

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 14/005

C12N 15/51 C12N 15/63



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00813582.7

[43] 公开日 2003 年 1 月 15 日

[11] 公开号 CN 1391579A

[22] 申请日 2000.9.28 [21] 申请号 00813582.7

[30] 优先权

[32]1999.9.30 [33]CA [31]2,283,538

[86] 国际申请 PCT/IB00/01393 2000.9.28

[87] 国际公布 WO01/22916 英 2001.4.5

[85] 进入国家阶段日期 2002.5.14

[71] 申请人 养生堂有限公司

地址 570216 海南省海口市金盘工业区金牛路
6 号

[72] 发明人 吴文翰 严弘杰 张纪忠

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 樊卫民

权利要求书 4 页 说明书 62 页 附图 24 页

[54] 发明名称 新的 HEV 抗原肽及方法

[57] 摘要

本发明公开了一种高度免疫反应性的病毒肽 pE2,其来自戊型肝炎病毒(HEV)基因组 ORF2 区羧基末端的区域。新 pE2 肽的独特特征在于其具有构象型抗原决定簇。所述抗原决定簇仅在该肽单体与另一单体通过非共价相互作用结合,天然形成同型二聚体时才暴露。已证明新 pE2 肽与来自患有或过往感染 HEV 的患者血清有高反应性,提示该同型二聚体可模拟 HEV 衣壳蛋白的某些结构特征。此外,pE2 肽的抗原活性本质上是严格构象限制性的,因此仅当肽以二聚形式存在时才显示免疫化学活性。因此,一旦二聚体解离则抗原活性丧失,但当单体重新结合成二聚体后活性恢复。此外,还公开了用于检测和诊断 HEV 感染的诊断方法,以及有效防止戊型肝炎病毒感染的疫苗组合物,其中利用了该新型 pE2 肽。

1. 一种纯化和分离的肽 pE2, 包括由 SEQ ID NO:2 确定的氨基酸序列, 或具有与 pE2 肽相似的抗原性质的同源序列、片段或其类似物。
2. 一种重组融合蛋白, 包括融合于权利要求 1 所述的氨基酸序列的异源氨基酸序列。
3. 根据权利要求 2 的重组融合蛋白, 其特征在于异源氨基酸序列编码谷胱甘肽 S-转移酶。
4. 一种产生如权利要求 1 所述的 pE2 肽的方法, 其可通过化学合成或重组 DNA 表达。
5. 一种纯化和分离的核酸分子 E2, 包括由 SEQ ID NO:1 确定的 DNA 序列, 或其同源序列或片段。
6. 一种纯化和分离的核酸分子, 包括编码权利要求 1 所述的 pE2 肽的 DNA 序列。
7. 一种纯化和分离的核酸分子, 包括由 SEQ ID NO:3 确定的序列。
8. 一种含有权利要求 5 或 6 的核酸分子的载体, 其特征在于一旦将载体导入一种合适的宿主细胞或微生物, 其能够表达核酸分子。
9. 根据权利要求 8 的载体, 其特征在于载体是一种质粒。
10. 根据权利要求 8 的载体, 其特征在于宿主细胞是真核细胞。
11. 根据权利要求 10 的载体, 其特征在于真核细胞是大肠杆菌。
12. 一种用权利要求 8-11 所述的任何一种载体转化的宿主细胞或微生物。
13. 一种用于产生如权利要求 1-3 所述的任何一种肽或蛋白的方法, 包括将编码这种肽或蛋白的核酸分子插入一种载体构建体, 使它能够在一种合适的宿主细胞或微生物中表达, 用此载体构建体转化宿主细胞或微生物, 培养转化的宿主细胞或微生物, 并且分离和纯化得到的肽或蛋白产物。

14. 一种产生针对权利要求 1-3 所述的任何一种 pE2 肽之纯化的抗体的方法，包括将 pE2 肽以免疫学有效剂量注射到一种非人的哺乳动物宿主中，分离和纯化产生的抗体。

15. 一种纯化的抗体或其片段，其由如权利要求 1-3 所述的任何一种 pE2 肽刺激产生。

16. 一种用于针对戊型肝炎病毒感染的免疫个体的疫苗组合物，包括如权利要求 1-3 所述的任何一种 pE2 肽，以及一种药理学上可接受的载体。

17. 如权利要求 13 所述的疫苗组合物的应用，用于免疫个体防止戊型肝炎病毒的感染。

18. 一种在生物学测试样品中检测 HEV 抗体存在与否的方法，包括：

- 提供一种纯化和分离的肽 pE2，其包括由 SEQ ID NO:2 表示的氨基酸序列，或具有与 pE2 肽相似抗原性质的同源序列、片段或其类似物；
- 使怀疑带 HEV 抗体的生物学测试样品与 pE2 肽接触。
- 在足够允许形成一种免疫复合物（抗原-抗体）的条件下，孵育得到的混合物；
- 检测混合物以确定这种免疫复合物的存在，由复合物的形成表明测试样品中 HEV 抗体的存在。

19. 根据权利要求 18 的方法，其特征在于生物学测试样品是人的血液、血清或血浆。

20. 根据权利要求 18 或 19 的方法，其特征在于在允许反应发生的条件下与一种指示剂孵育后确定免疫复合物的存在与否。

21. 根据权利要求 20 的方法，其特征在于指示剂是一种与酶偶联的哺乳动物抗人免疫球蛋白，其中酶与底物反应形成一种有颜色的产物。

22. 一种用于检测抗戊型肝炎病毒（HEV）抗体的诊断检测试剂盒，包括：

- 一种纯化和分离的肽 pE2, 其包括由 SEQ ID NO:2 表示的氨基酸序列, 或具有与 pE2 肽相似抗原性质的同源序列、片段或其类似物;

- 一种指示剂, 其能够检测一种带有 pE2 肽的免疫复合物 (抗原-抗体)。

23. 根据权利要求 22 的诊断检测试剂盒, 进一步包括:

- 对照标准;
- 样品稀释液和/或洗涤缓冲液。

24. 根据权利要求 22 或 23 的诊断检测试剂盒, 其特征在于 pE2 肽固定于一种固相支持物上。

25. 根据权利要求 24 的诊断检测试剂盒, 其特征在于固相支持物是滴定微孔板的壁。

26. 一种用于检测生物学测试样品中戊型肝炎病毒病毒颗粒的方法, 包括:

- 提供如权利要求 15 所述的纯化的抗 pE2 抗体;
- 在允许含有抗 E2 抗体和 HEV 病毒颗粒的复合物形成的条件下, 使抗 pE2 抗体与生物学测试样品接触并孵育;
- 检测混合物以确定复合物的存在与否, 复合物的形成表明测试样品中 HEV 病毒颗粒的存在。

27. 根据权利要求 26 的方法, 其特征在于由抗 pE2 抗体捕获的 HEV 病毒颗粒的存在, 是通过提取病毒 RNA 以及应用反转录聚合酶链反应检测。

28. 一种检测生物学测试样品中戊型肝炎病毒分析物的诊断试剂, 包括权利要求 15 所述的纯化的抗 pE2 抗体。

29. 如权利要求 15 所述的纯化的抗 pE2 抗体的应用, 作为检测生物学测试样品中戊型肝炎病毒分析物的诊断试剂。

30. 一种用于检测生物学测试样品中戊型肝炎病毒分析物的诊断检测试剂盒, 包括权利要求 28 中所述的诊断试剂。

31. 根据权利要求 30 的诊断检测试剂盒, 其特征在于纯化的抗

pE2 抗体固定于一种固相支持物上。

32. 一种抗原决定簇，其特征在于这种抗原决定簇能够被感染了戊型肝炎病毒的病人血清中的 HEV 抗体免疫识别，也能够被权利要求 15 所述的抗 pE2 抗体免疫识别。

33. 一种用于检测生物学测试样品中戊型肝炎病毒抗体的存在与否的诊断试剂，其特征在于诊断试剂包括一种蛋白、多肽或肽，其具有与权利要求 1 所述的 pE2 肽相同的一个或多个抗原决定簇，其能够被抗 pE2 肽的抗体所识别。

新的 HEV 抗原肽及方法

本发明涉及克隆自戊型肝炎病毒 (HEV) 中国株基因组的、具高度免疫反应性的病毒肽 pE2, 以及它在为 HEV 的检测和诊断而研制的可靠诊断方法方面的应用, 以及在预防人类 HEV 的疫苗组合物中的应用。

发明背景

戊型肝炎病毒 (HEV) 首次发现于 1983 年, 它引起肠道传播的肝炎 (Balayan 等人, 1983)。1991 年, 病毒的全长基因组首次获得克隆及测序, 发现它是一条单股正链有义无包膜的 RNA (Tam 等人, 1991)。虽然 HEV 在形态上与杯状病毒科的成员相似 (Bradley 等人, 1988; Huang 等人, 1992; Panda 等人, 1989), 但其具有独特的基因组组成 (Berke 等人, 1997)。基于序列分析, 推测 7.2kb 的病毒基因组包含三个开放读码框架 (ORF) (图 1) (Tam 等人, 1991; Aye 等人, 1992; Aye 等人, 1993; Huang 等人, 1992; Reyes 等人, 1993)。非结构病毒蛋白由位于病毒基因组 5' 端的 ORF1 编码成多聚蛋白质。ORF2 位于基因组的 3' 端, 编码一个主要结构蛋白质。ORF3 的 5' 端有一个碱基与 ORF1 的 3' 端重叠, 3' 端有 339 个碱基与 ORF2 的 5' 端重叠。ORF3 被认为编码另一功能尚未知的结构蛋白质。通过表位作图和重组肽研究, 表明线性抗原表位位于 ORF2 和 ORF3 (Coursaget 等人, 1993; Khudyakov 等人, 1993; Khudyakov 等人, 1994)。

最近的研究表明, 来自 ORF2 区域的主要 HEV 结构蛋白的氨基端和羧基端的截短的重组多肽能自组装成病毒样颗粒 (Li 等人, 1997)。虽然体积较小, 这些病毒样颗粒在形态和抗原性方面与感染病毒的衣壳蛋白相似 (Li 等人, 1997; Xing 等人, 1999)。基于这些发现,

表明重组肽装配成病毒样颗粒与全长 HEV 结构蛋白装配成感染病毒颗粒的大衣壳具有相似的必要条件。很显然，这些发现提示仅仅是 ORF2 编码的结构蛋白可能已经足够自组装成病毒衣壳。而且显示涉及衣壳蛋白自身形成的相互作用可能发生在全长 ORF2 蛋白的 112 至 608 氨基酸残基区域内 (Xing 等人, 1999)。位于主要结构蛋白氨基端的 111 个氨基酸序列，等电点高达 12.35，被认为涉及病毒基因组的包装 (Briton 和 Heinz, 1990)，但是这一区域显然不直接参与病毒衣壳自身的组装。主要结构蛋白的羧基端同样不直接参与病毒衣壳的组装，但是 Li 等人 (1997) 已显示这一区域的蛋白切割是病毒样颗粒组装的关键。

戊型肝炎主要发生于发展中国家，有流行和散布发生两种形式。几次大的戊型肝炎暴发发生于 1950 年代到 1980 年代，由粪便污染的饮用水而引起 (Visvanathan, 1957; Wong 等人, 1980; Myint 等人, 1985; Belabbes 等人, 1985; Hau 等人, 1999)。感染通常是自我限制的，但是也有在怀孕期间发生感染而产生严重并发症的报道 (Tsega 等人, 1992; Dilawari 等人, 1994; Hussaini 等人, 1997)。用于防止病毒感染的一个重要的预防策略就是环境样品的监控和检测，以保证公共卫生安全和环境保护。但是目前用于采集和浓缩病毒颗粒的传统方法具有几个众所周知的缺点，限制了潜在来源的 HEV 的调查和发现。目前最通用的两种方法是吸附法和离心法。

在吸附法中，首先将测试样品吸附于微孔滤膜而浓缩病毒，然后用大体积的洗脱液进行洗脱。但是这种技术同时也有效地浓缩了一些别的溶解物，如腐殖酸和蛋白质，它们可能干扰病毒的检测。特别是，很多天然产生的无机和有机溶质抑制用于扩增靶基因组的核酸聚合酶 (如反转录酶和 Taq 聚合酶) (Tsai 等人, 1992; 1993)。存在于测试样品中的核酸酶和蛋白酶可能在扩增病毒基因组之前而使之降解，因此而产生模棱两可的结果。此外，多种蛋白质、糖类和其它有机化合物可能结合镁离子和核苷酸，而这些是核酸聚合酶发挥适当功能所必须的，而且其它溶质可能存在毒性影响，可能彻

底破坏这些聚合酶的活性(Demeke 和 Adams, 1992; Lmai 等人, 1992; Kolk 等人, 1992)。

在离心法中, 将测试样品匀浆, 然后重复离心。在处理过程中, 将聚乙二醇(PEG)加入到上清液中然后再离心。最后的沉淀重悬于缓冲液中, 但是最终的浓缩物仍然含有有毒物质, 这些有毒物质可能干扰诊断方法的后续步骤, 如细胞培养、反转录和聚合酶链式反应(Beril 等人, 1996)。因此, 必须通过葡聚糖凝胶过滤对来源于测试样品的浓缩物进行脱毒。

用于防止病毒感染的另外一种重要策略就是应用疫苗产生抗 HEV 的免疫, 以保证公共卫生安全和保护。但是迄今不可能用活的减毒的或杀死了的病毒颗粒来制备疫苗, 防止 HEV 感染, 因为在培养细胞中繁殖病毒有很大的困难。作为另一种解决的方法, 已证明一些重组 HEV 多肽, 特别是那些来源于病毒基因组结构基因的重组 HEV 多肽, 更有希望提供保护而防止感染 HEV (Tsarev 等人, 1994a; Tsarev 等人, 1997)。与减毒病毒相比, 用重组多肽制备疫苗的优点在于, 多肽可以更为有效地生产而且易于纯化。而且, 产生的疫苗不可能带有任何活的完整病毒颗粒, 因此避免了潜在的感染危险。

综上所述, 始终需要一种检测和诊断 HEV 的可靠方法, 其不仅避免前面所述的缺点, 又能为生物和环境样品的 HEV 检测提供一种更为灵敏的分析测定。根据本发明, 提供了一种诊断方法, 该方法使用一种具有高度抗原反应性的重组病毒肽 pE2, 该肽来源于戊型肝炎病毒(HEV)基因组的 ORF2 的羧基末端区域, 已证明该多肽与正在感染或感染过 HEV 的病人的血清有很高的反应性。另外, pE2 肽的部分氨基酸序列在其它 HEV 分离株中高度保守, 从而与戊型肝炎病毒具有抗原相关性。正如本发明所描述及进一步说明的, pE2 肽的抗原特性使它成为 HEV 感染的免疫和预防疫苗的极佳候选者。相应地, 本发明提供应用新的 pE2 肽检测 HEV 感染的诊断方法, 以及包含 pE2 肽的有效预防 HEV 感染的疫苗组合物。

发明概述

本发明的一个目的是提供一种戊型肝炎病毒(HEV)肽 pE2, 由于其存在的构象型抗原决定簇只有当 pE2 单体二聚化形成同型二聚体的时候才暴露出来, 因此与感染了戊型肝炎病毒的个体的血清有高度的免疫反应性。

本发明的另一个目的是提供一种改进的、更为可靠的诊断方法, 通过检测临床或生物测试样品中的 IgM 和 IgG 抗体来测定现在的以及过去的 HEV 感染。因为 pE2 二聚体结合 HEV 抗体的高度特异性和敏感性, 其中掺入了 pE2 二聚体为一种免疫试剂。

本发明的另一个目的是提供一种监测和检测公共卫生和环境研究的、改进的以及更可靠的诊断方法, 该方法用针对 pE2 二聚体的高度特异性的抗体, 能有效地捕获、分离和浓缩测试样品中的 HEV 颗粒, 避免了其它传统方法的缺点。

本发明的另一个目的是提供一种疫苗组合物, 其中包含 pE2 二聚体, 其用途在于 HEV 感染的免疫和预防。

如表 1 所示, 虽然不同 HEV 分离株之间的核苷酸同源性在 77% 至 100% 之间, 这些突变在自然界中通常是保守的, 其氨基酸序列具有高度同源性。HEV 不同分离株之间显示的 HEV 基因组保守性提示(1) pE2 肽可能是 HEV 结构蛋白的一个重要的功能域; (2) 掺入 pE2 肽的诊断测试在检测 HEV 不同分离株时可能具有优越性; (3) 由 pE2 肽制备的疫苗可能对不同的 HEV 分离株都具有保护性。

表 1 HEV 主要结构蛋白的一个保守区域

毒株	区域	序列同源性 (%)		参考文献
		核苷酸	氨基酸	
D11092	中国	100	100	Aye 等人, 1992
D10330	中国	92.6	98.6	Aye 等人, 1993
L25547	中国	94.1	99.5	Yin 等人, 1994
M73218	缅甸	92.9	100	Tam 等人, 1991
M74506	墨西哥	78.2	94.3	Purdy 等人, 1999
M80581	巴基斯坦	98.3	100	Tsarev 等人, 1992
M94177	中国	98.6	99.5	Bi 等人, 1994
X98292	印度	89.7	99	Donati 等人, 1997
M74506	墨西哥	78.2	94.3	Huang 等人, 1992
AF035437	美国	76.7	92.9	Schlauder 等人, 1998

根据本发明, 提供了一种具高度免疫反应性的病毒肽 pE2, 其来源于戊型肝炎病毒 (HEV) 基因组的 ORF2 的羧基末端区域, 包括如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。pE2 肽的一个特殊特征是它拥有的构象型抗原决定簇, 只有在肽的单体间非共价相互作用而自然形成同源二聚体后才暴露出来。而且, 本发明提供这个高度免疫反应性的结构性 pE2 肽的克隆和表达, 以及其纯化和特性的描述。

本发明涉及的 HEV 肽, pE2, 来源于上述 HEV 主要结构蛋白的区域, 该主要结构蛋白直接参与病毒衣壳的组装。从 ORF2 核苷酸序列的羧基区域翻译出来, pE2 肽最初有 267 个氨基酸残基, 在长度上与全长蛋白的羧基端区域一致。基于相似的多肽图谱研究 (Khudyakov

等人,1993;Khudyakov 等人,1994),认为在多肽的氨基和羧基端都有线性表位。但是,在克隆序列中的移码突变导致在原来 cDNA 序列的上游出现一个新的终止密码,而使翻译提前终止,产生一个只有 213 个氨基酸残基长度的小肽(图 2)。

pE2 肽的性质研究表明,在其羧基端的截短有效地去除了抑制病毒样颗粒自组装的羧基区域。其结果是 pE2 肽单体之间通过二聚体化而相互作用,因而天然产生了同型二聚体。pE2 肽的二聚体形式被 HEV 反应性人血清强烈识别,提示同型二聚体可能模拟了 HEV 衣壳蛋白的某种结构特征。因此,pE2 肽的二聚体化而带来的构象型抗原决定簇使其与其他研究者报导的细菌表达的 HEV 多肽区别开来(Yarbough 等人,1991;Purdy 等人,1992;Li 等人,1994;Li 等人,1997)。以前报道的 HEV 多肽的抗原活性主要在于它们各自的一级结构的线性表位,而本发明的 pE2 肽的抗原活性主要与同型二聚体的四级结构相关。相应地,pE2 肽的抗原区域明显不同于上述存在于 ORF2 区域的氨基端的线性表位,因为以前从未有过类似的构象型抗原决定簇的描述或多肽图谱推测。

如本文证明及描述,在新的 pE2 肽中存在两种不同类型的抗原活性。第一种类型的抗原活性与 pE2 肽的单体形式相关,它与迄今为止描述的其它细菌表达的 HEV 抗原多肽具有相似的活性类型(Yarbough 等人,1991;Purdy 等人,1992;Li 等人 1994)。这种类型的抗原活性主要来自于位于各种多肽一级结构的线性表位,其活性可能受到各种多肽在水溶液中不同构象如二级和三级结构的影响(Li 等人,1997)。但是 pE2 肽的第二种也是更突出的抗原活性是与多肽的二聚体形式相关,而且发现它比其单体形式具有更高的免疫反应性。实验研究表明,pE2 二聚体与 HEV 人的血清的抗体反应水平通常比 pE2 单体的反应水平高很多。这种新型的抗原活性,到目前为止未见报道,其抗原活性主要在于 pE2 同型二聚体的新的构象型抗原决定簇。而且,当二聚体解聚时其抗原活性下降,一旦单体重新形成二聚体,其活性亦得到恢复。这种行为表明与构象型抗原决

定簇相关的抗原活性，与 pE2 二聚体的形式或四级结构相关，而 pE2 二聚体或四级结构是来自 pE2 单体之间的非共价相互作用形成的同型二聚体。

E2 的 DNA 序列

根据本发明的一个方面，提供一种纯化的核酸分子 E2，编码构象型肽 pE2，包括其 cDNA 序列（见 SEQ ID NO:1），以及其它任何同源的序列或片段。

E2 核苷酸序列最初分离自戊型肝炎病毒（HEV）中国株 D11092 的 HEV 基因组的 ORF2 区域的羧基末端（图 2）。最初克隆的序列包含 811 个碱基对长度，分布于 6326 至 7136 位核苷酸之间，在 7127-7129 位带有一个终止密码，在 6957 位包含一个单碱基对的无意删除，推测是由 PCR 扩增错配引起（图 2）。结果导致移码突变使得核苷酸序列的翻译在一个新的终止密码（位于 6966-6968）处提前终止。核苷酸序列的翻译导致产生和发现了新的 pE2 肽和新的 E2 核苷酸序列（即 SEQ ID NO:1），编码区包括 642 个碱基对。相应地，参照图 2，新的 E2 核苷酸序列位于 6326-6968 位碱基，其中位于新的终止密码下游即 6968 位之后的序列片段被去除，在 6957 位发生了一个单碱基对删除。

本领域技术人员知晓由于遗传密码的简并性，不只一个密码可编码序列 SEQ ID NO:2（即 E2）的任何一个氨基酸残基，因此除了序列 SEQ ID NO:1（即 E2）之外，还可以产生很多种不同的核酸序列，它们同样编码 pE2 肽。相应地，本发明包括任何一种核苷酸序列的突变型，这些突变型可以基于可能的密码子选择而合成，还包括 SEQ ID NO:1 的互补核苷酸序列。这些化合物根据标准的三联体遗传密码制备，如同 pE2 肽核苷酸序列所用的标准的三联体遗传密码，所有这些突变型都认为被特别公开。

而且，可被制备的多种 pE2 肽衍生物或抗原性等同物，包括例如各种替换、插入、删除或延长，其最终结果不改变 pE2 肽的免疫

反应性。因此，编码具 pE2 肽免疫学活性衍生物的核苷酸序列也是本发明的一部分。制备这些衍生物的方法可能很容易地通过任何本领域的普通技术而实现（Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册，第二版，冷泉港实验室印刷，Plainview, NY, 1989）。根据本发明，编码 pE2 肽或抗原性等物质的氨基酸序列的任何核苷酸序列，能够用于产生表达 pE2 的重组分子。

pE2 氨基酸序列

根据本发明的另一方面，提供一种构象型的 HEV 多肽抗原 pE2，包括一种 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，或者其同源序列、片段、或其类似物。

已知确定一种多肽三维结构的信息完全存在于其氨基酸序列。而且，包含决定特异构象性表位氨基酸的序列各部分可能广泛地分散在整个分子中，之间为间隔序列。基于推测的多肽的三级（和四级）结构，构象型表位的三维坐标因为多肽一级结构的三维折叠而最终形成其正确结构。相应地，预计氨基酸序列可以进行一定程度的、基于多肽结构组织高水平的改造，这种改造基本上不会改变多肽的构象型结构和免疫化学反应性。因此，位于决定不同表位的残基基团之间的多肽片段即这些间隔序列，其内部的延伸、删除、插入、残基替换，可能不会显著改变表位的形成。

此外，根据一种序列包含的氨基酸残基的化学特性决定一个特殊的表位，用具有相似功能基团的残基替换可能不会改变多肽的免疫化学反应性。考虑到这点，预计只要 pE2 肽的免疫化学反应性保留，仍然能被抗 pE2 抗体识别，氨基酸序列中的多种氨基酸可以被删除、插入或用其它氨基酸残基替换，而得到衍生物。当然这是假设组合的特殊改变在其应用上提供了优越性，如涉及不同的 HEV 分离株（表 1）之间的株与株之间差异。此外，本发明范围预期的氨基酸替换指那些替换残基的化学性质与原来的氨基酸相似。基于其功能基团，一般认为氨基酸有相似的化学特征，因此包括组合

如:Gly/Ala; Asp/Glu; Asn/Gln; Val/Ile/Leu; Ser/Thr;Lys/Arg; 和 Phe/Tyr。这些 pE2 肽衍生物可能还包括 SEQ ID NO:2 决定的氨基酸序列的延伸、替换、插入和/或删除,只要它们对 HEV 抗体的免疫化学反应性保留。当多肽能被抗 pE2 肽的相同抗体所识别,亦可认为二者有相同的免疫化学反应性且在本发明的范围内。

pE2 肽的制备

本发明的 pE2 肽通过本领域已知的方法产生,并提供目的蛋白的构象型表位,这些方法包括化学合成法和重组 DNA 技术。制备 pE2 肽的优选方法是在一种宿主细胞中表达重组 DNA,然后分离纯化多肽。根据本发明,编码 pE2 肽、多肽片段、融合蛋白或其它功能等同物的核苷酸序列,可能用于重组 DNA 分子,并在合适的宿主细胞中指导 pE2 肽的表达。为了表达一种具免疫学活性的 pE2 肽,编码 pE2 的核苷酸序列(即 SEQ ID NO:1),或编码其功能等同物的核苷酸序列,被插入到一种合适的表达载体,此载体带有插入编码序列转录和翻译所必需的元件。根据所选择的宿主细胞,表达载体一般含有影响 DNA 序列表达的 DNA 调控元件,通常包括一种启动子、核糖体结合位点、翻译起始和终止位点,以及转录终止位点。

