

颗粒化重组戊型肝炎病毒衣壳蛋白及其抗原性与免疫原性

何志强 张军 李少伟 林鉴 刘如石 陈毅歆 王颖彬 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,福建省医学分子病毒学研究中心,厦门 361005)

摘 要 过去的研究发现大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒(HEV)衣壳蛋白 ORF2 的 aa394-606 片段 NE2 可以形成同源多聚体,并具有良好的免疫保护性,但纯化后的免疫原性较弱。这里表达了 3 个 NE2 蛋白的 N 端延伸突变体,发现对应于 ORF2 aa368-606 的重组蛋白 HEV 239 在体外可以形成颗粒性抗原。HEV 239 抗原颗粒与戊肝患者血清反应性良好,对中和性单克隆抗体 8C11 的反应性与 NE2 抗原相当,而对另一中和性单克隆抗体 8H3 的反应性较 NE2 抗原显著提高,表明 HEV 239 抗原颗粒具有比 NE2 更好的抗原性。纯化后的 HEV 239 抗原颗粒直径约为 15~30nm。铝佐剂吸附的 HEV 239 免疫 Balb/c 小鼠的半数有效剂量(ED_{50})在 0.08~0.25 μ g 之间,而同样以铝佐剂吸附的 NE2 抗原 60 μ g 剂量免疫的抗体阳转率仅 25%,表明 HEV 239 抗原颗粒具有更好的免疫原性。

关键词 戊型肝炎病毒,衣壳蛋白,疫苗,颗粒性抗原,原核表达

中图分类号 R373.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0262-07

戊型肝炎(戊肝)是一种由戊型肝炎病毒(HEV)引起的经肠道传播的急性肝炎,临床表现与甲型肝炎类似,但病死率较高(1%~3%),孕妇感染病死率可高达 20%^[1]。我国是戊肝主要流行区之一,1986~1988 年在新疆南部地区发生的大规模戊肝爆发流行,造成 20 万人发病,死亡 1000 余人,除新疆外,我国吉林、辽宁、内蒙古及山东等地均有戊肝爆发流行的报道^[2]。由于戊肝病毒尚不能进行有效的体外组织培养,传统的减毒疫苗和灭活疫苗的研制无法进行,基因工程疫苗的研制成为戊肝疫苗的最大希望所在。

HEV 含 3 个开放读码框架(ORF),其中 ORF2 编码 660 个氨基酸的多肽(PORF2),为病毒主要结构蛋白,组成病毒衣壳^[1]。目前已发现多个 ORF2 重组蛋白具有免疫保护作用,表明 ORF2 蛋白上存在着重要的中和表位^[3-5]。最近,我们在大肠杆菌中表达了 HEV ORF2 aa394-606 的一个片段,获得的重组蛋白(NE2)对戊肝急性期、恢复期血清均有很强的反应性,免疫恒河猴可产生良好的保护性^[6-9]。利用 NE2 蛋白制备的单克隆抗体成功地鉴定出 HEV ORF2 上的 2 个不同的中和表位区域,分别被中和单抗 8C11 和 8H3 所识别^[10]。但随后的研究发

现,当 NE2 纯度提高到 95% 以上时,其免疫原性显著下降,成为疫苗研制的一大障碍。为有效提高疫苗的免疫原性,我们进一步对 NE2 的延伸突变体进行了表达、纯化和免疫原性研究。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌种

含有 HEV ORF2 a. a. 394~a. a. 606 基因片段的非融合表达载体 pTO-T7-E2^[6]及 pTO-T7^[11]为本实验室所构建与保存,受体菌 *E. coli* ER2566 购自 New England Biolabs 公司。

1.2 引物

根据 HEV 基因 I 型中国株(DDBJ 登录号 D11092)序列,合成 5' 段延伸引物如表 1(上海博亚公司),引物 5' 端均引入 *Nde* I 位点。以引物 HERP(5'-ctcgagaaataaactataactccga-3')为反向引物,引物 5' 端引入 *Eco*R I 位点。

1.3 工具酶及其它

限制性核酸内切酶、*Taq* DNA 聚合酶和 pMD 18-T 载体为 TaKaRa 产品,酶标记抗体购自晶美公司,为 PROTOS 产品,预染蛋白分子量标准和蓝染试剂为 HyClone Pierce 公司产品。

