

林万明 主编

医学分子微生物学进展

YI XUE FEN ZI

WEI SHENG WU XUE JIN ZHAN



第二集

1993

人民军医出版社

医学分子微生物学进展

(第二集)

林万明 主编

编写者(按文章的先后顺序排列)

闻玉梅	秦鄂德	逢金聚	徐健雄	朱庆义	苏国富
李倩	黄建	刘志奇	史书文	秦生巨	蒋国桥
黄谷良	李建标	路文彬	汪恩涛	俞树荣	张薇芬
谢维	阙劲松	沈萍	张智清	王申五	楚雍烈
王嘉玺	逯好英	王永俊	吴卫星	林万明	孙光
李伍举	张萍	金冬雁	徐明波	黎孟枫	涂强
杨晓林	陈泮藻	董伟	吴加金	熊春生	

XAP41118

人民军医出版社

责任编辑 柴寿江 程 云

医学分子微生物学进展
(第 二 集)

林万明 主编

*

人民军医出版社出版

(北京复兴路 22 号甲 3 号 邮政编码: 100842)

解放军一二〇一工厂印刷

新华书店总店科技发行所发行

*

开本: 787×1092mm 1/16 印张: 25.13 字数: 627 千字

1993 年 10 月第 1 版 1993 年 10 月第 1 次印刷

印数: 1~2 000 册 定价: 21.00 元

ISBN 7-80020-412-X / R · 353

内 容 提 要

本书介绍了近几年国内外医学分子微生物学和基因工程技术的最新研究进展。内容主要包括病毒、细菌、立克次体、螺旋体、寄生虫等病原体及毒素和质粒的分子生物学；基因工程研究中的各种载体、外源基因的克隆及其在原核和真核细胞中的高效表达；基因扩增；引物设计和核酸杂交技术；多肽合成和测序、蛋白质的分离、地高辛标记、化学发光、生物发光和生物分子数据库等各种新技术的建立，以及在基因工程和分子微生物学研究中的应用。

本书可供医学院校、综合性大学生物学和微生物学专业的师生及研究人员参考，也可供分子生物学工作者、临床医生、卫生防疫和检验人员参考。

前 言

分子微生物学是生命科学中发展甚快的新兴学科,为了更快更好地促进分子微生物学在我国医学领域中的应用和发展,在中华医学会和微生物与免疫学会领导的关怀和支持下,于1990年成立了医学分子微生物学组。学组成立后,同年9月4~9日在庐山召开了首届全国医学分子微生物学研讨会。会议收到论文235篇,出席会议代表237人,并于会后编写出版了《首届全国医学分子微生物学研讨会论文选编》,在中华流行病学杂志1990年第11卷特刊6号选登论文55篇,约30万字。同时编写了《医学分子微生物学进展》第一集(上下册,130万字),于1991年3月由中国科学技术出版社出版发行。

通过医学分子微生物学组成员的共同努力,在中华医学会和空军总医院领导的大力支持下,于1992年10月22~28日在黄山召开了第二届全国医学分子微生物学研讨会。出席会议的代表320人,并将会议收到的学术论文经评审合格的编辑成《第二届全国医学分子微生物学研讨会论文选编》(约85万字),在中华流行病学杂志1992年第13卷特刊2号正式发表,其中全文发表183篇,摘要发表236篇。在会议期间,又组织部分专家编写成《医学分子微生物学进展》第二集。该书主要内容有医学微生物中主要病原体的分子生物学,基因工程研究中各种载体、克隆和高效表达,基因扩增、标记、杂交和发光等各种新技术的建立和应用等。

1990年9月~1992年10月,学组先后在庐山、北京、南昌、大连和黄山等地举办了以基因探针、基因扩增(PCR)、核酸提取纯化、DNA合成和测序、逆转录等技术和理论为主要内容的新技术学习班,共397人参加了学习,已为全国各地培养了一批技术骨干。

3年来,学组通过组织召开学术研讨会,举办各种新技术学习班,出版学术论文和著作等工作,对医学分子微生物学在我国的普及和发展起到了积极的推动作用,但各地区、各单位发展不平衡。在总体水平上,尤其在科研深度和创新方面与国际水平相比,还有很大的差距。我们衷心希望广大中青年科研人员积极拼搏进取,勇于开拓创新,为我国医学分子微生物学的深入发展努力工作,让我国医学分子微生物学水平更上一个新台阶,进一步为我国的经济建设发挥更大的作用。

经过各位同行的共同努力,继第一集之后,一本反映近几年国内外医学分子微生物学研究最新进展的专著将奉献给读者。由于本人水平有限,时间仓促,在编写中难免有错漏之处,敬请读者给予批评指正。