因此根据本发明的另一方面,提供一种本发明制备 pE2 肽的方法,包括从 HEV 基因组中分离 cDNA 序列,将此 cDNA 序列插入到一种能在合适的宿主细胞中进行表达的表达载体,然后用表达载体转化宿主细胞,培养转化了的宿主细胞,以及分离和纯化 pE2 肽。

对本领域技术人员而言众所周知的方法,可用于构建含有 pE2 编码序列的表达载体,以及合适的转录或翻译调控元件。上述获得的目的 cDNA 序列可以用已知及标准的技术插入到一种表达载体(Sambrook 等人,1989 and Ausubel 等人,1989)。表达载体通常用限制性内切酶切割,cDNA 序列用平端或粘端连接插入。通常是在表达载体的方便位置的限制性位点进行切割,一旦插入,该 cDNA 序列即位于影响其表达的 cDNA 功能元件的控制之下。宿主细胞的转化和

培养以及多肽的分离也可以用标准的技术进行。

在细菌系统中，可以根据要表达的目的多肽或蛋白来选择多种表达载体。例如，当需要表达大量的多肽或蛋白用以产生抗体时，需选择能达到高的融合蛋白表达水平且易于纯化的载体。根据本发明的相关方面，提供一种带有 E2 核酸序列（如 SEQ ID NO:1 所示）表达载体，该核酸序列编码 pE2 肽，该载体能表达 E2 核酸序列。该表达载体适于在一种细菌系统中表达，以大肠杆菌为佳，包括但不限于多功能的大肠杆菌克隆和表达载体 pGEX (Promega, Madison, 威斯康星州)。在这个特殊的载体中，pE2 编码序列在其 5' 端被符合读框地连接到载体中谷胱甘肽 S 转移酶（GST）异源序列的 3' 端，得到的杂合多聚核苷酸序列表达为融合蛋白。通常，这种融合蛋白是可溶性的，而且通过吸附到谷胱甘肽-琼脂糖珠，然后用自由谷胱甘肽洗脱而从裂解细胞中纯化出来。这种系统制备的蛋白被设计成包含了剪切位点，因此克隆的目的多肽可能通过加入合适的蛋白酶如凝血酶而从 GST 部分释放出来。

因此，根据本发明的优选实施方案，提供一种表达融合蛋白 GE2 的质粒，GE2 包括 HEV 肽 pE2（序列为 SEQ ID NO:2），其融合于谷胱甘肽 S 转移酶（GST）多肽。将 E2 核酸序列（SEQ ID NO:1 所示）插入一种 pGEX₂₀ 表达载体，使 E2 核苷酸序列的开放读码框架与 GST 的开放读码框架相符合。本发明的质粒包括位于 6326-7136 位的 811 个碱基对的序列（图 2），终止密码位于 7127-7129 位。但是，推测由于 PCR 扩增错误引起的在 6957 位的单一碱基对的删除，导致移码突变，引起核苷酸序列的翻译在一新的终止密码子（6966-6968 位）处提前终止，结果产生新的 pE2 肽。相应地，这一新的 E2 序列分布于 6326-6968 位，在 6957 位有一单碱基对删除，在 6968 位之后、新终止密码下游的片段被去除（图 2）。克隆的 E2 序列编码新的 pE2 肽，有 642 个碱基对，其序列确定为 SEQ ID NO:1。

GE2 蛋白

分离的 GE2 融合蛋白质，含有完整的、融合于全长 GST 多肽的 pE2 肽，共约 92kD。但是，本发明的 GE2 融合蛋白质可以含有 pE2 肽的较小部分，该部分仍具有免疫原性，因此 GE2 融合蛋白质预计可以小于 92kD。本文描述的融合蛋白质 GE2，在 pE2 氨基酸序列和 GST 或异源物、蛋白序列之间含有一个剪切位点，将融合蛋白结合于谷胱甘肽葡聚糖 4B 柱，再用凝血酶剪切，使得 pE2 肽从异源物中纯化出来。而且，除了纯化和表征目的，GE2 多肽也用于在合适的宿主细胞中指导和确证 pE2 肽的表达，以及制备针对 pE2 肽表位的特异多克隆抗血清或单克隆抗体。反过来，用分离的 GE2 多肽免疫哺乳动物制备的多克隆抗血清或单克隆抗体，有利于测定生物学测试样品中 HEV 颗粒的存在。

pE2 作为一种诊断试剂

此处提供的构象型 pE2 肽可以在诊断测定中用作免疫试剂，用于筛选生物学测试样品中的 HEV 抗体的存在，帮助从业者或临床医生检测或诊断 HEV 感染。相应地，本发明提供用 pE2 肽检测生物学测试样品中抗 HEV 抗体的免疫化学方法。本质上，可以应用任何一种免疫检测形式，其设计都是用 pE2 作为一种捕获抗原来检测抗 HEV 抗体。进行免疫检测的方法在本领域是众所周知的，本发明不限于任何一种特定的免疫测定。可以用于均相和非均相免疫测定。

通常而言，怀疑带有 HEV 抗体的生物学测试样品与 pE2 肽接触，并在允许反应发生的条件下孵育一段时间。pE2 肽最好连在一种合适的固相支持物上。如果 HEV 抗体存在于测试样品中，它们将与 pE2 肽形成一种免疫学复合物（抗原-抗体复合物），并连在固相支持物上。可以选择用缓冲洗涤液洗涤固相支持物，去除任何未结合的成分，这样在一定程度上可以帮助提高检测的敏感度。洗涤之后，免疫学复合物与一种指示试剂反应，并在第二种复合物形成的条件下孵育一定时间。免疫学复合物可以用任何一种已知的技术检测，依测定形式的不同而异。例如，一种抗哺乳动物免疫球蛋白与一种标

记或产生信号的成分（如一种酶）的偶联物通常用作指示剂。免疫学复合物的存在证明了测试样品中抗 HEV 抗体的存在，并通过检测产生的信号而确定。对很多种指示剂而言，抗体存在的量通常与产生的信号成比例。测试样品中免疫复合物的存在可以直观地或机械地检测，如用自动化扫描和解释装置。

合适的固相支持物将依赖于所采用的免疫检测形式的类型，但是期望选择的支持物类型有合理的强度而且不会干扰免疫学复合物的免疫反应性，也不会从产生信号的成分中产生出可检测的信号。固相支持的例子包括微孔反应板的壁、试管、薄片（sheets）、平板、载玻片、珠子（如聚苯乙烯或玻璃）、硝酸纤维条或膜、小颗粒如乳胶颗粒、玻璃或塑料芯片，以及其它。

用于检测一种免疫复合物形成的标记或产生信号的成分，将允许通过沉淀的产生或颜色变化而进行直观检测，也可以通过显微镜直观检测，或者通过光谱测定、放射测定而自动检测，或者类似的检测方法。产生信号的成分的例子包括胶体金、荧光化合物、发光化合物、一种染料、放射性元素、酶（如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶和 β 半乳糖苷酶）以及增强化合物（如生物素、抗生物素和亲和素）。

相应地，本发明的另一方面提供一种生物测试样品中 HEV 抗体的诊断或检测方法，包括以下步骤：

- 提供一种 pE2 肽，其包括由 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，或同源序列、片段或其类似物，其特征在于 pE2 肽被优选地固定于一种固相支持物上；
- 在允许 pE2 肽和抗 HEV 抗体之间形成免疫复合物（抗原-抗体）的条件下，使 pE2 肽与生物学测试样品接触并孵育；
- 可能地从得到的混合物中去除未结合的成分；
- 将得到的混合物与一种指示剂孵育；
- 检测混合物以确定免疫学复合物的存在，由免疫学复合物的形成表明测试样品中抗戊型肝炎病毒（HEV）抗体的存在。

抗 pE2 肽抗体的产生

本文所描述的方法和实例进一步证明，因为 pE2 肽呈现出的高度免疫化学反应性，与 pE2 肽特异反应的抗体可以通过本领域公知的技术产生。因为本发明的 pE2 肽的构象型抗原决定簇模拟了 HEV 衣壳蛋白的相似结构特征，pE2 肽可用于产生多克隆和单克隆抗体。而且，这些针对 pE2 肽的抗体或其它片段，作为有价值的免疫试剂，可通过分离和筛选病毒颗粒和/或抗原而证明 HEV 感染，在诊断测试的研究中有重要用途。因此，抗 pE2 抗体可用于很多临床诊断程序，包括传统的在生物学样品中检测 HEV 抗原存在的免疫检测方法，以及小样品中 HEV 病毒颗粒可被分离和浓缩的免疫捕获法。(Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1988, Cold Springs Harbor Laboratory Press)。

如果期望得到针对本发明 pE2 肽的多克隆抗体，则将肽注射到一种选择的非人的哺乳动物宿主（如小鼠、大鼠、绵羊、兔、山羊，等）中，肽最好与一种载体偶联以提高免疫反应，将产生的抗体进行回收和纯化。根据本发明的优选实施方案，哺乳动物用上述带有 HEV 构象表位的 GE2 多肽免疫。GE2 多肽是以一种可注射的制剂形式施用，因此 GE2 是与一种生理学上可接受的稀释液混合。佐剂，如福氏完全或不完全佐剂，可以包括在制剂中。制剂注射到宿主后，经过一段合适的时间，在合适的间隔期采集血浆样品以检测 HEV 病毒的抗体。当获得合适水平的活性时，采集宿主的全血。然后用标准程序如免疫亲和层析，从血浆中回收及纯化抗体。

虽然优选本发明的多克隆抗体，带有多种单克隆抗体的系统，其功能与多克隆抗体系统相同，也在本发明的范围内。针对 HEV 构象型表位的单克隆抗体也能够由本领域的技术人员容易地用本发明的 GE2 多肽产生。用永生的产生抗体的细胞系—通常叫作杂交瘤，产生单克隆抗体的一般方法是从所周知的。杂交瘤可以通过融合产生抗 pE2 抗体的细胞与一种永生的细胞而产生，永生的细胞赋予杂

交细胞以长期组织培养的能力。在杂交细胞的形成中，第一融合伴侣——产生抗体的细胞，可以是一种接种了 GE2 多肽的非人的哺乳动物宿主（如大鼠 或小鼠）的脾细胞。经过足够的时间，当宿主达到高水平的抗体反应时，摘除产生抗体的细胞。一种永生化的细胞系（如大鼠 或小鼠的骨髓瘤细胞系）的细胞，与产生抗体的细胞融合，接下来进行融合筛选以识别一种细胞系如杂交瘤，能分泌期望的单克隆抗体。产生抗体的细胞与永生细胞的融合可以用标准的程序完成（Kohler and Milstein, (1975) Nature (London) 256, 495-497; Kennet, R., (1980) in Monoclonal Antibodies (Kennet 等人, Eds. pp. 365-367, Plenum Press, NY)。融合细胞系可以进行培养，从培养液中筛选和纯化抗 pE2 的单克隆抗体与回收多克隆抗体具有相似的方法。

此外，根据本发明的另一方面，提供一种产生抗 HEV 抗原的纯化抗体的方法，其中具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的构象型 HEV 肽 pE2，或者同源序列、片段或其类似物以有效剂量被注射到一种非人的哺乳动物宿主中，收集产生的抗体。在本发明的优选实施方案中，包括 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的重组融合蛋白 GE2，被注射到非人的哺乳动物宿主中以产生期望的抗体。

抗 pE2 抗体用作捕获试剂

用本发明的 pE2 肽产生的单克隆或多克隆抗体，可以作为捕获试剂用于免疫测定中，以检测生物学测试样品中 HEV 衣壳蛋白或病毒颗粒的存在。本质上，可以使用任何一种免疫测定方式，其设计中都运用了抗 pE2 抗体作为捕获试剂。进行免疫测定的方法在本领域从所周知，本发明不限于任何一种特殊的免疫测定。

通常，因为本发明的 pE2 肽的构象型抗原决定簇模拟了 HEV 衣壳蛋白的结构特征，抗 pE2 抗体可以用于免疫捕获方法来分离和浓缩 HEV 病毒颗粒，然后通过提取病毒的 RNA 及运用反转录酶聚合酶链式反应（RT-PCR）而检测到病毒的存在。根据本发明的优选

实施方案，免疫捕获方法是用于分离和浓缩 HEV 病毒颗粒，因此抗 pE2 肽的抗血清被包被在聚苯乙烯片或者其它合适的固相吸附材料上。在检测测试样品中的小量病毒时这一方法效果很好，通过提取病毒 RNA，之后立即进行 RT-PCR，最好是巢式聚合酶链反应以确定病毒的有无。

合适的固相支持物或吸附材料将依赖于所采用的免疫测定形式的类型，但是期望选择的支持物类型有合理的强度而且不会干扰免疫学复合物的免疫反应性。固相支持的例子包括微孔反应板的孔壁、试管、薄片、平板、载玻片、珠子（如聚苯乙烯或玻璃）、硝酸纤维条或膜、小颗粒如乳胶颗粒、玻璃或塑料芯片，以及其它。

相应地，本发明的另一方面提供一种在生物学测试样品中检测 HEV 病毒颗粒（即分析物）的方法，包括以下步骤：

- 提供一种抗 pE2 肽（氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示）或同源序列、片段或其类似物的纯化抗体，其特征在于抗 pE2 抗体被优选地固定于一种固相支持物上；
- 在允许抗 pE2 抗体和任一 HEV 分析物（可能存在于测试样品中）之间形成免疫复合物的条件下，使抗 pE2 抗体与生物学测试样品接触并孵育；
- 可能地从得到的混合物中去除未结合的成分；
- 测定混合物以确定 HEV 分析物的存在与否。

诊断检测试剂盒

本文描述的新的 HEV 肽 pE2 或抗 pE2 抗体一般以诊断试剂盒的形式包装，用于 HEV 感染的检测和诊断。试剂盒通常包括作为免疫试剂的 pE2 肽或抗 pE2 抗体，分装在分开的容器中。而且，根据使用的免疫试剂和被检测的 HEV 分析的类型，试剂盒可能附带阳性和阴性对照样品、一种指示剂如标记的抗人抗体，如果标记不直接产生一种信号则附带产生信号的试剂（如以酶标记则为酶的底物）。如本文所述，术语“分开的容器”是指任何材料，能够在其中装固定

量的本发明的 pE2 肽或抗 pE2 抗体，以及其它诊断试剂盒中提供的成分。试剂盒中通常还包括进行测定的说明书。这些说明书一般描述免疫试剂的浓度，或者至少一种测定方法参数，如需混合的免疫试剂和样品的相关量、免疫试剂和样品混合的时间长度、温度、缓冲液条件及类似内容。

如果需要，本发明的 pE2 肽或抗 pE2 抗体一般可以通过被动吸附或共价偶联而固定到一种固相支持材料上，其中可采用的很多技术对本领域的技术人员而言是公知的。一种合适的支持物依赖于所进行的免疫测定形式的类型，但是期望选择的支持物类型有合理的强度而且不会干扰免疫学复合物的免疫反应性，也不会从产生信号的成分中产生出可检测的信号。固相支持的例子包括微孔反应板的孔壁、试管、薄片、平板、载玻片、珠子（如聚苯乙烯或玻璃）、硝酸纤维条或膜、小颗粒如乳胶颗粒、玻璃或塑料芯片，以及其它。

指示剂应该包括一种标记或产生信号的成分，能够通过本发明的免疫试剂和捕获的 HEV 分析物指示免疫复合物的形成。诊断试剂盒中的指示剂可以以液体分散的溶液形式提供，或者是干粉，例如以一种冻干的形式。当指示剂是用一种酶作为产生信号的成分，在诊断试剂盒的单独的容器中可以提供酶的底物。而且，用于检测一种通过抗原抗体结合引起的免疫复合物形成的标记或产生信号的成分，将允许通过沉淀的产生或颜色变化而进行直观检测，也可以通过显微镜直观检测，或者通过光谱测定、放射测定而自动检测，或者类似的检测方法。产生信号的成分的例子包括胶体金、荧光化合物（如荧光素和罗丹明）、发光化合物、一种染料、放射性元素、酶（如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶和 β 半乳糖苷酶）以及增强化合物（如生物素、抗生物素和亲和素）。

作为一检测 HEV 抗体的试剂盒的例子，本发明的预先测定的一定量的 pE2 可以固定到反应条的微孔中，从而能够通过免疫反应结合将要加入的 HEV 抗体。指示剂可以是标记的哺乳动物抗人抗体，它将识别并结合到任何一种可能存在于测试样品中的 HEV 抗体。标

记的哺乳动物抗人抗体可以用一种酶作为产生信号的成分，如酶不直接产生信号则附带提供酶的底物。

疫苗

目前因为 HEV 病毒不能成功地在培养中增殖，也就不可能产生减毒的 HEV 疫苗。现在发展的候选疫苗是由真核表达产生的主要结构蛋白的重组多肽 (Tsarev 等人, 1993a; Tsarev 等人, 1994a)。与减毒病毒相比，在疫苗组合物中使用重组多肽的优点在于，多肽的生产更为有效而纯化更为方便。此外，得到的疫苗不可能带有任何完整的病毒颗粒，因此避免了感染的危险。

已发现 pE2 肽的二聚体形式比它的单体形式具有更强的免疫原性。在一个实验研究中，抗血清由 pE2 肽免疫后得到，针对二聚体的抗体反应水平基本上高于针对单体的抗体反应水平。而且不象 HEV 反应的人血清存在 HEV 抗体特异性的广谱性，pE2 抗血清具有 HEV 抗体特异性的限定谱。但是值得注意的是，pE2 抗血清能够识别和结合 HEV 颗粒，已证明它们能够影响病毒免疫捕获的有效性。建立在 pE2 肽的二聚体形式和病毒之间的抗原相互关系在于，pE2 二聚体模拟了病毒衣壳的某种结构特征，使它在形态上和抗原性上与 HEV 衣壳蛋白相关。相应地，很有可能戊型肝炎病毒衣壳和 pE2 肽共享某种共同的抗原决定簇，特别是与 pE2 肽二聚体形式相关的新的构象型抗原决定簇。这一论点与多肽的二聚体形式通常被 HEV 反应的人血清强烈识别的发现相吻合。

根据 pE2 同型二聚体在结构上和抗原性上与 HEV 衣壳蛋白相关，使得细菌表达的多肽可作为抗 HEV 感染的潜在疫苗。而且，不同 HEV 分离株 (表 1) 的 HEV 基因组之间保守性进一步提示虽然 pE2 肽是来自于一中国分离株，也同样可能针对其它 HEV 分离株提供保护，包括最近从墨西哥和美国分离的遗传变化最大的分离株。

此外，根据本发明的另一方面，提供一种疫苗组合物，其包括 pE2 肽，序列如 SEQ ID NO:2 所示，或者同源序列、片段，或其类似

物，以及药学上可接受的载体，其在免疫接种后保护哺乳动物抵抗 HEV 的攻击。

而且，也提供疫苗的应用，其用来免疫个体以抵抗戊肝病毒的感染，其中疫苗包括 pE2 肽的免疫学有效剂量，以及药理学上可接受的载体。药理学上可接受的载体对本领域的一般技术而言是众所周知的 (Amon, R. (Ed.) 合成疫苗 1:83-92, CPC Press, Inc., Boca Raton, Fl., 1987), 包括适于作为载体的液体媒介来介导肽进入病人体内，但其本身不应引起对接受此成分的个体有害的抗体的产生。盐溶液是这类液体媒介的一个例子。此外，疫苗组合物可能还含有一种佐剂，用于刺激免疫反应而增强疫苗的效果。

“免疫学有效剂量”是指以单剂量或者是一系列中的一部分的形式，向受试者施用，如上定义，这一施用对治疗而言是有效的。这个量依不同情况而异，如需治疗的个体的健康和身体条件，个体的不同种类 (如非人哺乳动物、灵长类动物等)，个体的免疫系统合成抗体的能力，需达到的保护程度，疫苗的组成，感染的 HEV 的株系，以及其它相关因素。可以预计这一剂量将位于一个相当广泛的范围，可以通过日常试验而确定。

通过任何一种方便的疫苗给药方法，包括口服和非肠道 (如静脉内、皮下或肌肉内) 注射，本发明的疫苗都可以施用。治疗由单剂量的疫苗或在一段时间内的多剂量组成。

这些以及其它赋予本发明新颖特征的优点和特点，在后面的权利要求中特别指出，并形成了关于此点的一部分。为了更好地理解本发明、其优点以及应用达到的目的，可以参考随后的图和描述性的材料，其中有阐明和描述本发明的优选实施方案。

虽然任何与本文描述相似或等同的方法和材料可以用于实践或测试本发明，下面描述优选的方法、设计以及材料。

附图简述

关于下面的描述，发明将借助伴随阐明本发明优选实施方案的

数据进行详细解释。

图 1 说明 HEV 基因组内部的开放读码框架 ORF1、ORF2、ORF3 的基因组结构，以及 pE2 和 pE3 肽的编码区的大约位置。

图 2A-2D 提供中国 HEV 株 (DDBJ Accession No. D11092) 的核苷酸序列以及来源于此的 E2 片段；方框处示单碱基对删除。

图 3 提供中国 HEV 株 (DDBJ Accession No. D11092) ORF3 的核苷酸序列和来源于此的 E3 片段。

图 4 提供由 E2 编码的 pE2 肽的氨基酸序列。

图 5 提供由 E3 编码的 pE3 蛋白的氨基酸序列。

图 6 显示带有 HEV 基因组序列的重组质粒的特征。用 BamHI 和 EcoRI 消化重组质粒 pGEX₂₀ 分别得到一个 821bp 的插入片段，其包含 HEV 基因组 ORF2 序列的 810bp (泳道 2)，和一个 124bp 的插入片段，其包含 HEV 基因组 ORF3 的 114bp 的序列 (泳道 3)。分子标记用以比较这些产物的分子量 (泳道 3)。

图 7 显示表达自 ORF2 的纯化 HEV 重组多肽的特征。(A) SDS-PAGE 和 (B) 用 GST 特异的抗血清进行 Western 印迹和 (C) 混合人 HEV 反应的人血清，用于分析纯化的 pE2 融合蛋白 GE2 (泳道 1 和 2)、pE2 肽 (泳道 3 和 4) 和谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 融合蛋白 (泳道 5)。另外，GE2 和 pE2 肽样品先加热到 100℃ 3 分钟，再用 SDS PAGE (A) 和 Western blotting (B 和 C) 进行分析 (泳道 2 和 4)。分子标记用以比较这些产物的分子量 (泳道 6)。

图 8 显示表达自 HEV 基因组 ORF3 的 GST 融合多肽 GE3 的特征。(A) PAGE 和 (B) 用 GST 特异抗血清的 Western 印迹和 (C) 混合人血清，用于分析 GE3 多肽 (泳道 1) 和经 100℃ 加热 3 分钟的 GE3 多肽 (泳道 2) 以及 GST (泳道 3)。分子标记用以比较这些产物的分子量 (泳道 4)。

图 9 显示 pE2 二聚体的抗原活性强度大约是 pE2 单体抗原活性的 80 倍。如下面图 10 所描述的，加热和未加热的纯化 pE2 的等体积样品中，蛋白梯度含量从 1.3ng 到 1360ng，用混合 HEV 反应性人

血清以 1:200 稀释进行 Western 印迹分析。通过混合血清检测 pE2 单体的最小量是 1360ng，比相同条件下检测到的 pE2 二聚体的最小量（86ng）高了 16 倍。在限定浓度对二聚体的反应性估计至少比单体限定浓度的反应强 5 倍。因此，综合而言，pE2 二聚体的抗原反应性估计比 pE2 单体强 80 倍。

图 10 显示在其二聚体和单体形式中重组 pE2 肽的不同抗原性。含有 1300ng 纯化的 pE2 样品被加热到 100℃ 3 分钟以分解多肽的二聚体形式为单体形式。加热的样品以等比例与纯化的未加热的 pE2 混匀。多肽的 23kDa 单体和 42kDa 二聚体形式用 SDS PAGE 分离并转移至膜上。将膜剪成条状进行 Western 印迹分析。以 1:50 稀释的血清进行测试，有 8 份血清同时与 pE2 单体和二聚体反应，而其余 10 份血清只与 pE2 二聚体反应。

图 11 显示在 4℃（泳道 1）、20℃（泳道 2）、37℃（泳道 3）、45℃（泳道 4）用 8M 尿素处理纯化的 pE2 1 小时。同样的纯化 pE2 样品用 8M 尿素在 45℃ 处理 1 小时后，对 1 × PBS 透析过夜（泳道 5）。5 个样品进行 (A) PAGE 和 (B) 用混合 HEV 反应人血清进行 Western 印迹分析。

