

丙型肝炎病毒 NS3 蛋白的原核表达及多克隆抗体制备

孙涛¹, 杨光文¹, 张金阳^{1,2}, 夏雪山^{1,2}

1 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500

2 云南省分子医学研究中心, 云南 昆明 650500

孙涛, 杨光文, 张金阳, 等. 丙型肝炎病毒 NS3 蛋白的原核表达及多克隆抗体制备. 生物工程学报, 2015, 31(5): 711-721.

Sun T, Yang GW, Zhang JY, et al. Prokaryotic expression of Hepatitis C Virus (HCV) NS3 protein and preparation of polyclonal antibody. Chin J Biotech, 2015, 31(5): 711-721.

摘要: 提高对丙型肝炎患者实验室检测的灵敏度和特异性, 对相关人群进行筛查和早期诊断, 是控制丙型肝炎病毒 (HCV) 流行与传播的有效措施。为了建立更为可靠的 HCV 诊断方法, 通过采用 PCR 方法从 J6/JFH1 2a 型病毒中克隆出 HCV *ns3* 基因片段, 将其连接到 pET-28a 载体上, 重组载体 pET-28a-*ns3* 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后诱导表达, 以 10% SDS-PAGE 进行鉴定, 获得表达的 NS3 重组蛋白分子量为 72 kDa。将纯化的 NS3 蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 第 4 次免疫后采集血液并分离血清进行抗体活性鉴定, 小鼠抗体效价为 1:256 000。进一步的 Western blotting 和间接免疫荧光结果显示, 以重组 NS3 蛋白免疫小鼠制备的多克隆抗体可以很好地识别 HCV 感染 Huh7.5.1 细胞中的 NS3 蛋白, 为下一步开展单克隆抗体制备和检测试剂盒研制工作奠定了基础。

关键词: 丙型肝炎病毒, B 细胞表位, NS3 蛋白, 多克隆抗体

Received: September 13, 2014; **Accepted:** December 10, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81260248), National Science and Technology Support Program of China (No. 2014BAI01B01), Applied Basic Research Projects of Yunnan Province (No. KKS0201326002), Found for Fostering Talents of Kunming University of Science and Technology (No. KKS0201326085), Construction of Science and Technology Innovation Platform of Yunnan Province (No. 2012DA002).

Corresponding author: Xueshan Xia. Tel: +86-871-65939528; E-mail: oliverxia2000@aliyun.com

Jinyang Zhang. Tel: +86-871-65939528; E-mail: zhangjinyangzjy@163.com

国家自然科学基金 (No. 81260248), 国家科技支撑计划项目 (No. 2014BAI01B01), 云南省应用基础研究计划 (No. KKS0201326002), 昆明理工大学人才培养基金 (No. KKS0201326085), 云南省科技创新平台建设计划 (No. 2012DA002) 资助。

Prokaryotic expression of Hepatitis C Virus (HCV) NS3 protein and preparation of polyclonal antibody

Tao Sun¹, Guangwen Yang¹, Jinyang Zhang^{1,2}, and Xueshan Xia^{1,2}

¹ Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, Yunnan, China

² Research Center of Molecular Medicine of Yunnan Province, Kunming 650500, Yunnan, China

Abstract: To increase detection sensitivity and specificity on hepatitis C virus (HCV) is vital for prevention and controlling of the disease. To establish a more reliable detection method for HCV diagnosis, the full gene fragment of *ns3* (non-structural protein of HCV) from recombinant plasmid of J6/JFH1 2a was amplified and then connected into the pET-28a prokaryotic expression vector, and the latter was subsequently transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) to have the target protein expression. As a result, a protein with a molecular weight of 72 kDa was obtained and visualized in 10% SDS-PAGE. The purified NS3 protein was used as immunogen to inoculate BALB/c mice and the sera was collected after the fourth immunization. The antibody titer of serum is determined to be about 1:256 000 with ELISA. Western blotting and indirect immunofluorescence analysis showed that the mouse polyclonal antibody could react specifically with the native NS3 protein in Huh 7.5.1 cells infected with HCV. These findings may provide basis for further preparation of monoclonal antibodies against NS3 and the development of related detection kit.

Keywords: Hepatitis C virus (HCV), B cell epitopes, NS3 protein, polyclonal antibodies

丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV) 是导致丙型肝炎的主要病原体^[1]。全球约有 2 亿人感染 HCV 病毒^[2-3], 其中 70% 的感染者会发展为慢性感染, 30% 的感染者会通过自身的免疫系统清除体内的病毒, 其中在慢性感染者中约有 5% 的病人最终会死于肝硬化和肝细胞癌^[4-8]。丙型肝炎病毒是单股正链 RNA 病毒, 基因组约长 9.5 kb, 仅有 1 个开放阅读框, 编码约 3 000 个氨基酸所组成的前体多肽, 由宿主蛋白酶和病毒编码的蛋白酶加工成多个成熟蛋白。目前由于 HCV 病毒的疫苗类制剂尚未成型, 也无特效的治疗药物, 临床治疗 HCV 常采用干扰素 α (IFN- α) 联合利巴韦林, 但应答率较低, 尽管目前以依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 为靶点的抗病毒药物索非布韦 (Sofosbuvir) 的使用, 较大程度地提高了