表 1 NE2 N 端延伸引物

Table 1 The primers of NE2 N- terminal extension

Peptide	Amino acid location	Primer name	Primer sequence
HEV 217	380-606	217FP	5'-CATATGTCGGCAGGTGGACAGCTGTTCTACTCTCGT-3'
HEV 227	370-606	227FP	5'-CATATGCTAGGCGGTCTACCCACAGAATTTGATTTTCGTCGGCAGGTGGACAG-3'
HEV 239	368-606	239FP	5'-CATATGATAGCGCTTACCCTGTTTAACTTCTGACACCCTGCTAGGCGGTCTACCCA-3'

1.4 重组表达载体的构建

以 pTO-T7-E2 为模板, 分别利用正向引物 217FP、227FP、239FP 以及反向引物 HERP, 依次进行 PCR 反应: 94℃ 5min, 94℃ 50s, 57℃ 50s, 72℃ 50s, 共 25 个循环, 72℃ 10min。扩增产物以胶回收试剂(上海华舜公司)回收后, 直接连接至 pMD18-T 载体中, 测序无误后用 *Nde*I 和 *Eco*R I 切下目的基因, 连到同样酶切处理的 pTO-T7 上, 获得 NE2 N 端延伸突变体表达载体 pTO-T7-217、pTO-T7-227 和 pTO-T7-239。图 1 显示了 pTO-T7-239 的主要基因元件。

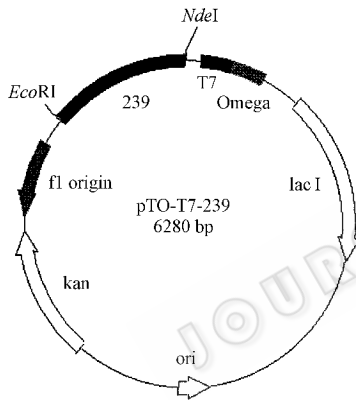


图 1 pTO-T7-239 质粒图谱

Fig.1 Plasmid map of pTO-T7-239

1.5 蛋白的表达与复性

表达载体转化大肠杆菌 ER2566 进行 IPTG 诱导表达。诱导条件为 25℃, 0.2mmol/L IPTG, 6h。离心收集菌体, 超声(SONICS& MATERIALS 公司, Uilbra-Cell VCX500 型超声破碎仪)破碎, 包涵体经 1% Triton X-100 洗涤 2 次, 溶于缓冲液 A(4mol/L 尿素, 20mmol/L Tris·Cl, pH8.5, 5mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl)中, 对 1×PBS(pH7.45)透析过夜, 离心获得复性上清液。

1.6 NE2 蛋白 N 端延伸突变体的分子筛保留时间检测

重组蛋白复性样品用高效液相色谱(HPLC, Beckman Syster Gold Nouveau 125NMP/166NMP)进行分子筛保留时间检测, 层析柱为 TSK G3000 SW_{XL}(7.8mm×30cm)。

1.7 HEV 239 重组蛋白的纯化

将缓冲液 A 中的 239 重组蛋白经 4mol/L 尿素水溶液透析过夜, 进行等电聚焦电泳纯化。等电聚焦仪选用 Amershan Pharmacia 公司生产的 Iso-Prime pI8 型制备型多腔等电聚焦电泳系统。6 个固相化 pH 膜为 pH5.10、pH5.20、pH5.25、pH5.30、pH5.35 和 pH5.40; 溶液为 4mol/L 尿素水溶液。上样于 pH5.25-pH5.30 腔室中; 电泳参数为 200V 2h、500V 2h、800V 2h、3000V 60h。聚焦后的 239 重组蛋白位于 pH5.25~pH5.30 之间。

经过等电聚焦纯化的 239 重组蛋白(2mg/mL)进一步以 HPLC 纯化。收集时间: 105~120min, 获得 239 纯化样品 100mL, 4mg/mL(SDS-PAGE 蓝染单一纯)。层析柱选用 TSK 公司的 Phenyl-5PW 21.5mm×15cm。缓冲液: 0.5mol/L 硫酸铵、4mol/L 尿素、20mmol/L 磷酸缓冲液 pH7.2; 洗脱液: 4mol/L 尿素、20mmol/L 磷酸缓冲液 pH7.2; 流速: 4mL/min, 洗脱程序为 0.5~0 mol/L 硫酸铵连续梯度洗脱 120min, 收集时间: 105~120min, 获得 239 纯化样品。

