

290-297

6773(4)

第10卷 第4期
1995年12月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 10 No. 4
Dec. 1995

戊肝病毒活性肽的选择、合成与应用

戚中田 潘 卫

(第二军医大学微生物学教研室, 上海 200433)

崔大敷 俞 超 崔恒冉

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

R373.21

A

摘要 对戊型肝炎病毒(HEV)编码蛋白序列进行了亲水性分析及二级结构预测,选择亲水性强、具有 β -转角与 β -折叠的区段,采用多肽固相合成法合成了HEV基因组3个开读框架(ORF₁, ORF₂和ORF₃)中可能的抗原表位,以免疫学方法进行鉴定并选出了分别来自HEV3个ORF的、具有重要生物活性与应用前景的3段肽(EH₁₇₄、EH₂₈₅、EH₃₈₂)。在此基础上,进行了抗HEV ELISA 新型检测试剂盒的实验室研究及临床试用。结果表明,所研究的戊肝抗体检测试剂盒特异性高、临床符合性好、具有可重复性,在戊肝辅助诊断及流行病学调查中具有重要意义。

关键词 戊型肝炎病毒, 基因序列, 合成肽, 酶联免疫吸附试验

活性肽; 合成

1989年, Reyes等成功地获得了戊型肝炎病毒(HEV)的基因克隆^[1], 并证实是经肠道传播的非甲非乙型肝炎(现称戊型肝炎)的病原体^[2,3]。现已证明^[4], HEV呈球形, 直径27~34 nm, 基因组是单股正链RNA, 长约7.6 kb, 由5'-非编码区、非结构区、结构区和3'-非编码区组成, 包括三个开读框架(ORF₁₋₃)。ORF₁位于基因组的5'端, 长5079 bp(第28~5107位), 编码病毒复制所需要的RNA复制酶、蛋白酶和解螺旋酶等, 为非结构区基因; ORF₂及ORF₃位于基因组的3'端, ORF₃长369 bp(第5103~5472位), ORF₂长1980bp(5147~7128位), 它们都编码病毒的结构蛋白。1986~1988年, 在我国新疆发生了戊肝爆发流行, 病人数超过12万。北京、吉林、辽宁、内蒙、河北、湖北、山东和上海等许多省市也报道有戊肝散在发生或流行。目前还缺乏特异、有效的戊肝诊断及防治方法, 是影响我国人民健康的常见传染病之一。近两年来, 我们开展了戊肝病毒基因组的结构与功能研究, 筛选鉴定出HEV序列中重要的抗原表位, 并对合成肽进行了构型修饰和化学处理, 增加了肽的免疫反应性。利用这些合成肽, 我们建立了新型的ELISA检测抗HEV IgG和IgM的方法并在临床进行了验证。现将研究结果报道如下。

材料与方 法

1 肽合成仪及其试剂 自动多肽合成仪为美国ABI公司产品431A型, HF切割仪为日本大阪多肽研究所产品; BOC-氨基酸和侧链带有保护基团的BOC-保护氨基酸也购自日本大阪多肽研究所, 它们是: Glu(Heox), His(Bom), Tyr(Br-Z), Cys(4-CH₃Bzl), Trp(CHO), Asp(Heox), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Arg(Tos), Lys(Cl-Z); PAM-树脂系美国ABI公司产品。

本文于1994年12月28日收到, 1995年4月10日修回

2 血清标本 阳性参照为 Genelabs 试剂盒检测阳性的医院临床送检血清标本或卫生部标准戊肝血清(暂定);正常血清取自上海市中心血站的义务献血员血清,HBsAg、ALT 及抗HCV 检测均为阴性。急性非甲非乙非丙型(NANBNC)肝炎患者血清、急性甲肝血清、乙肝血清和丙肝血清等分别采自上海、江苏、四川和福建等地。

3 HEV 编码蛋白的分析与合成 利用 Kyte 和 Doolittle 原理^[5],通过计算机对 HEV 编码蛋白各区域进行亲疏水性分析;并利用 Garuiser-Robson^[6]法和 Conform 法^[7],对编码蛋白进行二级结构的预测。在此基础上,根据 Merifield 的固相合成肽原理,选择并合成了 HEV 结构区和非结构区的肽段。

