

戊型肝炎病毒 IV 型 ORF2 蛋白在汉逊酵母中的表达

Expression of ORF2 Protein of HEV Genotype IV in *Hansenula polymorpha*

苏彩霞^{1*}, 顾美荣¹, 张 萍¹, 金贞姬¹, 孟凡红¹, 陈尔佳¹, 杨 喆¹, 刘 勇², 王佑春³

SU Cai-Xia^{1*}, GU Mei-Rong¹, ZHANG Ping¹, JIN Zhen-Ji¹, MENG Fan-Hong¹, CHEN Er-Jia¹, YANG Zhe¹, LIU Yong² and WANG You-Chun³

1 大连汉信生物制药有限公司技术开发部, 大连 116600

2 中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心, 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 100050

3 中国药品生物制品检定所细胞室, 北京 100050

1 Department of R&D, Dalian Hissen Bio-Pharmaceutical INC., 116600, China

2 National Center for AIDS/STD Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China

3 National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China

摘 要 为了寻求新型表达系统来研制戊型肝炎基因工程疫苗, 利用甲基营养型汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)系统表达戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus, HEV)IV 型结构区 ORF2 编码蛋白第 112-607 氨基酸片段。为实现目的基因在汉逊酵母中的高效表达, 根据汉逊酵母偏爱密码子优化设计目的基因, 用搭桥 PCR 法合成优化后的基因序列, 并克隆到多拷贝表达载体上, 转化汉逊酵母营养缺陷宿主菌 ATCC2601X(Ura₃⁻)。在选择培养基上培养, 运用 PCR 法筛选得到携带外源基因的重组菌株, 然后用含甲醇的培养基诱导表达, 对表达产物进行 SDS-PAGE、ELISA 和 Western blot 检测和鉴定。SDS-PAGE 实验结果表明目的蛋白分子量约为 56kD, 表达量占菌体总蛋白的 12%。ELISA 检测结果表明表达产物为具有免疫反应性的 HEV ORF2 蛋白, ELISA 效价最高可达 1:2048, 目的蛋白表达量随着基因拷贝数的增加呈升高的趋势; Western blot 鉴别实验结果证实表达产物与 HEV 多抗有特异性抗原抗体结合反应。HEV 结构区 ORF2 蛋白在汉逊酵母中的成功表达, 为研制基因工程戊型肝炎疫苗奠定了基础。

关键词 戊型肝炎病毒, ORF2 基因, 汉逊酵母, 表达, 56kD 蛋白

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)01-0073-06

Abstract Hepatitis E, an acute infectious disease transmitted via the fecal-oral route, is caused by hepatitis E virus. However, no effective treatment currently exists for hepatitis E, and the only epidemic control approach is vaccination. But so far there are no commercial vaccine for hepatitis E available in the world. To find a new expression system to develop recombinant hepatitis E vaccine, in this study the expression system of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* was used to express the gene encoding amino acid 112 - 607 of the open reading frame 2 (ORF2) of hepatitis E virus (HEV) genotype IV. In order to achieve high expression level, the coding sequence was optimized according to codon usage bias of *Hansenula polymorpha* and synthesized through overlapping PCR. Subsequently the gene was subcloned into the multi-copy expression vectors of *Hansenula polymorpha*,

Received: August 28, 2006; Accepted: November 1, 2006.

This work was supported by a grant from Hi-tech Research and Development Program of China ("863 Program").

(No. 2002AA2Z3342) and Dalian Industry Technology Innovation Program.(No. 20050701-30).

* Corresponding author. Tel: +86-411-87407565; Fax: +86-411-87407553; E-mail: sucx@hotmail.com

国家高技术研究与发展计划项目(No. 2002AA2Z3342)和大连市产业技术创新资金项目(No. 20050701-30)资助。

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

which include pDGXHP1.0 (MOX promoter), pDGXHP2.0 (MOX promoter) and pDGXHP2.1 (FMD promoter). The series of one-copy and multi-copy recombinant plasmids were transformed into ATCC26012 (Ura3⁻) by electroporation. The transformants were cultured in selection media MDL and screened for the existence of foreign gene by PCR. Then the strains were induced in MM media and the expression products were detected by SDS-PAGE, ELISA and Western blot assays to select the high-level expression strains. The result of SDS-PAGE showed that the HEV ORF2 expression product was accumulated up to 12% of total cellular protein and its molecular weight is 56kD. The expression product showed high immunoreactivity detected by ELISA and the highest titer is 1:2048. The result of Western blot demonstrated that the expression product could be specifically recognized by the polyclonal antibody against HEV. The successful expression of HEV ORF2 protein in *Hansenula polymorpha* provides foundation for the further development of recombinant subunit vaccine against hepatitis E.

