新型 HLA-A2 限制的 B, C 型 HBV 特异性 CTL 表位的筛选及鉴定

任玉林^①, 张宇^{②①}, 邱立鹏^①, 张小俊^①, 陈煜^③, 王福生^④, 谢尧^⑤, 高斌^①, 段钟平^{③*}, 孟颂东^{①*}

① 中国科学院微生物研究所, 北京 100101;

② 中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230026;

③ 首都医科大学附属佑安医院, 北京 100069;

④ 中国人民解放军第 302 医院, 北京 100039;

⑤ 北京市地坛医院, 北京 100015

* 联系人, E-mail: mengsd@im.ac.cn; duan2517@sohu.com

2010-03-31 收稿, 2010-05-19 接受

国家自然科学基金(30970146)和国家“十一五”传染病重大专项课题(2008ZX10002-005-3)资助项目

摘要 乙型肝炎病毒(HBV)特异性 CD8⁺ T 细胞(CTL)介导的细胞免疫应答在控制 HBV 感染和病毒清除中至关重要, 已鉴定的 T 细胞表位绝大多数都来自 A, D 基因型的乙肝病毒, 而在我国流行的 B, C 型病毒表位研究较少. 本研究合成重叠九肽肽库, 通过细胞结合试验和体外重折叠实验系统筛选和鉴定 B 型和 C 型 HBV 核心蛋白表位, 发现一个在 60 位氨基酸由 L 变异成 V(L60V)而产生的新表位 HBcAg60-68. 表位肽能在 HLA-A2/K^b 转基因小鼠体内激发特异性 CTL 细胞免疫反应. 检测 HLA-A2 阳性乙肝患者表位特异性 CTL 证明该九肽序列为体内自然加工的表位, 这为研究 HBV 感染中特异性 CTL 免疫应答提供新的依据.

关键词

HBV
表位
突变
HLA-A2/K^b
转基因

目前全球范围内大约有 3.5 亿人感染乙型肝炎病毒(HBV)^[1,2], 在我国约有 9300 万乙肝病毒携带者, 其中 3000 万人为慢性乙肝患者^[3]. HBV 慢性感染可导致肝硬化、肝衰竭和肝癌, 严重威胁人们身体健康^[4]. HBV 抗原特异性 CD8⁺ T 细胞(CTL)介导的细胞免疫应答在控制 HBV 感染和病毒清除、乙肝免疫耐受、免疫逃避以及疾病转归中发挥着重要作用^[5-18]. CTL 所识别的抗原表位存在于 HBV 病毒核心蛋白(C)、外膜蛋白(S)、聚合酶蛋白(P)以及 X 蛋白中, 其中以核心蛋白的抗原性最强, 保守性最好^[16-21]. 通过对急性 HBV 感染者体内 CD8⁺ T 细胞进行分析, 相对于 S 蛋白、P 蛋白以及 X 蛋白来说, 核心蛋白抗原特异性 CD8⁺ T 细胞数最多, 在抑制和清除病毒的免疫应答中可能起主导作用^[22]. 因此, 筛选和鉴定 HBV CTL 表位, 尤其是病毒核心蛋白的 T 细胞表位,

对于检测病毒特异性 CTL 和研究乙肝感染的免疫学机制及免疫治疗有重要意义.

到目前为止, 有 44 个 HBV 特异性 HLA-I 类分子限制的抗原表位(表 S1)和 32 个 HLA-II 类分子限制的抗原表位已经被鉴定^[14,15], 但是这些表位有一定局限性: 绝大多数表位都来自于欧美流行的 A, D 基因型的乙肝病毒, 而在我国流行的病毒基因型多为 B, C 型. 另外这些已经报道的表位大多是依据 HLA 分子限制的表位锚着残基的特点通过软件预测后发现和鉴定的, 难免遗漏一些非典型表位^[14]. HLA-I 类分子限制的表位一般为 8~10 个氨基酸的多肽, 以含 9 个氨基酸的多肽居多. 本研究通过重叠(overlapping)合成的方法合成覆盖 B 型和 C 型 HBV 核心蛋白的 9 个氨基酸的多肽, 系统筛选 HLA-A2 限制的 CTL 新表位, 通过体外重折叠实验及 HLA-A2

英文引用格式: Ren Y L, Zhang Y, Qiu L P, et al. Identification of an HLA-A2 restricted HBcAg-specific T cell epitope derived from HBV genotypes B and C (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2010, 55: 2915—2924, doi: 10.1360/972010-577

转基因小鼠免疫实验验证了该肽是 HLA-A2 限制性的 CD8⁺ T 细胞表位, 并通过比较不同病程的乙肝患者血液中表位特异性 CTL, 初步验证病毒特异性 CTL 在乙肝感染中的免疫学功能.

1 材料与方法

(i) 合成覆盖全 HBV 核心蛋白的九肽. 从 GenBank 搜索所有 B, C 基因型 HBV 核心蛋白(HBc)的基因序列和氨基酸序列, 其中 B 型共 171 个, C 型 159 个, 并用 overlapping 的方法合成覆盖整个蛋白的所有 9 个氨基酸的多肽. 如果 10% 以上的序列在某一氨基酸发生突变, 则另合成包含这一突变位点的多肽. 所有多肽在吉尔生化公司(上海)合成, 总共合成 191 条多肽, HPLC 分析纯度在 90% 以上. B 及 C 型 HBC 核心抗原的氨基酸序列如下: B 基因型乙肝病毒核心抗原氨基酸序列: MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALSPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDPASRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVVRRRGRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSRESQC; C 基因型乙肝病毒核心抗原氨基酸序列: MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALSPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDPASRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVVRRRGRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSRESQC.

(ii) 主要抗体及试剂. FITC 标记的抗 HLA-A2 分子单抗购于北京表源生物技术有限公司. 人的淋巴细胞分离液(Ficoll-PaqueTM PLUS)购自 GE 公司(美国). 其他生化试剂购自 Sigma 公司(美国). 人的 IFN- γ ELISPOT 试剂盒及相关产品购自达科为生物公司(深圳).