4 合成肽的包被及封闭 抗原包被缓冲液为 0.05 mol/L (pH9.6)碳酸盐缓冲液。合成肽用包被液稀释至 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$,加入聚苯乙烯条排孔 100 $\mu\text{g}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 小时后弃去包被液,每孔加 200 μl 含 2.5% BSA (第 5 组份)的封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 小时,用洗涤液洗 2 遍,干燥后真空封装,4 $^{\circ}\text{C}$ 贮存供间接 ELISA 法检测抗 HEV 用。

5 抗 HEV ELISA 检测 在合成肽包被的条排孔中每孔加稀释后样品 110 μl (稀释液 100 μl ,待检血清 10 μl),37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 45 分钟后洗涤 5 遍;再加酶标羊抗人 γ 链或 μ 链抗体 100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 45 分钟,洗涤 5 遍后用 OPD (100 μl)显色,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 分钟后用 2 mol/L H_2SO_4 终止,在酶标仪上测定 492 nm 吸光度(OD 值),参考波长为 653 nm。

结 果

1 HEV 编码蛋白的疏水性及二级结构分析

对 HEV 非结构区(ORF₁)及结构区(ORF₂ 和 ORF₃)编码蛋白进行疏水性分析及二级结构预测,发现 HEV 的抗原表位尽管有沿其氨基酸序列全长分布的倾向,但某些区段的抗原性仍较明显,故选择亲水性高、含有 β -转角及 β -折叠的区域,在 3 个开读框架内共合成了 7 个肽段。再根据各肽与戊肝血清的免疫反应性(结果未列出),选出了 EH₁₇₄(ORF₁)、EH₂₈₆(ORF₂)和 EH₂₉₀(ORF₃)三段肽(图 1)。

2 HEV 合成肽的纯化与鉴定

从树脂上酸解离下来的合成肽,经裂解、去保护基团、Sephadex G-15 脱盐及 TSK 40(f)分离后,再过高压液相 C₁₈反相层析柱纯化,从而得到 HPLC 纯(单一峰)的目的肽(图 2)。氨基酸组成分析证明各肽的氨基酸组成均符合理论值(以 EH₁₇₄为例,见表 1)。

表 1 HEV 合成肽(EH₁₇₄)的氨基酸组成分析

Table 1 Amino Acid Composition of Synthetic HEV Peptide EH₁₇₄

氨基酸 Amino acids	测得平均值 Average values	理论值 Expected values
Asx	4.06	4
Thr	1.8	2
Ser	4	4
Glx	2.1	2
Pro	1.08	1
Gly	4	4
Ala	4	4
Val	1.09	1
Ile	2.9	3
Leu	2.13	2
Tyr	1.07	1
His	2.02	2
Lys	1.04	1
Arg	6.8	7

