表达系统开展 p495 蛋白的表达、体外组装、免疫原性和假病毒包装等研究, 以期对戊型肝炎病毒的研究提供新的工具。

首先, 本研究利用大肠杆菌表达系统可溶性表达 p495 蛋白, 并通过突变分析发现, Leu<sup>244</sup> 为 p495 蛋白可溶性表达的关键位点。采用阴离子交换层析等方法获得纯度约 90% 的 p495 蛋白, 通过摸索蛋白颗粒组装的条件, 包括组装时溶液的 pH、盐离子浓度和温度等, 确定 20-50mM PB6.5、0.5M NaCl、37℃ 是 p495 的颗粒体外组装的较优条件, 并发现 Pro<sup>284</sup> 为 p495 蛋白组装的关键位点之一。

其次, 透射电镜观察和动态光散射测定显示, p495 可形成为形态均一、半径为 15nm 左右的 VLP; 免疫反应性分析表明, p495 与各种 HEV 特异单抗反应性良好, 与 p239 的反应性相当; p495 在小鼠体内的半数有效剂量 (ED<sub>50</sub>) 为 0.068μg, 0.5μg 剂量可诱导的小鼠抗体水平为 10<sup>5</sup>, 与已上市的 p239 疫苗 Hecolin<sup>®</sup> 免疫原性相当。

再次, 细胞入胞实验表明, p495 可吸附并进入 HEV 易感细胞 HepG2, 将能

够表达 GFP 的质粒载体与其进行共组装，采用 HPLC 分子筛的双波长紫外检测和组装颗粒的细胞感染实验，提示 p495 可包裹质粒 DNA，并在细胞内表达 GFP 报告基因，显示了用于制备 HEV 假病毒的可行性。

综上所述，本研究首次利用大肠杆菌可溶性表达了 HEV p495 蛋白，其中的 Leu<sup>244</sup> 和 Pro<sup>284</sup> 分别在可溶性表达和颗粒组装中起重要的作用，组装获得形态均一的病毒样颗粒，具有良好的免疫反应性和免疫原性，这些颗粒可感染细胞或包裹质粒 DNA 在细胞内表达报告基因。从而，为 HEV 的衣壳组装机理、细胞感染机制、受体鉴定等研究奠定了良好的基础，为基于大肠杆菌的戊肝病毒的疫苗设计提供新的参考，假病毒的应用将推动 HEV 细胞模型和动物模型的发展。

**关键词：**戊型肝炎病毒；大肠杆菌表达系统；病毒样颗粒；颗粒组装；假病毒制备

## Abstract

Hepatitis E virus (HEV) is a non-enveloped RNA virus and can cause an acute viral hepatitis with the symptoms of inappetence, nausea and vomit. It also can cause liver failure and is responsible for unusually high rates of mortality in pregnant women, patients with chronic liver disease, the aged and infants. HE has been paid more attention as it is a pathogen which is hazardous to health.

Since there is no efficient cell culture model of HEV, HEV VLP assembly, infection mechanism and vaccine development are researched through various heterologous expression systems. Previous study has shown that HEV ORF2 aa112-606 (p495) is able to assemble into virus-like particles in insect cells, but there is no report about p495 assembly in vitro and expression in *E. coli*. Pseudovirus which is infectious and invade the cell can be prepared following with the packaging of nucleic acid in vitro, thus it can be used on research of interaction between virus and host cell, mechanism for entry cell, virus receptors and evaluation of vaccine efficacy. We researched the expression of p495 in *E. coli* system, assembly in vitro, immunogenicity and its pseudovirus based on p239 (which is the first recombinant HEV vaccine prepared by our research group), and we hope that it can be a new tool for the research of HEV.

First, we expressed p495 from bacterially expressed soluble precursor, and found the amino acids, Leu<sup>244</sup>, is important to soluble expression of p495. Then p495 protein with purity of 90% are acquired by purification with anion chromatography. After that, we established an efficient self-assembly method which showed 20-50mM PB6.5, 0.5M NaCl and 37°C is the most suitable for formation of p495 VLPs by researching its assembly conditions, such as salt ions concentrations, pH and temperature of assembly buffer and found the amino acids, Pro<sup>284</sup>, played an important role in the process of assembly of p495.

