

• 论 著 •

DsbC 介导 HCV 优势抗原表位原核可溶性表达与间接 ELISA 分析^{*}

肖彭莹¹, 黄国红¹, 王丽君¹, 孙卫国², 张灵霞², 侯江厚^{1△}

1. 昆明市妇幼保健院妇女保健部, 云南昆明 650013; 2. 解放军总医院第八医学中心结核病研究所, 北京 100091

摘 要: **目的** DsbC 蛋白与丙型肝炎病毒(HCV)优势抗原表位原核融合表达并纯化, 获得一种特异优良的 HCV 血清抗体诊断抗原。 **方法** 通过生物信息学软件, 筛选我国 HCV 主要流行株优势抗原片段并进行串联融合形成组合肽命名为 P367, 将 P367 与 DsbC 蛋白进行融合后在原核系统内可溶性表达并纯化获得重组抗原 DsbC-P367, 建立 HCV-IgG 血清学检测方法, 通过对 HCV 阴阳性血清的检测, 评价 DsbC-P367 与 P367 在血清学诊断差异, 获得一种新型 HCV-IgG 血清学诊断抗原制作方法。 **结果** 通过信息学软件筛选获得的优势抗原表位来源于不同基因型, 全长 367 个氨基酸。通过原核表达系统发现, DsbC-P367 以可溶性表达形式存在, 亲和纯化后其相对分子质量为 63×10^3 , 纯度为 92%, Western blot 实验初步证实重组 DsbC-P367 与 P367 蛋白均具有抗原性; 对 100 份明确 HCV 阴阳性血清进行检测, DsbC-P367 与 P367 灵敏度分别为 96%、90%, 特异度均为 100%, 与“金标准”比较, McNemer 检验显示均 $P=1.00$, Kappa 分别为 0.95、0.87, 提示 DsbC-P367 相对于 P367 具有更优的灵敏度。 **结论** 重组获得的 DsbC-P367 融合肽在 HCV 血清学抗体检测中具有较好的灵敏度和特异度, 可开发为 HCV-IgG 体外诊断试剂盒用于 HCV 感染的实验室诊断。

关键词: 丙型肝炎病毒; 抗原表位筛选; DsbC 蛋白; 间接酶联免疫吸附试验

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.01.012

中图法分类号: R373.21

文章编号: 1673-4130(2023)01-0063-05

文献标志码: A

Soluble expression of HCV dominant antigen epitope in prokaryotic system mediated by DsbC protein and its indirect ELISA analysis^{*}

XIAO Pengying¹, HUANG Guohong¹, WANG Lijun¹, SUN Weiguo²,
ZHANG Lingxia², HOU Jianghou^{1△}

1. Women's Health Department, Kunming Maternal and Child Health Hospital, Kunming, Yunnan 650013, China; 2. Army Tuberculosis Prevention and Control Key Laboratory, the Eighth Medical Center of General Hospital of PLA, Beijing 100091, China

Abstract: **Objective** To obtain a specific and excellent hepatitis C virus (HCV) serum antibody diagnostic reagent by expressing and purifying of HCV dominant antigen epitopes fused with DsbC protein. **Methods** Through bioinformatics software, the dominant antigen fragments of major HCV epidemic strains in China were screened and fused in tandem to form a combined peptide named P367. After the fusion of P367 and DsbC protein, the recombinant antigen DsbC-P367 was obtained by soluble expression and purification in prokaryotic system. HCV IgG serological detection method was established. The difference between DsbC-P367 and P367 in serological diagnosis was evaluated through the detection of HCV positive and negative serum, and a new method for preparing HCV IgG serological diagnostic antigen was obtained. **Results** The dominant epitopes obtained by informatics software were from different genotypes, with a total length of 367 amino acids. Through prokaryotic expression system, it was found that DsbC-P367 existed in soluble expression form. After affinity purification, its relative molecular weight was 63×10^3 , and its purity was 92%. Western blot test results preliminarily confirmed that both recombinant DsbC-P367 and P367 proteins had antigenicity. The sensitivity of DsbC-P367 and P367 was 96% and 90% respectively, and the specificity was 100% when 100 positive and negative HCV sera were detected. Compared with the "gold standard", McNemer test showed that all $P=1.00$, Kappa were 0.95 and 0.87 respectively, suggesting that DsbC-P367 had better sensitivity than P367. **Conclusion** The recombinant DsbC-P367 fusion peptide has good sensitivity and specificity in the detection of HCV serological antibodies, and could be developed as an in vitro diagnostic kit for HCV IgG for laboratory diagnosis of HCV infection.

