

不同基因型戊型肝炎病毒存在多种类型抗原表位

邓 蕾¹ 孟继鸿^{1*} 赵 宇¹ 张红梅¹ 戴 星²

(东南大学¹ 基础医学院病原生物学与免疫学系² 医学院附属中大医院皮肤科 南京 210009)

摘 要:以戊型肝炎病毒(HEV)ORF2 重组蛋白 p166Us 为免疫原制备单克隆抗体(McAbs),采用间接 ELISA 和免疫印迹法检测 McAbs 与不同基因型和亚型 HEV 重组蛋白 p166Bur(Ⅰa 型)、p166Pak(Ⅰb 型)、p166Mor(Ⅰc 型)、p166Mex(Ⅱ型)、p166U(Ⅲ型)、p166N(猪 HEV,Ⅲ型)和 p166Chr(Ⅳ型)的反应性,采用抗原或抗体竞争 ELISA 分析 p166 蛋白与天然 HEV 颗粒之间抗原表位的关系。结果获得 4D₃、2E₃、11E₁₁、12H₅、3A₃ 和 1F₁ 6 株稳定分泌 McAbs 的杂交瘤细胞株。4D₃ 分泌的 McAb 与 7 种 p166 均发生反应,其与免疫原 p166Us 的结合可被Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ或Ⅳ型天然 HEV 颗粒或病人血清竞争抑制。2E₃、11E₁₁ 和 12H₅ 分泌的 McAbs 只与 p166Us、p166Nz 和 p166Chn 发生反应,它们与 p166Us 的结合仅能被Ⅲ和Ⅳ型病毒或血清所抑制。3A₃ 分泌的 McAb 只与 p166Us 及 p166Nz 结合,1F₁ 分泌的 McAb 只与 p166Us 结合,两者均能被Ⅲ型美国株竞争抑制,而Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ型不能抑制它们与 p166Us 的结合。由此可见,不同基因型和亚型 HEV ORF2 编码蛋白 p166 上存在多种类型抗原表位,其中包括Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ基因型共同的,Ⅲ、Ⅳ基因型共有的和Ⅲ基因型特异的等,这些表位与天然 HEV 颗粒上的抗原表位具有相同的免疫学特征。

关键词:戊型肝炎病毒;抗原表位;单克隆抗体;重组蛋白;基因型

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2006)01-0120-07

戊型肝炎(HE)是由戊型肝炎病毒(Hepatitis E Virus, HEV)引起的一种经消化道传播的急性传染性肝炎,呈全球分布,以暴发流行或散发感染的形式存在^[1]。急性 HE 病情较重,病死率为 2.5%,而孕妇病死率可高达 15%~20%^[2]。HEV 基因组全长约 7.2kb,含有 3 个开放读码框架(ORF),其中 ORF2 编码病毒的衣壳蛋白。根据全基因组序列分析,HEV 在全球主要可分为 4 个基因型^[3]:Ⅰ型来自于亚洲和非洲,至少包括 3 个亚型,分别以缅甸株(Ⅰa 型)、巴基斯坦株(Ⅰb 型)和摩洛哥株(Ⅰc 型)为代表;Ⅱ型来自墨西哥;Ⅲ型来自美国,还包括部分猪 HEV^[4];Ⅳ型包括新近发现的 HEV 中国株、台湾株和部分日本株。

HEV 是一种 RNA 病毒,容易变异,不同 HEV 毒株在核苷酸和氨基酸水平的同源性高低不一,为诊断试剂和疫苗的研制带来一定的困难。有报道^[5]被 HEV Ⅰ型或/和Ⅱ型抗原制备的诊断试剂排除的部分急性非 HE 病人血清对 HEV Ⅳ型的多肽呈阳性反应。Meng 等^[6]的研究发现,HEV ORF2 基因编码的一段由 452~617 位氨基酸组成的重组蛋白(p166)含有 HEV 构型依赖性中和抗原表位。

当以不同基因型和亚型的 p166 对 HE 病人和实验感染动物血清进行抗体 ELISA 滴定时,发现血清抗体滴度的高低与所用抗原的基因型明显有关^[7],提示不同基因型 HEV 可能具有不同的抗原表位。因此,有必要对不同基因型 HEV 抗原表位的差异进行深入研究。我们曾通过制备单克隆抗体(McAbs)进行抗原表位分析,发现 HEV 第Ⅰ基因型重组蛋白(p166Bur)和第Ⅱ基因型重组蛋白(p166Mex)既含有 HEV 共同的抗原表位,又含有基因型特异性的抗原表位^[8,9],提示 HEV 第Ⅲ、Ⅳ基因型的重组蛋白中也可能含有不同于第Ⅰ、Ⅱ基因型的抗原表位。为此,本文采用代表 HEV 第Ⅲ基因型的美国株 p166Us 为免疫原,制备抗-p166Us 的 McAbs,进一步分析不同基因型 HEV 重组蛋白 p166 的抗原表位特点,并探索基因工程表达的重组蛋白与天然 HEV 颗粒之间抗原表位的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和粪便标本:大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 菌株为 Promega 公司产品。缅甸株、墨西哥株