患者持续性病毒学应答率 (SVR), 但由于病毒在此区段固然发生的基因变异, 仍可能发生耐药性突变, 导致该药物使用仍伴有一定的副作用^[9-11]。

由于 HCV 主要是通过输血途径传播, 提高对丙型肝炎患者检出的灵敏度和特异性, 对相关人群进行筛查和早期诊断, 是控制 HCV 流行与传播的有效措施。目前 HCV 病毒的检测主要有 HCV 核酸检测、HCV 抗体检测以及 HCV 抗原检测。患者体内病毒 RNA 量直接反应病毒复制的活跃程度, 检测患者体内的病毒 RNA 存在和水平可用于确定感染、评价病程与药物治疗效果。但由于核酸检测 PCR 方法的高灵敏性, 这种方法对实验室条件和实验工作人员要求都很高, 容易造成污染, 同时还存在病毒变异导致引物不能有效结合出现假阴性问题。HCV 抗体检测多以 HCV 核心蛋白、NS3、NS4 和 NS5

非结构蛋白的特异抗体为靶标物,已有金标试纸条和 HCV ELISA 试剂盒,虽然 HCV 抗体检测的第 3 代 ELISA 技术较大提高了检测灵敏性,但可检测出抗体的窗口期仍需 40 多天^[12]。抗体检测灵敏度低,固然存在的“窗口期”,以及免疫缺陷患者不能有效产生抗体,抗体检测容易漏检和出现假阴性。抗原检测靶标直接针对 HCV 病毒,检测结果更为直接可靠。国内已有湖南景达生物工程有限公司和山东莱博生物科技有限公司研制的双抗体夹心法检测 HCV 核心抗原诊断试剂,国际雅培 ARCHITECT HCV 核心抗原检测试剂也于 2012 年 6 月 5 日获得 SFDA 认证注册。但由于体内 HCV 核心抗原的低水平和相关特异性抗体制备的困难,现有的抗原检测技术还存在一些问题。

HCV 非结构蛋白 NS3 分子量为 67 kDa,具有丝氨酸蛋白酶和 ATP 酶及 RNA 解旋酶活性,是具有重要生物活性的 HCV 功能蛋白。针对 NS3 蛋白开发抗体检测试剂,其检测特异性与灵敏性都高于结构蛋白,同时 NS3 蛋白在 HCV 感染早期就出现,其与特异性抗体亲和力和特异性也都很强,且持续时间较长,这些都决定了 NS3 蛋白在丙型肝炎的实验室检测方面具有较大优势^[13]。

本研究首先使用生物信息学软件对 HCV-NS3 蛋白序列的跨膜区和 B 细胞抗原表位进行分析和预测,用 PCR 方法从 J6/JFH1 2a 型病毒中扩增得到 HCV *ns3* 基因片段,成功构建

了 pET-28a-*ns3* 重组载体,在大肠杆菌 BL21 细胞中成功表达并通过亲和层析得到纯化的 NS3 蛋白,免疫小鼠结果证实其具有很好的抗原性,为以 NS3 蛋白及相应抗体为检测靶标的检测试剂的开发奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 蛋白质结构分析及抗原表位预测

采用在线网站服务器 ExPASy 中 ProtScale 模块 (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) 预测蛋白质疏水性,使用 TMHMM server v.2.0 在线软件对 HCV-NS3 蛋白序列进行跨膜区预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)^[14]。使用 Swiss-prot 蛋白数据库中 Swiss-model 模块预测 NS3 蛋白的三级结构,使用 DNASTAR 中 Protean 模块对 HCV-NS3 蛋白的抗原表位进行预测^[15]。

1.2 *ns3* 目的基因扩增与纯化

以 J6/JFH1 2a 型重组病毒 (GenBank Accession No. AY746460.1) 为扩增模板,根据引物设计原则设计 PCR 引物 (表 1),引物两端分别加上 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点。培养获得的 J6/JFH1 2a 进行病毒核酸提取,作为模板进行 *ns3* 全长基因扩增。PCR 扩增条件:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,并回收目的片段进行序列测定确认 PCR 扩增无误。

表 1 扩增 *ns3* 基因的引物序列

Table 1 Sequences of the PCR primers for the gene of *ns3*

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Endonuclease (Location)
Forward	<u>CCGGATCC</u> ATGCTCGCTCCCACT	<i>Bam</i> H I
Reverse	GCAAGCTTTTACATGACCTCAAGGTC	<i>Hind</i> III

Notes: the protective bases are marked with bold; the recognition sequences of restriction enzymes are showed in italics; the primers sequences are marked with underline.