^{*} 基金项目: 昆明创新团队项目(2019-1-R-23676); 国家科技重大专项项目(2017ZX10201301-007)。

作者简介: 肖彭莹, 女, 副主任医师, 主要从事妇科方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: houjianghou2009@163.com。

Key words: hepatitis C virus; epitope screening; DsbC protein; indirect enzyme-linked immunosorbent assay

丙型肝炎病毒(HCV)的抗体检测目前仍是诊断 HCV 慢性感染和进行献血员筛查的主要方法。随着技术方法的进步, HCV 抗体检测试剂已发展到第三代, 抗原主要组成为结构区 C 蛋白、非结构区 NS3 及 NS5 区重组抗原, 虽然检测的灵敏度得到很大提高, 但由于抗原序列包含有较多非保守性序列, 导致特异度不强^[1], 需要通过生物信息学的方法筛选特异度强优势保守抗原序列。同时 HCV 感染具有异质性特点, 存在不同的基因型和亚型, 同一型各片段抗原性存在差异, 其相应的抗体在体内出现的时间、持续状态及意义有一定的差别^[2], 在进行抗原筛选时, 从我国的主要基因型 1b、2a 和 6a 出发, 从不同 HCV 基因序列不同片段中挑选优势的编码抗原, 是进行抗体检测成功的关键。原核系统因为自身的缺陷, 在重组外源蛋白时, 存在表达量低和容易形成包涵体的缺点, 二硫化物异构酶 DsbC 作为伴侣分子, 不但可以提高重组蛋白的正确折叠, 促使外源蛋白可溶性形式存在, 还能提高目的蛋白的表达水平和生物活性^[3]。在本研究中, 从 HCV 的结构蛋白与非结构蛋白中, 通过生物信息学的方法, 筛选出尽可能多并且特异度强的抗原表位, 进行串联形成抗原肽, 在原核系统内进行重组表达, 同时以 DsbC 作为融合分子进行融合表达, 纯化两组蛋白, 评价两组抗原融合肽在 HCV 感染者血清诊断中的灵敏度和特异度, 评价 DsbC 蛋白作为伴侣分子在重组抗原血清学诊断上提高其灵敏度、特异度和生物活性中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 原核表达载体 pET-DsbC、pET-28a 和宿主感受态 BL21(DE3)由解放军总医院第八医学中心(下称八中心)实验室制作保存; 限制性内切酶 Nde I、HindⅢ和 Xho I 及 T4 DNA 连接酶均购自美国 NEB 公司。质粒小提试剂盒、DNA 凝胶回收和 PCR 产物回收试剂盒为国产天根生物科技公司产品; His 标签亲和树脂购为 GE 公司产品, 自行灌装纯化柱; 山羊抗人 IgG(HRP 标记)为索莱宝生物公司产品, 酶联免疫吸附试验(ELISA)法抗体检测试剂盒购于北京飞凯生物技术公司。100 份 HCV 阳性血清来源于昆明市妇幼保健院和八中心血液科血清库。100 份 HCV 阴性血清(血液抗-HCV 阴性; 血液 HCV RNA 阴性)来源于八中心体检中心。ELISA 法严格按照生物安全有关规定操作, 遵循实验室操作的常规规定。

1.2 方法

1.2.1 HCV 优势抗原表位信息学筛选策略 HCV 病毒核心蛋白 C、非结构蛋白 NS3、NS4 和 NS5 区拥有保守的免疫显性区域^[4], 其中 HCV 核衣壳蛋白 C 与 NS3 蛋白在 HCV 多种基因型中最为保守^[5]。以我国 HCV 主要基因型 1b(GenBank: ACJ37239.1)、2a(Gen-

Bank: AGZ91309.1)、6a(GenBank: BBH 48831.1) 型为分析对象, 综合考虑亲水性、柔韧性、表面可及性和抗原指数, 采用 Emini Surface Accessibility Prediction、Karplus & Schulz Flexibility Prediction、Kolarik & Tongaonkar Antigenicity 和 Parker Hydrophobicity Prediction 等算法筛选优势表位, 通过在线 Blast 分析序列的保守性, 剔除特异度低的部分, 结合文献[6-8], 选取 HCV 的 C 蛋白和 NS3 蛋白的部分序列为主要骨架, 加入 NS4 和 NS5 优势抗原肽段组成待检测的抗原肽, 在短肽之间加入 GSG 或者 AAY 进行串联, 命名为 P367。序列提交北京华大基因进行合成, 对应的核酸 N 端加入限制性酶切位点 HindⅢ-Nde I, C 端加入终止密码子 TAA 和限制性酶切位点 Xho I 序列, 合成编号为 WHC2112223。

