

# 应用噬菌体随机肽库技术筛选戊型肝炎病毒中和表位模拟肽

顾 颖 张 军 王颖彬 李少伟 杨海杰 罗文新 夏宁邵\*

(厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

**摘 要** 以识别戊型肝炎病毒(HEV)构象依赖性中和表位的单克隆抗体 8C11、8H3 作为固相筛选分子,对噬菌体随机 7 肽库进行 4 轮筛选后,随机挑取单克隆噬菌体进行测序。合成优势 7 肽序列基因,将其插入 HBcAg AA78-83 位置之中,进行原核表达,所获重组蛋白经蛋白印迹实验证实可与相应单抗结合,电镜下可见重组蛋白能形成与 HBcAg 相似的类病毒颗粒。化学合成单抗 8H3 筛选出的优势 7 肽,所获 7 肽经生物传感器结合实验证实与单抗 8H3 结合。这些结果提示用噬菌体 7 肽库可以筛选出部分模拟构象性表位的短肽,为亚单位疫苗的研制提供了新的思路。

**关键词** 戊型肝炎病毒,中和表位,噬菌体肽库

中图分类号 Q516 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)06-0680-06

戊型肝炎(HE)是一种由 HEV 引起的经消化道传播的急性散发型肝炎,约占我国急性散发型肝炎的 15%~20%<sup>[1]</sup>。HEV 是一种无包膜二十面体对称结构的病毒,其基因组为 7.5 kb 左右的单链正义 RNA,包含了 3 个开放读码框(ORF)。其中 ORF1 编码的 1693 个氨基酸的多肽,可识别甲基转移酶、木瓜酶样蛋白酶、解旋酶、RNA 依赖的 RNA 聚合酶,此外还存在碱基配对的超变区域;ORF2 编码的 660 个氨基酸的多肽,为病毒主要结构蛋白,组成病毒衣壳;ORF3 编码的 123 个氨基酸的小肽。HEV ORF2 编码的结构蛋白中含有保护性表位<sup>[2]</sup>。最近我们在大肠杆菌中表达了一个具有很强免疫保护性的 HEV ORF2 重组蛋白 NE2,并从 NE2 免疫后的单克隆抗体中筛选出了两个中和单抗 8C11 和 8H3,分别识别病毒衣壳表面的 2 个构象依赖性表位<sup>[3~7]</sup>。本研究利用噬菌体随机 7 肽库筛选 HEV 中和单抗 8C11 和 8H3 所识别表位的模拟肽,并利用乙型肝炎核心抗原(HBcAg)作为短肽表位的展示载体,结合合成肽技术验证模拟肽的活性,为 HEV 亚单位疫苗的研制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 单克隆抗体

抗 HEV 中和性单克隆抗体 8C11、8H3 由本实验室制备<sup>[4,5]</sup>。

### 1.2 单抗模拟肽的筛选

噬菌体随机 7 肽库及受体菌 *E. coli* ER2738 购于美国 New England BioLabs 公司。其生物淘洗操作按使用手册的要求进行,大致如下:将单克隆抗体 8C11、8H3(100 μg/mL)分别包被在微孔板上,用 2% 胎牛血清白蛋白(BSA)封闭后,将噬菌体肽库原液 1:10 稀释后加入微孔中,室温静置 1 h;PBST(含 0.1% Tween20)洗涤 10 遍;用 100 μL 10 mmol/L Gly-Cl(pH 2.2)洗脱结合的噬菌体,室温轻微震荡 10 min;加入 15 μL 1 mol/L Tris-HCl(pH 9.1)中和洗脱液,并将噬菌体洗脱液接种到 20 mL 新鲜培养的 *E. coli* ER2738 培养液中,37℃ 振荡培养 4.5 h,4℃ 5000 r/min 离心 15 min,收集上清,加入 1/6 体积的聚乙二醇(PEG)/NaCl 溶液(20% PEG8000,2.5 mol/L NaCl),混匀后 4℃ 沉淀过夜。4℃ 10000 r/min 离心 25 min,用 1 mL PBS 重悬沉淀,收集扩增后的噬菌体,并按照上述方法用 PEG/NaCl 再次沉淀提纯噬菌体,最终

