

丙型肝炎病毒 E2 基因 DNA 免疫实验动物研究

刘源洁, 叶林柏**, 徐进平, 郜金荣, 冯磊, 孙明颢, 李江, 吴正辉

(武汉大学生命科学院病毒研究所, 湖北武汉 430072)

The Immunization Study of Hepatitis C Virus E2 Gene DNA
in Experimental AnimalLIU Yuan-jie, YE Lin-bai**, XU Jin-ping, GAO Jin-rong, FENG Lei,
SUN Ming-hao, LI-Jiang, WU Zheng-hui

(Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: HCV E2 DNA fragment encoding E2 protein(amino acid 417-750) was cloned into the eucaryotic expressing plasmid pCDNA3 to get the recombinant plasmid pcE2. The pcE2 DNA was used as gene vaccine to immunize rabbits and mice respectively. The specific antibody against HCV E2 was detected by ELISA at 20th day after immunization, and was raising to highest level at 40th day, then maintained at the titer of 1:1 600. The CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocyte in immune mice increased compared with the control group, the CD8⁺ T-cell increased 35.46% as measured by FACS. The immuno-histochemical assay of the tissue from immune mice demonstrated that the E2 gene had expressed inside the cells, this results indicated that E2 DNA has a good immunity.

Key words: Hepatitis C virus (HCV); DNA Immunization; Immunohistochemical assay

摘要: 将编码丙型肝炎病毒(HCV)E2蛋白417~750位氨基酸的DNA片段克隆到真核表达载体pcDNA3.1(-)中的CMV IE启动子下游,构建成HCV E2重组真核表达质粒pcE2。ELISA法检测pcE2 DNA免疫兔血清中的E2抗体变化和维持规律,结果显示免疫20d已有抗体产生,30d后开始进入高峰,40d时达到最高值,至第90d抗体水平保持平稳,抗体滴度达到1:1600左右。流式细胞计数仪(FACS)检测pcE2 DNA免疫鼠CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞变化情况,与注射空载体pcDNA3.1(-)的阴性鼠相比,CD4⁺淋巴细胞水平略有上升,CD8⁺细胞水平有较大升高,增幅达35.46%。免疫组化检测结果显示注射pcE2的小鼠组织中有明显的阳性着色,而注射pcDNA3.1(-)的对照组小鼠免疫组化结果为阴性。以上结果表明:pcE2在实验动物内表达出的HCV E2蛋白可以引起免疫动物的体液免疫应答和细胞免疫应答,尤其是MHC-1限制性杀伤性CD8⁺T淋巴细胞水平的提高对清除病毒是十分有利的,因此HCV E2 DNA免疫有可能成为预防和治疗HCV感染的一条新途径。

关键词: 丙型肝炎病毒(HCV); DNA免疫; 免疫组化

中图分类号:R512.63 文章标识码:A 文章编号:1003-5125(2002)01-0011-06

DNA免疫是近几年发展起来的一种新型免疫方法,目前已在肝炎、流感、狂犬、结核和艾滋病的防治上进行了有益的探索。它的基本原理是将编码病原体抗原的基因片段直接通过肌肉注射或基因枪等方法导入宿主体内,在宿主细胞中表达的抗原经主要组织相容性复合物(major histocompatibility com-

plex, MHC) I类和/或II类分子加工处理后提呈给免疫系统,从而激发机体特异性的体液和细胞免疫应答^[1]。丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)是引起输血后肝炎的主要病原体之一,可以引起急性感染和慢性肝炎,慢性肝炎可发展为肝硬化和肝癌。目前国际上不但没有高效的治疗药物,而且也没有