1.2.2 pET-P367、pET-DsbC-P367 表达载体的构建与鉴定 将合成的克隆载体 pUC-P367 菌株进行扩大培养后, 提取克隆载体, 然后分别以限制性内切酶 HindⅢ与 Xho I、Nde I 与 Xho I 进行双酶切, 用 DNA 电泳凝胶回收试剂盒回收融合基因片段 P367, 将回收的双酶切片段分别与对应双酶切的表达载体 pET-DsbC、pET-28a 进行连接, 热激法转化表达宿主感受态细胞 BL21(DE3), 涂含有卡那抗性固体平板 37 ℃ 隔夜培养, 挑选灰白色光滑菌落转接到含有 50 μg/mL 卡那霉素的 5 mL LB 培养基中激活, 选取阳性克隆送华大基因进行测序以确保阅读框的正确。

1.2.3 HCV P367 抗原肽原核重组表达与纯化 将筛选到的阳性克隆菌株 pET-P367、pET-DsbC-P367 接种于 LB 培养基中(含卡那霉素 50 μg/mL), 37 ℃ 振荡培养过夜。然后按照 1:50 的比例接种到 100 mL LB 培养基中(含卡那霉素 50 μg/mL), 37 ℃ 振荡培养 3~4 h; 再按照 1:20 的比例接种到 1 000 mL LB 培养基中(含卡那霉素 50 μg/mL), 37 ℃ 振荡培养到吸光度(A_{600})值为 0.6 时, 加入诱导剂异丙基硫代半乳糖苷(IPTG), 终浓度为 0.5 mmol, 37 ℃ 恒温摇床震荡诱导 7 h, 收集 1 mL 菌液, 12 000 r/min 离心 2 min。沉淀重悬于 400 μL 的 1×SDS 上样缓冲液中, 沸水浴 5 min, 取 20 μL 进行 12% SDS-PAGE 胶电泳。

4 ℃ 条件下以 6 000 r/min 离心收集表达菌体, 1×PBS 悬浮混匀冰育, 置于冰水状态下进行超声碎菌。高速离心分离上清和沉淀, 由于 P367 以包涵体形式存在, 采用柱上复性复性的方法对 P367 进行纯化, 取包涵体以 1% triton-100 洗涤两次, 以 7 mol 尿素+PBS 充分溶解包涵体, 高速离心后取上清以 2 mL/min 缓慢结合镍离子螯合的亲合层析柱, 缓慢柱流速 PBS 溶液进行柱上复性, 以 50 mmol 咪唑+PBS 洗脱除去杂蛋白、以 120 mmol 咪唑+PBS 洗脱收集

复性后的融合肽 P367;取 DsbC-P367 融合蛋白表达后超声上清,同样以镍离子螯合的亲层析柱进行亲和纯化,以 80 mmol 咪唑+PBS 洗脱除去杂蛋白、以 150 mmol 咪唑+PBS 洗脱收集复性后的融合肽 DsbC-P367。两组纯化的样品分别取 20 μ L 变性后进行 12% SDS-PAGE 电泳分析融合蛋白的纯度,终产品以水透析除去咪唑和盐离子,冰干保存。

1.2.4 DsbC-P367、P367 多表位抗原融合肽抗原性 Western blot 分析 纯化后的 DsbC-P367、P367 蛋白以 PBS 配制成 1 mg/mL 的母液,各取 5 μ L 煮沸变性,12% SDS-PAGE 电泳后半干法转移(恒压 20 V, 30 min)至硝酸纤维素膜(NC 膜)上。5%脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h,37 $^{\circ}$ C 条件下与 1:50 稀释 HCV 阴阳性血清后孵育 1 h,以 PBS 震荡洗膜 5 次,再以 HRP 标记的羊抗人 IgG 孵育 1 h,同样震荡洗涤 5 次,ECL 暗室自动曝光显影分析 DsbC-P367、P367 蛋白的抗原性及其特异度。

1.2.5 HCV 两组融合肽 DsbC-P367、P367 最佳包被浓度 为了验证两组不同融合肽在血清 HCV-IgG 抗体检测的最佳包被浓度,采用浓度等比梯度对两组重组融合肽进行稀释,以用碳酸盐缓冲液将纯化的重组蛋白 DsbC-P367、P367 稀释为 1.0、2.5、5.0、10.0 及 20.0 μ g/mL,分别取 100 μ L 包被酶标板,37 $^{\circ}$ C 包被 2 h,除去包被液,加入 150 μ L 封闭液 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h,甩干封闭液,洗涤 5 次;每孔加 PBS 和待测稀释血清各 50 μ L,每个样品设置两个平行孔,空白孔不加液体,37 $^{\circ}$ C 温育 30 min,洗涤 5 次,拍干;加入 HRP 标记山羊抗人 IgG(1:5 000),37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min 后洗涤;每孔加入底物液 A 和 B 各 50 μ L,轻拍混匀,37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 min;加入 2 mol/L H_2SO_4 终止液 50 μ L 进行终止反应,酶标仪 450 nm 波长下测定各孔 A 值,选用 P/N 值最大(P 为标准阳性血清 A_{450} ;N 为标准阴性血清 A_{450})时的条件为最佳反应条件。