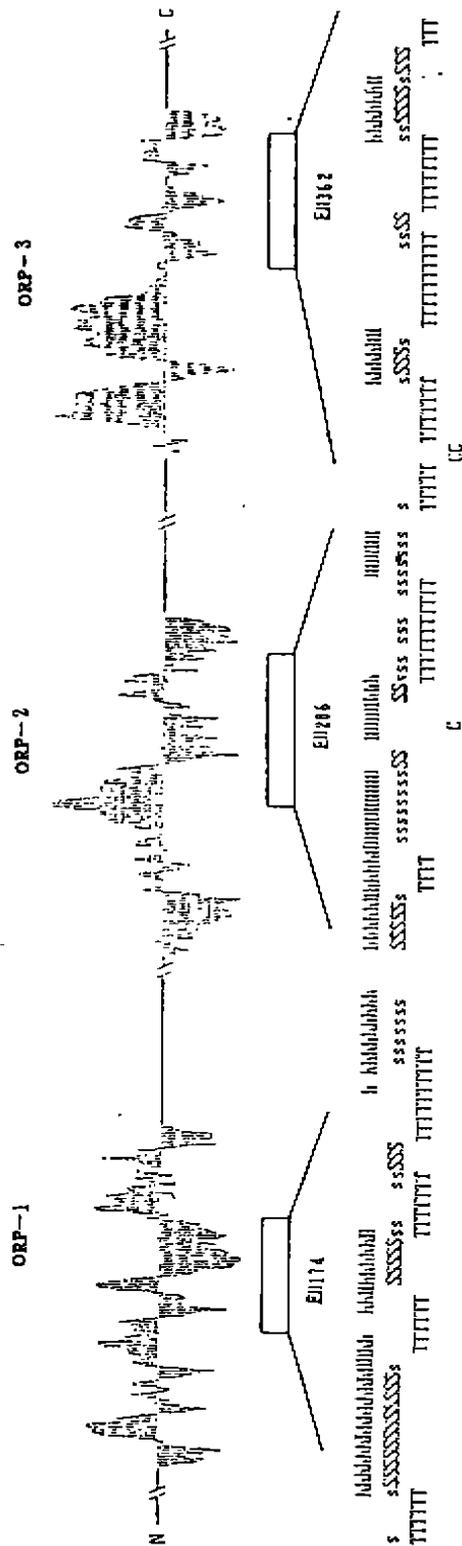


图1 HEV 编码蛋白的疏水性分析及二级结构预测

Fig 1 Hydrophobic analysis and secondary structure prediction of HEV encoding proteins

图中上半部分为疏水性分析, 下半部分为二级结构预测的结果

H: α -螺旋, S: β -折叠, T: β -转角, C: 无规则卷曲

The upper part of the figure shows the hydrophobic analysis of the synthetic peptides, while the lower part demonstrates the secondary structure prediction of the peptides.
H: α -helix, S: β -sheet, T: β -turn, C: coil

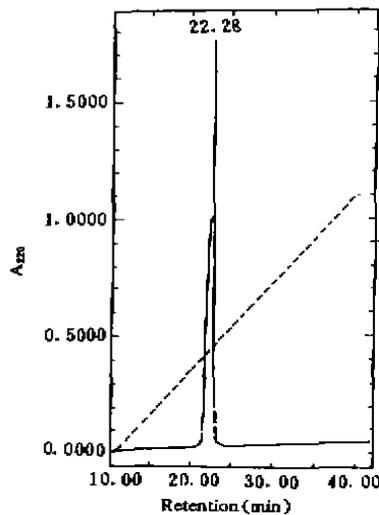
图 2 HEV 合成肽(EH₃₆₂)的 HPLC 鉴定

Fig 2 Purity Profile of Synthetic HEV

Peptide (EH₃₆₂) on HPLC柱(Column): RP-C₁₈ (7×250 nm)

波长(Wavelength): 220 nm

缓冲液(Buffer) A: 0.1% TFA;

B: 0.1% TFA, 100% CH₃CN

流速(Flow rate): 4 ml/min

梯度(Gradient): B: 0→50% in 40 min

3 戊肝肽与参照血清的反应性

利用合成、筛选的三段肽(EH₁₇₄、EH₂₈₆和 EH₃₆₂)分别检测卫生部的 HEV 参照血清(暂定),由表 2 可见 EH₂₈₆检测阴性参照品的符合率最高(25/25, 100%), EH₃₆₂对阳性参照品的检出率最好(45/51, 88.3%)。实验还证明(见参考文献 9), EH₂₈₆与 EH₃₆₂在 HEV IgG 和 IgM 检测中有互补作用; EH₁₇₄的反应性较弱, 尚未见与 EH₂₈₆或 EH₃₆₂有互补性, 但它的加入可使待测标本的免疫反应性增加, 使检测时的本底更清晰。用此 3 段肽联合组装成试剂盒检测上述 76 份参照血清, 与 Genelabs 公司的试剂盒比较, 两者阴、阳性相符的有 69 份, 不符的有 7 份^[9]。相对敏感性为 88.3%(45/51), 特异性为 96.0%(24/25), 总符合率为 90.8%(68/76)。

表 2 各段戊肝病毒肽与标准戊肝血清的反应性

Table 2 Immunoreactivity of Synthetic HEV Peptides with a Serum Panel

标准血清 Reference	份数 Quantity	EH ₁₇₄		EH ₂₈₆		EH ₃₆₂	
		+	-	+	-	+	-
Genelabs 阳性* (DBL +ve)	10	0	10	0	10	9	1
Genelabs 阴性* (DBL -ve)	10	1	9	0	10	1	9
阳性参照品 Positive reference	15	0	15	1	14	11	4
阴性参照品 Negative reference	15	1	14	0	15	1	14
临床阳性血清 Acute-phase sera of HEV infection	26	10	16	11	15	25	1

* Genelabs 公司产品, 由新加坡 DBL 公司生产

Commercial anti-HEV IgG kit from Diagnostic Biotechnology (Pte) Ltd, Singapore.