收稿日期:2001-04-09,修回日期:2001-05-08

作者简介:刘源洁(1976-),女,河北省籍,硕士研究生,主要从事病毒学、免疫学、分子生物学研究。

** 通讯作者:叶林柏(1948-),男,广东省籍,教授,病毒分子生物学和免疫学研究。Correspondence author.

疫苗用于丙肝预防,因而研究并发展丙型肝炎疫苗十分迫切。HCV E2 为 HCV 的囊膜糖蛋白,含有重要的 T、B 细胞抗原表位^[2,3]。已有实验证明用基因工程方法表达的 E2 蛋白免疫黑猩猩可使其体内产生中和抗体^[4],但 E2 的变异性和制备的困难性给 E2 蛋白质疫苗的研究带来极大的障碍。因此,为探索一条预防 HCV 感染的新途径,我们进行了 HCV E2 DNA 免疫动物的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌种 含有 HCV AD78 株 1b 型 cDNA 核苷酸 17-5323 的重组质粒 p17-5323 由德国 Roggendorf 博士惠赠,真核表达载体 pcDNA3.1 (-) 购自 Invitrogen 公司, pUCm-T Vector 购自 Sangon 公司, *E. coli* DH5a 为本室保存。

1.1.2 工具酶与试剂 rTaq DNA polymerase Kit 为 TaKaRa 公司产品, DNA 限制性内切酶为华美生物工程公司产品, T4 DNA 连接酶为 GIBCO BRL 公司产品, 红细胞裂解液为 Pharmigen 公司产品, Histostain TM-Plus Kits 为 ZYMED 公司产品, 浓缩型 DAB 试剂盒为北京中山生物技术公司产品。

1.1.3 检测用抗原、单克隆抗体及第二抗体 检测抗原为我室在 *E. coli* 中表达并纯化的 HCV E2 蛋白, HCV E2 单克隆抗体由法国 Dubussion 博士惠赠, 兔抗鼠 CD4⁺、兔抗鼠 CD8⁺ 抗体为 Santa Cruz Biotechnology Inc. 产品, FITC-羊抗兔 IgG 为 Sigma 公司产品, 羊抗兔 IgG-HRP 为华美生物工程公司产品。

1.1.4 实验动物 昆明种纯系兔和 Balb/c 小鼠由武汉大学生科院实验动物饲养中心提供。

1.2 方法

1.2.1 HCV E2 重组真核表达质粒构建

1.2.1.1 引物和 PCR 扩增 根据 HCV E2 的序列设计引物:

正向引物 5'-TTTAAA AGATCTATGAACACCAA-
Dra I Bgl II
TGGCAGTTGG-3'

反向引物 5'-GGTACCGAATTC TTCTAGGCGGC-
Kpn I Eco RI
CTCGGCCTGGGC-3'

以质粒 p17-5323 为模板进行 PCR 反应, 扩增 HCV E2 基因片段(编码第 417~750)位氨基酸。反应如下: 第一个循环: 93℃ 1min, 37℃ 5min, 72℃

1.5min; 后 30 个循环: 93℃ 1min, 55℃ 2min, 72℃ 1.5min; 最后一个循环: 60℃ 退火 2min, 72℃ 延伸 7min, 电泳检查 PCR 扩增产物。

1.2.2.2 PCR 产物与 pUCm-T 载体进行连接 依据 pUCm-T 载体说明书, 进行连接反应, 通过蓝/白菌落筛选, 酶切鉴定, 获得阳性重组克隆 pTE2。

1.2.2.3 构建重组 HCV E2 真核表达质粒 pcE2 用限制性内切酶 *Bgl* II-*Kpn* I 消化重组质粒 pTE2, 获得 E2 基因, 将 E2 基因与经过限制性内切酶 *Bam* HI-*Kpn* I 双酶消化的载体质粒 pcDNA3.1 (-) 进行连接, 筛选得到在 CMV 早期启动子控制下的重组 HCV E2 真核表达质粒 pcE2。

1.2.2 实验动物的 DNA 免疫

1.2.2.1 重组质粒 pcE2 及载体质粒 pcDNA3.1 (-) 的大量制备及纯化 按分子克隆所述方法提纯质粒 DNA^[5], 用灭菌生理盐水溶解, 测定 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值确定核酸样品的纯度, A₂₆₀ 值确定样品的浓度。用生理盐水调整浓度至 1.0 μg/mL, 作为 DNA 免疫的注射样品。