基金项目:国家自然科学基金(30271231、30271212);江苏省自然科学基金(BK2002053);江苏省卫生厅医学科技发展基金(H200115);教育部留学回国人员科研启动基金(2004176)

* 通讯作者。Tel: 86-25-83272454; Fax: 86-25-83324887; E-mail: jihongmeng@263.net

作者简介:邓 蕾(1972-),女,江苏南京人,硕士研究生,主要从事肝炎病毒免疫学研究。E-mail: szwam@nuaa.edu.cn

收稿日期:2005-04-25;接受日期:2005-07-05;修回日期:2005-08-02

和中国株 HEV 攻击后的猕猴带毒粪便标本及正常猕猴粪便标本均由美国国家疾病预防控制中心(CDC)肝炎部及法国巴斯德研究所惠赠,本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:Glutathione-Sepharose 4B 亲和层析柱为 Pharmacia 公司产品;HAT 培养液购自 Gibco 公司;HRP 标记兔抗鼠 IgG 亚类抗体及兔抗鼠 IgM 抗体购自 Pierce 公司;其它试剂均为国产或进口分析纯试剂。酶标仪、电泳仪均为 Bio-Rad 公司产品;生物电泳图像分析仪为上海复日科技有限公司产品。

1.2 单克隆抗体的制备

1.2.1 抗原:用基因型特异性引物分别扩增 HEV 缅甸株(Bur82)、巴基斯坦株(Sar55)、摩洛哥株(Morocco)、墨西哥株(Mexican)、美国株(US1)、新西兰猪株(Nz)和中国株(NJ703)编码 ORF2 C 端第 452~617 位氨基酸的基因片段,插入 pGEX-4T-2 载体(Pharmacia 产品)构建重组质粒,转化大肠杆菌(*E. coli*)JM109 菌株,表达 GST-ORF2 融合蛋白,经 Glutathione-Sepharose 4B 亲和层析纯化,得到 7 种代表 HEV 不同基因型和亚型的重组蛋白,分别命名为 p166Bur(缅甸株)、p166Pak(巴基斯坦株)、p166Mor(摩洛哥株)、p166Mex(墨西哥株)、p166Us(美国株)、p166Nz(新西兰猪株)和 p166Chr(中国株)。

1.2.2 动物免疫和细胞融合:采用常规方法,以 p166Us 免疫 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠,末次免疫后 3d 摘除眼球放血处死小鼠,收集血液,分离血清作为 ELISA 检测的阳性对照。无菌操作取其免疫脾细胞在 PEG4000 作用下与骨髓瘤细胞 SP2/0 以 10:1 的比例融合,加入已制备有饲养细胞的 96 孔板,以含 20% 小牛血清的 HAT 培养液,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中选择培养。

1.2.3 杂交瘤细胞株的建立:用所免疫的 p166Us 重组蛋白包被酶标反应板,GST 包被酶标反应板作为对照。采用间接 ELISA 法检测,TMB 底物显色,测定 A₄₅₀ 吸光度值,P/N ≥ 2.1 者为 ELISA 阳性。杂交瘤筛选时,凡 p166Us 阳性,同时 GST 阴性者,为 McAb 阳性孔。阳性孔用有限稀释法亚克隆 2~3 次,至 100% 培养孔阳性,即建立分泌 McAb 的杂交瘤细胞株。采用制备腹水和培养瓶直立培养法大量制备 McAbs。离心取上清,置 -20℃ 保存。

1.2.4 McAbs 效价检测及其免疫球蛋白(Ig)类别的鉴定:收集小鼠腹水经倍比稀释后用 ELISA 法检测抗体效价。同时以 HRP 标记的兔抗鼠 IgG 亚类抗

体及兔抗鼠 IgM 抗体为二抗,采用间接 ELISA 法鉴定 McAbs 的 Ig 类别。

1.3 HEV 重组蛋白抗原表位的分析

1.3.1 计算机辅助的序列分析:选取 GenBank 中已经登录的 39 株 HEV(登录号见表 1,其中中国株 NJ703 为基因型 IV 型,由本实验室自行分离鉴定,经测序证实)ORF2 C 端第 452~617 位氨基酸的基因组序列,使用 LASERGENE 计算机软件系统(DNASTAR, Inc., 美国 Wisconsin)的 MegAlign Program 和 PHYLIP 软件包,进行计算机辅助序列比对分析。

1.3.2 ELISA 检测:用 7 种不同 HEV 基因型和亚型的 p166 重组蛋白分别包被酶标反应板(30ng/孔),加入杂交瘤细胞的培养上清,经 37℃ 孵育 40min、PBST 洗涤后,加入 1:10000 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体,再经 37℃ 孵育 40min、洗涤后,加入底物 TMB 显色,采用酶标仪测定 A₄₅₀ 值,P/N ≥ 2.1 者为阳性,从而确定 McAbs 对不同 p166 重组蛋白上抗原表位的反应性。