Secondly, Transmission Electron Microscopy (TEM) and Dynamic Light Scattering (DLS) indicated that p495 is able to self-assemble into VLP (which is

homogeneous and radius of 15nm). The immunoreactivity of p495 is well with HEV monoclonal antibodies and is same as p239. After immunization, the ED<sub>50</sub> of p495 is 0.068μg, also they can elicit higher titers of HEV antibodies (which is the same as Hecolin®) in mouse at 0.5μg dose.

Thirdly, p495 also have the ability of cellular attachment (we used HepG2 cell line) , and we prepared HEV pseudovirus through adding exogenous gene (such as GFP recombinant plasmid) to p495 in the self-assembly process. We confirmed feasibility of preparation of HEV pseudovirus through dual-wavelength ultraviolet HPLC analysis and cell infection.

In a conclusion, we firstly generated HEV p495 from bacterially expressed soluble precursor and found the important amino acids Leu<sup>244</sup> and Pro<sup>284</sup> for successful soluble expression and self-assembly in vitro respectively. These VLPs are homogeneous and have good immunoreactivity and immunogenicity, they also have the ability of cellular attachment and packaging of DNA in vitro. Therefore, our findings lay the foundation of research of mechanism for HEV capsid assembly and cell infection and identification of receptors, and it also significantly provide guidance for design of HEV vaccine based on *E coli*. The application of pseudovirus will advance the development of HEV cell and animal models.

**Key words:** Hepatitis E virus; *E coli* expression system; virus like particles; self-assembly; preparation of pseudovirus.

## 缩略词

- Amp: Ampicillin, 氨苄青霉素
- AUC: Analytical Ultracentrifugation, 分析型超速离心
- Bp: base pair, 碱基对
- NV: Norwalk Virus, 诺瓦克病毒
- DLS: Dynamic Light Scattering, 动态光散射
- DNA: Deoxyribonucleic Acid, 脱氧核糖核酸
- ELISA: Enzyme-linked ImmunoSorbant Assay, 酶联免疫吸附测定
- GAM-AP: 标记碱性磷酸酶的羊抗鼠抗体
- GAM-HRP: 标记辣根过氧化物酶的羊抗鼠抗体
- GFP: Green Fluorescent Protein, 绿色荧光蛋白
- HPLC: High Performance Liquid Chromatography, 高效液相色谱
- HEV: Hepatitis E virus, 戊型肝炎病毒
- HRP: Horseradish Peroxidase, 辣根过氧化物酶
- Kan: Kanamycin, 卡那霉素
- KDa: kilo Daltons, 千道尔顿
- Mab: monoclonal antibody, 单克隆抗体
- ORF: Open Reading Frame, 开放阅读框
- RNA: Ribonucleic Acid, 核糖核酸
- mRNA: Messenger RNA, 信使 RNA
- DEAE FF: DEAE Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow, 阴离子交换层析介质
- SV: Sedimentation Velocity, 沉降速度
- TEM: Transmission Electron Microscopy, 透射电子显微镜
- VLPs: Virus-Like Particle(s), 病毒样颗粒
- pH: hydrogen ion concentration, 氢离子浓度指数
- IEM: immuno-electron microscopy, 免疫电镜
- cryo-EM: cryo-electron microscopy, 低温电镜