1.3 pET-28a-ns3 重组载体构建与表达

将回收的目的基因片段双酶切后连接到经同样双酶切的 pET-28a 载体上, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, PCR 鉴定确定阳性克隆, 并经测序分析进一步验证。阳性菌的小量培养后, 用 0.1 mol/L IPTG 诱导培养 4 h, 菌体沉淀用 1 \times SDS 上样缓冲液悬浮并热处理后, 进行 10% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色观察蛋白表达。

阳性菌扩大培养, 收集菌体, 将菌体悬浮于 PBS, 冰浴条件下超声破碎直至菌体清亮。离心弃上清, 包涵体沉淀用 8 mol/L 尿素裂解过夜, 取菌体破碎后上清和包涵体裂解液, 进行 SDS-PAGE。包涵体裂解液以 Ni-NTA 进行重组 NS3 蛋白纯化, 并进行 SDS-PAGE 验证。

1.4 小鼠免疫过程

取纯化后 NS3 蛋白溶于 PBS 溶液中, 与等量的弗氏完全佐剂充分混匀后, 在漩涡振荡器上振荡 30 min, 保证蛋白溶液与弗氏完全佐剂充分混合。第 1 次免疫小鼠采用小鼠背部和皮下多点注射, 隔 14 d 免疫 1 次, 除第 1 次使用弗氏完全佐剂外, 第 2 次和第 3 次均使用弗氏不完全佐剂进行混合, 第 4 次为加强免疫, 只注射纯蛋白液。

1.5 小鼠多抗血清的特异性检测

用 J6/JFH1 2a 型病毒感染 Huh7.5.1 细胞, 48 h 后弃去培养基, PBS 洗 3 次, 以固定液 (甲醇:丙酮=1:1) 于 -20 $^{\circ}$ C 下固定 20 min, 风干, 同时设未感染病毒的细胞为阴性对照。取第 3 次免疫的血清 (1:100) 作为一抗孵育 2 h (37 $^{\circ}$ C), PBS 洗 5 次后, 用 FITC 标记羊抗鼠 (1:300) 孵育 1 h (37 $^{\circ}$ C), PBS 避光洗涤 5 次, 荧光显微镜下观察荧光反应。

将 J6/JFH1 2a 型病毒感染 Huh7.5.1 细胞,

感染 72 h 后, 弃去培养液, PBS 洗 3 次, 用 RIPA 裂解细胞, 1 200 r/min 离心 5 min, 取上清, 进行 SDS-PAGE, 转膜, 取第 3 次免疫的血清作为一抗 (1:100) 孵育 2 h (37 $^{\circ}$ C), HRP 标记的羊抗鼠作为二抗孵育 1 h (37 $^{\circ}$ C), 进行 Western blotting 分析, 同时以未感染病毒的细胞作为阴性对照。

1.6 间接 ELISA 检测与进口试剂盒对比实验

用美国进口试剂盒 (ORTHO) 按其说明书操作对采自泸西的 692 份临床血清样本进行 ELISA 检测, 之后以本实验室原核表达的 NS3 蛋白为包被抗原对从中随机筛出的 15 份阳性样品、5 份阴性样品进行检测, 由阴性血清样品的 OD 均值计算出 Cutoff 值及 A/C (Absorbance at 450 nm/Cutoff value) 值, A/C 值 >1 为阳性, 反之则为阴性, 计算间接 ELISA 检测结果与进口试剂盒检测结果的灵敏性及特异性。

2 结果与分析

2.1 蛋白质疏水性分析及跨膜结构预测

通过 ExPASy 服务器上 ProtScale 模块进行在线分析 (图 1), HCV-ns3 基因编码蛋白由 632 个氨基酸组成, 平均疏水性 (Grand average of hydropathicity) 为 0.035, 结果显示其蛋白序列所表达的蛋白整体不存在强的疏水区, 只是蛋白 N 端几个氨基酸可能存在小的疏水区。为了降低跨膜区对蛋白表达的不利影响, 使用在线网站预测 HCV-NS3 蛋白的跨膜结构 (图 2), 结果显示 HCV-NS3 蛋白为 632 个氨基酸, HCV-NS3 蛋白没有典型的跨膜区, HCV-NS3 蛋白的 1-632 个氨基酸都位于细胞膜表面, 降低了跨膜区疏水性氨基酸对蛋白折叠的影响, 易于表达和纯化。

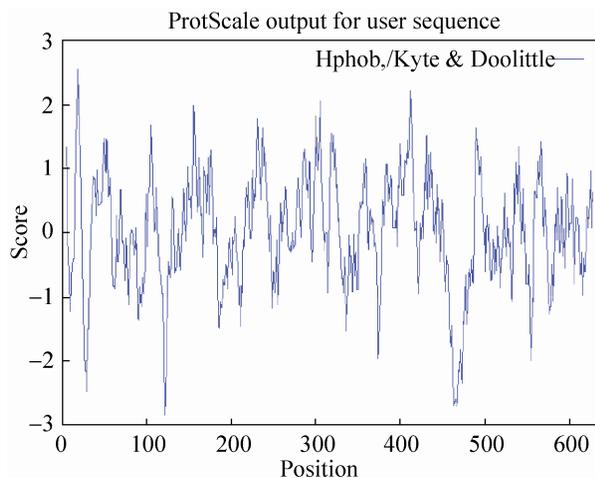


图1 NS3 蛋白的疏水性分析
Fig. 1 Analysis of the hydrophobicity of NS3 protein.