林 万 明

空军总医院临床分子生物学研究中心

1992年12月

目 录

乙型肝炎病毒的分子生物学进展	(1)
黄病毒蛋白抗原性的研究进展	(7)
布尼亚病毒科病毒的研究进展	(18)
产毒素大肠杆菌基因探针诊断技术研究进展	(30)
致腹泻大肠杆菌的分子病理学及检测技术研究进展	(34)
沙门菌弱毒株的构建及其作为外源抗原载体的研究进展	(43)
葡萄球菌的分子生物学研究进展	(50)
布鲁杆菌分子生物学研究近期动向	(54)
致病性耶尔森菌表面蛋白的研究	(63)
耶尔森菌属毒力遗传学物质基础研究新进展	(76)
结核杆菌的分子生物学	(83)
炭疽杆菌质粒与致病因子研究进展	(94)
我国对噬菌蛭弧菌的研究	(104)
噬菌蛭弧菌、噬菌体和细菌素	(120)
细菌 L 型的结构与功能	(128)
拟杆菌核酸探针	(134)
细菌毒素	(147)
细菌系统分类学	(159)
立克次体遗传学	(168)
伯氏疏螺旋体的分子生物学	(178)
寄生虫的分子流行病学	(187)
rDNA 指纹图谱在细菌分类鉴定和流行病学调查中的应用	(197)
质粒的分子生物学研究进展	(204)
体外随机和定位诱变技术研究进展	(214)
痘苗病毒载体的研究进展	(222)
逆转录病毒基因转移体系	(227)
逆转录病毒载体研究新进展	(237)
外源基因在大肠杆菌中的高效表达	(245)
人白介素 6 cDNA 的分离鉴定及其在 COS 细胞与 <i>E. coli</i> 细胞 中的克隆与表达	(251)
外源基因在酵母菌中的表达	(257)
真核 II 类基因的转录调控	(265)
逆转录病毒基因表达的翻译校正	(270)
病原微生物基因探针和 PCR 检测技术的最新进展	(281)
核酸扩增技术的新进展及其应用	(291)
PCR 实验的计算机辅助设计与分析	(294)

细胞原位杂交	(305)
多肽合成与测序技术及其在分子病毒学中的应用	(309)
生物工程蛋白质色谱分离单元的选择与放大	(320)
异羟基洋地黄毒甙标记的核酸探针杂交技术及其在分子 微生物学中的应用	(330)
地高辛和抗地高辛技术研究进展	(339)
化学发光技术在基因分析中的应用	(349)
化学发光免疫分析技术及其在医学分子微生物学中的应用	(354)
生物发光分析和生物发光免疫分析及其在分子微生物学中的应用	(368)
生物分子数据库及其在生物医学研究中的应用	(381)
一种新型分子识别元件——催化抗体	(390)

乙型肝炎病毒的分子生物学进展

一、基因结构概述

乙型肝炎病毒 (HBV) 属嗜肝 DNA 病毒科 (Hepadnaviridae), 其独特的基因组为小环状双股 DNA, 但有一部分单股区。双股 DNA 中的长股约 3 200 碱基, 因其核苷酸序列与病毒的 mRNA 互补, 故为负股; 短股长度为 1 700~2 800 碱基, 为正股。负股也不是完整环状, 而是有一小缺口, 位于距离正股的 5'端 225 碱基。无论长股或短股 DNA 的 5'端 DNA 都不能用核苷酸激酶磷酸化, 原因是在负股的 5'端有一短肽结合, 正股的 5'端有 17 个寡核苷酸与之结合。目前认为短肽与寡核苷酸是 DNA 合成的引物。在基因负股的末端有 11 个核苷酸的顺向重复序列, 其中 DR₁ (顺向重复序列) 是负股 DNA 复制的起始点, 而 DR₂ 则为正股 DNA 复制的起始点。在负股有 4 个阅读框架, 分别编码病毒的包膜 (S 基因与 pre-S 基因) 并可能编码吸附于细胞表面受体的病毒决定簇; 病毒的衣壳蛋白 (核心蛋白) 及 α 抗原; 具有反式激活作用的 HBxAg 与病毒的 DNA 聚合酶。鉴于 HBV 的 DNA 聚合酶具有逆转录酶的活性, 而 HBV 复制过程中有逆转录阶段, 因此 HBV 可能有易于变异的倾向, 已发现不同类型, 涉及不同基因片段的变异株。HBV 与细胞受体的结合近来已初步被提示, 对了解 HBV 入侵细胞及复制的环节有重要价值。近来还对 HBV 基因中存在调控序列如启动子、增强子及决定包装病毒核酸的信号等均有所进展。对于 HBxAg 的反式激活作用, 特别是在肝癌发生机理中的地位已成为研究的热点。以下对上述几方面的进展作一介绍。

二、HBV 的细胞受体

HBV 的包膜由 3 种蛋白组成: 主要蛋白 (或 S 蛋白) 为 226 个氨基酸, 中等蛋白 (S+pre-S₂) 为 318 个氨基酸, 大蛋白 (S+pre-S₂+pre-S₁) 为 489 或 500 个氨基酸。对于 3 种蛋白中何种蛋白或决定簇可吸附于靶细胞受体尚无定论。Pontisso 应用重组表达的 S 蛋白及用 CHO 细胞表达的中等蛋白, 以及用酵母菌表达并自菌体细胞裂解而纯化的重组大蛋白, 分别用 ¹²⁵I 标记后, 与人肝细胞膜作结合试验。结果仅大分子蛋白可直接与肝细胞膜结合。用针对 pre-S₁ 的不同决定簇的单克隆抗体作阻断, 发现一株单抗 (18/7) 可阻断大分子蛋白与肝细胞膜的结合; 另一株单抗 (T0606) 则无阻断作用。结果提示只有 pre-S₁ 的一部分肽决定 HBV 对靶细胞的吸附, 与过去 Neurath 报道的合成肽 pre-S₁ 区第 21~47 位氨基酸决定 HBV 吸附于受体相符。当以肝细胞膜先与聚合人白蛋白 (PHSA) 共同孵育后, 经洗去游离的 PHSA, 再检测对 ¹²⁵I 标记的中等蛋白的吸附, 发现吸附率增加。这一吸附作用可被特异的 pre-S₂ 单抗所抑制。因此认为 pre-S₁ 中的部分肽是直接与靶细胞受体结合的配体, 而 pre-S₂ 中的部分肽则需经 PHSA 介导而吸附于受体。既然这些肽顺序可能与病毒在体内吸附于靶细胞相关, 这些氨基酸顺序很可能与保护免疫有关。