## 目录

|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| 摘要.....                         | I         |
| Abstract.....                   | III       |
| 缩略词.....                        | V         |
| 前言.....                         | 1         |
| <b>1 HEV 简介.....</b>            | <b>1</b>  |
| 1.1 天然 HEV 的结构.....             | 1         |
| 1.2 HEV 基因组及编码蛋白研究.....         | 1         |
| 1.3 HEV 的分类.....                | 4         |
| 1.4 HEV 的流行病学.....              | 4         |
| 1.5 HEV 的细胞培养与感染模型.....         | 5         |
| <b>2. HEV 衣壳结构与组装的研究.....</b>   | <b>7</b>  |
| 2.1 HEV 衣壳蛋白二聚体的研究.....         | 7         |
| 2.2 HEV T=1 VLP 的研究进展.....      | 9         |
| 2.3 HEV T=3 VLP 的研究进展.....      | 11        |
| 2.4 其它 HEV 颗粒的研究.....           | 15        |
| <b>3. 病毒衣壳蛋白组装的基本要素和方法.....</b> | <b>17</b> |
| 3.1 蛋白质体外折叠的机制.....             | 17        |
| 3.2 病毒衣壳蛋白组装的基本要素.....          | 18        |
| 3.3 病毒衣壳蛋白组装的策略.....            | 20        |
| 3.4 蛋白质正确折叠的影响因素.....           | 21        |
| <b>4.本研究的目的是、思路和意义.....</b>     | <b>23</b> |
| <b>材料与方法.....</b>               | <b>25</b> |
| <b>1.材料.....</b>                | <b>25</b> |
| 1.1 主要仪器.....                   | 25        |
| 1.2 主要试剂与材料.....                | 26        |
| 1.3 常用溶液及培养基配制.....             | 28        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2 方法 .....</b>  | <b>32</b> |
| 2.1 分子克隆相关生物学实验方法.....   | 32        |
| 2.2 重组蛋白质的诱导表达和纯化方法.....   | 35        |
| 2.3 动物免疫实验方法.....  | 43        |
| 2.4 细胞的培养.....   | 43        |
| <b>结果与分析 .....</b>   | <b>45</b> |
| <b>第一部分：p495 蛋白及其突变蛋白在大肠杆菌中的表达纯化和颗粒组装研究.....</b>                       | <b>45</b> |
| 1. p495 蛋白及其突变蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达 .....                                     | 45        |
| 2. p495 蛋白及其突变蛋白的纯化 .....  | 49        |
| 3. p495 及 p495-A188V、p495-P284L、p495-T335A 蛋白组装成病毒样颗粒方<br>法的初步研究 ..... | 54        |
| 4. 第一部分小结 .....  | 55        |
| <b>第二部分：p495-P284L 蛋白颗粒组装方法的研究.....</b>                                | <b>56</b> |
| 1. p495-P284L 蛋白在不同 NaCl 浓度下的组装研究.....                                 | 56        |
| 2. p495-P284L 蛋白在不同 pH 溶液中的组装研究 .....                                  | 57        |
| 3. p495-P284L 蛋白组装受不同温度影响的分析.....                                      | 57        |
| 4. p495-P284L 蛋白组装受不同浓度的磷酸盐溶液影响的分析.....                                | 58        |
| 5. p495-P284L VLPs 的颗粒性分析 .....  | 59        |
| 6. 第二部分小结 .....  | 60        |
| <b>第三部分：p495-P284L VLPs 的性质研究及构建 HEV 假病毒的初步尝试.....</b>                 | <b>61</b> |
| 1. p495-P284L VLPs 的免疫反应性分析 .....                                      | 61        |
| 2. p495-P284L VLPs 免疫原性分析 .....  | 63        |
| 3. p495-P284L VLPs 细胞吸附能力的分析 .....                                     | 65        |
| 4. HEV 假病毒的研究.....   | 66        |
| 5. 第三部分小结 .....  | 69        |
| <b>讨论.....</b>   | <b>70</b> |
| 1.原核表达系统及可溶表达策略的选择 .....   | 70        |
| 2. p495 蛋白中影响可溶性表达的关键位点的发现 .....                                       | 70        |
| 3. p495 蛋白纯化工艺的探索 .....  | 70        |

|  |    |
|--|----|
| 4. p495-P284L 蛋白颗粒组装方法的研究及其潜在的改进策略.....  | 71 |
| 5. 可能影响 p495 蛋白颗粒组装的关键位点 .....           | 72 |
| 6. p495-P284L N 端延伸体蛋白在促进颗粒组装方面的可行性..... | 72 |
| 7. p495-P284L VLPs 与 p239VLPs 的对比.....   | 73 |
| 8. HEV 假病毒未来的研究方法.....                   | 73 |
| 小结与展望 .....                              | 75 |
| 参考文献 .....                               | 76 |
| 致 谢.....                                 | 84 |
| 附录.....                                  | 85 |

