

317—322

丙型肝炎病毒核心抗原高效表达 及产物抗原性的研究

张庶民 祁自柏 刘克 李河民 R373.21

(中国药品生物制品检定所,北京100050)

A

提要 用含谷胱甘肽转硫酶(GST)基因的 pGex-2T 为表达载体在大肠杆菌中高效表达了含 HCV 核心区部分基因片段(约122个氨基酸)的融合蛋白,表达产物 C₂₇经测定占菌体总蛋白的30%,C₂₇纯化后,用我国 HCV 诊断试剂第二代血清参考品为标准与 C₁₁核心抗原进行比较,结果显示二者具有相同的总体检出率和近似的抗原活性.因此,推测表达的部分区段基因可能是核心区重要功能区域.另外融合蛋白对提高重组蛋白的抗原活性和分离纯化等均有一定作用.

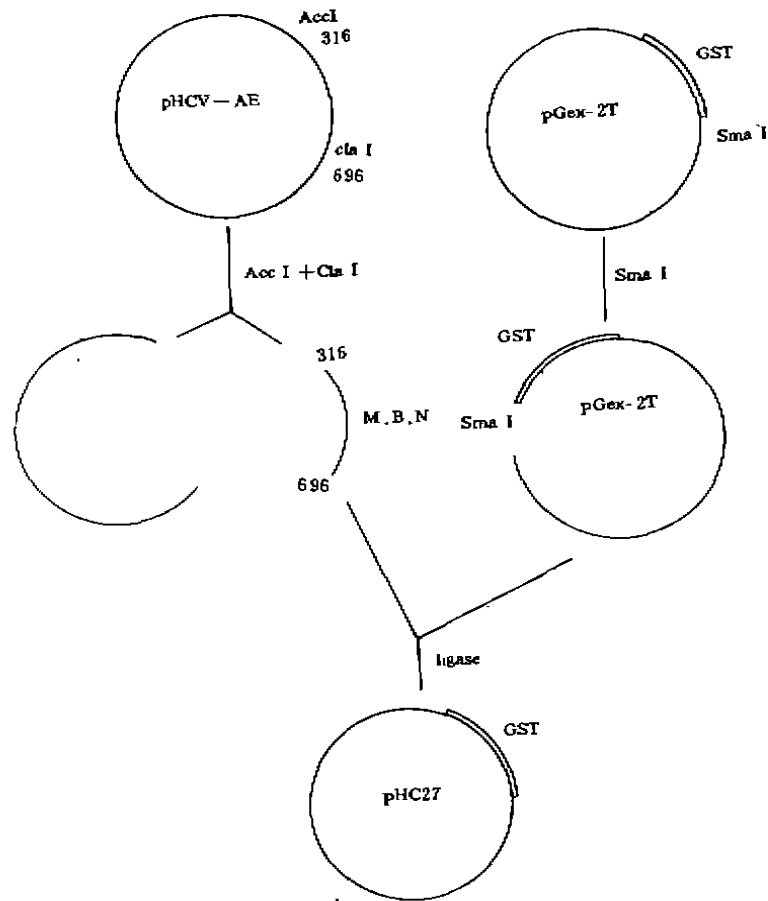
关键词 丙型肝炎病毒,核心区,抗原,表达 核心抗原

丙型肝炎病毒(HCV)核心区抗原蛋白,不仅能够早期检测出 HCV 感染,而且对提高 HCV EIA 诊断试剂的灵敏度有重要作用^[1].目前,国内已有成功获得 HCV 核心抗原的报道^[2,3].国外试剂中,已在使用且质量较好的核心区抗原有日本东燃公司的 C₁₁抗原和美国 Abbott公司的 C₂₂抗原.本研究用含谷胱甘肽转硫酶(GST)基因的 pGex-2T 为表达载体,利用大肠杆菌系统融合表达了 HCV 核心区部分基因片段,并利用国家 HCV 诊断试剂第二代参考品对纯化后抗原的活性进行研究和比较.

材料与amp;方法

- 1 基因片段、表达质粒和宿主菌** 基因片段 pHCV-E 是从216 nt 至755 nt,由我所工作人员刘克在美国从中国人血清中克隆,详情请参阅文献^[4].表达质粒 pGex-2T 购自 Pharmacia 公司,宿主菌 *E. coli*: 06由巴斯德研究所惠赠.
- 2 工具酶、层析介质及所用试剂** 分别购自 Promega, Pharmacia, Serva Sigma 及北京化工厂和协和友谊开发公司.
- 3 基因重组,SDS-PAGE 电泳,免疫印迹及 EIA 方法检测** 均按文献^[5]进行.
- 4 表达载体构建及重组蛋白的诱导表达** 用 AccI, clal 酶切 pHCV-E,回收316~696 nt 的小片段,用修饰酶切平两端后,插入用 SmaI 切开的 pGex-2T 表达质粒(如图1),转入宿主菌,筛选后,接种于新鲜 LB-胍苄(含 0.1 mg/ml 胍苄)培养基中,37℃振荡培养过液后,1:10稀释于新鲜 LB-胍苄培养基,37℃振荡培养1小时,加入 IPTG(终浓度0.1 mmol/L)诱导7小时,离心收集菌体.

