

# 戊型肝炎病毒 IV 型衣壳蛋白缺失突变体原核表达与性质

邱义兰<sup>1</sup>, 吴俊文<sup>1</sup>, 邱果<sup>1</sup>, 李桑<sup>1</sup>, 李焯<sup>1</sup>, 刘胜姿<sup>2</sup>, 刘如石<sup>2,3</sup>

1 湖南师范大学生命科学学院, 湖南 长沙 410081

2 湖南师范大学医学院, 湖南 长沙 410013

3 湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128

邱义兰, 吴俊文, 邱果, 等. 戊型肝炎病毒 IV 型衣壳蛋白缺失突变体原核表达与性质. 生物工程学报, 2014, 30(3): 381-392.

Qiu YL, Wu JW, Qiu G, et al. Prokaryotic expression and characterization of truncated mutant capsid protein of genotype IV hepatitis E virus. Chin J Biotech, 2014, 30(3): 381-392.

**摘要:** 采用 PCR 技术扩增基因 IV 型 HEV (Hepatitis E Virus, HEV) 开放阅读框 2 (Open Reading Frame 2, ORF2) 的缺失突变体 (aa384-606), 亚克隆到表达载体后, 转化到大肠杆菌中进行诱导表达, 表达蛋白命名为 rP24. SDS-PAGE 和免疫印迹实验表明, rP24 获得了高效表达, 且和单克隆抗体 15B2 具有强的反应活性。rP24 经过包涵体洗涤、溶解复性、离子交换层析和分子筛层析纯化后, 免疫印迹实验表明, 纯化 rP24 能与抗 HEV ORF2 中和单克隆抗体 8C11 以及 HE (Hepatitis E, HE) 阳性血清发生很强的免疫反应性, 说明 rP24 上具有构象型中和表位, 模拟了 HEV 衣壳蛋白的空间结构。动态光散射测量结果表明, rP24 的平均水化半径为 7.48 nm; 纯化 rP24 免疫动物实验表明, rP24 具有强的抗原性, 小鼠阳转周期短, 抗体持续时间长; 纯化 rP24 作为包被抗原检测 HE 阳性血清和阴性血清, 结果显示 rP24 对 HE 阳性血清和阴性血清检出率与北京万泰公司的抗 HEV-IgG 检测试剂盒的检出率一致。这些实验结果说明, 具有较好免疫反应性和免疫原性的 rP24 获得了高效表达, 该蛋白模拟了天然病毒衣壳蛋白的中和表位, 为进一步研究基因 I 型和基因 IV 型 HEV 感染不同宿主细胞差异的分子机制奠定了基础。

**关键词:** 戊型肝炎病毒, 衣壳蛋白, 原核表达, 免疫反应性, 免疫原性

**Received:** June 27, 2013; **Accepted:** November 21, 2013

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31072141), Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (Nos. 12JJ2013, 11JJ6020), Science and Technology Program of Hunan Province (Nos. 2011SK2014, 2010RS4001), Science and Technology Program of Changsha City (No. K1104047-31), Science Research Projects in Colleges and Universities in Hunan Province (No. 10B060).

**Corresponding author:** Rushi Liu. Tel: +86-731-83998511; E-mail: liurushi@hunnu.edu.cn.

国家自然科学基金 (No. 31072141), 湖南省自然科学基金 (Nos. 12JJ2013, 11JJ6020), 湖南省科技计划项目 (Nos. 2011SK2014, 2010RS4001), 长沙市科技计划项目 (No. K1104047-31), 湖南省高等学校科学研究项目 (No. 10B060) 资助。

# Prokaryotic expression and characterization of truncated mutant capsid protein of genotype IV hepatitis E virus

Yilan Qiu<sup>1</sup>, Junwen Wu<sup>1</sup>, Guo Qiu<sup>1</sup>, Sang Li<sup>1</sup>, Ye Li<sup>1</sup>, Shengzi Liu<sup>2</sup>, and Rushi Liu<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China

<sup>2</sup> Medical College, Hunan Normal University, Changsha 410013, Hunan, China

<sup>3</sup> College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

**Abstract:** A truncated mutant of the Open Reading Frame 2 (ORF2, aa384-606) was amplified from cDNA of genotype IV hepatitis E virus (HEV) by polymerase chain reaction (PCR), subcloned to expression plasmid pTO-T7, and expressed in *Escherichia coli*. SDS-PAGE and Western blotting were used to detect and identify the recombinant protein, namely rP24. After washing of inclusion bodies, dissolving in denaturing agents, refolding by dialysis, ion exchange chromatography and gel chromatography, dynamic light scatter was used to study the hydrated radius of rP24. Western blotting was applied to detect the immunoreactivity of rP24, and mouse immunity test and indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) were applied to evaluate the immunogenicity and the detection rate of HEV positive and negative serum. SDS-PAGE and Western blotting show that rP24 was highly expressed in the form of inclusion bodies after induction, and had strong immunoreactivity to monoclonal antibody (McAb) 15B2. After a multi-step purification of rP24, Western blotting indicated that the purified rP24 also had strong immunoreactivity to neutralizing McAb 8C11 and HEV positive serum, suggesting that rP24 simulated the nature structure of HEV capsid protein. Dynamic light scatter demonstrated that the average hydration radius of purified rP24 was 7.48 nm. The mouse immunity test showed that the purified rP24 also had good immunogenicity, and the period of serum antibodies converted from negative to positive was very short, but the antibodies maintained more than 20 weeks. Indirect ELISA tests showed that the detection rate of was the same as anti-HEV-IgG diagnostic kit (Wan Tai corporation). Taken together, the rP24 simulated the neutralizing epitopes of natural HEV, and had strong immunoreactivity and immunogenicity. It provided a basis for the further investigation of the difference of infection mechanism between genotype I and genotype IV HEV.