除肝细胞外, 外周血淋巴细胞、B 细胞系、某些肿瘤细胞及 SV40 转化的细胞系也有对 HBV pre-S 的 P21~47 肽的受体。然而在 T 细胞、外周血单个核细胞或前单核细胞系的膜上并无对 pre-S 的 P21~47 受体, 虽然在这些细胞内曾发现有 HBV DNA 或 RNA。为阐明这一现象, Neurath 等用 T 细胞系 HUT-78 与 MOLT-3, 以刀豆蛋白 A 吸附于 pre-S21~49 肽并共价吸附于纤维素表面的复合物进行激活试验, 同时检测这些细胞表面是否存在 HBV 受体。结果发现这些细胞经活化 24h, 受体表达为高峰, 以后随培养时间延长而逐渐减少。为研究是否有些细胞因子的受体参与 pre-S1 与细胞的相互作用, 用 IL-3, IL-5, IL-7, T 细胞生长因子 α 与 β (TGF- α , TGF- β) 阻断 pre-S21~47 肽对 HepG2 细胞的吸附均未成功。然而 IL-6 却能抑制这一吸附作用。抗 IL-6 的单克隆抗体可拮抗 IL-6 的抑制作用。IL-6 与其他细胞因子不同, 不需经前体分子断裂而成, 故仅需经 PH4 处理而自细胞表面解离。用 PH4 处理 HepG2 细胞后, IL-6 可自细胞表面解离, 同时还可失去对 pre-S21~47 的吸附作用。上述结果提示 IL-6 可介导 HBV 吸附于受体, 但是这些结果尚有不能解释的问题, 例如 IL-6 抑制 pre-S21~47 吸附于细胞受体的浓度大大超过生理条件下存在的 IL-6 量, 阻断 HBV 吸附于 HepG2 细胞的 IL-6 量也远远超过占据细胞膜表面的 IL-6 的受体数量。

三、病毒变异株

(一) 前核心基因变异株

Carman 首先报道乙肝患者血清 HBV DNA 在前核心 (pre-C) 基因区存在变异株, 主要类型为第 1896 位或 1899 位核苷酸出现点突变, 鸟嘌呤核苷 (G) 被腺嘌呤核苷 (A) 所取代, 致原来的密码子由 TGG 变为 TAG, 即终止密码子。变异后由于 pre-C 出现终止密码子, 变异株不能转录及翻译 pre-C/C 蛋白, 无 HBeAg 分泌。日本学者通过随访 1~5 年 HBV 感染者, 发现当病毒携带者为 HBeAg 阳性时, 很少或几乎没有克隆出现第 1896 位点突变; 然而当携带者转为血清抗-HBe 阳性时, 57/59 (97%) 的 HBV 克隆均有终止密码突变。我们对 17 名抗 HBe 阳性乙肝患者血清作聚合酶链反应 (PCR), 8 例为阳性, 并且均有第 1896 位的 TGG 转为 TAG 点突变, 其中 2 例患者受变异株与野毒株混合感染。随访 1 年至 1 年半中, 野毒株与变异株的比例可有消长, 反映两种毒株均可增殖, 并可能相互竞争。推测如果野毒株占上风, 则由于可表达 HBeAg, 机体的免疫应答可发挥作用而清除病毒; 如变异株占上风则可能有利于病毒持续。

1991 年日本学者报道 pre-C 区变异株可能与重症肝炎相关, 在欧洲亦有类似发现, 然而 pre-C 变异株与重症肝炎的相关性在我国患者中尚未阐明。美国重症肝炎患者现已确定与变异株无相关性。

迄今, 已报道在我国或华裔乙肝患者的 pre-C 区点突变共有 4 种 (根据 Carman 分类):

- (1) M1: 在第 1856 位出现由胞嘧啶核苷 (C) 转为胸腺嘧啶核苷 (T), 引起脯氨酸转为丝氨酸 (在第 15 位氨基酸)。
- (2) M2: 第 1896 位出现 G→A 突变, 致第 28 位密码子变为终止密码子。
- (3) M3: 第 1898 位出现 G→A 突变, 致第 29 位氨基酸由甘氨酸转为丝氨酸。

