

重组 HCV NS5 区蛋白抗原在丙型肝炎检测中的应用

牛建章¹ 徐东刚² 孟宗达¹ 逯好英² 陈淑芬¹
于秋丽¹ 康铁军¹¹(河北省卫生防疫站,保定 071000)²(军事医学科学院基础医学研究所,北京 100850)

R512.630.4

R373.21

A

摘要 对 HCV NS5 区部分基因进行了克隆表达,获得优质 NS5 区蛋白抗原。通过对不同人群抗-NSS 检测表明,随访 3 年和 6 年的输血后丙肝(PT-HC)病例抗-NSS 阳性率分别为 70.5% 和 80.0%;随访 8 年和 11 年慢性丙肝(C-HC)病例分别为 50.7% 和 82.4%。一般人群阳性率仅为 1.7%,正常献血员中未检出阳性。结果表明研制的 NS5 抗原产生持久、特异性强。16 例 PT-HC 病人抗-NSS 和 HCV RNA 的动态随观察时间延长,阳性率呈升高趋势($P>0.05$)。说明抗-NSS 抗体和 HCV RNA 一样可反映病毒活动状态。对 11 份低值阳性参比血清检测表明,加入重组 NS5 抗原后,可进一步提高检出率。NS5 区抗原的表达成功无疑为研制我国自己的第三代诊断试剂奠定了重要基础。

关键词 HCV NS5 基因,抗原表达,丙型肝炎,检测研究

丙型肝炎病毒

HCV 是世界范围内输血后非甲非乙型肝炎(PT-NANBH)和散发性非甲非乙型肝炎(S-NANBH)的主要病原。主要经输血和污染的血制品传播^[1]。感染后极易转为慢性且与原发肝癌的发生密切相关^[2,3]。因此,研制筛查献血员、病例早期诊断和疗效评价的高敏感性、高特异性的诊断试剂具有十分重要的意义。

为研制我国自己的第三代诊断试剂,我们对 HCV NS5 区的部分基因组进行了克隆表达,获得了优质的重组蛋白抗原。由于抗原表达内容将有另文发表,本文将重点对 NS5 抗原在不同人群中 HCV 感染检测结果进行分析。

材料和方法

1 重组 NS5 蛋白抗原的制备

首先用计算机 Goldkey 程序对 HCV NS5 区蛋白的抗原决定簇进行预测分析。在优势抗原表位设计合成引物。从河北省固安县丙肝病人血清中纯化 HCV RNA,用 RT-PCR 合成 cDNA。目的基因经亚克隆构建 pGEX-NS5-1 重组质粒。转化至宿主菌 BL21 中诱导表达。用 Western 印迹和 EIA 法测定抗原活性。用制备电泳技术获得高纯度的重组抗原,建立 EIA 方法。

2 血清来源

各不同类型病人血清采自河北省固安县,输血后丙型肝炎(PT-HC)系列血清分别采自病人输血前和输血后 1、3、6 月、1、3、6 年。慢性丙型肝炎(C-HC)血清采自随访 8 年和 11 年的病人。所有系列血清组病人均

为一次性输血,输血前抗-HCV 阴性,ALT 正常而且近 6 年内无肝病史。输血后排除了其他肝炎病毒的感染。献全血血员血清和一般人群血清由河北省保定血站提供。参比血清由北京新伟凯生物技术公司提供。

3 检测方法

3.1 ALT:以改良赖氏法 ≥ 25 U/L 为异常。

3.2 抗-HCV:包括抗-HCV C100-3(美国 Ortho Chiron C-100E1A 试剂)、抗-HCV CP10(日本 Kuraray NI4 E1A 试剂)、抗-HCV C22(日本化血研 Jcc-2 E1A 试剂)、抗-HCV Sc, NS3/4(珠海亚利生物工程公司引进的美国 UB1 第二代试剂)、抗-HCV NS5(本研究组重组表达的 NS5 区抗原)、抗-HCV IgM,以沈阳惠民第二代 E1A 试剂为基础,用中和 IgG 法检测。有关试剂均在有效期内使用,按说明书操作和判定结果。以两种和两种以上试剂同时阳性判为阳性。