## Table of Contents

|   |            |
|---|------------|
| <b>Abstract in Chinses</b> .....                                      | <b>I</b>   |
| <b>Abstract in English</b> .....                                      | <b>III</b> |
| <b>Abbreviations</b> .....  | <b>V</b>   |
| <b>Chapter 1:Preface</b> .....  | <b>1</b>   |
| <b>1. Introduction of HEV</b> .....                                   | <b>1</b>   |
| 1.1 Structure of native HEV.....                                      | 1          |
| 1.2 Genome and encoding protein of HEV.....                           | 1          |
| 1.3 HEV types.....  | 4          |
| 1.4 Epidemiology of HEV .....   | 4          |
| 1.5 Cell culture system and cellular attachment model of HEV.....     | 5          |
| <b>2. Structure of HEV capsid protein and its VLPs assembly</b> ..... | <b>7</b>   |
| 2.1 Dimer of HEV capsid.....  | 7          |
| 2.2 Research of HEV T=1 VLPs assembly .....                           | 9          |
| 2.3 Research of HEV T=3 VLPs assembly.....                            | 11         |
| 2.4 Other HEV VLPs .....  | 15         |
| <b>3. Assembly basis and methods of capsid protein</b> .....          | <b>17</b>  |
| 3.1 Folding mechanism in vitro of protein.....                        | 17         |
| 3.2 Basis of capsid protein assembly .....                            | 18         |
| 3.3 Strategy of capsid protein assembly .....                         | 20         |
| 3.4 Factors affecting the protein assembly.....                       | 21         |
| <b>4. The purpose and meaning of this research</b> .....              | <b>23</b>  |
| <b>Chapter 2:Materials and Methods</b> .....                          | <b>25</b>  |
| <b>1. Materials</b> .....   | <b>25</b>  |
| 1.1 Instrument .....  | 25         |
| 1.2 Meterials and Reagents .....                                      | 26         |
| 1.3 Common solution and culture medium.....                           | 28         |
| <b>2. Methods</b> .....   | <b>32</b>  |
| 2.1 Molecular cloning related methods.....                            | 32         |
| 2.2 Protein expression and purification methods.....                  | 35         |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.3 Methods for animal immunization.....   | 43        |
| 2.4 Cell culture.....  | 43        |
| <b>Chapter 3: Results and Analysis .....</b>                                       | <b>45</b> |
| <b>Part 1: Expression , purification and assembly of p495 and its mutants.....</b> | <b>45</b> |
| 1.Vector construction and expression of p495 and its mutants.....                  | 45        |
| 2. Purification of recombinant p495 and its mutants .....                          | 49        |
| 3. Research of p495 and its mutants assembly .....                                 | 54        |
| 4. Summary of Part 1 .....   | 55        |
| <b>Part 2: Research of methods for p495-P284L assembly .....</b>                   | <b>56</b> |
| 1. NaCl in different concentrations analysis of p495-P284L assembly .....          | 56        |
| 2. Buffer in different pH analysis of p495-P284L assembly .....                    | 57        |
| 3. Different temperature analysis of p495-P284L assembly.....                      | 57        |
| 4. PB in different concentrations analysis of p495-P284L assembly .....            | 58        |
| 5. The characterization of the 495-P284L particles .....                           | 59        |
| 6. Summary of Part 2.....  | 60        |
| <b>Part 3: Activity of p495-P284LVLPs and preparation of HEVpseudovirus .....</b>  | <b>61</b> |
| 1. Immunoreactivity analysis of p495-P284L VLPs.....                               | 61        |
| 2. Immunogenicity research of p495-P284L VLPs .....                                | 63        |
| 3. Cellular attachment ability research of p495-P284L VLPs .....                   | 65        |
| 4. Research of HEV pseudovirus .....   | 66        |
| 5. Summary of Part 3.....  | 69        |
| <b>Discussion.....</b>   | <b>70</b> |
| <b>Summary and prospect .....</b>  | <b>75</b> |
| <b>Reference.....</b>  | <b>76</b> |
| <b>Acknowledgment.....</b>   | <b>84</b> |
| <b>Appendix.....</b>   | <b>85</b> |

## 前言

### 1 HEV 简介

戊型肝炎，又称戊肝，是一种由戊型肝炎病毒引起的经粪口途径传播的急性肝炎，病死率较高（1~3%），孕妇感染病死率可高达20%，妊娠晚期者致死率则更高达56%<sup>[1, 2]</sup>。起初，人们将其定义为非甲非乙型肝炎，直到二十世纪九十年代，人们才克隆到HEV全基因组<sup>[3-5]</sup>。由于戊型肝炎是一种人畜共患病，已引起人们的普遍关注<sup>[6]</sup>。