图 12 显示在纯化的 pE2 或 GE3 反应的 3 种人血清类型中，用 ELISA 法测定比较其中 IgG 抗体的水平。在微孔板中以预先测定的理想浓度包被纯化的 pE2 或 GE3，然后检测这些血清中含有的 IgG 抗体的滴度水平。多肽的制备物用 SDS PAGE（左泳道）分析，用 1:100 的稀释血清进行 Western 印迹测定。对相应的重组多肽，人血清出现强反应（实心圆）、弱反应（阴影圆）或不反应（空心圆）。抗体水平确定为血清稀释度的倒数，血清稀释度的 OD 值需高于阈值 OD 0.37。

图 13 显示由 ELISA 测定的 96 份非甲、非乙、非丙型肝炎病人血清中 IgG 抗体的分布水平，对纯化的 pE2 或 GE3 分别表现为强反应（实心条）、弱反应（阴影条）和不反应（空心条）。每一份血清样品用 1:100 稀释血清进行 Western 印迹测定，以及用包被了纯化

的 pE2 的微孔板进行 ELISA 分析。抗体的水平由 OD 证明，而血清对多肽的反应性根据反应的强度评估。

图 14 显示从疾病开始 HEV 抗体的时间分布。用各自的 HEV 多肽进行 ELISA，测定 96 份 96 份非甲、非乙、非丙型肝炎病人血清中，pE2 特异的 IgG (A) 和 IgM (B) 以及 pE3 特异的 IgG (C) 和 IgM (D) 抗体。得到的结果与疾病开始以后取得这些血清的时间长度进行比较。pE2 IgG、IgM 的阈 OD 值(虚线)分别为 0.52、0.57，GE3 IgG、GE3 IgM 的阈 OD 值(虚线)分别为 1.05、0.74。

图 15 显示通过不同 HEV 特异性的三种 ELISA 确定抗体的反应。使用商用试剂 (GeneLabs Diagnostics Pte Ltd., Singapore)，对 96 份非甲、非乙、非丙型肝炎病人血清中的 74 份进一步进行 HEV 特异抗体的测定。将得到结果与 GE3 特异 (A、B 和 C) 或 pE2 特异 (A 和 D) 测定得到的结果相比较。前面进行的 Western 印迹显示，这些血清中的 32 份对 pE2 和 GE3 有反应 (A 和 D)，14 份只与 pE2 有反应 (B 和 E)，还有 40 份不与二者反应 (C 和 F)。商用试剂测定的阈 OD 值是 0.6，pE2 特异的 IgG 阈 OD 值是 0.52，GE3 特异的阈 OD 值 IgG 是 1.05 (虚线)。

图 16 显示用包被了针对纯化 pE2 的抗血清的聚苯乙烯片来特异性地免疫捕获 HEV。抗血清是来自图 19 描述的动物 M1，以 1:100 稀释，包被聚苯乙烯片。片分别在带有 HEV (泳道 2)、HAV (泳道 3)、杯状病毒 (泳道 4 和 5) 或肠道病毒 (泳道 6) 的溶液中浸泡过液。然后去掉溶液，用缓冲液彻底洗涤 4 次。提取结合于片的 RNA，进行反转录，将 cDNA 用相应病毒的引物进行 PCR 扩增。分子标记用以比较这些产物的分子量 (泳道 1)。

图 17 显示从图 18 描述的动物 M1 取得一种 pE2 特异的抗血清 (A) 或免疫前的血清 (B)，分别用二者包被聚苯乙烯片，用于免疫捕获 HEV，然后与 4.5ml 带有 HEV、经系列稀释的胆汁样品反应。经过洗涤后，结合于片上的 HEV 颗粒用 RT-PCR 进行检测。分子标记用以比较这些产物的分子量 (左泳道)。

图 18 显示短尾猴 (Macaque monkeys) 对纯化 pE2 免疫的反应而产生的 pE2 抗体。3 只猴子 (M1、M2 和 M3) 每星期分别用 100ug 纯化的 pE2 进行免疫, 共 4 次。3 只对照的猴子 (M5、M7 和 M8) 用安慰剂进行同样操作。免疫完成后的两个星期, 两组猴子都用等剂量的 10^5 基因组当量的 HEV 进行静脉内注射, 继续观察动物 7 个星期。每星期采集血清样品, 用 ELISA 测定分析抗 pE2 抗体的存在。

图 19 显示在短尾猴未感染 HEV 之前, 用制备的 pE2 肽进行免疫, 然后收集血清分析 HEV 的抗体谱。每星期分别用带 100ug 纯化 pE2 的制备物注射 3 只成年猴 (M1、M2 和 M3), 共 4 次。在最后一次注射后的 2 星期收集血清, 进行 4 倍递增的系列稀释, 用纯化的 pE2 的单体 (100℃ 加热 3 分钟) 和二聚体 (未加热) 的等量混和物进行 Western 印迹测定。来自 M1 的免疫血清在 1:4,000 至 1:256,000 之间的 4 倍系列稀释后进行测定 (泳道 1-4); 来自 M2 的免疫血清在 1:100 至 1:6,400 之间的稀释后进行测定; 来自 M3 的免疫血清在 1:250 至 1:16,000 之间进行测定。免疫前的血清用为阴性对照以 1:100 测定 (泳道 5) (A)。来自这些动物的免疫前和免疫后的血清以及阳性对照血清 P, 进一步以 1:100 稀释, 进行 Western 印迹测定, 抗原为 GE3 即 30kDa 的带 pE3 多肽的 GST 融合蛋白, 同时用商用试剂盒 (北京医科大学, 北京) 进行 ELISA 测定。生产者建议 ELISA 的阈 OD 值由虚线所示。

图 20 显示戊肝病毒的攻击基因组剂量。用 1ml 1:100 稀释的贮存 HEV 接种动物。接种病毒的基因组剂量由病毒制备物的系列稀释的等份样品, 经 RT-PCR 确定。这里所说的病毒制备物在“材料和方法”部分描述。

图 21 显示 HEV 攻击的抗体反应。在 HEV 攻击之前及之后的指定时间, 立即从免疫了的 (M1、M2、M3) 和未免疫的对照动物 (M5、M7、M8) 获得血浆样品。血清样品以及阳性 P、阴性 N 对照人血清样品, 用纯化的 pE2 和 pE3 进行 Western 印迹测定, 同时用商用试剂盒 (Genelabs Diagnostics Pte Ltd., 新加坡) 进行 ELISA 测定。

发明详述

除非另外说明，本文所用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员所共同理解的含义。通常，在下面描述的细胞培养、分子遗传和核酸化学中所用的术语和实验方法，在本领域中是众所周知且普遍应用的。标准技术用于重组核酸方法、细胞培养和转化。通常，酶反应和纯化步骤根据生产者的说明进行。一般进行的技术和方法是根据本领域传统的方法和各种一般文献（Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册，第二版，冷泉港实验室印刷，Plainview, NY, 1989）进行。如本文通篇所用，下列术语：除非另外说明，应该理解为以下含义：

生物学测试样品：指个体身体的一个部分，这个部分是目的分析物的来源。测试样品的例子包括但不限于，人和动物身体的流体如全血、血清、血浆、脑脊髓液、白血细胞、肠道分泌物、尿液和淋巴液。

E2 是克隆的 cDNA 片段，如图 2 描述，它位于中国 HEV 株（DDBJ Accession No. D11092）基因组的 6326-6968 位，在 6957 位含有一个单碱基对的删除。

pE2 是由 E2 编码的肽（即 SEQ ID NO:2）

E3 是克隆的 cDNA 片段，如图 3 描述，它位于中国 HEV 株（DDBJ Accession No. D11092）基因组的 5364-5477 位。

pE3 是如图 4 描述的由 E3 编码的多肽。

GE2 是一种融合蛋白，其中 pE2 的氨基端与谷胱甘肽 S 转移酶的羧基端相连。

GE3 是一种融合蛋白，其中 pE3 的氨基端与谷胱甘肽 S 转移酶的羧基端相连。

戊型肝炎病毒（HEV）是一单股正链 RNA 病毒，形态上与杯状病毒的成员相似。能引起肝炎的散发发病或地方暴发，在血清学上不同于甲肝病毒（HAV）、乙肝病毒（HBV）、丙肝病毒（HCV）和丁肝病

毒 (HDV)。

同型二聚体是由两个相同的单体形成的分子。

同型序列是一种核酸或氨基酸序列,分别与 E2 核苷酸序列或 pE2 氨基酸序列 (确定为 SEQ ID NL: 1 或 2) 有至少 80%, 甚至 90% 的序列等同。

I HEV 基因组序列

图 2A-2D 和图 3 中阐明的 HEV 基因组序列分别对应于 ORF2 和 ORF3 区域。类似地,图 4 和 5 中所示的多肽序列分别对应于来自 ORF2 和 ORF3 区域的基因产物。相应地,所列出来的基因组序列如下:

SEQ ID NO. 1 是来自于 ORF2 的、克隆的 DNA 片段 E2 的核苷酸序列。

SEQ ID NO. 2 是多肽 pE2 的氨基酸序列。

SEQ ID NO. 3 是下游引物 ORF2Rb (参见表 9) 的核苷酸序列。

II HEV 多肽 pE2 和 pE3

从 HEV 基因组中表达 pE2 和 pE3 多肽

用反转录聚合酶链反应 (RT-PCR), 从 HEV 中国株 D11092 基因组内 ORF3 序列的 3' 端克隆及扩增出 114bp 片段, 从 ORF2 序列的 3' 端克隆及扩增出 811bp 片段。将这些序列连到 pGEX 载体的 BamHI 和 EcoRI 克隆位点。用 EcoRI 和 BamHI 分别消化质粒并回收克隆的病毒基因 (图 6, 泳道 2 和 3), 并进行序列分析。结果发现 114bp 序列位于病毒基因组内部的 5364-5477 位, 编码 37 个氨基酸的多肽 pE3, 分子量为 3.9kD。811bp 序列位于 6326-7136 位, 但是发现在 6957 位有一个单碱基对删除 (图 2D), 推测是由于 PCR 扩增错误引起。结果由移码突变导致核苷酸序列的翻译在 6968 位的新终止密码子处提前终止, 因而产生一个长度上比预计小的 213 个氨基酸残基多肽 pE2, 分子量为 23kD, 而不是开始预计的 267 个氨基酸残基。pE2 羧基端的 3 个氨基酸残基是由移码突变产生, 不是 HEV 序列 (SEQ ID NO:2)。

图 2A-2D 和图 3 所示的核苷酸序列分别对应于 HEV 中国株 (DDBJ

Accession No. D11092) 的 ORF2 和 ORF3。

图 4 和 5 所示的氨基酸序列对应于多肽 pE2 和 pE3, 分别来自于 HEV 中国株 (DDBJ Accession No. D11092) 的 ORF2 和 ORF3。

HEV ORF2 和 ORF3 特异蛋白的表征

克隆自 HEV 基因组的 ORF2 和 ORF3 区域的序列被分别表达成谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 融合蛋白 GE2 和 GE3。这个表达系统可产生高水平的病毒多肽, 而且用谷胱甘肽葡聚糖 4B 系统可以进行有效的纯化。这一方法从 1 升的细菌培养物中可产生约 2mg 纯化的 GE2 和 7mg 纯化的 GE3。而且, 可以用凝血酶将结合于葡聚糖 4B 的 GE2 洗脱下来, 凝血酶在 GST 的羧基端剪切融合蛋白从而释放出病毒多肽 pE2。这个方法从 1 升细菌培养物中产生约 1mg 纯化的 pE2 肽。

纯化的 GE2 和 pE2 制备物用 SDS PAGE 和 Western 印迹技术进行性质研究 (图 7)。纯化的 pE2 融合蛋白 GE2 (泳道 1 和 2)、pE2 肽 (泳道 3 和 4) 和谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 融合蛋白 (泳道 5), 用 SDS PAGE (A) 进行分析, 以及用 GST 特异的抗血清 (B) 和合并的人 HEV 反应的人血清 (C) 进行 Western 印迹分析。另外, GE2 和 pE2 肽样品先加热到 100°C 3 分钟, 再用 SDS PAGE (A) 和 Western 印迹 (B 和 C) 进行分析 (泳道 2 和 4)。纯化的 pE2 呈现出一条分子量为 92kD 的二聚体形式的主带 (图 7A, 泳道 1), 但是多肽样品经 100°C 加热 3 分钟后分解成一条 49kD 的条带 (图 7A, 泳道 2)。在对应的 Western 印迹检测中, GE2 的二聚体和单体形式都可以被抗 GST 血清所识别 (图 7B, 泳道 1 和 2)。值得注意的是这一制备物中的少量成分 - 49kD 的 GE2 单体, 只与抗 GST 血清反应, 不与人 HEV 反应性血清反应 (图 7C, 泳道 2)。相应地, 当 GE2 经 100°C 加热 3 分钟后, 49kD 的单体变成主带, 但是它对人 HEV 血清的抗原性显著下降 (图 7C, 泳道 2)。用凝血酶消化结合的融合多肽而纯化出的 pE2 肽, 天然形成 42kD 的二聚体, 也在 100°C 加热 3 分钟后解聚成 23kD 的单体 (图 7A, 泳道 3 和 4)。pE2 的单体或二聚体都不被抗 GST 血清识别 (图 7B, 泳道 3

和 4)。而且只有 pE2 的二聚体形式与人 HEV 血清反应 (图 7C, 泳道 1 和 3)。

表达自 ORF3 的纯化 GST 融合蛋白 (GE3) 同样用 SDS PAGE 和 Western 印迹进行性质分析 (图 8)。GE3 蛋白作为单体产生一条预计的 30kD 的条带。Western 印迹显示 GE3 与抗 GST 抗血清和混合人血清都发生反应。但是与 pE2 和 GE2 相比较, GE3 的反应性只与其单体形式有关系, 因此它的抗原活性不受加热的影响。因此, 通过以前的多肽图谱研究, 认为很可能这种活性至少部分是由于其表位位于 ORF3 特异的全长蛋白的羧基端引起。

III Pe2 和其抗原反应性

pE2 肽天然以同型二聚体出现

以前的研究已描述过 HEV 基因组 ORF2 编码的 HEV 结构蛋白的重组多肽, 可以被 HEV 反应性人血清所识别 (Yarborough 等人, 1991; Li 等人, 1994)。利用分布于全长结构蛋白的重叠短肽和多肽图谱技术, 发现这些具抗原性多肽的活性是来自于, 位于全长多肽不同区域的抗体结合位点的数量和性质。作为线性表位, 这些抗体结合位点与蛋白的一级结构相关, 而一级结构是由其氨基酸序列决定的。在溶液中重组蛋白的构象由它们的二级和三级结构决定, 可能影响表位与抗体的接触, 因而减低它们的抗原活性。

本发明的重组 pE2 肽具有被 HEV 反应性人血清识别的两种类型的抗原活性。抗原活性的一种类型与 pE2 肽的一级结构有关, 而第二种类型的活性与它的二聚体形式多肽的四级结构相关。第一种抗原活性来自于 pE2 肽的氨基酸序列中的线性表位, 而且由下面的 Western 印迹实验证明是与其单体形式有关。但是第二种类型的抗原活性具有严格的天然构象, 只有当 pE2 肽的单体之间相互结合成二聚体时才会出现。因此, pE2 肽的一个使其区分于其它 HEV 重组多肽的显著特征是, 在生理学条件下它会自然且主要形成二聚体 (如更多的聚体), 其抗原活性就来自于仅由二聚体形式的四级结构构成的

构象型抗原决定簇。此外，当二聚体降解时，这种抗原活性即消失，但是当单体重新变成二聚体时活性又可以恢复。对于HEV基因组ORF2区域来源的重组多肽而言，这种类型的抗原活性是首次报告。

图7显示合并的人HEV反应性血清与pE2谷胱甘肽S转移酶(GST)融合蛋白(即GE2)和纯化的pE2的二聚体形式具有强烈的反应。如本文描述的制备纯化的GE2(泳道1和2)和纯化的pE2(泳道3和4)，再用SDS PAGE(A)进行分析，以及用GST特异的抗血清(B)和合并人HEV反应的人血清(C)进行Western印迹分析。泳道2和4的样品先加热到100℃3分钟，然后立即用于分析。纯化的GST样品和分子量标记混和物分别上到泳道5和6。在未加热的样品中(7A, 泳道1和3)，融合蛋白GE2主要以分子量约为92kD的二聚体形式迁移(7A, 泳道1)，pE2主要以分子量约为42kD的二聚体形式迁移(7A, 泳道3)。但是，如图7A泳道2和4所示，加热引起两种蛋白的二聚体形式解聚，GE2融合蛋白解聚为为49kD单体，pE2肽解聚为23kD单体。接下来的Western印迹发现，融合蛋白GE2，不管是以二聚体或单体形式，都被抗GST抗血清识别(7B, 泳道1和2)，其结果与GST相同(7B, 泳道5)。HEV反应性人血清强烈识别GE2融合蛋白(7C, 泳道1)和pE2肽(7C, 泳道3)的二聚体形式。样品经100℃加热3分钟后引起GE2融合蛋白和pE2肽的二聚体解聚成相应的单体形式。但是，这种解聚伴随着抗原活性的消失，HEV反应性人血清不能识别和结合于GE2蛋白和pE2肽的单体形式(7C, 泳道2和4)。

用Western印迹来评估pE2单体的抗原性并与pE2二聚体相比较(图9)。混合等量未加热和加热了的纯化pE2肽样品。混合物进行4倍系列稀释，上到泳道1-6。经过电泳，用图7中所用的混合HEV反应性人血清以1:200稀释，来测定pE2两种形式的抗原性。图9显示，pE2单体与混合人HEV反应性血清发生阳性反应的最少量为1360ng，比在相同条件下pE2二聚体的最小阳性反应量(86ng)高16倍。此外，对pE2二聚体的反应强度估计大约是对pE2单体反应

强度的5倍。因此,综合证明,pE2二聚体的抗原活性显著不同于单体,pE2二聚体的总体反应性估计比pE2单体强约80倍。pE2单体的抗原活性是来自于pE2氨基酸一级结构中的几个线性表位。

此外,18份用商用HEV ELISA试剂盒(Genelabs Diagnostics Pte Ltd.,新加坡)测定为阳性的人血清,以1:50稀释进行Western印迹测定(图10),抗原为纯化pE2的经加热和未经加热的两种形式的等量(每个反应每种形式的量为1360ng)混匀物,未加热则保留了pE2二聚体形式,100℃加热3分钟则分解pE2二聚体成单体形式。根据图10所示结果,18份血清中只有8份同时与pE2二聚体和单体反应,而其余10份血清只与pE2二聚体反应。与pE2单体比较,pE2二聚体的抗体反应性的高比例,进一步说明二聚体比单体具有更好的抗原反应性。

图11显示pE2二聚体的第二种类型的抗原反应性是与pE2肽的二聚体或寡聚体形式的四级结构相关。作为构象型抗原决定簇,抗原反应性的这种类型迄今未知,它与重组多肽而不只是pE2相关,这些重组多肽来自于HEV基因组的ORF2区域。在进行SDS PAGE (A)和Western印迹(B)分析之前,纯化的pE2样品分成5份,分别用M尿素在不同温度条件下处理1小时:4℃(泳道1)、20℃(泳道2)、37℃(泳道3)、45℃(泳道4)。而且,一份样品用8M尿素在45℃处理1小时后,对1×PBS透析过夜去除尿素(泳道5),再进行SDS PAGE和Western印迹分析。用混合HEV反应性人血清以1:250稀释进行Western印迹分析。SDS PAGE得到的结果(图11A)表明,pE2二聚体解离成单体的程度随加热处理的温度的升高而提高,温度达到45℃时pE2二聚体完全解离(泳道4)。与这些结果相一致的是,相应的Western印迹分析(图11B)显示,只有存在pE2二聚体的样品(即泳道1-3和泳道5),HEV反应性血清都存在一定程度的反应。另外,HEV反应性人血清与只含有pE2肽单体的加热样品不发生反应(即泳道4)。

这些结果提示,在生理学条件下,pE2单体自然地相互作用而形

成同型二聚体，被 HEV 反应性人血清识别的构象型抗原决定簇很可能是产生于这种二聚体的相互作用，因为检测不到针对 pE2 单体形式的抗体。相应地，由 pE2 二聚体的四级结构决定的、抗原反应性的第二种类型，显示出严格的天然构象，只有当 pE2 肽呈二聚体时才有功能。因此，pE2 肽二聚体形式的解离呈现出与构象型抗原活性的消失相关（即图 11B 泳道 4）。但是，将尿素处理的样品对 PBS 进行过夜透析后，pE2 单体重新结合形成二聚体，构象型抗原活性得以恢复（图 11B 泳道 5）。

pE2 的构象型抗原决定簇在 HEV 感染中的重要性

如上所述及证明，被 HEV 反应性人血清识别的 pE2 抗原活性的两种类型中，二聚体形式的构象型抗原决定簇显然在天然 HEV 感染中的作用比单体的线性表位更为重要。Western 印迹分析的结果（图 10）显示，总共 18 份 HEV 反应性人血清都能与 pE2 肽的二聚体形式反应，而只有 8 份血清另外与 pE2 肽的单体形式反应。这个实验结果同样得出上述结论。而且，基于图 9 的结果，pE2 构象型抗原决定簇的总体反应性估计大约是单体的线性表位反应性的 80 倍。

能过测定 21 份健康献血者的血清和 96 份非甲、非乙、非丙型急性肝炎病人从肝炎发病时的不同时间采集的血清（表 2），进一步评价 pE2 构象型抗原决定簇在天然 HEV 感染中的角色。研究中所用的血清是经过香港皇后玛珈丽医院允许，取自正在发病的或得过病的非甲、非乙、非丙型急性肝炎病人。结果显示，pE2 特异的 IgG 抗体在非甲、非乙、非丙型急性肝炎病人中比健康献血者中明显普遍得多。这个差异与流行病学研究相一致，提示这些病人的一部分可能正在感染而其他人可能以前感染过这个病毒。大约 10% 的健康献血者在过去感染过病毒，与这些血清样品来源的社区中 HEV 的感染水平相一致。

表 2 用 Western 印迹检测人血清中的 HEV 抗体
抗体 (IgG) 血清数量

pE2	非甲、非乙、非丙型 肝炎病人	健康献血者
+	56	3
-	40	18
总计	96	21

IV 确定 pE2 和 pE3 的 HEV 特异性

为了确定 pE2 二聚体和 pE3 的抗原活性是 HEV 特异的, 96 份来自急性或曾经急性的非甲、非乙、非丙型急性肝炎病人的血清样品中的 74 份, 通过商用的 HEV 特异的 ELISA 进一步进行测定 (表 3)。商用测定与 pE2 或 pE3 测定的高符合率证明了 pE2 和 pE3 的 HEV 抗原特异性。

表 3 用商用 ELISA 测定抗 pE2、pE3 的 IgG 抗体以及 HEV IgG 抗体

Western 印迹	EIA		合计	总一致率*
	+	-		
pE2	+	37	44	89.2%
	-	1	30	
pE3	+	30	32	89.2%
	-	8	54	
合计	38	36	74	

*整体一致性=结果一致的样品数/总样品数 x100%

V 检测抗 HEV IgG 和 IgM 的 ELISA 的建立

分别用 pE2 或谷胱甘肽 S 转移酶融合蛋白 GE3 的纯化样品包被

微孔板，进行两个分开的 ELISA 实验。这些 HEV 多肽的产生和纯化已在上文描述。这些样品的纯度由 42kD 的 pE2 二聚体和 30.4kD 的 GE3 融合多肽的相对强度决定，它们占各自样品的总蛋白中的 89% 和 95%（图 12 左泳道）。Western 印迹显示，这些多肽是这些样品中的主要抗原，因为它们与 HEV 阳性的人血清发生反应（图 12 实心阴影），而不与阴性对照的人血清发生反应（图 12 空心）。用这些纯化的 HEV 多肽样品滴定这些血清而得到的一般结果与用 Western 印迹测定的相应多肽与这些血清的反应相一致。

在进一步的研究中，用 pE2 和 pE3 特异测定，检测了 90 份健康献血者和 96 份正在得病或曾经得病的非甲、非乙、非丙型急性肝炎病人血清中的 HEV IgG 抗体水平。个体病人血清的抗体水平通常与它们和相应病毒多肽的反应性相关，这一反应性已用 Western 印迹测定（图 13）。由 Western 印迹确定有反应的血清（图 13 实心条）得到的 OD 值要高于弱反应（图 13 阴影条）或无反应血清（图 13，空心条）。

设定超过由 Western 印迹证明无反应血清的平均 OD 值的 5SD 为阈值。通过 pE2 特异性测定，85.7% 的 pE2 反应或弱反应性血清给出阳性结果。通过 GE3 特异性测定，66.6% 的 GE3 反应性血清给出阳性结果。Western 印迹和 pE2、GE3 特异性测定的总相符率分别为 91.7% 和 88.5%。基于 Western 印迹结果，两者的 ELISA 测定都有 100% 的特异性，由这些测定和 Western 印迹得到的不同结果只限于弱反应性血清。这些结果证实了 pE2 测定是特异于 42kD 的 pE2 二聚体，而 GE3 测定是特异于 30.4kD 的 pE3 多肽。由 ELISA 测定 pE2 IgG 抗体的血清流行，在 HEV 病人中为 50%，在献血者中为 5.5%，而 GE3 IgG 抗体的血清流行性况为，在 HEV 病人中为 22.9%，在献血者中为 1.1%。测试样品中两个群体的 pE2 特异抗体的血清流行均高于 GE3 特异抗体。这个结果提示，pE2 是两个抗原的主要成分，这些抗体的高度流行与急性肝炎有关。

