

## 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 片段的聚合现象研究

李少伟 张军 何志强 葛胜祥 顾颖 林鉴 刘如石 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** 在大肠杆菌中表达了戊型肝炎病毒(HEV)ORF2 的 a. a. 394 ~ a. a. 604 片段,得到的重组蛋白 NE2 在 SDS-PAGE 中主要以可被尿素解聚的二聚体形式存在,二聚体对病人血清的反应性明显强于单体;质谱分析表明 NE2 可形成从二聚体到至少六聚体的多种聚体;动态光散射测定表明平均分子半径约 4nm,相当于四聚体,但分散度较大,提示为多种大小不一的聚合体的混合物。这些证据表明 NE2 蛋白可形成以同源二聚体为基本单位的多种聚合体形式,其中以二聚体间的结合最为紧密,并且以二聚体为基础可进一步装配出多种更高级结构,从而具有作为 HEV 疫苗及诊断试剂抗原的良好前景。

**关键词** 戊型肝炎病毒,ORF2,组装,二聚体,原核表达

**中图分类号** Q939.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)04-0463-05

戊型肝炎是发展中国家的一种主要急性散发型肝炎,其病原体戊型肝炎病毒(HEV)主要经消化道传播,是大小约 27 ~ 34nm 的单股正链无包膜的 RNA 病毒,基因组全长约 7.5kb,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。目前已有几个研究小组利用昆虫杆状病毒表达系统表达了 N 端部分缺失的 POPF2 片段,并发现当表达片段的 C 端被昆虫细胞内蛋白酶剪切至 a. a. 607 的产物能够形成类病毒颗粒<sup>[1-5]</sup>。在过去的研究中,我们利用谷胱甘肽转移酶(GST)融合表达载体在大肠杆菌中表达了 ORF2 的 a. a. 394 ~ a. a. 604 的区域(E2)的重组蛋白(GE2),发现其在 SDS-PAGE 中形成大量的二聚体,而且二聚体与感染血清的反应性要大大强于单体,提示该重组蛋白的二聚体形式有利于某些强构象型表位的暴露;用该重组蛋白免疫恒河猴,可以保护其抵抗高滴度的 HEV 攻击而不发病,因此具有成为疫苗的良好前景<sup>[6,7]</sup>。对昆虫细胞表达的 HEV 类病毒颗粒的研究提示 HEV 衣壳的基本形态单位(子粒)是在 ORF2 的同源二聚体基础上形成的<sup>[5]</sup>,E2 片段在 SDS-PAGE 中的二聚化现象以及其较单体形式更好的血清反应性提示其可能与 HEV 子粒的基本结构具有较大的相似性。为探讨 E2 片段在溶液中

是否依然形成二聚体,并是否可在二聚体基础上模拟病毒子粒的装配过程形成更高级的聚体形式乃至类病毒颗粒,本研究将该区段转移至一个非融合表达载体 pTO-T7 中,表达出无融合蛋白的 E2 多肽,并从多个方面对该重组多肽的聚合现象进行了探讨。

### 1 材料与方法

#### 1.1 质粒与菌种

含有 HEV ORF2 a. a. 394 ~ a. a. 604 基因片段的质粒 pGEX 20T-E2(pGE2)为香港大学微生物系吴文翰教授惠赠<sup>[6]</sup>,非融合表达载体 pTO-T7 为本实验室所构建与保存<sup>[8]</sup>,受体菌 *E. coli* ERR2566 亦为本室保存。

#### 1.2 引物

根据 pGEX 20T-E2 上 HEV ORF2 基因序列,由上海博亚公司合成。5 端引物 HEFP(5'-CATATG-CAGCTGTCTACTCTCGTC-3')引入酶切位点 *Nde*I,3 端引物 HERP(5'-CTCGAGAAATAAATAACTATAACTCCGA-3')引入酶切位点 *Xho*I。

