

## 庚型肝炎病毒基因在大肠杆菌中表达的初步研究

夏宁邵<sup>1</sup>, 杨海杰<sup>1</sup>, 张军<sup>1</sup>, 林长青<sup>1</sup>, 王颖彬<sup>1</sup>, 王隼<sup>1</sup>, 詹美云<sup>2</sup>, 吴文翰<sup>3</sup>

(1. 厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室 361005;

2. 中国预防医学科学院病毒学研究所 100052; 3. 香港大学微生物系)

**摘要:** 利用原核表达载体 pRSET 或(和)pGEX 在大肠杆菌内表达了覆盖庚型肝炎病毒(HGV)G-NS3 和 NS5 区的多段基因。CE1、E2、NS3、NS5 及 NS3-NS5 嵌合基因等的 8 段基因均有高效表达, 各重组蛋白产量与菌体总蛋白之比在 10%~35% 之间。对以上重组蛋白进行免疫学筛选, 证实其中 7 个重组蛋白均具免疫学活性, 在一定程度上确定了重组 HGV 抗原表位的分布, 为 HGV 的血清学和免疫学诊断试剂的研究奠定了坚实基础。

**关键词:** 庚型肝炎病毒(HGV) 基因; 原核表达; 重组抗原; 免疫学活性

中图分类号: R373.2<sup>+</sup> 1; G786 文献标识码: A 文章编号: 1000-8721(2000)01-0029-05

庚型肝炎病毒(hepatitis G virus, HGV) 是 1996 年初由美国 Abbott 实验室<sup>[1]</sup>和美国 Genlabs 公司<sup>[2]</sup>相继报道从肝炎病人血清中克隆到的一种与肝炎相关的新病毒。HGV 属黄病毒科(Elaviviridae) 家族成员, 为单股正链 RNA 病毒, 基因组结构与丙型肝炎病毒相似, 全长约 9.4kb 左右, 仅有一个开放阅读框架(ORF), 编码一长约 2900 个氨基酸的多蛋白前体。该蛋白前体经病毒和宿主细胞蛋白酶水解后可形成不同的结构蛋白(核心蛋白、包膜蛋白和 P7 蛋白) 和非结构蛋白(NS2-NS5)。在编码蛋白的两侧分别为 5' NCR 和 3' NCR。其中 NS3 区编码病毒 Supergroup ①解旋酶、锌蛋白酶及丝氨酸蛋白酶、NS5B 编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RDRP)<sup>[3]</sup>。

HGV 以输血及其它肠道外途径传播为主, 呈全世界分布, 献血员中 HGV RNA 的阳性率约为 1%~3%<sup>[4,5]</sup>。研究发现, HGV 与 HBV、HCV 重叠感染率高<sup>[6,7]</sup>。1997 年 Alter 等报告, 在 100 例 HBV 患者血清中, 32 例(32%) HGV-RNA 为阳性; 116 例 HCV 患者中有 23 例(20%) 为 HGV RNA 阳性<sup>[8]</sup>。HGV 在其它高危人群如静脉药瘾者(IVDU)、血透者、血友病患者和自身免疫性肝炎患者中的感染率也甚高<sup>[9]</sup>。截至目前, 人们对 HGV 的复制场所尚无明确定论。日本 Saito 在 6 例 HGV 感染者的肝

组织中, 均通过 RT-PCR 检测到 HGV 的正、负链 RNA, 提示肝脏可能为 HGV 复制的主要原初器官<sup>[10]</sup>, 在我国也有类似的报告。但这些结果的可靠性尚存争议, 美国学者用类似方法在 HGV 感染者的肝组织中未能检出 HGV 的负链 RNA<sup>[11]</sup>。同样, 人们对 HGV 的致病性亦有争议<sup>[12]</sup>。但无论如何, HGV 在人群中具有较高的感染率, 其病毒血症可以持续存在, 但 HGV 对肝脏的致病性没有 HCV 的强均已是不争事实。进一步明确 HGV 与肝炎和/或其它疾病的相关性, 阐明 HGV 的临床意义已成为目前研究的重点。建立简捷、特异、敏感的血清学诊断手段, 进行大量的血清学检测是其主要的手段之一。