收稿日期 2003-05-23,修回日期 2003-08-21。

基金项目 福建省科技重大项目(No. 2002F013),教育部跨世纪优秀人才培养计划。

\* 通讯作者。 Tel: 86-592-2184110; Fax: 86-592-2184110; E-mail: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

用 200 $\mu$ L PBS 重悬沉淀 4℃ 保存。按常规方法滴定洗脱液中噬菌体。将包被用单抗的浓度降低至 50 $\mu$ g/mL ,同时把洗涤用 PBST 中 Tween20 的浓度提高到 0.5% ,按上述步骤再淘洗 3 次。经过 4 次淘洗后 ,随机挑取各单抗筛选出的单克隆蓝色噬菌斑 ,提取单链 DNA 测序。M13 单链 DNA 抽提纯化试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司。基因测序由上海博亚公司完成。

1.3 模拟肽重组表达载体的构建

重组表达载体 pC149-mut 为本实验室所构建。该载体利用 HBcAg 的 AA1-149 可以在大肠杆菌中以颗粒的形式表达 ,同时 HBcAg 的 AA78-83 位暴露于 HBc 颗粒的表面的性质 ,将 HBcAg 的 AA1-149 插入大肠杆菌表达载体 pTO-T7 中<sup>[8]</sup> ,并以连接器替代 HBc B 细胞优势表位区段的第 79、80 两个氨基酸 ,构建了突变型 HBc 表达质粒 pC149-mut ,外源表位插入 HBc AA78-83 后 ,仍能以颗粒的形式表达重组蛋白 ,并可使外源表位暴露于颗粒表面。

根据所挑取的单克隆噬菌体的测序结果 ,以及 pC149-mut 载体序列 ,设计引物(表 1 ,由上海博亚公司合成)将 7 肽的基因插入 HBcAg 基因内部融合表达。大致过程如下 :以质粒 pC149-mut 为模板 ,分别用 8C11AFP、8H3AFP 为上游引物 ,149mutRP 为下游引物扩增出 546bp 片段。PCR 条件为 :94℃ 预变性 5min 94℃ 变性 50s ,56℃ 退火 50s ,72℃ 延伸 25s ,扩增 25 个循环 ,最后再 72℃ 延伸 10min。PCR 扩增片段与 pMD 18-T 载体连接 ,分别得到插入 8C11 表位模拟肽 8C11A 基因( CATCCTACTCTTTTGGCTATT)和 8H3 表位模拟肽 8H3A 基因( TCTATTCTGCCG-TATCCTTAT)的阳性亚克隆 ;再经过 *EcoR* I / *Bam* H I 酶切处理 ,接入经过同样酶切处理的 pC149-mut 表达载体 ,获得表达载体 pC149-mut-8C11A 和 pC149-mut-8H3A(图 1) ,重组子转化受体菌 *E. coli* ER2566。其中所使用的限制酶、*Taq* DNA 聚合酶和 pMD 18-T 载体为 TaKaRa 产品。受体菌 *E. coli* ER2566 亦为本实验室保存。

表 1 模拟肽表达克隆载体构建所使用的引物  
Table 1 The primers for the expression vector of the mimic peptide

Primer ID	Primer sequence
8C11AFP	GGATCCCATCCTACTCTTTTGGCTATTGGTGGTGAGGCTCAGG
8H3AFP	GGATCCTCTATTCTGCCGTAICTTATGGTGGTGAGGCTCAGG
149mutRP	GAATTCCTAAACAACAGTAGTTT

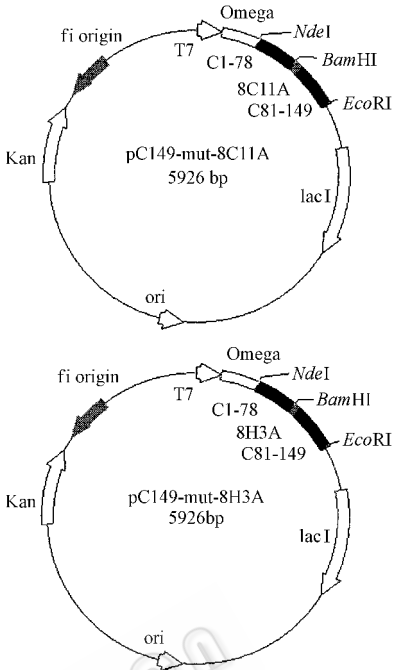


图 1 pC149-mut-8C11A 和 pC149-mut-8H3A 质粒图  
Fig.1 Plasmid map of pC149-mut-8C11A and pC149-mut-8H3A

