

多表位丙型肝炎病毒抗原的表达和分析

苏秋东 郭敏卓 伊瑶 毕胜利 贾志远 邱丰

摘要 目的 目前常用的丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)血清学检测试剂都基于3~6个重组蛋白或合成多肽,抗原制备繁琐且诊断效果参差不齐。制备一种诊断效能优良的HCV抗原势在必行。**方法** 利用原核表达系统和层析纯化技术制备涵盖我国HCV主要流行株(1b和2a)的6个免疫显性区域的多表位HCV抗原(命名为H65),并以此建立HCV-IgG的血清学检测方法,通过对部分HCV阴性血清的检测,初步评价了H65抗原的免疫活性。**结果** 融合Trx标签的H65抗原为可溶性形式表达,纯化后蛋白浓度可达2.991mg/ml,纯度为94.53%;Western blot法检测实验初步证实了蛋白H65的抗原性;应用某商品化试剂盒与H65抗原血清检测方法,对50份HCV阴性血清进行检测,McNemer检验显示,新制备诊断抗原与“金标准”比较, $P > 0.05$, $Kappa > 0.75$,且与某商品化试剂盒比较, $P > 0.05$, $Kappa > 0.75$,提示一致性优异。**结论** H65具有良好的免疫活性,为进一步应用多表位HCV抗原为基础的HCV-IgG体外诊断试剂提供了依据。

关键词 丙型肝炎病毒 多表位诊断抗原 原核表达与层析纯化 免疫检测

中图分类号 R512.6

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.06.011

Preparation of a Multi-epitope Fusion Antigen for Hepatitis C Virus Antibodies Immunoassay. Su Qiudong, Guo Minzhuo, Yi Yao, et al. Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Abstract Objective Current Hepatitis C virus (HCV) immunoassays used three to six separate recombinant proteins or synthetic peptides with cumbersome preparation of diagnostic antigens and uneven diagnostic efficiency. It is imperative to prepare a HCV antigen with excellent diagnostic efficiency. **Methods** Prokaryotic expression and chromatographic purification were applied to prepare multi-epitope HCV diagnostic antigens (named H65) covering six immunodominant regions of HCV major epidemic strains (1b and 2a) in China. The immunological activity of H65 antigen was preliminarily evaluated by detection of some hepatitis C virus negative and positive sera. **Results** With Trx as a tag, the soluble H65 was prepared with the concentration 2.991mg/ml and purity 94.53%. Western blot analysis demonstrated the antigenicity of H65. Based on the data from 50 HCV positive and negative sera, McNemer test suggested that there was no statistical difference between the ‘Gold standard’ and H65-based immunoassay with a $Kappa > 0.75$, while there was also no statistical difference between a commercial kit and H65-based immunoassay with a $Kappa > 0.75$, indicating excellent consistency. **Conclusion** H65 had good immunological activity, which provided a basis for further application of multi-epitope HCV antigen-based HCV-IgG immunoassay.

Key words Hepatitis C virus; Multi-epitope diagnostic antigen; Prokaryotic expression and chromatographic purification; Immunoassay

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)属于黄病毒科肝炎病毒属,是一种由脂膜包裹的正链RNA病毒。其基因组RNA长约9600nt,包含一个多蛋白开放阅读框,编码约3000个氨基酸的多聚蛋白,结构蛋白主要有C、E1和E2,非结构蛋白主要有NS2、NS3、

NS4A、NS4B、NS5A和NS5B。HCV是慢性肝炎的主要致病因子,预估全球有7110万慢性丙肝患者,约10%~20%慢性肝炎患者在20~30年里将会发展为肝纤维化和肝硬化甚至肝癌^[1]。2015年全球HCV感染诊断率仅为20%,其中只有15%确诊丙肝患者得到了有效治疗,HCV的诊断治疗问题亟待解决^[2]。在目前直接抗病毒(direct-acting antivirals, DAAs)疗法对HCV有效的情况下,提高诊断及治疗率对于实现世界卫生组织2030年消除病毒性肝炎的目标至关重要。

HCV实验室诊断主要包括核酸和血清学诊断。需要提取病毒核酸、受型别特异性限制、成本高以及

基金项目:“十三五”国家科技重大专项基金资助项目(2018ZX10734404)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(苏秋东、伊瑶、毕胜利、贾志远、邱丰);100026 北京海关技术中心(郭敏卓)