1.3.3 Western blot 检测:样品为 7 种不同基因型 p166 的纯化蛋白,经 SDS-PAGE 后转移至硝酸纤维素膜进行杂交,一抗为不同杂交瘤细胞的小鼠腹水,二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体,DAB(二氨基联苯胺)显色,比较不同 McAbs 与不同基因型 p166 重组蛋白的反应性。

1.4 重组蛋白 p166 与天然 HEV 颗粒之间抗原表位关系的分析

1.4.1 抗原竞争 ELISA:以不同类型 McAbs(培养上清)各 50μL 分别与缅甸株、墨西哥株和中国株 HEV 攻击后的猕猴带毒粪便悬液,以及正常猕猴粪便悬液(阴性对照)和 PBS(空白对照)各 50μL 于 1.5mL 离心管中 37℃ 混合孵育 1h 后,离心取其上清分别加入预先以 p166Us 包被的酶标反应板中,37℃ 孵育、洗涤,加入 1:10000 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体,再经 37℃ 孵育、洗涤后,底物 TMB 显色,酶标仪测定 A₄₅₀ 值。抑制率 = (阴性对照 A₄₅₀ - 检测标本 A₄₅₀) / 阴性对照 A₄₅₀ × 100%,抑制率 ≥ 50% 判为阳性。

1.4.2 抗体竞争 ELISA:先以经 RT-PCR 检测证实为美国株 HEV RNA(+) 的病人血清、中国株 HEV RNA(+) 的病人血清,以及正常人血清(均以 1:5 稀释)和 PBS(空白对照)各 100μL 分别加入由 p166Us 包被的酶标反应板中,37℃ 孵育、洗涤;再以不同类型 McAbs 各 100μL 分别加入上述酶标反应板中:

37℃孵育、洗涤后加入 1:10000 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 ,经孵育、洗涤 ,底物 TMB 显色 ,酶标仪测定 A_{450} 值。抑制率公式同上 ,以 $\geq 50\%$ 判为阳性。

表 1 不同基因型 HEV p166 序列内氨基酸残基的基因型相关性变化

Table 1 Genotype-associated change of amino acid residuals within the sequence of p166 of different genotypes of hepatitis E virus

Genotype	Sequence name	GenBank accession number	Genotype-associated changes of amino acid residuals at different sites within the sequence of p166															
			32	39	41	46	58	60	76	84	86	129	136	139	142	148	158	163
I	Bur82	M73218	S	G	V	S	A	A	S	T	F	A	S	A	V	A	L	L
	Bur86	D10330	S	A	V	S	A	A	S	T	F	A	S	A	V	A	L	L
	Yam67	AF459438	S	G	V	S	A	A	S	T	F	A	S	A	V	A	L	L
	Hyderabad	AF076239	S	G	V	S	A	A	S	I	F	A	S	A	V	A	L	L
	TK15-92	AF051830	S	G	V	S	A	A	S	T	F	A	S	A	V	A	L	L
	Madras	X99441	S	G	V	S	A	A	S	T	F	A	S	A	V	A	L	L
	Abb-2B	AF185822	S	G	V	S	A	A	S	T	F	A	S	A	V	A	L	L
	Sar55	M80581	S	G	V	S	A	A	S	T	F	A	S	A	V	A	L	M
	pSK-2	AF444002	S	G	V	S	A	A	S	T	F	A	S	A	V	A	L	M
	KS2-87	L25595	S	G	V	S	A	A	S	T	F	A	S	A	V	A	L	M
	Hetian88	D11092	S	G	V	S	A	A	S	T	F	A	S	A	V	A	L	M
	Uchida	D11093	S	G	V	S	A	A	S	T	F	A	S	A	V	A	L	M
	Hetian87	L08816	S	G	V	S	A	A	S	T	F	A	S	A	V	A	L	M
	Morocco	AY230202	S	G	V	S	A	A	S	T	F	A	S	A	V	A	L	L
	T3-Chad	AY204877	S	G	V	S	A	A	S	T	F	A	S	A	V	A	L	L
	Fulm	X98292	S	G	V	S	A	A	S	T	F	A	S	A	V	A	L	M
II	Mexican	M74506	S	G	V	S	A	A	P	T	F	A	R	A	V	A	L	F
III	US1	AF060668	T	N	M	T	A	A	T	K	Y	A	S	A	T	G	V	V
	Nz	AF200704	T	N	M	T	A	A	T	T	Y	A	S	A	V	G	I	V
	US2	AF060669	T	N	M	T	A	A	T	T	Y	A	S	A	T	G	V	I
	Swine	AF082843	T	N	M	T	A	A	T	T	Y	A	S	A	T	G	V	V
	JKN-Sap	AB074918	T	N	M	T	A	A	T	T	Y	A	S	A	T	G	V	V
	JMY-Haw	AB074920	T	N	M	T	A	A	T	T	Y	A	S	A	T	G	A	V
	HE-JA10	AB089824	T	N	M	T	A	A	T	T	Y	A	S	A	T	G	V	V
	JRA1	AF003430	T	N	M	T	A	A	T	T	Y	A	S	A	T	G	V	A
	JJT-Kan	AB091394	T	N	M	T	A	A	T	T	Y	A	S	A	T	G	V	A
	swJ570	AB073912	T	N	M	T	A	A	T	T	Y	A	S	A	T	G	V	V
	swArkell	AY115488	T	N	M	T	A	A	T	T	Y	A	S	A	T	G	V	V
	Osh-205	AF455784	T	N	M	T	A	A	T	T	Y	A	S	A	V	G	A	I
IV	T1-China	AJ272108	T	N	M	T	G	S	T	T	Y	C	N	S	V	G	A	A
	HE-JK4	AB099347	T	N	M	T	G	S	T	T	F	C	N	S	V	G	A	V
	JSN-Sap	AB091395	T	N	M	T	G	S	T	T	F	C	N	S	V	G	A	V
	HE-JA1	AB097812	T	N	M	T	G	S	T	T	F	C	N	S	V	G	A	V
	swJ13-1	AB097811	T	N	M	T	G	S	T	T	F	C	N	S	V	G	A	V
	HE-JI4	AB080575	T	N	M	T	G	S	T	T	F	C	N	S	V	G	A	V
	JAK-Sai	AB074915	T	N	M	T	G	S	T	T	F	C	N	S	V	G	A	V
	JKK-Sap	AB074917	T	N	M	T	G	S	M	T	F	C	N	S	V	G	A	V
	Changchun	AB108537	T	N	M	T	G	S	M	T	F	C	N	S	V	G	A	V
	NJ703	AY789220	T	N	M	T	G	S	T	T	Y	C	N	S	V	G	A	V