1.4 重组蛋白的表达与纯化

转化重组质粒的工程菌 *E. coli* ER2566 分别用 LB 培养基 37℃ 振荡培养 ,至 *OD*<sub>600</sub> 达到 0.8 ~ 1.0 ,用 0.2 mmol/L IPTG 诱导表达 ,37℃ 振荡培养 6h。离心收集菌体 ,超声(SONICS&MATERIALS 公司 ,Uilbra-Cell VGX500 型超声破碎仪)破碎 ,包涵体经 1% Triton X-200 洗涤 2 次 ,将沉淀直接溶解于缓冲液 A(4 mol/L 尿素 ,20 mmol/L Tris · Cl ,pH8.5 ,5 mmol/L EDTA ,100 mmol/L NaCl)中 ,对 1 × PBS 透析过夜 ,离心获得复性的上清液。

1.5 蛋白印迹实验(Western blotting)

蛋白样品 :煮沸的表达菌体、菌体超声上清和超声沉淀 ,以及阳性对照 HEV ORF2 重组蛋白 NE2、阴性对照 pC149-mut 载体表达产物 ,经 12% SDS-PAGE 电泳分离后 ,转膜 ,用 5% 脱脂奶封闭 2 h ,然后加入一抗(分别为单抗 8C11 和 8H3)室温孵育 1.5 h ,洗涤后 ,加入二抗(羊抗鼠 IgG-AP)室温孵育 1.5 h ;显色。

1.6 重组蛋白的电子显微镜分析

将复性重组蛋白溶液固定在铜网上 ,经 2% 磷酸钨负染色后 ,直接进行透射电镜(JEM-100CX II)观察 ,放大倍数为 100000 倍。

1.7 单抗 8H3 筛选到的模拟 7 肽的合成及结合活性检测

8H3 所识别表位的模拟 7 肽 8H3A( N'-Ser-Ile-  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

Leu-Pro-Tyr-Pro-Tyr-C ')由西安美联生物有限公司合成并纯化。抗小鼠抗体 Fc 段抗体与生物传感器 (BIAcore X ,Amersham Biosciences 公司)羧甲基葡聚糖 (CMD)预处理芯片 (CM5)的偶联,按照产品手册进行操作。即用 1-乙基-3-(3-二甲基-氨丙基)碳二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀亚胺(NHS)活化 CMD 表面后,偶联蛋白样品,最后用乙醇胺封闭。将纯化后的单抗 8H3,与结合在芯片上的抗小鼠抗体 Fc 段抗体反应,稳定结合后,加入 20 $\mu$ L 1 mg/mL 浓度 8H3A,观察其结合曲线。

2 结 果

2.1 抗 HEV 中和单抗表位模拟肽的序列特征

分别以抗 HEV 中和单抗 8C11 和 8H3 作为筛选分子,对噬菌体 7 肽库进行 4 轮“吸附-洗脱-扩增”的筛选,从第 4 轮筛选后得到的噬菌斑中随机挑取 21 个(8C11 单克隆所筛选出的 10 个克隆和 8H3 所筛选出的 11 个克隆),提取其 DNA 进行测序,并推导插入序列编码的氨基酸残基,即噬菌体所展示的 7 肽序列如图 2。单抗 8C11 筛选出的 7 肽的优势序列为 HPTLLR(50%),经过分析单抗 8H3 筛选出来的 7 肽中,优势序列为 SILPYPY(27.3%)。在 8H3 筛选出来的 7 肽中还发现了 S\*LP、S\*P、S\*L、LP 的氨基酸排列方式所占比例也很大,说明在单抗 8H3 所识别的表位中 S、L、P 三个氨基酸的作用可能比较重要。而在 8C11 所筛选出的 7 肽序列中,除了优势序列以外,PTL 的氨基酸排列在其他序列中也有出现。