(iii) 多肽与 T2 细胞表面的 HLA-A2 分子结合能力的检测. 我们采用经典的 HLA-A2 结合实验^[23]. 实验的原理主要是依据 T2 细胞系的特点, T2 细胞是 HLA-A2 阳性的抗原多肽转运蛋白(TAP)缺陷的淋巴瘤细胞, 故内源性多肽不能经过 TAP 呈递给 HLA-A2 分子, 因此细胞表面空载的 HLA-A2 分子表达极不稳定, 很容易降解或重新回收回到内质网. 而外源加入的抗原肽与 HLA-A2 分子结合后能稳定 HLA-A2 分子的表达, 抗原肽与 HLA-A2 分子的结合能力越强, 则 T2 细胞表面的 HLA-A2 分子表达量就越高. T2 细胞表面 HLA-A2 分子表达量的增加直观地

反映了外来抗原肽与 HLA-A2 分子的结合力. 据报道, 外源多肽与 T2 细胞表面的 HLA-A2 分子结合能力采用荧光指数(FI)来评价^[24-27]. 具体方法如下: 在 96 孔培养板中用无血清的 RPMI 1640 培养 T2 细胞, 加入终浓度为 50 mmol/L 多肽和 3 μ g/mL 的 β 2m 蛋白, 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养 18 h, 然后用 FITC 标记的抗 HLA-A2 分子单抗 BB7.2 染色. 通过 FACS Calibur 流式细胞仪(BD)检测荧光偏移, 与阳性(A 及 D 型 HBcAg18-27 实验组)及阴性对照(不加肽或阴性肽 HBcAg82-90 实验组, 我们选取不加肽作为阴性对照, 实验结果表明这两组实验结果无差异)比较筛选出表位肽. 荧光偏移率用 FI 来计算: FI=(样品肽平均荧光-阴性对照平均荧光)/阴性对照平均荧光, 其中 FI>1 的肽视为阳性肽. 另外, 我们用 MOPC-11 单克隆抗体作为同型控制抗体去染 HBcAg18-27V 和 β 2m 共孵育后的 T2 细胞, 没有发现荧光偏移.

(iv) HLA-A2 分子重链和轻链的表达和包涵体的纯化. 将表达 HLA-A2 分子重链和轻链的菌种分别接种于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素和卡那的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜后, 第二天按 1:100 接种于新鲜 LB 培养基中, 继续培养到对数生长期($A_{600}=0.5\sim0.7$), 1 mol/L IPTG 诱导 8 h. 包涵体的提取参照文献^[28]的方法进行, 具体的操作如下: 6000 r/min 离心收集诱导表达的菌液, 沉淀用 1/10 体积的洗脱液重悬, 在超声波下裂解细胞, 12000 r/min 离心, 去掉上清, 沉淀用悬浮缓冲液洗涤 2 次, 最后, 包涵体用 8 mol 的尿素融解, -80 $^{\circ}$ C 下保存.

(v) HLA-A2 分子与表位肽在体外重折叠实验. 利用大肠杆菌表达 HLA-A2 分子的轻链 β 2m 和重链(37 $^{\circ}$ C, 8 h)均为包涵体. 在含有表位肽和轻链的重折叠缓冲液中逐渐添加 HLA-A2 重链, 然后将浓缩的产物用 Surperdex 200(GE 公司)分子筛分离, 并用 SDS-PAGE 进一步检测.

(vi) HBcAg60-68 突变肽免疫 HLA-A2/K^b 转基因小鼠和脾细胞的分离. HLA-A2/K^b 转基因小鼠^[29]由第二军医大学的曹雪涛教授馈赠. 将转基因小鼠在无特异性病原体的环境中饲养, 通过荧光标记的 anti-HLA-A2 单抗染色法确认转基因小鼠细胞表面 HLA-A2 分子的表达(方法与人 HLA-A2 分型相同). 肽的免疫根据文献^[30]报道的方法进行, 具体操作如下: 先用不完全弗氏佐剂乳化 HBcAg60-68 突变肽、阳性对照肽(HBcAg18-27V), HBcAg60-68 及阴性对照肽

(HBcAg82-90), 然后采用皮下多点注射法免疫小鼠, 每组免疫 5 只, 每只小鼠免疫 50 μg 抗原肽, 体积最多为 200 μL . 每周免疫 1 次, 共免疫 3 次, 第 3 次免疫后的第 7 天杀小鼠分离单个脾细胞. 脾细胞分离的方法如下: 通过颈椎断裂法将小鼠致死, 无菌取出脾脏放在 100 目的铜网中, 用玻璃注射器的末端碾磨脾脏, 收集分离到的单个细胞, 将单个细胞转移到 15 mL 离心管中, 用无血清的培养基将体积调整到 10 mL, 在 1000 r/min 条件下离心, 去掉上清, 然后加入 5 mL 红细胞裂解液, 充分重悬细胞后, 放在室温下 5 min 使红细胞得到充分裂解. 然后立即加入 10 mL PBS, 离心, 去掉上清, 接着用无血清的 RPMI1640 培养基洗 2 次. 最后计细胞数.

(vii) 临床乙肝患者血样的收集. 与中国人民解放军第 302 医院、306 医院、北京市地坛医院、首都医科大学附属佑安医院达成合作协议, 收集急性和慢性乙肝患者新鲜静脉血样, 通过 PCR 扩增并测定 HBc DNA 序列^[31], 挑选 HBc 中第 60 位氨基酸由 L 变异为 V(L60V) 的患者. 其中 6 例急性患者血样中有 3 例患者为 HLA-A2 阳性, 28 例慢性患者中有 14 例 HLA-A2 阳性. 这些慢性患者的 ALT 水平及 HBV DNA 拷贝数有较大差异, 显示其病程不尽相同. HLA-A2 阳性患者的血样用来检测表位特异性 CTL, HLA-A2 阴性患者的血样和健康人的血样用来作为对照. 收集的所有血样都经过医院伦理委员会批准, 并且和患者签订知情同意书.

(viii) PCR 扩增的引物和条件. 用 PCR 扩增的方法鉴定患者感染 HBV 是否有突变. 用于扩增 HBcAg 基因片段的上游引物为: 5'-TGTGTTTACTGAGTGGAGG-3', 下游引物为: 5'-ATAAAGCCCCGTAAAGTTTC-3'. 扩增反应的条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 扩增 30 个循环. 每个循环的条件是: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min.