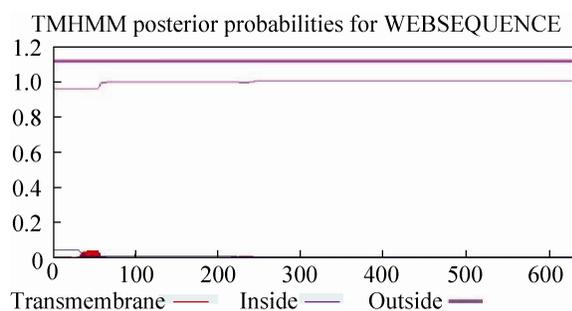


图2 NS3 蛋白的跨膜区分析
Fig. 2 Analysis of transmembrane domain of NS3 protein.

2.2 HCV-NS3 蛋白三级结构及 B 细胞抗原表位预测

通过 Swiss-model 在线软件同源建模的方法预测 HCV-NS3 蛋白三级结构 (图 3), HCV NS3 蛋白由 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲等结构组成规则的空间构象。该构象由 α -螺旋位于蛋白内部、 β -折叠位于蛋白中心, 两者构成 1 个疏水核心区域; β -转角和无规则卷曲位于蛋白外部, 它们结构松散, 易变性扭曲。使用 DNASTar 中 Protean 模块中亲水方案、表面可及

性方案、柔性方案、抗原性方案和抗原指数方案对 HCV-NS3 蛋白质抗原表位进行综合分析发现, NS3 蛋白全长序列中具有较为丰富且分布均匀的抗原表位 (图 4), 主要的抗原氨基酸序列及分布位点 (表 2) 所示, 有 8 个优势抗原表位, 这些位点的抗原指数较高, 且具有强的表面可及性和亲水性位点, 因此该蛋白制备抗体具有较强的可行性。

2.3 *ns3* 目的基因扩增及重组质粒 pET-28a-*ns3* 的构建

以提取、纯化的 J6/JFH1 2a 型病毒核酸为模板, PCR 扩增 *ns3* 全长基因 (图 5A) 及重组载体 pET-28a-*ns3* 双酶切 (图 5B) 后经 1% 琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物长度为 1 893 bp, 与预期长度一致。该片段经回收测序, 核酸序列准确无误。构建的载体经测序分析, 确认插入片段及引物、限制性酶切位点准确无误。

2.4 重组蛋白的表达与纯化

阳性菌经 IPTG 诱导表达后, SDS-PAGE 分析结果发现阳性菌有约 72 kDa 的特异性条带。重组质粒在 N 端和 C 端共表达分子质量约 5 kDa

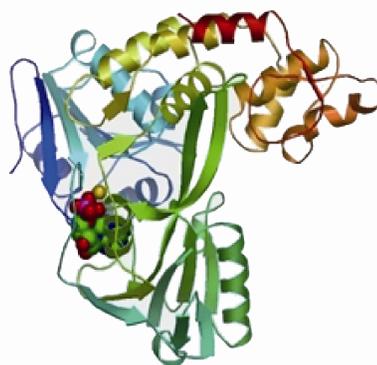


图3 NS3 蛋白三级结构
Fig. 3 Tertiary structure of NS3 protein.

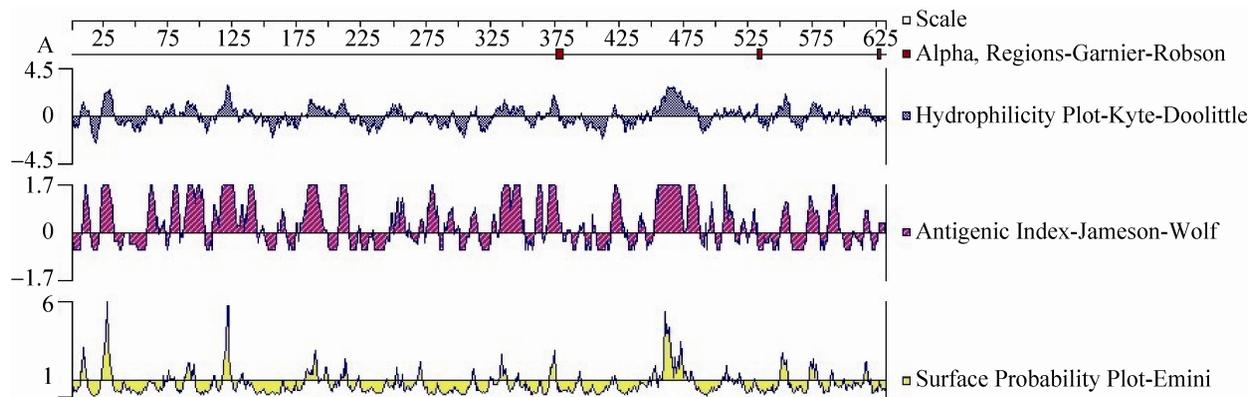


图 4 NS3 蛋白的特性分析

Fig. 4 Analysis of the characteristics of NS3 protein.