**Keywords:** hepatitis E virus, capsid protein, prokaryotic expression, immunoreactivity, immunogenicity

戊型肝炎是全球最主要的病毒性肝炎之一, 由 HEV 感染导致, 戊型肝炎多数呈自限性, 其症状与甲肝相似, 但症状更重, 死亡率更高, 该病孕妇死亡率高达 20%, 慢性肝病患者合并戊型肝炎感染容易引发肝衰竭, 病死率达 70%<sup>[1-4]</sup>。HEV 至少可以分为 4 个基因型, 在中国主要流行的是基因 I 型和基因 IV 型 HEV。根据易感宿主又可以分为 2 个大类: 一类 (H 类) 仅分离于人类, 包括基因 I 型和基因 II 型, 是迄今病因明确的大规模戊肝爆发的病原体,

实验动物目前只成功感染非人灵长类; 另一类 (Z 类) 广泛分布于世界各地, 只见于小规模流行和临床散发病例, 可以感染多种哺乳动物, 目前研究发现猪为 Z 类 HEV 的天然宿主<sup>[5-7]</sup>。由于缺乏可靠的 HEV 细胞培养模型及动物模型, 对完整 HEV 的研究较少, 因此, H 类和 Z 类在跨种间感染入侵宿主细胞机制的差异, 以及致病机理至今还不清楚。

HEV ORF2 编码主要结构蛋白, 形成病毒衣壳蛋白, 介导 HEV 与宿主的吸附。现有的研

究结果证明, HEV 的主要中和表位位于 ORF2 的 aa384-606 之间, 也是主要介导 HEV 与嗜性细胞吸附的区域<sup>[2-3,8-10]</sup>。本实验室在表达基因 I 型 HEV 衣壳蛋白的基础上, 进一步利用大肠杆菌表达基因 IV 型 HEV 衣壳蛋白缺失体 (ORF2 aa384-606), 并研究了重组表达蛋白的免疫反应性质和部分物理性质, 证明表达的基因 IV 型 HEV 衣壳蛋白模拟了天然病毒颗粒的中和表位, 其与受体的结合方式与天然病毒结合受体的方式可能一致, 为进一步从分子水平研究戊型肝炎病毒基因 I 型和基因型 IV 感染宿主细胞差异的机制打下了基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

HEV 基因: 基因 IV 型 HEV ORF2 (aa384-606) 基因来源于我国戊肝病人的血清标本 (厦门大学夏宁邵教授惠赠), 单克隆抗体 15B2 和 8C11、HRP-羊抗鼠二抗、HRP-羊抗人 IgG 和 HRP-羊抗人 IgM (夏宁邵教授惠赠); pMD-18T、*Taq* 酶、T4 DNA 连接酶、*EcoR* I 和 *Nde* I (TaKaRa 公司); DNA 胶回收试剂盒与质粒提取试 (上海生物工程技术有限公司); 蛋白质相对分子质量标准 (Genestar 公司); 硝酸纤维素膜 (Schleicher & Schuell 公司); HRP-DAB 底物显色试剂盒 (TIANGEN 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 *rP24* 基因的编码序列克隆与构建表达载体

根据基因 IV 型 HEV ORF2 (aa384-606) 编码序列设计 PCR 扩增引物 (在上游引物引入 *Nde* I 位点, FP: 5'-CATATGCAGCCGTTCTACTCTCGCC-3'; 下游引物引入 *EcoR* I 位点, RP: 5'-GAATTCAAGTCAGCTCTAGCTCCCGA-3'), 以

基因 IV 型 HEV ORF2 为模板扩增 *P24* 基因, 反应体系为: 10×PCR 缓冲液 2.5 μL、dNTPs (10 mmol/L) 2 μL、上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.2 μL、HEV ORF2 DNA 2 μL、去离子水补足 25 μL。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 58 °C 40 s, 72 °C 1 min 20 s, 25 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定与胶回收后连接到 pMD18-T 载体, 然后亚克隆到表达载体 pTO-T7 上。

#### 1.2.2 重组蛋白的表达和纯化

挑取筛选的单克隆菌株, 接种到 5 mL LB 液体培养基中 (含有 100 μg/mL Kan<sup>+</sup>) 37 °C 培养至 *OD*<sub>600</sub> 值达到 0.6, 加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达, SDS-PAGE 分析重组蛋白的表达情况。表达的包涵体蛋白先溶于 4 mol/L 尿素, 然后样品透析到 20 倍体积以上的 PBS 溶液 (20 mmol/L NaCl, 2.68 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.76 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) 中 4 °C 复性, 2-3 h 更换一次 PBS 溶液, 4 °C、8 000×g 离心 10 min, 收集离心后的上清液即为复性的重组蛋白。

用 10 倍柱体积的 PBS 先平衡离子交换层析柱 (DEAE-5PW, 21.5 mm×150 mm, 日本 TOSOH 公司) 将复性蛋白样品上柱, 以 2 倍柱床体积的 PBS 缓冲液过柱, 然后线性梯度 0-1 mol/L NaCl/PBS 洗脱液进行洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 收集 280 nm 吸收值大于 0.5 AU 的蛋白峰, 每管收集 1 mL, SDS-PAGE 分析收集组分的蛋白纯度。

收集离子交换柱纯化重组蛋白, 上样于平衡好的分子筛层析柱 (TSK-GEL G 3 000 SW 7.5 mm×300 mm, 日本 TOSOH), 流速为 0.5 mL/min, 收集 280 nm 吸收值大于 0.2 AU 的

蛋白峰, 每管收集 1 mL, SDS-PAGE 分析收集组分的蛋白纯度。

### 1.2.3 蛋白印迹实验 (Western blotting)

蛋白样品经 12% 的 SDS-PAGE 后转移到 PVDF 膜进行杂交: 用含 5% 的脱脂奶的 TBS (100 mmol/L Tris·HCl, 150 mmol/L NaCl, pH7.5) 缓冲液封闭 2 h。加入用脱脂奶稀释的抗 HEV ORF2 鼠源单克隆抗体, 室温反应 2 h; TBST 缓冲液 (100 mmol/L Tris·HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入 HRP 酶标羊抗鼠, 室温反应 2 h, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 用 HRP-DAB 显色试剂盒显色。

### 1.2.4 酶联免疫吸附分析 (ELISA)

将纯化的 rP24 重组蛋白用碳酸盐缓冲液 (3.5 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 15 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 3 mmol/L NaN<sub>3</sub>) 稀释抗原至终浓度为 1 μg/mL, 聚苯乙烯板的每孔包被 100 μL, 37 °C 包被 2 h; 弃孔内液体, PBST 洗涤 1 次, 每孔加入 200 μL 封闭液 (2% 明胶, 0.5% 酪蛋白, 0.1% ProClin 300), 37 °C 封闭 2 h 后抽干; 加入样品稀释液 (2% 明胶, 0.5% 酪蛋白, 0.1% ProClin 300, 15% 新生牛血清) 稀释的待检样品 100 μL, 37 °C 孵育 30 min, PBST 洗涤 3 次; 每孔加入封闭液稀释的 HRP-羊抗人二抗 100 μL, 37 °C 孵育 30 min, PBST 洗涤 3 次; 每孔加入 100 μL 显色液, 37 °C 避光显色 10 min, 加终止液终止显色液, 450 nm/620 nm 双波长检测各孔的 OD 值。