(4) M4: 第 1899 位出现 G→A 变异, 因是在突变发生的终止密码子之后, 故不被翻译。

M1 和 M2 是互相排斥的, 而 M3 及 M4 从不独立存在, M3 仅在伴有 M1 时存在, 而 M4 仅在伴有 M2 时存在。

此外, 还发现有 pre-C 区的移码突变及起始密码子变异。有学者曾对 pre-C 区可能发生点突变而导致终止密码子出现的核苷酸进行人工构建点突变, 并分析这些构建的突变体与野毒株在复制能力方面的差异。结果发现 M2 具有与野毒株一样的复制与包装核心壳的活性, 而有些突变体则活性明显低于野毒株, 有时完全失去复制活性, 从而可解释为何 M2 在自然界中占主导地位。Junker-Niepmaun 等曾报道核心 (C) mRNA 的包装是由一小段 cis 作用因子, 在 pre-C 区 3' 的 2/3 和 C 基因的 5' 端所决定。这一小段因子称为 ϵ (包装信号), 由一发夹结构组成, 有 2 个茎、1 个祥和 1 个突起 (bulge)。用构建的点突变体研究发现, 第一个茎处有少量核苷酸变异时, 病毒包装仍能进行; 但在祥和第 2 个茎处发生突变则 ϵ 信号失去包装能力。

(二) 核心基因区变异株

有些 HBV 感染者血清中不出现抗 HBc 或抗 HBe, 从而被认为可能是由与野毒株 (即 HBV 原型或 HBV I 型) 核心基因编码不同蛋白抗原 (HBeAg) 的“HBV II 型”所致。然而用这些“HBV II 型”感染黑猩猩后, 不仅引起典型症状, 还可诱生抗 HBc。本室曾自一份抗 HBc 阴性的 HBsAg 阳性者血清用 PCR 扩增了 pre-C 及 C 区, 作核苷酸序列分析, 证实并无 C 区的变异, 因此证明并不存在“HBV II 型”。感染 HBV 后不产生抗 HBc 的原因很可能是由于感染者的免疫应答异常。

在 C 区也确实存在一些变异。本室曾在一份血清与肝组织配对做 pre-C / C 基因扩增与分析中, 发现 C 起始密码子上游 230 位 nt 突变而构成 Sau3A I 酶切位点增多的变异。也曾发现有 C 区起始密码子由 ATG 突变 CTG 的变异株。美国学者也曾发现 C 基因起始密码子前插入 36 个核苷酸的变异株。但这些变异株的临床意义还未能阐明。

本室在肝癌组织中也曾发现除存在第 28 位密码子点突变外, 核心基因密码子的变异。对 3 份自肝癌克隆的 C 基因分析, 分别有 24, 10, 13 处点突变, 可引起 5, 5, 2 个氨基酸变化。根据已知的 HBcAg 抗原决定簇的分布, 发现有些氨基酸的变化在决定簇区内, 很有可能会引起抗 HBc 不能识别的异常 C 蛋白。

(三) pre-S 基因变异株

Gerken 报道 1 例乙肝感染者经 5 年随访发展为肝癌。应用 PCR 和序列分析, 发现在 9/10 克隆中有 183 个碱基在 pre-S1 区缺失, 及在 pre-S1 和 pre-S2 区有多处点突变, 当 pre-S1 区中编码与肝细胞结合的决定簇依然存在, 但 pre-S2 的启动子区及对 T、B 细胞识别区均缺失时, 病毒仍可吸附, 穿入靶细胞, 但因 pre-S2 区的变异, 导致机体消除病毒的能力下降, 病程转为慢性。在鸭乙肝病毒 (DHBV) 感染肝细胞的模型中发现, pre-S / S 基因的缺失可致闭环型 DHBV DNA 的积聚。近来美国学者还发现存在 pre-S1 缺失及在 pre-S2 起始密码子后出现突变而导致终止密码子的变异。用这些变异株转染细胞, 表达与分泌 S 蛋白明显减弱, 然而用 PCR 检测, 患者血清中仍有少量野毒株存在, 说明变异株可能需伴随野毒株存在。至于这些变异株的存在是否也可引起类似闭环 DHBV DNA 积聚, 并与肝癌的发展相关, 还有待研究。

(四) S 基因变异株

用疫苗免疫婴儿过程中发现, 约 2%~3% 虽经主动加被动免疫, 仍受 HBV 感染, 对其中 1 例作系统的随访, 发现出现了“逃逸变异株”(escape mutant), 在第 145 位氨基酸由甘氨酸变成精氨酸, 从而不能被乙型肝炎疫苗所诱生的抗 HBs 所中和。最近 Howard 等在冈比亚作系列研究, 发现 30/358 (8.3%) 经乙肝疫苗免疫的儿童仍被 HBV 感染而表现为“突破”(breakthrough)。对 1 名抗 HBs 阴性但 HBV 基因组阳性的儿童的 HBV 毒株分析, 发现 S 区第 141 位氨基酸由赖氨酸变为谷氨酸。已知 HBsAg 的“a”决定簇由 139~147 氨基酸所决定, 其中 140~146 为抗 HBs 结合的关键氨基酸, 因此第 141 位氨基酸的变异将使变异株不被常规的抗 HBs 所检出。

(五) P 基因变异株

Blum 曾自 1 例 HBsAg 阴性感染者的肝内克隆出 P 区有变异的 HBV 株。点突变发生于 P 区的 5' 端, 在第 2798 位核苷酸发生 A→C 变异, 并导致苏氨酸变为脯氨酸。对 14 株已被克隆并测序的 HBV 比较, 这一位置的苏氨酸是保守的, 并认为变为脯氨酸后有可能影响病毒前基因组 RNA 的包装。发现这一变异株的复制缺陷可因野毒株共存而被弥补。本室用与这一 P 区互补的合成寡聚核苷酸与野毒株共转染, 发现可显著抑制野毒株的复制, 说明这一区在 HBV 复制中确占重要地位。

