

学校编码: 10384
学号: 200426058

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

HCV core 抗原检测系统的初步建立

Preliminary establishment of HCV core antigen detection
system

郭永利

指导教师姓名: 张 军 教授
专业 名称: 细 胞 生 物 学
论文提交日期: 2007 年 7 月 2 日
论文答辩时间: 2007 年 7 月 29 日
学位授予日期: 年 月 日

答辩委员会主席: 曾 定 教授

评 阅 人: _____

2007 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密（ ），在年解密后适用本授权书。
2. 不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

目 录

摘 要.....	1
第一章 前 言.....	5
一、HCV 流行病学.....	5
二、HCV 生物学特征.....	10
三、HCV 的研究模型.....	19
四、HCV 的入胞机制和生活史.....	21
五、HCV 的感染进程、临床症状和临床诊断.....	23
六、机体对 HCV 的免疫应答及 HCV 抗病毒治疗和疫苗的研究.....	26
七、HCV 的实验室诊断.....	30
八、HCV core 蛋白的性质及体外表达的特点.....	31
九、本研究的目的是和意义.....	32
第二章 材料与方 法.....	33
一、材料.....	33
二、方法.....	39
第三章 结果与分析.....	51
一、HCV core 重组抗原的制备.....	51
二、HCV core 单抗的制备.....	56
三、HCV core 单抗的性质鉴定.....	58
四、天然 HCV core 抗原的表位分析.....	62
五、单抗在 HCV core 抗原检测系统中的应用.....	63
第四章 讨 论.....	67
一、HCV core 重组蛋白表达和纯化的特点分析.....	67
二、HCV core 抗原免疫原性及其优势表位分析.....	68
三、重组蛋白 c120 在固、液相中的构像变化.....	70
四、HCV core 抗原检测系统研究的探索.....	70

五、未来的工作.....	71
小结	74
参考文献.....	75
致谢.....	81
附录.....	82

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract	1
Chapter 1 Preface	5
I. Epidemiology of HCV	5
II. Biological characteristic of HCV	10
III. Research model of HCV	19
IV. Cell entry and life cycle of HCV	21
V. Infection history and diagnose procedue of HCV	23
VI. Therapy and vaccine research of HCV	26
VII. Laboratory diagnosis of HCV	30
VIII. Characteristic and expression property of HCV core protein	31
IX. Purpose and significance of this study	32
Chapter2: Materials and Methods	37
I. Materials	37
II. Methods	39
Chapter3: Results and Analysis	51
I. Preparation of recombinant HCV core antigen	51
II. Preparation of HCV core McAbs	56
III. Characteristic identification of HCV core McAbs	58
IV. Epitope analysis of nature HCV core antigen	62
V. Utility of HCV core McAbs in HCV core antigen detection system	63
Chapter4: Discussion	67
I. Expression and purification property of HCV core antigen	67
II. Antigenicity and dominant epitope anaysis of HCV core antigen	68
III. Conformational difference of HCV core protein in solid and liquid phase	70
IV. Establishment of HCV core antigen detection system	70
V. The next work	71

Brief summary	74
References	75
Acknowledgement and Appendix	81

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV) 是一种小包膜 RNA 病毒, 主要经血液传播, 可引起急、慢性病毒性肝炎, 并常导致慢性进行性肝病, 肝硬化 (Hepatocellular cirrhosis, HC), 甚至肝癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC)。目前全球约有 1.23-1.7 亿人感染 HCV, 中国有近 4 千万 HCV 感染者, 是 HCV 流行较严重的国家之一。因此控制 HCV 的传播已成为一个相当严峻的公共卫生问题。目前血清的筛查多以检测 HCV 抗体为主, 但 HCV 抗体检测一般存在 7-10 周的窗口期, 仍威胁着用血安全。虽检测 HCV 核酸可有效缩短窗口期, 但因其操作复杂, 容易污染且价格昂贵, 使之不能广泛应用。HCV core 蛋白在 HCV 感染后体内抗体阳转前即可产生, 是患者体内 HCV 复制和 HCV 病毒载量的重要指标。通过检测患者体内 core 蛋白可有效缩短 HCV 检测窗口期, 并可作为临床 HCV 抗病毒治疗效果评估的依据。因此本研究旨在初步建立 HCV core 抗原检测系统, 并为最终成功建立 HCV Ag/Ab 诊断试剂奠定基础。