表 2 DNASTar 预测 HCV NS3 蛋白优势抗原表位的肽段位置

Table 2 Advantage antigen peptide of NS3 protein predicted by DNASTar

Sequence	Initiation and termination sites	Predicted antigenic sequences	Peptide length
1	20-28	VSMTGRDRT	9
2	35-41	QILSTVS	7
3	74-92	QMYSSAEGDLVGWSPPGT	19
4	113-141	DVIPARRRGDKRGALLSPRPISTLKGSSG	29
5	183-189	PTFSDNS	7
6	203-213	LHAPTGSGKST	11
7	366-375	LIFCHSKKCC	10
8	454-483	QDAVSRSQRRGRTGRGRQGTYYRYVSTGERA	30

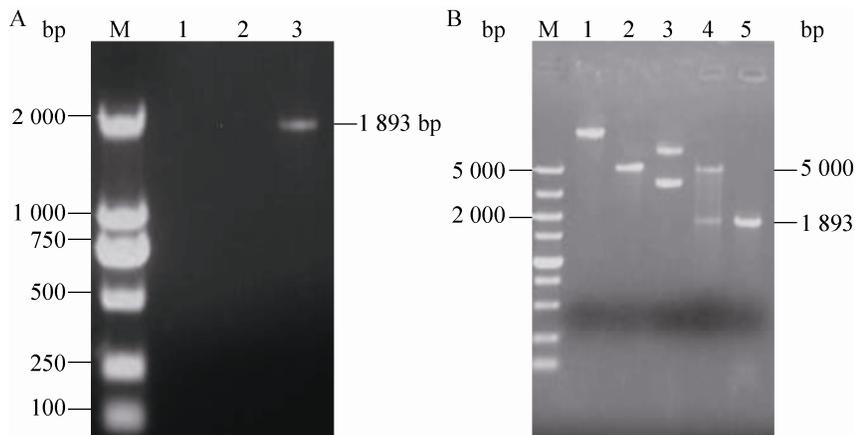


图 5 PCR 及重组质粒的双酶切鉴定结果

Fig. 5 Results of PCR and recombinant plasmid digested by restriction endonucleases. (A) PCR products of *ns3* gene. M: DNA marker; 1: negative control; 2: water; 3: PCR products. (B) Identification of recombinant plasmid digested with restriction endonucleases. M: DNA marker; 1: linearize plasmid pET-28a by restricting enzyme; 2: empty plasmid pET-28a; 3: recombinant plasmid pET-28a-*ns3*; 4: digestion products of pET-28a-*ns3*; 5: PCR products of *ns3*.

的蛋白,中间的分子质量为 67 kDa 的 HCV NS3 蛋白,而未加 IPTG 的重组菌和 BL21 菌没有相应的条带(图 6),可初步确定 HCV *ns3* 基因在重组表达载体中得到正确表达(图 6)。重组蛋白经大量表达后,用 Ni Sepharose Fast Flow 进行纯化,使用梯度洗脱(图 7),在洗脱缓冲液:结合缓冲液=6:4 的条件下,纯化效果最佳。

2.5 重组蛋白抗体与 NS3 蛋白的特异性结合

采集重组蛋白免疫的小鼠血清,间接免疫荧光法 IFA 测定血清抗体对 J6/JFH1 2a 型病毒的结合情况。结果表明,J6/JFH1 2a 型病毒感染的细胞可以与重组蛋白免疫小鼠抗血清发生阳性反应,产生特异性的绿色荧光,且可见 NS3 蛋白主要分布于细胞质中(图 8),而未感染病毒的细胞呈阴性反应,无明显的荧光出现,表明重组蛋白免疫小鼠制备的多抗血清具有很好的特异性。

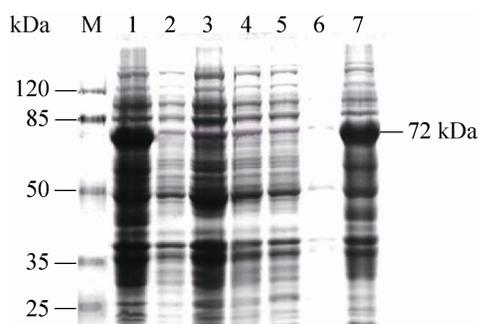


图 6 SDS-PAGE 检测重组蛋白在 *E. coli* BL21 中的表达

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of recombinant protein expressed in *E. coli* BL21. M: protein marker; 1: *E. coli* BL21 containing pET-28a-*ns3* was induced with IPTG; 2: *E. coli* BL21 containing pET-28a-*ns3* before induced; 3: *E. coli* BL21 containing pET-28a was induced with IPTG; 4: *E. coli* BL21 containing pET-28a before induced; 5: *E. coli* BL21 was induced with IPTG; 6: supernatants of the BL21 lysates with pET-28a-*ns3* induced by IPTG; 7: inclusion bodies of the BL21 with pET-28a-*ns3* induced by IPTG.