2 结果

2.1 单克隆抗体的鉴定

获得 6 株稳定分泌 McAbs 的杂交瘤细胞株 ,命名为 4D₃、2E₃、11E₁₁、12H₅、3A₃ 和 1F₁。所分泌的抗体用免疫原 p166Us 检测均为阳性 ,GST 检测均阴

性 ,说明所制备的 McAbs 是针对 HEV 基因编码蛋白的特异性抗体。经 Ig 类别鉴定 ,确定 4D₃、2E₃、11E₁₁、12H₅、和 3A₃ 均为 IgG1 ,1F₁ 为 IgG2a。经 ELISA 测定 6 株杂交瘤细胞株所制备腹水的抗体效价分别是 :4D₃ 为 1:10⁻⁵ ,2E₃、11E₁₁、12H₅ 和 3A₃ 均为 1:10⁻⁶ ,1F₁ 为 1:10⁻³。

2.2 不同基因型 HEV p166 重组蛋白抗原表位的分析

采用不同基因型的 p166 重组蛋白作为包被抗原进行 ELISA 检测(表 2)。6 株杂交瘤细胞株中, 4D₃ 分泌的 McAb 能与 7 种不同基因型 HEV 的 p166 重组蛋白均发生阳性反应; 2E₃、11E₁₁、12H₅ 分泌的 McAbs 只能与第Ⅲ、Ⅳ基因型的 p166Us、p166Nz 及

p166Chn 结合,而与第Ⅰ、Ⅱ基因型的 p166 重组蛋白不发生交叉反应; 3A₃ 分泌的 McAb 只能与第Ⅲ基因型的 p166Us 和 p166Nz 结合,而 1F₁ 分泌的 McAb 只能与 p166Us 结合,与其它 6 种 p166 均不反应。提示不同基因型 p166 重组蛋白中存在多种类型的抗原表位,其中包括Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ基因型共同的,Ⅲ、Ⅳ基因型共有的和第Ⅲ基因型特异的等抗原表位。

表 2 抗-p166Us McAbs 与 7 种不同基因型 p166 重组蛋白的免疫反应性
Table 2 Immunoreactivity of anti-p166Us monoclonal antibodies to p166 recombinant proteins of different HEV genotypes

HEV recombinant proteins	Reactivity of the McAbs to p166s(P/N values)*					
	4D ₃	2E ₃	11E ₁₁	12H ₅	3A ₃	1F ₁
p166Bur	10.21	0.58	0.58	0.53	0.49	0.41
p166Pak	10.53	1.23	1.19	1.02	0.45	0.37
p166Mor	9.02	0.91	0.71	0.73	0.33	0.29
p166Mex	10.86	0.83	0.36	0.45	0.41	0.29
p166Us	12.17	12.74	15.39	16.34	13.69	9.34
p166Nz	12.79	6.68	6.87	5.96	4.68	0.38
p166Chn	10.48	4.72	10.71	5.43	0.49	0.49

* P/N ≥2.1 as positive.