本研究首先构建了非融合表达 core 区 1-120aa 的表达载体 pTO-T7-C120, 经转化 E.coli 表达, 表达产物约为 13kD (命名为 c120)。c120 主要表达在上清中, 经饱和硫酸铵沉淀及阳离子交换柱层析纯化后, SDS-PAGE 分析目的蛋白纯度可达 95%以上。考虑到缺失 C 端的重组 core 抗原可能导致的构象差异及表位缺失, 本研究另外构建了融合表达 core 区 1-173aa 的表达载体 pTrc-CKS-C173, 并经转化 E.coli 表达, 表达产物约为 45kD (命名为 cks-c173)。cks-c173 主要表达在包涵体中, 目的蛋白可溶于 8M 尿素, 后经电洗脱纯化, SDS-PAGE 分析目的蛋白纯度可达 97%以上。重组蛋白 c120 和 cks-c173 经 Western Blotting 和间接 ELISA 验证表明均有良好的活性和特异性, 适宜制备单抗。

然后将重组蛋白 c120 和 cks-c173 及赠送重组 core 抗原 core-R 分别免疫 BALB/c 小鼠, 并利用常规单抗制备技术和间接 ELISA 法筛选单抗, 最终成功获得了 103 株抗 HCV core 抗原的单克隆抗体。单抗的滴度和亚型通过间接 ELISA 法分析。所有单抗经条带免疫印记实验证实均有良好的活性。并利用 HCV core 区合成肽和间接 ELISA 鉴定出 60 株单抗的表位, 共识别 5 个表位区。其中识别 25-39aa 和 90-119aa 的单抗最多, 分别有 25 株和 21 株; 识别 49-78aa 和 17-31aa

的单抗各有 9 株和 4 株；另有 1 株单抗识别 33-47aa。此结果同时反应了重组 core 抗原的优势表位区，并发现 3 种 core 区重组蛋白暴露的优势表位存在差别。此外利用 HCV core 区合成肽和间接 ELISA 分析 HCV 患者血清中抗 HCV core 不同区段抗体的丰度，发现 HCV 患者血清中 core 抗体的表位谱更宽，且可能更偏构象依赖，其中 49-78aa 可能是天然 core 抗原一个重要的线性表位区。

最后，将 103 株单抗通过正交双抗体夹心 ELISA 检测不同稀释度的 c120 蛋白以筛选出检测 c120 灵敏度最高的配伍单抗。结果成功筛选到 6 组检测 c120 灵敏度达 100pg/mL 的配伍单抗，其中配伍 83-65HRP 的检测灵敏度最高，可达 50pg/mL。再利用这 6 组配伍单抗夹心检测 25 份 HCV 抗体和 PCR 阳性血清中的 core 抗原，最终发现 2 组能高灵敏度检测天然 core 抗原的配伍 83-65HRP 和 97-65HRP，检出率达 8/25，并具有较好的特异性，初步建立了 HCV core 抗原的检测系统。但因缺乏 HCV 窗口期血清，此系统还需进一步评价和改进。

关键词：HCV；核心蛋白；单克隆抗体

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) is an enveloped RNA virus that belongs to the family of Flaviviridae. HCV is mainly spread through blood, causes acute or chronic viral hepatitis, which often leads to chronic progressive liver disease (cirrhosis) or even liver cancer. It is estimated that 123-170million people worldwide are living with HCV infection, of whom 40 million are in china. Therefore, the control of HCV spread has become a very urgent public health concern in china. The introduction of anti-HCV screening in blood donor have significantly decreased the risk of HCV infection through blood transfusion. However, HCV infection has a 7-10 weeks' serological window period which still threaten the safe use of blood. Although HCV RNA detection can effectively shorten the window period, it is difficult to be widely adopted because of cost and practicality. HCV core protein generated in patient before seroconversion, and the quantity of core protein in blood usually indicated the HCV viral load of a patient. Therefore, the detection of HCV core protein will effectively reduce the serological window period and evaluate the effect of antiviral therapy. The present study intended to construct a HCV core antigen detection system.