HPLC 纯化样品进行切向流复性, 使用 PALL 公司的切向流系统, 膜包截留分子量为 30kD, 运行时压力为 0.034MPa, 流速为 500mL/min, 切向流速为 15mL/min; 复性缓冲液为 20 倍样品体积的 PBS pH7.45。

1.8 透射电镜观察

复性后 HEV 239 重组蛋白经 2% 磷钨酸 pH7.0 负染, 固定于喷炭的铜网上进行透射电镜观察(日本 Electronics 公司 JEM-100CX II 透射电镜)。

1.9 原子力显微镜观察

复性后 HEV 239 重组蛋白包被于聚苯乙烯微孔板, 进行原子力显微镜观察, 扫描面积为 1mm²。仪器为美国 DI 公司生产的 Nano III A 型原子力显微镜, 探针分辨率为 1nm。

1.10 动态光散射观察

复性后 HEV 239 重组蛋白以动态光散射仪(Protein Solutions 公司, DynaPro MS/X 型)测量水化动力学直径, 使用 Regulation 算法。

1.11 HEV 239 重组蛋白与戊肝患者血清和抗 HEV 中和单抗的 ELISA 反应

纯化的 HEV 239 抗原,溶解于 CB 中,100ng/孔包被 96 孔聚苯乙烯微量板,37℃ 吸附 2h,4℃ 过夜;PBST 洗液 (pH7.4) 洗涤 1 遍,200 μ L/孔封闭液(20% 牛血清 PBS)37℃ 封闭 2h,甩尽、拍干后真空密封,4℃ 保存备用。检测时,于每孔中加入 100 μ L 样品稀释液,然后加入 10 μ L 血清,37℃ 温育 30min;PBST 洗涤 5 次,扣干后每孔加入 100 μ L 稀释好的抗人 IgG-HRP(北京万泰生物药业公司提供),37℃ 温育 30min;洗涤 5 次,扣干,加入显色剂,37℃ 温育 10min,终止液 50 μ L(2mol/L H₂SO₄)终止,读取 OD_{450nm/620nm} 的读值。

5 份戊肝患者急性期血清和 5 份抗 HEV 抗体阴性血清由北京万泰公司惠赠。抗 HEV 中和单抗 8C11 和 8H3 由本实验室制备^[10]。

1.12 HEV 239 重组蛋白颗粒免疫小鼠的半数有效剂量测定

纯化复性后的 HEV 239 抗原以 PBS 稀释至 40 μ g/mL,铝佐剂吸附过夜后以铝佐剂 3 倍系列稀释疫苗至终浓度分别为 20、6.67、2.25、0.74、0.25、0.08 μ g/mL,以 1mL 腹腔注射抗 HEV 抗体阴性 5~6 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠,每剂量组 8 只。免疫前 0d、免后 1 月、2 月、3 月、4 月、5 月、6 月分别以定量毛细采血管采集鼠尾静脉血 20 μ L。以 239 为抗原的间接 ELISA 法检测鼠血清抗体。血清稀释度为 1:100,每份标本进行双孔检测,取平均值判断结果。

2 结果

2.1 NE2 蛋白 N 端延伸突变体的表达及复性产物分子筛柱层析保留时间分析

将重组表达载体质粒转化大肠杆菌进行诱导表达,HEV 217、HEV 227 和 HEV 239 重组蛋白均有较好表达,表达产物溶解于 4mol/L 尿素后透析复性纯化。利用 G3000SW_{XL} 分子筛层析柱在 HPLC 中观察复性纯化产物的保留时间,结果发现 HEV 217 和 HEV 227 蛋白的保留时间稍短于 NE2,但其保留时间对应的分子量显著短于相应的单体分子,提示三者均主要以多聚体形式存在。而 HEV 239 随穿透峰出现,其保留时间明显短于其他蛋白,相当于 >500kD 的分子,提示其形成了颗粒(图 2)。

2.2 HEV 239 重组蛋白的纯化

质粒 pTO-T7-239 转化的 *E. coli* 菌体经诱导后,SDS-PAGE 显示在电泳迁移率相当于 31kD 左右有一

图 2 重组蛋白的分子筛保留时间

Fig.2 Retained time of recombinant proteins in gel filtration chromatogram

表达条带,表达量约为 30%(图 3 lane 1),主要以包涵体的形式存在。经 2mol/L、4mol/L 和 8mol/L 尿素洗涤,可见尿素上清中有电泳迁移率相当于 43kD 左右的二聚体蛋白(图 3 lane 3~5)。取 4mol/L 尿素溶解的样品进一步以等电聚焦电泳、疏水相互作用层析和切向流复性纯化,纯化样品的 SDS-PAGE 显示目的蛋白主要为二聚体形式(图 3 lane 6),煮沸后仅出现单体带,未见杂带(图 3 lane 7)。经 HPLC 分子筛层析柱及 SDS-PAGE 稀释染色法鉴定纯化蛋白纯度大于 95%(结果未列出)。最终纯化得率约为包涵体重组蛋白的 20%。