1.2.6 HCV 两组融合肽 DsbC-P367、P367 血清抗体间接 ELISA 差异分析 为了验证两组不同融合肽在血清 HCV-IgG 抗体检测的差异性和可行性,采用间接 ELISA 实验进行验证。血清样本为经过“金标准”筛选的阴阳性血清,同时以成熟的商品化试剂盒进行比较。将 DsbC-P367、P367 两种融合肽以包被缓冲液均稀释成 10 μ g/mL,ELISA 每孔包被 100 μ L。ELISA 实验步骤同方法 1.2.5。

1.2.7 DsbC-P367、P367 间接 ELISA 特异度、灵敏度和符合率分析 将 100 份明确 HCV 阳性血清和 100 份明确 HCV 阴性血清以商品化 HCV-IgG-ELISA 法检测试剂盒进行复检,操作方法严格遵照说明书进行,同上述实验同批同时操作,检测 A 值,分析获得的两组重组蛋白用于 ELISA 血清抗体检测中体现出的灵敏度、特异度和相对试剂盒的符合率。

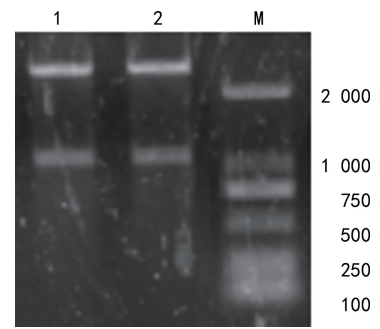
1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行统计分析;散点图用 GraphPad Prism 5.00 软件绘制;

ELISA 测定的 A 值分布进行 Wilcoxon 检验;cut off 值以阴性结果 A 值均值 2.1 倍作为临界值。用 McNemer 检验及 Kappa 一致性检验评价不同检测方法的一致性,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HCV 优势抗原表位生物信息学分析与筛选、串联 以我国 HCV 的 1b、2a 和 6a 型为分析对象,通过对其抗原优势表位的预测,结合 BLAST 保守性分析,选择的抗原序列为:HCVC(1b) aa1~60、NS3(1b) aa1201~1301、NS4A(1b) aa1~30、NS4A(2a) aa1~30、NS5A(2a) aa2272~2331 等 5 个抗原区域作为优势抗原表位组合框架,并在合成的 C 端补充加入 NS3(1b) VDFIPVEGDPTTMR、Core(6a)PALSTGLIH、NS4A(2a) SIIGRLHINQRTVVAP、NS4B(1b) SRGNHVSPTHYVPESDA、E2(1b) YEVRNVS-GVYH 5 种抗原短肽,短肽之间以 AAY 或 GSG 相连。合成的序列命名为 P367,核酸两端加入相应的酶切位点和终止密码子序列。

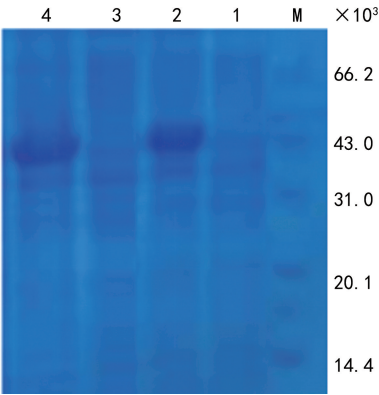
2.2 DsbC-P367、P367 融合肽表达载体的构建与鉴定 全序列合成的克隆载体 pUC-P367 分别以限制性内切酶 HindIII 与 Xho I、Nde I 与 Xho I 进行双酶切,UV 灯下观察片段大小,融合肽 P367 含有 367 个 aa,对应核酸大小为 1 100 bp(图 1),两组双酶切产生的核酸片段大小均在 1 100 bp,符合预期。将双酶切的核酸片段 P367 进行胶回收后,克隆到原核表达载体 pET-DsbC、pET-28 上。