#### 1.3 工具酶及其它

限制酶、*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。

收稿日期:2002-01-24,修回日期:2002-04-01。

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

#### 1.4 重组表达载体的构建

以质粒 pGEX 20T-E2 为模板, HEFP 与 HERP 为引物扩增出 828bp 片段。PCR 条件为: 94 预变性 5min; 94 变性 50s, 57 退火 50s, 72 延伸 1min, 共扩增 25 循环; 最后再 72 延伸 10min。PCR 扩增片段与 pMD 18-T 载体连接, 得到插入 E2 基因的阳性亚克隆; 再经 *NdeI*/*EcoRI* 酶切处理, 接入 pTO-T7 表达载体, 获得表达载体 pTO-T7-E2 (图 1), 并测序证实序列无误(测序由上海博亚公司进行)。重组子转化受体菌 *E. coli* ERR2566。

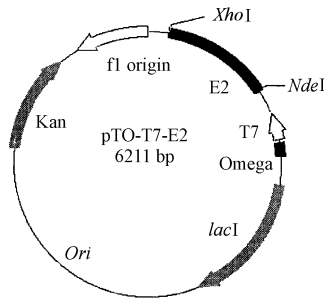


图 1 pTO-T7-E2 质粒图

Fig. 1 Plasmid map of pTO-T7-E2

#### 1.5 重组蛋白的表达与 SDS-PAGE 电泳

诱导表达的条件为 25 °C, 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, 依次以 2mol/L、4mol/L 和 8mol/L 尿素洗涤 1 次, 取洗涤上清进行 12% SDS-PAGE 电泳。

#### 1.6 重组蛋白的纯化

包涵体经 1% Triton X-100 洗涤 2 次后, 直接溶于缓冲液 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, 再经 TSK GEL SW3000 21.5mm × 60cm 硅胶柱 HPLC (Beckman System Gold Nouveau 125NMP/166NMP 高效液相色谱仪) 纯化, 获得的重组多肽命名为 NE2。

#### 1.7 蛋白印迹实验 (Western blotting)

按常规方法操作, 样品为纯化的 NE2, 12% SDS-PAGE 后转移到硝酸纤维素膜进行杂交, 一抗分别为恢复期病人血清和鼠抗 NE2 单抗 16D7, 二抗为羊抗人或羊抗鼠 IgG-AP。单抗 16D7 为 NE2 免疫小鼠后筛选出的识别线性表位的单克隆抗体 (结果另文发表)。

#### 1.8 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS)

将  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸 (HCCA) 溶于乙腈 - 0.1% 三氟乙酸 (1:2, V/V) 混合液形成饱和溶液即基质溶液, HPLC 纯化的 NE2 经超纯水透析脱盐后与等体积的基质溶液混合, 点于样品靶上, 送入质谱仪 (Bruker Daltonics 公司, REFLEX III 型), 进行质谱分析。

#### 1.9 重组蛋白 NE2 水化动力学分子半径测定

HPLC 纯化的 NE2 样品经 0.1 $\mu$ m 的氧化铝微孔滤膜过滤, 于动态光散射仪 (美国 PROTEIN SOLUTIONS 公司, DYNAPRO99-D-50 型) 上测量, 入射激光波长为 824.0nm, 使用 Regulation 算法计算, 溶剂为 PBS。

## 2 结果

#### 2.1 重组蛋白 NE2 的表达与纯化

质粒 pTO-T7-E2 转化的 *E. coli* 菌体经诱导后, SDS-PAGE 显示在 29kD 的位置有一表达条带, 表达量约为 40% (图 2, lane 2), 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 2mol/L 尿素上清中以约 40kD 蛋白为主 (图 2, lane 3), 4mol/L 尿素上清中则在 29kD 处出现大量表达产物, 依然可见明显 40kD 蛋白 (图 2, lane 4), 而 8mol/L 尿素上清中以 29kD 蛋白为主, 几乎不见 40kD 蛋白 (图 2, lane 5); 对 4mol/L 上清样品直接以 PBS 透析复性后, 目的蛋白在 SDS-PAGE 中主要以 40kD 蛋白和 29kD 蛋白两种形式存在, 二者比例约为 5:1 (图 2, lane 6); 透析复性样品继续在 HPLC 中经分子筛柱层析纯化 (图 2, lane 7), 沸水浴 10min 后则 29kD 带明显增多, 而 40kD 带消失, 未见其他杂带 (图 2, lane 8)。