通讯作者:贾志远,电子信箱:jiazy@ivdc.chinaacdc.cn;邱丰,电子信箱:qiufeng615@sina.com

需要专业操作是核酸检测的弊端。而血清学检测简单易行,成本低廉,所以一直是 HCV 临床诊断的主要辅助手段。HCV 病毒蛋白 C、NS3、NS4 和 NS5 区拥有保守的免疫显性区域^[3]。因此 HCV 抗体检测用诊断抗原主要围绕这 4 个区设计。第 1 代 HCV 抗体检测使用 NS4 的一段抗原,第 2 代为包含 C、NS3 和 NS4 免疫显性区的重组抗原,目前使用的第 3 代检测试剂加入 NS5 区抗原且优化了 NS3 区抗原^[4]。迄今已经发现 HCV 存在 8 个基因型和 86 个基因亚型^[5,6]。因此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,大大增加了检测成本和非特异性反应。多表位 HCV 诊断抗原的设计为解决这些问题提供了一条很好的途径。最早的多表位抗原出现在 2006 年,随后不同的设计层出不穷^[7]。我国 HCV 主要流行亚型为 1b 和 2a^[8]。此研究将这两种主要流行亚型的 6 个主要免疫区域进行串联,制备新型 HCV 抗体诊断抗原,并利用阴阳性血清评价其诊断效能。

材料与方 法

1. 主要材料与试剂:BL21(DE3)感受态细胞购自北京金全生物技术有限公司。M48 载体,为本科室构建,由 pET43.1a 载体,在 Nde I 和 Nco I 酶切位点之间插入 Trx 标签改造所得。限制性内切酶 Nco I 和 Xho I 以及 T4 DNA 连接酶购自美国 NEB 公司。预整合 Ni²⁺亲和层析介质为美国 GE 公司产品。山羊抗人 IgG H&L(HRP)酶标物为英国 Abcam 公司产品。50 份 HCV 阳性血清参照 WS213-2018 丙型肝炎诊断标准:①生化指标异常;②血液抗-HCV 阳性;③血液 HCV RNA 阳性,核酸定量范围为 4.97(4.52,6.34)[Log 转换,中位数(Q1,Q3)];④来源于科室现存血清库。50 份 HCV 阴性血清:①血液抗-HCV 阴性;②血液 HCV RNA 阴性;③来源于科室现存血清库。HAV、HBV、HDV 及 HEV 阳性血清各 20 份,由实验室和临床确诊,来源于科室现存血清库。

2. HCV 多表位诊断抗原表达质粒的制备:根据参考文献[4,9~13]与相关经验,将 HCV NS3(1b)aa 1201-1464、Core(1b)aa 1-34、NS4A(1b)aa 1681-1735、NS4A(2a)aa 1681-1735、NS4B(2a)aa 1929-1935 及 NS5A(2a)aa 2273-2307 等 6 个抗原区域用(GGGG)₃进行串联,5'端添加 CCATGG(Nco I)酶切位点,3'端添加 CTCGAG(Xho I)酶切位点,密码子优化后交由日本 TaKaRa 公司进行基因合成,命名为 H65F。利用 Nco I 和 Xho I 限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶将 H65F 亚克隆到 M48 表达载体上,转

化 BL21(DE3)感受态细胞。16h 后挑取 6 个单菌落(1~6 号)接种于 2ml 培养基中(10g/L 蛋白胨,5g/L 酵母提取液,10g/L NaCl,50μg/ml 氨苄霉素)振荡培养,诱导进行小量表达,提取质粒进行测序并双酶切鉴定,验证正确的质粒命名为 H65。

3. HCV 多表位诊断抗原的制备:选择 4 号作为菌株进行大量表达(3L),诱导条件为 30℃,1mmol/L IPTG,5h。离心(3500r/min,10min,4℃)收集沉淀,用溶解缓冲液(20mmol/L 磷酸盐缓冲液,20mmol/L 咪唑,0.5mol/L NaCl,pH 7.0)重悬后用超声仪破碎(功率 300W,超声时间 20s,间歇时间 20s,共 20 个循环),离心(11000r/min,10min,4℃)收集上清。将上清加载于预整合 Ni²⁺亲和层析介质中。分别用 0、0.1、0.5mol/L 咪唑(溶于溶解缓冲液中)进行梯度洗脱。取样进行 SDS-PAGE(恒流 35mA,45min)电泳,分析 H65 蛋白的含量以及分布情况。将 H65 蛋白蛋白含量最高、纯度最好的洗脱液于 PBS(137mmol/L NaCl,2.7mmol/L KCl,10mmol/L Na₂HPO₄,2mmol/L KH₂PO₄,pH 7.4)中透析,并于 0℃保存备用。