Key words hepatitis E virus (HEV), open reading frame (ORF2), *Hansenula polymorpha*, expression, 56kD protein

戊型肝炎 (Hepatitis E, 简称戊肝 HE) 是一种由戊型肝炎病毒引起的经肠道传播的急性肝炎病, 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]。戊肝流行于世界上许多国家, 最常见于亚洲和非洲一些国家。我国是戊肝主要流行区之一, 以爆发和散发两种形式流行, 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], 而且近年流行呈上升趋势, 因此戊肝严重危害人类健康。由于戊肝病毒尚不能进行有效的体外组织培养, 无法研制传统的减毒疫苗和灭活疫苗, 唯一的疫苗策略是研制基因工程疫苗。

HEV 基因组包含 3 个开放读码框架: ORF1、ORF2 和 ORF3。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, 其中存在多个免疫显性抗原表位及 B 细胞抗原表位, 还存在能产生中和抗体的抗原结合位点, 因此, HEV 基因工程抗原的研制主要集中于 ORF2 蛋白^[1,3,4]。ORF2 已有在原核、昆虫、哺乳动物细胞等表达系统中表达的报道, 表达产物均有一定免疫原性^[5-7]。ORF2 在原核细胞表达时常以包涵体形式存在, 蛋白质很难正确折叠, 无法形成和保持天然的空间构象; 昆虫蛋白本身的异源性也使其作为疫苗开发存在很大困难, 哺乳动物细胞表达系统其主要缺点是成本比较高。因此有必要寻求新型表达系统研制 HEV 基因工程疫苗。

汉逊酵母表达系统是最近 10 年来发展起来的一类可用于表达外源基因特别是真核生物基因的理想系统。汉逊酵母外源基因表达系统具有重组菌的遗传性质稳定、表达量高、表达产物类似于天然蛋白、能保持很好的生物学活性、表达条件易于控制、适于大规模发酵等优点。汉逊酵母是当前国际上公

认的最为理想的外源基因表达系统之一, 许多基因包括在其他系统中难以高效表达的基因已在其细胞中得到高效表达^[8]。我们应用该系统已成功地表达了基因重组乙肝疫苗、基因重组水蛭素等, 乙肝疫苗已成功产业化。但目前国内外尚未见应用汉逊酵母系统表达戊肝 ORF2 的报道。为了探讨戊型肝炎基因工程疫苗生产的新途径, 我们利用甲基营养型汉逊酵母表达系统进行了 HEV ORF2 蛋白表达的初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株: DH5 α 为本室保存, ATCC26012 购自美国菌种保存中心, 汉逊酵母表达载体质粒 pDGXHP1.0、pDGXHP2.0、pDGXHP2.1、ATCC26012 (Ura3⁻) 为本公司自主构建。

1.1.2 工具酶与试剂: 限制性内切酶、PyrobestTM DNA Polymerase、DNA Ligation Kit Ver. 2.1、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0、TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 2.0 等为宝生物工程 (大连) 有限公司产品; 胰蛋白酶、酵母提取物购自 Oxoid 公司; YNB 酵母氮碱购自 Sigma 公司; 其他化学试剂均为国产或进口分析纯产品; HRP 标记抗体购自大连博瑞得公司; HEV 单抗、HEV 羊多抗为中国药品生物制品检定所王佑春研究员惠赠。