#### 2.2 重组蛋白 NE2 的蛋白印迹实验

以恢复期人血清和识别线性表位的单克隆抗体 16D7 对煮沸前、后的 HPLC 纯化样品进行蛋白印迹检测, 结果显示未煮沸样品 40kD 带对 HEV 阳性血清的反应性明显, 29kD 带隐约可见 (图 3, lane 2), 从 26kD 至约 80kD 间对 16D7 单抗出现多条反应带, 而以 29kD、40kD 及 80kD 处最明显 (图 3, lane 3); 对煮沸样品人血清检测则未见明显反应条带 (图 3, lane 5), 16D7 单抗检测可见 29kD 处较宽明显反应带 (图 3, lane 6)。

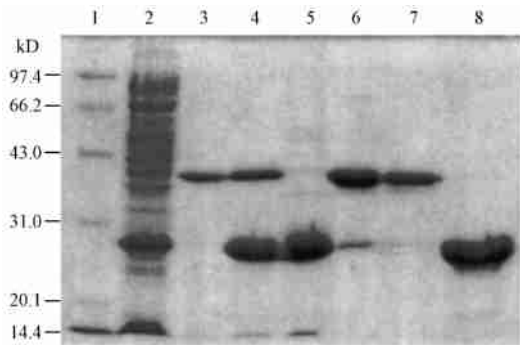


图2 重组蛋白 NE2 的表达与纯化(12% SDS-PAGE)

Fig. 2 Expression and purification of recombinant protein NE2 (12% SDS-PAGE)

1. Protein molecular weight marker; 2. Bacterium lysis; 3. Supernatant of 2mol/L urea solution; 4. Supernatant of 4mol/L urea solution; 5. Supernatant of 8mol/L urea solution; 6. Supernatant of 4mol/L urea solution after dialysis with PBS; 7. NE2 purified with gel filtration HPLC (without boiling); 8. NE2 purified with gel filtration HPLC (after boiling for 10min)

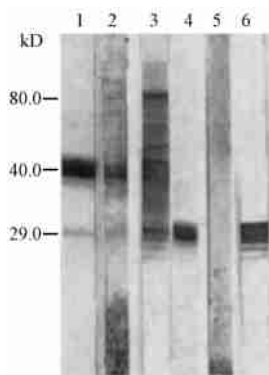


图3 NE2 的蛋白印迹实验

Fig. 3 The Western blotting of NE2

1,4. NE2 on SDS-PAGE; 2,5. Convalescent serum of an acute hepatitis E patient; 3,6. Monoclonal antibody 16D7 against a linear epitope in NE2. 1,2,3. Without boiling; 4,5,6. Boiled for 10min

### 2.3 重组蛋白 NE2 的 MALDI-TOF-MS 分析

将 NE2 在 HCCA 中进行 MALDI-TOF-MS 分析, 结果较明显的谱峰有 9 个, 其中最高的峰核质比为 22899.18, 与 NE2 的理论分子量(23097.02D)相当, 其余 8 个峰均与 23097.02 呈倍比关系(图 4), 推测为 NE2 的不同聚体形式。在实验条件下蛋白分子通常带 1~2 个电荷, 因此推测这 9 个谱峰分别对应着 NE2 蛋白的单体至十二聚体(表 1)。