注:M 为标志物;1 为双酶切载体 pUC-P367(HindIII 与 Xho I);2 为双酶切载体 pUC-P367(Nde I 与 Xho I)。

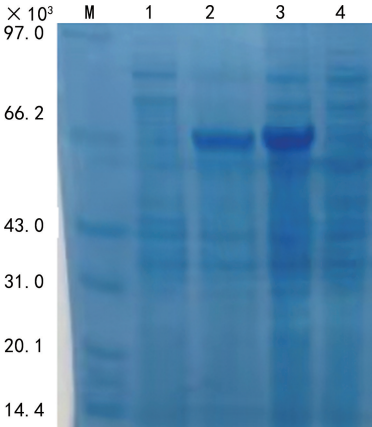
图 1 pUC-P367 双酶切核酸电泳鉴定

2.3 HCV 优势表位融合肽 DsbC-P367、P367 原核重组表达与纯化 对 DsbC-P367、P367 两组融合蛋白进行小样表达,SDS-PAGE 结果发现,两组蛋白在原核系统均获得高效表达,相对分子质量分别为 43.0×10^3 与 65.0×10^3 (图 2、3),与预期一致。超声破碎后发现,P367 融合肽主要以包涵体形式存在,而 DsbC-P367 融合肽大部分以可溶形式存在超声上清中,实验结果符合实验设计预期,对两组重组蛋白分别采用包涵体柱上复性和上清亲和纯化,SDS-PAGE 电泳发现,经亲和纯化后,P367 融合肽纯度分别为 92%;DsbC-P367 融合肽纯度为 90%(图 4、5),符合后续血清学抗体 ELISA 实验要求。



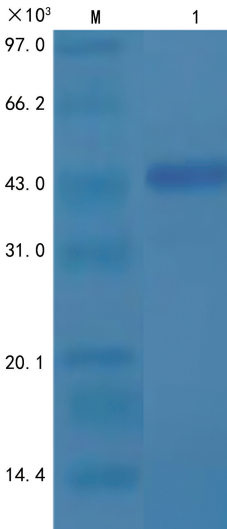
注: M 为低分子量蛋白标准; 1 为未诱导的全菌体; 2 为诱导 P367 全菌体蛋白; 3 为超声破碎后上清; 4 为超声破碎后沉淀。

图 2 P367 融合肽原核表达形式电泳鉴定



注: M 为低分子量蛋白标准; 1 为未诱导的全菌体; 2 为诱导 DsbC-P367 全菌体蛋白; 3 为超声破碎后上清; 4 为超声破碎后沉淀。

图 3 DsbC-P367 融合肽原核表达形式电泳鉴定



注: M 为低分子量蛋白标准; 1 为复性后 P367 融合肽。

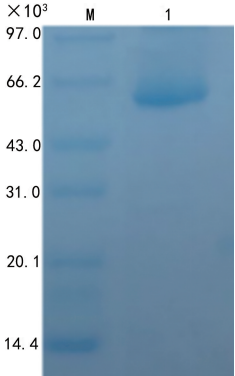
图 4 P367 融合肽柱上复性纯化电泳鉴定

2.4 DsbC-P367、P367 融合肽抗原性 Western blot 实验结果 纯化后 DsbC-P367、P367 两组融合肽均可与 HCV-IgG 阳性血清发生特异性反应, 通过 Western blot 实验初步鉴定了两组蛋白的抗原性。实验中以 HCV 阳性血清作为一抗, HRP 标记的山羊抗人 IgG 为二抗, 暗室曝光后在 NC 膜出现单一的条

带, 分子量同预期一致(图 6), 阴性对照无条带显现。

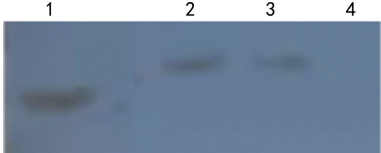
2.5 HCV 两组融合肽 DsbC-P367、P367 最佳包被浓度确定 通过 ELISA 实验检测两组不同融合肽在血清 HCV-IgG 抗体检测的最佳包被浓度, 对抗原浓度进行等比梯度稀释, 实验结果确定 DsbC-P367、P367 最佳包被浓度均为 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$, P/N 值最大。实验结果见表 1。

2.6 DsbC-P367、P367 血清抗体间接 ELISA 实验分析结果 以获得的两组融合肽作为包被抗原建立间接法 ELISA 试剂, 分别对明确 HCV 阳性样本和阴性样本各 100 份进行检测。参照文献, 实验中 cut off 值设为阴性血清的 A 值均值 2.1 倍。实验结果发现, DsbC-P367 阳性样本 A 值分布为 (1.680 ± 0.068) ; P367 阳性样本 A 值分布为 (1.574 ± 0.047) ; 阴性血清样本 A 值分布为 (0.094 ± 0.009) ; cut off 值为 0.197。采用 SPSS22.0 统计分析, McNemer 检验显示: DsbC-P367 融合肽与确定阳性样本比较, $P = 1.00$, Kappa = 0.950; P367 融合肽与确定阳性样本比较, $P = 1.00$, Kappa = 0.910。采用商品化试剂盒检测对样本血清进行复检, 结果检出阳性 92 份, 假阳性 7 份, 其 McNemer 检验 $P = 1.00$, Kappa = 0.910。所得数据分析见图 7。