目前常用的诊断试剂主要为 RT-PCR, 但由于 HGV 核苷酸的变异比较分散, 故设计的引物均有不同程度的漏检。另外, PCR 的假阳性及操作的复杂性也限制了它的应用。合成肽作为抗原已应用于 ELISA 来检测抗 HGV IgG 抗体, 但众多合成肽均存在重复性差的问题。本研究利用我们克隆的 HGV 中国株(Genbank Accession No. U94695) 的全长 cDNA 基因进行亚克隆, 对 HGV 基因的多个区段进行原核表达并进行免疫学筛选, 基本明确 HGV 抗原表位的分布, 并从中筛选出产量高、免疫学活性强的重组蛋白, 为发展 HGV 免疫诊断试剂奠定基础。同时, 利用筛选出的 HGV 不同基因的相应重组蛋白对不同临床时期的感染血清进行检测, 以阐明机体对 HGV 不同蛋白的免疫反应动态过程。

### 材料与方法

1. 菌株和质粒 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , BL21(DE3) 株为本室保

收稿日期: 1999-08-12; 修回日期: 1999-10-09.

基金项目: 国家 863 项目(102-07-02-07) 和九五攻关项目(96-906A-03-08)。

作者简介: 夏宁邵(1964-), 男, 湖南省宁乡县人, 厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室暨教育部重点实验室副研究员、硕士生导师。主要从事病毒分子生物学及基因工程研究工作。

存。表达质粒 pRSET 系列和 pGEX 系列分别购自美国 In-vitrogen 公司和瑞典 Pharmacia 公司。分段克隆在 pGEM-T Easy 的 HGV 基因片段由本实验室和北京中国预防医学科学院病毒研究所合作完成克隆<sup>[18]</sup>。

**2 酶及其它生化试剂** 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 Taq DNA 聚合酶购自美国 Promega 公司。Sephacrose 4B-GST 亲和纯化介质、His Trap<sup>TM</sup> 及 IPTG 为 Pharmacia 公司产品。碱性磷酸酶(AP) 标记羊抗人 IgG 和底物 BCIP、NBT 购自德国 Boehringer Mannheim 公司。

**3 血清标本来源及背景** 血清标本由北京地坛医院、中国预防医学科学院病毒学研究所、北京万泰生物药业公司、北京血站、厦门市中医院、泉州市第一医院提供。Western blot 第一抗体为 3 份混合血清, 其中 2 份为 HGV-RNA 阳性血清, 一份为用多种合成肽 ELISA 试剂盒反复筛选确定的高滴度抗体阳性血清。

**4 表达载体的构建** 按常规的分子生物学方法, 用适当的限制性内切酶处理克隆载体, 将它与合成相对应的引物 PCR 扩增的 HGV 基因产物作用, 使其克隆至 pRSET 系统或 pGEX 系统载体中, 获得多个 HGV 基因的表达克隆。

**5 目的基因在大肠杆菌中的表达**

**5.1 小量表达:** 用 *E. coli* BL21(DE3) 作表达菌株, 挑单菌落于 2ml LB 培养基中, 37℃ 过夜培养, 次日按 1: 100 扩种, 菌液 OD<sub>600</sub> 值达 0.8 左右, 0.5mmol/L 的 IPTG 诱导在 37℃ 表达 3h 后收获菌体。取 1ml 诱导菌, 离心收集后悬于 400μl 1× SDS 样品溶液, 取 10μl 进行 12% 的 SDS-PAGE。欲得可溶性蛋白, 采用 20℃ 表达 3h, 其余同。

**5.2 中量表达:** 用 *E. coli* BL21(DE3) 作表达菌株, 挑单菌落于 100ml LB 培养基中, 37℃ 过夜培养, 次日按 1: 10 扩种, 菌液 OD<sub>600</sub> 值达 1.0 左右, 0.2mmol/L 的 IPTG 诱导, 以下同 5.1)。