本文于1995年1月16日收到,5月10日修回

图1 表达质粒 pHC₂₇ 构建图Fig. 1 The construction of the expression plasmid pHC₂₇

5 表达蛋白纯化 沉淀后菌体用 PBS (pH7.3) 洗三次, 悬浮振荡洗涤后, 于4℃离心洗涤悬液, 弃上清, 沉淀菌体再用 PBS 悬浮, 振荡洗涤, 然后离心, 如此反复洗涤三次。洗涤后菌体悬浮于适量裂解液中 (20%蔗糖, 50 mmol/L Tris·HCl, 10 mmol/L EDTA, 0.85% NaCl, 1 mmol/L PMSF, pH7.3), 室温静置10分后, 冰浴超声破碎菌体。然后于4℃高速离心15分钟, 将上清液弃掉, 沉淀分别用含1% Triton X100和3 mol/L 尿素的洗液洗涤, 洗涤方法同上。洗涤悬液于4℃高速离心, 弃上清, 沉淀用含8 mol/L 尿素的溶液溶解。然后分别用离子交换 (DEAE) 和分子筛 (S-200) 柱层析纯化。纯化后重组蛋白浓缩后待用。用激光扫描仪测定纯化后蛋白的 SDS-PAGE 电泳图, 显示其纯度达到95%。

6 纯化抗原的 EIA 检测 纯化表达抗原与 C₁₁ 抗原 (全核心基因的重组抗原, 购自北京生研所, 由日本东燃公司生产, MW=19 kD) 分别包被 Nunc 板 (丹麦), 每孔 0.1 μg 蛋白, 制成单片段抗 HCV 抗体检测试剂, 分别检测我所研制的第二代 HCV-EIA 诊断试剂参考血清^[6], 并计算阴性均值 (\bar{N}_2) 和 SD 值, Cut off 值以 $\bar{N}_2 + 2SD$ 计算。OD 值 \geq Cut off 值定为阳性。抗原活性强弱以 Cut off 指数 S/C 值和 \bar{P}/\bar{N} 值表示, 值越高, 活性越好。

结 果

1 重组融合蛋白 C₂₇ 的表达及免疫印迹确证

工程菌用 IPTG 诱导表达后,取适量菌液离心,沉淀菌体用 SDS-PAGE 电泳,考马氏亮兰染色。结果发现诱导后工程菌较对照菌体多一条蛋白带,分子量约为 39kD,与理论推导重组蛋白分子量(13kD+26kD,26kD 为 GST 分子量)相符(如图 2)。将其命名为 C₂₇,经用激光扫描仪扫描测定,C₂₇ 约占菌体总蛋白量的 30%(如图 3)。利用免疫印迹(Western Blotting)对其活性进行检测,发现此蛋白能特异地与 HCV 感染血清反应而不与非 HCV 感染血清反应(图 4)。说明表达蛋白具有 HCV 抗原活性。免疫印迹中出现的低分子小带推测是大肠杆菌蛋白与人血清交叉反应引起的非特异反应。

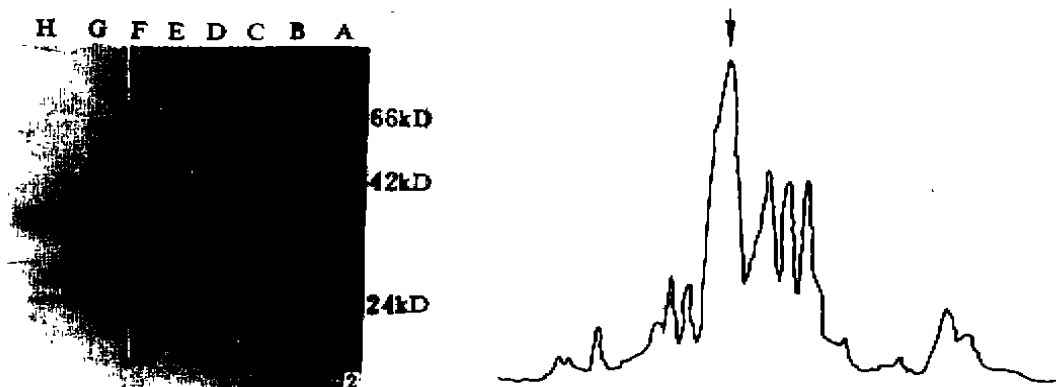


图2 表达蛋白 C₂₇ 的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 2 Analysis of the recombinant C₂₇ by SDS-PAGE