(ix) 人外周淋巴细胞(PBMC)的分离. 在无菌条件下分离血液中的 PBMC. 等体积的无菌 PBS 与血液混合, 稀释的血液与淋巴细胞分离液按 4:3 的比例将血液沿离心管管壁缓缓加入到淋巴分离液液面上, 室温 400 $\times g$ 离心 35 min, 然后用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 重悬细胞, 室温 100 $\times g$ 离心 10 min, 重复重悬一次. 用细胞计数板计数, 细胞浓度的计算公式为: 实际细胞浓度=(4 个大方格细胞总数/4) $\times$ 稀

释倍数 $\times 10^4$ 个/mL. 最后用 Lympho-SpotTM 无血清培养基(达科为生物公司, 深圳)将细胞调节到需要的浓度备用, 或者用淋巴细胞冻存液冻存(达科为公司; 预实验显示冻存液冻存后复苏成活率>95%, ELISPOT 结果与未冻存相比没有显著差异), 收集齐血样后批量作 ELISPOT 检测. 本研究用到的大部分是患者新鲜的 PBMC.

(x) HLA-A2 的分型. 取出分离的外周血淋巴细胞(PBMC) 1×10^5 个, 用 FITC 标记的 HLA-A2 分子的单抗染色 15 min 后, 用 FACS Calibur 流式细胞仪(BD)检测. 流式结果见图 S1.

(xi) ELISPOT 检测. 乙肝患者 PBMC 中表位特异性 CTL. 按照 ELISPOT 试剂盒的说明书操作. 先用含 10% 胎牛血清的 PRMI 1640 培养基封闭 ELISPOT 预包被板 1 h, 临用前倒掉封闭液, 加入 100 μL 含 1×10^5 的人的 PBMC(直接用新鲜的 PBMC 或者将 PBMC 体外扩增培养 7 d). 实验组中加入 20 $\mu\text{g/mL}$ 的待测表位肽刺激, 阳性对照加入 20 $\mu\text{g/mL}$ 的已知表位 HBcAg18-27, 阳性参照加入 4 $\mu\text{g/mL}$ 的 PHA 进行刺激, 阴性对照加入 20 $\mu\text{g/mL}$ 无关肽(HBcAg82-90). 在细胞培养箱内培养 26~36 h 后, 在每孔中加入 100 μL 预冷的去离子水, 并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 10 min. 倒掉水, 用洗涤液洗涤 5~7 次, 每次放置 30~60 s, 最后一次在吸水纸上扣干. 然后向每孔中加入生物素标记的 anti-IFN- γ 单抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 倒掉液体, 用洗涤液洗涤 5 次, 每次放置 30~60 s, 最后一次在吸水纸上扣干. 加入检测二抗, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 倒掉液体, 用洗涤液洗涤 5 次, 每次放置 30~60 s, 最后一次在吸水纸上扣干. 最后加入显色剂显色 15~30 min, 待出现斑点后立即用自来水冲洗终止反应. ELISPOT 板晾干后用斑点读板仪 CTL-ImmunoSpot[®] S5 Micro Analyzer9(C.T.L 公司, 美国)计数, 并记录斑点的各种参数, 作统计分析.

(xii) ELISPOT 检测转基因小鼠脾淋巴细胞中特异性 CTL. 方法同(xi), 每孔加入 5×10^5 个脾淋巴细胞. 所用的小鼠 IFN- γ ELISPOT 检测试剂盒购于达科为.

2 实验结果

2.1 HBV 核心蛋白来源的多肽与 HLA-A2 分子的结合

将所合成的 191 条覆盖 B 型和 C 型 HBV 核心蛋

白的 9 肽, 在严格控制相同的试验条件前提下, 分别与 T2 细胞及 HLA-A2 分子的轻链 $\beta 2m$ 共孵育后加入 FITC 标记的 HLA-A2 抗体(BB7.2mAb, 北京表源), 最后通过流式细胞仪检测. 我们筛选到 1 个阳性表位肽, 该表位位于 B 型、C 型的 HBV 核心蛋白第 60~68 位氨基酸(HBcAg60-68, VCVGELMNL), 该 9 肽流式检测的荧光结果如图 1(a)所示, 相对于阴性肽, HBcAg60-68 多肽孵育的 T2 细胞荧光明显右移到荧光强度高的区域, 说明该肽能结合并稳定 HLA-A2 分子. 与空白对照、阳性对照(HBcAg18-27V)及阴性无关肽(HBcAg82-90)的 FI 值比较结果见表 1. 如表 1 所示, 阳性对照肽 HBcAg18-27 的 FI 值为 3.86, 阴性对照肽 HBcAg82-90 的 FI 值接近 0, 我们发现的新的表位肽 HBcAg60-68 的 FI 值为 1.25, 明显高于阴性对照肽 HBcAg82-90, 与 HLA-A2 的亲合力介于阳性肽和阴性肽之间. 因此, 通过细胞结合试验初步发现了 HLA-A2 限制的 HBc 蛋白上的一个新表位 HBcAg60-68. 另外 HBcAg18-27V 肽、 $\beta 2m$ 与 T2 细胞共孵育后, 选取 FITC 标记的鼠 IgG(MOPC-11mAb, BD 公司)作为同型控制抗体去染色, 通过流式细胞仪检测, 没有发现荧光偏移(图 1(b)).

我们在 GenBank 上搜索全部 B 型和 C 型 HBV 核心蛋白序列共 330 条, 通过序列比对该表位在第 60 位氨基酸由 L 变异为 V(L60V), 变异率在 B 型和 C 型 HBV 核心蛋白中分别为 12.3%和 9.4%, 而未变异

的序列 LCWGELMNL 不能与 HLA-A2 分子结合(图 1(c)), 所有 D 型 HBV 核心蛋白(共搜索出 183 条序列)该表位均未发生变异.

2.2 多肽表位最小序列的优化

我们通过 T2 细胞结合实验初步筛选到 1 个新的 HBV 表位, 含有 9 个氨基酸, 常见的 CTL 表位含有 8~10 个氨基酸不等. 为了验证我们得到的新表位是否是最优化的序列, 对该 9 肽两端氨基酸延长或截断, 合成了一系列多肽(8 肽或 10 肽): CWGELMNL, VCVGELMN, IVCWGELMNL, VCVGELMNLA 等, 测得的 FI 分别为: 0.05, 0.02, 0.01 和 0.05(图 2), 远小于我们发现的表位“VCWGELMNL”, 因此我们所筛选的表位是最适表位, 多 1 个或少 1 个氨基酸都不能与 HLA-A2 分子结合.