**6 重组蛋白的 Western blot 分析** 全菌裂解液上样进行 SDS-PAGE; 接着 100V 电转 1h, 将胶上的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 电转后将膜在室温下用 5% 的脱脂奶封闭 1h; 用 5% 脱脂奶按 1: 200 稀释混合血清, 室温下孵育 2h 后, 洗涤 3 次, 每次 10min; 用 5% 的脱脂奶按 1: 1000 稀释 AP 标记的羊抗人 IgG, 室温温育 1h 后, 洗涤 3 次, 每次 10min; BCIP 和 NBT 显色, 显色完全后, 用 TE 终止反应。

**7 重组蛋白的纯化** 选取表达产量高的重组蛋白进行纯化。

**7.1 可溶性重组蛋白的纯化** 采用超声破碎菌体, 高速离心取上清进行纯化。pRSET 系统载体表达的重组蛋白按说明书使用 His Trap<sup>TM</sup> 柱亲和层析对带(His) 6 的目的融合蛋白进行纯化; pGEX 系统载体表达的重组蛋白按说明书使用 Sepharose 4B-GST 亲和层析柱对带 GST 的目的融合蛋白进行纯化。

**7.2 重组蛋白包含体的纯化** (a) 包含体的洗涤: 菌体超声破碎后, 离心收集沉淀(包含体), 再用洗液(50mmol/L Tris-HCl pH 7.2, 5mmol/L EDTA, 150mmol/L NaCl, 0.5% Triton X-100) 充分洗涤, 除去膜脂和杂蛋白, 并接着用 2mol/L、4mol/L 脲洗涤进一步除去杂蛋白, 溶于 8mol/L 脲即获得初纯的重组变性蛋白。(b) 包含体的电泳回收纯化: 将溶于

8mol/L 脲初步纯化的样品上样进行 SDS-PAGE 电泳, 用 0.3mol/L CuCl<sub>2</sub> 溶液将胶染色 5min 左右, 目的带清晰可见, (背景为浅兰色, 蛋白带呈空斑状), 小心切下目的蛋白带。接着用洗液(250mol/L EDTA, 250mol/L Tris-HCl pH9.5) 除去 Cu<sup>2+</sup>, 并将胶块封于透析袋中进行电洗脱。

**8 专业软件使用** DNA 的序列分析与比较采用 DNA 或 DNASIS 软件(Hitachi); 蛋白分析采用 PROSIS 软件(Hitachi); 蛋白的 B 细胞表位分析采用 Epiplot(Version1.0); 引物合成采用 Oligo 4.0 辅助设计。

结 果

**1 表达载体的构建与鉴定**

用适当的限制性内切酶进行酶切分析, 表明各 HGV 各段序列在表达载体 pRSET、pGEX 中插入方向及大小均正确(图略)。构建的 HGV 表达载体及在 HGV CH(U94695) 中的核苷酸和氨基酸定位见表 1。

表 1 所构建的表达载体的核苷酸和氨基酸在 HGV CH 菌株上的定位

Table 1 The nucleotide location and amino acid location of the constructed expression vector in HGV CH strain

Target fragment	Expression vector	Location of nucleotide	Location of amino acid
G1	CE1-433 pRSET	pGEX 424-856	1-144
G2	E1-525 pRSET	723-1 277	101-284
G3	E2-998 pRSET	pGEX 1 162-2 159	247-578
G31	E2-263 pRSET	1 897-2 159	491-578
G4	NS2-1008 pRSET	2 046-3 053	542-876
G5	NS2-NS3 pRSET	2 984-3 662	854-1 078
G6	NS3-820 pRSET	pGEX 3 640-4 459	1 073-1 345
G61	NS3-561 pRSET	pGEX 3 899-4 459	1 160-1 345
G7	NS3-485 pRSET	pGEX 4 221-4 705	1 267-1 427
G8	NS3-1028 pRSET	6 872-7 997	2 151-2 524
G81	NS5-788 pRSET	6 872-7 659	2 151-2 412
G82	NS5-355 pRSET	pGEX 7 643-7 997	2 408-2 524
G821	NS5-506 pRSET	7 492-7 997	2 357-2 524
G822	NS5-872 pRSET	7 126-7 997	2 235-2 524
		3 899-4 459+	1 160-1 345+
G61-821	NS3+ 5 pRSET	7 492-7 997	2 357-2 524