1.1.3 引物设计与合成: 根据 HEV ORF2 (112aa—607aa) 基因优化合成方案分段合成正链 27 条引物, 负链 27 条引物, 该 54 条引物由北京三博远志公司合成。构建多拷贝重组质粒引物如下: 引物 A: HEV-Dra I, 5'-GATCTTTAAAAACAAAATGGCCGTGCCCCAGCCC-3', 引入 Dra I 位点; 引物 B: HEV-EcoRI, 5'-CGGAATTCTTAGCGGCCAGGGCAGACTG-3', 引入 EcoRI 位点。用于鉴定转化菌的引物 p1 位于

MOXR(甲醇氧化酶基因启动子) P2 位于 MOXI(甲醇氧化酶基因终止子) P1' 位于 FMDP(甲醛脱氢酶基因启动子) 上的一段序列 , 具体如下 :

P15'-CACGGTGTGACATCATCTAAAGT-3' ;

P25'-TCCTTCCACGTCTCCTTAGTCTG-3' ;

P15'-CGGTATGTCCTTCCACGTCTCCTT-3' ,

以上引物由宝生物工程(大连) 有限公司合成。

1.1.4 培养基 : LB 培养基(0.5% 酵母提取物、1% 蛋白胨、1% NaCl) , YPD 培养基(1% 酵母提取物、2% 蛋白胨、2% 葡萄糖) , MDL 培养基(0.14% YNB、0.5% 硫酸铵、2% 葡萄糖) , MM 培养基(1% 甲醇、0.67% YNB、0.5% 硫酸铵) 。

1.2 方法

1.2.1 HEV ORF2 基因优化 : 基因序列优化原则 : 尽量使用 *Hansenula polymorpha* 最偏爱密码 ; 为了调整整个基因的 GC 含量 , 某些氨基酸使用次偏爱密码 , 但前提是该次偏爱密码与最偏爱密码使用频率非常接近 , 氨基酸序列不变。根据 GenBank 中 AJ272108 提供的基因序列截取 HEV ORF2 中 1488bp 编码 HEV ORF2 氨基酸 112 ~ 607 片段 , 将其进行优化设计。

1.2.2 HEV 基因合成 : 先以优化合成的 54 条引物为模板和引物 , 利用 PCR 搭桥的方法分别以 6 条引物为模板和引物进行分段合成 9 个小片段 a ~ i , 然后再以小片段两两为模板合成片段 ab、cd、ef、gh、i , 依次同样合成大片段 abcd、ef、ghi , 最后将以这三个片段为模板合成整个 HEV ORF2(112aa—607aa) 基因 1515bp , 将 PCR 合成的整个基因产物回收 , 连于 pMD 18-T Simple Vector 转化 DH5 α 提取质粒鉴定正确者送宝生物工程(大连) 有限公司测序。

1.2.3 HEV 重组表达载体的构建 : 以 pMD18-T-HEV 为模板 , 引物 A 和 B 作常规 PCR 扩增到目的片段 , 切胶回收 , 将目的片段酶切连接到单拷贝表达载体 pDGXHP1.0 构建单拷贝重组表达质粒 pDGXHP1.0-HEV , 酶切连接到多拷贝表达载体 pDGXHP2.0(启动子为 MOXP) 和 pDGXHP2.1(启动子为 FMDP) 上 , 通过一系列酶切连接构建二、四、六拷贝的重组表达质粒 pDGXHP2.0-2MOX-HEV、pDGXHP2.1-2FMD-HEV、pDGXHP2.0-4MOX-HEV、pDGXHP2.1-4FMD-HEV、pDGXHP2.0-6MOX-HEV 。

1.2.4 转化酵母细胞筛选多拷贝重组菌株 : 将上述重组表达质粒及 pDGXHP1.0 质粒阴性对照以电转化方法转化 ATCC26012(Ura3-) 宿主菌 , 转化细胞涂于 MDL 平皿上 , 33 $^{\circ}$ C 孵箱培养 1 周 , 将长出的转化