### 1.2.5 纯化后蛋白的动态光散射

动态光散射专用的石英比色皿用 0.22 μm 微孔滤膜过滤的超纯水反复冲洗 20 遍以上。待测样品经 4 °C、15 000×g 离心 15 min 后, 取 50 μL 样品至比色皿中, 待温度平衡到 25 °C 时, 将比色皿放入动态光散射仪 (美国 PROTEIN

SOLUTION 公司, DYNAORO99-D-50 型) 样品架进行测量, 入射波长为 824 nm, 溶剂为 PBS, 采用 Regulation 算法计算, 根据需要设置过滤参数和分析分辨率。

### 1.2.6 纯化蛋白非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Native Blue PAGE)

非变性电泳参考 Wittig 等<sup>[11]</sup>的方法, 稍作修改, 具体步骤如下: 配制 13% 的分离胶, 蛋白样品和上样缓冲液按 1:1 的比例混匀上样, 先恒压 100 V 于 4 °C 电泳, 待样品进入浓缩胶后, 恒压 300 V 继续电泳, 当蛋白样品在分离胶中泳动达到分离胶的 1/3 处时, 更换为 1/10 负极缓冲液, 然后固定、染色与脱色。

## 2 结果与分析

### 2.1 原核表达载体的构建与鉴定

P24 基因经过 PCR 扩增后, 产物用 1.5% 琼脂糖进行电泳检测, 结果在 500–750 bp 之间发现唯一一条清晰、大小约为 600 bp DNA 条带 (图 1A), 与 P24 基因理论值大小相符。连接到 T 载体上后送上海生工测序, 结果显示该序列与 GenBank 中基因 IV 型 HEV 基因序列 (GenBank Accession No. AB161717.1) 完全一致。然后将 P24 基因亚克隆到 pTO-T7 表达质粒中, 重组质粒 pTO-T7-P24 经 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切和电泳检测后, 结果在 600 bp 位置处观察到 DNA 条带, 说明 P24 基因已经成功克隆到表达载体上 (图 1B)。

### 2.2 rP24 的诱导表达

将诱导好的重组 rP24 菌株和仅转化空母体质粒的对照组菌株制备蛋白样品并进行 SDS-PAGE 检测, 结果在 rP24 重组菌株诱导表达的试验组中可以观察到一条相对较粗的蛋白

条带,其相对分子质量大小约为 25 kDa,与基因 IV 型 HEV rP24 的理论分子量 23.25 kDa 基本一致,这种分子量大小的差异可能是重组蛋白构象与天然蛋白不一致造成的。而在对照组中没有出现这一分子量大小的蛋白条带(图 2A),说明 rP24 在重组菌株中可能获得了高效表达。Western blotting 结果显示,表达的重组蛋白与鼠源抗 HEV ORF2 蛋白单克隆抗体 15B2 发生特异性反应(图 2B),进一步说明 P24 基因在大肠杆菌中获得了高效表达,而且具有良好的免疫反应性。

### 2.3 抗原蛋白的大量表达及包涵体纯化

超声破碎细胞后,取 100  $\mu$ L 细胞悬液 4  $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g 离心 10 min,分别收集上清和沉淀,

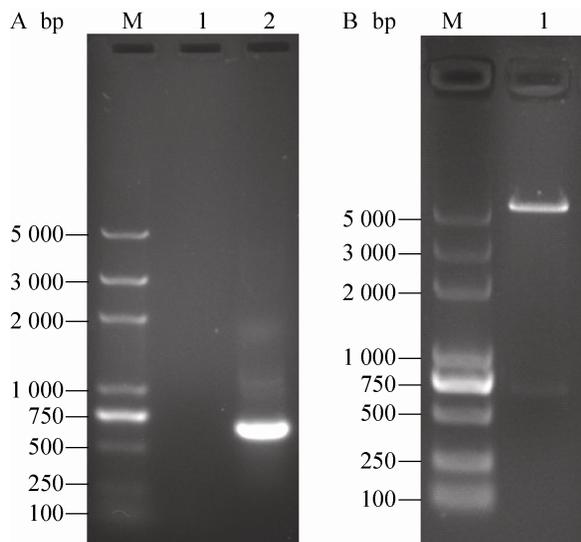


图 1 HEV IV 型 *p24* 基因原核表达载体的构建与鉴定  
Fig. 1 Construction and identification of prokaryotic expression plasmid of genotype IV HEV *P24* gene. (A) PCR products of genotype IV HEV *P24* gene. M: DNA marker DL5000; 1: negative control; 2: PCR products of genotype IV HEV *P24* gene. (B) Restriction map recombinant plasmid by enzyme digestion. M: DNA marker DL5000; 1: recombinant plasmid pTO-T7-*P24* digested by *Nde* I and *EcoR* I.

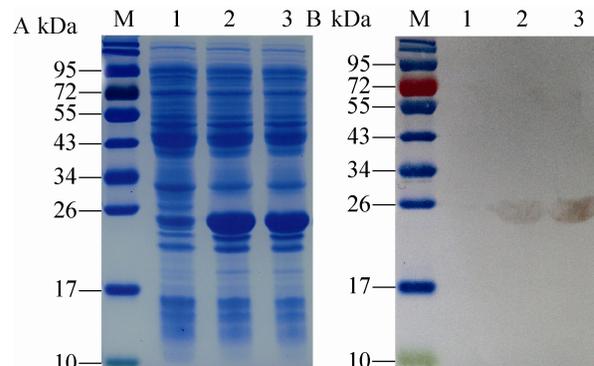


图 2 HEV IV 型 *p24* 基因在大肠杆菌中的表达鉴定  
Fig. 2 Identification of recombinant genotype IV HEV rP24 protein expressed in *E. coli*. (A) SDS-PAGE analysis of recombinant genotype IV HEV *P24* protein expressed in *E. coli*. M: protein marker; 1: total protein expression profile of *E. coli* transfected pTO-T7 with IPTG induction; 2-3: total protein expression profile of *E. coli* transfected pTO-T7-*P24* with IPTG induction. (B) Western blotting analysis of genotype IV HEV rP24 expressed in *E. coli* with 15B2. M: protein marker; 1: immunoblotting profile with 15B2 of total protein expression of *E. coli* transfected pTO-T7 with IPTG induction; 2-3: immunoblotting profile with 15B2 of total protein expression of *E. coli* transfected pTO-T7-*P24* with IPTG induction.