**2 目的基因的在大肠杆菌中的表达**

HGV 基因组和所表达的蛋白质结构如图 1 所示。

所有表达质粒转化 BL21(DE3) 表达宿主菌, 用 IPTG 诱导工程菌的表达, SDS-PAGE 分析表达产物。结果 pRSET G2、G3、G4、G5、G8 均未见明显的表达, 而将 G3N 端 245 个氨基酸的片段去掉后构建的 G31, 其表达产量高达菌体总蛋白的 30%。将 G8 C 端 113 个氨基酸的片段去掉后构建的 G81, 亦未

见明显的表达。而将 N 端 267 个氨基酸的片段去掉后构建的 G822, 其表达产量大于 30%。又分别将 G8 N 端的 217 个氨基酸和 95 个氨基酸的片段去掉后构建的 G82 和 G821, 表达产量超过 15%, G1、G6、G61 和 G7 的表达产量均在 10% ~ 35% 之间。嵌合的 G6-8 表达产量在 25% 左右。有表达的重组蛋白 SDS-PAGE 电泳结果见图 2。所有高效表达的重组蛋白均以包含体的形式存在。为了得到天然构象的可溶性蛋白, 我们曾尝试通过更换表达载体、低温诱导表达、缩短表达时间、减少 IPTG 的用量和改用丰富培养基等手段, 但仅能使 pGEX-G1 表达的总目的蛋白中的 10% 成为可溶性蛋白。

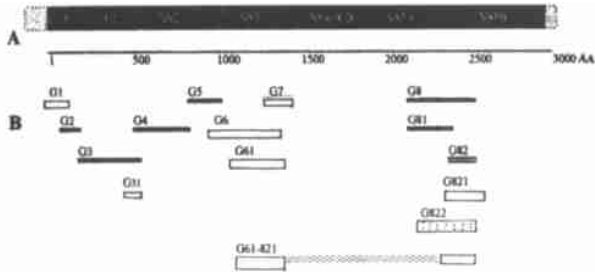


图 1 HGV 基因组和所表达的蛋白结构示意图

Figure 1 Schematic representation of HGV genome and expressed proteins

(A) Putative genomic organization of HGV CH strain. (B) Fragments expressed from the HGV CH strain polyprotein.

: high production with strong immunoreactivity; : no obvious production; : : : high production, the immunoreactivity has not been tested; ==: high production without obvious immunoreactivity.

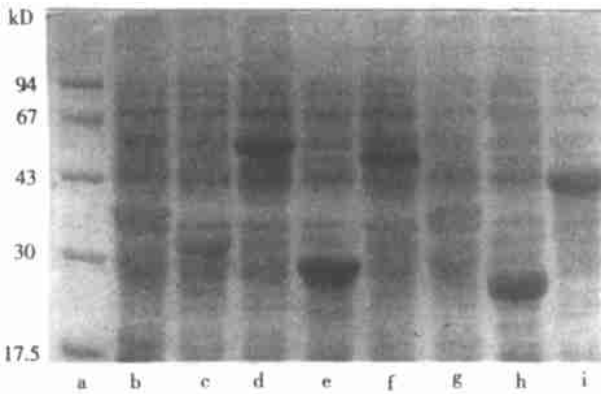


图 2 SDS-PAGE 分析大肠杆菌表达的 HGV 重组蛋白  
Figure 2 Expression of the recombinant HGV proteins in *E. coli* analyzed by SDS-PAGE

Lane designations refer to HGV proteins as follows: a- Molecular weight standard; b- G1; c- G31; d- G6; e- G61; f- G7; g- G82; h- G821; i- G61- 821.