3.3 HCV RNA:采用 RT-PCR 方法^[4-6]检测。选用 HCV 基因组 5'非编码区引物(由中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所合成),按照 Kwok 等报道的方法防止假阳性扩增和交叉污染^[7]。

3.4 酶免疫分析(EIA)方法:参考 Kuo G 等报告的方法进行^[8-11]。首先通过方阵滴定确定抗原的最佳包被量为 1:400,酶标记物的最佳稀释浓度为 1:1000,血清的稀释浓度为 1:20。具体步骤按常规方法进行。

结 果

1 不同人群抗-NS5 和抗-HCV 的检测

不同人群抗-NS5 和抗-HCV 抗体检测结果见表 1。随访 3 年和 6 年的 PT-HC 病例,抗-NS5 阳性率分别为 70.5%和 80.0%;随访 8 年和 11 年的 C-HC 病例,抗-NS5 阳性率分别为 50.7%和 82.4%,阳性率均有大幅度升高。291 例献全血血员中未检出抗-NS5 抗体。179 份一般人群血清抗-NS5 阳性率为 1.7%,这与第二代试剂检测结果相同。

表 1 不同人群抗-NS5 和抗-HCV 检测结果分析

Table 1 Percentages of anti-NS5 and anti-HCV in different population

| 人 群 Population | 检测例数 Cases | 抗-NS5 Anti-NS5 | 抗-HCV Anti-HCV |
|---|---------------|-------------------|-------------------|
| 输血后丙型肝炎(随访 3 年) PT-HC (follow-up 3 years) | 44 | 70.5 | 93.2 |
| 输血后丙型肝炎(随访 6 年) PT-HC (follow-up 6 years) | 40 | 80.0 | 77.5 |
| 慢性丙型肝炎(随访 8 年时) C-HC (follow-up 8 years) | 140 | 50.7 | 94.3 |
| 慢性丙型肝炎(随访 11 年时) C-HC (follow-up 11 years) | 34 | 82.4 | 88.2 |
| 献全血血员 Blood donors | 291 | 0.0 | 1.1 |
| 一般人群 Normal population | 179 | 1.7 | 1.7 |

抗-HCV:第二代试剂

Anti-HCV; Second generation reagent

2 34 例 PT-HC 的 ALT、抗-NS5 等抗体和 HCV RNA 首次异常或阳性时间分析

结果详见表 2,以 ScNS3/4 阳转时间和 ALT 首次异常时间为最早,其次为 CP10 和 P22,抗-NS5 的产生时间平均为 4 个月左右,有 5 例没有产生(14.71%),在 HCV 不同区域抗体中出现较晚。

3 39例PT-HC的抗-NS5动态检测

结果见表3及图1。输血后1、3、6、12、36和72个月抗-NS5阳性率分别为51.28%、56.41%、64.10%、69.23%、71.79%和82.05%，呈逐渐升高趋势。在39例病人中34例抗-NS5出现阳转，其中30例阳转后持续阳性；5例在6年抗-NS5始终阴性；1例出现阴转。

表2 34例PT-HC的ALT、抗-NS5等抗体和HCV RNA首次异常或阳性时间

Table 2 First positive time of ALT, anti-NS5 and HCV RNA in 34 cases PT-HC

| 标志 | 首次异常(阳性)时间(输血后天) | 首次异常(阳性)平均时间 $\bar{X} \pm S$ 天 | | 一直正常或阴性% |
|----------------------|-------------------------------|----------------------------------|-------|----------------------|
| Index | Time (days after transfusion) | Average time $\bar{X} \pm S$ day | | Normal or negative % |
| ALT | 14~90 | 48.0 | 17.1 | 0 |
| 抗-HCV NS5 | 25~730 | 120.3 | 185.5 | 14.71 |
| Anti-NS5 | | | | |
| 抗-C100-3 | 27~395 | 95.4 | 82.9 | 2.94 |
| Anti-C100-3 | | | | |
| 抗-HCV CP10 | 33~185 | 70.5 | 41.5 | 8.82 |
| Anti-CP10 | | | | |
| 抗-HCV C22 | 27~547 | 74.3 | 97.5 | 3.45 |
| Anti-C22 | | | | |
| 抗-HCV C.NS3.4 | 25~90 | 44.3 | 16.3 | 0 |
| Anti-HCV C.NS3.4 | | | | |
| 抗-HCV C.NS3.4 IgM | 14~365 | 108.1 | 90.1 | 33.33 |
| Anti-HCV C.NS3.4 IgM | | | | |
| HCV RNA | 14~87 | 40.3 | 20.1 | 0 |