用抗体反应来区分 HEV 衣壳蛋白的抗原区域

为了进一步比较, 从 96 份血清中取出 74 份, 进一步用商用检测试剂盒 (Genelabs Diagnostics Pte Ltd., 新加坡) 测定其 IgG 抗体。商用测定试剂盒是由 42 个氨基酸的多肽和 33 个氨基酸的多肽混合组成, 这两个多肽分别编码自 HEV 的 Burmese 和 Mexican 株的 ORF2 和 ORF3 的 3' 端 (Yarborough 等人, 1991)。如上所述, pE3 是一 38 个氨基酸的多肽, 也表达自 ORF3 的 3' 端, 所以发现用于商用测定的 ORF3 的 33 个氨基酸多肽是 pE3 中的一部分 (即 GE3)。因此可以预计在商用测定中 ORF3 特异的多肽的抗原特异性应该与 GE3 密切相关。另一方面, 用于商用测定的 ORF2 特异的多肽位于 213 个氨基酸的 pE2 肽的羧基端的更下游。因此, 商用测定试剂盒的抗原特异性部分由其含有的 ORF2 多肽决定, 预计不同于体发明的 pE2 肽。不同于以前报道的来自于 ORF2 区的 HEV 多肽, pE2 的抗原活性的唯一性在于, 它主要来源于其构象型抗原决定簇, 这种构象型抗原决定簇只有当 pE2 单体之间相连成二聚体时才会暴露出来。

如 Western 印迹所证明的, 30 份血清同时与 pE2 IgG 和 pE3 IgG 反应 (pE2+/pE3+, 图 15A 和 15E), 14 份只与 pE2 IgG 反应 (pE2+/pE3-, 图 15B 和 15E), 30 份与两者都不反应 (pE2-/pE3-, 图 15C 和 15F)。因此, 由商用测定的 pE2 和 GE3 反应性血清的抗体水平随 GE3 特异抗体的水平的变化 (图 15A), 但是与 pE2 特异抗体的水平无关 (图 15D)。这些血清中的 11 份与 pE3 呈弱反应性, OD 值在 GE3 特异的 ELISA 阈值以下 (图 15A)。发现只与 pE2 反应的 14 份血清中的 10 份带有不同水平的相应抗体。14 份血清中的 7 份在商用测定中有反应 (图 15E)。但是, 它们在 GE3 特异的 ELISA 中都呈阴性 (图 15B)。其余血清不与任何一种多肽反应, 在 pE2 和 pE3 特异的 ELISA 中, 它们都呈阴性, 在商用测定中, 除了一份外其余也都呈阴性。

用三种方法测定的 HEV 抗体谱总结于表 4。尽管它们的抗原特异性不同, 33 份血清在 pE2 特异测定和商用测定中为阳性, 30 份在两种测定中为阴性, 两种测定的总一致率为 87.8%。类似的, GE3 特

异性测定和商用测定的总一致率为 74.3%。三种测定的总一致率为 66.2%。用商用测定检测的 HEV 抗体的频率 (47%) 稍低于 pE2 特异性测定 (50%)，高于 GE3 特异性测定 (29%)。基于个体血清中存在的抗体谱，在 40 份血清中由商用测定检测出 15 份血清的抗体，可能是与这种试剂盒中的 ORF2 特异性多肽特异作用的抗体的存在，因为这些血清在 GE3 特异性测定中不发生反应。其余的 23 份血清在商用测定和 GE3 特异测定中都是阳性，但是如果这些血清仍含有针对商用试剂盒中的 ORF2 特异多肽的抗体，则结果仍不能确定。

表 4 病毒性肝炎病人血清与 HEV 多肽和商用 ELISA 试剂盒的反应方式

pE2 ELISA	GE3 ELISA	Genelabs 试剂盒	血清数量 (n=74)
+	+	+	17
+	-	+	16
+	-	-	4
-	+	+	2
-	-	+	3
-	-	-	32
37 (50%)	19 (25.7%)	38 (51.3%)	流行 (%)
87.8%	74.3%	-	总一致率 ¹

1 商用 ELISA 试剂盒的总一致率=用 pE2 或 GE3 特异检测和同时用商用测定得到阳性或阴性结果一致的血清数/检测的总血清数 X100%。三种测定方法之间的总一致率为 66.2%。

VI 正在和曾经的 HEV 感染中的抗体反应

同样检测了 HEV 病人和健康献血者血清中的 pE2 和 GE3 特异的 IgM 抗体的水平。开始的研究显示，测定不受存在的 IgG 抗体的影响，

因此在有和无抗人 IgG 存在时都得到一样的结果。因此做了一些无抗人 IgG 存在时的检测, 设定阈值为 90 份献血者血清的平均 OD 值的 3SD。图 14 比较了戊型肝炎刚发病的病人血清中的 pE2 和 GE3 抗体的产生。pE2 和 GE3 特异的 IgM 抗体和 GE3 特异的 IgG 抗体主要存在于戊型肝炎刚发病的早期血清样品中, 而 pE2 特异的 IgG 抗体的产生不与疾病的发病相关。

如图 14, 基于 pE3 和 GE3 特异测定检测的 HEV 抗体水平, 测定的个体血清样品存在 9 个不同的 HEV 血清型。发现总共有 53 份病人血清与 1 种或多种抗体发生的反应 (表 5)。18 份血清存在 5 种血清型, 与正在感染的情况一致 (表 5 曲线 1-5)。其中包括 3 份只有 pE2 IgM 反应的血清 (表 5 曲线 1), 11 份另外有 pE2 和 GE3 特异的 IgG 抗体反应的血清 (表 5 曲线 2), 另外 3 份有以上抗体反应以及 GE3 特异的 IgM 抗体反应的血清 (表 5 曲线 4)。其余血清存在 pE2 特异 IgM 和不同的其它抗体的反应。值得注意的是这些血清中的 16 份血清是在戊型肝炎发病之后的 30 天内采集的。其余 2 份病人血清是在病程开始后的 60 天以后采集的。推测这些以及其它来自献血者的血清是属于无征兆的 HEV 感染, 与以前的戊型肝炎病史无关。另外 35 个病人的血清存在血清谱, 与那些 IgG 阳性而 IgM 阴性的过往 HEV 感染一致 (表 5 曲线 6-8)。这些血清中的 27 份有 pE2 特异的 IgG 反应 (表 5 曲线 6), 7 份有 GE3 特异 IgG 反应 (表 5 曲线 7), 但是没有一份有 IgG 抗体反应 (表 5 曲线 6-8)。1 个血清谱显示血清不存在任何一种抗体的反应 (表 5 曲线 9)。但是, 这些血清谱的产生不与戊型肝炎的开始发病时间相关。很多显示正在感染的血清谱样品是在戊型肝炎开始之后的 27 天内 (平均=13 天) 采集的, 其它样品是在括号内所示天采集的。过往感染的血清谱与疾病开始不相关, 这些样品是在疾病开始以后与非反应的血清以相似的速率累积 (平均=50 和 40 天)。

表 5 HEV 感染的血清谱

确定的 血清谱	IgM		IgG		献血者		病人
	pE2	GE3	pE2	GE3	血清数 (n=90)	血清数 (n=96)	发病后的天数
1	+	-	-	-	0	3	9-15
2	+	-	+	+	0	11	5-27 (190, 240)
3	+	+	-	-	1	1	8
4	+	+	+	+	0	3	7-14
5	-	+	+	+	0	1	18
合计 (正在感染)					1	18	平均=13
6	-	-	+	-	5	27	5-430
7	-	-	+	+	0	7	9-40
8	-	-	-	+	0	1	18
合计 (过往感染)					5	35	平均=50
9	-	-	-	-	84	42	平均=40

ELISA 测定低亲和力 IgG 抗 pE2 抗体

ELISA 的进一步应用是用 pE2 二聚体检测血清中的低亲和力 IgG 抗体。在 4M 尿素或无 4M 尿素中滴定血清样品而完成此检测。当尿素处理引起明显的抗体水平显著下降 4 倍以上, 即表明低亲和力 IgG 抗体的存在。表 6 显示, 在戊肝发病 2 周内采集的病人血清中检测到的主要是低亲和力的抗体, 后来这一抗体逐渐被亲和力 IgG 抗体所代替。因此, 低亲和力抗体转移的产生使其在急性戊型肝炎的诊断中有潜在的用途。

表 6 用 ELISA 检测开始发病后的不同时间的非甲、乙、丙型肝炎病人血清样品中的低亲和力 pE2 IgG 抗体
pE2 IgG 亲和力测定 (例子)

发病后的天数	低亲和力	高亲和力	合计
0-7	3	0	3
8-14	3	3	6
15-21	3	0	3
22-84	0	12	12
>84	0	7	7
合计	9	22	31

VII 建立免疫捕获 RT-PCR 来检测 HEV RNA

如果 pE2 二聚体模拟了 HEV 衣壳的某种结构特征, 则以上描述的人血清的反应性是可以解释的。为了测定这种可能性, 进行了实验以确定针对 pE2 的抗血清是否影响 HEV 颗粒的免疫捕获。

RT-PCR 引物的特异性

在本研究中, 选择了两对引物 A5R/A3F 和 B5R/B3F (表 9) 进行 RT-PCR。分别用含有 HEV、HAV、肠道病毒和杯状病毒的样品直接进行 RT-PCR 以评估这些引物的特异性。图 16 显示, 只有含 HEV 的样品经 RT-PCR 扩增出一条特异的 203bp HEV 序列的条带。

pE2 二聚体模拟了 HEV 的结构特征

用包被了抗 pE2 肽的抗血清的聚苯乙烯板 (paddle) 进行免疫捕获实验, 以研究 pE2 双全和 HEV 病毒颗粒的抗原关系。使用的抗血清是采用一只用 4 次 100ug 剂量的纯化 pE2 肽免疫的猴子, 它与 pE2 二聚体有强烈的反应。抗血清与 pE2 单体存在弱反应, 不与其它的 HEV 抗原反应。发现包被了抗血清的板影响 HEV 颗粒的特异免疫捕获, 结合的病毒用于后面的反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 (泳

道 2), 在”材料和方法”部分对本方法有所描述。板相似地允许与 HAV (泳道 3)、杯状病毒 (泳道 4 和 5) 和肠道病毒 (泳道 6) 反应, 但不能捕获病毒 (图 16)。

这些结果进一步支持 pE2 二聚体可能模拟了 HEV 病毒颗粒某种结构特征的论点, 使得抗血清能够与二聚体强烈反应, 影响了 HEV 颗粒免疫捕获的有效性和特异性。下面讨论这一发现应用于发展一种检测临床、食品和环境样品中的 HEV 的免疫捕获测定法。

免疫捕获 RT-PCR (IC-RT-PCR)

测定兔子 pE2 抗血清的免疫捕获 HEV 的能力。聚苯乙烯板分别用抗血清和免疫前的血清包被, 用于捕获病毒。进行捕获病毒的 RT-PCR。发现抗血清能捕获贮存病毒的 5^5 稀释液中的 HEV 颗粒 (图 17A), 而免疫前的血清不能捕获即使是未稀释的贮存液中的病毒 (图 17B)。

用商用病毒 RNA 检测试剂盒进行 IC-RT-PCR 的比较。

上面描述的免疫捕获 RT-PCR (IC-RT-PCR) 方法可以用于日常公共健康和环境监测的 HEV 检测, 因为稳定来源的抗血清是源自 HEV 特异的蛋白 pE2 的表达。

在上面描述的方法中, 免疫捕获的 HEV 颗粒用一种商用试剂盒 (QIAamp Viral RNA Kit, QIAGEN) 提取其 RNA, 这种试剂盒为分子生物学家常用。如果假设用商用试剂盒的 RNA 提取的有效性为 100%, 不受任何干扰, 则理论上, IC-RT-PCR 应该比直接的 RT-PCR 敏感 32 倍, 因为前者能够容纳 32 倍体积的样品。在本研究中, 接种的病毒进行了 5 倍系列稀释, 因此预计 IC-RT-PCR 的结果比 RT-PCR 敏感 25 倍。

在本研究中, 准备了三种类型的 HEV 接种样品, 包括水、人粪便样品的上清和匀浆的贝类样品的上清。水样品、一份贝类样品 (如牡蛎) 和一份粪便样品用相同量的 HEV 穿刺。穿刺样品进行 5 倍递

增的系列稀释，各稀释样品用商用（传统的）方法和免疫捕获法进行 HEV 的测定。对这些样品的 HEV 捕获有效性进行了比较，结果如表 7。根据这些结果，证明免疫捕获法比传统的 RT-PCR 法增加了 HEV 的检测灵敏度，在水样品中提高 25 倍，在粪便样品中提高 125 倍，在贝类样品中则大于 125 倍。因此，结果显示 IC-RT-PCR 至少比商用病毒 RNA 试剂盒敏感 25。在水样品中观察到敏感性增加的原因，是由于免疫捕获法中的测定样品体积是传统 RT-PCR 测定中样品体积的 32 倍。而且，结果也提示，在粪便和贝类上清中存在未知因子抑制 RNA 的提取。这是为什么水样品的结果显著高于贝类和粪便上清样品的结果，因为水样品预计不含有抑制检测的物质。但是，与传统的 RT-PCR 法相比，用 IC-RT-PCR 法使粪便和贝类样品中的干扰降低到最小。与传统的 RT-PCR 相比，IC-RT-PCR 法的敏感度提高了 25 倍，是因为用免疫捕获法去除了抑制物质。

表 7 比较免疫捕获-RT-PCR 和传统的 RT-PCR 法的 HEV 检测效率

方法	水	粪便上清	贝类上清
IC-RT-PCR	1:3125	1:125	1:125
传统的 RT-PCR	1:125	1 (未稀释)	未检测到

检测敏感度由病毒检测要求的有限样品稀释度表示。

总之，与水样品相比，商用 RT-PCR 法和 IC-RT-PCR 法对粪便和贝类样品都具有低的敏感度。但是，这种现象可能是因为粪便和贝类样品中的一些未知因子引起，这些因子可能加速病毒的降解。另一方面，IC-RT-PCR 结果比直接的 RT-PCR 敏感 125 倍，暗示免疫捕获法成功地克服了粪便和贝类样品中未知因素的干扰，进一步表明 IC-RT-PCR 可用于临床和环境监测。

VIII pE2 在针对 HEV 的保护中的作用

前面对非甲、乙、丙型肝炎病人的研究结果提示，重组肽 pE2 的二聚体形式通过暴露构象型抗原决定簇可能在天然 HEV 感染中起着重要作用，其构象型抗原决定簇是由肽单体形式的二聚体化而产生。

如在前面非甲、乙、丙型肝炎病人的研究中所示，发现 pE2 的二聚体形式在天然 HEV 感染中起着更突出的作用。在急性 HEV 感染中，通常产生 pE2 特异的 IgM 抗体。相应的 IgG 抗体同样产生并持续一段时间，并伴随着亲和力的上升。而且在恢复期血清和以前感染过该病毒的个体血清中，它们是最普遍的抗体。这些结果提示，pE2 可能对 HEV 提供保护，在实验感染的短尾猴 (Macaque monkeys) 中的保护性研究进一步支持这一观点。而且，结果也提示，保护性作用主要是由于 pE2 肽的二聚体化呈现出来的构象型抗原决定簇，而不是呈现的线性表位，这一论点为疫苗的发展提供了合理的理论基础。

用短尾猴作为模型进行实验感染的保护性研究中显示，用纯化的 pE2 肽制备物免疫能够保护动物免受 HEV 攻击，因此使它成为一种很好的疫苗候选者。发现感染剂量接近基因组剂量，与实验感染相关的病理学用以与人体的天然感染相关的病理学相比较 (Tsarev 等人, 1993b; Tsarev 等人, 1994b)。为了获得一种清晰的指征即是否细菌表达的肽提供针对 HEV 的保护，本研究中的动物用相当大剂量的、含有至少 10^5 基因组当量的 HEV 病毒进行感染。对照动物出现的粪便中的病毒分泌和病毒血症在免疫动物中基本消除。没有动物产生另外的除抗 pE2 抗体以外的 HEV 抗体，抗 pE2 抗体是在攻击之前就已经存在的。因为在攻击之前存在的抗 pE2 抗体中，特异性识别 pE2 二聚体的抗体与识别其单体的抗体相比占了优势，得出的结论是，在很大程度上保护效果是由于这一病毒多肽的二聚化产生的构象型抗原决定簇。与这一结论相一致，pE2 肽的研究和特性提示，它可能包含了 HEV 主要结构蛋白中的一个区域，这一区域之间相互作用而形成 HEV 衣壳。因此，与那些通过 pE2 二聚体化产生的构象

型抗原决定簇相比，病毒衣壳是产生于相同或相似的构象型抗原决定簇。因此，pE2 二聚体特异的抗体是与天然 HEV 感染反应的主要抗体。

将编码 210 个氨基酸 HEV 多肽 pE2 的核苷酸序列与已报道的 HEV 原型株相应区域的核苷酸序列和编码的氨基酸序列相比较。210 个氨基酸多肽是由 HEV 基因组的 ORF2 的高度保守的区域编码(表 1)。用于免疫的病毒多肽的纯度用 SDS PAGE 评估(图 7A 泳道 3)，其抗原性用人 HEV 反应的血清的免疫印迹法评估(图 7C 泳道 3)。用于免疫的纯化制备物中 pE2 占了超过 90% 的量。HEV 反应的人血清特异识别二聚体形式(图 7C 泳道 3)，而不是 23kD 的单体形式(图 7C 泳道 4)。这些结果提示人血清中存在的抗 HEV 抗体主要针对由病毒多肽的二聚体化产生的构象型抗原决定簇。

免疫接种

3 只猴子(M1、M2 和 M3)每星期分别用 100ug 纯化的 pE2 二聚体进行肌肉内免疫，共 4 次。3 只对照的猴子(M5、M7 和 M8)用安慰剂进行同样操作。第四次免疫完成后的两个星期，给所有动物采血，血清用纯化的 pE2、GE3 作为抗原进行 Western 印迹检测，以及商用 ELISA 测定。在最的一次免疫后的两个星期，两组猴子都用 10^5 基因组当量的同种 HEV 株进行攻击。

用纯化的 pE2 肽进行 ELISA 监测免疫接种后的抗体反应(图 18)。结果显示，在三只动物中(M1-M3)，免疫接种都导致了活跃的抗病毒多肽的抗体反应。首次后的一个星期进行第一次抗体检测，发现抗体即达到了接受第三次剂量一周后的最高水平。对照动物没有检测到 pE2 特异的抗体。在所有动物中观察到的活跃反应显示 pE2 具有很强的免疫原性。

在病毒攻击前立即采集 HEV 特异的血清，进一步进行 Western 印迹分析，抗原为天然(即 pE2 二聚体)和加热变性的纯化 pE2(即 pE2 单体)(图 19A 泳道 1-4)、纯化的 GE3 融合蛋白(图 19B)，同

体是主要的免疫原。而且，用纯化的 pE2 免疫不会引起用其它商用方法检测得到的、其它 HEV 抗体的产生。因此，从这些结果可以得出结论，抗纯化 pE2 的抗血清是 pE2 特异性的，对多肽的二聚体形式更为特异。

而且，对于单体，在有限稀释度范围内稀释的抗血清只能与二聚体发生反应，而不与单体发生反应。根据免疫学中的正常应用，此处描述的合适稀释度时产生对二聚体的”单特异性”的抗血清，可以用于区分单体和由单体形成二聚体而暴露的构象型抗原决定簇和其中含有的线性表位。

HEV 攻击

用 HEV 同源株进行肌肉内注射免疫后的 2 个星期，对 3 个测试动物 (M1, M2, M3) 和 3 个对照动物 (M5, M6, M7) 进行攻击。攻击病毒最初分离于 1986 年中国的一场爆发 (表 1 D11092 株)，注射的病毒量用 PCR 评估为每剂量为 10^6 HEV 基因组当量 (图 20)。攻击病毒的首次感染剂量未测定。其他研究者的最近报道显示，HEV 的首次感染滴度与基因组滴度相同。

实验感染之后，每天观察动物戊型肝炎病毒的发展。在感染前和后的每 2 天，监测粪便样品中病毒的分泌。每周采集 2 次外周血样品，用于检测血浆和外周血中单核细胞 (PBMC) 的病毒。收集血清样品用于检测 ALT 水平。两组猴子的 ALT 水平正常，无戊型肝炎发展的征兆。推测是因为在灵长类中，病毒在前面的传代中被削弱了 (Zhuang 等人, 1992)。不过，表 8 显示，1 只对照动物 M5 在感染后的第 5 至 17 天的每个粪便样品中分泌病毒。在其它两只对照动物 M7 和 M8 中，从第 7 至 17 天持续 10 天分泌病毒。感染后的第 9 和第 13 天的 M7 和 M8 的 PBMC 样品也进行了 HEV 基因组检测。从这些动物的任何血浆样品中都没有检测到 HEV 基因组。在两只测试动物 M1 和 M2 中，用 pE2 肽进行免疫完全消除了病毒分泌，在第 3 只测试动物 M3 中，将病毒分泌减少到 1 天，从这些动物的血浆或 PBL 样品中没

时用商用 ELISA 试剂检测 HEV (图 19C)。后者的 ELISA 试剂是由两种合成的 HEV 多肽混和而成,多肽对应于 ORF2 和 ORF3 特异蛋白的羧基端区域的氨基酸序列。根据生产者的操作说明,检测使用了两个 HEV 多肽,一个类似于 pE3 (即 GE3),另一个对应于 HEV 主要结构蛋白的羧基端区域,位置与 pE2 相邻但不重叠。

图 19A 显示,将血清进行 4 倍递增的系列稀释,等份稀释血清用于 Western 印迹,检测抗 pE2 二聚体和单体的抗体水平。来自 M1 的免疫血清在 1:4,000 (泳道 1) 和 1:256,000 (泳道 4) 稀释度之间进行测定;来自 M2 的免疫血清在 1:100 (泳道 1) 和 1:6,400 (泳道 4) 之间进行测定;来自 M3 的免疫血清在 1:250 (泳道 1) 和 1:16,000 (泳道 4) 之间进行测定。纯化 pE2 肽的二聚体和单体形式的等量制备物用于 Western 印迹。抗任何一种形式的抗体水平由血清的最大稀释度 (有限稀释) 确定,在这一稀释度时仍能与多肽的各自形式发生反应。结果显示,来自 M1 的血清中抗二聚体的抗体水平是 1:64,000,比抗单体的抗体水平 (有限稀释度为 1:4,000) 高 16 倍。M2 和 M3 的血清抗二聚体的抗体水平分别为 1:1,600 和 1:4,000,比相同血清中相应的抗单体的抗体水平高 16 倍和 4 倍。这些动物免疫前的血清在 1:100 稀释度没有检测到活性 (图 19A 泳道 5)。

图 19B 显示,在 1:100 稀释度时,没有血清与纯化的 GE3 发生反应。相同血清在相同的稀释度用商用 ELISA 测定,商用 ELISA 是产生于一种合成多肽,对应于 HEV 主要结构蛋白的羧基端,蛋白由 HEV 基因组的 ORF3 编码。图 19C 显示,没有血清含有抗这些 HEV 多肽的可检测的抗体。来自对照动物的血清同样用上述方法检测,任何一种方法都没有检测到任一种血清中的 HEV 抗体。

因此,这些结果显示,pE2 肽具有高度免疫原性,能够在猴子中引起活跃的抗体反应,同样能在其它动物如小鼠、大鼠、羊或兔中激发免疫反应。针对免疫反应产生的抗体主要是与 pE2 二聚体反应。通过有限稀释法测定,这些抗体的水平比相应抗单体的抗体水平高 4 至 6 倍。pE2 二聚体比单体引起更高抗体水平的产生,说明 pE2 二聚

有检测到病毒基因组。

表 8 病毒攻击后粪便中的 HEV 分泌和病毒血症

群 猴子	攻击后的天数										
	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	
测	No. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
试	No. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	No. 3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
对	No. 5	-	+	+	+	+	+ ¹	+	+	-	-
照	No. 7	-	-	+	+ ¹	+	+	+	+	-	-
	No. 8	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-

¹ 用 RT-PCR 检测外周血单核细胞中的 HEV 基因组。没有血浆样品带有可检测的 HEV 基因组。

病毒攻击后的 HEV 血清转换

根据图 19 描述的实验方法和条件，分析了病毒攻击前和攻击后 4 个星期的血清样品中的 HEV 抗体谱。图 21 显示，从病毒攻击前的 3 只对照动物 (M5, M7, M8) 获得的血清，开始时在所有 3 种 HEV 抗体测定中都为阴性。1 只对照动物 M5 的 HEV 血清转化发生于感染后的 7 天，在这天以及所有后来采集的血清中都检测到了 pE2 同源二聚体特异的抗体 (图 21)。所有这些血清样品用商用 ELISA 测定也给出了 HEV 抗体的可能的测定结果，在第 7 天和 14 天连续采集的样品同样与纯化的 GE3 发生反应。针对感染产生的广泛特异性抗体谱与以前描述的用 pE2 肽免疫而产生的严格的特异抗体谱形成对照 (图 21)。感染后的第 14 和 21 天，从另一对照动物 M7 获得的血清样品，与 pE2 二聚体有弱反应性，用商用测定得到的是阳性结果。但是无样品与 ORF3 特异的多肽 GE3 发生反应。剩余的对照 M8 对感染不产生足够可检测的抗体量。相反，除了 pE2 抗体，免疫动物在感染后没有获得其它的 HEV 抗体 (图 21)。