### 3 Western blot 分析

对高效表达的 8 种重组蛋白(全菌裂解液)经 SDS-PAGE 分离后, 电转移至硝酸纤维素膜, 进行

Western blot 分析, 结果见图 3。图 3 所示高效表达的 8 种重组蛋白中, 除 G82 外, 其余的 7 个蛋白均具免疫学活性, 其中 G1 和 G821 的免疫反应性最强, G31 的免疫反应性较弱, G82 无明显免疫反应性。

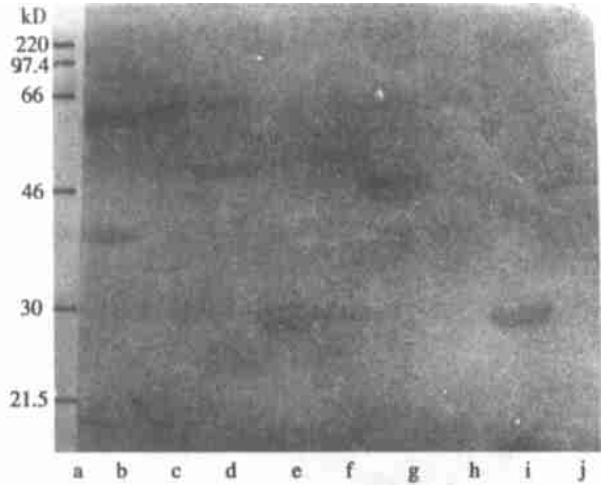


图 3 各重组 HGV 蛋白的免疫印迹反应

Figure 3 Western blot analysis of expressed recombinant HGV proteins

*E. coli* lysates were separated by SDS-PAGE, transferred, then reacted with serum as described in the text.

Lane designations refer to fragments as follows: a- Molecular weight standard; b- G1; c- G31; d- G6; e- G61; f- G7; g- G82; h- G821; i- G82; j- G61- 821.

### 4 融合重组蛋白的纯化

由于可溶性蛋白的表达量甚低, 用 His Trap™ 柱亲和和层析对带(His)6 的目的融合蛋白进行纯化, 用 Sepharose 4B-GST 亲和和层析柱对带 GST 的目的融合蛋白进行纯化, 未见其目的蛋白。G1 虽然电泳可见占总蛋白的约 5%, 但与 His Trap™ 柱和 Sepharose- 4B- GST 不结合, 故纯化效果不够理想(图略)。有代表性的选取 5 个有免疫学活性的重组蛋白(G1、G31、G61、G821 和 G6- 8)的包含体进行纯化, 结果显示对包含体的初步纯化可使目的蛋白的纯度达 50% ~ 60% 左右, 接着对初步纯化溶于 8mol/L 脲的包含体进行电泳洗脱纯化, 除 G821 纯化后获得 3 条明显的条带外, 其它的蛋白的纯度均在 90% 以上(图 4)。

### 讨 论

在 1996 年, 我们根据 GBV-C 的序列, 利用 RT-PCR 从北京 1 名献血员血清中分段克隆到一株 HGV 全长基因。本研究利用获得的 8 个插入

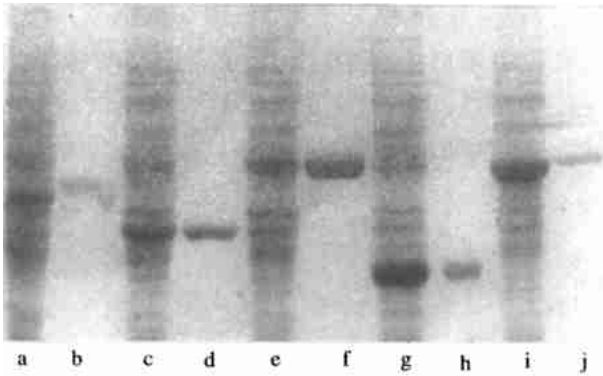


图 4 HGV 重组蛋白纯化结果(SDS-PAGE 分析)

Figure 4 SDS-PAGE analysis of purified recombinant HGV proteins

Lane designations refer to purified HGV proteins or corresponding *E. coli* lysates: a- G1; b- purified G1; c- G31; d- purified G31; e - G61; f- purified G61; g- G821; h- purified G821; i- G61-821; j- purified G61-821.