2.6 Western blotting 分析小鼠多抗血清对病毒编码蛋白的反应性

Huh7.5.1 细胞接种 J6/JFH1 2a 型病毒,病毒感染 72 h 收集细胞样品。用小鼠多抗血清作为一抗进行 Western blotting 分析,结果出现与预期分子量大小相符的特异性条带,而未感染病毒的细胞在此位置无相应条带出现,表明重组蛋白制备的小鼠多抗血清对 HCV 感染细胞中 NS3 蛋白的线性抗原表位能够很好的识别(图 9)。

2.7 间接 ELISA 检测与进口试剂盒检测结果比较

以纯化的大肠杆菌表达的 NS3 蛋白为抗原包被 96 孔板对随机筛出的 15 份阳性样品、5 份阴性样品进行 ELISA 检测, OD_{450} 处测吸光值并测定 A/C 值(表 3),经测定,阴性对照 OD_{450} 均值为 0.067,根据“阴性对照的平均 OD 值 $\times 0.05$ 时, $Cutoff=2.1 \times 0.05$; 当阴性对照的平均 OD 值 > 0.05 时, $Cutoff=2.1 \times$ 阴性对照均值”的 ELISA

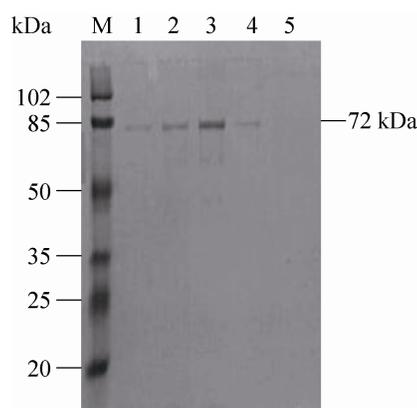


图 7 重组 NS3 蛋白纯化条件优化

Fig. 7 Optimization of recombinant protein purification. M: protein marker; 1: elution buffer: binding buffer=2:8; 2: elution buffer: binding buffer=4:6; 3: elution buffer: binding buffer=6:4; 4: elution buffer: binding buffer=8:2; 5: 100% elution buffer.

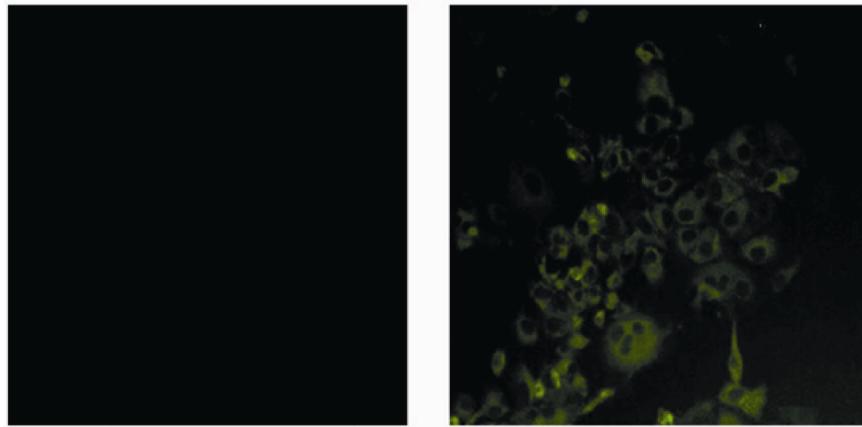


图 8 HCV NS3 蛋白的 IFA 分析

Fig. 8 Analysis of HCV NS3 protein in cells by IFA (320×). (A) Mock infected cells. (B) HCV infected Huh7.5.1 cells.

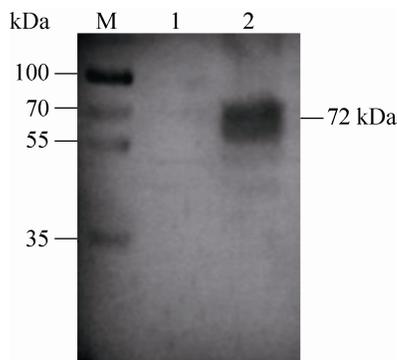


图 9 Western blotting 分析小鼠多抗血清的特异性

Fig. 9 Analysis of the specific of the mouse antiserum by Western blotting. M: protein marker; 1: mock infected cells; 2: cells after HCV infection.

表 3 ELISA 检测结果的 A/C 值

Table 3 Detection of the A/C value by ELISA

\bar{x}	Cutoff value	ELISA (A/C)		
		Positive	Negative	
0.067	0.141	15.72	12.47	0.681
		15.60	13.89	0.312
		14.14	14.61	0.657
		14.11	11.35	0.417
		14.04	12.30	0.298
		13.40	13.97	
		13.58	11.35	

测定阈值确定原则, 所建立方法的 Cutoff 值为 0.141, A/C 值>1 为阳性, 反之则为阴性。利用该方法对 20 份样本进行测定, 结果 14 份为阳性, 5 份为阴性 (表 4), 以 ORTHO 试剂盒结果作为参照, HCV NS3 ELISA 检测的灵敏性为 93.3%, 特异性为 100%, 表明重组蛋白具有很好的灵敏性及特异性。

3 讨论

丙型肝炎病毒 (HCV) 感染是引起慢性肝病的主要病因, 病毒一经感染, 超过 70% 的感染者最终会发展为慢性肝炎, 严重危害人类健康。HCV 是一种高度变异的病毒, 到目前为止, 还没有有效的疫苗去预防 HCV 病毒和有效的药物彻底清除体内的病毒颗粒, 并且相关的疫苗和药物研究进展缓慢, 及早准确诊断, 严格控制 HCV 的感染源头是控制 HCV 传播的有效手段, 有研究报道^[16]针对 HCV 核心基因的序列构建的 M1GS-HCV/C₁₄₁ 核酶在体外具有很好的抗 HCV 活性, 也为 HCV 的后期诊断与治疗提供了一条新的研究途径。