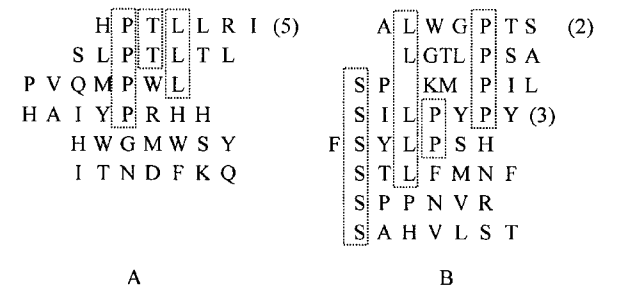


图 2 单抗筛选出的 7 肽序列

Fig.2 The sequence of the peptides selected out by monoclonal antibodies  
A. Selected by mAb 8H3 ;B. Selected by mAb 8C11

2.2 中和单抗表位模拟肽的表达及 Western blotting 实验

将筛选到的两个单抗表位的优势模拟肽: 8C11A (N'-His-Pro-Thr-Leu-Leu-Arg-Ile-C')和 8H3A (N'-Ser-Ile-Leu-Pro-Tyr-Pro-Tyr-C')基因分别插入

HBcAg 表达递呈载体 pC149-mut 中进行表达,以 pC149-mut 为对照,表达产物 C8C11A、C8H3A 和 C149mut 理论分子量均约 20 kD。表达和相应单抗的 Western blotting 结果如图 3。重组蛋白 C8C11A 主要出现在超声沉淀中,而且主要以 40kD 二聚体蛋白为主,基本未见 20kD 单体。Western blotting 结果表明仅 40 kD 产物具有活性,强度与 NE2 蛋白的单体相当。重组蛋白 C8H3A 也主要出现在超声沉淀中,20 kD 单体和 40kD 二聚体均可见,以单体为主,但仅 40 kD 蛋白具有活性。

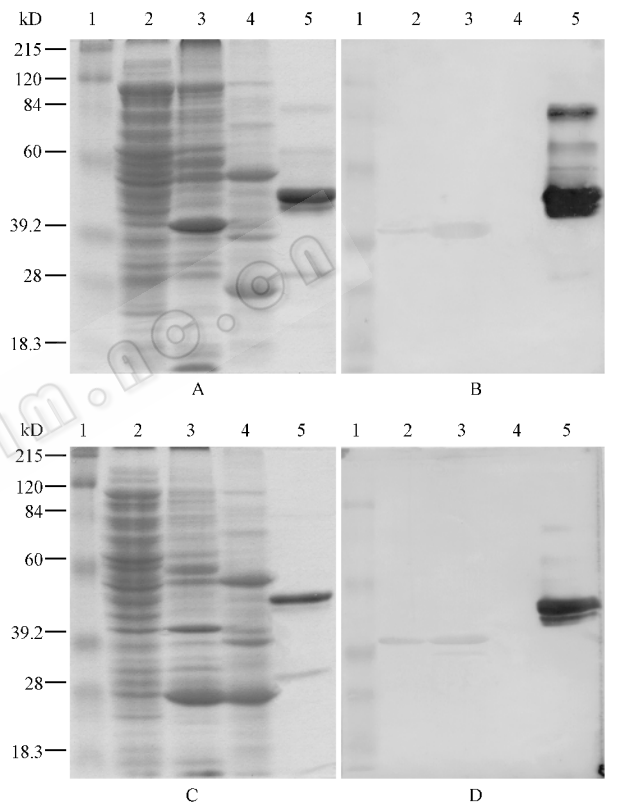


图 3 质粒 pC149-mut-8C11A 和 pC149-mut-8H3A 的表达和蛋白印迹实验

Fig.3 Expression and Western blotting of pC149-mut-8C11A and pC149-mut-8H3A  
A ,C. SDS-PAGE ;B ,D. Western blotting by mAbs 8C11 and 8H3 respectively ;A ,B. pC149-mut-8C11A ;C ,D. pC149-mut-8H3A. 1 ,Protein molecular weight marker 2. Supernatant of ultrasonic lysate 3. Deposition of ultrasonic lysate 4. C149-mut control 5. purified NE2 antigen( positive control )