HGV 目的基因片段的 pGEM-T 克隆载体, 分别亚克隆入 pRSET 或 pGEX 原核表达载体进行原核表达, 发现仅有 C-E1 区和 NS3 区的 3 个片段(G1、G6、G7)呈高效表达。为了更全面地了解 HGV 的免疫活性区, 我们对原有克隆进行了多种改造, 以期首先获得各区段的高效表达重组蛋白。首先对 HGV E2 中的 G3 片段进行剪切, 获得其 3' 端 263 个核酸片段并转入 pGEX 载体, 经削短后的 G31 即可有明显表达。另外将 G8 的 5' 端 788 个核苷酸片段亚克隆为 G81, 3' 端 350 个核苷酸片段亚克隆为 G82, 结果 G81 仍未见明显表达, 而 G82 表达产量可高达 15%。

欲检测 HGV 多个重组蛋白的抗原活性, 很重要的一点是选用多种表型的血清。由于目前尚缺乏可靠的 HGV 抗体检测手段, 本研究特选取目前使用相对较多的多种 HGV 合成肽抗体试剂盒, 将反复检测均呈强阳性的血清 1 份及 HGV RNA 阳性血清 2 份, 组成混合血清, 以提高 Western blot 检测的灵敏度。对这些高表达的重组蛋白用 Western blot 进行检测, 结果除 G82 外均有明显免疫活性。将 G82 向 N 端延伸了 50 个氨基酸, 构成 G821, 表达出的重组蛋白显示了较强的免疫活性。在 HCV 的研究中发现, HCV 的 NS5A 内具有强的抗原表位, 我们用 EPIPLOT 软件结合 PROSIS 软件对该区域的可能表位进行了分析, 提示该区域存在强表位, 因此我们又将 G821 往 N 端延伸了 122 个氨基酸, 构成了 G822, 并获得了较好的表达, 目前正进行免疫活性检测。G8 与 G822 相比, 在 N 端多了 85 个氨基酸, 而与同样不表达的 G81 相比, C 端多了 113 个氨

基酸, 从而提示 N 端的几十个氨基酸对于该区段的表达有明显的影 响。G821 蛋白完全包含了 G82 蛋白, 二者抗原性却大不相同, 我们 G82 进行血清吸附后也不能够阻断 G821 与抗体的结合。提示 G821 蛋白 N 端 50 个左右的氨基酸(aa2357-2408) 对其免疫活性很重要, 可能是这 50 个氨基酸单独构成了一个强抗原表位, 或是 G82 蛋白的氨基酸与这 50 个氨基酸共同构成了一个强抗原表位。

对 HCV 的研究发现, HCV 的 NS3 区的抗原表位主要是构象依赖型的, 这类表位在包含体形式的重组蛋白中通常活性会受一定影响。而我们表达的 HGV NS3 区的 G6 蛋白完全以包含体形式存在, 我们去除了 G6N 端的 87 个氨基酸以削短这段蛋白(构成 G61 重组蛋白), 力图表达出可溶性蛋白, 结果效果并不明显, 但 G61 的免疫活性似乎要强一些。G31 位于 E2 内, Western blot 检测证实其有免疫活性, 这是迄今为止对 HGV E2 的原核表达活性的首次证实。

G61 和 G821 都含有较强的表位, 我们将这两段进行了嵌合表达, 以求提高对血清抗体检测的灵敏度, 表达出的 G61-821 重组蛋白仍保持了高的免疫活性和产量, 但 G61-821 能在多大程度上包含 G61 和 G821 的表位还有待进一步研究。

在研究过程中还发现, 带有 G821、G822、G61-821 的 BL21 工程菌株在固体培养基上均生长缓慢, 迟于其它工程菌及对照菌 3h 左右, 而 G82 工程菌的生长则未见异常, 其原因可能与前三者表达出的重组蛋白中均包含的 NS5 区的 50 个左右氨基酸区域(aa2357~aa2408) 的表达有关。另外, G821 重组蛋白包含体经电泳回收纯化后, 未经煮沸用 SDS-PAGE 分析, 发现存在 24kD 及 72kD 左右两条明显的带, 对样品煮沸后分析, 发现只剩下 24kD 一条带。分析可能是由于 G821 蛋白单体形成多聚体之故。据分子量大小推测, 可能是 G821 形成三聚体。G821 位于 RDRP 的氨基酸, 是否 RDRP 可形成三聚体行使其生物功能, 目前尚无报道, 或者是由于结构上的互补性, 利于 G821 单体自发形成同源三聚体, 都有待于进一步证实。