1.2.2.2 选取 10 只适龄雌性 Balb/c 小鼠, 其中 5 只作为阴性对照组注射载体质粒 pcDNA3.1 (-), 另外 5 只作为阳性组注射重组质粒 pcE2。DNA 免疫前先在实验动物左后肢股四头肌按 100 μL/只注射 0.5% 盐酸普鲁卡因注射液, 使肌肉处于再生状态, 提高 DNA 的摄取率, 3d 后在相同的部位进行 DNA 免疫。初次免疫 20d 后, 再在实验动物左后肢加强免疫一次, 同样先经盐酸普鲁卡因预处理, 两次免疫共计 100 μg DNA/只。另外选取体重为 2~3Kg 的昆明种纯系兔用同样的方法和 200 μg/只的剂量进行 DNA 免疫, 其中 3 只注射重组质粒 pcE2, 1 只注射载体质粒 pcDNA3.1 (-) 作为阴性对照。

1.2.3 DNA 免疫动物特异性抗体的检测

定期对注射了重组质粒 pcE2 的兔子耳静脉取血至免疫 90d, 采用常规 ELISA 方法检测针对 HCV E2 蛋白的特异性抗体水平。包被抗原为我室原核表达并纯化的 HCV E2 蛋白, 加适当稀释的待测血清样品反应后, 加羊抗兔 IgG-HRP (1:500) 反应, 加底物 OPD 显色后, 测 490nm 光吸收。

1.2.4 流式细胞计数仪 (FACS) 检测 DNA 免疫动物细胞免疫水平

免疫 35d 的小鼠断颈取血并加入 1/20 体积的抗凝剂 0.26mol/L 柠檬酸三钠。用 ELISA 法检测抗体水平。每只小鼠各取全血 100 μL 进行 FACS

样品的处理。首先各加入 1:1000 浓度的兔抗鼠 CD4⁺ 抗体或 CD8⁺ 抗体, 室温反应 30min, PBS 洗涤悬浮, 加入 1:400 工作浓度的 FITC-羊抗鼠 IgG 室温反应 30min, PBS 洗涤后加入 0.5mL 1×红细胞裂解液裂解红细胞, 离心洗涤去除红细胞裂解碎片并沉淀其它细胞, 用 1% PFA(1×PBS) 固定备用。FACS 检测样品 CD4⁺ 或 CD8⁺ 水平, CellQuest 软件处理数据(Becton Dickinson)。

1.2.5 DNA 免疫动物免疫组化的研究

将免疫 35d 的阳性组及注射空载体质粒的对照组 Balb/c 小鼠注射区部位的股四头肌用 4% 多聚甲醛(pH7.3) 固定, PBS 洗涤后石蜡包埋并进行常规石蜡组织切片(5μm 厚度)。完成脱蜡、脱水、灭活内源性过氧化物酶、抗原修复及封闭过程后, 滴加鼠抗 HCV E2 的单克隆抗体进行反应, 洗涤后滴加生物素标记的羊抗小鼠 IgG 进行反应; 洗涤后, 再滴加 HRP-链霉卵白素工作液反应; 洗涤后用 DAB 显色底物进行显色, 流水冲片后, 苏木素轻度复染, 经脱水、透明后中性树脂封片, 显微镜下观察拍照。