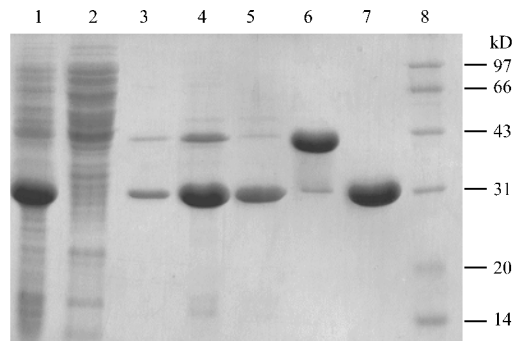


图 3 HEV 239 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig.3 SDS-PAGE of recombinant protein HEV 239

1: bacterium lysis; 2: supernatant of bacterium; 3: supernatant of 2 mol/L urea solution; 4: supernatant of 4 mol/L urea solution; 5: supernatant of 8 mol/L urea solution; 6: purified by HPLC; 7: purified by HPLC (boiled); 8: protein molecular weight marker

2.3 HEV 239 重组蛋白颗粒的形态

透射电镜观察负染的纯化后的 HEV 239 重组蛋白,可见直径约为 15~30nm 的颗粒(图 4)。以原子力显微镜观察,同样可见直径约为 15~30nm 的颗粒(图 5)。动态光散射仪测定重组蛋白在溶液中的平均水化半径为 13.25nm(图 6)。