表 1 HBcAg60-68 肽与 T2 细胞表面的 HLA-A2 分子结合能力比较

多肽	平均荧光值 ^{a)}	FI 值 ^{b)}
不加肽	11.14 $\pm$ 0.1021	0
HBcAg18-27	54.25 $\pm$ 0.3214	3.86 $\pm$ 0.029
HBcAg60-68 突变肽	25.03 $\pm$ 0.6364	1.25 $\pm$ 0.057 ^{c)}
HBcAg82-90	10.78 $\pm$ 0.4352	-0.03 $\pm$ 0.039

a) 采用流式细胞检测 T2 细胞表面 HLA-A2 分子的平均荧光值, 数据来自 3 次重复试验的平均值. b) FI=(样品肽平均荧光-阴性对照平均荧光)/阴性对照平均荧光, FI>1 视为阳性肽, 不加肽作为阴性对照. c) 与阴性对照肽 HBcAg82-90 比较, $P<0.01$ (双尾学生 t -检验)

图 1 T2 细胞表面 HLA-A2 与乙肝核心抗原多肽结合实验

T2 细胞(表型为 HLA-A2)首先与 $\beta 2m$ 蛋白以及 HBcAg60-68 突变肽、已知 HLA-A2 表位 HBcAg18-27(阳性对照)、HBcAg82-90(阴性对照)及未突变肽 HBcAg60-68 共孵育, 然后以 FITC 标记的单抗染色检测细胞表面的 HLA-A2 分子. (a) 流式检测结果显示 HBcAg60-68 突变肽对应的荧光值与阳性肽相当而显著高于阴性肽($P<0.01$); (b) FITC 标记的鼠同型对照抗体去染与 HBcAg18-27V 和 $\beta 2m$ 共孵育的 T2 细胞流式检测结果; (c) HBcAg60-68 未突变肽与 HLA-A2 分子没有结合

图2 T2细胞表面 HLA-A2 与多肽 HBcAg60-68 延长或截断序列的结合实验

流式检测结果表明多肽延长或截断序列与 A2 分子的结合与阴性肽 HBcAg82-90 相当, 我们在此处选取截断多肽 HBcAg61-68(CWGE-LMNL)的流式荧光图为例

2.3 HLA-A2 轻链 $\beta 2m$ 、表位肽及 HLA-A2 重链体外重折叠实验

通过体外重折叠试验进一步验证我们新发现的表位. 在体外用多肽 HBcAg60-68 突变肽和 HLA-A2 轻重链包涵体于复性缓冲液中复性, 所得产物通过分子筛及 SDS-PAGE 电泳检测如图 3 所示. 图 3(a) 显示表位肽能与 HLA-A2 轻重链在体外形成复合物(其中箭头所示复合物的蛋白峰), 收集复合物蛋白峰进行 SDS-PAGE 电泳, 证明复合物中含有 HLA-A2 分子的重链和轻链(图 3(b)), 这进一步验证该多肽为

HLA-A2 限制性 CD8⁺ T 细胞表位. 不加肽时, HLA-A2 轻重链包涵体在体外不能形复合物, 其中重链形成沉淀析出, 而只收集到轻链, 如图 3(a)上.

HBcAg60-68 未突变肽(LCWGELMNL)在体外不能与 HLA-A2 轻重链重折叠形成复合物(结果与不加肽的情况类似, 实验结果未显示).

2.4 HBcAg60-68 突变肽能刺激 HLA-A2/K^b 转基因小鼠产生特异性的 CTL

在体外条件下 HBcAg60-68 突变肽可以结合 HLA-A2 分子, 为进一步查明该肽是 MHC I 类分子限制的 CD8⁺ T 细胞表位, 我们进一步做体内实验验证. 用 HBcAg60-68 突变肽免疫 HLA-A2/K^b 转基因小鼠后, 采用 ELISPOT 去检测小鼠体内的特异性 CTL. 用不完全弗氏佐剂乳化肽, 免疫 3 次后取小鼠的淋巴细胞, 用 ELISPOT 试剂盒检测特异性的 CTL, 结果如图 4 所示, HBcAg60-68 突变肽免疫转基因小鼠与 18-27V 一样, ELISPOT 结果产生大量的斑点, 而 60-68 未突变肽及阴性对照肽都几乎没有产生斑点. 突变肽与未突变肽及阴性对照肽比较有显著性差异 ($P < 0.01$). 实验结果说明 HBcAg60-68 突变肽在体内能被呈递给 HLA-A2 分子而诱导产生特异性的 CD8⁺ T 细胞, 而 HBcAg60-68 则不能, 从而我们通过动物试验进一步证实了该肽为 CD8⁺ T 细胞表位.

图3 HBcAg60-68 突变肽的体外重折叠分析

(a) HLA-A2 蛋白重链(Hc)、轻链 $\beta 2m$ 与表位肽 HBcAg60-68 突变肽体外重折叠后, 所形成的复合物经分子筛 Superdex 200 分离纯化, 图中箭头所示为包含 HLA-A2 复合物的蛋白峰; (b) 收集复合物组分进行 SDS-PAGE 电泳分析和考马斯亮蓝染色. 不加肽的重链与轻链体外折叠的分子筛纯化和电泳图见(a)中左上图

图 4 HBcAg60-68 突变肽免疫 HLA-A2/K^b 转基因小鼠 ELISPOT 检测结果

用 HBcAg60-68 突变肽和未突变肽、HBcAg18-27V(PC)及 HBcAg82-90(NC)免疫小鼠, 每组 5 只, 免疫 3 次后取脾淋巴细胞, ELISPOT 检测特异性的 CTL. (a) 各组的斑点图; (b) 斑点数目柱状分析图