## 参 考 文 献

- [1] Simons J N, Leary T P, Dawson F J, et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis [J]. *Nature, Medicine*, 1995, 1: 564-569.
- [2] Linnen J, Wages J Jr., Zhang-Keck Z-Y, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus, a transfusion-

- transmissible agent[J]. Science, 1996; 271: 505– 508.
- [3] Erker J C, Simons J N, Muerhoff A S, et al. Molecular cloning and characterization of a GB virus isolated from a patient with non- A- E hepatitis [J]. J Gen Virol, 1996, 77: 2713– 2720.
- [4] Wang J T, Chen P J, Liu D P, et al. Prevalence and infectivity of hepatitis G virus and its strain variant, the GB agent, in volunteer blood donors in Taiwan. Transfusion [J]. 1998, 38: 290– 295.
- [5] Fischler B, Lara C, Chen M, et al. Genetic evidence for mother- to- infant transmission of hepatitis G virus [J]. J Infect Dis, 1997, 176: 281– 285.
- [6] Nakano T, Mizokami M, Cao K, et al. Lack of anti- GOR antibody among subjects with GB virus C/hepatitis G virus RNA [J]. J Med Virol, 1998, 55 (2): 129– 133.
- [7] Khudyakov Y E, Cong M E, Bonajonte M T, et al. Sequence variation within a nonstructural region of the hepatitis G virus genome [J]. J Virol, 1997, 71: 6875– 6880.
- [8] Alter H J. The cloning and clinical implications of HGBV- C [J]. N Engl J Med, 1996, 334: 1536– 1537.
- [9] Ross R S, Viaro S, Schmitt U, et al. Distinct prevalence of antibodies to E2 protein of GB virus C/hepatitis G virus in different parts of the world [J]. J Med Virol 1998; 103– 106.
- [10] Satoru S, Katsuaki T, Masaaki K, et al. Plus- and minus- stranded hepatitis G virus RNA in liver tissue and in peripheral blood mononuclear cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997; 237: 288– 291.
- [11] Tomasz L, Marek R, Wang L F, et al. Lack of evidence for hepatitis G virus replication in the livers of patients coinfecting with hepatitis C and G viruses [J]. J Virol, 1997, 71: 7804– 7806.
- [12] Laskus T, Radkowski M, Wang L F, et al. Detection of hepatitis G virus replication sites by using highly strand- specific Tth- based reverse transcriptase PCR [J]. J Virol, 1998; 72 (4) : 3072– 3075.

## Preliminary Studies of Prokaryotic Expression of Hepatitis G Virus Gene

XIA Ning-shao<sup>1</sup>, YANG Hai-jie<sup>1</sup>, ZHANG Jun<sup>1</sup>, LING Chang-qing<sup>1</sup>,  
WANG Ying-bin<sup>1</sup>, WANG Jun<sup>1</sup>, ZHAN Mei-yun<sup>2</sup>, M. H. Ng<sup>3</sup>

(1 The State Laboratory for Tumor Cell Engineering, Xiamen University 361005, China; 2 Institute of Virology, CAMP, Beijing 100052, China; 3 Department of Microbiology, HongKong University, China)

**Abstract:** The prokaryotic expression vector pRSET of (and) pGEX was used to express overlapping clones encompassing hepatitis G virus Core- NS3 and NS5 in *E. coli*. CE1, E2, NS3, NS5 and chimeric NS3- NS5 gene could produce recombinant proteins efficiently. The ratio of every recombinant protein to total bacteria proteins varied from 10% to 35%. All recombinant proteins were immunoscreened, the results showed that seven of them were immunoreactive. To some extent, we identified the epitopic distribution of recombinant HGV antigens and made a solid foundation for the research of HGV serology and immunological diagnostic reagents.

**Key words:** hepatitis G virus gene; prokaryotic expression; recombinant antigen; immunoactivity