2 结果

2.1 重组 HCV E2 真核表达载体的构建

PCR 产物电泳检查, 显示一条 DNA 带大小为 1.0kb, 与预计大小完全相符。经 T4 连接酶把 PCR 获得的 E2 DNA 与 pUCm-T 载体(2.7kb) 连接后转化 *E. coli* DH5α 菌株, 挑选白色菌落培养扩增, 提取 DNA 用 *Bgl* II 和 *Kpn* I 双酶切鉴定, 并从胶中回收获得 E2 DNA 带, 连接到 *Bam* HI 和 *Kpn* I 切开的 pcDNA3.1(-) 表达载体(5.4kb) 中, 由于 *Bam* HI-*Bgl* II 为同尾酶, 故 E2 基因可以定向插入载体中。连接后转化 *E. coli* DH5α 菌株, 挑选菌落培养并提取质粒 DNA 进行鉴定。由于载体多克隆位点上(E2 基因插入区上游) 有 *Eco* RI 单一切点, E2 基因 3' 端也有 *Eco* RI 切点, 故用 *Eco* RI 单酶可以从重组质粒中消化得到约 1.0kb 的 HCV E2 基因。应用此方法对克隆进行酶切鉴定, 结果产生 1.0kb 的 E2 DNA 带, 表明 E2 DNA 已被克隆到 pcDNA3.1(-) 中的 CMV IE 启动子下游。获得的重组克隆命名为 pcE2(图 1)。

2.2 HCV E2 基因 DNA 免疫抗体产生水平和变化规律

定期对注射了重组质粒 pcE2 的 3 只兔子及注射空载体质粒的 1 只兔子耳静脉取血, 制备血清, 用

间接 ELISA 方法检测抗体产生水平(表 1)。结果显示, 注射了重组质粒 pcE2 的兔子自初次免疫 20d 起已有抗体产生, 免疫 30d 时进入高峰, 40d 时达到最高值。至第 90d 内抗体水平保持平稳, 抗体滴度达到 1:1 600, 其 OD₄₉₀ 值维持在 0.45 左右。而对对照组血清 E2 抗体 ELISA 测定的 OD₄₉₀ 值平均一直处在 0.02 左右(图 2)。结果表明重组质粒 pcE2 可以引起实验动物的体液免疫应答且抗体水平保持稳定, 抗体滴度维持在 1:1 600 的高水平上。

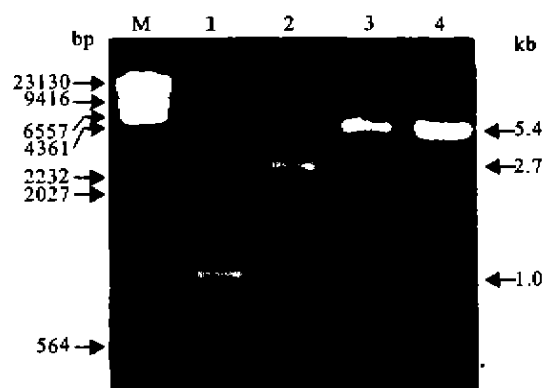


图 1 HCV E2 PCR 产物及重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 PCR of the HCV E2 and ligase with pUCm-T and analysis of recombinant plasmid pcE2

M. λDNA/*Hind* III Marker; 1, HCV E2 PCR product; 2, pTE2/*Bgl* II-*Kpn* I; 3, pcDNA3.1(-)/*Eco* RI; 4, pcE2/*Eco* RI.

2.3 HCV E2 基因 DNA 免疫小鼠诱发 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞增殖, 激发机体细胞免疫应答

免疫 35d 的小鼠尾静脉取血, ELISA 检测表明阳性组小鼠体内抗体滴度已达 1:1500 左右, 可以认为这时小鼠处于最佳免疫应答状态。选取免疫组和对照组各 3 只小鼠断颈取血, 各取 100μL 全血, 进行流式细胞仪(FACS) 上样前的处理。流式细胞检测结果显示(表 2), DNA 免疫可以诱发小鼠 T 淋巴细胞增殖, 特别是杀伤性 T 淋巴细胞 CD8⁺ 水平上升很高, 说明 HCV E2 的 DNA 免疫可以促使免疫机体 MHC-I 限制性 CD8⁺ T 淋巴细胞增殖, 发挥针对 HCV 的 CTL 效应。由于细胞免疫被认为是感染宿主清除病毒的一个非常重要的部分, 那么本实验提示 HCV E2 基因的 DNA 免疫有可能激发免疫宿主的细胞免疫应答, 从而可以预防和清除病毒的感染。