制备蛋白样品进行 SDS-PAGE,结果显示,重组目的蛋白主要分布在沉淀,说明目的蛋白的表达是以包涵体的形式存在(图 3A)。经过 BandsScan 软件分析 rP24 在沉淀中占到总蛋白的 96%。通过用缓冲液 I (20 mmol/L Tris·HCl, 5 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, pH 7.4) 和 TritonX-100 缓冲液 I 洗涤,去除部分杂蛋白。洗涤后的包涵体蛋白在 2 mol/L、4 mol/L、8 mol/L 尿素/缓冲液 I 中均能溶解,但是 rP24 在 2 mol/L 尿素/缓冲液 I 中溶解度较小,在 4 mol/L 尿素/缓冲液 I 中溶解量很大,且 rP24 能形成同源二聚体,4 mol/L 尿素/缓冲液 I 中不能溶解的部分在 8 mol/L 尿素/缓冲液 I 中可以溶解(图 3B),

而且经过包涵体洗涤后，去除了相当部分杂蛋白，目的蛋白获得了有效的纯化。Western blotting 结果说明不论是单体还是二聚体都能与单克隆抗体 15B2 有很强的反应，进一步说明 rP24 具有良好的免疫反应性 (图 3C)。本研究表达的蛋白分子量约为 25 kDa，二聚体蛋白的分子量约为 40 kDa，小于正常天然蛋白二聚体分子量 46.5 kDa。这可能既有重组蛋白构型问题而导致相对分子量的偏差，也可能还存在通过蛋白质的疏水作用，使蛋白质的高级结构变得更加紧密，导致相同电泳条件下泳动速度加快，从而使二聚体的相对分子量变小。

#### 2.4 蛋白的复性、反应活性检测与纯化

将 4 mol/L 尿素/buffer I 溶解的 rP24 于 4 °C

的 PBS 中透析复性，然后将复性样品进行 SDS-PAGE。结果显示 rP24 复性后以单体和二聚体的形式存在，目的蛋白复性后，单体的量变小，二聚体的量增大。目的蛋白与抗 HEV ORF2 蛋白鼠源单克隆抗体 8C11 的 Western blotting 结果显示，复性后的蛋白具有良好的免疫反应性 (图 4A, B)。将一抗改用 HEV 阳性血清进行免疫印迹检测，结果显示聚体与血清能发生强烈的反应，单体与血清的反应能力相对弱一些，而且复性蛋白样品在 95–113 kDa 之间有明显免疫印迹反应条带，说明 rP24 具有形成寡聚体蛋白的能力 (图 4C, D)。而复性样品在 SDS 存在条件下煮沸处理后，蛋白质的构象发生改变，不能形成二聚体，蛋白只能以单体蛋白条带存在。

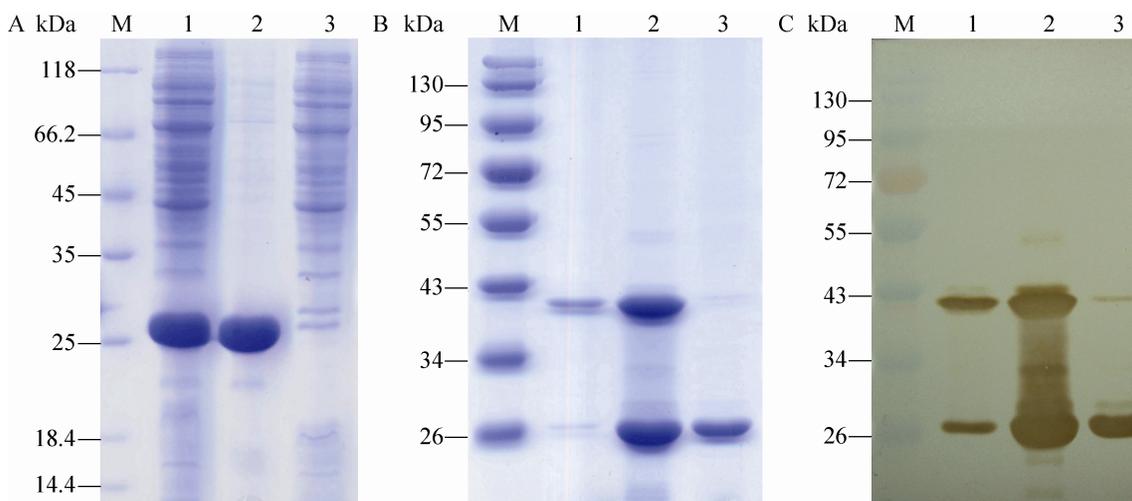


图3 重组IV HEV rP24蛋白包涵体纯化

Fig. 3 Purification of recombinant genotype IV HEV rP24 inclusion body protein. (A) SDS-PAGE analysis the expression forms of P24 protein. M: protein marker; 1: total protein expression profile of cell lysis solution with IPTG induction; 2: precipitation of cell lysis solution with IPTG induction; 3: supernatant of cell lysis solution with IPTG induction. (B) SDS-PAGE analysis dissolubility of rP24 resolved in different concentration of urea. M: protein marker; 1–3: rP24 protein dissolved in 2 mol/L, 4 mol/L, 8 mol/L urea/Buffer I respectively. (C) immunoblotting profile of rP24 protein with 15B2 of dissolved in 2 mol/L, 4 mol/L, 8 mol/L urea/Buffer I respectively. M: protein marker; 1–3: rP24 protein dissolved in 2 mol/L, 4 mol/L, 8 mol/L urea/Buffer I respectively.

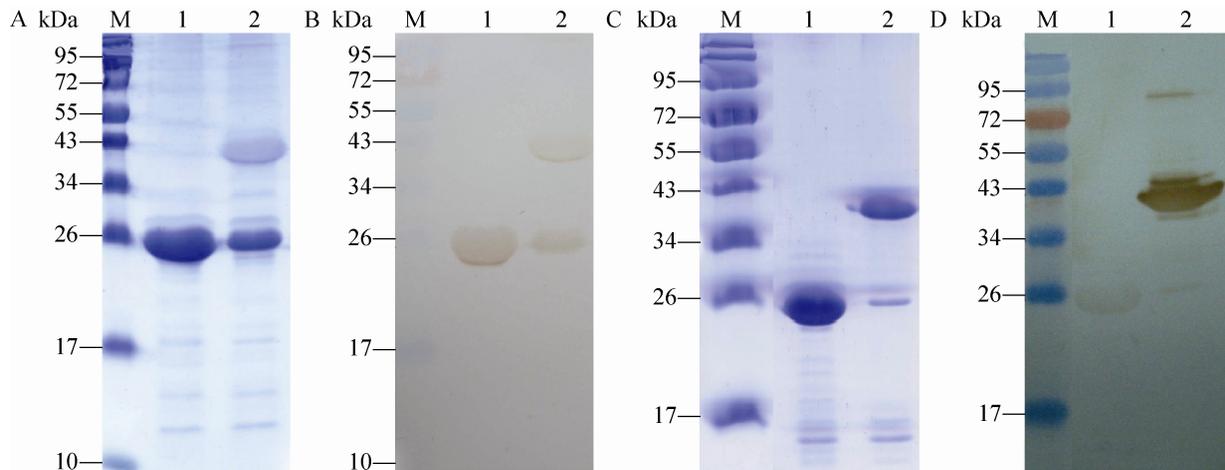


图 4 重组 P24 蛋白免疫反应活性分析

Fig. 4 Immunoreactivity analysis of renatured recombinant rP24. (A) and (C) SDS-PAGE analysis of renatured rP24. M: protein marker; 1: renatured recombinant rP24 (boiled); 2: renatured rP24 (no boiled). (B) Immunoblotting profile of rP24 to 8C11. (D) Immunoblotting profile of rP24 to HEV positive serum. M: protein marker; 1: renatured rP24 (boiled); 2: renatured rP24 (no boiled).