4. HCV 多表位诊断抗原抗原性初步分析:H65 蛋白抗原性的初步分析利用 Western blot 法检测。取 10μl 透析后 H65 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳(恒流 35mA,45min),半干转膜法(恒压 15V,35min)至 PVDF 膜上。室温,封闭液(1% BSA,0.05% 吐温-20,溶于 PBS 中)振荡孵育 PVDF 膜 1h。室温,1:10 稀释 HCV 阴阳性血清后分别处理两块 PVDF 膜 1h,而后用 PBS 洗膜 10min。用山羊抗人 IgG H&L(HRP)酶标物(1:5000)室温处理 PVDF 膜 1h 后用高盐缓冲液(0.5mol NaCl,0.2% SDS,溶于 PBS 中)洗膜 30min 后超纯水洗膜,用 DAB 显色,清水终止显色。

5. HCV 多表位诊断抗原诊断效能评价:利用蛋白 H65 建立血清 HCV-IgG 抗体检测间接法 ELISA 试剂盒,对“金标准”确诊的阴阳性血清样本以及其他肝炎病毒阳性标本进行检测,评价其对阴阳性血清标本的鉴别能力,并与某商品化试剂盒进行比较,评价其优劣。包被缓冲液(50mmol/L 碳酸盐缓冲液,pH 9.6)1:300 稀释蛋白 H65 后加入 ELISA 板中,37℃孵育 2h。37℃,封闭液孵育 1h 后用 PBST 洗涤。每孔加 PBS 和待测血清各 50μl,37℃孵育 1h 后洗涤;加入山羊抗人 IgG H&L(HRP)酶标物(1:6000),37℃孵育 1h 后洗涤;加新鲜配制 TMB 液显色,2mol/L H₂SO₄ 终止反应。用酶标仪测定 450nm 处各孔吸收度值(A 值)。

利用某商品化 HCV - IgG ELISA 检测试剂盒检测待测同批血清,具体操作遵循厂家说明书,最后用酶标仪测定 450nm 处吸收度值(A 值)。

6. 统计学方法:实验数据采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析,用 GraphPad Prism 8.00 软件绘制 6 组血清 A 值散点图。对 HCV 阴阳性两组血清 A 值分布进行 Wilcoxon 检验(独立样本 Mann - Whitney U 检验),原假设为在两组类别上,A 值分布相同。根据经验选取阴性血清 A 值均值 2.1 倍作为临界值。用 McNemer 检验及 Kappa 一致性检验评价两种检测方法的一致性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 融合表达层析纯化可获得高纯度蛋白 H65: HCV 6 个抗原区域用 (GGGS)₃ 串联并进行密码子优化后,片段大小为 1608bp(图 1A),构建好的表达质粒经测序、双酶切鉴定(图 1B)及小量表达(图 2A)证实构建成功,命名为 H65 质粒。

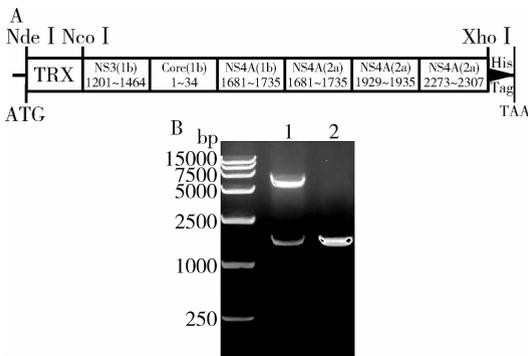


图 1 H65 表达质粒的构建

A. H65 表达区段示意图; B. H65 表达质粒的鉴定;
1. H65 表达质粒双酶切鉴定; 2. H65 基因片段

H65 蛋白小量表达 SDS - PAGE 结果发现,与未诱导菌比较,诱导菌组在约 74.2kDa 处有明显表达条带(图 2A),H65 蛋白在大肠杆菌中表达良好。大量表达(3L)发现 H65 蛋白占菌体总蛋白的 39.82%(图 2B)。超声处理后发现蛋白 H65 主要存在上清中(图 2B)。经亲和层析纯化后 H65 蛋白主要存在于 0.5mol/L 咪唑洗脱液中,浓度为 2.991mg/ml,纯度为 94.53%(图 2B)。