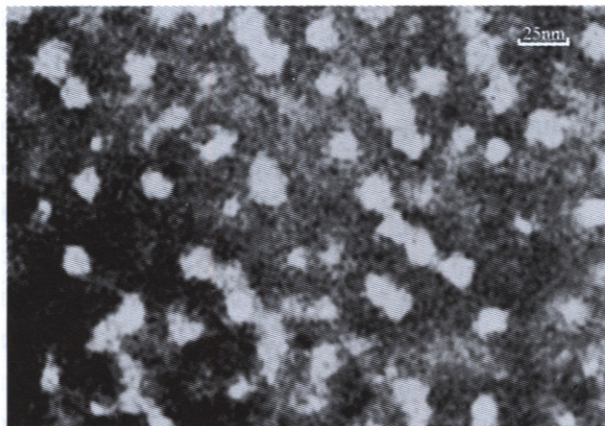


图4 HEV 239 重组蛋白颗粒的电镜照片

Fig.4 Electromicroscopy photo of HEV 239 recombinant particle

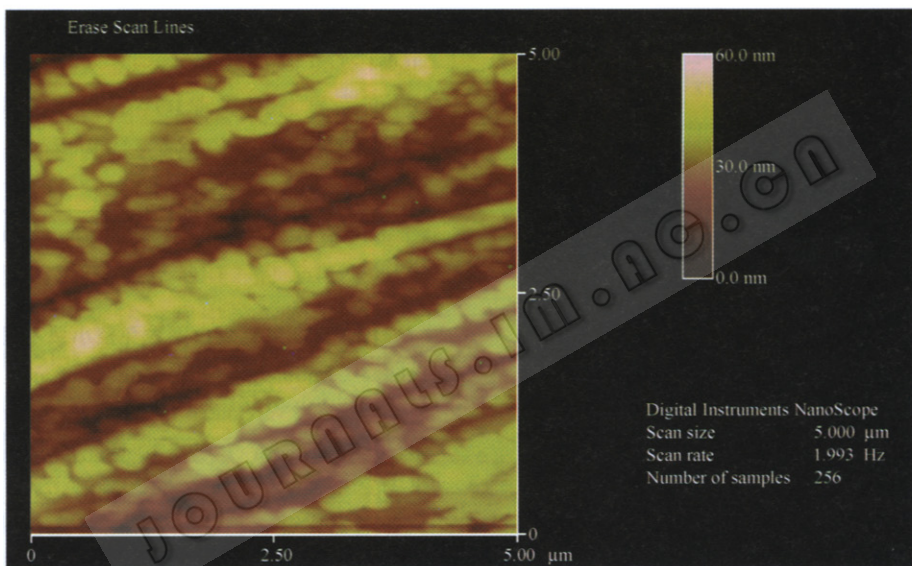


图5 HEV 239 蛋白颗粒的原子力显微镜观察

Fig.5 HEV 239 recombinant particle under atomic force microscopy

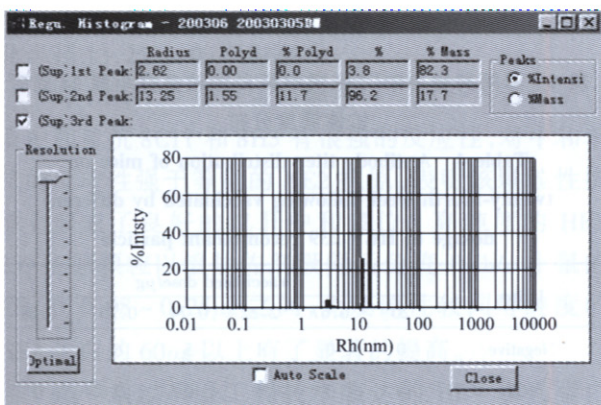


图6 HEV 239 蛋白颗粒在溶液中的水化半径

Fig.6 The hydrated radius of HEV 239 recombinant particle in solution

2.4 HEV 239 重组蛋白颗粒的抗原性

2.4.1 HEV 239 重组蛋白颗粒对戊肝患者血清的反应性:5 份阳性血清分离自戊肝患者急性期,5 份阴性血清来自健康体检人群,其相关背景及对重组 239 VLP(作为包被抗原)的反应性见表 2。5 份阳性血清用 Genelabs 公司的抗 HEV IgG 试剂(GL-IgG)和 IgM 试剂(GL-IgM)均为阳性,用万泰公司以 NE2 为抗原的抗 HEV IgG 试剂(NE2-IgG)和 IgM 试剂(NE2-IgM)亦为阳性,同时具有典型的急性肝炎临床表现。5 份阴性血清 GL-IgG 试剂为阴性,用 NE2-IgG 试剂和 NE2-IgM 试剂亦为阴性,同时无 ALT 异常和其他肝炎表现。

2.4.2 HEV 239 重组蛋白颗粒上中和表位活性:不同浓度重组蛋白 239 或 NE2 包被,以间接 ELISA 检

测对单抗 8H3 或 8C11 ,结果如图 7。239 蛋白上 8C11 表位的活性与等量 NE2 抗原相当 ,而 8H3 表位的活性显著高于等量 NE2 抗原。

表 2 HEV 239 重组蛋白颗粒与戊肝患者血清的 ELISA OD 值

Table 2 OD value of HEV 239 recombinant particle against sera of hepatitis E patients detected by ELISA

Sera	Sex	Age	Days after onset	ALT	GL-IgG	GL-IgM	E2-IgM	E2-IgG	HEV 239-IgG
Patient 1	Male	73	9	3043	0.643	3.461	3.050	3.430	2.857
Patient 2	Male	73	19	228	1.056	3.527	3.133	3.402	2.933
Patient 3	Male	35	16	174	4.000	3.518	3.542	3.450	2.234
Patient 4	Female	37	14	355	4.000	1.539	4.000	4.000	3.137
Patient 5	Male	41	12	286	3.000	3.416	3.216	3.051	2.453
Mean									2.722*
Healthy 1	Male	48	-	9	0.051	-	0.085	0.021	0.022
Healthy 2	Female	20	-	12	0.058	-	0.091	0.015	0.017
Healthy 3	Female	21	-	23	0.052	-	0.089	0.019	0.016
Healthy 4	Male	42	-	17	0.019	-	0.110	0.019	0.036
Healthy 5	Male	24	-	7	0.023	-	0.091	0.016	0.015
Mean									0.021*

* The mean OD value for anti-HEV 239 IgG on hepatitis E patients was significantly higher than that on healthy individuals ($P < 0.001$, Student T test).