这些结果说明 rP24 可以通过透析复性，蛋白复性后可以以单体、二聚体和多聚体的形式存在，其中二聚体结合最为紧密，即使在 SDS 存在的不沸水浴条件下仍不被完全破坏。分析 aa 序列一级结构发现，p24 aa 中不含有半胱氨酸，不可能形成二硫键，也没有形成强离子键的 aa 基础；再通过 DNASTAR 软件包中的 Protean 程序提供的 Kyte-doolittle 算法分析，p24 aa199-210 为疏水性最强的区域，由于 p24 为病毒的衣壳蛋白，该疏水区域发生的疏水相互作用可能在形成同源二聚体作用中发挥了重要作用。

通过生物信息学软件分析，rP24 一级结构等电点为 5.23，适合使用阴离子交换层析进行纯化，因此采用 DEAE-5PW 阴离子交换层析柱进行蛋白的纯化，在 rP24 的离子交换层析图谱上可以发现一个极小穿透峰、一个主峰，另外在层析图谱的主峰前有 2 个小峰。主峰的出峰时间为 24 min 左右，占总面积的 73.75% (图 5A)，

主峰前的小峰可能是不成熟的蛋白多聚体，由于不能形成正确的空间构象，其表面所带电荷与成熟的蛋白聚体表面所带电荷不一样，所以洗脱的出峰时间也不一样。目的蛋白经过离子交换层析纯化后，蛋白聚体的均一性得到了有效的提高。

分子筛层析不仅能分离纯化目的蛋白，而且还可以起到脱盐的作用。将离子交换层析纯化的蛋白上样于分子筛层析柱 (TSK-GEL G 3 000 SW)，洗脱流速为 0.5 mL/min，从 rP24 的凝胶层析图谱中可以看到一个大峰和一个小峰，大峰的出峰时间为 7 min 左右，占总面积的 80.63%；小峰的出峰时间为 5 min 左右，小峰面积占总面积的 12.93% (图 5B)，其中的小峰可能是复性后形成的寡聚体蛋白 (图 4C，泳道 2)，其带电性质和二聚体相同，因而在离子交换层析中和二聚体同时被洗脱，但是在凝胶分子筛层析中，由于分子量较大而先被洗脱，收集小

峰蛋白进行 Native-PAGE (图 5C), 结果发现, 大峰蛋白的分子量介于 45 kDa 和 98 kDa 之间, 为了进一步鉴定 Native blue PAGE 上 rP24 多聚体, 同时也为验证收集小峰蛋白为大于 45 kDa 的 rP24 多聚体, 将收集的第 1 个峰 (保留时间为 5 min) 和第 2 个峰 (保留时间为 7.5 min) 的蛋白分别收集, 经过冷冻干燥后, 两个峰的蛋白质进行 SDS-PAGE, 结果表明, 第 1 个峰和第 2 个峰的蛋白在沸水浴和非沸水浴处理后, 均可以形成二聚体蛋白, 电泳结果通过 BandsScan 软件分析显示: 纯化后 rP24 的纯度超过 99%, 在 SDS 电泳缓冲液中, 单体蛋白的含量极少, 主要以二聚体的形式存在 (图 6)。

## 2.5 rP24 动态光散射实验

纯化后的 rP24 样品经过过滤后, 用动态光散射仪测量水化分子动力学半径, 得到一个质量贡献比 100% 的峰, 重组 rP24 的平均水化半径为 7.48 nm (图 7), 相当于平均分子量 90 kDa, rP24 的分散度较小, 说明 rP24 经过纯化后, 蛋白在 PBS 溶液中形成平均为四聚体的多种聚合状态, 且聚体的均一性很高。

## 2.6 重组 rP24 免疫原性

以不同剂量的纯化 rP24 免疫 Balb/C 小鼠, 免疫后的不同时间从小鼠尾静脉采血检验血清的阳转数, 其结果如表 1 所示, 5 周时, rP24 2  $\mu\text{g}$  以上剂量免疫的小鼠全部阳转, 0.5  $\mu\text{g}$  免疫有