菌落转入 10mL MDL 液体培养基中 33 $^{\circ}$ C 摇床传代培养。传代过程中运用 PCR 的方法筛选重组菌株 , 即取少量的菌体为模板 , 以引物 P1 和 P2 用于鉴定 MOXP 菌株、P1' 和 P2 用于鉴定 FMDP 菌株 , 重组菌株根据转化的质粒命名 , 如 MOXP 为启动子的单拷贝、双、四、六拷贝的重组质粒转化后筛选的重组菌株分别命名为 HP1/MHEV、HP2/MHEV、HP4/MHEV、HP6/MHEV ; 同样以 FMD 为启动子的二、四拷贝的重组质粒转化后筛选的重组菌株分别命名为 HP2/FHEV、HP4/FHEV , 阴性对照菌株命名为 HP/pDGXHP1.0。最后将稳定传代培养 70 ~ 80 代 , 并且经 PCR 筛选为稳定整合有外源基因的重组菌株 , 接入 YPD 培养基中 33 $^{\circ}$ C 摇床培养 , 加入冻存液制成主代种子批于 -70 $^{\circ}$ C 保存菌种。

1.2.5 诱导表达 : 选择生长性能较稳定的重组菌株进行 MDL 培养 , 33 $^{\circ}$ C 摇床培养大约 24h , OD 值长至 15 ~ 18 , 将其离心转接到含有 1% 甲醇的 MM 培养基中经甲醇诱导 72h 后对表达产物进行检测。

1.2.6 表达产物的检测 :

(1) ELISA 检测表达产物活性 :

以双抗体夹心 ELISA 法建立检测表达产物活性的方法 , 步骤如下 : 4 $^{\circ}$ C 包被 HEV 单克隆抗体过夜 ; 0.5% 牛血清白蛋白 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h ; 加入菌体超声破碎上清液(设阳性、阴性、空白对照) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h ; 再加入抗 HEVORF2 羊多克隆抗体 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h ; 然后加入 HRP 标记的兔抗羊 IgG 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h ; 加入 1% TMB 显色 10min , 2mol/L H₂SO₄ 终止作用 , 在酶标分析仪上测定 ELISA 反应各孔 OD_{450nm} 值 , 结果分析 P/N \geq 2.1 , 判为阳性 , 且 A_{450nm} \geq 0.1 , 抗原的最高稀释度为目的蛋白的 ELISA 效价。

(2) SDS-PAGE 检测 :

配制 12% 分离胶 , 6% 浓缩胶 , 样品经 NaOH、SDS Buffer 处理 4 μ L 上样 , 同时点样阳性对照和阴性对照 , 在恒流下 , 12mA 20min , 24mA 1.5h , 电泳完毕 , 取下胶 , 考马斯亮蓝染色 , 凝胶成像系统扫描分析目的蛋白的表达量。

(3) Western blot 鉴定 :

实验步骤如下 : SDS-PAGE ; 电转移至 PVDF 膜 , 以 160mA 的恒定电流转移 2h ; 封闭 : 将转移后的 PVDF 膜置封闭液 PBST 中 37 $^{\circ}$ C 封闭过夜 ; 结合 : 加入羊抗 HEV 多克隆抗体(1 : 500) 作为第一抗体 , 与 PVDF 膜 37 $^{\circ}$ C 结合 2h , 然后加入 HRP-兔抗羊 IgG(1 : 1000) 第二抗体 , 37 $^{\circ}$ C 作用 1h ; OPD 显色直至出现清晰条带 , 去离子水终止反应。

2 结果

2.1 HEV 基因合成

见图 1。

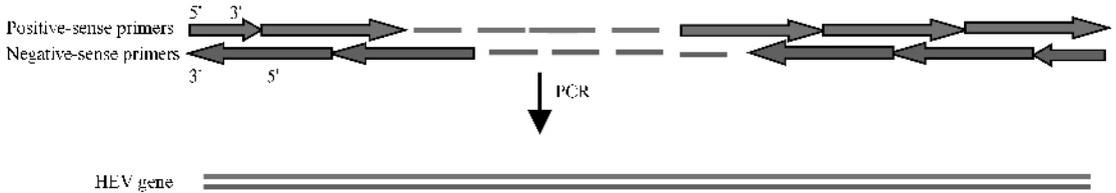


图 1 HEV 基因合成结构示意图

Fig.1 Schematic map of the HEV gene synthesis by overlapping PCR

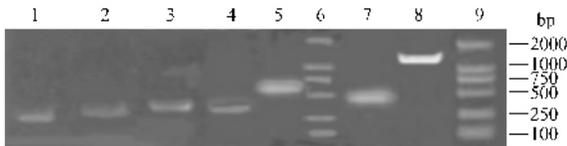


图 2 基因合成中片段和完整基因

PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 Agarose gel analysis of PCR products of

middle fragments and the whole gene

1 : fragment ab (342bp) ; 2 ~ 4 : fragments cd, ef, gh (369bp) ; 5 : fragments abcd (685bp) ; 6, 9 : DNA marker DL2000 ; 7 : fragment ghi (515bp) ; 8 : whole gene (fragment abcdefghi , 1515bp) .

