应用丙型肝炎病毒蛋白多区段合成肽检测特异性抗体的探讨*

郝 飞 李梦东 (第三军医大学西南医院传染科) 630038

提 要 应用丙型肝炎病毒(HCV)的核心(C)区和非结构(NS)区 4 条合成肽(CP_{10}、CP_9、CP_{33C}和CP_{100}),建立了 ELISA 检测抗-HCV 的方法,并用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测血清 HCV RNA 作对比研究。发现在检测来自肝炎患者、供血员和其它疾病患者的320份血清标本中,有49份血清对1条或多条合成肽呈阳性反应;单一合成肽抗体检出率以CP_{10}最高(9.69%),CP_{33C}最底(3.44%),联合应用C区和NS区合成肽可显著提高抗体的检出率($P<0.01$);57.14%～88.24%抗体阳性血清用 RT-PCR 可检出 HCV RNA。提示应用合成肽检测本地区 HCV 感染者特异性抗体是可行的,联合应用多区段合成肽对减少假阴性的发生有重要意义。

关键词 肝炎病毒;肽/生物合成;抗体反应;ELISA

随着丙型肝炎病毒(HCV)基因克隆成功,已相继建立了检测血清抗-HCV 和 HCV RNA 的方法。HCV 基因变异较大,导致各地区 HCV 感染检测结果不一致。应用合成肽作抗原检测抗-HCV 已获得成功,并显示良好的应用前景[1,2]。我们在原有工作的基础上[3],应用根据 HCV 原型株(HCV-P)[4]和日本株(HCV-J)[1]基因序列合成的4条肽段作抗原,建立了 ELISA 检测抗-HCV,旨在探讨联合应用人工合成肽检测抗-HCV 的价值,试图筛选出适合本地区 HCV 感染的血清学诊断方法。

1 材料与方法

1.1 血清标本来源

1.1.1 待检标本:待检标本均为我科1989年4月至1992年4月部分住院患者的血清,计甲型肝炎41份,慢性乙型肝炎66份,肝炎肝硬化25份,非甲非乙型肝炎25份,其它疾病16份(包括阻塞性黄疸9份,发热待查6份,阿米巴痢疾1份)。

1.1.2 对照标本:对照标本来自我院供血员血清,共147份。

1.2 HCV 肽段的选择和合成

按 HCV-P 株和 HCV-J 株基因序列保守区分别合成4条肽段(表1)。合成肽分别由上海生化所和北京医科大学提供,其中CP_9和CP_{10}位于核心(C)区,CP_{33C}和CP_{100}位于非结构(NS)区。

表1 HCV 合成肽抗原

Tab 1 Peptide antigens of HCV

peptide	length of amino acid(aa)	peptide position	referencing sequences
CP_{10}	19	the first hydrophilic region of C protein	HCV-J
CP_9	36	the second hydrophilic region of C protein	HCV-J
CP_{33C}	27	NS_3 region	HCV-P
CP_{100}	42	NS_4 region	HCV-P

1.3 方法

1.3.1 合成肽 ELISA 抗体的检测:每反应孔包被100μl 体积,每孔每条肽含量为0.2μg,单独或联合包被。包被和检测条件根据已报道的方法[1,3]稍加改动。结果判断:标本测定 OD 值减去空白测定值后与阴性对照 OD 值和空白测定 OD 值差之比,比值大于或等于2.5为阳性。部分标本做了吸收抑制试验。

1.3.2 血清 HCV RNA 的检测:血清 HCV RNA 的检测采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)。简要过程如下:取血清100μl,按 Chomczynski 等[5]方法抽提 RNA。然后加入聚合酶缓冲液、4×dNTP、RNasin(华美公司产品)、AMV 逆转录酶(Promega 公司产品)、外引物(序列为 HCV cDNA 5' 非编码区1～20和305～324核甘酸)和 Taq DNA 聚合酶(华美公司产品),在42℃水浴1h 进行 cDNA 合成。然后直接在94℃60sec(变性)、55℃60sec(退火)和74℃

* 国家自然科学基金资助课题

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

120sec(反应延伸)共35个循环条件下进行第1次PCR。再取第1次 PCR 产物3μl,加入内引物(序列为5'非编码区23～42和269～288核甘酸)、聚合酶缓冲液、4×dNTP、Taq DNA 聚合酶 ,按第1次 PCR 反应条件进行第2次 PCR。取第2次 PCR 反应产物10～20μl,在1.5%琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色,以 S·M·W 为 DNA 标志物,在紫外灯下观察257bp 处扩增片段并判断结果。

1.3.3 统计学处理:两组率之间比较用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 单独或联合应用各条合成肽检出抗-HCV 情况