4 临界值的确定

测定了 600 份义务献血员的抗 HEV IgG, 对其中 OD > 0.35 的标本用 Genelabs 试剂盒^[8]复测剔除 17 份, 对余下的 583 份的 OD 值进行统计学处理, 得均值(\bar{X}) 0.065, SD 0.071。另测

定 113 份 Genelabs 检测阳性的血清标本,得 OD 均值 1.265,SD 0.673。由图 4 可见,当临界 (Cut off) 值为阴性对照均值(\bar{X})+4SD 时,假阳性和假阴性例数控制在最小范围。据此,我们得到本检测系统抗 HEV IgG 检测的临界值为阴性对照平均值+4×0.071。以同法测定抗 HEV IgM 的 OD 均值为 0.083,SD 为 0.081,故临界值为阴性对照平均值+4SD 即 4×0.081 (图 3)。

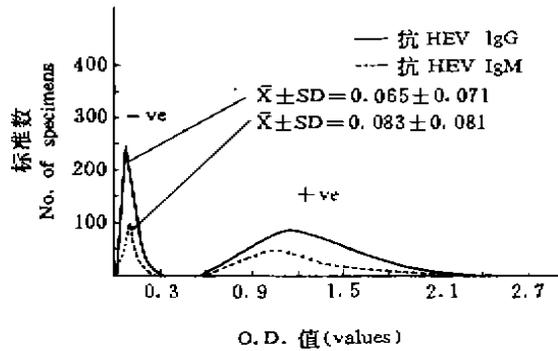


图 3 抗 HEV ELISA 临界值的确定

Fig 3 Determination of Cut off Values for Anti-HEV ELISA Kits

5 抗 HEV ELISA 的可重复性研究

表 3 显示了用上述 3 段合成肽研制的抗 HEV IgG 和 IgM 酶联免疫检测试剂盒的精密度分析结果,实验标本为抗 HEV IgG 及 IgM 均呈阳性的 3 份病人血清。由表 3 可见抗 HEV IgG 的批内变异系数(CV)为 3.2%~4.5%;批间 CV 为 7.4%~10.3%。抗 HEV IgM 的批内 CV 为 3.9~5.5%;批间 CV 为 7.5%~9.2%。表明我们研制的检测试剂盒的批内及批间 CV 均符合精密度标准。

表 3 抗 HEV ELISA 的精密度实验结果

Table 3 Reproducibility of the Peptide-based ELISA Kits

标本 Serum specimens	抗 HEV IgG Anti-HEV IgG kit						抗 HEV IgM Anti-HEV IgM kit					
	批 内*			批 间**			批 内*			批 间**		
	\bar{X}	SD	CV	\bar{X}	SD	CV	\bar{X}	SD	CV	\bar{X}	SD	CV
A	1.426	0.046	3.2%	1.438	0.106	7.4%	1.634	0.063	3.9%	1.558	0.117	7.5%
B	1.738	0.058	3.3%	1.806	0.134	7.4%	1.940	0.080	4.1%	1.970	0.162	8.2%
C	0.964	0.042	4.5%	0.942	0.097	10.3%	0.849	0.047	5.5%	0.901	0.083	9.2%

* 批内检测为同一批待测标本做 10 个复孔

** Ten wells from the same batch of the kit were done at the same time.

** 批间检测为同时测定 10 批不同批号的试剂

** Ten batches of the kit were compared in a single experiment.

表中 \bar{X} : 平均 OD 值; SD: 标准差; CV: 变异系数

\bar{X} : mean OD values; SD: standard deviation; CV: coefficient of variation.

6 合成肽与重组蛋白试剂的比较

用本合成肽试剂盒检测肝炎门诊或住院病人的血清标本 518 份,同时与重组 HEV 抗原组装的 Genelabs 试剂盒的测定结果进行比较(表 4)。结果显示,两者均阳性者 87 份,两者均阴

性片 401 份,相对敏感性为 82.9%;特异性为 97.1%;总符合率达 94.2%(488/518)。表明本合成肽试剂与国外重组抗原试剂有较好的一致性。

表 4 两种抗 HEV 试剂盒的结果比较*

Table 4 Comparison between the Peptide-based and Recombinant-based Kits*

重组抗原 试剂盒** Recombinant-based kit	合成肽试剂盒 Synthetic peptide-based kit		
	阳性 +ve	阴性 -ve	小计 Subtotal
+ve	87	18	105
-ve	12	401	413
合计 Total	99	419	518

* 此表结果由上海瑞金医院、上海长海医院、上海传染病总院及福建漳州 175 医院协助完成。

* The comparative experiment was carried out with assistance of Shanghai Changhai Hospital, Shanghai Rui Jin Hospital, Shanghai General Hospital of Infectious Diseases, and Hospital No. 175 in Zhangzhou, Fujian Province.