四、HBV 编码蛋白的反式激活作用

由 X 基因编码的 HBxAg 共约 154 氨基酸。在 HBV 感染者的血清中可测及抗 HBx, 在肝组织内, 约 40%~50% 的慢性肝炎患者细胞膜可表达 HBxAg, 并可受免疫抗体或细胞的攻击而引起病变。胞浆中存在的 HBxAg 可能干扰蛋白激酶 C 介导的信号传递。用免疫组化也曾发现 HBxAg 存在于细胞核内。在有肝硬化的乙肝患者中约 70% 有肝细胞核内 HBxAg, 但为单纯慢性乙肝的患者中仅约 10% 有核内 HBxAg。这一分布图型似乎与发展成肝癌 (HCC) 有平行关系, 即多数 HCC 发生于肝硬化的基础上。整合 HBV DNA 表达的 HBxAg 可通过反式激活而影响细胞基因的表达。已发现 HBxAg 可以反式激活多种细胞及病毒基因, 包括 HBV 的增强子, HBx 和核心基因的启动子, 单纯疱疹病毒 tk 基因的启动子、 β 干扰素、AP1、AP2、RNA 聚合酶 II 与 III 的启动子。HBxAg 还可反式激活癌基因 c-myc、c-fos 和 I 类 MHC。进一步研究发现 HBxAg 并不是一种与 DNA 结合的蛋白, 而是通过与一种或几种调控转录的细胞蛋白结合。这些研究提示 HBxAg 的反式激活作用依赖于肝细胞的分化程度及细胞周期的不同阶段中这些调控蛋白是否存在。因此 HBxAg 的反式激活作用在无症状携带者中及慢性活动性肝炎和肝硬化患者中可完全不同; 在前一类感染者中的肝细胞分化完全并处于静止期, 与后一类患者中肝细胞分化程度较差且多数处于分裂状态, HBxAg 所起的作用可不相同。HBxAg 的反式激活作用可能通过与转录因子结合而改变其功能, 从而可导致某些生长因子 (如胰岛素样生长因子 II) 或癌基因的过度表达。HBxAg 还可与转录抑制因子结合或与抗癌基因产物结合而使肝细胞生长失控。已证实 HBxAg 与野生型或变异性抗癌基因产物 P53 结合是致 HCC 中的一个重要步骤。将 X 基因与其他 HBV 基因区段比较, 可见 X 基因位于 3' 端, 与致癌逆转录病毒的转化基因位置相似。X 基因所用的密码子与细胞基因相似, 说明 X 基因可能来源于细胞的染色体序列。同

样, DNA 肿瘤病毒的转化基因也是如此。此外还发现 HBV DNA 整合入宿主的染色体时常发生 X 基因 3'端的缺失。这种缺失的 X 因子比野生型基因具有更强的反式激活作用。虽然 HBxAg 是否具有蛋白激酶的作用还未被充分肯定, 但 HBxAg 有结合二价金属离子的顺序, 并可成为双体; 其中的苏氨酸和丝氨酸残基可被磷酸化。

进一步研究提示在 HBV 感染中, 不止一种病毒基因产物可在宿主细胞蛋白表达中起致癌作用。通过对 HCC 中整合的 HBV DNA 分析, 发现可以激活异源基因表达的还有 pre-S2 和 3'端截短的 S 基因。在土拨鼠肝炎病毒 (WHV) 中, 证实 pre-S2 和截短的 S 基因可以使 c-myc 癌基因表达提高 5~50 倍。有意义的是 pre-S2/S 完整基因表达的产物并无此激活作用, 可能是由于 HBV DNA 有缺失或重排, 使整合的 HBV DNA 具有产生新的蛋白的特性, 并具有与完整 HBV DNA 编码蛋白完全不同的生物学活性。

五、基因组中的调控因子

HBV 的基因组虽然很小, 且编码病毒蛋白的基因间有重叠, 但基因组中也有调控因子。HBV 感染时有 4 种不同长度的转录体, 即 3.5kb、2.4kb、2.1kb 和 0.7kb 的 RNA。3.5kb RNA 转录体编码前基因组 RNA, 是病毒 DNA 的复制中间体。3.5kb 的 RNA 也是核心抗原、HBeAg 和 DNA 聚合酶的 mRNA。2.4kb RNA 编码含 pre-S1 的大蛋白; 2.1kb RNA 编码含 pre-S2 的中等蛋白; 0.7kb RNA 编码 X 蛋白。调控因子启动子共有 4 个, 即 cp、spl、xp2、xp, 分别启动 3.5kb、2.4kb、2.1kb 和 0.7kb RNA。此外, 还有一个 GRE (glucocorticoid responsive element, 糖皮质激素反应因子) 存在于编码 S 的基因中, 与一个增强子 I (enhancer I, EN I), 在编码 s 抗原区的下游。由于增强子可以刺激异源启动子的转录, 如整合入细胞染色体又与其它致癌病毒基因或细胞染色体调控细胞生长的基因邻近, 则具有致癌或促癌的潜在能力。EN I 存在于一个 360bp 区内, 不仅当置于转录单位的 5'或 3'均可增强转录, 即使置于转录单位内部也可有增强子活性。EN I 可与 SV40 的增强子/启动子联合作用。多数学者认为 EN I 有肝细胞特异性, 但也有学者认为无细胞种类的特异性。EN I 对 HBV 的启动子均有增强作用, 而 HBxAg 又可反式激活 EN I。