2.5 乙肝患者体内表位特异性 CTL 的检测

通过体外和体内试验证实了 HBcAg60-68 突变肽是 HLA-A2 限制性的 CD8⁺ T 细胞表位, 那么在乙肝患者中是否有能检测到该表位特异性的 CTL 呢? 我们通过 HLA-A2 分型检测有突变位点的急性慢性乙肝患者, 共筛选到 HLA-A2 阳性患者 11 例. 选取 HLA-A2 阳性急性乙肝($n=3$)和慢性乙肝($n=11$)患者作为研究组, 随机选取 HLA-A2 阴性的急性乙肝($n=3$)和慢性乙肝($n=3$)患者作为对照组(表 2), 通过 ELISPOT 方法检测患者新鲜血液中表位特异性 CTL, 特异性 CTL 的频率通过计数斑点数量来确定(图 5). 如图 5(a) 所示, 在 3 例急性乙肝患者的 PBMC 中均可检测到高频率的 HBcAg60-68 特异性 CTL, 其特异性 CTL 的数量和文献报道的最常见的优势表位 HBcAg18-27 特异性 CTL 的数量相似(分别为 50 和 41/10⁵ PBMC), 同时并没有检测到无关肽 HBcAg82-90(阴性对照)特异性 T 细胞, 说明 ELISPOT 结果是表位特异的. 另外, 有趣的是, HBcAg60-68 突变肽和肽 HBcAg18-27V 比

阴性对照肽 HBcAg82-90 在 HLA-A2 阴性患者中的特异性 CTL 数量要高, 可能是因为这 2 个 HLA-A2 限制的表位与其他的 HLA-I 类分子中(如 A33, A24 及 A11 等)存在一定交叉反应.

与急性乙肝患者相反, 在大部分慢性乙肝患者($n=8$)的 PBMC 中检测不到 HBcAg60-68 特异性 CTL, 但是有 3 例患者血液中特异性 CTL 数量显著升高($P<0.05$)(图 5(b)), 通过比较这 3 例患者与其他 8 例患者的临床指标发现, 这 3 例患者血液中 ALT 水平和 HBV DNA 水平均较高($P<0.05$), 而且 ALT/AST 比值小于 1(而其他 8 例患者的比值均大于 1), 暗示该表位的特异性 CTL 与慢性乙肝患者病程相关. 所有急性慢性患者(3 例特殊慢性患者除外)表位特异性 CTL 数量的比较见图 5(c), 可以看到乙肝急性患者血液中存在高活性的 HBcAg60-68 特异性 CTL, 相对于急性乙肝患者, 突变肽特异性 CTL 在大多数慢性乙肝患者血液中的数量很低($P<0.01$). 另外, 我们检测了 2 例 HLA-A2 阳性的健康人血液, 通过 ELISPOT 检测

表 2 急、慢性乙肝患者的临床医学指标

	急性乙肝患者		慢性乙肝患者	
	HLA-A2 阳性	HLA-A2 阴性	HLA-A2 阳性	HLA-A2 阴性
患者例数	3	3	14	14
性别(男/女)	2/1	2/1	8/6	10/4
年龄(岁)	32~54	28~57	26~56	32~54
ALT(U/L)	267~469	309~579	18~213	15~78
AST(U/L)	140~345	198~298	26~191	28~94
HBV 型别(B/C)	0/3	1/2	2/12	5/9
HBV DNA(>10 ⁷ DNA 拷贝/ <10 ⁷ DNA 拷贝)	0/3	0/3	3/11	4/10

图5 急性和慢性乙肝患者体内 HBcAg60-68 特异性 CTL 的检测

(a) 急性乙肝患者(3 例 HLA-A2 阳性, 3 例 HLA-A2 阴性)PBMC 直接按 1×10^5 孔接种于 ELISPOT 板, 分别以 HBcAg60-68, HBcAg18-27 (阳性对照, PC)或 HBcAg82-90 (阴性对照, NC)多肽刺激培养, 比较斑点数(左)及斑点所覆盖的面积(右); (b) 慢性乙肝患者 PBMC 的 ELISPOT 检测结果. 上排患者(8 例 HLA-A2 阳性, 3 例 HLA-A2 阴性)血清转氨酶和 HBV DNA 拷贝数较低, 患者 PBMC 分离后直接 ELISPOT 检测(左), 或体外培养 7 d 后检测(右), 下排 3 例患者血清转氨酶和 HBV DNA 拷贝数相对较高; (c) HLA-A2 阳性的急性乙肝(AHB)和血清转氨酶和 HBV DNA 拷贝数较低的慢性乙肝(CHB)患者中 HBcAg60-68 特异性 CTL 数量的比较. ** t 检验 $P < 0.01$

HBcAg60-68 突变肽、阳性及阴性对照肽特异性的 CTL, 结果都几乎没有斑点(结果未显示).

3 讨论

我们通过 T2 细胞结合实验从覆盖 B, C 基因型的 HBV 核心蛋白的九肽库中筛选出了一个新型的 HLA-A2 限制性表位 HBcAg60-68, 并通过对其两端氨基酸延长或截断的方法合成对应的 8 肽及 10 肽证实该 9 肽序列为最适的表位. 通过体外重折叠实验及转基因小鼠体内免疫试验我们进一步验证了该肽为 HLA-A2 限制性的 CD8⁺ T 细胞表位. 最后通过 ELISPOT 检测到 HLA-A2 阳性的急性乙肝患者血液中存在该表位特异性 CTL, 从而证明该 9 肽为体内自然加工的表位.

目前所报道的 HBV 的表位大多是依据 HLA 限制的表位锚着残基的特点用计算机软件协助发现和鉴定的, 这种方法目的性强, 但不可避免的有遗漏, 因为锚着残基特点并不一定准确, 因此我们选取合成重叠肽库的全系统表位分析方法去筛选鉴定 B 及 C 型 HBV 核心抗原特异性 CTL 表位, 力求更全面更准确地筛选鉴定出所有 HLA-A2 限制的 HBcAg 特异性 T 细胞表位. 虽然该筛选表位比较麻烦, 但是能克服传统数学软件预测的局限性. 根据经验, HLA-A2 分子限制性表位的锚着残基的特征是第 2 位为亮氨酸和甲硫氨酸; 第 9 位为缬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、异亮氨酸和亮氨酸^[32,33]. 我们所筛选的表位肽 HBcAg60-68(VCWGELMNL)的第 2 位为半胱氨酸, 不是很符合经典表位序列. 我们用网上的预测表位软件

预测 HLA-A0201 限制性的 B, C 型 HBcAg 表位(8~10 mer), 结果总结见表 3, 我们所筛选的新表位 HBcAg-60-68 的预测分数及排名并不高, 分数比最高分数小很多, 因此用这些软件预测表位时很可能将其漏掉, 但我们的研究表明它是 HLA-A2 限制的表位. 另外用预测软件得到分数较高的序列如 Core118-126, 我们通过结合实验证实和 HLA-A2 没有结合力(数据未显示). 我们新发现的表位 HBcAg60-68 的锚着残基并不符合经典规律, 其他一些研究也发现了类似现象, 除锚着残基外, 多肽的其他残基、多肽构象和蛋白酶切位点均会影响与 MHC-I 类分子的结合^[34~36].