2. 蛋白 H65 可以与 HCV - IgG 阳性血清发生特异性反应:利用 Western blot 法,初步鉴定蛋白 H65 的抗原性。HCV 阳性血清作为一抗,山羊抗人 IgG H&L(HRP)酶标物作为二抗,在 NC 膜上相应位置出现了明显条带(图 3A);而 HCV 阴性血清作为一抗,

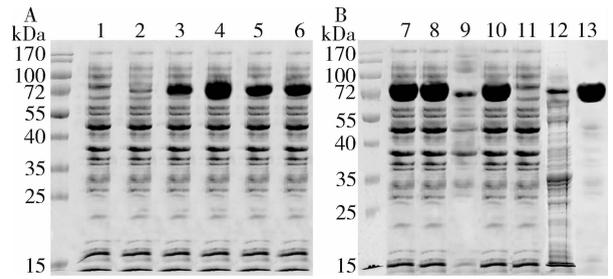


图 2 蛋白 H65 表达及纯化电泳分析

A. 小量表达; B. 大量表达及纯化。1. 未诱导菌; 2~6. 诱导菌; 7. 超声后总菌体蛋白; 8. 超声液上清; 9. 超声液沉淀; 10. 亲和层析上样; 11. 穿柱; 12. 0.1mol/L 咪唑洗脱液; 13. 0.5mol/L 咪唑洗脱液

在 NC 膜上相应位置无条带(图 3B)。并且无论是用 HCV 阴阳性血清,无蛋白 H65 表达菌(空载体)都未出现明显条带(图 3)。

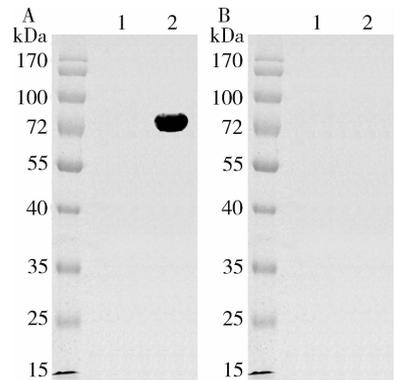


图 3 蛋白 H65 的 Western blot 法分析

A. HCV 阳性血清作为第一抗体,羊抗人 IgG H&L(HRP)作为第二抗体; B. HCV 阴性血清作为第一抗体,羊抗人 IgG H&L(HRP)作为第二抗体; 1. 阴性对照; 2. H65 蛋白

3. 基于蛋白 H65 的间接法 ELISA 可以很好地鉴别 HCV - IgG 阴阳性血清标本:蛋白 H65 作为包被抗原建立间接法 ELISA 试剂,分别对 50 份 HCV 阳性和阴性血清样本进行检测。阳性样本 A 值分布为 1.487 ± 0.055 ,阴性血清样本 A 值分布为 0.082 ± 0.007 。两组数据分布比较使用 Wilcoxon 检验,结果发现两组数据分布明显不同($P < 0.01$),根据经验阴性血清 A 值均值 2.1 倍作为临界值得出临界值为 0.171。McNemer 检验显示结果,新制备诊断试剂与“金标准”比较, $P = 1.00$, $Kappa = 0.940$,提示诊断结果与“金标准”一致性优异。

应用某商品化试剂盒检测相同的血清(按照说明书判定阴阳性),阳性结果 46 份(46/50),阴性结果 44 份(44/50)。与新型试剂盒进行比较,详见表 1,进行 McNemer 检验发现, $P = 1.00$, $Kappa = 0.900$ 。

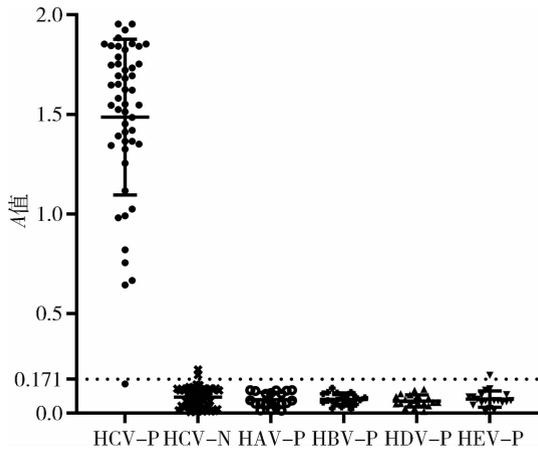


图4 蛋白 H65 在 HCV 感染血清学诊断效果
P. 阳性血清;N. 阴性血清

表1 新制备与商品化试剂盒比较(n)