表1 HCV E2 DNA 免疫兔子抗体水平检测结果

Table 1 The result of Anti-HCV E2 antibody in E2 DNA immune rabbits

Immune group	Immune time/anti-E2(OD _{490nm})										
	0d	14d	20d	25d	30d	35d	40d	45d	50d	60d	90d
1	0.01	0.09	0.18	0.27	0.42	0.46	0.46	0.44	0.48	0.48	0.46
2	0.02	0.10	0.22	0.30	0.42	0.44	0.49	0.45	0.46	0.46	0.45
3	0.02	0.12	0.21	0.34	0.44	0.45	0.46	0.45	0.45	0.44	0.45
Average	0.02	0.10	0.20	0.30	0.43	0.45	0.48	0.45	0.46	0.46	0.45
Control group	0.02	0.02	0.02	0.04	0.03	0.03	0.04	0.02	0.02	0.02	0.02

表2 FACS 检测 HCV E2 基因 DNA 免疫的小鼠体内 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞变化情况Table 2 FACS analysis the change of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in HCV E2 DNA immune mice

	Control group				Immune group			
	1 [#]	2 [#]	3 [#]	Average	1 [#]	2 [#]	3 [#]	Average
CD4 ⁺	40.31%	42.44%	43.02%	41.92%	45.51%	43.09%	44.32%	44.01%
CD8 ⁺	20.76%	21.58%	23.56%	21.97%	29.30%	32.75%	27.22%	29.76%
CD4 ⁺ /CD8 ⁺				1.91				1.48
(CD4 ⁺ 前-CD4 ⁺ 后)/CD4 ⁺ 前								4.99%
(CD8 ⁺ 前-CD8 ⁺ 后)/CD8 ⁺ 前								35.46%

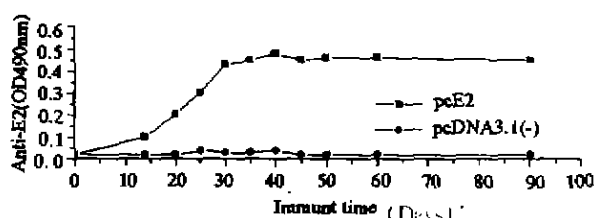


图2 DNA 免疫兔子 HCV E2 抗体水平检测

Fig. 2 Level of antibodies against HCV E2 in DNA immune rabbits

2.4 DNA 免疫的小鼠肌肉组织的免疫组化结果

取经注射 pcE2 的小鼠肌肉组织做常规免疫组织化学检查(彩版 I 图 3)。注射了重组质粒的阳性小鼠与注射空载体质粒的对照小鼠比较,肌纤维细胞为多核细胞,核均被苏木素染为亮蓝色,但阳性小鼠肌肉组织细胞中有不均匀的明显的棕色着色,尤其在细胞膜部位着色更深,而对照小鼠肌肉中无棕色着色,说明 HCV E2 基因在免疫小鼠的肌肉组织中产生阳性表达,表达的 E2 蛋白主要分布在细胞膜内侧。

3 讨论

HCV 是黄病毒科成员,是主要的非甲非乙型肝炎病毒。我国人群丙肝抗体阳性率达 4% 左右,仅次于乙肝。世界范围内,HCV 的感染率估计为 1% - 2%,被丙型肝炎病毒感染的患者中 70% 以上会引起持续性感染和慢性感染,最终可能引起肝硬化及肝坏死,部分患者甚至可能发展成肝癌。故探索和发展预防丙型肝炎的疫苗成为当务之急。无论是工程蛋白疫苗或 DNA 基因疫苗,必须能使免疫机体产生保护性中和抗体,起到预防病毒感染的作用;或激发机体细胞免疫应答达到治疗的效果。尽管机体对病毒特异性蛋白普遍能做出免疫应答,但并非任何一种蛋白都可以作为疫苗的候选者。抗 HCV 的核心蛋白和 NS3 蛋白抗体在慢性丙肝病人血清中水平很高,但不能使病人好转,而且这两种蛋白有致癌之嫌,作为疫苗是个有争议的问题。HCV 包膜糖蛋白 E1 和 E2 分布在病毒粒子表面,与病毒入侵宿主的吸附和侵入过程有关,它们的抗体通常是保护性抗体,能中和病毒的感染力,阻止病毒与细胞表