4 16例PT-HC病人抗-NS5和HCV RNA动态分析

对16例PT-HC病例的抗-NS5和HCV RNA进行了动态统计分析。从表4和图2可看出，输血后第1到72个月间，抗-NS5抗体阳性率波动在56.4%至81.3%之间；HCV RNA在62.5%至87.5%之间，两项指标动态变化均呈平缓上升趋势。

表3 39例PT-HC抗-NS5动态分析

Table 3 Dynamic state of anti-NS5 in 39 PT-HC

| 时间(月) | 阳性例数 | 阳性率(%) |
|--------------|--------------|-------------------|
| Time (month) | Positive No. | Positive rate (%) |
| 1 | 20 | 51.28 |
| 3 | 22 | 56.41 |
| 6 | 25 | 64.10 |
| 12 | 27 | 69.23 |
| 36 | 28 | 71.79 |
| 72 | 32 | 82.05 |

表4 16例PT-HC病人抗-NS5和HCV RNA动态分析

Table 4 Dynamic state of anti-NS5 and HCV RNA in 16 PT-HC

| 时间(月) | 抗-NS5(%) | HCV RNA(%) | 精确概率P值 |
|--------------|--------------|-------------|------------------|
| Time (month) | Anti-NS5 (%) | HCV RNA (%) | Exact method (P) |
| 1 | 56.4 | 62.5 | 27.22 |
| 3 | 68.8 | 75.0 | 39.48 |
| 6 | 75.0 | 81.3 | 28.34 |
| 12 | 81.3 | 81.3 | 63.23 |
| 36 | 75.0 | 81.3 | 63.23 |
| 72 | 81.3 | 87.5 | 13.55 |