We firstly constructed a non-fusion expression vector pTO-T7-C120 which contains 1-120aa of core sequence. When transformed into E.coli, the bacteria expressed a 13kD recombinant protein named c120. c120 mainly existed in the expression supernatant. c120 were purified through saturated ammonium sulfate deposition and cation exchange column chromatography and the purity of c120 is above 95% by SDS-PAGE analysis. As c120 deleted the C-terminal of core antigen which may lead to the conformational changes and epitope deficiencies, we constructed another expression vector pTrc-CKS-C173 which with contained 1-173aa sequence of core protein that fused with cks. The expression product is about 45kD, named cks-c173. cks-c173 mainly expressed in inclusion body which was dissolved in 8 M urea. cks-c173 was purified by electroelution and the final purity is above 97%. Both c120 and cks-c173 were identified to have good activity and specificity by using Western Blotting and indirect ELISA methods.

The purified c120, cks-c173 and a currently existed HCV core protein (core-R) were used to immunize BALB/c mice separately, followed with establishment of 103 hybridoma cell lines secreting McAbs against core antigen. We found that all McAbs specifically reacted with c120 in Western Blotting. Meanwhile, we identified the epitope of 60 McAbs by using synthetic peptides and indirect ELISA, and these epitopes can be divided into 5 groups according to reaction site: 25 McAbs recognized 25-39aa, 21 McAbs recognized 90-119aa, 9 McAbs recognized 49-78aa, 4 McAbs recognized 17-31aa, and 1 McAb recognized 33-47aa of HCV core sequence. These results clarified the dominant epitopes of the recombinant proteins, and indicated that exposed dominant epitopes of the three proteins are different. In addition, we also used synthetic peptides and indirect ELISA to analyze the epitope distribution of anti-HCV core antibody in HCV patient sera. Our result showed that the epitope distribution was much wider, and there were more conformational anti-core antibodies in the sera of patient, when compared with mice sera that was immunized by recombinant core protein. Further, from the results we speculate that 49-78aa may be an important linear epitope of nature core antigen.

Finally, we examined 103 McAbs for their detecting ability on c120 protein by using a double-antibody sandwich ELISA. We successfully screened 6 pairs of McAbs combinations in which the sensitivity to c120 could achieve to 100pg/mL, and one pair 83-65HRP could reach to 50pg/mL. The screened out McAbs were then used to detect natural core antigen from 25 patients sera that both anti-HCV and HCV PCR were positive. We found 2 pairs (83/97-65HRP) combinations could successfully detect natural core antigen with a sensitivity of 8/25, and the 2 pairs also had good specificity.

This study preliminary established a HCV core antigen detection system, which provides many useful information and experience to finally establish a HCV Ag/Ab assay. However, the system needs to be further evaluated with serological window period sera.

Keywords: HCV; core protein; monoclonal antibody.