在320份标本中,有49份标本对1条或多条肽 ELISA 呈阳性反应,各条肽抗体检出率以 CP_{10} 最高,CP_{33C} 最低(表2)。

表2 各肽段 ELISA 检测血清抗-HCV 结果($n=320$)

Tab 2 Results of detection for serum anti-HCV by ELISA based on different peptides($n=320$)

peptide	positive number(%)
C region	
CP_{10}	31 (9.69)
CP_9	24 (7.50)
$CP_{10}+CP_9$	39 (12.19)
NS region	
CP_{33C}	11 (3.44)
CP_{100}	21 (6.56)
NS+C region	
$CP_{10}+CP_9+CP_{100}$	47 (14.69)

在49份阳性标本中,各条肽或联合多条肽抗体检出情况见表3。

表3 抗-HCV 阳性血清对各条肽反应($n=49$)

Tab 3 Sera positive with anti-HCV response to different peptides($n=49$)

peptide	positive number(%)
C region	
CP_{10}	31 (63.26)
CP_9	24 (48.98)
$CP_{10}+CP_9$	39 (79.59)
NS region	
CP_{33C}	11 (22.44)
CP_{100}	21 (42.88)
NS+C region	
$CP_{10}+CP_9+CP_{100}$	47 (95.92)

$^{\triangle\triangle}P<0.01$, compared with $CP_{10}+CP_9+CP_{100}$

$^{**}P<0.01$, compared with $CP_{10}+CP_9$

2.2 肝炎患者的血清对各合成肽的反应

不同肽段的抗体在同一类型肝炎中检出率并不一致,而同一肽段抗体在不同类型肝炎中的检出率也有差别(表4)。1例阿米巴痢疾患者和3例供血员检出抗-HCV,并经 HCV RNA 检测证实为 HCV 感染。

表4 各型肝炎患者血清对合成肽反应(%)

Tab 4 Sera from patients with several types of hepatitis response to different peptides(%)

clinical diagnosis	cases	C region			NS region		NS+C region	total positive number
		CP_{10}	CP_9	$CP_{10}+CP_9$	CP_{33C}	CP_{100C}	$CP_{10}+CP_9+CP_{100}$	
acut hepatitis A	41	1(2.44)	0	1(2.44)	0	0	1(2.44)	1(2.44)
chronic hepatitis B	66	9(13.64)	6(9.09)	11(16.67)	2(3.03)	4(6.06)	16(24.24)	17(25.76)
liver cirrhosis	25	6(24.00)	5(20.00)	8(32.00)	3(12.00)	5(20.00)	8(32.00)	8(32.00)
NANB hepatitis	25	13(52.00)	10(40.00)	15(60.00)	4(16.00)	8(32.00)	18(72.00)	19(76.00)
total	157	29(18.47)	21(13.38)	35(22.29)	9(5.73)	17(10.83)	43(27.39)	45(28.66)

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 各区段合成肽抗体与HCV RNA的关系

对各区段合成肽抗体阳性血清进行 RT-PCR 检测 HCV RNA，发现 CP_{10}和 CP_9抗体阳性血清其 HCV RNA 检出率最高，而单独 CP_{33C}抗体阳性血清检出率最低(表5)。另外检测了22例抗-HCV 阴性的肝炎患者血清，发现4例(18.18%)HCV RNA 阳性。

表5 各肽段抗体与 HCV RNA 的关系

Tab 5 Correlation between different anti-peptides and HCV RNA

peptide	cases	positive cases of HCV RNA(%)
C region		
CP_{10}	17	15 (88.24)
CP_9	12	8 (66.67)
$CP_{10}+CP_9$	19	16 (84.21)
NS region		
CP_{33C}	7	4 (57.14)
CP_{100}	18	11 (61.11)
NS+C regions		
$CP_{10}+CP_9+CP_{100}$	22	17 (77.27)

3 讨论

选择性地人工合成病毒蛋白氨基酸序列的某一区段，来构成病毒蛋白的抗原表位，建立 ELISA 法或放射免疫分析(RIA)法检测相应的抗体，已在某些病毒感染的血清学诊断中获得成功[6]。合成的肽段要既是保守区，又具有抗原表位。我们应用的4条合成肽分别位于HCV 蛋白的 C 区和 NS 区，均为较保守区段，且经研究证实有抗原表位[1,2]。应用这4条肽段检测本地区 HCV 感染者血清抗体，发现均有不同频度的阳性反应，提示这4条合成肽均可作为抗原用于本地区部分 HCV 感染者抗-HCV 的检测。