从免疫动物 (M1, M2, M3) 采集的血清在病毒攻击之前的 0 天已经与 pE2 二聚体发生反应。病毒攻击后的 7、14、28 天从这些动物中采集的样品中, 抗体持续存在。但是与对照动物相比较, 免疫过的动物在病毒攻击后都没有获得另外的 HEV 抗体 (图 21A)。

讨论

前面的研究已将恒河猴 (Rhesus monkey) 建立为 HEV 的合适动物模型。发现感染剂量接近基因组剂量 (Tsarev 等人, 1994b), 与实验感染相关的病理学用以与人体天然感染相关的病理学相比较 (Tsarev 等人, 1993b)。为了获得一种清楚的指征, 即是否细菌表达的多肽对 HEV 提供保护, 本研究中所用的动物用相当大剂量的、含有至少 10^5 基因组当量的 HEV 病毒进行感染。我们的结果显示, 感染导致 3 个对照动物的粪便样品中延长了至少 10 天的病毒分泌, 在 PBMC 样品中用病毒基因组检测证明两只动物有短暂的病毒血症。而且, 在两只动物中感染伴随着 HEV 血清转化。推测因为攻击的病毒在以前的灵长类动物中的传代中被削弱, 但是所有对照动物仍然保持健康, ALT 水平正常。

发现用纯化的 pE2 免疫引起了活跃的针对其单体和二聚体形式多肽的抗体反应。二聚体反应性抗体的水平基本上高于相应单体特异性抗体的水平。除了这些抗体, 血清中不存在其它的 HEV 反应。pE2 反应性抗体显然在免疫动物中阻止了实验感染。在两只免疫动物中粪便的病毒分泌消失, 在第 3 只动物中, 分泌时间已从对照动物的 10 或更多天而减少到 1 天。进一步显示免疫过的动物在其 PBMC 或血浆样品中没有发现可检测的病毒, 在病毒攻击后, 这些动物也没有获得另外的 HEV 抗体。

综合以上结果显示, 用重组表达的 pE2 肽免疫已阻止了 HEV 同种株对灵长类的实验感染, 保护很大程度上是得益于抗 pE2 肽二聚体形式的抗体。因为在不同的 HEV 分离株之间是高度保守的, 包括分离自墨西哥 (Huang 等人, 1992) 和美国 (Schlauder 等人, 1998)

的遗传变异最大的分离株，可能 pE2 肽能够同样阻止 HEV 其它株的感染。

下面提供的实施例用于阐明发明的概念，而不限制权利与要求确定本发明的范围。

实施例

病毒株—中国 HEV 株的 DDBJ 登录号为 D11092，由中国北京医科大学 Zhuang H 教授提供 (Aye 等人, 1992)。根据 Zhuang 描述的方法 (Zhuang 等人, 1992)，用戊肝病人的粪便样品实验感染恒河猴，再从其胆汁中获得病毒。

血清—本发明所述的 96 份血清是经过香港皇后玛珈丽医院允许，取自正在发病的或得过病的非甲、非乙、非丙型急性肝炎病人。样品采集自正在住院的病人或出院后的不同时期。

实施例 1 HEV 衣壳基因的克隆

HEV RNA 的提取

根据生产者的说明，用 QIAamp Virus RNA 试剂盒 (QIAGEN GbmH, Hilden, Germany)，从实验感染了 HEV 的恒河猴 (Zhuang 等人, 1992) 的肝汁中提取 RNA。纯化的 RNA 与两倍体积的异丙醇 (BDH Laboratory Supplies, England)、1/10 体积的 3M 醋酸钠 (pH6.4) (Sigma, 美国) 混匀，置于 -20℃ 1 小时。之后，混合物以 15,000 转/分钟离心 15 分钟。沉淀用 70% 乙醇 (BDH Laboratory Supplies, 英国) 洗一次，然后重悬于反转录缓冲液中。

目的序列的 RT-PCR

为了进行反转录，RNA 沉淀加到 20ul RT 混合物中 (4ul 5 × RT 缓冲液 [Boeringer Mannheim]; 1.6ul 2.5mM dNTP; 0.2ul 禽成髓细胞血症病毒 (AMV) [Boeringer Mannheim]; 0.625ul RNAsin

[Boeringer Mannheim]; 1ul 下游引物 E5R 或 E3R (150ug/ul); 12.6ul 无 RNase 的水), 在 42℃ 温育 1 个小时。

所用的引物列于表 9。E3R 和 E5R 是用于合成病毒的 cDNA 片段。分别用引物对 ORF2F/ORF2Rb 和 ORF3F/ORF3R 扩增 ORF2 和 ORF3 的 3' 端区域的相应 cDNA 序列。这些引物已设计成带有 BamHI 和 EcoRI 限制性内切酶位点, 易于克隆扩增的 cDNA 片段。所有的引物由美国 Life Technologies 合成。

最初的 cDNA 序列位于 6326-7136 位, 在 6957 位带有一个单碱基删除, 这段序列由引物对 ORF2F/ORF2Ra 克隆自 ORF2 区域。但是, 新的 E2 cDNA 序列 (即 SE ID NO:1) 可以用同样的上游引物 ORF2F 和新的下游引物 ORF2Rb 从同一区域克隆出来, ORF2Rb 位于 6932-6956 位核苷酸处。新克隆的序列编码相同的 pE2 肽 (即 SEQ ID NO:2), 但新的终止密码下游的序列被去除。

表 9 RT 和 PCR 引物

引物*	目的	位置	序列	酶切位点
E3R	RT	5508-5529	5'-CGGGGAGTCAACATCAGGCACT-3'	
E5R	RT	7117-7140	5'-AAGCAAATAAACTATAACTCCCGA-3'	
ORF2F	克隆	6326-6350	5'- <u>GCTGGATCC</u> CAGCTGTTCTACTCTCGTCCCGTCG-3'	BamHI
ORF2Ra	克隆	7117-7136	5'- <u>GGCGAATTCC</u> AAATAAACTATAACTCCCGA-3'	EcoRI
ORF2Rb	克隆	6932-6956	5'-GGCGAATTCCGGGGGGCTAAACAGCAACCGCGGA3'	EcoRI
ORF3F	克隆	5364-5384	5'- <u>CCGGGATCC</u> GACCTCGTGTTCGCCAACCCG-3'	BamHI
ORF3R	克隆	5457-5477	5'- <u>CAGGAATTCC</u> TTAGCGGCGCGGCCCCAGCTG-3'	EcoRI
A3R	RT-PCR	4566-4586	5'-GGCTCACCGGAGTGTTCCTC-3'	
A5F	RT-PCR	4341-4362	5'-CTTTGATGACACCGTCTTCTCG-3'	
B3R	RT-PCR	4554-4575	5'-GTGTTTCTTCCAAAACCCTCGC-3'	
B5F	RT-PCR	4372-4392	5'-GCCGCAGCAAAGGCATCCATG-3'	

* 引物是参照中国 HEV 分离株 (DDBJ 登录号 D11092) 的序列而设计。非 HEV 序列用下划线表示。

目的 cDNA 序列的 PCR 扩增是将 5ul cDNA 加入 45ul PCR 混合物

中 (5ul 10 ×Taq 缓冲液) [Boeringer Mannheim]; 4ul 2.5mM dNTP 混合物; 1.0ul 的每种引物 (150ng/ul); 1ul Taq DNA 聚合酶 (1U/ul) [Boeringer Mannheim]) 和 33ul 超纯水。加入 50ul 矿物油于 PCR 混合物表面。热循环条件为: 94℃ 变性 40 秒; 57℃ 复性 40 秒; 72℃ 延伸 1 分钟。从 ORF2 和 ORF3 得到的 PCR 产物分别命名为 E2 和 E3。

克隆至 pGEX 载体

PCR 产物用酚-氯仿抽提, 然后用乙醇沉淀。产物 E2 和 E3 以及用 BamHI 和 EcoRI (Boeringer Mannheim) 消化。pGEX₂₀ 载体由香港大学微生物系 Liang Cao 博士馈赠。它来源于 pGEX 表达载体 (Smith 等人, 1988), 其多克隆位点为 5' -CCGCGTGGATCCGAAATTCCTCG AGATCGATTAG-3', 含有 BamHI、EcoRI、XhoI 和 ClaI 限制性剪切识别序列。消化的片段用琼脂糖凝胶电泳分离, 切出目的条带, 电洗脱后用乙醇沉淀。之后, 用 T4 连接酶 (Boeinger Mannheim) 将 E2 和 E3 连至 pGEX₂₀。用基因脉冲器 [BIO-RAD] 电转, 将重组质粒 pGEX₂₀-E2 和 pGEX₂₀-E3 转化到 DH5α 大肠杆菌中, 涂布在带有青霉素 (100ug/ml) 的 LB 琼脂板上 (Sambrook 等人, 1989)。挑选 20 个转化克隆提取质粒, 质粒进行 BamHI 和 EcoRI 消化, 选择预计插入片段的重组子 (图 6)。本研究中所用的所有质粒都用 QIAgen miniplasmid 试剂盒制备 (QIAgen, Hilden, 德国)。

测序

用 ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit [PERKIN ELMER] 进行 DNA 测序。结果显示, 811bp 的 E2 序列位于 6326-7136 位, 在 6957 位带有一个单碱基删除, 推测是由 PCR 扩增错误引起。产生的移码突变引起翻译在 6968 位的一个新终止密码处提前终止, 产生一个比预计小的 213 氨基酸、分子量为 23kD 的多肽, 而不是最初期望的 267 个氨基酸。E2 的位置及相关片段如图 1 所示。

实施例2 HEV多肽的产生和纯化

GST融合蛋白的表达

重组质粒转化到 BL21 大肠杆菌中。挑选单克隆于 2 ×YTA 培养基(蛋白胨 16g/L;酵母膏 10g/L;NaCl 5g/L;青霉素 100ug/L)。4ml 过夜培养物接种到 400ml 2 ×YTA 培养基中,在 28℃ 培养至 OD600 大于等于 0.5。加入 IPTG[Pharmacia Biotech, 美国](400ul 100mM 溶液),继续培养 5-6 小时。在 Beckman J2-MC 转子 JA-14 以 7000 转/分钟离心 10 分钟,收获细胞。

纯化

沉淀用磷酸盐缓冲液(PBS:0.8% NaCl;0.02% KCl;0.144% Na₂HPO₄; 0.024% KH₂PO₄, pH 7.0)洗涤一次,重悬于 20ml PBS,用 SONIPREP 150[MSE]超声破碎(30 秒超声;30 秒停;35 个循环;power 18-22)。超声后,加入 Triton-X100(Sigma, 美国)至终浓度为 1%,温和振荡混合物 30 分钟。细菌裂解物在 4℃ 离心,收集上清。融合蛋白的批次纯化根据"GST Fusion Protein System Manual"用谷胱甘肽凝胶-4B[Pharmacia Biotech, 美国]进行。结合融合多肽用洗脱缓冲液(10mM 还原谷胱甘肽溶于 50mM Tris-HCl, pH 8.0)洗脱两次,相应于 ORF2 和 ORF3 cDNA 序列分别命名为 GE2 和 GE3。

凝血酶剪切结合于 Bulk 基质的融合蛋白

凝血酶[Pharmacia Biotech, 美国](5ul 的 1U/ul 溶液)和 95ul PBS 加入到的 100ul 结合于谷胱甘肽凝胶-4B 的 GE2,于 22℃ 温育 16 小时。离心收集上清,将第 2 次基质洗涤的上清汇集在一起。这种由凝血酶剪切出的蛋白命名为 pE2。

实施例3 HEV多肽的鉴定

SDS PAGE (SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳)分析

根据标准方法 (Sambrook 等人, 1989) 制备 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶。4 μ g 多肽样品上到凝胶上, 用 Minigel TwinG42 [Biometra, 德国] 电泳槽于 100 伏电泳 3 个小时。凝胶用考马斯亮兰 R250 混合物 (45ml 甲醇, 45ml 水和 10ml 冰乙酸) 染色。

Western 印迹

SDS-PAGE 结束后, 用 Mini-PROTEIN II Cell 电转仪 [BIO-RAD] 在 100 伏条件下进行一小时, 将凝胶中的蛋白被转移到 0.45 μ m 的硝酸纤维膜上 [BIO-RAD, 美国]。在 1 \times PBS 配制的 5% 脱脂奶 [Carnation, Nestle] 中 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜后, 将膜与来自戊肝病人的血清 (1:500) 或来自几内亚猪的抗 GST 血清 (1:1000) 在室温反应 1.5 小时。洗涤三次, 每次用含 0.05% Tween₂₀ 的 PBS 洗 5 分钟, 将膜与偶连于辣根过氧化物酶 (HRP) 的 Protein-A [BIO-RAD, 美国] 在室温反应 1.5 小时。再洗三次, 将膜与 3-氨基-9-乙烷基吖唑 [AEC Single Solution, ZYMED, 美国] 在室温反应 5-10 分钟, 产生阳性带。将膜转移到水里而终止颜色反应。以上所说的血清和偶联物都是在封闭缓冲液 (用 1 \times PBS 配制的 5% 脱脂奶 [Carnation, Nestle] 中稀释)。

实施例 4 检测抗 HEV IgG 和 IgM 的 ELISA 法的建立 血清来源

研究了 96 份采集于香港皇后玛珈丽医院的非甲、非乙、非丙型肝炎病人血清。其中的 74 份进一步用商用 HEV 试剂盒 [Genelabs, 新加坡] 测定。90 份健康献血者的血清采集自王后玛丽医院。

用 HEV 多肽抗原进行 ELISA 检测

用 0.063 μ g/ml 的纯化 pE2 肽 (在 0.05M pH9.5 的碳酸钠溶液中的浓度为 6.3ng/100 μ l) 或 0.23 μ g/ml 的纯化 GE3 多肽 (在 0.05M pH9.5 的碳酸钠溶液中的浓度为 23.0ng/100 μ l) 包被聚苯乙烯微孔滴度板 [Nunc, 丹麦], 用于进行 pE2 或 GE3 的特异性测定。使用的多

肽浓度预先调整到最佳。在 4℃ 孵育过夜后,用 350ul 洗涤缓冲液(含有 0.05% Tween₂₀ 的 PBS)洗一次,然后用含 2% 小牛血清白蛋白(BSA) [Sigma, 美国]的 PBS 在 4℃ 封闭 24 小时。板用洗涤缓冲液洗两次。加入以 1:100 稀释的 0.1ml 的血清样品到双孔(稀释液:含 1% BSA 和 0.2% Bronodox 的 PBS),检测 HEV 抗体水平。在 37℃ 温育 30 分钟后,微孔用洗涤缓冲液洗 5 次。与 1:25,000 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)偶联的人 IgM 特异的抗血清[BIOSOURC]反应以检测 IgM 抗体,与 1:16,000 稀释的 HRP 偶联的蛋白 A[BIO-RAD]反应以检测 IgG 抗体(稀释液:含 1% BSA、0.2% bronidox、10% 蔗糖的 PBS)。37℃ 温育 30 分钟后,再洗涤 5 次,加入 100ul TMB 底物(3,3',5,5'-四甲基对二氨基联苯) [Diesse, 意大利]。在 37℃ 温育 15 分钟后,用 0.3M 硫酸终止反应。用 Anthos 2001 微孔板读数仪[ANTHOS LAB]在 450nm 波长读板。为了能够比较不同测定批次获得的结果,每次测定都包括一份参考血清,每一次测定获得的测试血清的 OD 值都对当次获得的参考血清的 OD 值进行标准化处理。抗 pE2 IgG 的阈值设定为由 Western 印迹测定无反应的血清的平均 OD 值的 3SD。抗 pE2 IgM 的阈值设定为健康献血者的血清的平均 OD 值的 3SD。

pE2 IgG 亲和力测定

血清进行系列稀释,以双孔方式与包被了 pE2 的微孔板反应。37℃ 温育 30 分钟后,洗板,再用 PBS(对照)或含有 4M 尿素的 PBS 在室温下处理 10 分钟。再洗板,然后如上与 HRP-蛋白 A 偶联物反应。

实施例 5 用 Western 印迹检测抗 pE2 IgG

血清来源

实施例 4 中所用的所有血清用于 Western 印迹技术重新测试

Western 印迹

将 34ug 纯化的 pE2 上样到 SDS 聚丙烯酰胺凝胶的 70mm 宽的单

泳道上，以 100 伏电泳 3 小时。电泳后，在一个 MINI-PROTEIN II Cell[BIO-RAD]电转仪中，以 100 伏电转 1 个小时，将多肽转移到一张 0.45um 的干净硝酸纤维素膜[BIO-RAD]。在封闭缓冲液中于 4℃ 振荡过夜，将膜剪成 2mm 的条。将条与每份以 1:250 稀释的血清分别孵育 1.5 小时。然后用洗涤缓冲液将条洗 3 次，每次 5 分钟，再与以 1:30,000 稀释的碱性磷酸酶偶联的羊抗人 IgG[Sigma, 美国]在室温孵育 1.5 小时。洗涤 3 次，加入 BCIP/NBT 混合物[Gibico BRL, 美国]以进行颜色反应，将条放入水中以终止反应。结果证实，由 ELISA 检测的大多数抗体是那些能结合于 pE2 的二聚体形式而不是其单体形式的抗体。

实施例 6 免疫捕获 RT-PCR(IC-RT-PCR)

特异兔多克隆抗体的产生

用于产生 HEV 抗体的抗原是谷胱甘肽 S 转移酶融合蛋白 GE2 形式的 pE2 肽。重 2.5-3.0 公斤重的雌白兔用 100ug 抗原免疫。第一剂量中含有等体积的完全福氏佐剂。以后的剂量以 10-14 天为间隔，其中加入了不完全福氏佐剂。当用 ELISA 检测到 1:10,000 稀释的兔血清中的特异抗体时，通过静脉给予兔子 100ug 溶于 PBS 的抗原进行刺激。刺激后的第 4 天，通过心脏穿刺采血。用 Western 印迹和 ELISA 评估特异抗体。

粪便悬浮液的制备

在广州第一人民医院收集了 13 份急性戊肝病患者的粪便。在接种 HEV 后的 0-30 天收集 3 只实验感染 HEV 猴子的粪便。

5 克粪便样品与 20ml 1 ×PBS 混匀，在 4℃ 孵育 1 小时。混合物以 1500 转/分钟离心 10 分钟，收集上清用于免疫捕获。

贝类匀浆上清液的制备

64 份贝类样品收集于香港市场，17 份收集于环境保护系。

将 20 克贝肉彻底混匀，匀浆与 100ml 0.2M 甘氨酸-0.15M NaCl 缓冲液 (pH 9.5) 和 2ml Cat-Floc 贮存液 (1% W/V) 混匀。得到的混合物经涡旋混匀，在 4℃ 孵育 10 分钟。然后以 1000 转/分钟离心 5 分钟。收集上清用于免疫捕获。

HEV 颗粒接种

含有 HEV 颗粒的胆汁由 Zhuang Hui 教授 (北京医科大学) 慷慨馈赠，肝汁是采自确证实验感染了 HEV 的恒河猴。胆汁用含 1% 的 PBS 稀释 200 倍，即为贮存液。贮存液从 5^0 至 5^6 进行 5 倍系列稀释后，即为工作液。10ul 的每一种工作液与 5ml 水、粪便上清液或贝类上清混匀，产生接种了 HEV 的样品，用于 IC-RT-PCR 和直接 RT-PCR 比较。

免疫捕获

用 50mM 碳酸钠/重碳酸钠缓冲液 (pH 9.6) 以 1:200 倍稀释抗血清，用作包被溶液。Nunc-Immuno 片 [Nunc, Denmark] 用 1ml 包被溶液在 37℃ 包被 4 小时。去掉抗血清，加入 1ml 含 2% 小牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS，在 37℃ 温育 1 小时。然后用含 0.05% Tween₂₀ 的 PBS 洗涤，转移至一个管子中用于免疫捕获。在管中加入 4.5ml 贝类悬浮液或 20% 粪便悬浮液，管子在 4℃ 温和振荡过夜。免疫片，用含 0.05% Tween₂₀ 的 PBS 洗涤 3 次，转移到小离心管中用于提取 RNA，进行巢式 RT-PCR 以检测 HEV RNA。

病毒 RNA 提取

140ul 无 RNase 水和 560ul AVL 缓冲液加入到装有免疫片的管中。然后根据 "QIAgen Viral RNA Handbook" 的说明提取病毒 RNA。之后，1/10 体积 2M 醋酸钠 (pH 4.6) 和 1 倍体积的异丙醇加入到纯化的 RNA 中。混匀混合物，在 -20℃ 放置 1 个小时，然后在 4℃ 以 14,000 转/分钟离心 15 分钟。沉淀用预冷的 70% 乙醇洗涤 1 次。离

心后, 小心去掉乙醇, 沉淀在室温空气干燥 15 分钟, 然后反转录成特异的 cDNA。

反转录 (RT) 和巢式 PCR

用于 RT 和 PCR 的引物列于表 9。外部的引物对为 A5F 和 A3R, 内部的引物对为 B5F 和 B3R。

RT-PCR: 每一份 RNA 沉淀与 20ul RT 混合物混匀, 20ul RT 混合物包括 4ul 5 × RT 缓冲液 [Boeringer Mannheim]; 1.6ul 2.5mM dNTP; 0.2ul 25/uI 的禽成髓细胞血症病毒 (AMV) [Boeringer Mannheim]; 0.625ul 40U/uI 的 RNAsin [Boeringer Mannheim]; 1ul 150ng/uI 的反向引物 (A3); 12.6ul 无 RNase 的水。在 42℃ 温育 1 个小时后, 将 5ul cDNA 加入 45ul PCR 混合物中, 45ul PCR 混合物包括 5ul 10 × Taq 缓冲液 [Boeringer Mannheim]; 4ul 2.5mM dNTP 混合物; 1.0ul 正向和反向引物 A3 和 A5 (150ng/uI); 1ul 1U/uI 的 Taq DNA 聚合酶 [Boeringer Mannheim] 和 33ul 超纯水。将 50ul 矿物油加在 PCR 混合物表面。扩增在 DNA Thermal cycler 480 [Perkin-Elmer Cetus] PCR 仪上进行, 热循环条件为: 94℃ 变性 40 秒; 57℃ 复性 40 秒; 72℃ 延伸 1 分钟 20 秒。总共运行 35 个循环, 最后在 70℃ 自动延伸。

巢式 PCR 和 amplicon 检测: 2ul 第一次 PCR 产物加入到 48ul PCR 混合物中, 其成份除了引物为 B3 和 B5 外与第一次 PCR 相同。5ul PCR 产物和 50bp 的 DNA ladder [GibcoGRL] 上样于 2% 琼脂糖凝胶 (TBE 缓冲液配制), 以 100 伏电泳 30 分钟。凝胶用 0.5ug/ml 的溴化乙锭染色 15 分钟, 然后在紫外灯下观察。

实施例 7 pE2 在针对 HEV 的保护中的作用 动物

野生恒河猴经一个月隔离后, 采血检测 ALT 和 HEV 抗体。排除 ALT/AST 超过 60 或抗 HEV IgG 阳性的猴子。将猴子分成两组, 一个

为试验组，一个对照组。每组由3只动物组成。

免疫接种

实验组每星期进行1次血管内免疫，共4次，每一剂量含100ug纯化的pE2。第一剂量含有等体积的完全福氏佐剂。后来的剂量中含有不完全福氏佐剂。对照动物注射含相应佐剂的安慰剂。每周采集血清样品用于检测HEV抗体。当特异抗体达到一个满意水平后，给予动物一个I/V刺激。两组动物在最后一次免疫两周后，用 10^5 基因组当量的HEV同源株进行静脉内注射。感染后，每两天收集一次病毒样品，每周收集一次外周血样品，持续5个星期。用ficoll-hypaque梯度离心分离血浆和外周单核血细胞（PMBC）（Kanof等人，1998）。在一台自动分析仪上（Model 7170, HITACHI, 日本）检测新鲜采集的血清样品中的丙氨酸氨基转移酶（ALT）水平。贮存血浆样品用于HEV抗体和HEV基因组的检测。

HEV 颗粒攻击

两组动物在最后一次免疫两周后用 10^5 基因组当量的HEV同源株进行静脉内注射。

灵长类监测

感染后，每两天收集一次病毒样品，每周收集一次外周血样品，持续5个星期。用ficoll-hypaque梯度离心分离血浆和外周单核血细胞（PMBC）（Kanof等人，1998）。在一台自动分析仪上（Model 7170, HITACHI, 日本）检测新鲜采集的血清样品中的丙氨酸氨基转移酶（ALT）水平。贮存血浆样品用于HEV抗体和HEV基因组的检测。

用北京医科大学生产的商用HEV ELISA试剂盒检测HEV抗体水平，也用包被了纯化的pE2肽的微孔滴定板进行测定。用Western印迹检测抗纯化的病毒多肽的抗体，其中约有0.5ug的pE2或100ug的GE3被上样到70mm宽的10% SDS聚丙烯酰胺凝胶上。电泳后，

病毒多肽经电转印迹到硝酸纤维膜上。膜在 5% 脱脂奶中经 4℃ 振荡过夜，再剪成 2mm 的条备用。1:2000 稀释的辣根过氧化物酶偶联的蛋白 A (BIO-RAD, 美国) 用作第二抗体。