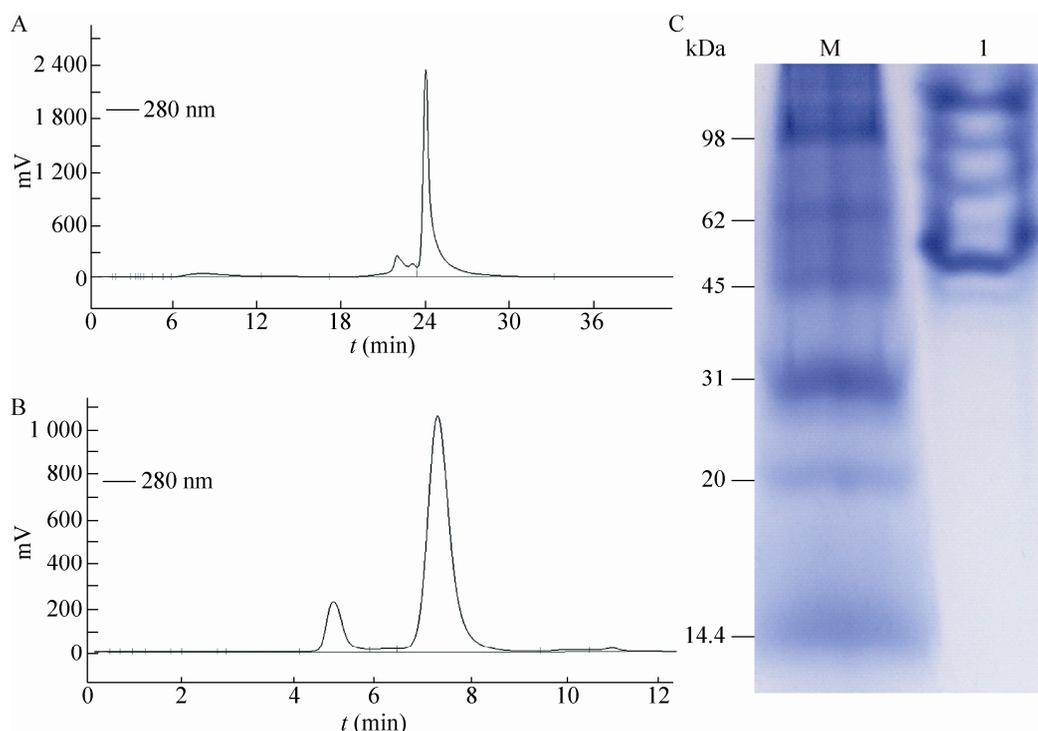


图 5 重组 P24 蛋白的离子交换、分子筛层析与非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 5 Profile of ion exchange chromatogram and Molecular sieve chromatogram and native-PAGE of rP24. (A) Profile of ion exchange chromatogram of rP24. (B) Profile of molecular sieve chromatogram of rP24. (C) Native-PAGE of rP24 (M: native protein marker; 1: purified rP24).

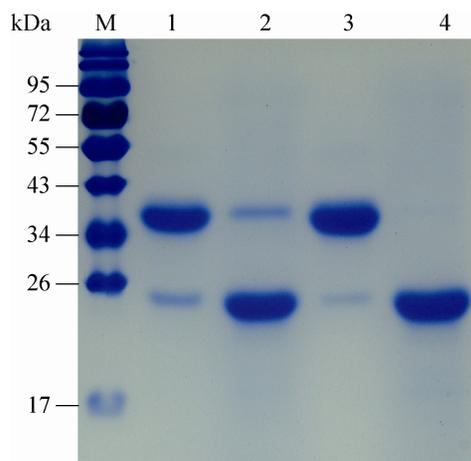


图 6 分子筛层析纯化蛋白 SDS-PAGE

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of rP24 after purified by molecular sieve chromatography. M: protein marker; 1: rP24 from the first peak (no boiled); 2: rP24 from the first peak (boiled); 3: rP24 from the second peak (no boiled); 4: rP24 from the second peak (boiled).

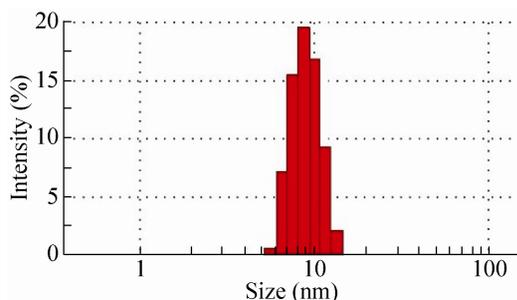


图 7 纯化重组 P24 分子溶液中水化半径的检测

Fig. 7 Hydrated radius of purified recombinant p24 protein in solution.

表 1 rP24 免疫 Bal b/C 后抗体阳转率与持久性分析

Table 1 Analysis of serological conversion rate and antibody persistence of Bal b/C mice vaccinated by recombinant rP24

Vaccinated (Dose/ $\mu\text{g}$ )	Vaccinated number	Serological conversion rate				
		0 week	5 weeks	10 weeks	15 weeks	20 weeks
10	6	0	6/6	6/6	6/6	6/6
5	6	0	6/6	6/6	6/6	5/6
2	6	0	6/6	6/6	5/6	5/6
1	6	0	5/6	5/6	4/6	2/6
0.5	6	0	4/6	4/6	2/6	0/6
0.2	6	0	2/6	1/6	0	0

6/8 只小鼠阳转，小鼠  $\text{ED}_{50}$  在 0.6–1.0  $\mu\text{g}$  之间。同时从该表中还可以看出，小鼠的免疫剂量与免疫产生的抗体持久性呈正相关，免疫小鼠产生的抗体滴度也与免疫剂量呈正相关，因此说明表达的 rP24 具有良好的免疫原性。

## 2.7 rP24 作为抗原检测血清的特异性

HEV 只有一种血清型，不同基因型的 HEV 抗原都能与 HEV 阳性血清反应。本研究选用 Genelab 公司检测的 24 份 HE 阳性血清和 21 份 HE 阴性血清，用本研究表达纯化的 rP24 作为包被抗原包被 ELISA 板条后，采用间接 ELISA 法对 24 份 HE 阳性血清和 21 份 HE 阴性血清进行检测，采用北京万泰公司生产的抗 HEV-IgG 诊断试剂盒作为对照，每个样品进行双孔重复。

将血清进行 1 : 100 稀释，以 2 倍标准阴性血清平均值作为阳性血清的判断标准 (Cut off 值为 0.216)，用统计学软件 GraphPad Prism 分析间接 ELISA 结果，结果表明：rP24 对 21 份阴性血清的检测结果为阴性，对 24 份阳性血清的检测结果为阳性，阳性血清的数据和阴性血清的数据之间差异极显著性 ( $P < 0.0001$ )，双孔数据间不存在显著性差异 ( $P > 0.05$ )，该结果与北京万泰和 Genelab 公司检测的结果一致，实验结果说明重组抗原具有良好的免疫反应性和特异性。

### 3 讨论

HE 是一个全球性的公共卫生问题, 在发展中国是导致病毒性肝炎的最主要原因, 而且时常导致食源性和水源性的暴发流行<sup>[12-18]</sup>。但病毒感染细胞的机制与致病机制并不清楚。Kapur 等<sup>[19-21]</sup>认为 HEV 进入肝细胞是在与受体蛋白结合后, 由网格蛋白介导的胞吞作用完成。基因 I 型和 II 型 HEV 只能感染人, 基因 III 型和 IV 型 HEV 能感染人和牲畜。两类 HEV 病毒的宿主不一样, 说明可能与细胞上的受体不同有关, 并且感染机制也可能会有差异, 研究感染差异的原因, 将对于防控 HEV 跨种间感染与传播起到一定的参考作用。

