

# HCV 复合多表位抗原基因表达及免疫原性的研究\*

黄建生<sup>1</sup> 解咏梅 林元凯 柯 岫 任大明

(复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

**关键词** 丙型肝炎病毒(HCV), 多表位抗原基因, T/B 细胞表位, 表达

**分类号** Q781 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)03-0268-71

丙型肝炎是常见的传染病之一, 易于慢性化及发展为肝硬化, 且与肝癌的发生关系密切, 目前尚无理想的防治手段。国内外对丙型肝炎疫苗的研究仍处于克隆表达 HCV 部分基因产物或合成短肽以研究体液和细胞免疫效应的阶段, 还没有任何真正有效的疫苗问世。复合多肽疫苗可望预防某种病原体的各个阶段或同时预防多种疾病, 因而被认为是将来疫苗研究的理想方向。我们根据近年来 HCV 各基因产物及其各表位免疫学研究进展, 优选了 5 个高度保守的 T 细胞及/或 B 细胞表位<sup>[1-7]</sup>, 同时加入破伤风类毒素(TT)上的一个 T 细胞激活位点, 各位点间以非极性的甘氨酸和脯氨酸分隔以保持表位的相对独立性, 组合成一个 HCV 复合多表位抗原基因, 并已在大肠杆菌等宿主中获得高效表达。本文报道该 HCV 复合多表位抗原基因的合成、克隆、表达及免疫原性的初步检测结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒:**质粒 pUC119、pWR450-1 及大肠杆菌 TG1 和 JM105 为复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室提供。

表 1 所选择的 T/B 细胞表位的  
来源、氨基酸序列及性质

来源	氨基酸序列及位置	特性
C	MTSTNPKPQRKTKRNTN(1~16)	B
C	DLMGYIPLV(132~141)	T
E1	RNAWDMMMW(317~326)	B
NS3	TGDFDSVID(1445~1453)	B/T
NS5	ELITSCSS(2781~2788)	T
TT	IYSYFPSVD	T

**1.1.2 酶与标记物:**T4 DNA 连接酶、磷酸激酶及限制性内切酶均购自 Promega 公司; IPTG 购自 Sigma 公司; DNA 标志物、HRP-免抗人 IgG 购自华美生物工程有限公司。

**1.1.3 抗 HCV 患者血清:**为广州南方医院传染科姜荣龙博士及上海市第一人民医院谢匡成医生赠送。

**1.1.4 复合多价抗原基因片段的选择:**根据文献报道, 从 HCV 的结构及非结构蛋白中优选了 5 个 HCV T 及/或 B 细胞表位, 其来源、序列及性质见表 1。

### 1.2 方法

**1.2.1 HCV 复合多价抗原基因的设计:**根据大肠杆菌偏爱密码及各表位应基本独立的要求设计 HCV 复合多价抗原因(图略)。

**1.2.2 DNA 片段的合成:**全基因序列共 270bp, 编码 89 个氨基酸, 分成 14 条单链 DNA 片段分别合成, 每条片段长为 34~43nt, 由上海生工生物工程公司合成, 合成的 DNA 片段每管约 4.0OD。

\* 国家自然科学基金资助项目(No.39780002)

作者还有:沈先荣, 谢匡成<sup>2</sup>, 张丽芸<sup>1</sup>, 郭明秋<sup>1</sup>, 李海燕<sup>1</sup>, 张 潜, 许 璋

<sup>1</sup> 第一军医大学; <sup>2</sup> 上海市第一人民医院中心实验室

收稿日期:1998-01-13, 修回日期:1998-04-26

**1.2.3 DNA 片段的拼接:**每管合成 DNA 片段分别溶于 100 $\mu$ L 0.5mol/L NaCl 中,浓度约为 90 $\mu$ mol/L。除片段 F1 和片段 F8 外,其余各片段各取 1 $\mu$ L,分别将 F2 与 F13、F3 与 F12、F4 与 F11、F5 与 F10、F6 与 F9 混在一管中,在各管中分别加入 14 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,2 $\mu$ L 10 $\times$  磷酸激酶(PNK)缓冲液,2 $\mu$ L 10mmol/L ATP,0.5 $\mu$ L T4 PNK;F7、F14 各在一管,分别加入 7 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,1 $\mu$ L 10 $\times$  PNK 缓冲液,1 $\mu$ L 10mmol/L ATP,0.5 $\mu$ L T4 PNK,所有管都在 37 $^{\circ}$ C 反应 30min。在 F7 和 F14 中分别加入 1 $\mu$ L F8 和 F1,再各加 9 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,所有 7 管都沸水浴 20min,而后自然冷却退火至室温(约 10h)。分别混合 F1/F14 与 F2/F13、F3/F12 与 F4/F11、F5/F10 与 F6/F9 与 F7/F8,各加 1 $\mu$ L 10mmol/L ATP,1 $\mu$ L T4 连接酶,20 $^{\circ}$ C 连接过夜;再混合 F1/F14 与 F2/F13 及 F3/F12 与 F4/F11,补充 1 $\mu$ L 10mmol/L ATP,0.5 $\mu$ L T4 DNA 连接酶,12 $^{\circ}$ C 连接过夜;最后混合全部片段,补充 1 $\mu$ L 10mmol/L ATP,0.5 $\mu$ L T4 连接酶,12 $^{\circ}$ C 连接过夜。2% 琼脂糖凝胶电泳回收约 270bp 的目的片段(命名为 PCX),再用 PNK 磷酸化基因的 5' 末端。