A: Marker B: E. coli control
C: pGex plasmid control D: pHC₂₇ plasmid
E: The supernatant F: The sediment
G: the washed inclusion body H: The purified C₂₇

图3 表达蛋白扫描图

Fig. 3 Scanning picture of the expressed recombinant protein

2 C₂₇ 抗原的抗原活性研究

将纯化后的 C₂₇ 抗原及 C₁₁ 抗原分别包被聚苯乙烯板,利用 ELISA 方法检测我国第二代 HCV EIA 质控参考血清。分析结果如表。

表1 用 C₁₁, C₂₇ 重组抗原检测我国第二代 Anti-HCV EIA 质控参考血清 OD 值分布表

Table 1 The distribution of OD value of the second generation anti-HCV EIA panel sera tested by recombinant antigen C₁₁, C₂₇

OD 值 OD value	C ₂₇		C ₁₁	
	阴性数 N	阳性数 P	阴性数 N	阳性数 P
<0.1	28	0	4	1
<0.291	69	7	50	2
<0.485	1	13	32	3
<1.0		17	2	30
<2.0		43		64
>2.0		20		0
Cut off 值 Cut off value		0.291		0.485
总 计 Total	98	100	98	100

N: negative sample numbers P: positive sample numbers

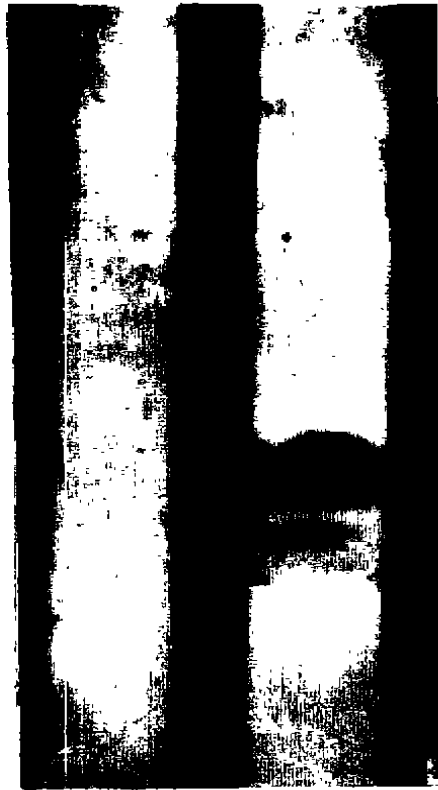


图4 表达蛋白C27的免疫印染分析
Fig. 4 Analysis of the recombinant C27 by Western Blotting

表2 用C₁₁、C₂₇重组抗原检测我国第二代 Anti-HCV EIA 质控参考血清s/c 值分布表

Table 2 The distribution of s/c value of the second generation anti-HCV EIA panel sera tested by recombinant antigen C₁₁, C₂₇

s/c 值 s/c	C ₂₇		C ₁₁	
	阴性数 N	阳性数 P	阴性数 N	阳性数 P
<0.5	62	0	42	2
<1.0	35	7	54	4
<2.0	1	10	2	26
<4.0		17		68
<5.0		22		
<10		44		
OD mean	0.457	4.50	0.538	2.22

N: negative sample numbers
P: positive sample numbers

表3 用C₁₁、C₂₇重组抗原检测我国第二代 Anti-HCV EIA 质控参考血清结果的数据处理

Table 3 Analysis of the result of the second generation anti-HCV EIA panel sera tested by recombinant antigen C₁₁, C₂₇

抗原 Antigen	Nx	Ncv	Px	Pcv	P/N	SS	SP	cut off
C ₂₇	0.133	0.079	1.309	0.698	9.84	93%	99%	0.291
C ₁₁	0.261	0.111	1.078	0.444	4.13	94%	98%	0.485

SS: sensitivity(灵敏度) SP: specificity(特异性)

从表1、2、3中所列结果看, C_{27} 阴性 OD 值较 C_{11} 低, 其阴性 OD 均值为 0.133, 而 C_{11} 阴性 OD 值均值 (\bar{N}_x) 为 0.261, 根据前文介绍的方法计算出的临界值 (Cut off value) C_{27} 为 0.291, C_{11} 为 0.485. C_{27} 阴性标本 OD 值有 97 个 (99%) 分布在临界值以下, 而 C_{11} 有 96 (98%) 个分布在临界值以下, 有 32 个 (33%) 标本分布在 0.291~0.485 之间. 分析阴性标本的 S/C 值, C_{27} 有 62 (63%) 个标本的 S/C 值小于 0.5, 而 C_{11} 只有 42 (43%) 个标本的 S/C 值小于 0.5. 以上结果说明 C_{27} 的反应本低要略优于 C_{11} .