2.3 重组蛋白的电镜图像

将复性重组蛋白 C8C11A、C8H3A 和 C149mut 负染后进行透射电镜观察,发现三种重组蛋白均可形成直径约 20nm 的相似的类型病毒颗粒。

2.4 化学合成 7 肽 8H3A 与单抗 8H3 的结合

用抗小鼠抗体 Fc 段抗体包被 BIAcore 生物传感

器 CM5 芯片 ,将纯化 mAb 8H3 与结合在芯片上的抗小鼠抗体 Fc 段抗体反应 ,再加入浓度为 1 mg/mL 的

8H3A 合成肽。结果 8H3A 肽与 8H3 有明显的结合反应(图 5)。

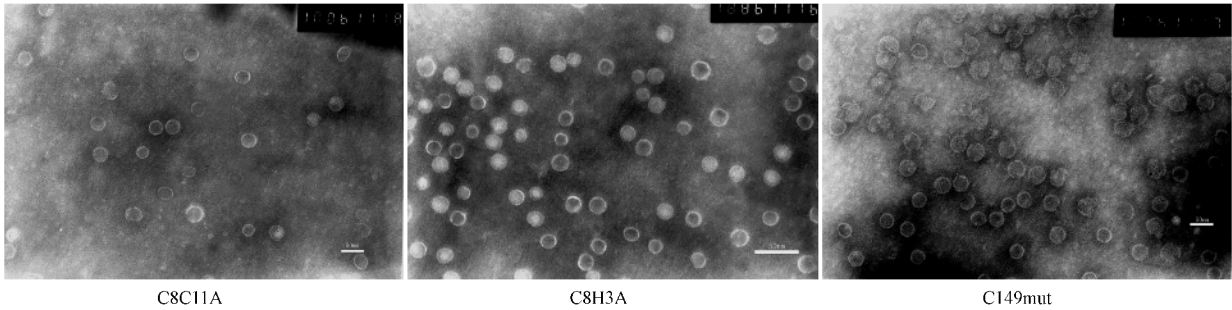


图 4 重组蛋白 C8C11A、C8H3A 和 C149-mut 聚合形成的类病毒空心颗粒(电镜负染,10 万倍放大)

Fig.4 Virus like particle assembled by recombinant protein C8C11A、C8H3A or C149mut  
( Negative staining electron microscopy , $\times 100\ 000$  )

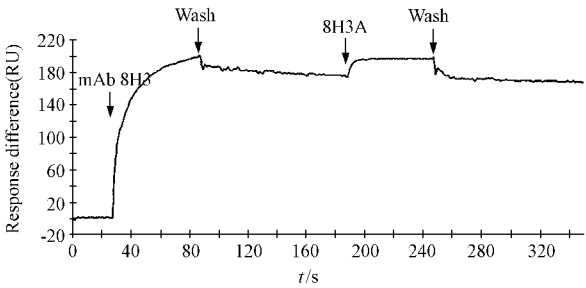


图 5 BIAcore 生物传感器上化学合成 7 肽 8H3A 与单抗 8H3 的结合曲线

Fig.5 Binding curve of chemo-synthesized seven peptide 8H3A against monoclonal antibody 8H3 in BIAcore biosensor

3 讨论

噬菌体展示技术目前已经被广泛的应用在抗体库的构建 ,以及随机肽活性的筛选等领域中。噬菌体随机短肽库技术是近年来出现的一种新技术。该技术利用噬菌体外壳蛋白的表达特性 ,将外源基因与噬菌体 pⅢ 融合表达 ,将外源肽片段展示在噬菌体表面。用噬菌体展示技术筛选与靶分子结合的特异性短肽 ,可直接利用两个分子间的亲和力进行筛选和富集。目前 ,国内外学者已经成功的用这项技术对各种肝炎病毒<sup>[9]</sup> ,HIV<sup>[10]</sup> 等的表位序列进行了模拟、分析 ;此外 ,还有应用于酶抑制剂的筛选<sup>[11]</sup>、免疫抑制剂的筛选等方向的报道<sup>[12]</sup>。同时利用噬菌体随机肽库还可以模拟一些半抗原 ,和不具有免疫原性的物质的功能 ,从而研制一些模拟肽药物 ,如对肺炎球菌等一些细菌疫苗的研制都从模拟肽入手获得了一定突破<sup>[13]</sup>。