** 系 Genelabs 公司产品,由新加坡 DBL 公司生产。

** From Diagnostic Biotechnology (Pte) Ltd., Singapore.

7. 合成肽试剂盒在戊肝诊断中的初步应用

1994 年 4 月至 8 月,上海市杨浦区传染病院使用本合成肽试剂盒检测临床标本 558 份,其中阳性 84 份,阳性率为 15.1%。随机对其中的 58 例阳性者进行临床表现与临床诊断追踪调查,发现有 43 例(74.1%)临床诊断为戊肝,5 例(8.6%)诊断为甲肝,2 例诊断为乙肝(3.4%),8 例(13.8%)未分肝炎型别。这些结果说明本合成肽试剂盒在戊肝抗体检测中有较高的特异性和临床符合率。鉴于戊肝可与其它类型肝炎混合感染且有隐性感染及恢复期抗体存在等因素,可以认为本试剂盒在戊肝的辅助诊断中具有重要意义。

8 合成肽试剂盒在戊肝流行病学调查中的应用

为了检验合成肽试剂盒的实用性,同时调查西藏人群的戊肝抗体携带情况,我们采集并检测了西藏山南地区学生(12~14 岁)体检血清标本 175 份,内科门诊病人(4~70 岁)随机血清标本 71 份。结果发现,体检学生中有 25 例戊肝抗体 IgG 阳性,阳性率为 14.29%;71 例门诊病人中,阳性者 8 例,阳性率为 11.27%。证明在西藏人群(包括西藏体检人群)中亦有较高的戊肝抗体携带率,过去尚未见有类似的报道。

讨 论

HEV 主要有墨西哥型及缅甸型两个基因型,我国人群感染的毒株主要是缅甸型^[10]。本研究合成的 HEV 肽,也主要是根据缅甸型序列设计筛选的。

1 戊肝肽的合成、修饰与筛选

病毒基因组及其表达产物的结构与功能研究,过去用理化方法提取的天然病毒蛋白(病毒体单位),70 年代后多用重组病毒蛋白,近年来又发展到用合成的病毒活性肽。运用人工合成肽法可分段研究 HEV 编码蛋白不同区域的生物活性,且合成肽段的长短及其在基因序列中的位置可人为地控制,分子的大小与构型也可人为地修饰。我们着眼于 HEV 合成肽的构象稳定性及免疫反应性,根据对 HEV 编码蛋白序列的亲水性分析及二级结构预测,选择亲水性

强、具有 β -转角和 β -折叠的区段,固相合成了HEV基因组3个开读框架(ORF₁、ORF₂和ORF₃)中可能的抗原表位序列,从而用免疫学方法鉴定出各开读框架中的重要抗原表位,选出了具有互补性和代表性的来自HEV 3个ORF的3段肽(EH₁₇₄、EH₂₈₆和EH₃₆₂),经纯化后作为固相包被抗原成功地用于抗HEV ELISA检测试剂盒的研制。EH₂₈₆(来自ORF₂)和EH₃₆₂(来自ORF₃)具有较强的免疫原性,而EH₁₇₄(来自ORF₁)的免疫反应性弱,这与在HEV基因库免疫筛选中仅发现ORF₂和ORF₃克隆而未找到ORF₁的序列也是吻合的。

2 戊肝肽与免疫抗体的反应性

酶联免疫测定法(ELISA)是继对流免疫电泳和血凝试验之后的新一代免疫学方法,我们合成的戊肝肽的纯度高,免疫反应性好,故作为包被抗原用于戊肝抗体检测诊断具有特异性高、抗原性强及重复性好等特点。继方法学上确定了结果判定的临界值后,我们又进行了精密度及与参照血清的比较实验。结果表明,我们研制的合成肽试剂盒稳定、特异、敏感,达到了临床实用的要求。279人份的临床验证表明,该试剂盒检测效果好,与临床诊断的符合率高。与国外(Genelabs)重组抗原试剂盒比较,518份标本的总符合率达到了94.2%(表4)。