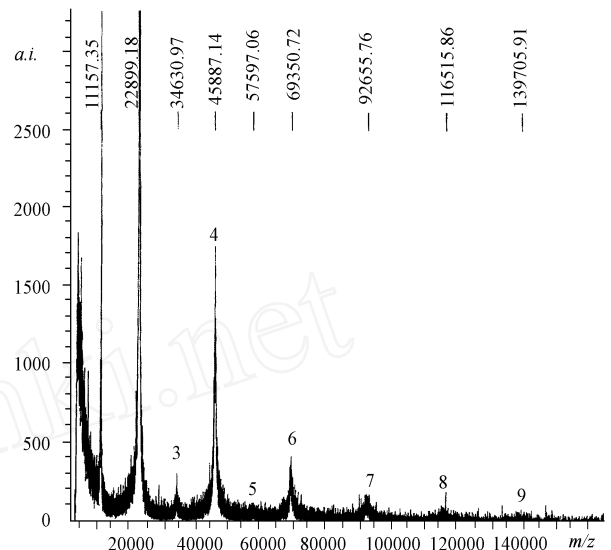


图4 NE2 蛋白的 MALDI-TOF-MS 图

Fig. 4 The map of MALDI-TOF-MS of NE2

### 2.4 重组蛋白 NE2 水化动力学分子半径测定

溶于 PBS 中的 HPLC 纯化的 NE2 样品经 0.1 $\mu$ m 的氧化铝微孔滤膜过滤, 用动态光散射仪使用 Regulation 算法测量水化分子动力学半径, 得到一个质量贡献比为 100% 的峰, 分子半径为 4.04nm, 相当于分子量 90kD, 分散度较大(27.2%), 提示 NE2 蛋白在 PBS 溶液中形成平均为四聚体的多种聚合状态(图 5)。

表 1 重组蛋白 NE2 在 MALDI-TOF-MS 中的主要谱峰(HCCA 基质)

Table 1 The main peak of recombinant protein NE2 in MALDI-TOF-MS (HCCA matrix)

Peak No.	Observed ( $m/z$ )	Deduced charge number	Expected ( $m/z$ )	Deduced oligomer status
1	11167.39	2	11548.51	Monomer
2	22899.18	1/2	23097.02	Monomer/Dimer
3	34630.97	2	34645.53	Trimer
4	45887.14	1/2	46194.04	Dimer/Tetramer
5	57597.06	2	57742.55	Pentamer
6	69350.73	1/2	69291.06	Trimer/Hexamer
7	92655.76	1/2	92388.08	Tetramer/Octamer
8	116512.86	1/2	115485.10	Pentamer/Decamer
9	139705.91	1/2	138582.12	Hexamer/Dodecamer

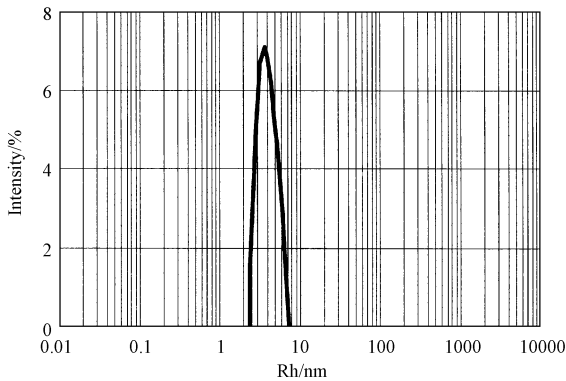


图 5 NE2 在 PBS 中的水化动力学分子半径

Fig. 5 The hydrated dynamic semidiameter of NE2 solved in PBS

### 3 讨 论

Zhang 等<sup>[6]</sup>利用 GST 融合表达载体表达了 HEV ORF2 的 a. a. 394 ~ a. a. 604 片段,首次发现该片段在 SDS-PAGE 中可以形成二聚体,而且二聚体蛋白对病人血清的反应性要明显优于单体,本研究在大肠杆菌中非融合地表达了该区域,并对获得的 NE2 重组蛋白的聚体性质进行了多项实验,发现:(1)在 SDS-PAGE 中可见明显 40kD 带和 29kD 带,煮沸后或 8mol/L 尿素处理后 40kD 带消失而 29kD 带明显增强,用病人血清进行的蛋白印迹实验中 40kD 的反应性明显强于 29kD,而用特异单克隆抗体的蛋白印迹实验中还可明显见约 80kD 带及多条分布于 29kD 到 80kD 之间的反应带,提示多种构型的存在;(2)在 MALDI-TOF-MS 中,可见多个 NE2 单体的整倍数谱峰,至少包含 NE2 的单体、双体及三至六聚体;(3)用动态光散射仪测得 NE2 在 PBS 溶液中的水化动力学半径约 4.04nm,相当于 90kD 的蛋白分子,分散度较大,这些结果表明 NE2 在溶液中为多种多聚体的混合物,其中以二聚体间的结合最为紧密,即使在 SDS-PAGE 条件下依然不被破坏。