注: M 为低分子量蛋白标准; 1 为亲和纯化后 DsbC-P367 融合肽。

图 5 DsbC-P367 融合肽亲和纯化电泳鉴定



注: 1 为 P367; 2、3 为 DsbC-P367; 4 为无关蛋白阴性对照。

图 6 DsbC-P367、P367 融合肽抗原性 Western blot 分析

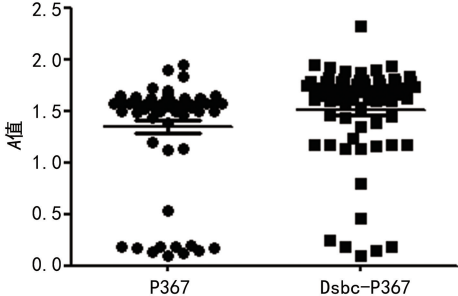


图 7 DsbC-P367 与 P367 融合肽在 HCV 阳性血清学诊断分析

表 1 DsbC-P367、P367 蛋白最佳包被浓度的确定($\bar{x}\pm s$)

抗原包被浓度($\mu\text{g/mL}$)	DsbC-P367			P367		
	标准阴性血清 (A_{450} 值)	标准阳性血清 (A_{450} 值)	P/N 值	标准阴性血清 (A_{450} 值)	标准阳性血清 (A_{450} 值)	P/N 值
1.0	0.080 $\pm$ 0.012	0.665 $\pm$ 0.079	8.31	0.078 $\pm$ 0.013	0.574 $\pm$ 0.054	7.35
2.5	0.087 $\pm$ 0.011	0.964 $\pm$ 0.075	11.08	0.083 $\pm$ 0.012	0.860 $\pm$ 0.051	10.36
5.0	0.092 $\pm$ 0.011	1.213 $\pm$ 0.074	13.15	0.089 $\pm$ 0.011	1.186 $\pm$ 0.051	13.32
10.0	0.094 $\pm$ 0.009	1.680 $\pm$ 0.071	17.87	0.091 $\pm$ 0.011	1.574 $\pm$ 0.047	17.30
20.0	0.120 $\pm$ 0.009	1.697 $\pm$ 0.068	14.14	0.113 $\pm$ 0.010	1.591 $\pm$ 0.041	14.04

2.7 DsbC-P367、P367 间接 ELISA 特异度、灵敏度与符合率 间接 ELISA 测定结果发现,DsbC-P367 与 P367 针对明确阳性血清检出样本数分别为 96、90,其灵敏度分别为 96.0%与 90.0%;相对于阴性对照血清检出的假阳性均为 0,其特异度均为 100.0%,提示 DsbC-P367 与 P367 两种融合肽均可作为诊断抗原用于血清学抗体诊断。采用商品化试剂盒检测对样本血清进行复检,结果检出阳性 92 份,假阳性 7 份,所得数据分析见表 2。结果表明,HCV DsbC-P367 抗原融合肽在血清学检测中灵敏度和特异度均优于商品试剂盒,而 P367 抗原融合肽的检测效果于目前市场上检测试剂盒检出率和灵敏度大致相当。

表 2 DsbC-P367、P367 特异度、灵敏度与符合率比较

项目	阳性血清 ($n=100$)	阴性血清 ($n=100$)	特异度 (%)	灵敏度 (%)	符合率 (%)
DsbC-P367	96	0	96.0	100.0	98.0
P367	90	0	90.0	100.0	95.0
试剂盒	92	7	92.0	93.0	92.5

3 讨 论

目前直接抗病毒(DAAs)治疗方法对抗 HCV 感染非常有效,精确诊断和实验室快速鉴别是实现世界卫生组织 2030 年消除病毒性肝炎目标的关键。HCV-RNA 检测作为 HCV 感染临床诊断的金标准已得到了广泛地认可,但由于其价格昂贵,检测时间较长,且不适用于 HCV 感染的初筛实验,血清学检测任然具有广泛的应用价值^[9]。由于 HCV 是一种高度异质性的 RNA 病毒,不同地区不同基因型的 HCV 毒株,在核苷酸序列和氨基酸序列上都有很大的不同,从而会影响到相应蛋白的性质和功能。我国 HCV 主要流行亚型为 1b、2a 和 6a^[10]。需要综合考虑三种主要流行亚型的优势抗原表位去提高抗体检测的敏感性,目前常用的抗体检测试剂都使用 3~6 种重组抗原或合成肽,缺点是增加了非特异性而出现较多假阳性,这就需要通过多表位 HCV 诊断抗原的筛选加上除去非保守氨基酸序列来完成。

HCV 核心多肽(C)抗原性较强,在 HCV 感染早期即可产生抗核心抗体^[11]在各种基因型 HCV 中最为保守,其核心区的优势表位主要集中在氨基端^[12],选择 1b 型 N 端 1~60 位氨基酸,基本包含了核心蛋