目前还没有建立成熟的 HEV 细胞培养的模型 ,对于 HEV 结构的研究大多通过不同的表达系统 ,表达特定区段的 HEV 结构蛋白 ,并对重组蛋白的结构

进行分析 ,从而间接地了解病毒颗粒的结构。我们曾利用大肠杆菌表达了 HEV ORF2 的一个片段 (NE2) ,发现 NE2 蛋白可以自发形成从二聚体到六聚体的多种聚体形式 ,类似于 HEV 病毒衣壳的装配过程<sup>[3,44,45]</sup>。以 NE2 免疫恒河猴 ,可产生良好的保护性抗体 ,提示 NE2 蛋白与 HEV ORF2 的天然结构具有较大的相似性<sup>[15]</sup>。用该蛋白为抗原 ,免疫小鼠制备单克隆抗体<sup>[4,5]</sup> ,从获得的十余株单抗中筛选出了两株识别 HEV 不同表位的单克隆抗体 8C11 和 8H3 ,通过恒河猴感染中和实验验证了这两株单抗对病毒感染细胞的中和活性。8H3 和 8C11 两株单抗都是识别其免疫原 HEV ORF2 重组蛋白 NE2 上的构象性表位。本研究通过噬菌体随机 7 肽库展示的由 7 肽所组成的简单的线性表位 ,模拟了这两株单抗所识别的表位。并将所筛选出的 7 肽重组到 HB-cAg 展示表达载体上 ,用 Western 验证了其活性。其中重组质粒 pC149-mut-8C11A 的表达产物主要是 40 kD 左右以二聚体形式存在的融合蛋白 ,与单抗 8C11 反应活性与 NE2 单体相似 ;质粒 pC149-mut-8H3A 表达后则同时可以看到 20 kD 左右的单体蛋白和 40 kD 的二聚体蛋白 ,但与单抗有明显反应的仍然是二聚体蛋白。这可能与插入的 7 肽序列比较短 ,在 HBcAg 中的暴露需要一定的构象协助有关 ,单体蛋白没有能更好的暴露外源 7 肽的表位 ,所以活性不明显。化学合成的单抗 8H3 所筛选出的模拟 7 肽 8H3A ,也可以与单抗 8H3 结合 ,但结合不稳定。通过蛋白质一级序列的比对 ,在 NE2 蛋白上没有找到与所筛选到的表位模拟肽相似的序列 ,提示 8C11、8H3 表位由不连续的氨基酸所组成 ,但其形成的空间构象与所筛选到的模拟肽有一定程度反应上的相似性。