3 戊肝肽在临床诊断与流行病学调查中的应用

HEV感染的基因检测及抗原检测的最佳时机多在疾病的潜伏期末和急性期初^[11],故在临床实践中漏检率很高,加之临床上对戊肝IgM抗体检测的意义还有争论。因此认为,本研究建立的抗HEV IgG检测系统将成为最主要的戊肝辅助诊断指标,具有重要的理论及实用意义。小范围的戊肝抗体流行病学调查结果,不仅验证了本合成肽试剂盒的实用性,而且首次证明西藏人群中的抗-HEV携带情况。本研究为在我国进一步开展戊肝的基础研究、流行病学调查及临床特异诊断打下了基础。

致谢 中国科学院上海生物化学研究所周国明、黄维德及上海第二军医大学宋燕斌、崔晓红、王锦红等同志参加此项工作,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, *et al.* Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science*, 1990; 247:1335~1339
- 2 戚中田. 国际丙型肝炎病毒及其感染会议介绍. 国外医学微生物学分册, 1993; 16(6):269
- 3 Huang CC, Nguyen D, Fernandez J, *et al.* Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology*, 1992; 191:550~558
- 4 Tam AW, Smith MM, Guerra ME, *et al.* Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*, 1991; 185:120~131
- 5 Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of protein. *J Mol Biol*, 1982; 157:105~132
- 6 Garnier J, Osguthorpe DJ, Robson B. Analysis of the accuracy and implication of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J Mol Biol*, 1978; 120: 97~120
- 7 Chou PY. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv Enzymol*, 1978; 47:45
- 8 Dawson GJ, Chan KH, Cabal CM, *et al.* Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for hepatitis E virus IgG and IgM antibodies utilizing recombinant antigens and synthetic peptides. *J Virol Med*, 1992; 38: 175~186
- 9 潘卫,俞超,戚中田,等. 戊型肝炎病毒合成肽决定簇检测抗HEV研究. 第二军医大学学报, (待发表)

- 10 毕胜利, 刘崇柏, 曹学义, 等. 我国戊型肝炎病毒基因组 cDNA 全序列测定及分析. 病毒学报, 1992, 8(3): 271~279
- 11 庄辉, 李凡, 郭晓霞, 等. 我国戊型肝炎病毒结构区基因组的序列分析. 中华实验和临床病毒学杂志, 1993, 7(1): 14~18

Selection, Synthesis and Application of Hepatitis E Virus Peptides

Qi Zhongtian Pan Wei

(*Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433*)

Cui Dafu Yu Chao Cui Henran

(*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*)

According to our computer analysis of hydrophobicity and prediction of secondary structures for the full-length putative proteins encoded by ORF₁ (open reading frame-1), ORF₂ and ORF₃ of hepatitis E virus (HEV), we selected amino acid regions with hydrophilicity, β -turn, and β -sheet, and synthesized seven peptides of possible epitope-containing regions of the polypeptide encoded by all three ORFs of HEV genomic RNA by Merrifield's method of solid-phase. The synthetic peptides were screened and identified by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Three of the peptides (EH₁₇₄ from ORF₁, EH₂₈₆ from ORF₂ and EH₃₆₂ from ORF₃) showed antigenic activity and possible application for the development of anti-HEV test kits (the peptide-based ELISA). The laboratory experiments and clinical trials indicated that the kits, using a set of three synthetic HEV peptides as coating antigens, were of high specificity and exhibited good reproducibility. Additionally, our results also demonstrated good agreement with clinical findings, suggesting that the test kits are valuable for immunodiagnosis and seroepidemiologic survey of HEV infection.

Key words Hepatitis E virus, Gene sequence, Synthetic peptide, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Acknowledgments

The authors thank Drs. Huang Weide and Zhou Guoming (Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica) for technical assistance in synthesis of viral oligopeptides, and Ms. Song Yangbing, Dr. Cui Xiaohong, Ms. Wang Jinhong (Department of Microbiology, Second Military Medical University in Shanghai) for evaluation of the peptide-based anti-HEV ELISA kits.