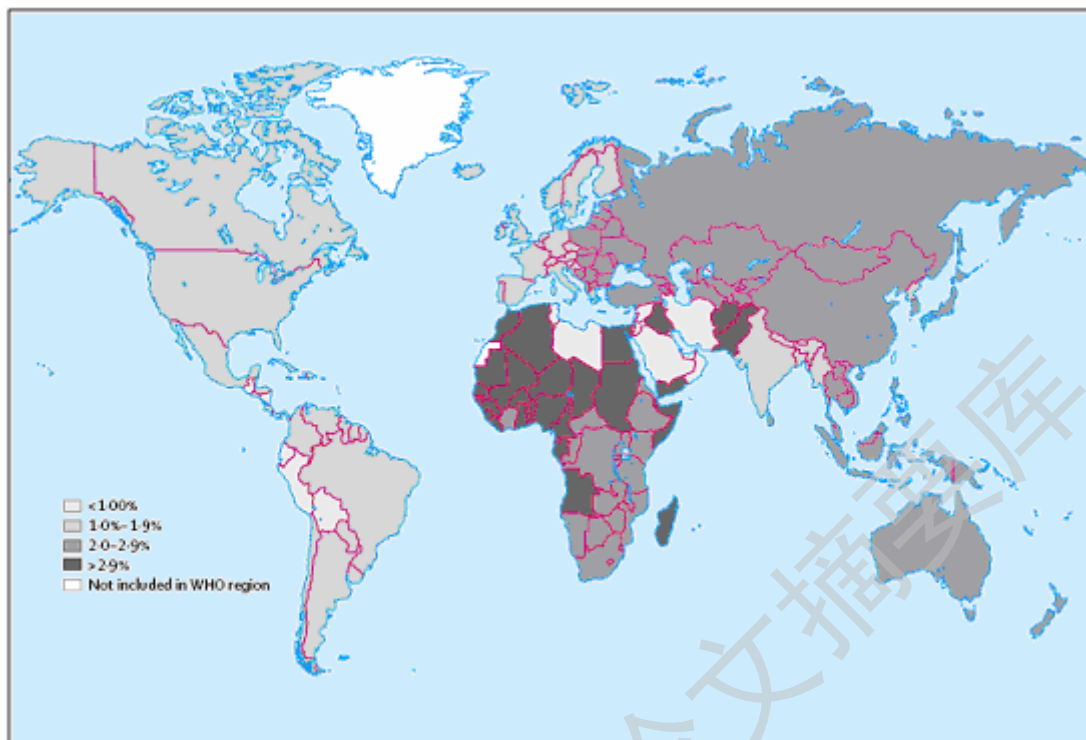
第一章 前言

1989年,美国学者 Choo 等首次从非甲非乙肝患者中发现病毒,后命名为丙型肝炎病毒,归类于黄病毒科,肝病毒属。HCV 是一种包膜 RNA 病毒,基因组含一条单股正链 RNA,全长约 9500 多个核苷酸,整个基因组只有一个开放阅读框,位于基因组中央,编码一条含有 3008-3037 个氨基酸的病毒前体多肽。HCV 主要有 6 种基因型和超过 50 种基因亚型。HCV 主要经血液传播,可引起急、慢性病毒性肝炎,慢性肝炎迁延不愈,常导致慢性进行性肝病,包括肝硬化,甚至肝癌。近年发现 HCV 除侵袭肝脏外,还会感染各种肝外组织和器官。目前全球约有 1.23-1.7 亿人感染 HCV,WHO 最近预测的全球 HCV 感染率约为 2%^[1-3],中国有近 4 千万 HCV 感染者,感染率接近 3.2%。

一、HCV 流行病学

1 HCV 流行状况

获得全球 HCV 流行的准确数据是一项较困难的工作,因为多数 HCV 流行数据是基于献血者或慢性肝炎患者等人群中 HCV 的感染情况统计而来,这对某一地区而言并不具有普遍的代表性。虽然基于某地全部人口的代表性流调数据会更有意义,但这样的数据在全球的多数地区是不易获得的。尽管如此,经过多年的努力 WHO 根据已经报道和递交的数据公布了 HCV 的全球流行数据(图 1-1)。HCV 的分布和流行有明显的地域差别。报道 HCV 流行最严重的国家多在非洲和亚洲。北美、北欧、西欧和澳洲等发达国家的 HCV 流行率相对较低。在发达国家的血清流调中,HCV 流行率较低的国家有:德国(0.6%),加拿大(0.8%),法国(1.1%)和澳大利亚(1.1%);HCV 流行率相对较高的国家有:美国(1.8%),日本(1.5-2.3%)和意大利(2.2%)。预计发展中国家的 HCV 流行会更为严重,但因某些国家 HCV 有效流调数据的缺乏,故较难作出准确的评估。人口最多的几个发展中国家,中国的 HCV 流行率高达 3.2%,印尼 HCV 流行率为 2.1%,巴西和印度的 HCV 流行率较低,分别为 1.1%和 0.9%(表 1-1);拥有 7 300 万人口的埃及,其 HCV 流行率高达 22-25%^[1,4]。



From: Colin W Shepard, et al.Lancet Infect Dis. 2005,5: 558-567

图 1-1 HCV 全球流行图

Fig.1-1 The world HCV prevalence

表 1-1 人口最多的 6 个国家中报道的 HCV 流行情况

Tab.1-1 HCV infection prevalence in the six most populous nations in the world

国家	人口(2004)	HCV 流行率	调查人群	调查人数
中国	13 亿	3.2%	全国流调	68 000
印度	10.87 亿	0.9%	West Bengal	3579
美国	2.94 亿	1.8%	全国流调	21 214
印度尼西亚	2.19 亿	2.1%	自愿献血者	7572
巴西	1.79 亿	1.1%	自愿献血者	66 414
巴基斯坦	1.59 亿	4.0%	自愿献血者	103 858