在乙型肝炎病毒各种抗原中,HBcAg 的免疫原性最强,载体 pC149-mut 所设计的外源基因插入位点位于 AA78-83<sup>[17]</sup>,使所插入的外源蛋白可以有比较好的免疫原性,同时又替换掉了 HBcAg 上主要的 B 细胞优势表位,减少了它们对外源表位的干扰,是一个十分有前景的多表位嵌合疫苗载体分子<sup>[18]</sup>。本研究将 7 肽克隆到 HBcAg 表达载体上,获得了具有插入表位活性的病毒样颗粒(VLP),并证实了所插入表位的免疫学活性。目前所知各病毒中和表位大多属于构象依赖性表位,因此要求针对这些病毒相关疾病的基因工程疫苗,一方面要具有良好的构象,并且以中和表位为免疫优势表位;另一方面,要保持基因工程疫苗本身良好的免疫学活性,这就需要在疫苗的研制过程中对抗原进行大量的基因工程筛选。而利用线性的表位模拟序列来替代构象依赖的中和表位,再利用 pC149-mut 作为表位模拟肽疫苗载体,有可能既可以形成很好 VLP 抗原,又较易保持中和表位的活性,保证了疫苗的免疫原性和免疫保护性。同时还可以将多个病毒中和表位的模拟肽同时表达在一个颗粒抗原上,从而为联合多价疫苗的研制创造了条件。多价联合性疫苗研制的一大障碍在于中和表位多为构象依赖性,用常规的方法很难保证联合苗中各中和表位的正确形成,而单独使用人工合成的中和表位模拟肽,由于分子量限制,不能确保良好的免疫活性。以 HBcAg 等类似的 VLP 蛋白为载体,用简单的线性表位模拟肽来代替各中和表位,并使之呈递在 VLP 表面,这种方法为解决联合型多价疫苗这一难题提供了一个新的思路。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Zhuang H, Cao XY, Liu CB *et al.* Epidemiology of hepatitis E in China. *Gastroenterologia Japonica*, 1999, **36**( suppl3 ): 135 - 138
- [ 2 ] Purcell RH and Emerson SU. Hepatitis E virus. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE *et al.* Editors. *Fields virology*, 4th ed., vol.2 Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2001, pp.3051 - 3061
- [ 3 ] LI S W( 李少伟 ), ZHANG J( 张 军 ), HE Z Q( 何志强 ) *et al.* The study of aggregate of the ORF2 peptide of hepatitis E virus expressed in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology*( 生物工程学报 ), 2002, **18**( 4 ): 463 - 467
- [ 4 ] GU Y( 顾 颖 ), ZHANG J( 张 军 ), LI S W( 李少伟 ) *et al.* Characterization of the anti-HEV ORF2 monoclonal antibodies by biosensor. *Chinese J Cell Mol Immunol*( 细胞与分子免疫学杂志 ), 2002, **18**( 6 ): 617 - 620
- [ 5 ] GE S X( 葛胜祥 ), ZHANG J( 张 军 ), HUANG G Y( 黄果勇 ) *et al.* The immuno-protect study of a hepatitis E virus ORF2 peptide expressed in *E. coli*. *Acta Microbiologica Sinica*( 微生物学报 ), 2003, **43**( 1 ): 35 - 42
- [ 6 ] GE S X( 葛胜祥 ), ZHANG J( 张 军 ), PENG G( 彭 耿 ) *et al.* Development and evaluation of ELISAs for anti-hepatitis E virus IgM and IgG detection based on polymerized recombinant antigen. *Chinese Journal of Virology*( 病毒学报 ), 2003, **19**( 1 ): 78 - 86
- [ 7 ] GU Y( 顾 颖 ), GE S X( 葛胜祥 ), HUANG G Y( 黄果勇 ) *et al.* Identification of neutralizing monoclonal antibodies to the hepatitis E virus. *Chinese Journal of Virology*( 病毒学报 ), 2003, **19**( 3 ): 217 - 223
- [ 8 ] LUO W X( 罗文新 ), ZHANG J( 张军 ), YANG H J( 杨海杰 ) *et al.* Construction and application of an *Escherichia coli* high effective expression vector with an enhancer. *Chinese Journal of Biotechnology*( 生物工程学报 ), 2000, **16**( 5 ): 578 - 581
- [ 9 ] Rodriguez-Iopez M, Riezu-bcJ JI, Ruiz M *et al.* Immunogenicity of variable regions hepatitis C virus proteins: selection and modification of peptide epitopes to assess hepatitis C virus genotypes by ELISA. *J Gen Virol*, 1999, **80**( 3 ): 727 - 738
- [ 10 ] Ferrer M, Sullivan B J, Godbout K L *et al.* Structural and functional characterization of an epitope in the conserved C-terminal region of HIV-1 gp120. *J Pept Res*, 1999, **54**( 1 ): 32 - 42
- [ 11 ] Kiczak L, Kasztura M, Koscielska-kasprzak K *et al.* Selection of potent chymotrypsin and elastase inhibitors from M13 phage library of basic pancreatic trypsin inhibitor ( BPTI ). *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1550**( 2 ): 153 - 163
- [ 12 ] Aramburu J, Yaffe M B, Lopez-Rodriguez C *et al.* Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science*, 1999, **285**( 5436 ): 2129 - 2133
- [ 13 ] Grothaus M C, Srivastava N, Smithson S L *et al.* Selection of an immunogenic peptide mimic of the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A using a peptide display library. *Vaccine*, 2000, **18**( 13 ): 1253 - 1263
- [ 14 ] Zhang JZ, Ng MH, Xia NS *et al.* Conformational antigenic determinants generated by interactions between a bacterially expressed recombinant peptide of the hepatitis E virus structural protein. *J Med Virol*, 2001, **64**( 2 ): 125 - 132
- [ 15 ] Im SW, Zhang J Z, Zhuang H *et al.* A bacterially expressed peptide prevents experimental infection of primates by the hepatitis E virus. *Vaccine*, 2001, **19**( 27 ): 3726 - 3732
- [ 16 ] GE S X( 葛胜祥 ), ZHANG J( 张军 ), HUANG G Y( 黄果勇 ) *et al.* The immuno-protect study of hepatitis E virus ORF2 peptide expressed in *E. coli*. *Acta Microbiologica Sinica*( 微生物学报 ), 2003, **43**( 1 ): 35 - 42
- [ 17 ] Botcher B, Wynne S A, Crowther R A. Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature*, 1997, **386**( 6620 ): 88 - 91
- [ 18 ] Ulrich R, Nassal M, Meisel H *et al.* Core particles of hepatitis B virus as carrier for foreign epitopes. *Adv Virus Res*, 1998, **50**: 141 - 182