根据 p166 重组蛋白的氨基酸残基数目,其分子量约为 44kDa。SDS-PAGE 凝胶中的 p166 经电转移至硝酸纤维素膜后,利用 4D₃ 腹水进行 Western blot 检测,在 7 种 p166 中均出现 1 条特异性 44kDa 棕色条带(图 1-A);利用 2E₃ 腹水进行检测,仅在第Ⅲ、Ⅳ基因型编码的 p166 重组蛋白(p166Us、p166Nz 和 p166Chn)泳道出现 1 条特异性 44kDa 棕色条带(图 1-B);而 3A₃ 株 McAb 仅在 p166Us 和 p166Nz 泳道分子量 44kDa 位置出现特异性棕色反应条带(图 1-C);1F₁ 株 McAb 则仅在 p166Us 泳道分子量 44kDa 位置出现特异性棕色反应条带,而其它泳道均无特异条带出现(图 1-D)。Western blot 的反应性与上述 ELISA 检测结果完全一致,进一步证明了不同基因型 p166 重组蛋白抗原表位的多样性。

计算机辅助的序列分析显示,39 株 HEV(涵盖 HEV 4 个不同基因型)在 p166 重组蛋白区段的氨基酸序列的同源性为 86.1% ~ 96.4%,明显高于其核苷酸序列的同源性(72.9% ~ 79.1%)。其中第Ⅲ基因型内各 HEV 株 p166 间氨基酸同源性为 95.8% ~ 100%,遗传距离为 0.0350 ~ 0.2704;第Ⅲ与第Ⅰ、Ⅱ基因型 p166 之间的氨基酸同源性相对较低,为 88.0% ~ 92.2%,遗传距离为 0.2331 ~ 0.3344;而第Ⅲ与第Ⅳ基因型 p166 的氨基酸同源性明显高于前者,为 93.4% ~ 96.4%,遗传距离为 0.1985 ~ 0.3219。由此可见,同源性比较与上述不同基因型 p166 抗原表位的分析结果相吻合。

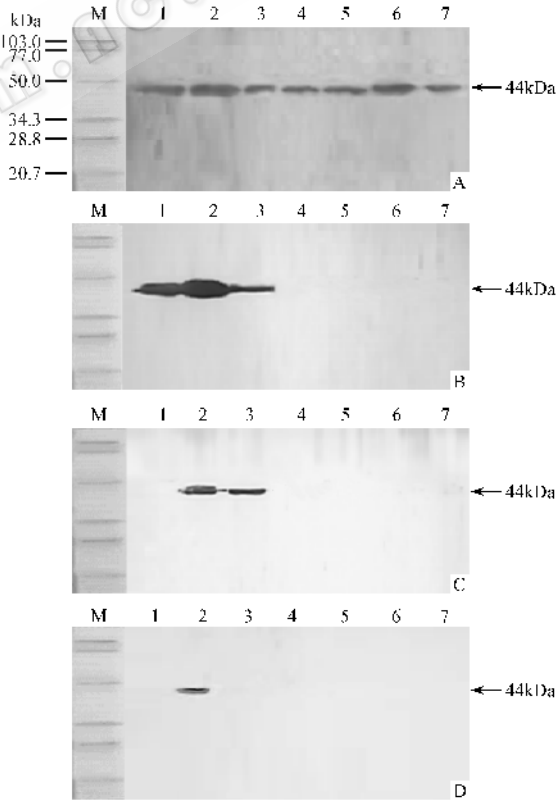


图 1 McAb(4D₃、2E₃、3A₃ 和 1F₁)与 7 种不同基因型 p166 重组蛋白的免疫印迹反应
Fig.1 Western blot reactivity of monoclonal antibody(4D₃ ,2E₃ ,3A₃ , 1F₁) to p166 recombinant proteins of different HEV genotypes
A :4D₃ ; B :2E₃ ; C :3A₃ ; D :1F₁ .
M. Prestained protein molecular weight standards ; 1. p166Chn ; 2. p166Us ; 3. p166Nz ; 4. p166Mex ; 5. p166Mor ; 6. p166Bur ; 7. p166Pak .