#### 1.1 天然 HEV 的结构

天然 HEV 为球状颗粒，直径约 27-34nm。1983 年，Balayan 等首次利用免疫电镜（immuno-electron microscopy, IEM）观察到戊肝病毒（如图 1），天然 HEV 有实心 and 空心两种颗粒<sup>[7]</sup>。进一步研究发现 HEV 为表面有裂痕的 T=3 的二十面体颗粒，梯度甘油-酒石酸钾浮密度为 1.29 g/cm<sup>3</sup>，沉降系数为 183S<sup>[8]</sup>，空心颗粒则为 165S<sup>[9]</sup>。HEV 主要存在于小肠，表明其在酸性和弱碱性环境中较稳定<sup>[10]</sup>。

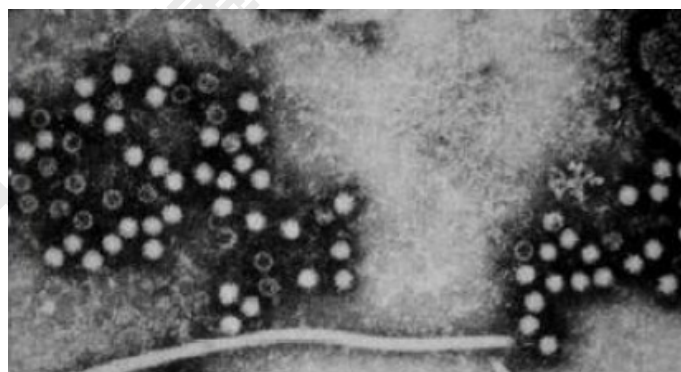


图 1 利用免疫电镜观察 HEV 天然病毒颗粒

Fig.1 Native HEV particles visualized by IEM

(quoted from Centers for Disease Control and Prevention(CDC), Atlanta, USA)

#### 1.2 HEV 基因组及编码蛋白的研究

HEV 基因组为全长约 7.2kb 的线性单链正义 RNA，是一种无包膜正二十面

体的病毒。通过分析来自缅甸、巴基斯坦、中国和墨西哥四个不同地区获得的分离株<sup>[11-13]</sup>，Tam 等于 1991 年首次报道其全基因序列（如图 2）。其基因组包含 3 个开放性读码框（ORF），并且有 3' 端长 poly (A) 尾巴结构和 5' 端含帽结构。

ORF1 位于基因组 5' 端。其编码的肽段序列上含有一个甲基转移酶、蛋白酶、解旋酶及一个 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的保守区，表明其编码病毒所需的如病毒复制和蛋白加工等非结构蛋白<sup>[14-16]</sup>。

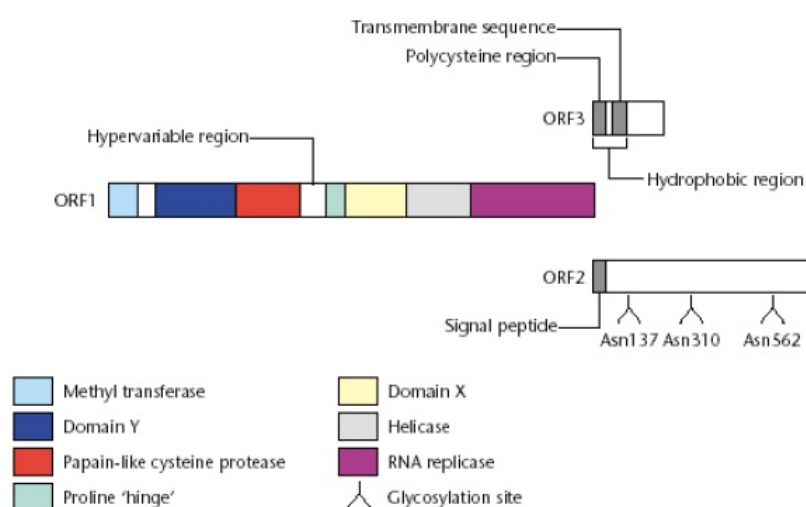


图 2 戊型肝炎病毒的基因组组织结构

Fig.2 Genomic organization of HEV

(quoted from encyclopedia in Nature)