From: Colin W Shepard, et al.Lancet Infect Dis. 2005,5: 558-567

中国一般人群抗-HCV 阳性率为 3.2%。各地抗-HCV 阳性率有一定差异，以长江为界，北方(3.6%) 高于南方(2.9%)，西南、华东、华北、西北、中南

和东北分别为 2.5%、2.7%、3.2%、3.3%、3.8%和 4.6%。抗-HCV 阳性率随年龄增长而逐渐上升，由 1 岁组的 2.0%至 50-59 岁组的 3.9%。男女间无明显差异。HCV 1b 和 2a 基因型在我国较为常见，其中以 1b 型为主；某些地区有 1a、2b 和 3b 型报道；6 型主要见于香港和澳门地区，在南方边境省份也可见此基因型^[5]。

2 HCV 的传播

HCV 主要通过血液传播。不安全输血、静脉注射毒品、不安全的医疗注射和侵入性医诊都是传播 HCV 最主要的途径。HCV 通过性传播和垂直传播的几率要远低于 HBV 和 HIV，因此性传播可能并不是 HCV 传播的主要途径。另外，一些研究人员利用流行病学和分子进化学的方法研究发现，HCV 主要基因型在不同国家的爆发很大程度上是与当地不安全的注射医疗相关的，例如在埃及和日本，全国血吸虫治疗运动时期的不安全注射医疗导致了 HCV 在以上两国的爆发流行(表 1-2)^[4]。

表 1-2 不同国家 HCV 爆发流行传播途径的研究总结

Tab.1-2 Summary of studies on HCV transmission in different countries

国家	HCV 基因型	预测初次发现 HCV 感染时间	预测初次爆发 HCV 时间	与 HCV 爆发相关的社会和 历史事件
埃及	4a	1902	1930s	全国注射治疗血吸虫病运动
日本	1b(1st wave)	1812	1920	全国注射治疗血吸虫病运动
日本	1b(2ed wave)	1918	1940s	二战
西班牙	1b	1892	Late 1930s	西班牙内战
法国	NR	NR	1940s	二战
前苏联	3a	1958	1960s	注射囊尾蚴疫苗运动及 IDU
美国	1a, 1b	1920	1960s	IDU 及不安全输血
中国	1b	1966	1970s	文革、输血及侵入性医疗
南非	5a	1937	Late 1950s	不安全医疗
越南	1a	1920	Late 1960s	越南内战

From: Daniele Prati. Journal of Hepatology. 2006, 45:607-616.

2.1 静脉注射毒品 (injection drug use, IDU) 传播

IDU 已成为发达国家 HCV 最主要的传播途径。在美国和澳大利亚, 当前通过 IDU 传播 HCV 的比例分别为 68% 和 80%, 且作为主要的传播途径已超过 30 年。IDU 史达 6 年以上的人群中, HCV 感染率高达 64-94%^[1]。在加拿大, 从 1993 年至今, 约 70-80% 的 HCV 感染者有 IDU 史^[2]。在欧洲的挪威、法国、意大利、英格兰和威尔士等地 IDU 也是感染 HCV 最主要的因素^[1]。

2.2 不安全的医疗注射和侵入性医诊

WHO 预计, 全球每年约有超过 160 亿次的注射是在贫穷地区进行的, 且因经济和条件限制, 约有 67 亿次注射是通过重复使用注射器进行的, 预计每年全球至少有 230 万起 HCV 感染是由不安全注射引起^[6, 7]。重复使用注射器最严重的地区是中东、东南亚和西太平洋地区^[7]。在埃及, 1960-1987 年间全国血吸虫治疗运动中重复使用污染的玻璃注射器是造成埃及 HCV 大流行的主因, 也使其成为全球 HCV 流行最严重的国家^[8]。一些研究表明非必须的注射医疗也是造成 HCV 流行的一个重要原因。例如, 维生素、抗生素或止痛药等可口服药的注射医疗, 以及对一些常见病 (头痛、发烧、恶心等) 的注射医疗, 这一问题在前苏联尤为突出。Simonsen 等最近的研究表明在坦桑尼亚、俄罗斯和印尼非必须注射分别占到这些国家全部注射的 70%、85-99% 和 82%^[9]。其次, 使用未经严格消毒的牙科器械、内镜、介入医疗、人工流产、针刺等手术器械, 都可造成 HCV 感染。一些可能导致皮肤破损和血液暴露的传统医疗方法也与 HCV 传播有关^[5]。