HBV 具有 8 个基因型, 这些基因型之间的核酸序列有很大差异, 可能导致其中表位序列发生突变, 这些突变对原始表位功能具有很大影响, 表现在本来在 1 种 HBV 基因型中的表位肽对应于另 1 种基因型中则丧失表位功能. Bertolotti 等人^[37]发现 I27 突变肽和 HLA-A2 分子的亲和力比 V27 表位下降了 10~20 倍. 新近研究对随机抽取的 105 份中国人 HBV 患者血样进行调查, 93.3% 发生核心蛋白氨基酸第 27 位由 V 突变为 I, 由此可见, 在我国流行的 HBV 病毒株中, HBcAg18-27 序列大部分发生了由 V 到 I 的突变, 而在国外则以 V 为主, 由 V 突变为 I 后, 表位激发 CTL 特异性反应的功能产生很大差异^[38]. 鉴于目前所鉴定的 HBV 表位大多是依据欧美患者, 他们所感染的 HBV 主要是 A 和 D 型基因型, 而在乙肝患者最多的亚洲特别是我国, 流行的 HBV 病毒基因型主要是 B 和 C 型. 因此依据我国人群的特点, 筛选鉴定 B 和 C

型 HBV 特异性 CTL 表位具有现实意义. 我们用 ELISPOT 的方法检测乙肝患者体内的 B 和 C 型 HBcAg60-68 特异性 CTL, 结果显示在急性患者体内该表位与经典表位 HBcAg18-27 特异性 CTL 数量相似, 而在大部分慢性乙肝患者体内特异性 CTL 数量很少, 这和多数文献报道一致, 即抑制和清除 HBV 的能力与病毒特异性 CTL 反应二者之间有很大相关性, 相对于急性 HBV 感染患者体内较强的 CD8⁺及 CD4⁺ T 细胞反应, 在慢性乙肝感染患者中病毒特异性 CTL 反应普遍较弱^[39~41].

我们发现的表位是一个因氨基酸变异而产生的新表位 60V, 该表位在第 60 位氨基酸由 L 变异为 V(L60V), 研究表明未变异的序列 60L 不是 HLA-A2 限制性表位, 该位点在 B 型和 C 型乙肝病毒中的变异率分别为 12.3% 和 9.4%. 已有研究表明 HBV 特异性 T 细胞表位区域的氨基酸突变直接影响到免疫应答, 在对慢性乙肝患者病毒突变长达 17 年的跟踪检测发现, 病毒在 T 细胞表位区域的突变率明显高于非表位区, T 细胞表位突变与宿主 ALT 水平及免疫耐受有直接的关系^[42]. 突变可能使原来的 T 细胞表位突变为非表位而使其激活表位特异性 CTL 的功能丧失而引起免疫耐受. 同样由于突变而产生的新的表位则引发宿主突破免疫耐受而进入免疫激活状态. 因此, 查明该位点的变异引发的 HBV 特异性 CTL 免疫应答的改变乃至对感染病程的影响, 可为进一步研究 HBV 感染的 T 细胞免疫调控机制和临床转归提供新的依据.

表 3 常用的预测表位软件对 HBcAg 上 HLA-A2 限制性表位的分析

表位预测软件	HBcAg60-67 预测的分数	在所有预测表位中的排名	最高的分数/对应的预测表位	表位预测服务网站
BIMAS	4.5	13	1300/Core118-126	http://www.bimas.cit.nih.gov
SYFPEITHI	18	18	26/Core 100-108	http://www.syfpeithi.de
NetMHC3.0	0.170	21	0.818/Core118-126	http://www.cbs.dtu.dk

致谢 感谢高斌教授实验室崔红莲老师在体外重折叠实验过程中的悉心帮助与指导, 感谢中国人民解放军 302 医院福军亮老师协助收集血样.

参考文献

1 Lai C L, Ratziu V, Yuen M F, et al. Viral hepatitis B. *Lancet*, 2003, 362: 2089—2094
2 Reyes-del Valle J, Hodge G, McChesney M B, et al. Protective anti-hepatitis B virus responses in rhesus monkeys primed with a vectored measles virus and boosted with a single dose of hepatitis B surface antigen. *J Virol*, 2009, 183: 9013—9017
3 Lu F, Zhang H. Prevention of hepatitis B in China: Achievements and challenges. *Chin Med J*, 2009, 122: 2925—2927
4 Chisari F V, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13: 29—60