$$X^2 = 0.05 \quad P > 0.05$$

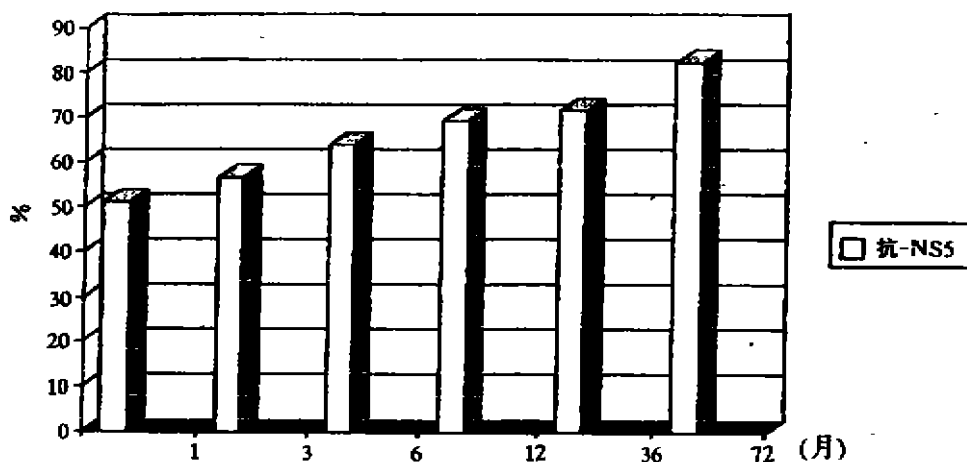


图1 39例PT-HC病例抗-NS5动态变化

Fig 1 The dynamic state change of anti-NS5 in 39 patients with PT-HC

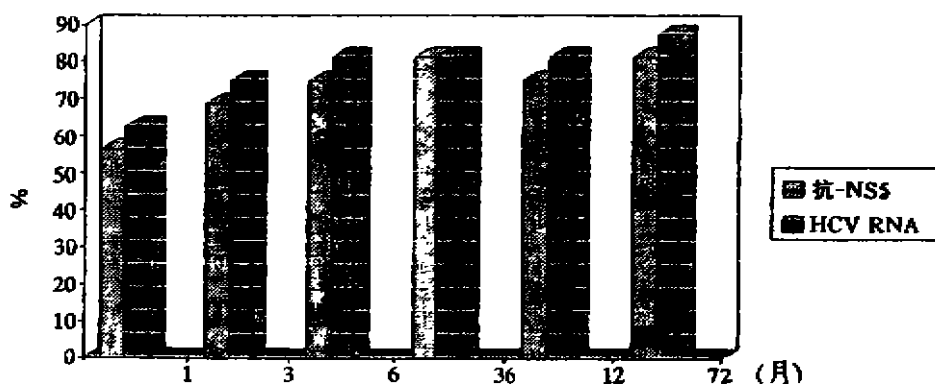


图2 16例PT-HC病人抗-NS5和HCV RNA动态分析

Fig 2 The dynamic state of anti-NS5 and HCV RNA in 16 patients with PT-HC

5 阳性、阴性参比血清和抗-HCV低值标本抗-NS5抗体的检测

对20份已知抗-HCV阳性和15份阴性参比血清进行抗-NS5抗体检测,结果阳性标本的平均OD值为1.29,阴性标本的平均OD值为0.042,在140例C-HC病例血清样品检测中发现一例抗-NS5抗体单独阳性,另有13例血清样品对第二代抗-HCV诊断试剂呈弱阳性反应,而抗-NS5抗体检测时的OD值较高。

讨 论

HCV基因组为单股正链RNA,长度约9.5 kb,由9个基因区组成,从5'端开始依次为5'-NCR、C区、E₁区、E₂/NS₁、NS₂、NS₃、NS₄、NS₅和3'-NCR。其中C区、E₁区和E₂区为病

毒结构蛋白编码区, NS₁ 区及 NS₂₋₅ 区为非结构蛋白编码区。NS₅ 区最长, 约有 3150 个核苷酸, 含有 GDD 序列, 编码病毒依赖 RNA 的 RNA 多聚酶, 参与病毒的复制^[12,13]。所以, 检测 NS5 抗体在一定程度上可反映丙肝病情的活动状态, 为临床治疗和愈后评价提供新的依据。

在本研究中, 随访 3 年和 6 年的 PT-HC 病例抗-NS5 阳性率分别为 70.5% 和 80.0%, 随访 8 年和 11 年的 C-HC 病例抗-NS5 阳性率分别为 50.7% 和 82.4% 阳性率均有大幅度的升高。献全血血员未检出抗-NS5 抗体。179 份一般人群血清抗-NS5 阳性率为 1.7%, 这与抗-HCV 检测结果相同。虽然抗-NS₅ 抗体出现较晚, 但在 PT-HC 中随着观察时间的延长阳性率逐渐升高, 到 6 年时仍达到 82.05%。上述结果表明我们研制的 NS5 抗原产生持久、特异性强。对 16 例 PT-HC 病人同时检测抗-NS5 和 HCV RNA 的动态变化, 结果表明两项指标均随观察时间的延长阳性率有升高的趋势, 在 6 个月以后阳性率基本稳定。这说明抗-NS5 抗体和 HCV RNA 一样可反映病毒在体内的活动状态。

最近, 国外学者通过加入 NS5 区抗原和对 NS3 抗原的优化, 推出了第三代抗-HCV 诊断试剂。与第二代试剂相比其敏感性和特异性均有所提高^[14-17]。国内学者也对 NS3 抗原进行了优化^[11]。我们在平行检测的 140 例慢性丙型肝炎血清中发现一例抗-NS5 单独阳性, 这与 Riezu J 等和 Waumans L 等^[14,15]报道存在抗-NS5 抗体单独阳性的丙型肝炎的结果相一致。在 C-HC 血清抗-NS5 检测中, 还发现有些血清抗-NS5 抗体的滴度明显高于其它区域抗体。对 11 份易漏检的阳性参比血清检测结果表明, 加入重组 NS5 抗原后, 可进一步提高阳性检出率。

综上所述, 我们研制的 NS5 抗原不仅有较好的特异性和敏感性。而且与 HCV RNA 一样可反映病毒在体内的活动状态, 加入重组 NS5 抗原后, 可进一步提高试剂的阳性检出率。它的表达成功无疑为研制我国自己的第三代诊断试剂奠定了重要基础。