进一步比较 39 株 HEV p166 区段的氨基酸序列 (表 1) 可以发现, 在第 32、39、41、46、76、148 和 163 等位点上, 第Ⅲ基因型和第Ⅳ基因型 HEV p166 的氨基酸残基基本相同, 第Ⅰ基因型和第Ⅱ基因型 HEV p166 的氨基酸残基也基本相同, 但Ⅲ、Ⅳ和Ⅰ、Ⅱ两者之间, 这些位点的氨基酸残基则绝然不同, 可能构成了两者之间抗原表位差异的结构基础。在第 58、60、86、129、136、139、142 和 158 等位点处, 第Ⅲ基因型与第Ⅳ基因型之间氨基酸残基大多又有特征性的变化, 这些残基可能参与Ⅲ、Ⅳ基因型不同抗原表位的构成。p166Us 和 p166Nz 同属第Ⅲ基因型, 但 p166Us 的第 84 位有一独特的赖氨酸残基(K)突变 (表 1), 而 p166Nz 在第 2、142、144、158 和 166 等位点处的氨基酸残基与大多Ⅲ型 HEV 毒株不同, 出现明显的变异, 这些变异可能使它们与 1F1 株 McAb 产生不同的反应性。

2.3 重组蛋白 p166 与天然 HEV 颗粒之间抗原表位的关系

抗原竞争 ELISA 的检测结果如表 3 所示。McAbs 2E₃、11E₁₁、12H₅ 与免疫原 p166Us 的结合能被中国株 HEV 所抑制, 而不能被缅甸株和墨西哥株 HEV 抑制; McAbs 3A₃ 和 1F₁ 与 p166Us 的结合不能被中国株、缅甸株或墨西哥株 HEV 抑制; 而 McAb 4D₃ 与 p166Us 的结合, 则可以被中国株、缅甸株和墨西哥株 HEV 中的任何一株所抑制。抗体竞争 ELISA 的结果如表 4 所示。抗 HEV-U_s 和抗 HEV-Chn IgG 阳性的病人血清均可以抑制 McAbs 2E₃、11E₁₁、12H₅ 和 4D₃ 与免疫原 p166Us 的结合; 而 McAbs 3A₃ 和 1F₁ 与 p166Us 的结合则能被抗 HEV-U_s 阳性的病人血清所抑制, 不能被抗 HEV-Chn 阳性的病人血清所抑制。由此可见, 竞争试验的结果与上述 McAbs 同各种不同基因型 p166 的反应情况一致, 说明 p166 上存在与天然 HEV 颗粒上相同或相似的抗原表位, 具有同样的免疫反应性。

表 3 不同基因型 HEV 毒株对 McAbs 与 p166Us 重组蛋白反应的竞争抑制作用

HEV strains	Competitive inhibition to the reactivity of the McAbs to p166Us*					
	2E ₃	11E ₁₁	12H ₅	3A ₃	1F ₁	4D ₃
Burma	0%	11.64%	29.67%	2.70%	3.28%	74.05%
Mexico	1.55%	0%	15.19%	11.63%	0%	50.48%
China	75.40%	88.20%	90.54%	5.61%	0%	54.09%

* Inhibition ≥50% as positive.

表 4 Ⅲ、Ⅳ基因型 HEV 感染病人阳性血清对 McAbs 与 p166Us 重组蛋白反应的竞争抑制作用

Table 4 Competitive inhibition of anti-HEV positive serum samples obtained from patients infected with genotype Ⅲ or Ⅳ of HEV to the reactivity of the monoclonal antibodies to p166Us recombinant protein

Anti-HEV positive serum	Competitive inhibition to the reactivity of the McAbs to p166Us*					
	2E ₃	11E ₁₁	12H ₅	3A ₃	1F ₁	4D ₃
US (Ⅲ)	67.43%	75.43%	77.23%	52.30%	57.03%	52.26%
China (Ⅳ)	71.09%	76.54%	68.46%	38.30%	15.17%	52.42%

* Inhibition ≥50% as positive.

3 讨论

HEV 是一种无包膜单股正链 RNA 病毒, 由于其成熟的细胞培养模型至今尚未建立, 因而目前多采用基因工程表达的重组蛋白或合成肽作为 HEV 特异性抗体检测的包被抗原以及作为免疫原制备 McAbs 和免疫血清。Mast 等^[10]通过对不同 HEV 抗体检测方法的比较, 发现以 HEV ORF2 编码蛋白作为已知抗原来检测未知抗体有较好的敏感性。另外

许多研究证实 ORF2 编码的衣壳蛋白上抗原表位数量多, 结构复杂, 其富含疏水区的 C 端 2/3 部分存在多个免疫优势 B 细胞表位, 包括能诱导中和抗体的抗原结合位点^[11]。Meng 等^[6,7]发现, p166 含有 HEV 中和抗原表位, 抗原性稳定, 用于检测 HE 病人血清和 HEV 实验感染的灵长类动物血清时, 均能查出高滴度的特异性抗体, 并且通过基于 PCR 的体外中和试验还证实 p166 可在不同基因型 HEV 之间诱导交叉中和反应, 可以替代 HEV 作为制备 McAbs 的理想

免疫原。本试验利用 p166Us 免疫小鼠,成功地制备出针对 HEV p166 重组蛋白的特异性 McAbs。同时证实此 McAbs 亦能被 HEV 感染后的猕猴带毒粪便悬液及 HEV 抗体阳性的病人血清所抑制,表明我们所研制的 McAbs 不仅是针对 HEV 重组蛋白的特异性抗体,而且能与天然的 HEV 产生特异的免疫反应,说明用基因工程技术表达的 p166 重组蛋白上的抗原表位可以模拟天然 HEV 颗粒上相应的表位结构,为 HEV 基因工程疫苗的研制和开发提供了科学依据。