- 5 Webster G, Bertoletti A. Quantity and quality of virus-specific CD8 cell response: Relevance to the design of a therapeutic vaccine for chronic HBV infection. *Mol Immunol*, 2001, 38: 467—473
- 6 石统东, 边疆, 万瑛, 等. 乙型肝炎病毒 HBcAg 免疫优势 CTL 表位多肽在 HBV 转基因小鼠体内的免疫学功能研究. *免疫学杂志*, 2003, 3: 186—196
- 7 周最明, 郭亚兵, 骆抗先, 等. HLA-肽复合物研究 HBV/C 区变异对 HLA-A2 限制性表位的影响. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11: 438
- 8 王洪, 周吉军, 夏杰, 等. 抗原表位特异性 CTL 在慢性 HBV 感染肝损伤和抗病毒中的作用研究. *世界华人消化杂志*, 2005, 13: 1030—1033
- 9 石统东, 吴玉章, 周伟, 等. 基于 HBV 核心抗原 CTL 表位的治疗性多肽在体诱导抗原特异性细胞免疫应答的研究. *第三军医大学学报*, 2002, 10: 1169—1172
- 10 Webster G J, Reignat S, Brown D, et al. Longitudinal analysis of CD8⁺ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: Implications for immunotherapy. *J Virol*, 2004, 78: 5707—5719
- 11 Westover K M, Hughes A L. Evolution of cytotoxic T-lymphocyte epitopes in hepatitis B virus. *Infect Genet Evol*, 2007, 7: 254—262
- 12 Tan A T, Loggi E, Boni C, et al. Host ethnicity and virus genotype shape the hepatitis B virus-specific T-cell repertoire. *J Virol*, 2008, 82: 10986—10997
- 13 Tsai S L, Sheen I S, Chien R N, et al. Activation of Th1 immunity is a common immune mechanism for the successful treatment of hepatitis B and C: Tetramer assay and therapeutic implications. *J Biomed Sci*, 2003, 10: 120—135
- 14 Desmond C P, Bartholomew A, Gaudieri S, et al. A systematic review of T-cell epitopes in hepatitis B virus: Identification, genotypic variation and relevance to antiviral therapeutics. *Antivir Ther*, 2008, 13: 161—175
- 15 薛皓, 张颖倩, 薛付忠, 等. 乙型肝炎病毒多表位疫苗的研究进展及现有的常用表位. *预防医学论坛*, 2008, 14: 1153—1159
- 16 Barnaba V, Franco A, Alberti A, et al. Recognition of hepatitis B virus envelope proteins by liver-infiltrating T lymphocytes in chronic HBV infection. *J Immunol*, 1989, 143: 2650—2655
- 17 Hwang Y K, Kim N K, Park J M, et al. HLA-A2 1 restricted peptides from the HBx antigen induce special CTL responses *in vitro* and *in vivo*. *Vaccine*, 2002, 20: 3770—3777
- 18 Thimme R, Chang K M, Pemberton J, et al. Degenerate immunogenicity of an HLA-A2 restricted hepatitis B virus nucleocapsid cytotoxic T-lymphocyte epitope that is also presented by HLA-B51. *J Virol*, 2001, 75: 3984—3987
- 19 Sobao Y, Sugi K, Tomiyama H, et al. Identification of hepatitis B virus-specific CTL epitopes presented by HLA-A*2402, the most common HLA class I allele in East Asia. *J Hepatol*, 2001, 34: 922—929
- 20 Nayersina R, Fowler P, Guilhot S, et al. HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J Immunol*, 1993, 150: 4659—4671
- 21 Hwang Y K, Kim N K, Park J M, et al. HLA-A2 restricted peptides from the HBx antigen induce specific CTL responses *in vitro* and *in vivo*. *Vaccine*, 2002, 20: 3770—3777
- 22 Bertoletti A, Gehring A J. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol*, 2006, 87: 1439—1449
- 23 Renner M, Claesson M H, Bregenholt S, et al. An improved method for the detection of peptide-induced upregulation of HLA-A2 molecules on TAP-deficient T2 cells. *J Exp Clin Immunogenet*, 1996, 13: 30—35
- 24 Gricks C S, Rawlings E, Foroni L, et al. Somatically mutated regions of immunoglobulin on human B-cell lymphomas code for peptides that bind to autologous major histocompatibility complex class I, providing a potential target for cytotoxic T cells. *Cancer Res*, 2001, 61: 5145—5152
- 25 Kuzushima K, Hayashi N, Kimura H, et al. Efficient identification of HLA-A*2402-restricted cytomegalovirus-specific CD8(+) T-cell epitopes by a computer algorithm and an enzyme-linked immunospot assay. *Blood*, 2001, 98: 1872—1881
- 26 Passoni L, Scardino A, Bertazzoli C, et al. ALK as a novel lymphoma-associated tumor antigen: Identification of 2 HLA-A2.1-restricted CD8⁺ T-cell epitopes. *Blood*, 2002, 99: 2100—2106
- 27 Jaramillo A, Narayanan K, Campbell L G, et al. Recognition of HLA-A2-restricted mammaglobin-A-derived epitopes by CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 2004, 88: 29—41
- 28 Garboczi D N, Hung D T, Wiley D C. HLA-A2-peptide complexes: Refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 3429—3433
- 29 Vitiello A, Marchesini D, Furze J, et al. Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex. *J Exp Med*, 1991, 173: 1007—1015
- 30 Yasutomi Y, Palker T J, Gardner M B, et al. Synthetic peptide in mineral oil adjuvant elicits simian immunodeficiency virus-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys. *J Immunol*, 1993, 151: 5096—5105
- 31 Meng S D, Song J, Rao Z, et al. Three-step purification of gp96 from human liver tumor tissues suitable for isolation of gp96-bound peptides. *J Immunol Methods*, 2002, 264: 29—35
- 32 Denkberg G, Klechevsky E, Reiter Y. Modification of a tumor-derived peptide at an HLA-A2 anchor residue can alter the conformation of the MHC-peptide complex: Probing with TCR-like recombinant antibodies. *J Immunol*, 2002, 169: 4399—4407
- 33 Lekka E, Gritzapis A D, Perez S A, et al. Identification and characterization of a HER-2/neu epitope as a potential target for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59: 715—727

- 34 Doytchinova I A, Guan P, Flower D R. Quantitative structure-activity relationships and the prediction of MHC supermotifs. *Methods*, 2004, 34: 444—453
- 35 Lü Y, Ruan Z, Wang L, et al. Identification of a novel conserved HLA-A2-restricted epitope from the spike protein of SARS-CoV. *BMC Immunol*, 2009, 10: 61
- 36 Kopycinski J, Osman M, Griffiths P D, et al. Sequence flexibility of the immunodominant HLA A*0201 restricted ppUL83 CD8 T-cell epitope of human cytomegalovirus. *J Med Virol*, 2010, 82: 94—103
- 37 Bertoletti A, Costanzo A, Chisari F V, et al. Cytotoxic T lymphocyte response to a wild type hepatitis B virus epitope in patients chronically infected by variant viruses carrying substitutions within the epitope. *J Exp Med*, 1994, 180: 933—943
- 38 Liu H G, Chen W W, Zhen P F, et al. The high prevalence of the I27 mutant HBcAg18-27 epitope in Chinese HBV-infected patients and its cross-reactivity with the V27 prototype epitope. *Clin Immunol*, 2007, 125: 337—345
- 39 Jung M, Hartmann B, Gerlach J, et al. Virus-specific lymphokine production differs quantitatively but not qualitatively in acute and chronic hepatitis B infection. *Virology*, 1999, 261: 165—172
- 40 Jung M, Spengler U, Schraut W, et al. Hepatitis B virus antigen-specific T-cell activation in patients with acute and chronic hepatitis B. *J Hepatol*, 1991, 13: 310—317
- 41 Thimme R, Wieland S, Steiger C, et al. CD8⁺ T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol*, 2003, 77: 68—76
- 42 Wang Y H, Chien M H, Huang H P, et al. Distinct hepatitis B virus dynamics in the immunotolerant and early immunoclearance phases. *J Virol*, 2010, 84: 3454—3463