参 考 文 献

- 1 Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB *et al.* Hepatitis C virus infection in posttransfusion hepatitis. *N Engl J Med* 1991, 325: 1325-1329
- 2 Sato I, Miyamura T, Ohbayashi A *et al.* Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:6547-6549
- 3 Resnick R, Koff R. Hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. Prevalance and significance. *Arch Intern Med*, 1993, 153: 1672-1677
- 4 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162:156-159
- 5 Garson JA, Tedder RS, Briggs M *et al.* Detection of hepatitis C viral sequences in blood donation by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet*, 1990, 335:1419-1422
- 6 徐东刚, 孟宗达, 逯好英等. 输血后丙型肝炎病毒血症、抗体及转氨酶动态研究. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1994, 8(4):340-343
- 7 Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positive with PCR. *Nature*, 1989;339:237-238
- 8 Kuo G, Choo QL, Alter HJ *et al.* An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*, 1989, 244:362-364
- 9 郑怀竟, 韩松. 临床检验 ELISA 指南. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1994.5
- 10 Mel K. Molecular detection of hepatitis C virus; Impact of detection methodology on clinical and laboratory correlations. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*, 1995, 32(1):41-66

- 11 Lu HY, Jin L, Ling SG *et al.* Cloning and expression of HCV capsid and NS3 gene and its application in diagnosis of HCV infection. In: Internation Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, 1993, May 10 - 14, Tokyo, Scientific Program and Abstract Volume, p192
- 12 Takamizawa A, Mori C, Fulke I *et al.* Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol*, 1991, 65:1105 - 1113
- 13 Houghton M, Weiner AJ, Han J *et al.* Molecular biology of the hepatitis C viruses: implication for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology*, 1991, 14:382 - 388
- 14 Riezu J, Parker D, Civerira MP *et al.* Detection of hepatitis virus antibodies with new recombinant antigens: assessment in chronic liver diseases. *J Hepatol*, 1992, 15:309 - 313
- 15 Waumans L, Claeys H, Verhaert H, *et al.* HCV confirmation in blood donors screening. *Vox Sang*, 1993, 64:145 - 149
- 16 Uyttendaele S, Claeys H, Mertens W, *et al.* Evaluation of third - generation screening and confirmatory assay for HCV antibodies. *Vox Sang*, 1994, 66:122 - 129
- 17 Pawlotsky J - M, Francoies R - T, Pellet C *et al.* Influence of hepatitis C virus (HCV) genotypes on HCV recombinant immunoblot assay patterns. *J Clin Microb*, 1995, 33(5):1357 - 1359

Application of Recombination Antigen of Hepatitis C Virus (HCV) NS5 Region in Detection of Hepatitis C Infections

Niu Jianzhang¹ Xu Donggang² Meng Zongda¹ *et al*

¹(Anti - epidemic Station of Hebei Province, Baoding 071000)

²(Institute of Basic Medicine, Military Medicine Academy, Beijing 100850)

The purpose of this study was to evaluate the effective of recombination antigen of HCV NS5 region in detection of hepatitis C infection and in developing the third generation HCV diagnostic kit in China. All the serum samples were obtained in Hebei Province. Sera of PT - HC patients were collected in pre - transfusion and at 1, 3, 6, 12, 36 and 72 months after transfusion, Sera from patients with C - HC were collected in 8th year and 11th year after followed - up. EIA method was developed using recombination antigen of HCV NS5 region. HCV RNA was determined with RT - PCR using 5' NTR primer. The anti - NS5 was detected in different populations. The positive rates of anti - NS5 in PT - HC patients, followed - up for 3 and 6 years, were 70.5% and 80.1%, respectively; C - HC patients followed - up for 8 and 11 years were 50.8% and 82.4%, respectively. No anti - NS5 in 291 blood donors was detected, and in the normal populations the positive rate was 1.7%. Although the anti - NS5 appeared later, the longer following up time the higher of positive rate in PT - HC, and in the 6th year were 82.05%. In 16 PT - HC patients, the positive rates of both Anti - NS5 and HCV RNA were increased in following up time longer gradually ($\chi^2 = 0.05$ $P > 0.05$). The results show that the antigen of HCV NS5 there is higher sensitivity and specificity. Undoubtedly, it can be used in producing the third reagent for testing anti - NS5 in China.

Key words HCV NS5 gene, Antigen expression, Hepatitis C, Detection application