白大部分疏水区和几乎所有的重要表位;HCV 感染者体内抗-NS3 出现较早并且持续时间长,NS3 蛋白具有强抗原性,在能产生较高滴度的特异性抗体^[13],选择 1b 型 NS3 蛋白的 1 201~1 301 位氨基酸;早期研究发现,1 型的 NS4 抗原对于 2、3 型抗-HCV 抗体检测缺乏敏感性^[14],在选择抗原时加入了 2a 型的 NS4A、NS4B;NS5a 区的高免疫原区位于氨基酸残基 2182~2343 的位置(162aa)^[2],通过在线 Blast 剔除非保守序列后选择 2 272~2 331 表位氨基酸抗原。为了提高抗体检测的灵敏度,在抗原选择时,通过软件结合多种筛选算法,筛选出 5 组优势抗原短肽,放置在合成序列的 C 端,极大提高了检测的灵敏度。实验室前期试验也已经验证,在重组抗原中含有这 5 种优势短肽时,检测的灵敏度从 86.0%提高到 92.0%。

在原核重组时,蛋白质折叠是生物功能和重组蛋白生产的核心,空间结构正确的形成是重组蛋白生物活性的保证,DsbC 蛋白作为二硫键异构酶,在原核重组的过程中扮演重要角色,不仅可以促进二硫键正确的配对,还可以让错误折叠的蛋白重新异构化形成正确的空间构象^[15]。PALENZUELA 等^[16]推论 NS3 蛋白所表现出的高免疫原性很可能是由构象型表位引起。为了促使 NS3 区构象型空间表位的形成和保持,在融合表达 HCV 抗原时,融合肽大都选择 GST 或者 Trx 蛋白^[7,17],它们在提高抗原可溶性上可能起到一些作用,但相对于目的蛋白生物活性的提高和保持,明显 DsbC 蛋白作用更为优势。其不仅提高了目的蛋白 P367 的表达量和可溶性,同时,DsbC-P367 的检测灵敏度从融合前的 90.0%提高到 96.0%。

研究已证实,单一结构抗原在血清学抗体诊断上明显灵敏度不足,检测抗原来源于同一基因型的片段也会制约到其他基因型及不同序列 HCV 感染患者血清标本的检测;不同基因型、同一基因型的不同基因亚型,甚至不同分离株之间由于基因序列的差异都存在有不同的免疫反应性,本课题通过信息学预测与筛选获得的多个优势抗原表位区域结合优势抗原表位短肽,弥补了目前存在的灵敏度不高的问题,在特异度上相对于现有的试剂盒也明显改善了很多,对 100 份阴性血清检测,特异度达到 100.0%。利用 DsbC 蛋白的伴侣分子功能,使得检测的灵敏度从 90.0%提高到 96.0%,并且纯化简单,重复好,优于商品试剂盒。

参考文献

[1] LOK A S F, GUNARATNAM N T. Diagnosis of hepatitis C[J]. *Hepatology*, 1997, 26(1): 48-56.

[2] DOU X G, TALEKAR G, CHANG J, et al. Antigenic heterogeneity of the hepatitis C virus NS5A protein[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 61-67.

[3] REZWAN S, ANN H K. Cell-free synthesis of correctly folded proteins with multiple disulphide bonds: production of fungal hydrophobins[J]. *Bio Protoc*, 2021, 11(10): e4019.

[4] HUANG J S, XIE Y M, REN D M. Genetic variation and conserved epitopes of hepatitis C virus[J]. *Prog Biochem Biophys*, 1999, 26(1): 50-51.

[5] EI-GOGO S, STAIB C, LASARTE J, et al. Protective vaccination with hepatitis C virus NS3 but not core antigen in a novel mouse challenge model[J]. *J Gene Med*, 2008, 10(2): 177-186.

[6] 万祥辉, 杨细媚, 邹学森. 我国 HCV 主要基因型优势抗原表位的筛选[J]. *实用检验医师杂志*, 2015, 7(4): 236-240.

[7] 苏秋东, 郭敏卓, 伊瑶, 等. 多表位丙型肝炎病毒抗原的表达和分析[J]. *医学研究杂志*, 2020, 49(6): 47-50.

[8] 石理兰, 窦晓光, 冯国, 等. 丙型肝炎病毒 NS5a 高免疫原区人工合成多肽抗原性的研究[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2004, 8(4): 344-347.

[9] 王伟, 葛亮, 居朝霞. 抗-HCV-IgG 抗体及血清 HCV-RNA 在丙型肝炎诊断中的应用价值[J]. *临床输血与检验*, 2017, 19(6): 602-605.