Identification of an HLA-A2 restricted HBcAg-specific T cell epitope derived from HBV genotypes B and C

REN YuLin¹, ZHANG Yu^{1,2}, QIU LiPeng¹, ZHANG XiaoJun¹, CHEN Yu³,
WANG FuSheng⁴, XIE Yao⁵, GAO Bin¹, DUAN ZhongPing³ & MENG SongDong¹

¹Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

³Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

⁴302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China;

⁵Beijing Ditan Hospital, Beijing 100015, China

Hepatitis B virus (HBV)-specific CD8⁺ T lymphocytes (CTL) play a major role in the control and clearance of HBV infection. However, the majority of human leukocyte antigen (HLA) class I restricted epitopes have been defined in HBV genotypes A and D, but definitions are lacking in genotypes B and C, which are prevalent in China. In this study, the overlapping 9-mer peptide pools were used to screen and identify genotypes B- and C-derived HBcAg-specific T cell epitopes by HLA stabilization assays and *in vitro* re-folding assays. We identified a new epitope derived from a leucine to valine mutation at position 60 of the core protein (L60V). This epitope can elicit CTL responses in HLA-A2/K^b transgenic mice. The defined HBV epitope was further characterized by investigating specific CTL responses in HLA-A2 positive patients with acute and chronic hepatitis B, indicating that the T cell epitope was naturally processed. These findings will provide a basis for the analysis of CTL responses in patients with HBV infection.

hepatitis B virus, epitope, mutation, HLA-A2, CTL, HLA-A2/K^b transgenic mice

doi: 10.1360/972010-577

补充材料

表 S1 已鉴定的 HLA-I 类分子限制性 HBV 表位

图 S1 流式细胞术鉴定 HLA-A2 阳性的乙肝病人

本文的以上补充材料见网络版 csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

图 S1 流式细胞术鉴定 HLA-A2 阳性的乙肝病人

表 S1 已鉴定的 HLA-I 类分子限制性 HBV 表位

表位依据基因阅读框的残基位点	残基位置(依据标准的命名)	氨基酸序列	HLA ^a	研究的病人来源
Envilope				
preS1 21-28	—	PLGFFPDH	A11	Vac PBL
PreS2 1-15	—	MQWNSTALH QALQDP	A3	CHB LIL
PreS2 12-20	—	LLDPRVRGL	A2	CHB PBL
PreS2 44-53	—	SILSKTGDPV	A2	AHB PBL
S 14-22	—	VLQAGFFLL	A2	AHB PBL
S 20-28	—	FLLTRILTI	A2	AHB PBL
S 41-49	—	FLGGTPVCL	A2	AHB PBL
S 88-96	—	LLCLIFLLV	A2	AHB PBL
S 95-104	—	LVLLDYQGML	A2	CHB PBL
S 97-106	—	LLDYQGMLPV	A2	AHB PBL
S 150-158	—	IPISSWAF	B7	AHB PBL
S 172-180	—	WLSLLVPFV	A2	AHB PBL
S 185-194	—	GLSPTVWLSV	A2	AHB PBL
S 207-216	—	SIVSPFIPLL	A2	AHB PBL
S 208-216	—	ILSPFLPLL	A2	CHB PBL
Precore				
	core			
Precore 40-56	Core 11-17	ATVELLSFLPSDFFPSV	A2	AVH PBL
Precore 47-56	Core 18-27	FLPSDFFPSV	A2	AHB PB
Precore 48-56	Core 19-27	LPSDFFPSV	B51	CHB PB

Precore 117-125	Core 88-96	YVNVNMGLK	A11	CHB LIL
Precore 136-144	Core 107-115	CLTFGRETV	A2	AHB PBL
Precore 144-153	Core 115-124	VLEYLVSGV	A2	CHB PBL
Precore 146-153	Core 117-125	EYLVSGVW	A24	AHB PBL
Precore 168-177	Core 139-148	ILSTLPETTV	A2	CHB PBL
Precore 170-180	Core 141-151	STLPETTVVRR	A3	AHB PBL
Polymerase	Polymerase			
Pol 49-57	tp 49-57	NVSIPWTHK	A3	AHB PBL
Pol 57-65	tp 57-65	KVGNFTGLY	A3	AHB PBL
Pol 63-71	tp 63-71	GLYSSTVPV	A2	AHB PBL
Pol 152-161	tp 152-161	TLWKAGILYK	A3	AHB PBL
Pol 367-376	rt 18-27	TPARVTGGVF	B7	AHB PBL
Pol 390-399	rt 41-50	LVVDFSQFSR	A3	AHB PBL
Pol 455-463	rt 106-114	GLSRYVARL	A2	AHB PBL
Pol 533-541	rt 184-192	SAICSVVRR	A3	AHB PBL
Pol 551-559	rt202-210	YMDDVVLGA	A2	AHB PBL
Pol 575-583	rt 226-234	FLLSLGIHL	A2	AHB PBL
Pol 655-663	rt 306-314	ALMPYACI	A2	AHB PBL
Pol 667-676	rt 318-327	QAFTFSPTYK	A3	AHB PBL
Pol 756-764	rh 63-71	KYTSPWLL	A24	AHB PBL
Pol 773-782	rh 80-89	ILRGTSFVYV	A2	AHB PBL
Pol 816-824	rh 123-131	SLYADSPSV	A2	AHB PBL
X-protein				
HBx 52-60	—	HLALRGLFV	A2	CHB PBL
HBx 92-100	—	VLHKRTLGL	A2	CHB PBL
HBx 99-108	—	GLSAMSTTDL	A2	CHB PBL
HBx 115-123	—	CLFKDWEEL	A2	CHB PBL
HBx 133-131	—	VLGGCRHKL	A2	CHB PBL