面受体结合和进入细胞。Choo 等用 E1 和 E2 蛋白免疫黑猩猩后,产生抗体水平 >3000 的黑猩猩,再接种 HCV 进行攻击,可以使黑猩猩受到完全的保护,没有出现任何肝炎症状,抗体水平低的黑猩猩也受到良好的保护,只在接毒攻击后出现 ALT 升高,然后恢复正常,未转为慢性肝炎,而未经 E1、E2 免疫的黑猩猩在同样接毒攻击后全部呈急性肝炎,这一结果证实 E1 和 E2 抗体具有良好的保护性^[6],是合适的工程蛋白疫苗的候选者。但是 HCV 的包膜糖蛋白在原核和真核系统中表达量低,难于获得大量的工程蛋白作为疫苗。Choo 等在 120L 体积的细胞培养物中才获得 1mg 工程蛋白用于黑猩猩免疫研究^[6],成本过于昂贵。因此对于这类表达水平很低的基因,尤其适合 DNA 疫苗的研究。基因免疫是一种引起免疫反应的简单而有效方法^[7]。最近,黄病毒科的另一成员 JEV(日本脑炎病毒)的包膜糖蛋白 DNA 疫苗可以使免疫小鼠在接受致死剂量的病毒攻击时受到完全保护,效果与灭活的 JEV 疫苗相当^[8]。

国内有研究者将 HCV 核心区与 HBV 核心区融合进行 DNA 免疫,获得了良好的免疫效果^[9]。但对于含有更多中和抗原表位的包膜糖蛋白基因 E2,国内还未见其 DNA 免疫的相关报道。本实验选用编码第 417~750 氨基酸的 E2 基因用于 DNA 免疫,虽然这段基因缺失了 HCV E2 基因的高变区 1(HVR1),但仍具有良好的免疫原性原因是虽然有研究者认为 HVR1 包含一个抗原中和位点,但在 HVR1 后面的一段大的保守区里,第 437a.a 和第 493a.a 也是两个很重要的抗原表位,而且针对这两个抗原表位的抗体水平要远高于针对 HVR1 的抗体水平^[10],另外, HVR1 下游第 528~546a.a 也被认为是重要的 B 细胞抗原表位^[3]。同时, HCV E2 的 HVR1 是免疫选择导致的,使得 HCV 得以逃脱宿主免疫机制的作用,造成 HCV 持续感染。所以针对 HVR1 的抗体是否可以阻断其它 HCV 毒株的感染,还不能肯定。再者,缺失 HVR1 并不影响 E2 蛋白的构型,也不影响 E2 与受体 CD81 的结合。研究表明, E2 蛋白的 480~493 和 544~551 位氨基酸组成的两个肽段与 E2 结合 CD81 有关^[11],因此编码 417~750 位氨基酸的 E2 基因免疫机体有可能产生针对这些区域的抗体从而阻断 E2 与 CD81 的结合,进而阻止 HCV 病毒的侵入。实验结果也证实这段 E2 基因 DNA 免疫可以诱使机体产生较好