根据生产者的说明，分别用 QIAmp RNA blood mini-kit 和 QIAgen Viral RNA kit (QIAGEN, 德国) 提取 PMBC 和血浆中的病毒 RNA。纯化的病毒 RNA 进行反转录，然后用巢式 PCR 扩增。用于反转录的引物为 A3R。外侧引物对为 A5F 和 A3R，内侧引物对为 B5F 和 B3R (表 9)。

免疫捕获法用于检测粪便样品中的 HEV。聚乙烯片 [Nunc, Denmark] 用 1ml 1:100 稀释的超免疫兔抗 pE2 血清在 37℃ 包被 4 小时。包被的片用 1ml 含 2% 小牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 在 37℃ 温育 1 小时进行封闭。然后用含 0.05% Tween₂₀ 的 PBS 洗涤，片转移至一个含 4.5ml 20% 粪便上清的管子中。管子在 4℃ 温和振荡过夜。然后将片用含 0.05% Tween₂₀ 的 PBS 洗涤 3 次，转移到一个干净的管中，用 QIAgen Viral RNA kit (QIAGEN, 德国) 提取 RNA。纯化的病毒 RNA 进行如上所述的反转录和扩增。

工业应用

克隆自戊型肝炎病毒 (HEV) 中国株基因组的、具有高度免疫原性的病毒多肽 pE2，在研制用于 HEV 检测的可靠诊断方法和诊断测定中，以及在研制人类针对 HEV 的保护的疫苗组成和疫苗方法中都有很大用途。

10. Bradley, D.W. and M.S. Balayan. 1988. 肠道传播的非甲、非乙型肝炎病毒[letter]. *Lancet*. 1:819.
11. Britton, M.A., and A.X. Heinz. 正链RNA病毒的新发现。美国微生物社会, 华盛顿, 1990.
12. Coursaget, P., Y. Buisson, N. Depril, P.L. Canne, M. Chavaud, C. Molinie, and R. Roue. 1993. 用合成肽分析戊型肝炎病毒编码的蛋白在开放读码框2和3的线性B细胞表位图谱。*FEMS Microbiol. Lett.* 109:251-256.
13. Demeke, T. and R.P. Adams. 1992. 植物多糖和缓冲液添加物对PCR的影响。 *生物技术(Biotechniques)*. 12:332-334.
14. Dilawari, J.B., K. Singh, Y.K. Chawla, G.N. Ramesh, A. Chauhan, S.R. Bhusnurmath, T.R. Sharma, and C.S. Sokhey. 1994. 戊型肝炎病毒: 北印第安流行的流行病学、临床和血清学研究。 *Indian J. Gastroenterol.* 13:44-48.
15. Donati, M.C., E.A. Fagan, and T.J. Harrison. 1997. 来源于爆发性戊型肝炎的人肝脏的全长HEV克隆的序列分析。 *病毒性戊型肝炎和肝脏疾病* (M. Rizzetto, R.H. Purcell, J.L. Gerin, and G. Verme, Eds.), p.p. 313-316. Edizioni Minerva Medica, Torino.
16. Harlow and Lane, 抗体: 实验室手册, 冷泉港实验室, 纽约, 1988.
17. Har, C.H., T.T. Hien, N.T. Tien, H.B. Khiem, P.K. Sac, V.T. Nhung, R.P. Larasati, K. Laras, M.P. Putri, R. Doss, K.C. Hyams, and A.L. Corwin. 1999. 越南湄公河三角洲区域肠道甲肝病毒和戊肝病毒的流行。 *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60:277-280.
18. Huang, C.C., D. Nguyen, J. Fernandez, K.Y. Yun, K.E. Fry, D.W. Bradley, A.W. Tam, and G.R. Reyws. 1992. 戊型肝炎病毒(HEV)墨西哥分离株的分子克隆和测序。 *病毒学(Virology)*. 191:550-558.
19. Hussaini, S.H., S.J. Skidmore, P. Richardson, L.M.

参考文献

1. Arnon. R. 1987. 合成疫苗. 1:83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fl.
2. Ausubel, F.M. et al., 分子生物学中的现代技术, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989.
3. Aye, T.T., Uchida, X.Z. Ma, F.lida, T. Shikata, H. Zhuang and K.M.Win. 1992. 分离自中国新疆流行病(1986-1988)的戊型肝炎病毒的完整核酸序列. 核酸研究(Nucleic Acids Res). 20:3512.
4. Aye, T.T., Uchida, X.Z. Ma, F.lida, T. Shikata, M. Ihcikawa, T. Rikihisa, and K.M. Win. 1993. 分离自缅甸的戊型肝炎病毒的序列和基因结构. 病毒基因(Virus Genes). 7:95-109.
5. Balayan, M.S., A.G. Andjaparidze, S.S. Savinskaya, E.S. Ketiladze, D.M. Braginsky, A.P. Savinov, and V.F. Polescschuk. 1983. 一种非甲、非乙型肝炎病毒通过粪-口途径传播的证明. Intervirology. 20:23-31.
6. Belabbes, E.H., A. Bourgurmouh, A. Benatallah, and G. Illoul. 1985. 阿尔及利亚非甲、非乙病毒性肝炎的流行: 由水传播的有力证据. 医学病毒学杂志(J. Med. Virol.). 16:257-263.
7. Beril, C., J.M. Crance, F. Leguyader, V. Apaire-Marchais, F. Leveque, M. Albert, M.A. Goraguer, L. Schwartzbrid, and S. Billaudel. 1996. 海扇和贻贝中病毒和细菌指示剂的研究. 海洋污染通报(Marin Pollution Bulletin). 32:404-409.
8. Berke, T., B. Golding, X. Jiang, W.C. David, M. Wolfaardt, A.W. Smith, and D.O. Matson. 1997. 杯状病毒种系发生分析. 医学病毒学杂志(J. Med. Virol.). 52:419-424.
9. Bi, S.L., M.A. Purdy, K.A. McCaustland, H.S. Margolis, and D.W. Bradley. 1994. 直接从中国暴发流行的单一来源分离出的戊型肝炎病毒的序列. 病毒研究(Virus Res.). 33:98.

- 蛋白通过 Western blot 检测对戊型肝炎病毒的持久和短暂的抗体反应。临床微生物学杂志 (J Clin Microbiol.). 32:2060-2066.
30. Li, F., J. Torressi, S.A. Locsrnini, H. Zhuang, W. Zhu, X. Guo, and D.A. Anderson. 1997. 当戊型肝炎病毒的全长开放读码框 2 表达于大肠杆菌, 其氨基端表位暴露而羧基端表位被掩盖。医学病毒学杂志 (J Med Virol.) 52:289-300.
31. Li, T.C., Y. Yamakawa, K. Suzuki, M. Tatsumi, M.A. Razak, T.Uchida, N. Takeda, and T. Miyamura. 1997. 戊型肝炎病毒空的病毒样颗粒的表达和自组装。病毒学杂志 (J Virol). 71:7207-7213.
32. Myint, H., M.M. Soe, T. Khin, T.M. Myint, and T.M. Tin. 1985. 仰光的一次非甲、非乙型肝炎流行的流行病学研究。Am. J. Trop. Med. Hyg. 34:1183-1189.
33. Purdy, M.A., K.A. McCaustland, K. Krawczynski, A. Tam, M.J. Beach, N.C. Tassopoulos, G.R. Reyes, and D.W. Bradley. 1992. 肠道传播的非甲、非乙型肝炎: 从南德里一次流行中回收病毒样颗粒以及在恒河猴中的传播研究。肝脏病学 (Hepatology). 10:466-472.
34. Purdy, M.A, K.A. McCaustland, K. Krawczynski, A. Tam, MJ. Beach, N.C. Tassopoulos, G.R. Reyes, and D.W. Bradley. 1992. 带有被人和实验感染的灵长类血清抗体识别表位的戊型肝炎病毒 (HEV) -trpE 融合蛋白的表达。Arch Virol. 123: 335-349.
35. Purdy, M.A., K.A. McCaustland, K. Krawczynski, J. Spelbring, G.R. Reyes, and D.W. Bradley. 1993. 一种 trpE-HEV 融合蛋白保护食蟹猴免受野生型戊型肝炎病毒 (HEV) 攻击的初步证据。医学病毒学杂志 (J. Med. Virol.) 41:90-94.
36. Reyes, G.R., C.C. Huang, A.W. Tam, and M.A. Purdy. 1993. 戊型肝炎病毒 (HEV) 的分子机制和复制。Arch. Virol. Suppl. 7:15-25.

- Sherratt, B.T. Cooper, J.G. O' Grady. 1997. 怀孕期严重的戊型肝炎感染。病毒性肝炎杂志 (J. Viral. Hepat.). 4:51-54.
20. Imai, H., O. Yamada, S. Morita, S. Suehiro, and T. Kurimura. 1992. HIV-1 血清阳性个体的肝素化血浆中 HIV-1 RNA 的检测。病毒学方法 (J. Virol. Methods). 36:181-184.
21. Kanof, E.M., P. Smith, and H.Zola. 1998. 从外周血和 Cord 血中分离完整单核细胞。在“现代免疫学方法” (JE. Coligan, A.H. Kruisbeek, D.M. Margulies, E.M. Shevach, and W. Strober, Eds.), p.p. 7.1.1-7.1.3. John Wiley & Sons, Inc., Greene.
22. Kennet, R., Monoclonal Antibodies, Kenneth et al., Eds., Plenum Press, New York, p.p. 365-367.
23. Khudyakov, Y.E., M.O. Favorov, D.L. Jue, T.K. Hine, and H.A. Field. 1994. 在戊型肝炎病毒一种结构蛋白中的免疫优势抗原区域。病毒学 (Virology). 198:390-393.
24. Khudyakov., Y.E., N.S. Khudyakov, H.A. Field, D. Jue, C. Starling, M.O. Favorov, K.Krawczynski, L. Polish, E. Mast, and H. Margolis. 1993. 戊型肝炎病毒蛋白中的表位图。病毒学 (Virology). 194:89-96.
25. Khuroo, M.S. 1980. 不同于输血后非甲、非乙型的另一种人肝炎病毒的可能性。Am. J. Med. 68:818-824.
26. Kohler and Milstein, 1975. 自然 (Nature) 256:495-497.
27. Kolk, .H., A.R. Schuitema, S. Kuijper, J. van Leeuwen, P.W. Hermans, J.D. van Embden, and R.A.Hartskeerl. 1992. 用聚合酶链反应和非放射性检测系统检测临床样品中肺结核分枝杆菌。临床微生物学杂志 (J. Clin. Microbiol.) 30:2567-2575.
28. Krawczynski, K. 1993. 戊型肝炎。肝脏病学 (Hepatology). 17:932-941.
29. Li, F., H. Zhuang, S. Kolivas, S.A. Locamini, and D.A. Anderson. 1994. 用开放读码框 2 和 3 以及谷胱甘肽 S-转移酶融合

37. Sambrook et al., 分子克隆: 实验室手册, 第二版, 冷泉港实验室印刷, Plainview, 纽约, 1989.
38. Schlauder, G.G., G. J. Dawson, J. C. Erker, P. Y. Kwo, M. F. Knigge, D. L. Smalley, J. E. Rosenblatt, S. M. Desai, and I. K. Mushahwar. 1998. 分离自美国急性肝炎病人的一种新型戊型肝炎病毒的序列和种系发生分析. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt3): 447-456.
39. Smith, D. B., and K. S. Johnson. 1988. 表达于大肠杆菌、与谷胱甘肽 S-转移酶融合的多肽的一步纯化. *基因 (Gene)*. 67: 31-40.
40. Tam, A. W., M. M. Smith, M. E. Guerra, C. C. Huang, D. W. Bradley, K. E. Fry, and G. R. Reyes. 1991. 戊型肝炎病毒: 全长病毒基因组的分子克隆和测序. *病毒学 (Virology)*. 185:120-131.
41. Tsai, Y. L., C. J. Palmer, and L. R. Sangermano. 1993. 用聚合酶链式反应检测污水和淤泥中的大肠杆菌. *应用环境微生物学 (Appl. Environ. Microbiol.)* 59: 353-357.
42. Tsai, Y. L. and B. H. Olson. 1992. 用聚合酶链式反应从底泥的腐殖质中快速分离细菌 DNA 的方法. *应用环境微生物学 (Appl. Environ. Microbiol.)*. 58:2292-2295.
43. Tsarev, S. A., S. U. Emerson, G. R. Reyes, T. S. Tsareva, L. J. Legters, I. A. Malik, M. Iqbal and R. H. Purcell. 1992. 一种戊型肝炎原型株的鉴定. *美国国家科学院院报 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.)* 89:559-563.
44. Tsarev, S. A., T. S. Tsareva, S. U. Emerson, A. Z. Kapikian, J. Ticehurst, W. London, and R. H. Purcell. 1993a. 基于表达于昆虫细胞中的完整开放读码框 2 蛋白的戊型肝炎病毒 (HEV) 抗体 ELISA: 鉴定灵长类中的 HEV 感染. *感染疾病杂志 (J Infect Dis.)* 168:369-378.
45. Tsarev, S. A., S. U. Emerson, T. S. Tsareva, P. O. Yarbough, M. Lewis S. Govindarajan, G. R. Reyes, M. Shapiro and R. H.

54. Yin, S., R.H. Purcell, and S.U. Emerson. 1994. 一种新的戊型肝炎病毒中国分离株: 与来自于不同地理区域的毒株的比较。病毒基因 (Virus Genes). 9:23-32.
55. Zhang, J.Z., M.H. Ng, N.S. Xia, S.H. Lau, X.Y. Che, T.N. Chau, S.T. Lai, and S.W.K. Im, (In press). 细菌表达的戊型肝炎病毒结构蛋白重组多肽之间相互作用产生的构象型抗原决定簇。医学病毒学杂志 (J. Med. Virol.).

- Purcell. 1993b. 实验感染的食蟹猴过程戊型肝炎的变化。感染疾病杂志 (J Infect Dis.) 167:1302-1306.
46. Tsarev, S.A., T.S. Tsareva, S.U. Emerson, S. Govindarajan, M. Shapiro, J.L. Gerin, and R.H. Purcell. 1994a. 食蟹猴对戊型肝炎的成功的被动和主动免疫。美国国家科学院院报 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 91:10198-10202.
47. Tsarev, S.A., T.S. Tsareva, S.U. Emerson, P.O. Yarbough, L.J. Legters, T. Moskal, and R.H. Purcell. 1994b. 食蟹猴中戊型肝炎病毒原型株的感染滴定。医学病毒学 (J Med. Virol.) 43:135-142.
48. Tsarev, S.A., T.S. Tsareva, S.U. Emerson, S. Govindarajan, M. Shapiro, J.L. Gerin, and R.H. Purcell. 1997. 针对戊型肝炎的重组疫苗: 对异源攻击的剂量反应和保护。疫苗 (Vaccine). 15: 1834-1838.
49. Tsega, E., B-G. Hanson, K. Krawczynsky, and E. Nordenfelt. 1992. 埃塞俄比亚的急性散发病毒性肝炎: 原因、怀孕的危险因子和影响。临床感染疾病 (Clin. Infec. Dis.) 14:961-965.
50. Visvanathan, R. 1957. 德里的感染肝炎 (1955-1956): 评论研究: 流行病学。印度医学研究杂志 (Indian J. Med. Res.) 9). 45: 1-30.
51. Xing, L., K. Kato, T. Li., N. Takeda, T. Miyamura, L. Hammar, and R.H. Cheng. 1999. 重组戊型肝炎衣壳蛋白自组装成双域=1颗粒, 呈现天然病毒表位。病毒学 (Virology) 265:35-45.
52. Wong, D.C., R.H. Purcell, M.A. Sreenivasan, S.R. Prasad, and K.M. Pavri. 1980. 印度的流行和地方性肝炎: 非甲、非乙型肝炎病毒病原学的证明。Lancet. 2:882-885.
53. Yarbough, P.O. A.W. Tam, K.E. Fry, K. Krawczynski, K.A. McCaustland, D.W. Bradley, and G.R.Reyes. 1991. 戊型肝炎病毒: 型共同表位的鉴定。病毒学杂志 (J. Virol.) 65:5790-5797.

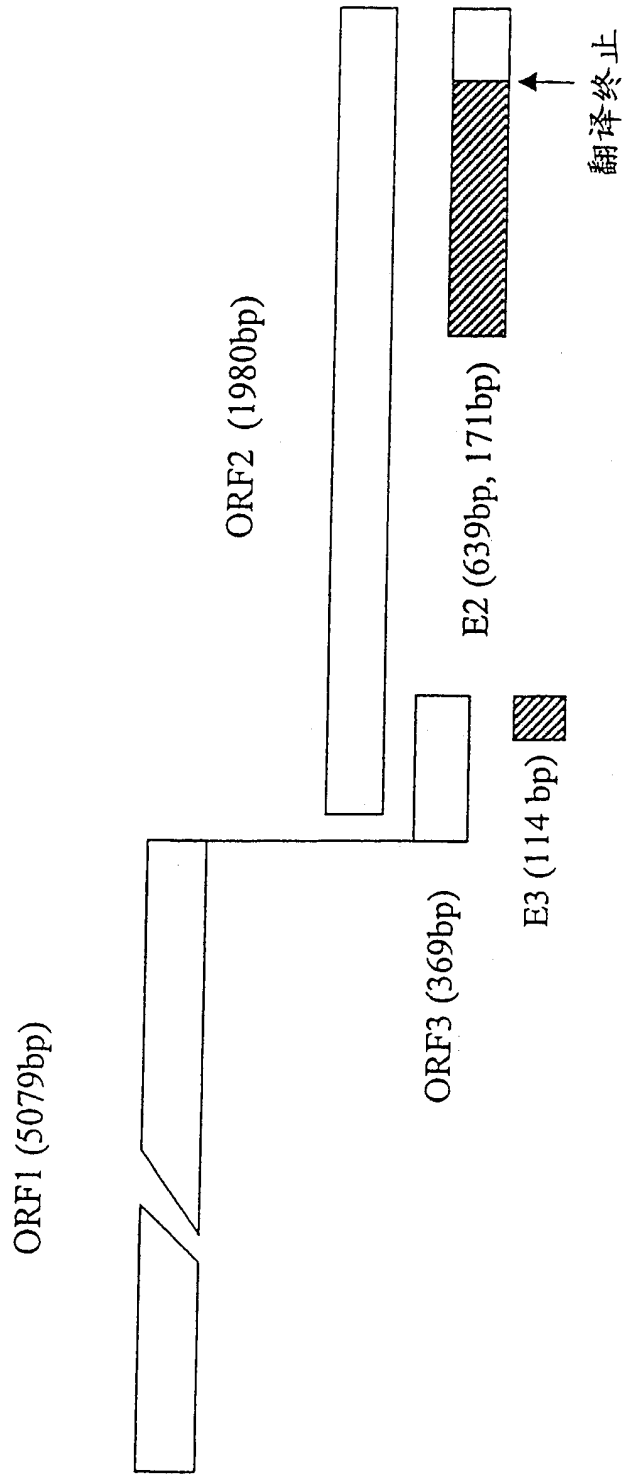


图 1

v10 v v v v
 ORF2 5147 ATGCGCCCTCGGCCTATTTTGCTGTTGCTCCTCATGTTTCTGCCTATGCT
 v60 v v v v
 ORF2 5197 GCCCGCGCCACCGCCCGGTGACCCGTCTGGCCGCGTCGTGGGCGGCGCA
 v110 v v v v
 ORF2 5247 GCGGCGGTTCCGGCGGTGGTTTCTGGGGTGACCGGGTTGATTCTCAGCCC
 v160 v v v v
 ORF2 5297 TTCGCAATCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTCGCCCCCGATGTCAC
 v210 v v v v
 ORF2 5347 CGCTGCGGCCGGGGCTGGACCTCGTGTTCGCCAACCCGCCCGACCACTCG
 v260 v v v v
 ORF2 5397 GCTCCGCTTGGCGTGACCAGGCCAGCGCCCCGCCGTTGCCCTCACGTCGT
 v310 v v v v
 ORF2 5447 AGACCTACCACAGCTGGGGCCGCGCCGCTAACCGCGGTGCTCCGGCCCA
 v360 v v v v
 ORF2 5497 TGACACCCCGCCAGTGCCTGATGTTGACTCCCGCGGCGCCATCCTGCGCC
 v410 v v v v
 ORF2 5547 GGCAGTATAACCTATCAACATCTCCCCTTACTTCTTCCGTGGCCACCGGT
 v460 v v v v
 ORF2 5597 ACAAACTTGGTTCTATACGCCGCTCCTCTTAGCCCACTTCTACCCCTCCA
 v510 v v v v
 ORF2 5647 GGACGGCACCAATACTCATATAATGGCCACAGAAGCTTCTAATTATGCCC
 v560 v v v v
 ORF2 5697 AGTACCGGGTTGCTCGTGCCACAATTGCTACCGCCCGCTGGTCCCAAC
 v610 v v v v
 ORF2 5747 GCTGTTGGTGGCTACGCCATCTCCATCTCGTTCTGGCCACAGACCACCAC
 v660 v v v v
 ORF2 5797 CACCCCGACGTCCGTTGACATGAATTCAATAACCTCGACGGATGTTGCGTA
 v710 v v v v
 ORF2 5847 TTTTAGTCCAGCCCGGCATAGCCTCCGAGCTTGTTATCCCAAGTGAGCGC

图 2A

```

          v760      v      v      v      v
ORF2 5897 CTACACTACCGTAACCAAGGTTGGCGCTCTGTTGAGACCTCCGGGGTGGC

          v810      v      v      v      v
ORF2 5947 GGAGGAGGAGGCCACCTCTGGTCTTGTTATGCTCTGCATACATGGCTCAC

          v860      v      v      v      v
ORF2 5997 CTGTAAATTCTTATACTAATACACCTTATACCGGTGCCCTCGGGCTGTTG

          v910      v      v      v      v
ORF2 6047 GACTTTGCCCTCGAACTTGAGTTCGCAACCTCACCCCGGTAATACCAA

          v960      v      v      v      v
ORF2 6097 CACGCGGGTCTCCCGTTACTCCAGCACTGCCCGTCACCGCCTTCGTGCGG

          v1010     v      v      v      v
ORF2 6147 GTGCAGATGGGACTGCCGAGCTTACCACCACGGCTGCTACCCGCTTCATG

          v1060     v      v      v      v
ORF2 6197 AAGGACCTCTATTTTACTAGTACTAATGGTGTGCGGTGAGATCGGCCGTGG

          v1110     v      v      v      v
ORF2 6247 GATAGCGCTTACCCTGTTTAACCTTGCTGACACCCTGCTTGCGGGTCTAC

          v1160     v      v      v      v
ORF2 6297 CGACAGAATTGATTTTCGTGCGGCTGGTGGCCAGCTGTTCTACTCTCGTCCC
E2      1      CAGCTGTTCTACTCTCGTCCC

          v1210     v      v      v      v
ORF2 6347 GTCGTCTCAGCCAATGGCGAGCCGACTGTTAAGCTTTATACATCTGTAGA
E2      22      GTCGTCTCAGCCAATGGCGAGCCGACTGTTAAGCTTTATACATCTGTAGA

          v1260     v      v      v      v
ORF2 6397 GAATGCTCAGCAGGATAAAGGTATTGCAATCCCGCATGACATCGACCTCG
E2      72      GAATGCTCAGCAGGATAAAGGTATTGCAATCCCGCATGACATCGACCTCG

          v1310     v      v      v      v
ORF2 6447 GGGAGTCTCGTGTAGTTATTCAGGATTATGACAACCAACATGAGCAGGAC
E2      122     GGGAGTCTCGTGTAGTTATTCAGGATTATGACAACCAACATGAGCAGGAC

```

图 2B

```

                v1360      v      v      v      v
ORF2 6497 CGACCGACACCTTCCCCAGCCCCATCGCGCCCTTTTTCTGTCCTCCGAGC
E2      172 CGACCGACACCTTCCCCAGCCCCATCGCGCCCTTTTTCTGTCCTCCGAGC
                v1410      v      v      v      v
ORF2 6547 TAATGATGTGCTTTGGCTTTCTCTCACCGCTGCCGAGTATGACCAGTCCA
E2      222 TAATGATGTGCTTTGGCTTTCTCTCACCGCTGCCGAGTATGACCAGTCCA
                v1460      v      v      v      v
ORF2 6597 CTTACGGCTCTTCGACCGGCCAGTCTATGTCTCTGACTCTGTGACCTTG
E2      272 CTTACGGCTCTTCGACCGGCCAGTCTATGTCTCTGACTCTGTGACCTTG
                v1510      v      v      v      v
ORF2 6647 GTTAATGTTGCGACCGGCGCGCAGGCCGTTGCCCGGTCACTCGACTGGAC
E2      322 GTTAATGTTGCGACCGGCGCGCAGGCCGTTGCCCGGTCACTCGACTGGAC
                v1560      v      v      v      v
ORF2 6697 CAAGGTCACACTTGATGGTCGCCCCCTTCCACCATCCAGCAGTATTCAA
E2      372 CAAGGTCACACTTGATGGTCGCCCCCTTCCACCATCCAGCAGTATTCAA
                v1610      v      v      v      v
ORF2 6747 AGACCTTCTTTGTCCTGCCGCTCCGCGGTAAGCTCTCCTTTTGGGAGGCA
E2      422 AGACCTTCTTTGTCCTGCCGCTCCGCGGTAAGCTCTCCTTTTGGGAGGCA
                v1660      v      v      v      v
ORF2 6797 GGTACTACTAAAGCCGGGTACCCTTATAATTATAACACCACTGCTAGTGA
E2      472 GGTACTACTAAAGCCGGGTACCCTTATAATTATAACACCACTGCTAGTGA
                v1710      v      v      v      v
ORF2 6847 CCAACTGCTCGTTGAGAATGCCGCTGGGCATCGGGTTGCTATTTCCA
E2      522 CCAACTGCTCGTTGAGAATGCCGCTGGGCATCGGGTTGCTATTTCCA
                v1760      v      v      v      v
ORF2 6897 ACACCACTAGCCTGGGTGCTGGTCCCGTCTCTATTTCCGCGGTTGCTGTT
E2      572 ACACCACTAGCCTGGGTGCTGGTCCCGTCTCTATTTCCGCGGTTGCTGTT