**1.2.4 基因的克隆及阳性重组子的筛选:**pUC119 经 Hind III/BamH I 双酶切后,与上述回收的目的片段 PCX 在 12 $^{\circ}$ C 连接过夜,转化 *E. coli* TG1,涂 IPTG/X-gal 平板,培养过夜后挑取白色菌落接种于 3mL LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 10 培养 10h,按常规碱变性方法抽提质粒,0.8% 琼脂糖电泳。取比对照质粒 pUC119 略大的质粒进行 BamH I/Hind III 双酶切,2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

**1.2.5 插入片段的序列分析:**挑取 2 个初选的阳性克隆菌(重组质粒命名为 pUC/PCX),培养后抽提质粒 pUC/PCX,用 pUC119 特异的荧光标记通用引物进行 DNA 自动测序。

**1.2.6 PCX 融合表达载体的构建及高效表达:**用 EcoR I/Pst I 双酶切质粒 pUC/PCX 及质粒 pWR450-1<sup>[8]</sup>,分别回收 PCX 基因及 pWR450-1 的大片段,T4 DNA 连接过夜后转化大肠杆菌 TG1,筛选重组子后用于转化 JM105,挑取单菌落在肉汤培养基(TB)中培养过夜后,按 1% 接种量接种到 2mL TB 中培养,于 4h 加 IPTG 至终浓度为 1mmol/L,4h 后分别收菌 1mL,离心后加 0.1mL 1 $\times$  SDS 蛋白质上样缓冲液,煮沸 10min 后取 20 $\mu$ L 上样,12% SDS-PAGE。

**1.2.7 融合蛋白质包涵体的纯化与溶解:**参照文献[9]进行,目的蛋白命名为 GZ-PCX,载体表达的  $\beta$ -半乳糖苷酶为 GZ。

**1.2.8 Western blot 检测融合蛋白质与 HCV 患者血清反应的免疫特异性:**Western blot 方法参照文献[9]。抗 HCV 患者血清(抗 HCV Ab+ 及 HCV RNA+)为上海第一人民医院提供(临床检测确定),以 1:4 稀释,二抗为 HRP-兔抗人 IgG,以 1:1000 稀释。

**1.2.9 ELISA 分析融合抗原与各类 HCV 抗血清反应:**ELISA 方法参照文献[8]。上述纯化的包涵体蛋白质裂解上清(纯度 87%,约 0.4mg/mL GZ-PCX)以 1:10 包被,抗 HCV 患者血清以 1:2 稀释,二抗为 HRP-兔抗人 IgG,以 1:2000 稀释,反应结束后在 Model 450 酶标仪(BIORAD)上测 D(490)。以未加抗体孔为阴性对照(N),其它孔测定的 D(490)值用 P 表示,阳性判断以  $P/N \geq 2.1$  为标准。

## 2 结果

### 2.1 HCV 复合多价基因抗原表位计算机分析结果

为了使设计方案更加可靠,用 PCGENE 软件对复合抗原进行多参数综合分析。氨基酸亲水性及侧链易曲性是衡量抗原性的两大指标<sup>[10]</sup>。Van Regenmortel 易曲性分析(图略)表明几个抗原表位均显示独立的区域性,这是它们形成独立的抗原决定簇所必须的。Hoops 和 Woods 亲水性分析发现亲水性最高的三个位点(最高处为第 22、23 位氨基酸,在此方法中最高点的预测可靠性为 100%)都位于第 16 和 28 位氨基酸之间,这一段正是 HCV 核衣壳蛋白上的 B 细胞表位(图略),而这种高亲水性对于 B 细胞表位激发良好的体液免疫应答至关重要。二级结构分析显示复合抗原中可以形成  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -片层、 $\beta$ -转角等结构(图略),提示具有形成 T 细胞位点的倾向,易于诱导 T 细胞介导的细胞免疫应答。