分析检测的阳性 OD 值, C_{27} 阳性 OD 值均值 (\bar{P}_x) 为 1.309, 高于 C_{11} 的阳性均值 1.078. C_{27} 的 \bar{P}/\bar{N} 和 P_{S7C} 分别为 9.84 和 4.50, C_{11} 抗原的 \bar{P}/\bar{N} 和 P_{S7C} 分别为 4.13 和 2.22. 阴阳性血清检测结果分析表明 C_{27} 在抗原活性强度上略优于 C_{11} 抗原.

综合分析结果, C_{11} 阳性符合率为 94% (94/100), 阴性符合率 98% (96/98), 总符合率 96% (190/198). C_{27} 检测阳性符合率为 93% (93/100), 阴性符合率为 99% (97/98), 总符合率 96% (190/198), 结果说明 C_{27} 与 C_{11} 具有相同检出率.

讨 论

HCV 核心抗原基因约 340 nt~900 nt, 编码约 20 kD 的蛋白质. 利用计算机对其编码蛋白进行分析发现 C 区主要由三个大的亲水簇组成, 这三个亲水簇主要分布在前 120 个氨基酸内^[7]. 曾有文献报道, 此区与乙肝嵌合表达时, 对乙肝抗原的表达有抑制作用, 说明此区域在核心区具有重要功能. 我们表达的 C_{27} 抗原包含了靠近 5' 端约 122 个氨基酸, 完全包含了三个主要的抗原决定簇. 其位置与长度基本与 C_{22} 相同, 比包含全核心区基因片段的 C_{11} 短. 另外, C_{27} 表达蛋白是与 26 kD 的谷胱甘肽转硫酶 (GST) 融合在一起的. 利用我国第二代 HCV 诊断试剂参考血清对 C_{11} 和 C_{27} 进行比较, 结果显示二者的总检出率相同, 但 C_{27} 在抗原的反应性强度上 (S/C, P/N 值) 略优于 C_{11} 抗原. 由于抗原包被是以等量而非等摩尔比包被, 因此, 若按等摩尔量包被对二者进行比较 C_{27} 可能会显示较大优势. 此结果说明核心区靠近 5' 端约 120 个氨基酸构成的抗原蛋白与全核心区抗原蛋白具有相同的检测能力.

感谢 本室谷金莲技师在实验中给予不少帮助, 特表谢意.

参考文献

- 1 Van der Pole CL, Cuypers H T W, Reesink H W, et al. Confirmation of Hepatitis C Virus Infection by New Four-antigen Recombinant Immunoblot Assay. *Lancet*. 1991; 337:317-319
- 2 王宇, 陶其敏, 冯百芳. 丙型肝炎病毒核心基因在大肠杆菌中的表达. *中华微生物和免疫学杂志*, 1992; 12(1): 9-12
- 3 金冬雁, 王海林, 侯云德. 丙型肝炎病毒核心蛋白抗原的化学合成及其在血清学诊断中的应用. *病毒学报*, 1992; 8(4): 321-326
- 4 Ke Liu, Hu Zhong-han, Li He-min et al. Genetic typing of hepatitis V virus present in China. *Gene*. 1992; 114:245
- 5 Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning* (second edition). Cold spring harbor laboratory press 1988.
- 6 金容玉, 周成, 祁自柏, 等. HCV 第二代试剂标准 panel 血清的建立 (待发表)
- 7 Choo Q. L, Kuo G, Alter H J, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 88:2451-2455
- 8 Shin CM, Lo SJ, Miyamura T, et al. Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in Huh-7 cells. *J Virol*, Oct, 1993; 67(10): 5823-5832

High Expression of HCV Core Antigen and the Study on the Recombinant Protein Antigenicity

Zhang Shumin Qi Zhibai Liu Ke *et al*

(*National Institute for the Control of Pharmaceutical and
Biological Products, Beijing 100050*)

Part of HCV core gene fragment is expressed in *E. coli*. The recombinant protein C27 is fusion protein with GST. The specific protein is about 30% of total bacterial protein. After purification, the purity of the recombinant protein is more than 95%. We compared C27 antigen with C₁₁ core antigen by ELISA using the second generation panel sera of HCV EIA diagnostic kit. The result showed that the two antigens had the same rate of sensitivity and specificity. So, we concluded that the expressed gene fragment may be an important region in HCV core gene. The fusion protein may also play an important role in increasing the antigenicity of the recombinant protein.

Key words HCV, Core, Antigen, Expression