```

图 2C

```

                v1810      v      v      v      v
ORF2 6947 TTAGCCCCCACTCCGCGCTAGCATTGCTTGAGGATACCATGGACTACCC
          :::::::::::|::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
E2      622 TTAGCCCCCACTCCGCGCTAGCATTGCTTGAGGATACCATGGACTACCC
                终止密码子

                v1860      v      v      v      v
ORF2 6997 TGCCCGCGCCATACTTTCGATGACTTCTGCCCGGAGTGCCGCCCCCTTG
          :::::::::::|::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
E2      672 TGCCCGCGCCATACTTTCGATGACTTCTGCCCGGAGTGCCGCCCCCTTG

                v1910      v      v      v      v
ORF2 7047 GCCTCCAGGGCTGTGCTTTTCAGTCTACTGTCGCTGAGCTTCAGCGCCTT
          :::::::::::|::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
E2      722 GCCTCCAGGGCTGTGCTTTTCAGTCTACTGTCGCTGAGCTTCAGCGCCTT
                ORF2 终点
                v1960      v      v      v      v
ORF2 7097 AAGATGAAGGTGGGTAAAAC TCGGGAGTTATAGTTTATTGCTTGTGCC
          :::::::::::|::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
E2      772 AAGATGAAGGTGGGTAAAAC TCGGGAGTTATAGTTTATTT

                v2010      v      v      v      v
ORF2 7147 CCCTTCTTTCTGTTGCTTATTTCTCTTTTCTGCGTTCCGCGCTCCCTGAAA

ORF2 7197 AAA

```

图 2D


```

          v10      v      v      v      v
ORF3 5106 ATGAATAACATGTCTTTTGCTGCGCCCATGGGTTTCGCGACCATGCGCCCT

          v60      v      v      v      v
ORF3 5156 CGGCCTATTTTGCTGTTGCTCCTCATGTTTCTGCCTATGCTGCCCGCGCC

          v110     v      v      v      v
ORF3 5206 ACCGCCCGGTCAGCCGTCTGGCCGCCGTCGTGGGCGGCGCAGCGGCGGTT

          v160     v      v      v      v
ORF3 5256 CCGGCGGTGGTTTCTGGGGTGACCGGGTTGATTCTCAGCCCTTCGCAATC

          v210     v      v      v      v
ORF3 5306 CCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTCGCCCCGATGTCACCGCTGCGGC

          v260     v      v      v      v
ORF3 5356 CGGGGCTGGACCTCGTGTTTCGCCAACCCGCCCGACCACTCGGCTCCGCTT
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
E3      1      GACCTCGTGTTTCGCCAACCCGCCCGACCACTCGGCTCCGCTT

          v310     v      v      v      v
ORF3 5406 GCGGTGACCAGGCCAGCGCCCCGCCGTTGCCTCACGTCGTAGACCTACC
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
E3      51    GCGGTGACCAGGCCAGCGCCCCGCCGTTGCCTCACGTCGTAGACCTACC

          v360     v
ORF3 5456 ACAGCTGGGGCCGCGCCGCTAA
          ::::::::::::::::::::::::::::
E3      101  ACAGCTGGGGCCGCGCCGCTAA

```

图 3

```
          v10      v      v      v      v
pE2  1  QLFYSRPVVSANGEPTVKLYTSVENAQQDKGIAIPHDIDLGESRVVIQDY
          v60      v      v      v      v
pE2  51 DNQHEQDRPTPSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEYDQSTYGSSTGPVY
          v110     v      v      v      v
pE2 101 VSDSVTLVNVATGAQAVARSLDWTKVTL DGRPLSTIQQYSKTFVLP LRG
          v160     v      v      v      v
pE2 151 KLSFWEAGTTKAGYPYNYNTTASDQLLVENAAGHRVAISTYTTSLGAGPV
          v210
pE2 201 SISAVAVLAPPPR
```