目前对戊肝病毒的研究多数集中于ORF2及其编码的蛋白上，其位于基因组RNA的3'端，全长1980bp，编码660个氨基酸的蛋白（pORF2）。pORF2为HEV的主要结构蛋白，形成病毒衣壳。其N端包含一个精氨酸富集区域，含有典型的信号识别序列。研究认为，大量正电荷富集于此可以使病毒复制时将RNA包裹于其衣壳内。另外，ORF2上含有三个N端糖基化位点，但这种糖基化修饰的生物相关性目前尚不清楚。

ORF2基因的转录翻译后，经过信号肽剪切熟化，产生大小为74kDa的pORF2蛋白，并在内质网发生糖基化形成糖蛋白（gpORF2），研究发现pORF2进入内

质网是蛋白细胞膜表面定位所需的<sup>[17]</sup>。利用动物细胞进行表达的ORF2基因产物为pORF2和~88kDa的gpORF2<sup>[18]</sup>，一般认为非糖基化的pORF2蛋白参与病毒衣壳组装<sup>[19]</sup>。肽扫描分析认为，pORF2的394-470和546-580残基是两个免疫显性区，即使是来自不同地区的绝大多数不同遗传的HEV分离株，这两个区域的序列均呈高度保守性<sup>[20, 21]</sup>。目前已发现多个ORF2 编码的重组蛋白具有免疫保护作用，表明ORF2 编码的蛋白存在着重要的中和表位<sup>[22-24]</sup>。现有研究结果表明HEV 的主要中和表位区域集中于ORF2 所编码蛋白的aa459~606 之间，并且也是主要介导HEV与嗜性细胞吸附的区域<sup>[25, 26]</sup>。

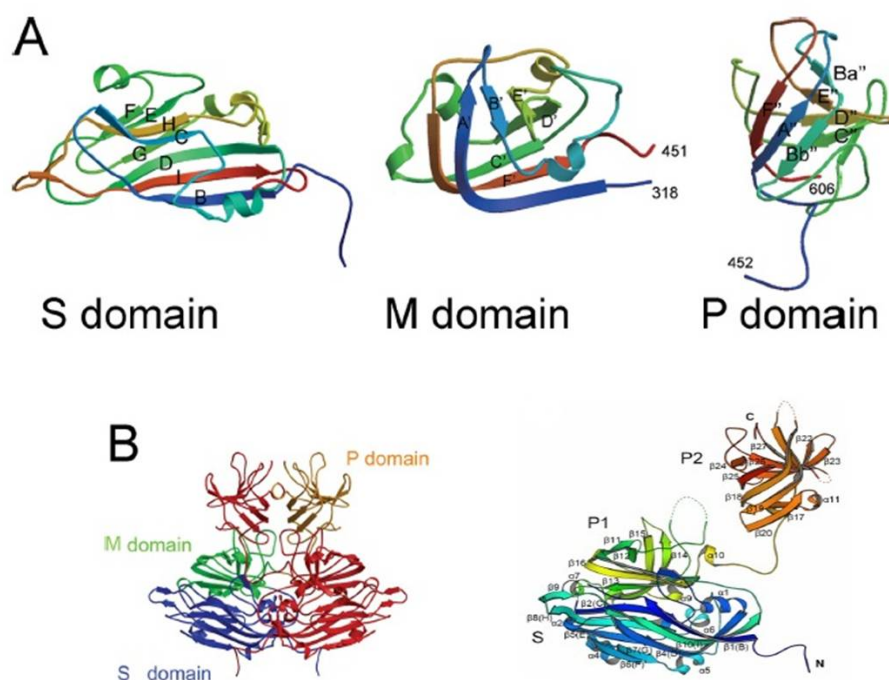


图3 HEV基因1的PORF2蛋白结构图<sup>[27, 28]</sup>

Fig.3 The structure of genotype-1 pORF2 protein

(A) Ribbon representations of S, M, and P. The structure is covered from blue (N terminus of the domain) to red (C terminus of the domain). (B) Dimer structure of the capsid protein. One subunit is colored red, and the other subunit is colored according to its domain structure (blue, S domain; green, M domain; orange, P domain).



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.

廈門大學博碩士論文摘要庫