近来又发现了另一增强子 (EN II), 处于 XORF 区内, 在 EN I 下游的 600bp, 通过用不同酶切后分析 EN II 的活性, 发现 1685~1774 及 1647~1774 均有重要的增强子活性。由于 EN II 位于 HBV 基因的 DR₁ 和 DR₂ 间, 又在核心的启动子上游, 是病毒复制重要区, 因此很受重视。EN II 可增强同源或异源的启动子, 并且有细胞特异性。EN II 在 HepG2 (肝癌细胞系) 中有高活性, 但在 HeLa 细胞或猴肾细胞中则无活性。学者分别确定 35bp、88bp 或 147bp 在 EN II 中是关键的因素。通过将 35bp 片段聚合后研究其功能, 发现与 88bp 的作用相同或更强, 说明这一段序列是 HBV EN II 的关键序列。这一新发现的 EN II 可能与 HBV 的复制周期及致病机理有重要关系。

(闻玉梅)

参 考 文 献

- 1 Li ZP, et al. eds. Retrospect and prospect of protein research. New York: World Scientific Press, 1991:79~85
- 2 Vannice JL, et al. J Virol 1988;62:1305
- 3 Feitelson M. Clin Microbiol Rev 1992;5:275
- 4 Neurath AR, et al. J Exp Med 1992;175:461
- 5 Carman WF, et al. Lancet 1989;2:588
- 6 闻玉梅. 中华医学杂志 1990;70:664
- 7 卫 清, 等. 病毒学报 1992;8:91
- 8 Omata M, et al. New Eng J Med 1991;324:1699
- 9 Gerken G, et al. Virology 1991;183:555
- 10 Pontisso P, et al. J Virol 1989;63:1981
- 11 Schodel F, et al. Biotest Bulletin 1990;4:63
- 12 Howard CR, et al. Abstracts of Molecular Biology of Hepatitis Viruses Meetings. 1992:101
- 13 Yee JK. Science 1989;246:658

黄病毒蛋白抗原性的研究进展

黄病毒 (Flavivirus) 是一类单股正链 RNA 病毒, 是通过吸血的节肢动物如蚊、蜱等媒介叮咬敏感的脊椎动物宿主而传播疾病的病毒。黄病毒科包括近 70 种具有抗原交叉反应的病毒, 其中许多黄病毒对脊椎动物宿主均有致病性。现已知道 28 种可引起人类疾病。我国目前已证实的黄病毒有乙型脑炎病毒 (JEV)、森林脑炎病毒 (TBE)、登革热病毒 (DEN)、丙型肝炎病毒 (HCV) 等。由于我国幅源辽阔, 气候及地理条件复杂, 因此, 一定还有许多黄病毒有待发现。

黄病毒可引起多种疾病: 从无并发症的热性病、出血热、休克综合征到肝炎和脑炎等。特别是脑炎和出血热, 致死率很高。但至今对许多黄病毒病仍缺乏安全有效的疫苗。

对黄病毒蛋白抗原结构及其抗原性的研究, 有助于对诱导保护性免疫的抗原决定簇的确定, 有助于了解病毒与宿主细胞相互作用的机理, 为病毒感染的特异诊断、研制有效疫苗和抗病毒药物的设计, 进而为病毒病的预防、控制和治疗提供科学依据。

一、病毒的形态结构及其基因组

黄病毒的毒粒为球形, 直径约为 40~50nm, 含有长约 5~10nm 的表面突起。毒粒的核衣壳直径 25~30nm, 由来自宿主膜的脂双层包绕。成熟毒粒的脂双层中只含有 2 种

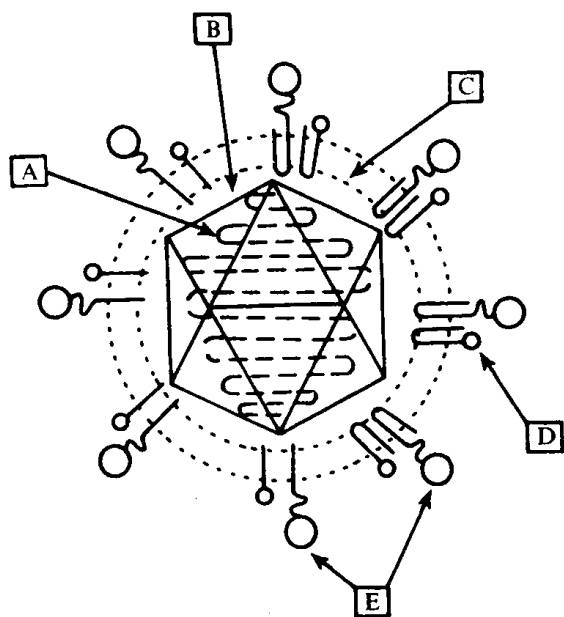


图1 黄病毒颗粒的结构示意图

两种毒粒形式: 右侧含双跨膜多肽; 左侧为单一跨膜多肽。A.病毒 RNA; B.病毒衣壳; C.脂膜; D.膜蛋白; E.包膜蛋白

核苷酸 AC 为末端, 但也有报道 3'端存在 polyA 尾。

结构蛋白: 包膜蛋白 E 及膜蛋白 M。此外, 还有与病毒 RNA 结合的衣壳蛋白 C。毒粒的两种形式尽管在形态上无法区别, 但是细胞内的毒粒 (I 型) 只含有 M 的前体 (prM), 而释放到细胞外的成熟毒粒 (T 型) 只含有 M。因此, prM 的裂解似乎与病毒的释放有关。大多数黄病毒的 E 蛋白均含有糖侧链, 但是也有个别毒株的 E 不含有糖。E 蛋白的糖成分可能与宿主有关。黄病毒颗粒的形态结构见图 1。至今还不清楚 E 蛋白的 C 端是否由双重的类似钩状的膜结构组成, 或是只有一个跨膜结构。