表 4 HCV NS3 ELISA 检测与 ORTHO 试剂盒检测结果比较

Table 4 Comparison of the HCV NS3 ELISA and the ORTHO kit

Prepared HCV polyclonal antibody	ORTHO kit		Total
	Positive	Negative	
Positive	14	0	14
Negative	1	5	6
Total	15	5	20

目前用于 HCV ELISA 检测所用的抗原主要是多肽合成和基因表达,既有单独使用,也有混合使用,其主要是核心区和 NS3 非结构区等抗原,但由于我们选择表达所制备的抗原与天然抗原还存在一些差距,故在检测中会出现一些漏检现象,进而影响检测的特异性和灵敏性。在 HCV 感染者血清中绝大多数都有 NS3 非结构蛋白抗体的出现且持续存在。NS3 蛋白抗原免疫性强,存在多个抗原表位,容易检测患者体内感染的 HCV 病毒。Murphy 等^[17]研究发现, *ns3* 基因表达的蛋白分子量很大,具有很强的免疫原性,可以引起机体特异性细胞免疫反应,诱导机体产生大量的干扰素,帮助机体清除病毒和抑制病毒的大量复制。我们研究发现, *ns3* 全长基因很保守,没有较强的疏水区,蛋白存在多个优势抗原表位,且还携带多个目标抗原以及辅助性表位,能够有效地应对病毒的变异和免疫反应中 HLA 的限制性^[18]。再者,其多个优势抗原表位主要存在于 N 端且又包括了 C 端除疏水区外的大部分蛋白,故既有利于蛋白的表达与纯化又有利于 C 端抗原决定簇的存在。抗原表位的覆盖面大,能覆盖更多的基因型和亚型,所设计的药物对绝大部分人群都有用,对诱导细胞免疫反应的强度和广度以及在病毒

清除中起着重要作用。由于 HCV NS3 蛋白还具有 NS3 丝氨酸蛋白酶、三磷酸核苷酶 (NTPase) 和螺旋酶 (Helicase) 活性^[19-22]。也有研究表明^[23], HCV NS3 蛋白的 NTP 酶和解旋酶功能区同样可以诱导产生体液免疫,而且 NTPase 及 Helicase 酶能使 NS3 蛋白结合到 HCV 基因组的 3'末端上,在病毒 RNA 复制中发挥重要的调节作用^[24-26]。所以在 HCV 感染者筛查方面使用 NS3 蛋白作为抗原, NS3 蛋白的多个优势抗原表位能够充分暴露其抗原决定簇和伸展氨基酸的活性组分,更好地提高检测灵敏度和免疫原性,有效避免 HCV 感染者的漏检,这也是目前 HCV 在血清学检测上多选择 NS3 蛋白作为抗原的原因。

综上所述,本研究成功地将 HCV *ns3* 全长基因连接到 pET-28a 表达载体中,诱导表达出分子质量约为 72 kDa 的重组蛋白并且通过 His 标签纯化出蛋白,免疫小鼠后制备出高效价的多克隆抗体。目前关于 HCV NS3 蛋白的多克隆抗体制备的条件已经很成熟,相关检测试剂盒都已经成熟化,而且单抗试剂盒也已经进入市场,但其都存在一定的缺陷。首先,目前关于 NS3 多克隆抗体制备的文献报道中,大多是通过 ELISA 法对其进行特异性及灵敏性验证,由于我们对抗原的选择区域相比于天然抗原还存在一定的差距,故对其灵敏性及特异性的要求就会很高,而本实验主要通过 IFA 对其进行验证,相比于 ELISA 法,IFA 更能扩大抗体应用范围,而且血清可以通过 Huh7.5.1 细胞传代进行吸收,大大提高了所制备抗体的特异性;而目前国外单抗检测试剂盒主要以 Anti-HCV-NS3 单抗检测试剂盒 (Abcam 公司) 为主,其特异性及灵敏性都很好,但其反应强度不如多抗,价格昂贵且抗体只针对 1 种抗原决定簇,比较单一。

故本研究通过对 HCV NS3 蛋白进行生物信息学分析, 挖出其优势抗原表位进行表达, 并通过 IFA 方法对所制备的多抗进行验证, 更加肯定了其特异性, 并准备以该抗体为基础建立竞争性 ELISA, 进一步提高 HCV 抗体检测的灵敏性以及为第 3 代 HCV 抗体检测试剂的改进和完善提供有力的工具。