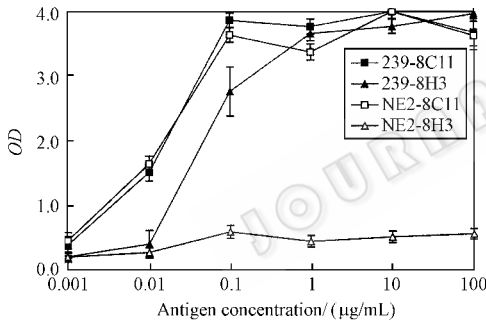


图 7 HEV 239 或 NE2 抗原与中和单抗 8C11 和 8H3 的反应性

Fig.7 Reactivity of HEV 239 antigen or NE2 antigen against neutralization monoclonal antibodies 8C11 or 8H3

2.5 HEV 239 重组蛋白颗粒的免疫原性

不同剂量免疫小鼠的抗体阳转情况如表 3。可见在 4 周时 0.74 μg 以上剂量免疫的小鼠抗体均阳转 ,0.25 μg 免疫有 7/8 只鼠阳转 ,0.08 μg 免疫有 3/8 只阳转 ,小鼠 ED50 在 0.08 ~ 0.25 μg 之间。各免疫小鼠抗体持久性与免疫剂量呈正相关。最大剂量免疫的 2 组在 24 周后抗体仍无一阴转。免后 24 周各组小鼠抗体滴度情况如表 4。可见小鼠抗体滴度与免疫剂量也呈明显的正相关。而 NE2 抗原免疫小鼠 20 μg 以下剂量无一阳转 ,60 μg 免疫阳转率也仅 25%(表 5)。HEV 239 蛋白的免疫原性显著高于 NE2 蛋白。

表 3 HEV 239 重组蛋白颗粒免疫小鼠不同时间的抗体阳性数

Table 3 Antibody positive number of mice on different month after being vaccinated by HEV 239 recombinant particle

Vaccinated dose/ μg	Vaccinated number	Antibody positive number						
		0week	4week	8week	12week	16week	20week	24week
20	8	0	8	8	8	8	8	8
6.67	8	0	8	8	8	8	8	8
2.22	8	0	8	8	8	8	7	7
0.74	8	0	8	8	8	8	4	3
0.25	8	0	7	6	5	5	2	2
0.08	8	0	3	2	0	0	0	0

表 4 不同剂量 HEV 239 重组蛋白颗粒免疫小鼠 24 周后抗体滴度分布

Table 4 Antibody titer distribution of mice on twenty-fourth week following vaccinated by different dosage of HEV 239 recombinant particle

1/titer	Vaccinated dose/ μg					
	20	6.67	2.22	0.74	0.25	0.08
Negative	0	0	1	5	6	8
100	0	0	1	0	2	0
1 000	0	0	4	3	0	0
10 000	8	8	2	0	0	0
Total positive	8	8	7	3	2	0

表 5 不同剂量 NE2 重组蛋白免疫小鼠后 4 周的血清阳转情况

Table 5 Seraconversion of mice on fourth week following vaccinated by different dosage of HEV 239 recombinant particle

Dose/ μg	5	10	15	20	30	60
Vaccinated No.	4	4	8	4	8	8
Seraconversion No.	0	0	0	0	1	2

3 讨论

在过去的研究中,我们发现所表达的 HEV 衣壳蛋白片段 NE2 可以形成良好的构象性中和表位,以弗氏佐剂免疫恒河猴具有良好的免疫原性,并诱导出高效价保护性抗体,使免疫猴获得对 HEV 的良好抵抗力^[9,10]。但当 NE2 蛋白纯度提高到 95% 以上。并且采用铝盐佐剂时,疫苗的免疫原性显著下降。在对 NE2 蛋白进行研究时,我们已发现 NE2 在体外可自发形成以二聚体为基础的多种聚合形式,类似于病毒衣壳蛋白的装配过程^[6]。Tsarev 等^[12]用昆虫杆状病毒表达系统表达 HEV ORF2 的 aa112-660 片段时,发现目的蛋白在表达过程中被剪切为 55kD 蛋白(aa112-607)和 53kD 蛋白(aa112-578),并且可以形成类病毒颗粒结构。NE2 蛋白与 55kD 蛋白相比,C 端几乎完全重叠,仅 N 端有 286 个氨基酸的缺失。因此,延长 NE2 的 N 端有可能表达出可在体外组装成颗粒的重组衣壳蛋白。结果发现,当 NE2 蛋白 N 端延伸至 aa368 时,获得的重组蛋白 HEV 239 的分子筛保留时间出现了显著缩短,提示蛋白颗粒的形成。将 HEV 239 蛋白进一步纯化、复性后,在透射电镜下、原子力显微镜下均可见直径约为 15~30nm 的颗粒,动态光散射检测蛋白在溶液中主要以平均水化半径 13.25nm 的颗粒存在。