## Selection of a Peptide Mimic the Neutralization Epitope of Hepatitis E Virus with Phage Peptide Display Technology

GU Ying ZHANG Jun WANG Ying-Bin LI Shao-Wei YANG Hai-Jie LUO Wen-Xin XIA Ning-Shao\*

(The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** Hepatitis E is an acute hepatitis caused by hepatitis E virus (HEV) in developing countries, where it occurs as cases sporadic and in epidemics form. The causative agent, hepatitis E virus, is transmitted primarily by the fecal-oral route. HEV is icosahedron non-enveloped virus, and its genome is a single-stranded, positive-sense, 3'-polyadenylated RNA about 7.5 kb in length. It contains three open reading frames (ORFs). Of which ORF1 codes for a polypeptide of 1693 amino acids and contains domains homologous to a viral methyltransferase, a papainlike cysteine protease, an RNA helicase, and an RNA-dependent RNA polymerase, besides the most hypervariable region of the HEV genome. And ORF3 codes for a 123-amino-acid-long polypeptide with unknown function. While the major viral capsid protein (pORF2, ORF2 codes) of 660 amino acid was showed to contain the protective epitope. The bacterially expressed polypeptide designated as NE2 has been proved to be a protective antigen. And the anti-NE2 monoclonal antibodies (mAb) was screened, two of these mAbs 8C11 and 8H3 were showed to be against separate conformational neutralization epitope of hepatitis E virus (HEV). And these two mAb were used to screen for binding peptides from a 7-peptides phage display library. After four rounds of panning, twenty-one positive monoclonal phages (11 for 8C11, and 10 for 8H3) were selected and the inserted fragments were sequenced. The DNA sequence coding for the obtained dominant peptide 8C11 (N'-His-Pro-Thr-Leu-Leu-Arg-Ile-C', named 8C11A) and 8H3 (N'-Ser-Ile-Leu-Pro-Tyr-Pro-Tyr-C', named 8H3A) were then synthesized and cloned to insert between amino acid 78 to 83 of hepatitis B core antigen (HBcAg), then expressed in *E. coli*. The recombinant proteins aggregate into homodimer or polymer on SDS-PAGE, and could bind with mAb 8C11 and 8H3 in Western blotting. Respectively, the recombinant protein 8C11A showed to be dimer mainly, which can bind with mAb 8C11. The monomer and dimer of 8H3A are in the same amount on SDS-PAGE, but only the dimer could bind with mAb 8H3 on Western blotting. The renatured recombinant proteins were all showed to aggregate into virus like particles which were similar as HBcAg on transmission electron micrograph. The dominant peptide 8H3A (N'-Ser-Ile-Leu-Pro-Tyr-Pro-Tyr-C') that selected out by mAb 8H3 was further chemo-synthesized, and its binding activity was confirmed by BIAcore biosensor. The result showed that this 7-peptide can bind with mAb 8H3 in a big  $K_a$  and  $K_d$  form, which means the binding is not stable. These results implicated that conformational dependent neutralization epitope could be partially modeled by short peptide, which provided a feasible route for subunit vaccine development.

**Key words** hepatitis E virus, neutralization epitope, phage peptide display

Received : 05-23-2003

This work was supported by Grant from Science and Technology Projects of Fujian Province, China; Grant number 2002 F013; Excellent Scholar Incubation Plan of the Ministry of Education, China.

\* Corresponding author. Tel : 86-592-2184110; Fax : 86-592-2184110; E-mail : nixia@jingxuan.xmu.edu.cn <http://journals.im.ac.cn>