2.2 重组质粒的构建及鉴定

重组质粒每多一个拷贝即在原来基础上多出一个 MOXP-HEV-MOXT 或 FMDP-HEV-MOXT 的结构 , pDGXHP 2.1 与 pDGXHP 2.0 不同点在于前者为 FMDP 启动子 , 后者为 MOXP 启动子 , 其余部分均相同。质粒图谱以 pDGXHP2.0-2MOX-HEV 为例。

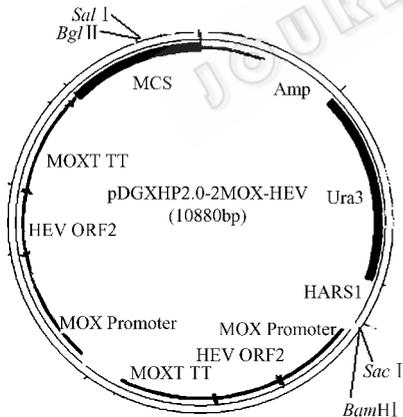


图 3 重组质粒 pDGXHP2.0-2MOX-HEV 的结构示意图

Fig.3 Schematic map of recombinant plasmid pDGXHP2.0-2MOX-HEV

2.3 外源基因整合酵母细胞的鉴定

PCR 引物位于外源基因两端启动子和终止子上 , 扩增目的基因片段大约为 1600bp , 部分 HEV 工程菌 PCR 结果如图 5 所示。

2.4 表达产物的 SDS-PAGE 检测、Western-blot 鉴别和 ELISA 检测结果

选择阴性对照菌株 HP/pDGXHP1.0 和系列重组

菌株 HP/MHEV、HP/2MHEV、HP/4MHEV、HP/6MHEV、

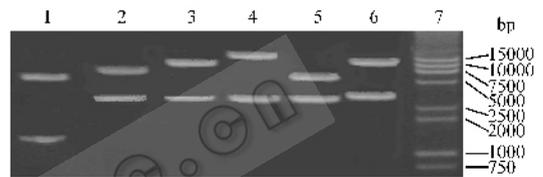


图 4 HEV 系列单、多拷贝重组表达质粒酶切鉴定

Fig.4 Confirmation of one copy and multi-copy of

HEV recombinant plasmids by restriction endonuclease

1 : pDGXHP 1.0-HEV 7380bp (EcoR I / BamH I) ; 2 : pDGXHP 2.0-2MOX-HEV 10880bp (BamH I / Sal I) ; 3 : pDGXHP 2.0-4MOX-HEV 17880bp (BamH I / Sal I) ; 4 : pDGXHP 2.0-6MOX-HEV 24880bp (Bgl II / BamH I) ; 5 : pDGXHP 2.1-2FMD-HEV 9880bp (BamH I / Sal I) ; 6 : pDGXHP 2.1-4FMD-HEV 15880bp (BamH I / Sal I) ; 7 : DNA marker DL15000 .

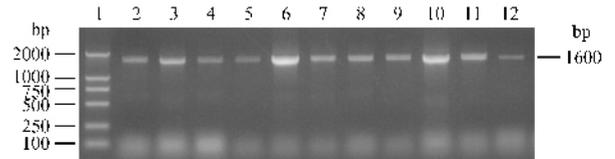


图 5 HEVORF2 重组工程菌 PCR 鉴定结果

Fig.5 Identification of HEV ORF2 recombinant strains by PCR

1 : DNA marker DL2000 ; 2 ~ 12 : HEV ORF2 recombinant strains .