[10] ZHANG Y, CHEN L M, HE M. Hepatitis C virus in mainland China with an emphasis on genotype and subtype

distribution[J]. *Virol J*, 2017, 14(1): 41.

[11] NAKAGIRI I, ICHIHARA K. ELISA for anti-HCV antibody employing a shorter synthetic core region peptide[J]. *J Virol Methods*, 1995, 52: 195-207.

[12] DUENAS-CARREA S, ALVAREZ-LAJONCHERE L, ALVAREZ-OBREGON J C, et al. A Truncated variant of the hepatitis C virus core induces a slow but potent immune response in mice following DNA immunization[J]. *Caccine*, 2000, 19(7/8): 992-997.

[13] JOLIVET C, ADIDA A, MICHEL S, et al. Characterization of mimotopes mimicking an immunodominant conformational epitope on the hepatitis C virus NS3 helicase[J]. *J Med Virol*, 2004, 72: 385-395.

[14] DOW B C, MUNRO H, BUCHANAN I, et al. Third-generation recombinant immunoblot assay: comparison of reactivities according to hepatitis C virus genotype[J]. *Transfusion*, 1996, 36(6): 547-551.

[15] SABRINA L S, DESPOINA A I M. Harnessing the potential of bacterial oxidative folding to aid protein production[J]. *Mol Microbiol*, 2021, 116(1): 16-28.

[16] PALENZUELA D O, PEDROSO S, ROCA J, et al. A new NS3 recombinant protein shows improved antigenic properties for HCV diagnosis[J]. *Biotechnol Appl*, 2006, 23: 94-98.

[17] 乔伟振, 孟继鸿, 李丽, 等. 丙型肝炎病毒不同编码区重组抗原在抗体检测中的应用[J]. *临床检验杂志*, 2004, 22(3): 175-177.

(收稿日期: 2022-04-27 修回日期: 2022-08-18)

(上接第 62 页)

[7] 姜明, 金晶, 沈红波, 等. 慢病毒介导长链非编码 RNA H19 过表达对非酒精性脂肪性肝病大鼠的影响[J]. *国际消化病杂志*, 2020, 40(2): 113-118.

[8] 范建高. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[C]// 肝硬化及其并发症的中西医结合诊治进展交流会. 2012, 31(9): 32-35.

[9] 张丽云, 邓家琦, 张双, 等. 长链非编码 RNA EXOC7 在非酒精性脂肪性肝病中的表达及临床意义[J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(2): 391-394.

[10] YUAN X, WANG J, TANG X, et al. Berberine ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by a global modulation of hepatic mRNA and lncRNA expression profiles[J]. *J Transl Med*, 2015, 13(1): 24.

[11] YS A, SA Y U, CL B, et al. LncRNA NEAT1-MicroRNA-140 axis exacerbates nonalcoholic fatty liver through interrupting AMPK/SREBP-1 signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 514(3): 584-590.

[12] 王运东, 孙文锦. 慢性乙型肝炎患者外周血 LncRNA NEAT1, STING 表达与 HBV-DNA 载量的相关性[J]. *中外医学研究*, 2020, 18(33): 181-184.

[13] 樊莉, 魏子湘, 杨希蕊, 等. LncRNA 与肝疾病的研究现状

[J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(9): 1794-1797.

[14] 张春艳, 颜羽昕, 梁洁, 等. 长链非编码 RNA 在肝纤维化中的作用研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(2): 186-192.

[15] 胡存梁, 陈尼维. 与肝纤维化相关的长链非编码 RNA 的研究进展[J]. *山东医药*, 2018, 58(24): 106-108.

[16] 孙宇, 朱琳, 董梁, 等. 长链非编码 RNA 在非酒精性脂肪性肝病中作用机制的研究进展[J]. *转化医学杂志*, 2018, 7(6): 367-370.

[17] 周琳, 蒋理, 范宇鹏, 等. 非酒精性脂肪肝与血清 CK-18、肝纤维化指标的相关性分析[J]. *检验医学*, 2016, 31(2): 99-102.

[18] 左志华, 曾楚怡, 姜瑶, 等. 长链非编码 RNA 在非酒精性脂肪性肝病发生发展中的调控作用[J]. *临床肝胆病杂志*, 2021, 37(7): 1704-1707.

[19] 黎梨, 邓凤莲, 黄赞松, 等. 长链非编码 RNA-H19 调控人肝癌 HepG2 细胞增殖与凋亡[J]. *右江民族医学院学报*, 2019, 41(1): 15-19.

[20] 刘思奇, 劳亚玲, 杨红菊. 长链非编码 RNA 与非酒精性脂肪性肝病[J]. *中外医疗*, 2019, 38(26): 196-198.

(收稿日期: 2022-04-20 修回日期: 2022-07-15)