黄病毒的基因组为单股 RNA 分子, 具有感染性, 因此它编码 RNA 复制所必需的病毒蛋白。基因组长约 11kb, 其 5'端有 I 型帽子结构。蚊传黄病毒的基因组 RNA 3'端缺乏聚腺苷酸 (polyA) 尾, 但其末端为保守性二核苷酸 CU。TBE RNA 可能以二

黄病毒基因组的显著特征就是，有一个不同长度的开放性阅读框架 (ORF)，从 DEN-4 的 10 158 碱基 (b) 到 MVE 的 10 302b，编码的聚蛋白为 3 386~3 434 氨基酸。在 ORF 的两侧为 5' 和 3' 非编码区，5' 端长 95~132b；3' 端长约 385~585b。TBE 3' 非编码区长 114b，比任何其它蚊媒黄病毒要短得多。

在长 ORF 中编码蛋白的基因次序为 5' C-prM (M) -E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5 3'。结构蛋白 C (其前体称作锚定 C)，M (前体为 prM) 和 E 基因位于基因组 5' 端 1/4 的序列；其余 3/4 的序列编码非结构蛋白。非结构蛋白包括分子量较大的具有高度保守性的 NS1、NS3 和 NS5，及 4 种分子量较小的疏水性蛋白 NS2a、NS2b、NS4a 和 NS4b (表 1)。

表 1 黄病毒的多肽

蛋白质	分子量 ($\times 10^3$)	糖基化	功 能
结构蛋白			
C	13~16	-	核衣壳蛋白；与病毒 RNA 结合
prM	24~27	+	M 的前体；与毒粒形态发生有关
M	8~8.5	-	膜蛋白；毒粒释放酶？
E	50~59	-	包膜蛋白；产生保护性抗体；与受体结合
非结构蛋白			
NS1	44~49	+	可溶性补结抗原
NS2a	16~21	-	具疏水性；NS1 成熟？
NS2b	12~15	-	具疏水性；蛋白水解酶？
NS3	67~76	-	螺旋酶？蛋白水解酶
NS4a	24~32	-	具疏水性；复制酶？
NS4b	10~11	-	具疏水性；复制酶？
NS5	91~98	-	RNA 聚合酶？

黄病毒聚蛋白前体合成之后，需经过加工才变成单个成熟的病毒蛋白。聚蛋白的加工涉及到宿主和病毒编码的蛋白水解酶，其中包括细胞的信号酶及至少一种病毒特异的蛋白酶。黄病毒蛋白的性质及功能见表 1。

二、黄病毒的抗原关系

通过血凝抑制 (HI) 和中和 (NT) 试验采用多克隆免疫血清对黄病毒进行免疫交叉反应性的研究，确立的抗原关系通常与 E 蛋白有关，因为 E 蛋白是 HI 和 NT 抗体的靶。最初通过 HI 试验证明所有的黄病毒均具有共同的抗原决定簇，但是后来应用交叉中和试验又将黄病毒分为 8 个血清学亚组 (subgroup)，共 66 种病毒 (表 2)，每个亚组则包括了更为密切相关的病毒。原型 YF 病毒由于缺乏足够的 NT 交叉反应性，尚未归于已确定的血清学亚组中。

表 2 黄病毒的抗原分类

亚 组	病 毒 成员数	主要成员	节 肢 媒 介
蜱传脑炎	12	中欧脑炎(TBE-W) 远东脑炎(TBE-FE) 跳跃病毒, Langat, Powassan	T(蜱)
Rio Bravo	6	Rio Bravo	U(未知)
日本脑炎	10	日本脑炎(JE), Kunjin(KUN), Murray Valley 脑炎(MVE), St. Louis 脑 炎(SLE), 西尼罗(WN)	M(蚊)
Tyulenyi	3	Tyulenyi	T
Ntaya	5	Ntaya	M*
Uganda S	4	Uganda S	M
登 革	4	登革 1, 2, 3 和 4 型(DEN1,2,3,4)	M
Modoc	5	Modoc	U
未分组	17	黄热(YF)	M*

* 有的为蚊媒, 有的媒介不明

应用单克隆抗体 (MAb) 研究黄病毒的抗原关系表明, 黄病毒 E 蛋白抗原结构是极为复杂的。采用某些免疫学方法和用 MAb 进行的中和试验, 不但确定了一些过去尚未证实的反应类型, 而且有些反应类型与多克隆血清进行交叉中和试验所划分的亚组不同。甚至某种 MAb 的功能活性对不同型的病毒或毒株都是不同的, 尽管在两种病毒上的表位是相同的。有些抗体只对异源病毒有功能活性 (如中和作用), 而与诱导产生该抗体的同源病毒无活性。因此, 随着 MAb 的应用, 使得人们能更详细地探讨黄病毒之间的抗原关系。