HEV ORF2 编码的病毒衣壳是病毒的最外层, 因此也包含了病毒的主要中和表位。利用 HEV 类病毒颗粒模拟病毒是研究病毒感染机制差异性的最佳选择。Li 等<sup>[22]</sup>利用大肠杆菌表达基因 II 型 HEV ORF2 aa 368-606, 获得融合蛋白 p239 能通过二聚体的相互作用形成一个直径为 23 nm 的类病毒颗粒。p239 蛋白中具有多个中和表位, 蛋白颗粒能很好的模拟 HEV 的空间结构<sup>[22-23]</sup>。何水珍等<sup>[24-25]</sup>利用 II 型 HEV P239 蛋白吸附 HepG2 细胞的模型来模拟 HEV 对宿主细胞的吸附, 初步确定了 p239 与细胞相互作用的区域位于 ORF2 上的 aa 423-443, 该段多肽可能和病毒上的细胞膜受体结合部位非常靠近或者直接参与构成了病毒与细胞特异性识别的表位。Guu 等<sup>[21]</sup>和 Li 等<sup>[26]</sup>表达非 IV 型 HEV 类病毒颗粒 (aa 118-608), 可分为 3 个线性区域。这 3 个区域都含有潜在的多聚糖的结合位点, 可能与细胞受体结合有关。

但是目前还没有确定找到人肝细胞 HEV 受体, H 类和 Z 类 HEV 感染人和动物的差异的分子机制仍待人们去研究和探讨。由于目前还缺乏成熟的 HEV 细胞培养模型与动物模型, 不可能获得大量的具有感染性的 HEV, 为了研究 H 类和 Z 类 HEV 病毒感染宿主差异的分子机制。我国流行的 HEV 主要为基因 I 型和基因 IV 型, 为结合 HEV 在我国的流行状况, 基因 I 型和基因 IV 型 HEV 跨种间感染的机制, 研究本研究拟在表达重组基因 I 型 HEV ORF2 蛋白的基础上, 进一步表达 IV 型 HEV ORF2 蛋白, 为研究这两类病毒的跨种间感染机制打下基础。

本研究利用基因工程技术表达了基因 IV 型 HEV 衣壳蛋白 rP24 (aa 384-606), 包含了与细胞相互作用的蛋白区域。重组蛋白通过 TSK-G 3 000 SW 分子筛层析柱和 DEAE 阴离子交换层析柱纯化以后, 蛋白的纯度可达 99% 以上, SDS-PAGE 结果显示纯化后的蛋白在 SDS 缓冲液中基本上以二聚体形式存在。rP24 蛋白与戊型肝炎阳性血清及中和单克隆抗体 8C11 的免疫印迹实验结果证明重组 rP24 蛋白具有良好的免疫反应性, 能以单体、二聚体和多聚体的形式存在, 说明 rP24 模拟了 HEV 的中和表位。虽然利用原子力显微镜和透射电镜观察不到 rP24 形成类病毒颗粒, 但利用动态光散色实验测得蛋白聚体的平均水化半径约为 7.48 nm, 聚体的均一性良好。同时动物免疫实验证明, rP24 具有良好的免疫原性, 免疫小鼠的 ED<sub>50</sub> 为 0.6-1.0 μg。因此以上实验表明, rP24 在 PBS 溶液能形成蛋白多聚体, 多聚体具有一定的空间构象, 并且还包含了 HEV 衣壳蛋白的中和表位, 因此该重组蛋白作为研究人和动物受体的主要材料, 适

合进一步研究基因 I 型和基因 IV 型 HEV 感染机制的差异性, 从而为预防 HEV 跨种间传播的研究提供一定的参考作用。下一步我们将以此为材料进一步研究 HEV 基因 I 型和基因 IV 型 HEV 跨种间感染细胞差异的机制。同时, rP24 也可以作为 HEV 血清诊断试剂的潜在关键原料, 具有一定的应用价值。

**致谢:** 此文部分工作由湖南省基础医学重点学科和生物发育工程及新产品研发湖南省协同创新中心资助。

## REFERENCES

- [1] Xiao P, Li R, She R, et al. Prevalence of hepatitis E virus in swine fed on kitchen residue. *PLoS ONE*, 2012, 7 (3): e33480.
- [2] Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, et al. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis*, 2008, 8(11): 698–709.
- [3] Teshale EH, Hu DJ. Hepatitis E: epidemiology and prevention. *World J Hepatol*, 2011, 3(12): 285–291.
- [4] Parvez MK, Purcell RH, Emerson SU, et al. Hepatitis E virus ORF2 protein over-expressed by baculovirus in hepatoma cells, efficiently encapsidates and transmits the viral RNA to naïve cells. *Virology*, 2011, 8: 159–164.
- [5] Yugo DM, Meng XJ. Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int Environ Res Public Health*, 2013, 10(10): 4507–4533.
- [6] Wedemeyer H, Pischke S, Manns MP. Pathogenesis and treatment of hepatitis E virus infection. *Gastroenterology*, 2012, 142 (6): 1388–1397.
- [7] Guo QS, Ge SX, Xiong JH, et al. The molecular differences between genotype 1 and genotype 4 of HEV in their neutralization region. *Chin J Virology*, 2007, 23(6): 454–458 (in Chinese).  
郭清顺, 葛胜祥, 熊君辉, 等. 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. *病毒学报*, 2007, 23(6): 454–458.
- [8] Xiu BS, Feng XY, He J, et al. Use of immuno-dominant epitope derived from genotype 4 as a diagnostic reagent for detecting the antibodies against Hepatitis E Virus. *Virology*, 2013, 10: 131. doi: 10.1186/1743-422X-10-131.
- [9] Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res*, 2011, 161(1): 47–58.
- [10] Liang JH, Dai X, Chen D, et al. A single amino acid substitution changes antigenicity of ORF2-encoded proteins of hepatitis E virus. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(8): 2962–2975.
- [11] Wittig I, Braun HP, Schägger H. Blue native PAGE. *Nat Protoc*, 2006, 1(1): 418–428.
- [12] Paula VS de, Wiele M, Mbunkah AH, et al. Hepatitis E virus genotype 3 strains in domestic pigs, cameroon. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(4): 686–688.
- [13] Khudyakov Y, Kamili S. Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res*, 2011, 161(1): 84–92.
- [14] Nelson KE, Kmush B, Labrique AB. The epidemiology of hepatitis E virus infections in developed countries and among immunocompromised patients. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2011, 9(12): 1133–1148.
- [15] Rakesh A, Shahid J. Hepatitis E. *Hepatology*, 2011, 54(6): 2218–2226.
- [16] Ghezeldasht SA, Miri R, Hedayatimoghadam M, et al. Population movement and virus spreading: HEV spreading in a pilgrimage city, Mashhad in Northeast Iran: an example. *Hepat Mon*, 2013, 13(8): e10255. doi: 10.5812/hepatmon.10255.
- [17] Parvez MK. Chronic hepatitis E infection: risks and controls. *Intervirology*, 2013, 56: 213–216.
- [18] Zekavat OR, Makarem A, Karami MY, et al. Serological investigation for hepatitis E virus infection in the patients with chronic maintenance hemodialysis from southwest of Iran. *Asian J Transfus Sci*, 2013, 7(1): 21–25.
- [19] Kapur N, Thakral D, Durgapal H, et al. Hepatitis E virus enters liver cells through receptor-dependent

clathrin-mediated endocytosis. J Viral Hepat, 19(6): 436-448.