成熟的戊肝病毒细胞培养模型迄今尚未成功建立,因此关于戊肝病毒颗粒的结构研究主要是通过各种表达系统进行。1994 年 Tsarev 等<sup>[1]</sup>首先报道了用昆虫杆状病毒表达系统表达 HEV ORF2 蛋白的 N 端缺失的片段(a. a. 112 ~ a. a. 660),在昆虫细胞内观察到了大量的 20nm ~ 30nm 戊肝类病毒颗粒,1997 年 Li 等<sup>[3]</sup>同样用昆虫杆状病毒表达系统表达了同一片段,发现昆虫细胞表达 50kD 和 58kD 2 种主要的重组蛋白产物,其中仅 50kD 蛋白能够组装成类病毒颗粒,进一步的研究证实这两种蛋白的 N 端同为 a. a. 112,58kD 蛋白为 a. a. 112 ~ a. a. 660 的全长表

达产物,而 50kD 蛋白的 C 端为 a. a. 607,昆虫细胞单独表达 a. a. 112 ~ a. a. 607 也可形成类病毒颗粒。用冰冻蚀刻电镜技术观察昆虫细胞表达的类病毒颗粒的结构,证实其为 T=1 的二十面体对称颗粒,具有 30 个  $56 \times 10^{-10}$  长,  $43 \times 10^{-10}$  宽的面,每个是由 5 个 p50 同源二聚体组成,沿二倍轴同源二聚体的一部分凸起于病毒表面,同源二聚体间在三倍轴上有较五倍轴上更紧密的连接,提示戊肝病毒 ORF2 蛋白首先形成同源二聚体,3 对同源二聚体间进而形成六聚体,并逐渐组装形成病毒衣壳<sup>[5]</sup>。本研究表达的 NE2 蛋白所形成的结合紧密的二聚体可能即模拟了形成 HEV 病毒颗粒的基本结构单位,并且发现了二聚体能进一步装配出更高级结构的初步证据。本研究未观察到形成类病毒颗粒的证据,可能 E2 区域尚未囊括某些子粒装配出类病毒颗粒所必需的结构,对以该区域为核心的进一步原核表达将提供更多的 HEV 子粒装配结构信息。

本研究表达的 NE2 主要以包涵体的形式存在,经梯度尿素洗涤,可见 2mol/L 尿素上清中以约 40kD 蛋白为主,4mol/L 尿素上清中则以 29kD 蛋白为主,依然可见明显 40kD 蛋白,而 8mol/L 尿素上清中以 29kD 蛋白为主,几乎不见 40kD 蛋白;对 4mol/L 上清样品直接以 PBS 透析复性后,目的蛋白在 SDS-PAGE 中主要以 40kD 和 29kD 两种形式存在,40kD 为主;透析复性样品继续在 HPLC 中经分子筛柱层析纯化,沸水浴 10min 后则仅见明显增强的 29kD 带,而 40kD 带消失,提示 40kD 蛋白为 29kD 蛋白的二聚体形式,且该二聚体可被尿素解聚,意味着二聚体的形成依赖于单体间的疏水作用,目前我们正通过系列缺失、突变研究寻找二聚体结合的核心区域。

用 NE2 作为抗原免疫并筛选出的 3 株单克隆抗体能够捕获天然 HEV 病毒颗粒,而且用纯化的 NE2 抗原用于 HEV 感染猴模型系列血清的抗体检测,其灵敏度明显优于现有商业试剂,用 NE2 作为疫苗可以保护免疫猴免受 HEV 病毒的攻击,均强烈提示 NE2 重组蛋白形成的多聚体较好地再现了 HEV 病毒衣壳的表面构型(结果另文报道)。重组蛋白免疫原性与颗粒疫苗相比有较大的差距,本研究表达的 NE2 蛋白在溶液中以多聚体形式存在,因此可能具有较普通重组蛋白更好的免疫原性。该蛋白一方面去除了融合蛋白,另一方面采用原核表达系统,由于目前已有大量大肠杆菌表达的重组蛋白成功地应用于人体治疗,而人们对昆虫杆状病毒表达系统的安全性问题始终存在疑问,另外,原核表达