2.3 输血传播

在对献血者进行抗-HCV 筛查后, 通过输血传播 HCV 的途径得到了有效控制。鉴于抗-HCV 检测存在窗口期, 多数发达国家引入了对献血者 HCV RNA 的检测 (HCV nucleic acid technology, HCV-NAT), 进一步降低了输血者感染 HCV 的可能性。目前预测在美国、加拿大和不同欧洲国家每百万次输血感染 HCV 的几率分别为 0.52、0.7 和 0.1-2.33^[4]。但另有研究表明 HCV-NAT 在减少 HCV 感染几率上的贡献明显不及人们的预期。2001 年到 2003 年间从欧洲 14 个国家收集的 5 800 万份献血中, 仅有 54 份是 HCV RNA 阳性/抗-HCV 阴性, 即 HCV-NAT 贡献的窗口期血清检出率仅为 0.93/百万^[10]; 这一几率在美国、太平洋地区和日

本分别为 3.92/百万、2.37/百万和 2.98/百万^[10, 11]。但在中国这一几率高达 1%^[12]。

在亚洲和非洲很多发展中国家，因经济和条件的限制，对献血员抗-HCV 筛查并不普及。在巴基斯坦，仅有 23%的血库进行抗-HCV 筛查^[13]。2000 年印度一份调查表明，87%的血库会筛查 HBV，95%的血库会筛查 HIV，而仅有 6%的血库会对 HCV 进行筛查^[14]。在撒哈拉以南非洲，仅有南非和津巴布韦会持续对献血者进行抗-HCV 检测^[15]。由于 HCV 在发展中国家有较高的流行率，且这些国家大部分都没有完善的 HCV 监测和输血安全体制，这将导致这些国家 HCV 的流行日益严重。研究表明，布隆迪、喀麦隆、坦桑尼亚和中非共和国的献血者中 HCV 阳性率分别为 4.9%，8.7%，8%和 6.1%^[13, 15, 16]。而在拉美和加勒比地区，因有 28 个国家（共 38 个国家）加入了 PAHO(Pan-American Health Organization)，故这些国家对献血者抗-HCV 的筛查率近 100%^[17, 18]。故而拉美和加勒比地区献血者中 HCV 阳性率仅为 0.1-1.1%和 0.7-1.9 %^[17, 18]。

2.4 性传播和垂直传播

性传播可能并不是 HCV 感染的主要途径（不考虑特殊人群和特殊地域），长期单性伴侣的人感染 HCV 的几率是极低的。单性伴侣是 HCV 感染者或多性伴侣则存在感染 HCV 的可能，但传播几率要远低于其它可通过性传播的疾病（HBV、HIV）。若同时伴有其他性病和 HIV，则感染 HCV 的危险性明显提高^[1, 5]。近期的报道发现欧洲的男同性恋者间（非吸毒人群）通过性传播 HCV 的几率在增多，并同时伴有 HIV 和其它性病的感染^[2]。

HCV 通过垂直传播的几率亦远低于 HBV 和 HIV，并不经哺乳传播^[2]。阳性母亲将 HCV 传播给新生儿的危险性为 2%，若母亲在分娩时 HCV RNA 阳性，则传播的危险性可高达 4-7%；合并 HIV 感染时，传播的危险性增至 20%。HCV 病毒高载量可能增加传播的危险性^[5]。

2.5 其它传播途径

通过一般接触及偶然因素感染 HCV 的几率是很低的。据报道医护人员不慎被污染的针刺后感染 HCV 的几率低于 0.3%^[1]。共用剃须刀、牙刷、文身和穿耳孔等可能是 HCV 潜在的经血传播方式，但仍缺乏可信的数据支持。部分 HCV 感染者的传播途径不明。接吻、拥抱、喷嚏、咳嗽、食物、饮水、共用餐具和水杯、无皮肤破损及其它无血液暴露的接触一般不传播 HCV^[2, 5]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库