由于合成肽仅含有1～2个抗原表位，如机体感染病毒后针对所合成的抗原表位不产生抗体或抗体产生不足，可造成检测的假阴性，这是合成肽检测抗体一个重要的限制因素[7]。我们研究发现，不同合成肽在同一类型肝炎患者中抗体检出率不一致，而同一条肽段在不同类型肝炎患者中抗体检出率也有差别。在多肽反应阳性血清中，单一肽段抗体检出率为22.42%～63.26%，联合应用多条肽段可使抗体检出率达到79.59%～95.92%，显著高于单一肽段的检出率，说明联合应用多区段合成肽检测抗-HCV 对减少假阴性的发生有较重要的意义。检测发现，各型肝炎中均可合并 HCV 感染，但以慢性乙型肝炎和肝炎肝硬化患者合并 HCV 感染为多，支持 HCV 感染参予肝炎慢性化过程。

HCV 抗原共约3000个氨基酸，由 C 区、包膜(E)区和5种 NS 区蛋白组成，以 C 区最保守，E 区变异较大。我们注意到，C 区肽段抗体检出率最高，且阳性血清 HCV RNA 检出率也最高，支持 C 区是较保守区且 C 区抗体的检出与 HCV 病毒血症存在有相关性的观点[1]。我们应用的4条肽段长度仅约占 HCV 抗原组成的4%，NANB 肝炎患者中抗-HCV 检出率仅达到76.0%，且在22例抗-HCV 阴性肝炎患者中有4例检出 HCV RNA，提示所应用的4条肽段可能不能代表本地区 HCV 感染者对 HCV 抗原全部抗体反应区域。HCV 基因的变异、HCV 感染的不同时期和合并其它肝炎病毒感染均可造成 HCV 抗原不同区段抗体产生水平的差异，对此尚需进一步研究。

从本实验结果来看，根据 HCV-P 株和 HCV-J 株基因序列合成的4条肽段用于检测本地区 HCV 感染者特异性抗体是可行的，联合应用 C 区和 NS 区合成肽可显著提高抗-HCV 的检出率。但仍有必要进一步明确本地区 HCV RNA 基因序列及其变异规律，对完善 HCV 感染者的血清学诊断及发展疫苗均有重要意义。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献

1. Okamoto H, Tsuda F, Machida A, et al. Antibodies against synthetic oligopeptides deduced from the putative core gene for the diagnosis of hepatitis C virus infection. Hepatology, 1992; 15: 180～186
2. Hosein B, Fang CT, Popovsky MA, et al. Improved serodiagnosis of hepatitis C virus infection with synthetic peptide antigen from capsid protein. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88: 3647～3651
3. 郝 飞 吴纯清 陈国致, 等。合成肽抗原 ELISA 检测丙型肝炎病毒核心抗体实验条件的初步探讨。第三军医大学学报, 1992; 14(2): 174～176
4. Choo QL, Richman KH, Han JH, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88: 2451～2455
5. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by quanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987; 162: 156～159
6. Norrby E. Human immunodeficiency virus antibody responses determined by site-directed serology. Intervirology, 1990; 51: 315～326
7. Whshitani Y, Kuroda N, Shiraki H, et al. Linear antigenic regions of the structural proteins of human T-cell lymphotropic virus type1 detected by enzyme-linked immunosorbent assays using synthetic peptides as antigens. J Clin Microbiol, 1992; 30: 287～290

(收稿: 1992-10-25; 修回: 1993-05-06)

Investigation on detection of specific antibodies with synthetic peptides corresponding to certain regions of hepatitis C virus antigen

Hao Fei, Li Mengdong (Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract Four synthetic peptides, CP_{10}, CP_9, CP_{33C} and CP_{100}, with the sequences corresponding to the capsid protein and nonstructural protein of hepatitis C virus (HCV) respectively, were employed to establish ELISA to detect anti-HCV. Serum HCV RNA was identified with reverse transcriptive polymerase chain reaction (RT - PCR) for comparison . Out of 320 sera collected from patients with viral hepatitis, patients with other diseases and blood donors, 49 were positive for antibodies against a single or several peptides. Among the positive rates of antibodies against a single peptide, anti-CP_{10} rate (9.69%) was the highest and anti-CP_{33C} (3.44%) the lowest. The positive rate for anti-HCV antibodies was significantly higher when 4 peptides were combinedly used than when only one peptide ($P<0.01$). HCV RAN was positive in 57.14% to 88.24% of the anti-HCV positive sera when RT-PCR was used.

Our findings suggest that synthetic peptides are capable of detecting anti-HCV in patients with HCV infection in our area, and simultaneous application of several peptides can substantially increase the positive rate.

Key words hepatitis viruses; peptides/BI; antibody response; ELISA

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net