HP/2FHEV、HP/4FHEV 进行诱导培养 72h 后 , 菌体用 NaOH 处理后直接 SDS-PAGE、Western-blot 检测 , 菌体取样进行细胞破碎之后 , 离心取上清进行 ELISA 检测 , SDS-PAGE 结果 (见图 6A) 显示 , 重组菌株表达了分子量大约为 56kD 外源蛋白 , 分子量大小与预期的目的蛋白大小一致 , 凝胶成像系统软件扫描分析结果表明目的蛋白的表达量占菌体总蛋白 12% ; Western-blot 实验结果 (见图 6B) 中只出现了与阳性对照抗原分子量大小一致的特异性反应条带 , 无非特异性反应 , 经过初步 ELISA 检测筛选 , 每一组

不同拷贝的重组菌株中分别挑选一或两株表达量最高的菌株,即 *HP/MHEV-5*、*HP/2MHEV-7*、*HP/4MHEV-9*、*HP/4MHEV-5*、*HP/6MHEV-17*、*HP/2FHEV-3*、*HP/4FHEV-8*, 总共 7 株重组菌株作平行的 ELISA 检测(结果见表 1), 每个样品作梯度稀释测定其效价。结果表明 P/N 值均大于 2.1, 表达产物的 ELISA

效价较高, 六拷贝菌株的 ELISA 效价最高, 其值为 1:2048, 单拷贝菌株的效价与多拷贝菌株相比较低, 其 ELISA 效价值为 1:256, 因此进一步证明表达产物具有高生物活性; 而且目的蛋白的表达量随着基因拷贝数的增加呈升高趋势, 但 MOXP 和 FMDP 两种不同启动子的重组菌株表达量无明显的区别。

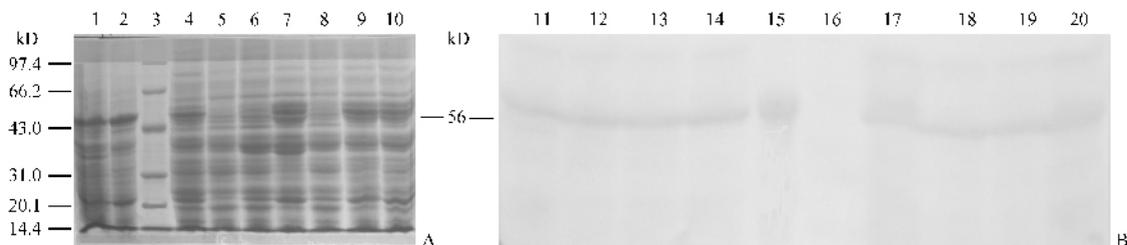


图 6 HEV 重组菌株表达产物 SDS-PAGE 电泳分析(A)和 Western-blot 分析结果(B)

Fig. 6 SDS-PAGE (A) and Western-blot (B) analysis of the expression products of HEV recombinant strains

1、12: *HP/2MHEV-7*; 2、13: *HP/4MHEV-5*; 3: Low molecular weight marker; 4、14: *HP/4MHEV-9*; 5、16: Negative control *HP/pDGXHP1.0*; 6: Recombinant strain before methanol induction; 15: HEV antigen positive control; 7、17: *HP/6MHEV-17*; 8、11: *HP/MHEV-5*; 9、18: *HP/2FHEV-3*; 10、19、20: *HP/4FHEV-8*

表 1 HEV 重组菌株表达产物 ELISA 检测结果

Table 1 The expression products of HEV recombinant strains assayed by ELISA

Sample (sonicate supernatant of strains)	A ₄₅₀	P/N	ELISA Titer
Positive control of HEV antigen	0.912	8.29	1:2000
Negative control of <i>HP/pDGXHP1.0</i>	0.11	—	—
Recombinant strain <i>HP/6MHEV-17</i>	0.961	8.73	1:2048
<i>HP/4MHEV-5</i>	0.832	7.56	1:1024
<i>HP/4FHEV-8</i>	0.824	7.49	1:1024
<i>HP/4MHEV-9</i>	0.820	7.45	1:1024
<i>HP/2MHEV-7</i>	0.761	6.92	1:512
<i>HP/2FHEV-3</i>	0.755	6.86	1:512
<i>HP/MHEV-5</i>	0.625	5.68	1:256