图 4

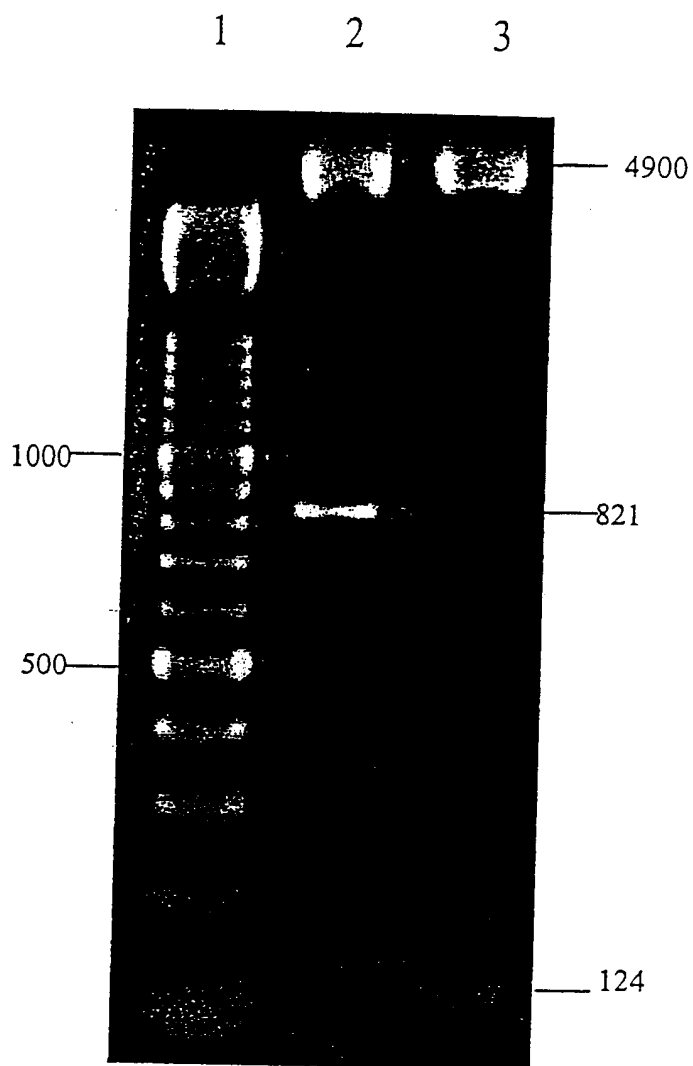


图 6

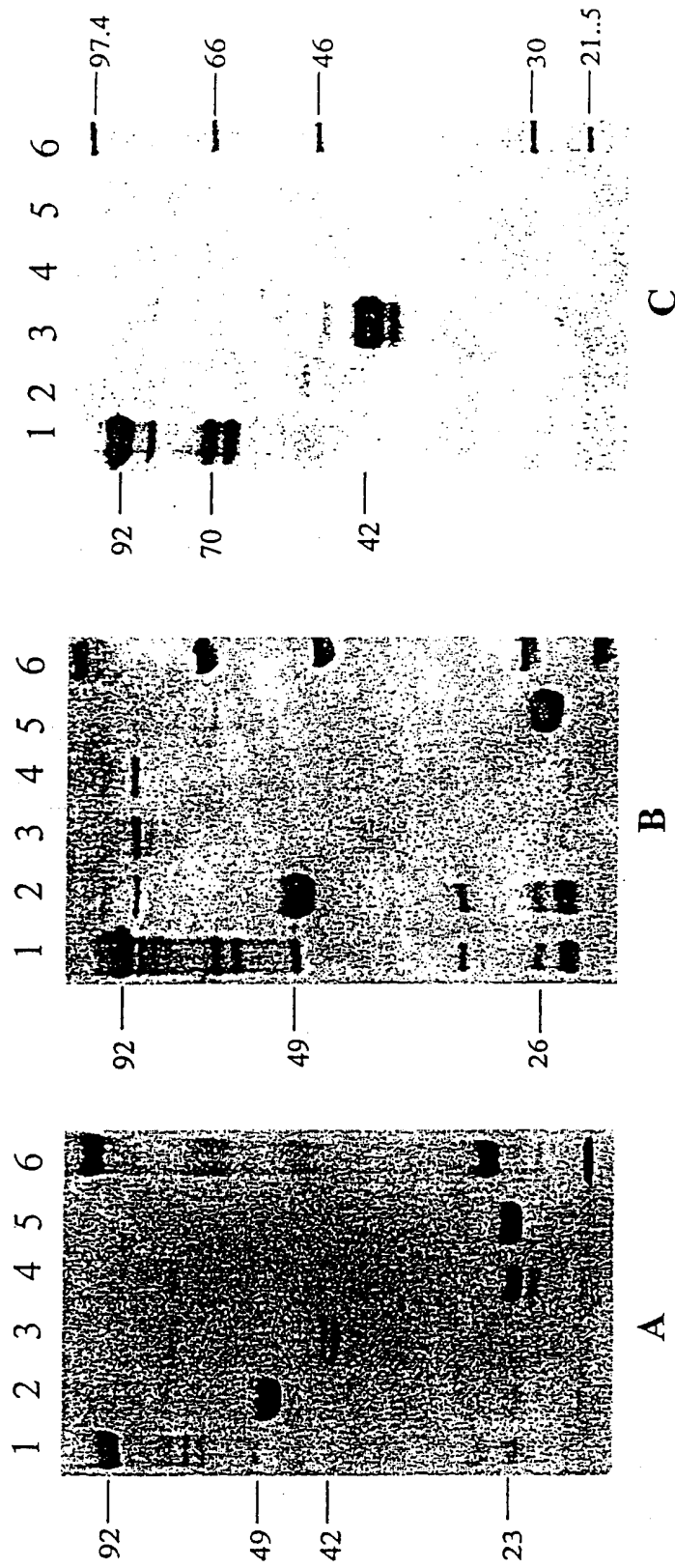


图 7

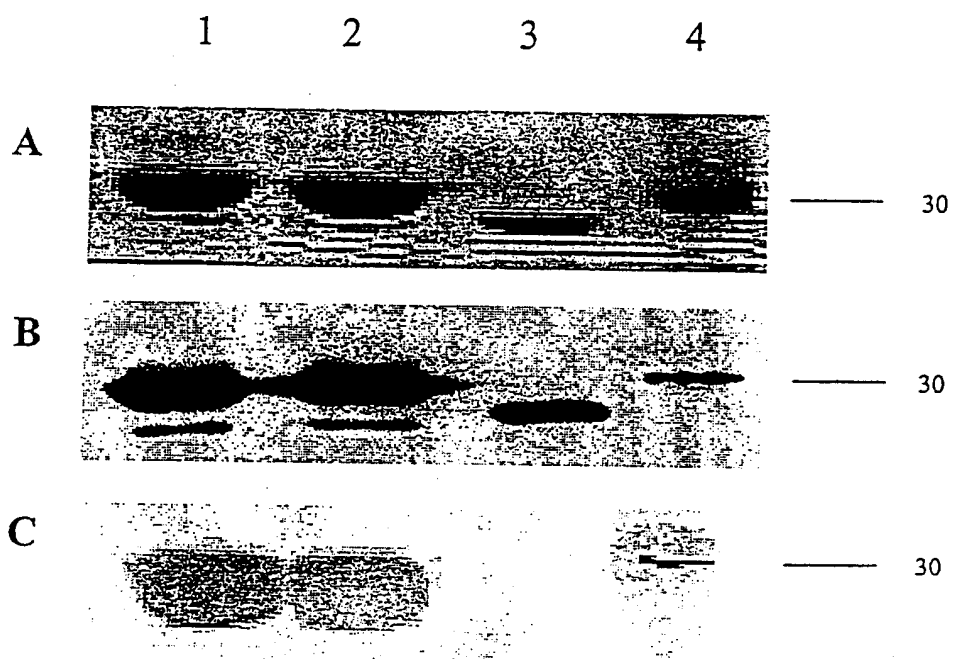


图 8

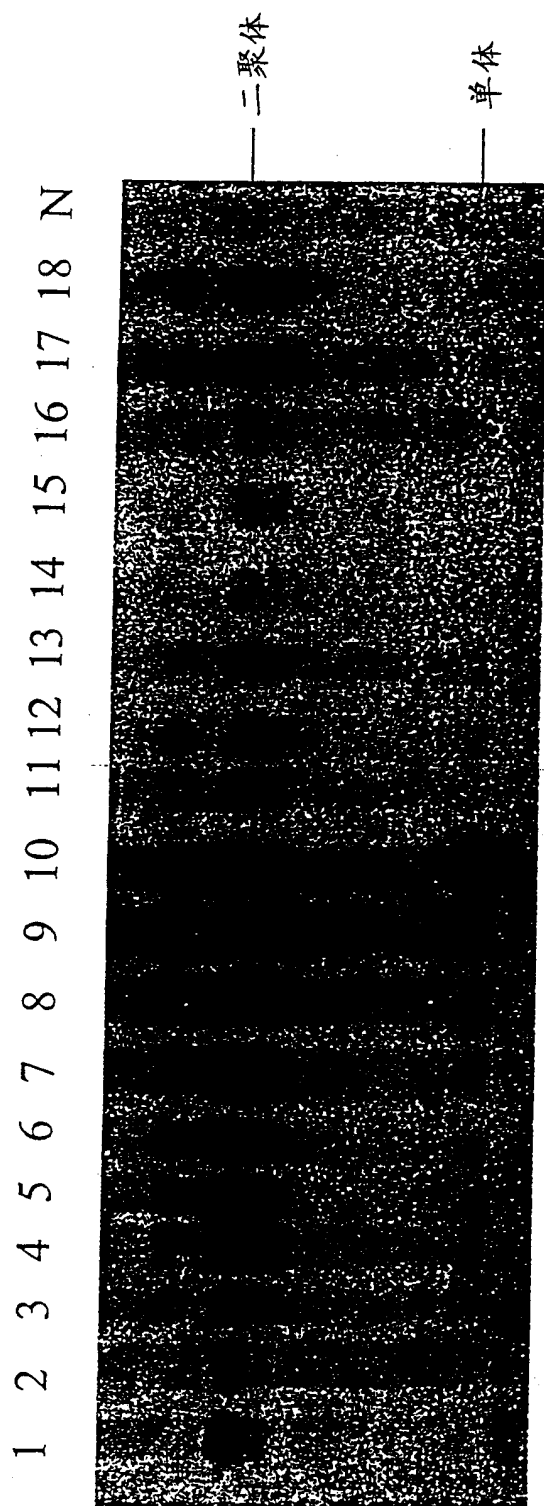


图 10

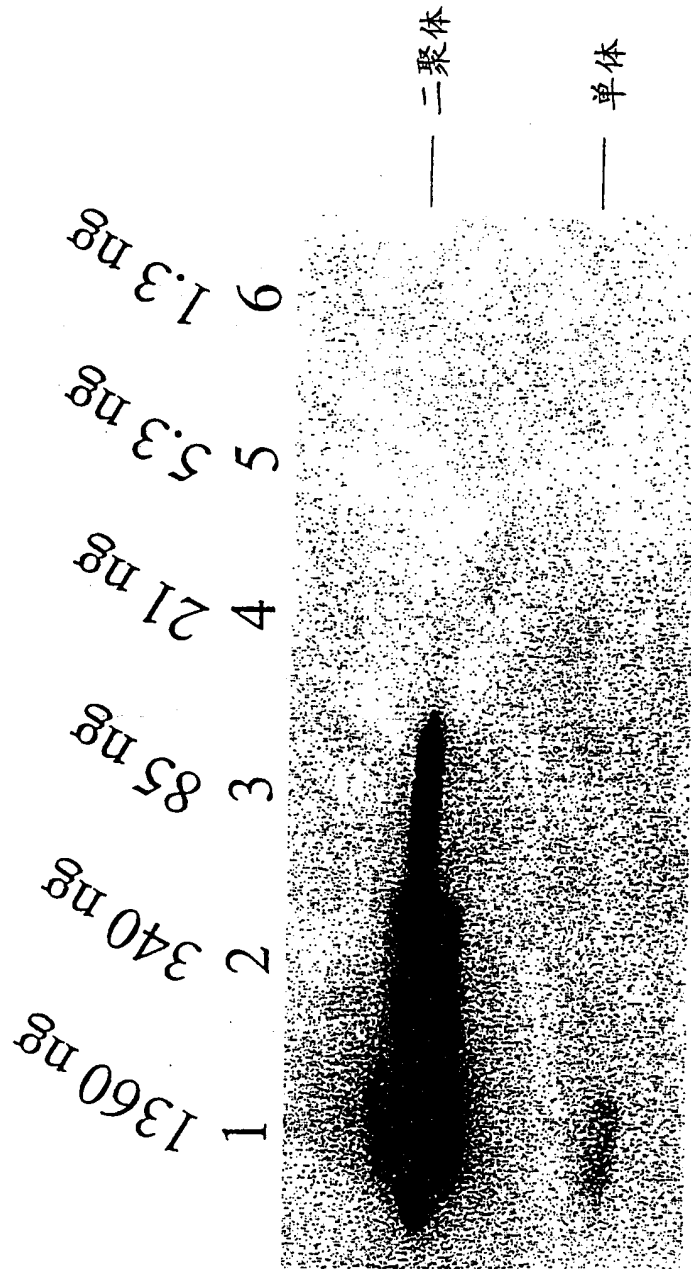


图9

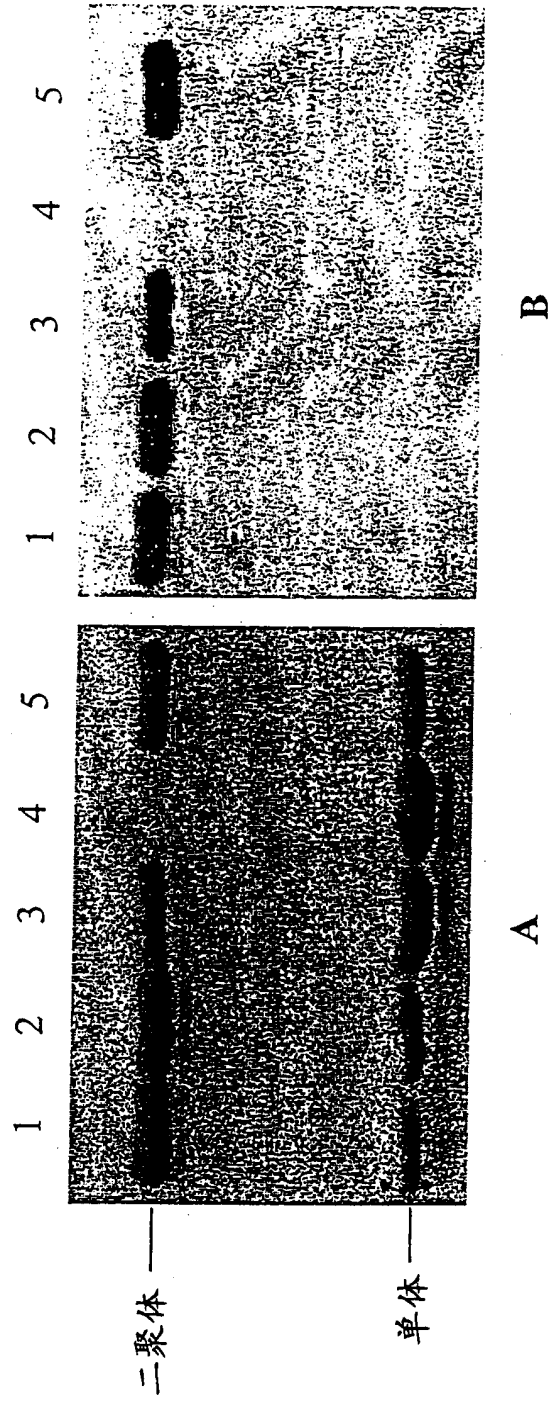


图 11

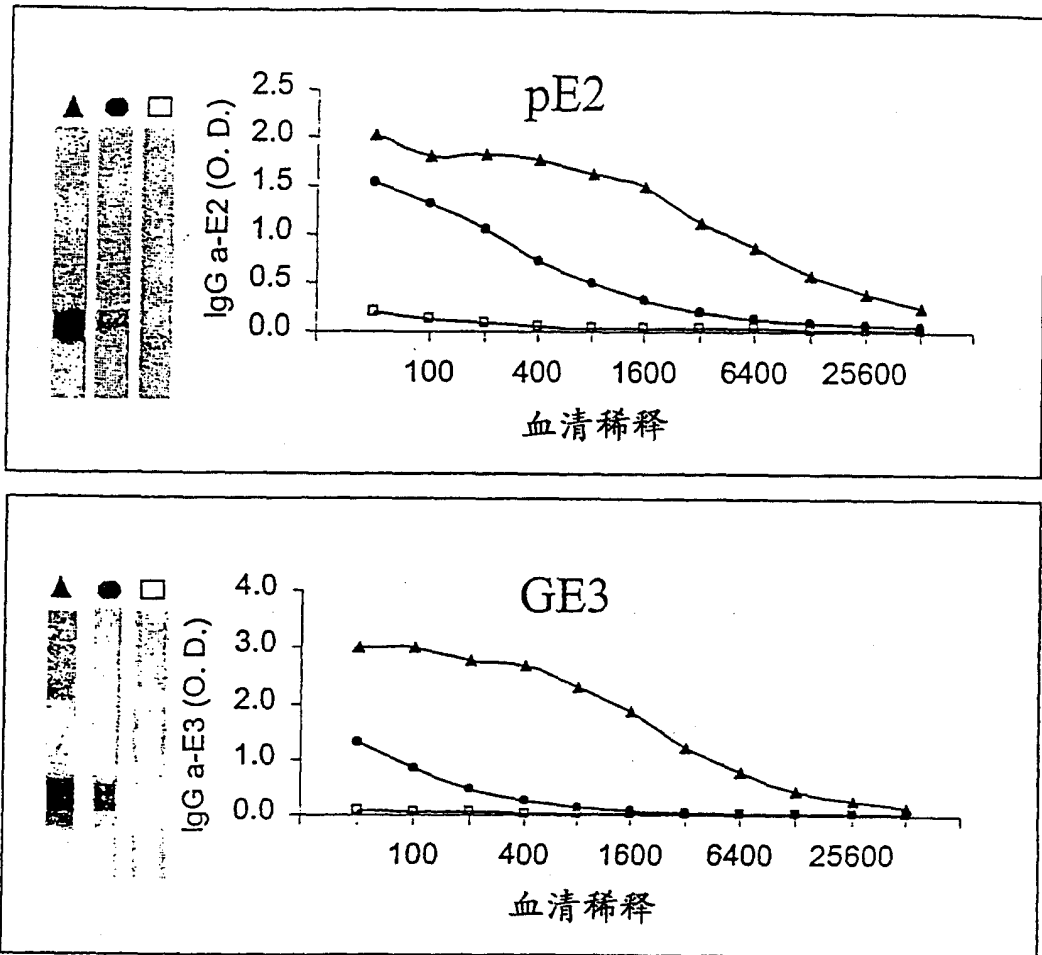


图 12

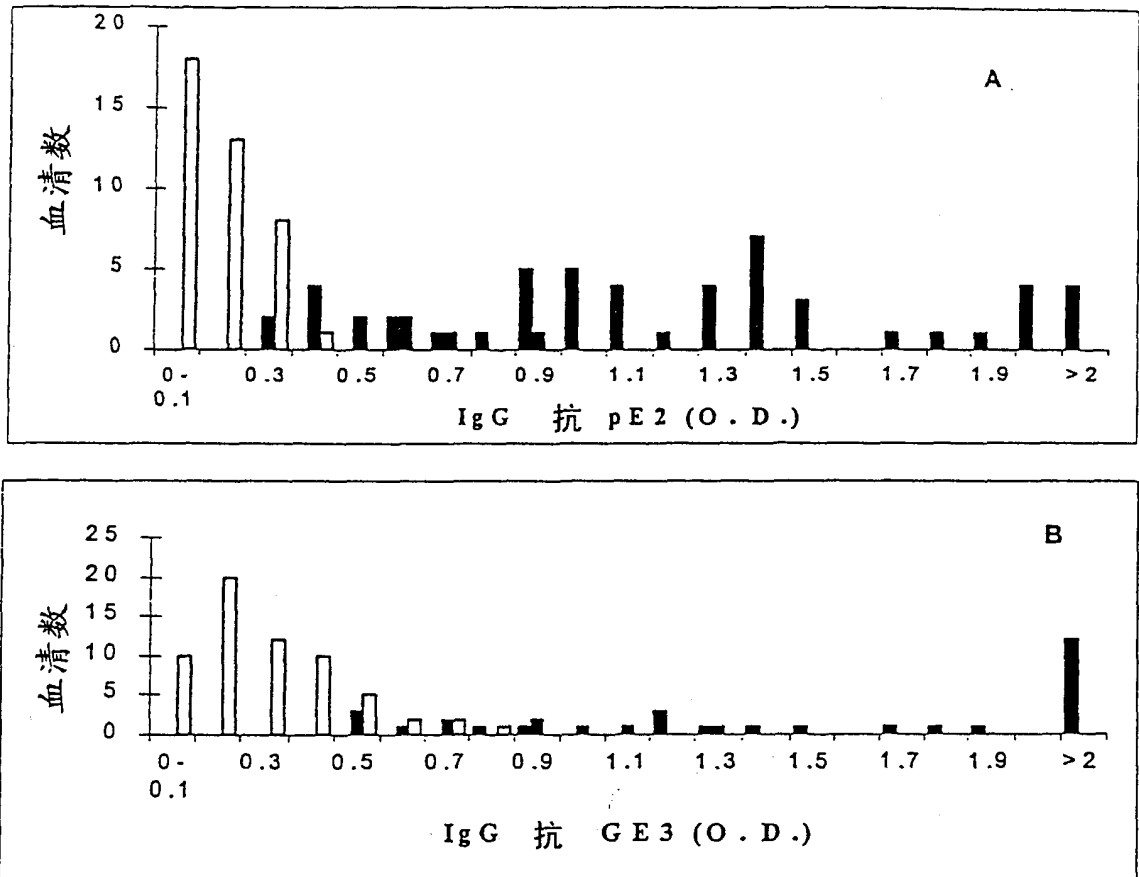


图 13

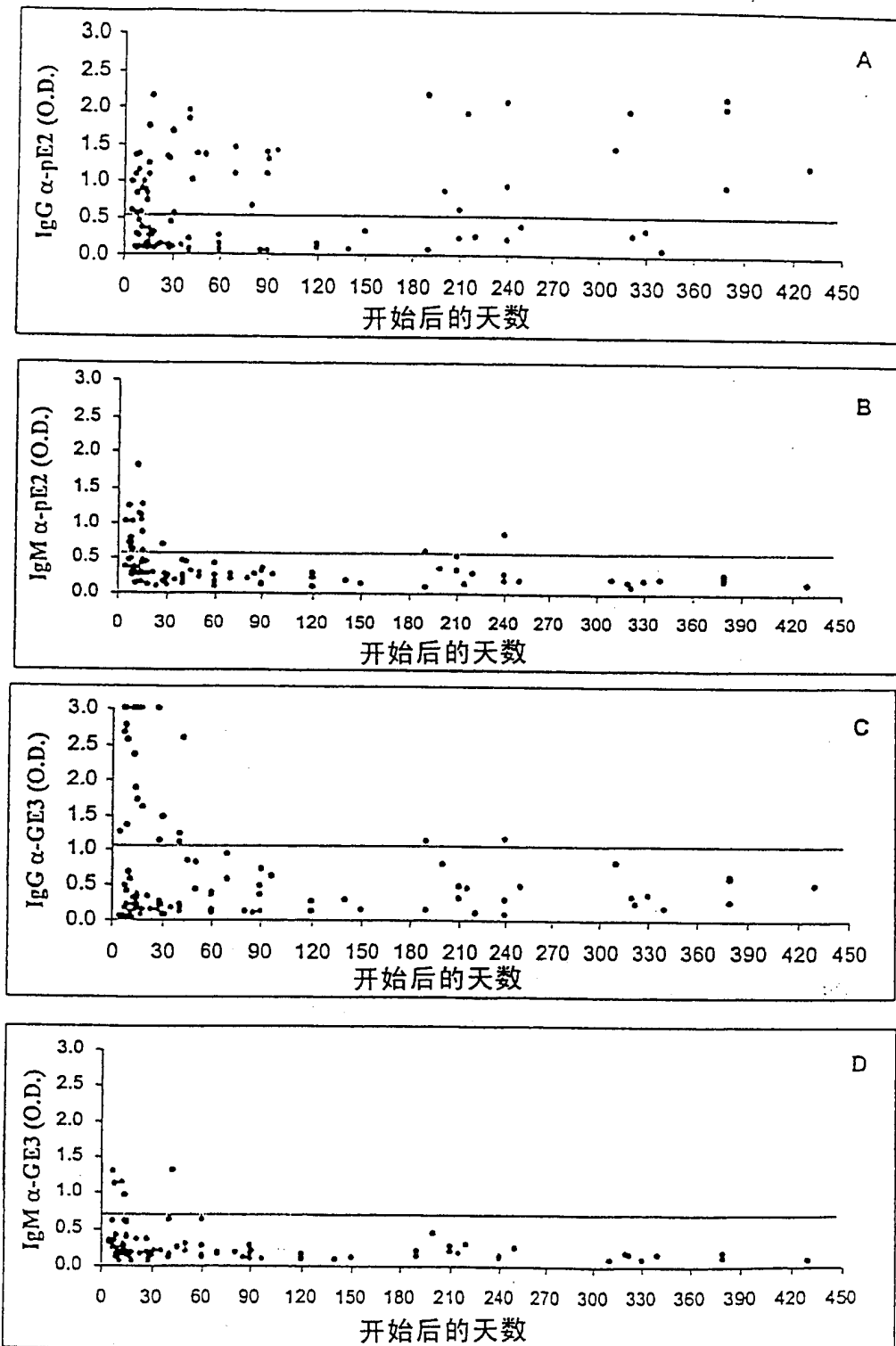


图 14

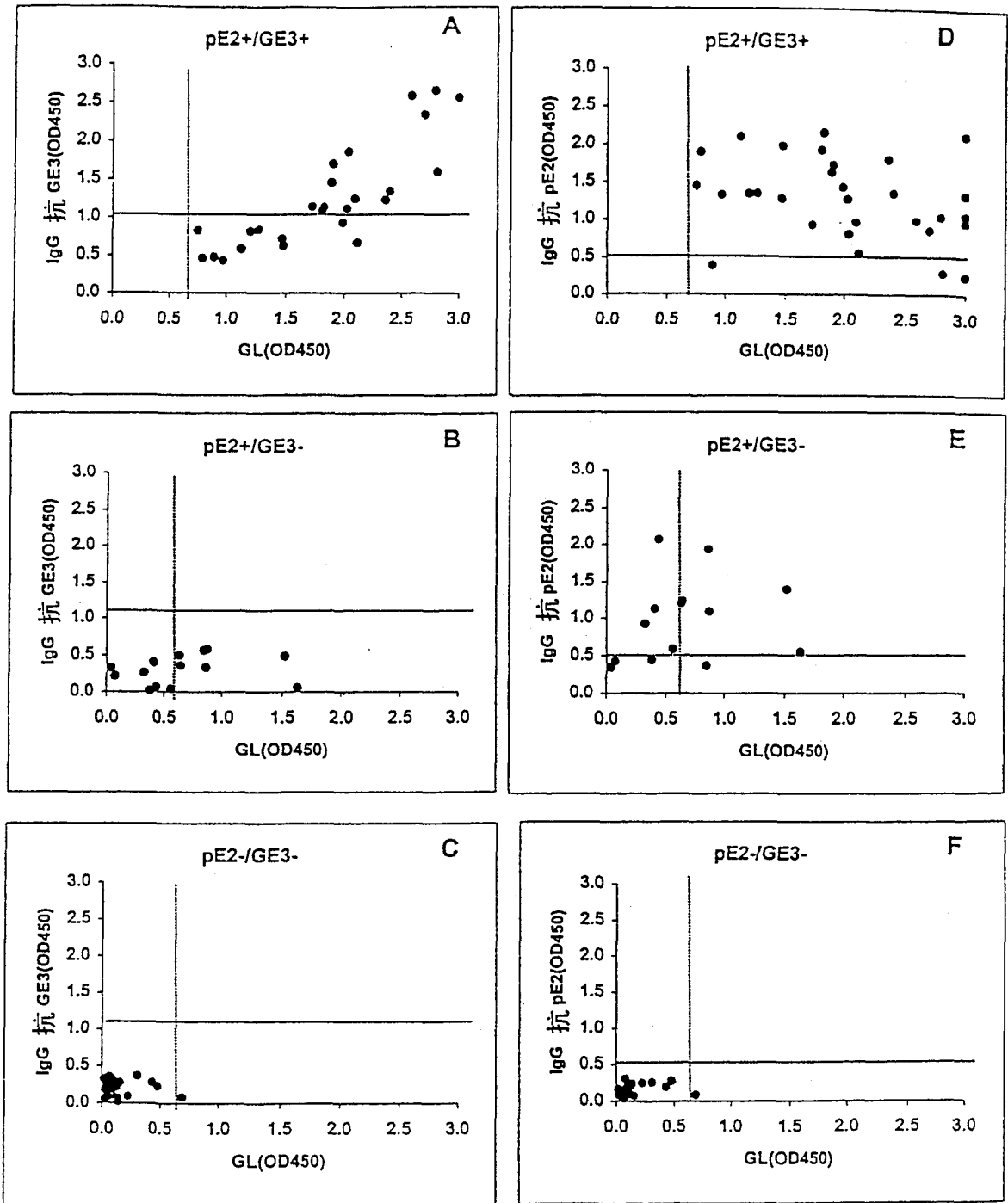


图 15

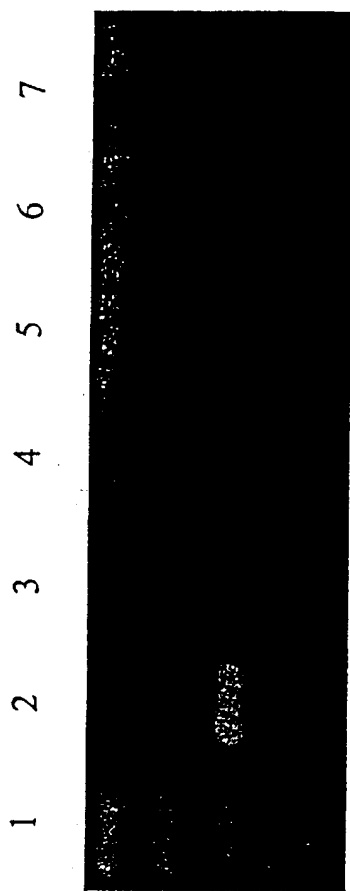


图 16

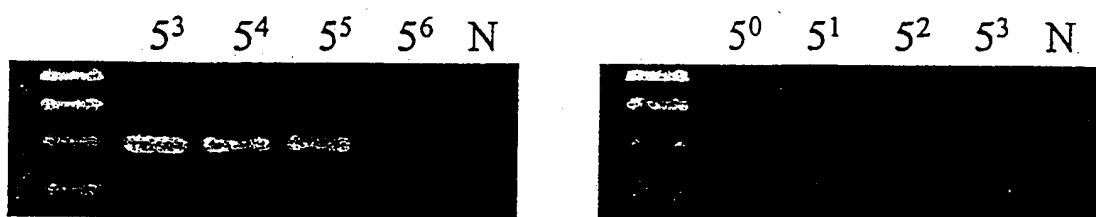
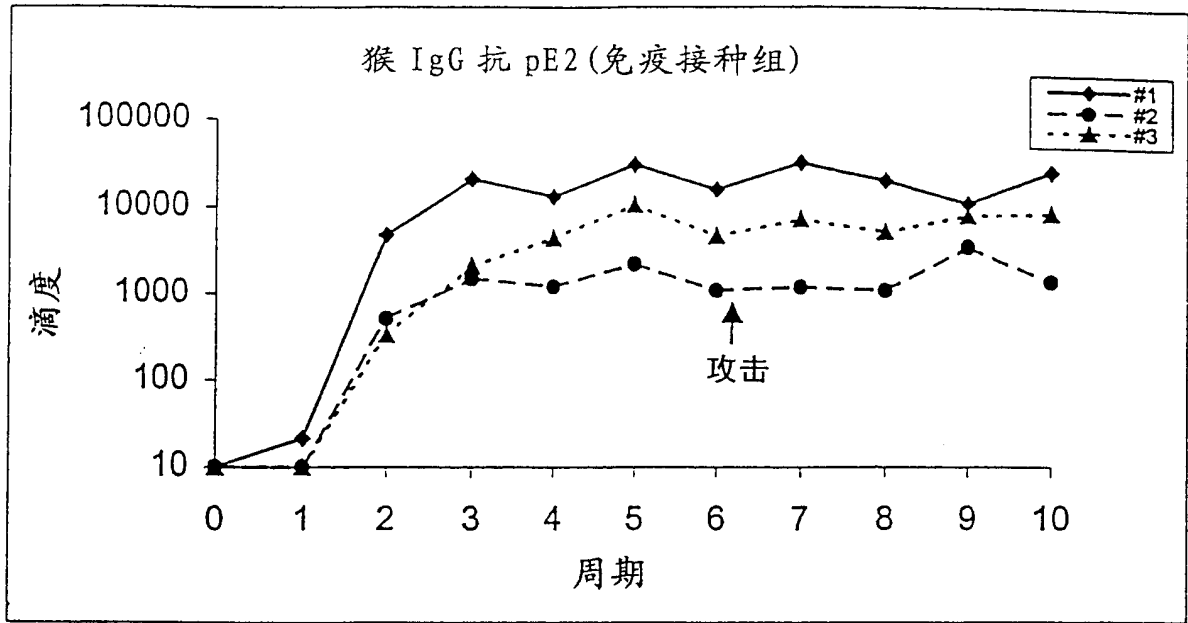
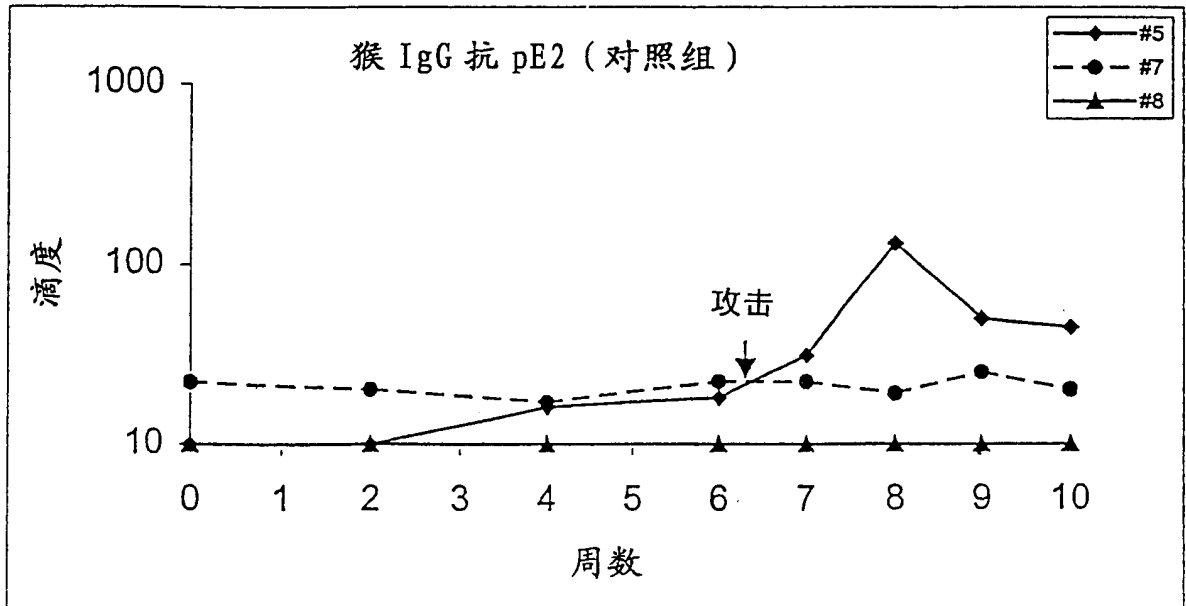


图 17



A



B

图 18

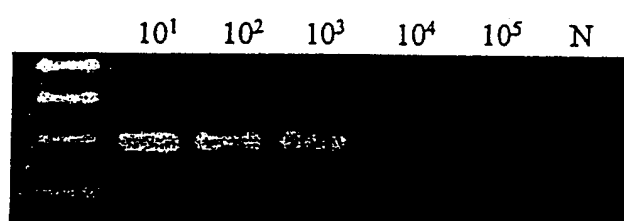


图 20

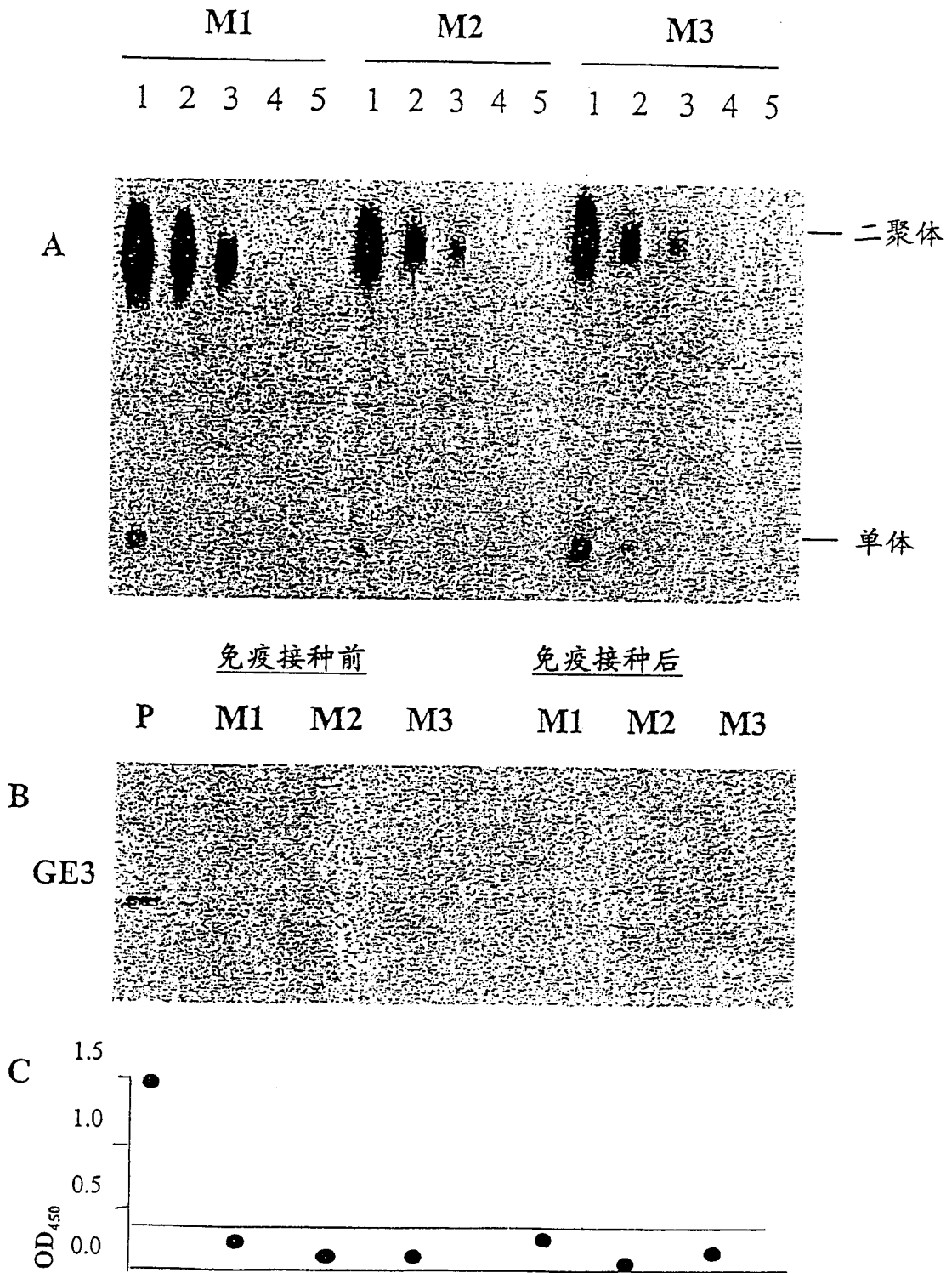


图 19

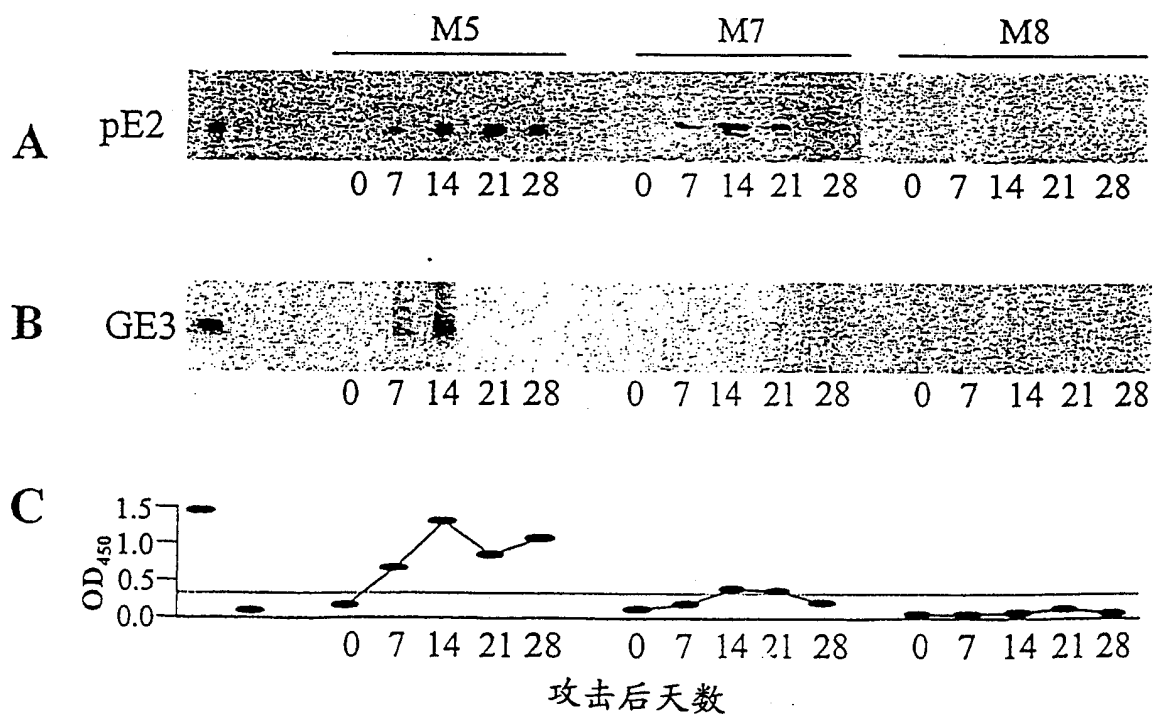
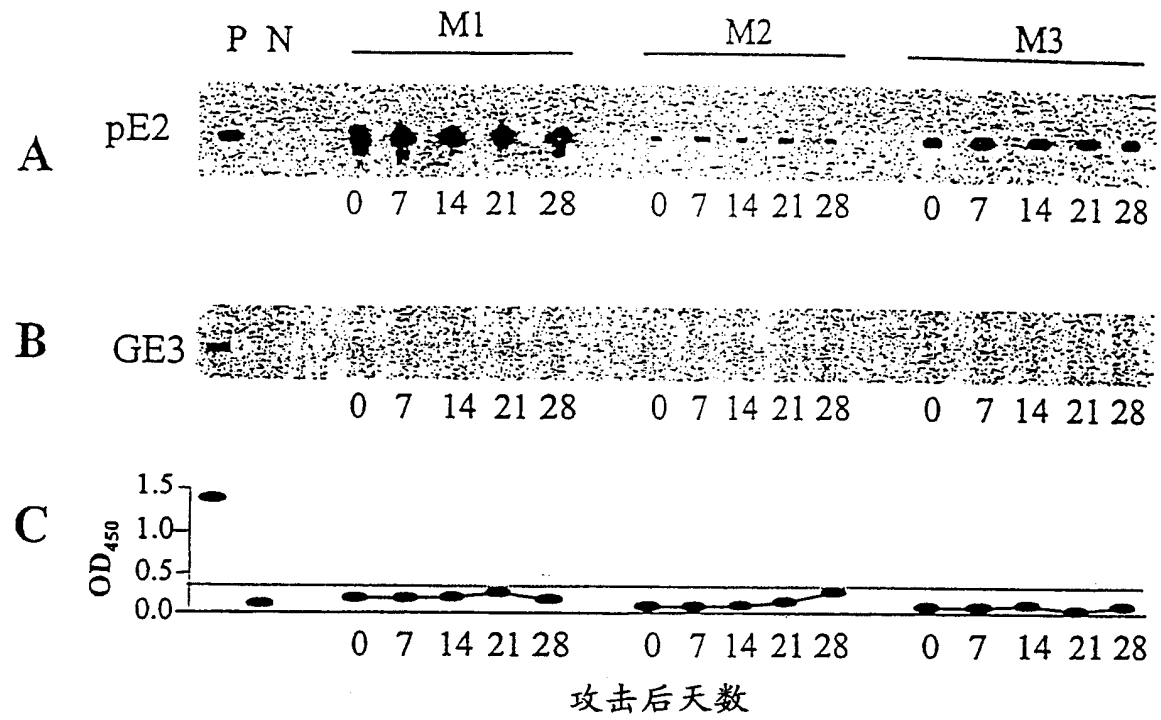


图 21