### 2.2 HCV 复合多价抗原基因的拼接和克隆

按材料与方法中的分步退火连接方案将 14 条单链 DNA 片段拼接,经电泳分离纯化并克隆到载体

pUC119 中,转化子经 HindⅢ 和 BamHⅠ 双酶切后,2%琼脂糖电泳可见 270bp 的阳性克隆,与设计相符。

2.3 序列分析结果

利用 pUC119 上的通用荧光标记引物和进行 DNA 自动测序,2 个克隆中有一个在 120 位处少一个 T,另一个的序列则完全符合原始设计(图略)。

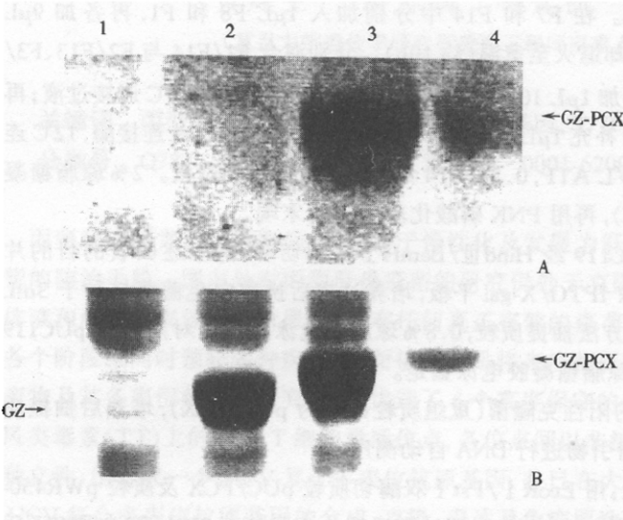


图 1 GZ-PCX 蛋白的 Western blot(A)与对应 SDS-PAGE(B)  
1 JM105; 2 pWR450-1/JM105; 3 pWR/PCX/JM105;  
4 GZ-PCX purified inclusion body supernatant.

2.4 GZ-PCX 融合蛋白的表达结果

无论是载体表达 GZ(64ku)或重组质粒表达 GZ-PCX(72ku),均在转接后 4h 加 IPTG 诱导后表达量最高,表达量约为 50%,而未诱导则无表达,包涵体经裂解后,获得纯度为 87%的 GZ-PCX 溶解上清(见图 1)。

2.5 Western blot 结果

图 1 显示,抗 HCV 患者血清可特异识别 GZ-PCX 融合蛋白,而不识别同样高效表达的载体所表达的 GZ 蛋白(与蛋白电泳图对照)。

2.7 ELISA 结果

表 2 为 GZ-PCX 与各类 HC 患者血清的反应结果,发现所有 18 个 HC 血清标本(HCV Ab+ RNA+, Ab+ RNA-, Ab- RNA+)中阳性率高达 16/18,可疑阳性 1/18,其

中抗 HCV Ab 阳性的血清阳性率为 10/10,来自广州的 2 例血清(表中 Ab+ RNA+ 的 1 及 2)均为阳性,而 HCV Ab-RNA-血清对照阳性率为 2/10,说明该 GZ-PCX 与抗 HCV 抗体的良好免疫反应特异性。

表 2 GZ-PCX 蛋白与 HC 患者血清反应的 ELISA 结果

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
Ab+ RNA+	0.42 (+)	0.68 (+)	0.64 (+)	0.76 (+)	0.16 (+)	0.42 (+)	0.39 (+)				0.44 (+)
Ab+ RNA-	0.70 (+)	0.55 (+)	0.61 (+)								0.62 (+)
Ab- RNA+	0.28 (+)	0.12 (±)	0.57 (+)	0.41 (+)	0.39 (+)	0.32 (+)	0.28 (+)	0.09 (-)			0.31 (+)
Ab- RNA-	0.28 (+)	0.06 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0.04 (-)	0.03 (-)	0.03 (-)	0.05 (-)	0.22 (+)	0.07