的体液和细胞免疫应答。

本文将编码 HCV E2 蛋白 417~750 位 a.a 的基因定向插入真核表达载体 pcDNA3.1(-)载体中,构建了在 CMV 早期启动了控制下的重组 HCV E2 基因真核表达载体 pcE2。通过肌肉注射免疫动物的实验研究发现直接注射重组质粒 pcE2 可以引起动物体内的体液免疫应答和细胞免疫应答。鉴于对小鼠定期剪尾取血或眼球取血较困难,而且也易造成死亡,故选用兔子进行 DNA 免疫体液免疫应答方面的动态研究。定期从免疫兔的耳静脉取血观察抗体产生水平和变化规律,结果显示免疫 20d 时已有抗体产生,40d 时达到高峰,随后抗体水平保持稳定,抗体滴度可达到 1:1600。应用流式细胞检测仪(FACS)检测 DNA 免疫第 35d 的小鼠体内杀伤性 T 淋巴细胞 CD8⁺ 和辅助性 T 淋巴细胞 CD4⁺ 变化情况,发现注射重组质粒 pcE2 的小鼠体内 CD4⁺ 和 CD8⁺ 水平均比注射空载体质粒的对照组小鼠 CD4⁺ 和 CD8⁺ 水平有所升高,尤其 CD8⁺ 水平上升更多,比对照鼠 CD8⁺ 水平升高 35.46%,说明注射重组质粒 pcE2 可以引起免疫动物 T 淋巴细胞,特别是 CD8⁺ T 淋巴细胞的增值。CD8⁺ T 淋巴细胞具有在 CD4⁺ T 细胞和粘附分子的辅助下杀伤感染病毒的靶细胞,从而清除病毒的作用,所以 HCV E2 DNA 免疫有可能诱发机体针对 HCV 的细胞免疫应答,从而清除病毒,达到预防和治疗的目的。应用免疫组化实验证明注射了重组质粒 pcE2 的小鼠肌肉组织中产生阳性表达,且细胞膜部分着色更深。说明直接肌肉注射组 HCV E2 真核表达载体 DNA 到动物体内可以使 CMV 早期启动子控制下的 E2 基因得以表达,很可能是表达的蛋白被肌间隙的 APC,主要为树突状细胞所吞噬,经过一系列细胞内加工而激活 B 细胞及 CTL 前体细胞,或者就是 DNA 直接转染 APC 启动免疫应答。

DNA 疫苗制备简单、方便,性质稳定,优于基因工程蛋白质疫苗和减毒疫苗,而且 DNA 疫苗不表达无关抗原,不形成完整病原体,没有病毒载体疫苗和减毒活疫苗的危险。HCV E2 DNA 免疫动物的研究可以为 HCV 的疫苗研究提供有益的参考。

参考文献

- [1] Whalen R G, Davis H L. DNA-mediated immunization and the energetic immune response to hepatitis B surface antigen[J]. Clin Immunol Immunopathol, 1995, 75:1-12.

- [2] Kaziel M J, Dudley D. Hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the core and envelope regions of HCV[J]. *J Virol*, 1993, 67:7522 - 7528.
- [3] Lee J W, Kim K M, Jung S H, *et al.* Identification of a Domain Containing B-Cell Epitopes in Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein by Using Mouse Monoclonal Antibodies[J]. *J Virol*, 1999, 73:11 - 18.
- [4] Rosa D, Campagnoli S, Moretto C, *et al.* A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorometric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:1759 - 1763.
- [5] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory manual*[M]. 2nded. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [6] Choo Q L, Kuo G, Ralston R, *et al.* Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:1294 - 1298.
- [7] Tang D, Devit M, Johnston S. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response[J]. *Nature*, 1992, 356: 152 - 154.
- [8] Chen H, Pan C, Liao M, *et al.* Screening of protective antigens of Japanese encephalitis virus by DNA immunization: a comparative study with conventional viral vaccines[J]. *J Virol*, 1999, 73: 10137 - 10145.
- [9] 杨莉, 刘晶, 孔玉英, 等. HCV 核心区与 HBV 核心区融合基因的 DNA 免疫[J]. *中国科学(C 辑)*, 1999, 29:246 - 252.
- [10] Tedschi V, Akatsuka T, Shih J, *et al.* A specific antibody response to HCV E2 elicited in mice by intramuscular inoculation of plasmid DNA containing coding sequences for E2[J]. *Hepatology*, 1997, 25:459 - 462.
- [11] Flint M, Maidens C, Loomis-Price L, *et al.* Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81[J]. *J Virol*, 1999, 73:6235 - 6244.