本试验获得的 6 株杂交瘤细胞株中 4D₃ 株分泌的 McAb 与 7 种不同基因型和亚型的 p166 均能发生阳性反应,表明不同基因型 HEV 的 p166 含有共同的 B 细胞表位。所以 Zhou 等^[12]利用来自第 I 基因型的 Sar-55 株 HEV 上含中和抗原表位的 ORF2 编码多肽 C 端片段作为抗原,可以有效地检测出 4 种 HEV 基因型实验感染灵长类动物血清中的 HEV 抗体。也可以解释我们曾以 7 种 HEV p166 抗原分别检测来自世界各国和中国沈阳、南京等地区的 HE 病人血清和实验感染动物血清均呈阳性反应^[7]。2E₃、11E₁₁、12H₅ 株 McAbs 除与免疫原 p166U(Ⅲ型)反应外,还与 p166N(Ⅲ型)和 p166Chr(Ⅳ型)反应,但不与第 I、Ⅱ基因型的 p166 反应,为Ⅲ、Ⅳ基因型反应性 McAbs,说明Ⅲ、Ⅳ基因型含有与 I、Ⅱ基因型不同的共有抗原表位。巧合的是,我们在先前的研究^[8,9]中,也曾利用 McAb 技术,得到了 I、Ⅱ基因型反应性 McAbs,说明在不同基因型 HEV p166 上确实存在有 I、Ⅱ基因型共有和Ⅲ、Ⅳ基因型共有的两种不同抗原表位,可以揭示不同基因型 HEV 毒株在起源和进化关系上的差异。3A₃ 株 McAb 除与其免疫原 p166Us 反应外,还与同属第Ⅲ基因型的 p166Nz 反应,但不与第 I、Ⅱ、Ⅳ基因型的 p166 发生交叉反应,是第Ⅲ基因型反应性 McAb。而 1F₁ 株 McAb 只与免疫原 p166Us 结合,不与其它 6 种 p166 反应,是另一种类型的第Ⅲ基因型反应性 McAb,表明 HEV 第Ⅲ基因型中至少存在两种不同类型的抗原表位。与上述结果吻合的是,我们在先前的研究^[8,9]中,已发现 HEV 第 I 基因型和第Ⅱ基因型也具有基因型特异性的抗原表位。目前我们正在制备 HEV 第Ⅳ基因型中国株的 McAb,如能进一步发现第Ⅳ基因型的特异性抗原表位,将为今后开展 HEV 的抗原分型奠定坚实的基础。

在本研究中我们还利用计算机辅助序列分析的方法,比较了 39 株不同基因型 HEV 在 p166 重组蛋白区段的氨基酸序列,获得了许多生物信息学的分析结果,一方面是可以部分佐证本研究所得的实验结果,另一方面,所显示出的不同基因型 HEV 在氨基酸序列上的特征性改变为抗原表位的定位提供了重要的线索,有助于深入研究 HEV 抗原表位的变异,为新一代 HE 免疫诊断试剂的开发以及疫苗的研制提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Worm HC, van der Poel WH, Brandstatter G. Hepatitis E: an overview. *Microbes Infect*, 2002, **4**(6): 657-666.
- [2] Purdy MA, Carson D, McCaustland KA, et al. Viral specificity of hepatitis E virus antigens identified by fluorescent antibody assay using recombinant HEV proteins. *J Med Virol*, 1994, **44**(2): 2122-2214.
- [3] Schlauder GG, Mushahwar IK. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol*, 2001, **75**(2): 282-292.
- [4] Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 9860-9865.
- [5] 王佑春, 张华远, 辜文洁, 等. 戊型肝炎病毒 IV 型的 ORF3 及 ORF2 蛋白的分片段表达、纯化及抗原性分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2002, **22**(3): 257-261.
- [6] Meng JH, Dai X, Chang JC, et al. Identification and characterization of the neutralization epitopes of the hepatitis E virus. *Virology*, 2001, **288**: 203-211.
- [7] 孟继鸿, 戴星, 龚晓光, 等. 不同基因型戊型肝炎病毒重组蛋白的抗原性分析. *东南大学学报(医学版)*, 2002, **21**(1): 31-35.
- [8] 赵宇, 梁久红, 孟继鸿, 等. 戊型肝炎病毒 I、Ⅱ与Ⅲ、Ⅳ基因型 B 细胞抗原表位的异同. *中国免疫学杂志*, 2004, **20**(9): 591-595.
- [9] 梁久红, 孟继鸿, 赵宇, 等. 不同基因型戊型肝炎病毒的抗原表位分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2003, **23**(10): 817-821.
- [10] Mast EE, Alter MJ, Holland PV, et al. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. *Hepatology*, 1998, **27**: 857-871.
- [11] Zhang MD, Emerson SU, Nguyen H, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a vaccine prepared from 53KDa truncated hepatitis E virus capsid protein expressed in insect cells. *Vaccine*, 2002, **20**: 853-857.
- [12] Zhou YH, Purcell RH, Emerson SU. An ELISA for putative neutralizing antibodies to hepatitis E virus detects antibodies to genotypes 1, 2, 3, and 4. *Vaccine*, 2004, **22**: 2578-2585.