对 HEV 239 重组蛋白颗粒可与戊肝患者血清以及中和单抗 8C11 和 8H3 有很强的反应性,对中和单抗的反应性强于等量的 NE2 抗原,表明该颗粒性抗原上形成了良好的戊肝中和表位。高纯度的 HEV 239 抗原颗粒以铝盐佐剂吸附后免疫 Balb/c 小鼠的 ED₅₀ 在 0.08~0.25 μg 之间,免疫原性较同等纯度的 NE2 蛋白的 60 μg 以上有了显著的提高。

迄今通过基因工程技术表达的 HEV 衣壳蛋白颗粒均是在昆虫杆状病毒表达系统中获得的。该系统生产过程涉及大量的活病毒和异种蛋白,其安全性问题一直未得到充分验证。因此虽然其具有表达量大,目的蛋白翻译后修饰过程更接近于哺乳动物

细胞等优点,迄今仍无一种正式上市的生物制品采用该系统进行生产。本研究在国际上首次采用生物制药业广泛使用的大肠杆菌表达系统获得了 HEV 衣壳蛋白颗粒,而且所获得的颗粒抗原形成了良好的中和表位,并能诱导出高效价抗体,从而在抗原性、免疫原性和安全性方面均能满足疫苗的要求,为 HEV 疫苗的研制奠定了坚实的基础。目前该疫苗对恒河猴的保护实验正在进行中,已发现其可诱导出高效价的中和抗体,并能保护免疫猴免受同型和异型 HEV 的感染(结果另文发表)。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Purcell RH, Emerson SU, Hepatitis E virus. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, et al eds. Fields virology, 4th ed., vol2. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2001, pp.3051-3061
- [2] Zhuang H, Cao XY, Liu CB et al. Epidemiology of hepatitis E in China. *Gastroenterologia Japonica*, 1999, **36**(suppl3): 135-138
- [3] Purdy MA, McCaustland KA, Krawczynski K et al. Preliminary evidence that a trpE-HEV fusion protein protects cynomolgus macaques against challenge with wild-type hepatitis E virus(HEV). *J Med Virol*, 1993, **41**: 90-94
- [4] Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU et al. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, **91**: 10198-10202
- [5] Zhang M, Emerson SU, Nguyen H et al. Immunogenicity and protective efficacy of a vaccine prepared from 53 kD truncated hepatitis E virus capsid protein expressed in insect cells. *Vaccine*, 2001, **20**: 853-857
- [6] Li SW(李少伟), Zhang J(张军), He ZQ(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
- [7] Zhang J, Ge SX, Huang GY et al. Evaluation of antibody based and nucleic acid based assays for diagnosis of Hepatitis E Virus infection in a rhesus monkey model. *J Med Virol*, 2003, **71**: 518-526
- [8] Ge SX(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
- [9] Ge SX(葛胜祥), Zhang J(张军), Huang GY(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
- [10] Gu Y(顾颖), Ge SX(葛胜祥), Huang GY(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
- [11] Luo WX(罗文新), Zhang J(张军), Yang HJ(杨海杰) et al. Construction and application of an *Escherichia coli* high effective

(生物工程学报) 2000, 16(5) 578-581

- [12] Tsarev S, Tsarev T, Emerson S *et al.* ELISA for antibody to hepatitis E virus based on complete open reading frame - 2 protein expressed

in insect cells : identification of HEV infection in primates. *J Infect Dis* ,1993 ,168 369 - 378

Particulate Recombinant Hepatitis E Virus Capsid Protein and Its Antigenicity and Immunogenicity

HE Zhi-Qiang ZHANG Jun LI Shao-Wei LIN Jian LIU Ru-Shi

CHEN Yi-Xin WANG Ying-Bin XIA Ning-Shao*

(*The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering* , *Research Center for Medical molecular virology of Fujian Province* , *Xiamen University* , *Xiamen 361005* , *China*)