- [20] Zhang W, Hua Xg, Quan S, et al. Identification of genotype 4 hepatitis E virus binding proteins on swine liver cells. Virol J, 2011, 8: 482-487.
- [21] Guu TSY, Liu Z, Ye Q, et al. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. Pro Nat Acad Sci USA, 2009, 106(31): 12992-12997.
- [22] Li SW, Zhang J, Li Y, et al. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. Vaccine, 2005, 23(22): 2893-2901.
- [23] Li SW, Tang XH, Seetharaman J, et al. Dimerization of hepatitis E virus capsid protein E2s domain Is essential for virus-host interaction. PLoS

Pathog, 2009, 5(8): e1000537. doi:10.1371/journal.ppat.1000537.

- [24] He SZ, Miao J, Zheng ZZ, et al. Putative receptor-binding sites of hepatitis E virus. J Gen Virol, 2008; 89: 245-249.
- [25] He SZ, Zheng ZZ, Wu T, et al. The establishment of cellular attachment model for hepatitis E virus (HEV) and its application in the identification of HEV cellular attachment region. Chin J Virol, 2006, 22(6): 426-430 (in Chinese).  
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. 病毒学报, 2006, 22(6): 426-430.
- [26] Li TC, Yamakawa Y, Suzuki K, et al. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. J Virol, 1997, 71: 7207-7213.

(本文责编 陈宏宇)



### 《生物工程学报》专刊获《科技导报》期刊亮点推荐

《生物工程学报》2013年分别于第8期和第10期出版了“合成生物学”专刊和“生物基化学品”专刊，集中介绍了国内外在相应领域内获得的最新研究进展和科研成果。专刊发表后受到了研究者的关注，被《科技导报》列为“科技期刊亮点”，刊载在2013年(28/29)期和32期上，相关信息请见《科技导报》网站 (<http://www.kjdb.org/cn/dqml.asp>)。

科技导报 2013, 31(2829)

特别栏目 (Columns)



·科技期刊亮点·

#### 专刊推介合成生物学领域研究进展

合成生物学是通过人工设计和构建自然界中不存在的生物系统解决能源、材料、健康和环保等问题，目前该领域在全球已得到迅猛发展。

《生物工程学报》2013年9月出版的“合成生物学”专刊集中报道了国内和国际实验室的研究工作，由清华大学教授、国家“973”基础研究项目“合成生物学”首席科学家甄巍担任特邀编辑。专刊主要以综述形式介绍国内外在合成生物学领域获得的最新研究进展，包括细胞器无痕敲除方法、基因合成技术、DNA组装新方法、最小基因组的方法及分析、合成生物系统的优化等，并讨论应用合成生物学策略优化食品营养和医药、生产新型高分子材料和新技术、新型生物材料和合成生物学的成本核算等相关问题。专刊还基于相关研究说明合成生物学的应用前景，包括复杂天然产物合成或人工生物系统的设计与构建、微生物替代制造过程改造制备生物基化学品以及构建细胞工厂工程合成重要药物。

(生物工程学报) [2013-08-25]

#### 设计塑料光纤通信 650nm 单片集成光接收芯片

厦门大学蔡肇学设计了一种用于塑料光纤通信的650nm单片集成光接收芯片。

该芯片包括光电探测器、跨阻放大器、差分驱动电路、激光驱动电路、输出缓冲器及高压补偿电路。研究人员基于合理假设与近似，从稳态连续方程和边界条件出发，分析了探测器的光谱响应；采用拉普拉斯变换方法，分析其频率响应。采用0.5μm BCD工艺流片，光接收芯片版图面积 832×943μm<sup>2</sup> 进行测试，结果表明：5V反向偏压时，探测器的响应度为0.26AW，光接收带宽在150Mbps速率下误码率小于10<sup>-4</sup>情况下，灵敏度为-14.04dBm，在100Mbps串并转换机二进制序列信号速率及误码率小于10<sup>-4</sup>情况下，能得到清晰的图形。

(光子学报) [2013-09-25]

科技导报 2013, 31(32)

特别栏目 (Columns)



·科技期刊亮点·

#### 专刊推介生物基化学品领域研究工作

生物基化学品 (Biosourced chemicals) 是指以可再生生物质为原料生产的可降解的化工产品。生物基化学品由于摆脱了对不可再生资源(石油、煤和天然气等)的依赖，避免或减少了温室气体的排放，被认为是实现可持续发展的主要方向，该领域的研究已成为世界科技前沿。

为了推动生物基化学品领域的学术交流，为相关研究人员提供学术平台，《生物工程学报》2013年10月出版了“生物基化学品”专刊，由中国科学院过程工程研究所甄巍研究员担任特邀编辑。通过特邀编辑形式介绍国内生物基化学品领域最新研究进展，包括利用木质纤维素生产生物基化学品和能源产品的一体化生物加工过程、微生物组的生产与生物转化技术、丁二酸、己二酸、乳酸、丙酮酸、乙醇等生物基化学品的合成和生产、生物基化学品的最新分离纯化技术等。此外，专刊还报道了国内学者通过代谢工程和发酵调控等手段提高了二糖-D-甘露糖、半乳糖、5-氨基乙烷丙酸、1,3-丙二醇和丁醇产量取得的研究成果。

(生物工程学报) [2013-10-25]

#### LIF 分子级化影响有机发光二极管管壁效应

西安大学物理科学与技术学院甄磊等研究了 LIF 分子级化对有机发光二极管管壁效应的影响。

研究发现，在常规有机发光二极管管壁中掺入 LIF 可以有效抑制管壁在不同温度下电致发光光谱红移现象。与未掺 LIF 的器件相比，掺 LIF 器件管壁的磁致发光光谱红移现象得到了明显抑制。在低温下，器件加磁后磁致发光光谱红移得到了明显抑制，管壁器件的磁致发光光谱红移增加几倍甚至十几倍，且表现出与器件的管壁效应。

此外，随 LIF 掺杂浓度的增大，电流与光亮度响应的幅度均表现出先增加后降低的变化趋势。掺 LIF 器件与未掺 LIF 器件管壁的磁致发光光谱红移现象的对比，是 LIF 抑制管壁内电场中发生分子级化的结果。此外，专刊还报道了国内学者通过代谢工程和发酵调控等手段提高了二糖-D-甘露糖、半乳糖、5-氨基乙烷丙酸、1,3-丙二醇和丁醇产量取得的研究成果。

(科学通报) [2013-10-30]