3 讨论

针对 HCV 的高度变异性,我们在 HCV 基因表达产物中优选了 5 个高度保守表位<sup>[1~7]</sup>,分别来自核心蛋白(1~16,132~141),E1(126~135),NS3(139~147)及 NS5(768~775),由于这些表位在 6 型 HCV 中均高度保守,而且多已被证实具有良好的 T 及/或 B 细胞激活能力,因此把这些表位设计组合成一个复合多表位抗原基因,可望诱发良好的免疫应答。为了增强复合抗原的免疫原性,在复合抗原中还加入了 TT 的一个 T 细胞激活位点。因此该复合基因所表达的抗原可望能对不同型、不同株的 HCV 提供保护作用,在理论上应该优于目前采用 PCR 技术扩增来制备 HCV 疫苗的方法。

整个基因的设计充分考虑到 HCV 本身免疫的特点,特别强调 HLA 限制的 CTL 作用对 HCV 疫苗

免疫应答的影响。因此我们在 HCV 基因组中优选了 4 个 T 细胞表位(其中 1 个为 T/B 细胞表位, 另一个 T 细胞表位含有 NS5 上的一个 B 细胞表位的部分序列)及一个破伤风类毒素(TT)外源刺激表位, 可被 HLA-A2 等限制的 CTL 所识别<sup>[1,3~6,11]</sup>, 为复合疫苗激发有效免疫应答打下良好的基础。

结果显示, 我们在大肠杆菌中高效表达了目的基因, 其表达产物显然具有良好的 HCV 免疫特异性, 其检测 HCV 的阳性率高达 90% 以上, 且可同时被不同地理株的 HCV 抗体所识别。至于“假阳性率”为 20%, 可能原因是所检测的血清均为临床怀疑为“丙肝”的血清, 目前用 PCR 及免疫反应未能敏感检出而可能导致假阴性结果, 这将进一步说明该抗原的优越性, 符合设计思路, 但也不能完全排除假阳性结果。现我们已收集了大量的 HCV 血清样品, 准备深入研究该 HCV 复合抗原的免疫特异性。Western blot 的结果进一步证实抗 HCV 抗体识别的并非  $\beta$ -半乳糖苷酶(GZ), 而是所设计的 HCV 细胞表位。

本研究的主要目的在于为研制一种高效、安全、价廉、方便、多价的 HCV 疫苗提供一定的理论及实验依据, 进一步的动物实验正在进行中。

### 参 考 文 献

- [1] Erickson A L, Houghton M, Choo Q L *et al.* *J Immunol*, 1993, **151**(8): 4189~4199.
- [2] Lin HJ, Lau JY, Lauder IJ *et al.* *Virus Res*, 1993, 3027~41.
- [3] Shirai M, Okada H, Nishioka M *et al.* *J Virol*, 1994, **68**: 3334~3342.
- [4] Shirai M, Arichi T, Nishioka M *et al.* *J Immunol*, 1995, **154**:2733~2742.
- [5] Battegay M, Fikes J, Bisceglie A M *et al.* *J Virol*, 1995, **69**(4):2462~2470.
- [6] Weiner A, Eriskson A L, Kansopon J *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**:2755~2759.
- [7] Sienoneit K, Silva M D, Koerner K *et al.* *Clin Exp Immunol*, 1995, **101**:278~283.
- [8] Huang J S, Wang C C, Ren Daming *et al.* *J Med Col Pla*, 1997, **12**(2):166~171.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *Molecular Cloning* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 18~60.
- [10] Hopp T P, Woods K R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**: 3824~3828.
- [11] 黄建生, 郭明秋. 国外医学免疫学分册, 1996, **5**:273~274.
- [12] Melen R H, Casal J I, Dalsgaard K *et al.* *Vaccine*, 1995, **13**(10):885~886.

## EXPRESSION OF A HCV MULTI-EPITOPES ANTIGEN GENE AND STUDY ON ITS IMMUNOGENICITY\*

Huang Jiansheng Xie Yongmei Lin Yuankai Ke Shen Ren Daming  
(State key laboratory, Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433)

**Abstract** Due to the hypervariable character of hepatitis C virus (HCV), 5 conserved T and/or B cell epitopes from core, envelope, NS3 and NS5 protein of HCV were chosen to form a 270bp multi-epitopes antigen gene. The gene was clone into a fusion vector pWR450-1 to express a  $\beta$ -galactosidase-HCV hybrid protein GZ-PCX. The purified GZ-PCX protein was specifically recognized by human anti-HCV antibodies. These results show that the HCV hybrid multi-epitopes antigen has excellent immunogenicity, which might be able to be used as an effective diagnosis agent and to provide protectivity to any genotype of HCV which might partly solve the problems in the researches of HCV vaccines.

**Key words** Hepatitis C Virus (HCV), Multi-epitopes antigen gene, T/B cell epitopes, Expression

\* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No. 39780002)