Abstract An *E. coli* expressed recombinant antigen NE2 was reported to aggregate into homo-oligomer, and can induce protective antibodies on rhesus monkey, but its immunogenicity was much weak after being purified. In this study, three N-terminal extension mutant of NE2 were expressed in *E. coli*, one of which named HEV 239 was found to aggregate into particle. HEV 239 antigen had good reactivity with sera of hepatitis E patients. The reactivity of HEV 239 against neutralization monoclonal antibody 8C11 was similar as NE2 antigen, while the reactivity of it against another neutralization monoclonal antibody 8H3 is much better than NE2 antigen, which indicated better antigenicity of HEV 239 than NE2. The diameter of purified HEV 239 particulate antigen was between 15 nm to 30 nm. The ED₅₀ of immunization of HEV 239 particle adsorbed by aluminum adjuvant to BALB/c mice was between 0.08 μg to 0.25 μg. In contrast, the seroconversion rate of mice immunized by NE2 antigen adsorbed by aluminium adjuvant was only 25% on 60 μg vaccination. These results suggested that HEV 239 antigen particle has better immunogenicity as well as antigenicity than those of NE2 antigen, so it is a better vaccine candidate against HEV.

Key words hepatitis E virus, capsid protein, vaccine, particulate antigen, prokaryotic expression

Received : 08-15-2003

This work was supported by Grant from Science and Technology Projects of Fujian Province (No. 2002 F013) and Excellent Scholar Incubation Plan of Ministry of Education, China.

* Corresponding author. Tel 86-592-2184110 ; Fax 86-592-2184110 ; E-mail: bxixia@jinyuan.com ; <http://journals.im.ac.cn>

by using above process.

Presently, in Chinese pharmaceutical industry, a major handicap in recombinant mAb development is that the expression level is still very low, usually in a range of 1 to 50 mg/L, this severely hinders the mAb R&D speed. Since the mAb content in cell culture supernatant is relatively low, the supernatant has to be concentrated with ultrafiltration prior to loading on the capture column. For industry scale production, the expression level of the engineering cells must be raised greatly, this is an anxious demand from pharmaceutical industry. If the cell culture supernatant can be loaded on the capture column directly, the total yield of the purification process can be elevated further.

Acknowledgement The authors acknowledge Zheng Hong for her contributions to rCHO cell culture, as well as Wang Yanfang, Kong Deqing and Li Limin *etc* for their contributions to the analysis work.

REFERENCES (参考文献)

- [1] Winokur PL, Stapleton JT. Immunoglobulin prophylaxis for hepatitis A. *Clin Infect Dis*, 1992, **14**(2): 580 – 586
- [2] Lemon SM, Thomas D. Vaccines to prevent viral hepatitis. *N Engl J Med*, 1997, **336**(3): 196 – 204
- [3] Siegl G, Lemon SM. Recent advances in hepatitis A vaccine development. *Virus Res*, 1990, **17**(2): 75 – 92
- [4] Liang MF (梁米芳), Cao JY (曹经瓓). Human anti-HAV neutralizing whole molecular antibody. Chinese Patent CN 01110720.0, 2001
- [5] Chen Q (陈谦). Protein concentration assay. In: Wang JZ (汪家政), Fan M (范明) eds. Protein Technology Manual, Beijing: Science Press, 2001, pp. 42 – 47
- [6] Sambrook J, Russell DW. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002, A8.40 – A8.51
- [7] Sambrook J, Russell DW. Isolation of High-molecular-weight DNA from Mammalian Cells Using Proteinase K and Phenol. In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002, 6.4 – 6.11
- [8] Zhang W, Czupryn MJ. Free sulfhydryl in recombinant monoclonal antibodies. *Biotechnol Prog* 2002, **18**(3): 509 – 513
- [9] Godfrey MA, Kwasowski P, Clift R *et al.* Assessment of the suitability of commercially available SpA affinity solid phases for the purification of murine monoclonal antibodies at process scale. *J Immunol Methods*, 1993, **160**(1): 97 – 105
- [10] Hunt G, Nashabeh W. Capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate nongel sieving analysis of a therapeutic recombinant monoclonal antibody: a biotechnology perspective. *Anal Chem*, 1999, **71**(13): 2390 – 2397
- [11] Kong J (孔健). Purification of antibody and characterization of its physico-chemical properties. In: Zhen YS (甄永芬), Shao RX (邵荣光) eds. Antibody Engineering Pharmaceuticals, Beijing: Chemical Industry Press, 2002, pp. 114
- [12] Johannes C, Obe G. Induction of chromosomal aberrations with benzon nuclease in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutat Res*, 1994, **325**(2 – 3): 113 – 116
- [13] Obe G, Schunck C, Johannes C. Induction of sister-chromatid exchanges by *Alu* I, DNase I, benzon nuclease and bleomycin in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutant Res*, 1994, **307**(1): 315 – 321