3 讨论

由于缺少稳定可靠的 HEV 体外培养系统, HEV 疫苗的研制受到限制。目前疫苗研究主要集中于 ORF2 编码的重组多肽和蛋白, 多种 ORF2 重组多肽或蛋白已在各种表达系统中获得表达, 但他们的免疫原性和免疫保护性等方面存在很大差异, 其中具有疫苗前景的是选择 ORF2 编码蛋白第 112 - 607 氨基酸大片段^[10], 所以本研究中选择了这一基因片段。

本研究的创新点在于选择了新的表达系统汉逊酵母表达系统, 因为在有关 HEV 基因表达方面的文献中还未见此系统的报道; 而且为了实现 HEV ORF2 基因在汉逊酵母中的高效表达, 我们针对影响产物表达的因素进行了优化设计: 1) 选择了汉逊酵母强启动子 MOXP 和 FMDHP, 在转录水平上提高表达量; 2) 将编码外源基因的密码子优化为汉逊酵母

偏爱密码子, 从翻译水平上提高表达量; 3) 体外构建外源基因高拷贝表达载体, 因为外源基因的拷贝数对其在宿主中的表达量有明显的影响, 这一点在本研究中也得到了验证, 即外源基因表达量随着拷贝数增加有升高的趋势, 实验结果表明经过一系列的优化设计最终获得了高表达重组菌株, 经诱导表达后对表达产物进行检测和鉴定, 结果表明目的蛋白分子量大约为 56kD, 表达量占菌体总蛋白的 12%, 具有免疫反应活性, 定量检测了目的蛋白的 ELISA 效价, 最高可达 1:2048。目前已对重组高表达菌株成功地进行了高密度发酵培养, 正在进行下游纯化工艺的摸索。HEV ORF2 蛋白在汉逊酵母中的成功表达为进一步研制基于 HEV ORF2 抗原大片段的基因工程戊肝疫苗打下了坚实的基础。

REFERENCES (参考文献)

[1] Purcell RH, Emerson SU, Hepatitis E virus, In Knipe DM, Howley PM, Fields Virology, 6th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2001, pp. 165-183.

- 2001, pp.3051 – 3061.
- [2] Zhuang H ,Cao XY ,Liu CB , *et al.* Epidemicology of hepatitis E in China. *Gastroenterologia Japonica* ,1999 ,**36**(suppl3) :135 – 138.
- [3] Khudyakow YE , Favorov MO , June DL , *et al.* Immunodominant antigenic regions in a structural protein of the hepatitis E virus. *Virology* ,1994 ,**198** :390 – 393.
- [4] Zhuang H(庄辉) ,Zhu WF(朱万孚) ,Li F(李凡) , *et al.* Advances of hepatitis E in China. *Chinese Journal Microbiol Immunol*(中华微生物和免疫学杂志) ,1999 ,**19**(5) :448 – 450.
- [5] Purdy MA , Mc Causland KA , Krawczynski K , *et al.* Expression of a hepatitis E virus(HEV)-trpE fusion protein containing epitope recognized by antibodies in sera from human cases and experimentally infected primates. *Arch Virol* , 1992 ,**123** :335 – 349.
- [6] Robison RA , Burgess WH , Emerson SU , *et al.* Structural characterization of recombinant hepatitis E virus ORF2 protein in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expression Purification* , 1998 ,**12** :75 – 84.
- [7] Jameel S ,Zafrullah M ,Ozdener MH , *et al.* Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural elements. *Journal Virology* ,1996 ,**70** :207 – 216.
- [8] Sudbery PE. The Expression of recombinant proteins in yeasts. *Curr. Opin Biotechnol* ,1996 ,**7**(5) :554 – 560.
- [9] CHEN FJ(陈凤菊) ,LU SF(卢善发) ,HU DX(胡敦孝) . Advances in the Expression of Foreign genes in *Hansenula Polymorpha* . *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) , 2001 ,**17**(3) :246 – 249.
- [10] Tsarev SA , Tsareva TS , Emerson SU , *et al.* Recombinant vaccine against hepatitis E : dose response and protection against heterologous challenge. *Vaccine* ,1997 ,**15** :1834 – 1838