的生产成本要远低于昆虫杆状病毒表达系统,因此 NE2 蛋白较已报告的昆虫杆状病毒表达的 HEV 疫苗相比将具有更大的应用潜力。NE2 免疫对灵长类动物的保护性实验目前已在进行,初步的结果表明 NE2 免疫可产生高效价的抗 HEV 抗体,并可保护免疫猴在大剂量 HEV 攻击下仍不出现任何肝炎症状(结果另文报道)。

在 SDS-PAGE 电泳中见到的表达产物对应的相对分子量约为 29kD(煮沸样品、尿素处理样品)和 40kD(透析复性样品),而 NE2 理论分子量为 23097.02D,这一差别可能是由于重组蛋白构型导致,也有可能是重组蛋白在表达、后加工过程中被剪切所致。为明确其原因,将 NE2 重组蛋白进行 MALDI-TOF-MS 分析,结果测得的谱峰均与 NE2 的理论分子量呈倍比关系(图 4)。目前在质谱图分析中,通常是根据谱峰与理论分子量的倍数关系推测所携带的电荷数,由于本研究中的 NE2 蛋白在溶液中即形成多种聚合体,因此难以用这一做法来推测电荷数,因此我们根据通常认为的在实验条件下蛋白分子所带电荷应为 1~2 个,推测这些谱峰分别对应着 NE2 蛋白的单体至十二聚体,重组蛋白 NE2 应未被剪切,在 SDS-PAGE 和 Western Blotting 中所见到的 29kD 蛋白、40kD 蛋白及 80kD 以上蛋白更可能分别对应着 NE2 的单体、二聚体和多聚体,但因重组蛋白构型问题而导致相对分子量的偏差。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Tsarev S A, Tsareva T S, Emerson S U *et al.* ELISA for antibody to hepatitis E virus (HEV) 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
- [2] McAtee C P, Zhang Y, Yarbough P O *et al.* Purification of a soluble hepatitis E open reading frame 2 - derived protein with unique antigenic properties. *Protein Expr Purif*, 1996, **8**:262 ~ 270
- [3] Li T, Yamakawa Y, Suzuki K *et al.* Expression and self-assembly of empty virus - like particles of hepatitis E virus. *J Virol*, 1997, **71**:7207 ~ 7213
- [4] Robinson R A, Burgess W H, Emerson S U *et al.* Structural characterization of recombinant hepatitis E virus ORF2 proteins in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif*, 1998, **12**:75 ~ 84
- [5] Xing L, Kato K, Li T *et al.* Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual-domain T = 1 particle presenting native virus epitopes. *Virology*, 1999, **265**:35 ~ 45
- [6] Zhang J Z, Ng M H, Xia N S *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**:125 ~ 132
- [7] Im S, Zhang J Z, Zhuang H *et al.* A bacterially expressed peptide prevents experimental infection of primates by the hepatitis E virus. *Vaccine*, 2001, **19**:3726 ~ 3732
- [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

## The Study of Aggregate of the ORF2 Peptide of Hepatitis E Virus Expressed in Escherichia coli

LI Shao-Wei ZHANG Jun HE Zhi-Qiang GE Sheng-Xiang GU Ying LIN Jian LIU Ru-Shi XIA Ning-Shao\*

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

**Abstract** A fragment of hepatitis E virus open reading frame-2 (ORF2), located from amino acid residues 394 to 604, was expressed in *E. coli*. The recombinant protein NE2 was found to form homodimer mostly in SDS-PAGE, which can be dissociated to monomers when treated with urea, and it was recognized more strongly in its dimeric form than the monomer by HEV reactive human serum in Western blotting. Besides, many aggregated form of NE2 from dimer to at least hexamer can be seen in MALDI-TOF-MS. And when the hydrated dynamic semidiameter of NE2 moleculars in PBS was measured as about 4nm by Dynamic Light Scattering (DLS), being equal to tetramer, but with high polydispersity, which suggested that the NE2 moleculars were existed in PBS in many different sizes. These results suggested that the recombinant NE2 can aggregate into several oligomer forms, the association in the dimer is most strong, and dimers can assemble further to form some super-structure.

**Key words** hepatitis E Virus, ORF2, assembly, dimer, prokaryotic expression

Received: 01-24-2002

\* Corresponding author. Tel:86-592-2184110; Fax:86-592-2184110; E-mail:nsxia@jingxian.xmu.edu.cn