Hepatitis E virus of different genotypes contains multiple-type antigenic epitopes

DENG Lei¹ MENG Ji-hong^{1*} ZHAO Yu¹ ZHANG Hong-mei¹ DAI Xing²

(¹ Department of Microbiology and Immunology , School of Medicine ,² Department of Dermatology ,
Zhongda Hospital , Southeast University , Nanjing 210009 , China)

Abstract : Monoclonal antibodies (McAbs) were prepared against a recombinant protein p166Us derived from US-1 strain of hepatitis E virus (HEV). The immune reactivity of the McAbs to seven p166s derived from different genotypes and subtypes of HEV , which included p166Bur (genotype I a) , p166Pak (genotype I b) , p166Mor (genotype I c) , p166Mex (genotype II) , p166Us (genotype III) , p166Nz (swine HEV , genotype III) and p166Chn (genotype IV) , was tested by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a Western blotting assay . The immunological relationship between the McAbs and native HEV particles or anti-HEV positive serum samples was analyzed by an antigen-competitive or antibody-competitive ELISA . Totally , six McAb-productible hybridoma cell lines , designated by the name of 4D₃ , 2E₃ , 11E₁₁ , 12H₅ , 3A₃ and 1F₁ respectively , were cloned and obtained in this study . The McAb of 4D₃ could react to all of the seven p166 recombinant proteins . This kind of reaction could be inhibited by each of 4 genotypes of native HEV particles or anti-HEV positive serum samples . The McAbs produced by 2E₃ , 11E₁₁ and 12H₅ reacted to p166Us , p166Nz and p166Chn , but did not react to p166Bur , p166Pak , p166Mor and p166Mex . The reaction of McAb of 2E₃ , as an example of the McAbs of 2E₃ , 11E₁₁ and 12H₅ , could be only inhibited by genotype III and IV HEV or anti-HEV positive serum . The McAb of 3A₃ could bind to p166Us as well as p166Nz . The McAb produced by 1F₁ was reactive to the p166Us only . However , neither of I , II , IV genotype HEV particles or antisera could inhibit both of their reactions to p166Us . The data as mentioned above suggested that there are multiple-type antigenic epitopes such as genotype I , II , III and IV common , III and IV common , and III specific epitopes within HEV ORF2 encoded p166 proteins of different genotypes and subtypes of HEV . Moreover , the antigenic epitopes on recombinant protein p166s and these on native HEV particles possess identical immunological characteristics .

Keywords : Hepatitis E virus ; Antigenic epitope ; Monoclonal antibody ; Recombinant protein ; Genotype

Foundation items : Chinese National Natural Science Foundation (30271231 , 30271212) ; Jiangsu Province Natural Science Foundation (BK2002053) ; Development Foundation of Medical Science and Technology of Jiangsu Health Bureau (200115) ; The Project Sponsored by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars , State Education Ministry (2004176)

* Corresponding author . Tel : 86-25-83272454 ; Fax : 86-25-83324887 ; E-mail : jihongmeng@263.net

Received 25 April 2005 / Accepted : 5 July 2005 / Revised : 2 August 2005

百科全书式的大型专科工具书《微生物学词典》问世

由著名微生物学教授周德庆先生和徐士菊女士共同编著的《微生物学词典》已由天津科学技术出版社于 2005 年 4 月出版发行。

这本积数年辛劳而产生的 130 余万字巨著 ,是第一部由我国微生物学家自己编著的大型专科工具书。该书收词原则明确 ,选词恰当 ,注释精练 ,涉及微生物学及其相关学科各个领域 ,跨越微生物学发展的各个时期 ,2003 年的新出现名词亦有收录。该书渗透了两位教授近半个世纪微生物学教学和出版物编审的鲜活经验 ,用辞书形式展示了微生物学的全景。尤为重要的是编著者结合中国国情 ,巧妙地地为读者提供了大量较难收集的资料。书后的 7 个附录可免去读者多方查找之苦 ,是微生物学工作者 ,特别是教学工作者的良师益友。

有意购买本书者 ,请和天津市和平区西康路 35 号天津科学技术出版社 (邮编 300051) 刘锟先生 (022-23332396 或 23332403) 联系。本书定价 88 元 ,由此获得信息者可享受 8 折优惠 ,免收邮运费。