REFERENCES

- [1] Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 1989, 244 (4902): 359–362.
- [2] Gravitz I. Introduction: a smouldering public health crisis. *Nature*, 2011, 474(7350): S2–S4.
- [3] Omland LH, Krarup H, Jepsen P, et al. Mortality in patients with chronic and cleared hepatitis C viral infection: a nationwide cohort study. *J Hepatol*, 2010, 53(1): 36–42.
- [4] Hatziaepostolou M, Polytarchou C, Aggelidou E, et al. An HNF4 α -miRNA inflammatory feedback circuit regulates hepatocellular oncogenesis. *Cell*, 2011, 147(6): 1233–1247.
- [5] Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*, 2011, 53(3): 1020–1022.
- [6] Yuan P, Chen SSL. Hepatitis C virus and cellular stress response: implications to molecular pathogenesis of liver diseases. *Viruses*, 2012, 4(10): 2251–2290.
- [7] Zaltron S, Spinetti A, Castelli F, et al. Chronic HCV infection: epidemiological and clinical relevance. *BMC Infect Dis*, 2012, 12 (Suppl 2): 1–7.
- [8] Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, et al. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virol J*, 2011, 8(11): 161–171.
- [9] Gentile I, Borgia F, Buonomo AR, et al. A novel promising therapeutic option against hepatitis C virus: an oral nucleotide NS5B polymerase inhibitor sofosbuvir. *Curr Med Chem*, 2013, 20(30): 3733–3742.
- [10] Herbst DA Jr, Reddy KR. Sofosbuvir, a nucleotide polymerase inhibitor, for the treatment of chronic hepatitis C virus infection. *Expert Opin Investig Drugs*, 2013, 22(4): 527–536.
- [11] Lam AM, Espiritu C, Bansal S, et al. Genotype and subtype profiling of PSI-7977 as a nucleotide inhibitor of hepatitis C virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 56(6): 3359–3368.
- [12] Kim DW, Gwack Y, Han JH, et al. C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 215(1): 160–166.
- [13] Tuke PW, Grant PR, Waite J, et al. Hepatitis C virus window-phase infections: closing the window on Hepatitis C virus. *Transfusion*, 2008, 48(4): 594–600.
- [14] Zhang JY, Sun T, Yang GW, et al. Prediction of B cell epitopes and major characteristics in protein gG of monkey herpes B virus. *J Kunming Univ Sci Technol: Nat Sci Ed*, 2014, 39(2): 79–85 (in Chinese).
张金阳, 孙涛, 杨光文, 等. 猴 B 病毒 gG 蛋白的主要特性与 B 细胞表位预测. *昆明理工大学学报: 自然科学版*, 2014, 39(2): 79–85.
- [15] Guo TL, Ye LB, Mao CQ. Expression, purification and usage of truncated HCV NS3 protein. *Biotechnology*, 2008, 18(6): 20–23 (in Chinese).
郭泰林, 叶林柏, 茆灿泉. 截短的 HCV NS3 蛋白的表达、纯化及应用. *生物技术*, 2008, 18(6): 20–23.
- [16] Li XF, Zhang WJ, Huang ZW, et al. Construction of an engineered M1GS-HCV/C141 ribozyme and determination of its antiviral activity *in vitro*. *Chin J Biotech*, 2013, 29(12): 1786–1795 (in Chinese).
李喜芳, 张文军, 黄志文, 等. M1GS-HCV/C141 核酶的构建及其体外抗病毒活性测定. *生物工程学报*, 2013, 29(12): 1786–1795.
- [17] Murphy D, Chamberland J, Dandavino R, et al. A new genotype of Hepatitis C virus originating from central Africa. *Hepatology*, 2007, 46(6): 267–276.

- [18] Vider-Shalit T, Raffaelli S, Louzoun Y. Virus-epitope vaccine design: informatic matching the HLA-I polymorphism to the virus genome. *Mol Immunol*, 2007, 44(6): 1253–1261.
- [19] Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, et al. Nonstructural protein 3 of the Hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J Virol*, 1993, 67(7): 3835–3844.
- [20] Grakoui A, McCourt D W, Wychowski C, et al. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol*, 1993, 67(5): 2832–2843.
- [21] Abian O, Vega S, Neira JL, et al. Conformational stability of hepatitis C virus NS3 protease. *Biophys J*, 2010, 99(11): 3811–3820.
- [22] Fatima K, Mathew S, Suhail M, et al. Docking studies of Pakistani HCV NS3 helicase: a possible antiviral drug target. *PLoS ONE*, 2014, 9(9): 1–12.
- [23] Qu LH, Cheng L, Wang JF. Progress on hepatitis C virus NS3 protease inhibitors. *Chin Hepatol*, 2007, 12(3): 203–206 (in Chinese).
屈莉红, 陈良, 王介非. HCV NS3 蛋白酶及抑制剂的研究进展. *肝脏杂志*, 2007, 12(3): 203–206.
- [24] de Francesco R, Tomei L, Altamura S, et al. Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res*, 2003, 58(1): 1–16.
- [25] Berdichevsky Y, Zemel R, Bachmatov L, et al. A novel high throughput screening assay for HCV NS3 serine protease inhibitors. *J Virol Methods*, 2003, 107(2): 245–255.
- [26] Yamane D, McGivern DR, Wauthier E, et al. Regulation of the hepatitis C virus RNA replicase by endogenous lipid peroxidation. *Nat Med*, 2014, 20(8): 927–935.

(本文责编 陈宏宇)