根据不同黄病毒 cDNA 序列所推测的病毒蛋白的氨基酸序列, 可确定某种蛋白序列同源性与抗原关系(表 3)。氨基酸序列的同源性大体上反映了使用多克隆血清进行交叉中和试验所确定的血清学亚组。从表 3 可以看出, 结构蛋白中的 E 具有较高的保守性, 而毒粒内部的 C 蛋白变异较大。

表 3 黄病毒的氨基酸序列同源性

亚组的 比较 ^a	同 源 性 (%)			
	蛋白 ^b	prM-M ^c	M	E
SG1-SG1	86	97	88	96
SG1-SG3	19~25	29~33	25~31	41~44
SG1-SG7	20~28	26~31	20~29	41
SG1-SGY	32~33	33	22~25	45
SG3-SG3	57~72(87)	61~77(91)	61~83(96)	72~83(93)
SG3-SG7	30~40	34~44	29~41	46~53
SG3-SGY	25~29	33~39	35~40	44~46
SG7-SG7	66~68	69~77	59~69	62~69
SG7-SGY	25~29	31~34	37~39	41~46

a. SG1: TBE-W, TBE-FE; SG3: JE, MVE, WN, KUN, SLE; SG7: DEN 1, 2, 4; SGY: YF

b. 括号中的数字代表WN和KUN的同源性数据; c. 除蛋白M外的prM部分

三、黄病毒蛋白的抗原结构

黄病毒的蛋白抗原包括结构蛋白和非结构蛋白，这里主要介绍结构蛋白 E 蛋白和非结构蛋白 NS1 蛋白的抗原结构。

包膜蛋白 E 是主要的结构蛋白，与病毒的许多生物学性质有关，与受体结合，酸性 pH 下对红细胞的凝集作用，诱导保护性免疫应答，成熟病毒颗粒的装配，及膜的融合等。因此，E 蛋白结构组织的阐明及其功能活性区的确定，对了解黄病毒的生物学性质是极为重要的。

近几年相继报道了 YF、JE、MVE 和 TBE 病毒的表位图谱。根据 E 蛋白中所有 12 个高度保守性半胱氨酸及病毒蛋白的亲水性，判定黄病毒成员所共有的结构组织，为详细了解其抗原结构奠定了基础。对 E 蛋白研究的一个重要进展就是它的二维结构模型的建立。该模型的提出主要依据：(1) E 蛋白分子内的二硫桥；(2) 由 MAbs 所确定的 E 蛋白表位的拓扑学和生物学性质；(3) 用蛋白水解酶或化学裂解产生肽段的物理和免疫学特征；(4) 抗体结合部位的测定；(5) 中和逃逸突变株 (neutralization-escape mutant) 核苷酸序列的测定；(6) 抗肽血清与 E 蛋白的反应性。

TBE 病毒 E 蛋白的表位图展示了近 20 种不同表位的血清学特异性，功能活性及拓扑学关系。采用抗体相互阻断进行的研究表明，大部分表位簇集成 3 个主要的抗原区：A、B 和 C。另外还有 3 个单独的表位。这 3 个抗原区对血清学特异性及功能活性并非同源性的。显然在表位水平（即血凝抑制，中和及被动保护）上具有独立的功能活性，并且用不同病毒的 MAbs 所进行的研究发现了不同的组合（如 HI^+ , NT^+ ; HI^+ , NT^- ; HI^- , NT^+ ）。在有的情况下，MAbs 在体内具有保护性，但在体外为非中和性的。A 区特异的中和性及保护性 MAbs 似乎比针对其它部位的 MAbs 具有较高的特异活性。

用 TBE 病毒与其它黄病毒进行的竞争结合试验表明，某些 MAbs 不仅不能被阻断，而且甚至可增强 MAbs 与距离较远的表位结合。这种现象既与抗体亲合力的增加有关，也与功能有关。因为已经证明，在 WN、TBE 和 JE 病毒的中和 / 或被动保护试验中，MAbs 之间具有协同作用。

E 蛋白结构模型与表位模型两者的结合，如前所述是依据表位的结构特征（如对变性作用，酸性 pH 的敏感与否，对完整二硫桥的依赖性），MAbs-逃逸突变株序列的比较分析，免疫反应性片段的 N 端序列分析及二硫桥的分布等。根据这些信息可以得出有关多肽链的折叠情况，并且可把过去提出的病毒蛋白的结构组织扩充为 R1、R2、R3、L1 和 L2 5 个区。

通过表位图谱揭示了 E 蛋白的不同抗原区与其不同结构区相对应（图 2）。至少 A 区的一部分是由相隔一定距离的多肽链组成。该区的表位对酸性 pH 和 SDS 处理具有同样的敏感性。A 区二硫桥所稳定的多肽链部分与黄病毒组反应性表位 A1 和 A2 有关。在用 MAbs A3 挑选的两个 MAbs-抗性突变株（A3a 和 A3b）中发现的氨基酸交换在登革病毒序列中仅相隔 3 个氨基酸，并且靠近一个潜在的糖基化位点。这个位置与 YF 病毒的中和表位的位置相一致，并且介于 DEN-1 病毒氨基酸残基 76 和 93 之间。A 区与病毒感染初期阶段的膜融合作用有关。