项目	判定结果	商品化试剂盒		总数
		阳性	阴性	
新制备	阳性	49	2	51
试剂盒	阴性	3	46	49
总数		52	48	100

讨 论

多表位抗原区域的选择依赖于4个关键因素:①免疫显性区域;②对HCV抗体特异;③属于线性或连续性表位;④在不同基因型之间进化保守^[4]。除了NS3区抗原区段大小达到264个氨基酸外,其他5个抗原区段大小都低于60个氨基酸。Palenzuela等^[14]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触发的,因此为了促使NS3区构象型表位的形成,在其区域片段的选择上并没有局限于文献所报道的表位区域。同样,其他5个免疫显性区域的选择也在文献报道表位区的基础上上下游延伸部分氨基酸,以尽力确保完整表位的展现^[15,16]。考虑到我国HCV的主要流行株为1b和2a,尤其是1b占主导地位^[8]。因此在抗原区域的选择上,NS3、C和NS4A选取1b基因亚型,NS4A、NS4B和NS5A选取2a基因亚型。其中NS4A在1b和2a基因亚型中不保守,因此共存了这两个相似表位^[17]。

多表位串联表达增加了蛋白高级结构的呈现及表达的难度^[18]。首先,表位区域上下游的延伸以及GGGS连接臂的加入大大降低了各抗原区域之间的相互影响。选取的免疫显性区主要为线性表位,加之连接臂的存在,大大降低了错误折叠的发生。其次,Trx标签的融合,大大提高了可溶性表达的概率。再

者,密码子的优化并不单单考虑最优密码子的替换,同时还考虑了转录和翻译以及核酸二级结构的动能变化。最后,表达条件的优化让大部分目的蛋白以可溶性形式存在,且表达量占菌体总蛋白的39.82%(图2B)。

基于多表位HCV诊断抗原建立的间接法ELISA敏感度为98.00%(cut-off值为0.171),特异性为96.00%,阳性预测值为96.08%,阴性预测值为97.96%,符合率为97.00%。虽然与某商品化试剂盒比较不能否定一致性检验存在差异($Kappa = 0.900$),但参考上述指标,新制备检测试剂更加优异。而且包被抗原只使用1个融合蛋白,相对于传统诊断试剂使用3~6个融合蛋白大大降低了诊断试剂的成本以及假阳性结果的出现,为血清学诊断的普遍使用及HCV诊断率的提高奠定基础^[19]。

本研究不足之处在于没有评价新制备试剂对不同基因型HCV血清标本的诊断效能。下一步工作将利用不同基因型(对HCV1b和2a基因型血清标本诊断效能优异,数据未发表)血清对抗原的诊断效能进行全面评价。

总之,多表位HCV诊断抗原能够在原核表达系统中可溶性表达,以这一融合蛋白建立的间接法ELISA能够对HCV阴阳性血清标本鉴别诊断。

参 考 文 献

- 1 Spearman CW, Dusheiko GM, Hellard M, et al. Hepatitis C[J]. Lancet, 2019, 394(10207): 1451-1466
- 2 Mane A, Sacks J, Sharma S, et al. Evaluation of five rapid diagnostic tests for detection of antibodies to hepatitis C virus (HCV): a step towards scale-up of HCV screening efforts in India[J]. PLoS One, 2019, 14(1): e0210556
- 3 Huang JS, Xie YM, Ren DM. Genetic variation and conserved epitopes of hepatitis C virus[J]. Prog Biochem Biophys, 1999, 26(1): 50-51
- 4 Salminen T, Juntunen E, Khanna N, et al. Anti-HCV immunoassays based on a multiepitope antigen and fluorescent lanthanide chelate reporters[J]. J Virol Methods, 2016, 228: 67-73
- 5 The Polaris Observatory HCV Collaborators. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2017, 2: 161-176
- 6 Borgia SM, Hedskog C, Parhy B, et al. Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: expanding classification of hepatitis C virus into 8 genotypes[J]. J Infect Dis, 2018, 218: 1722-1729
- 7 Dipti CA, Jain SK, Navin K. A novel recombinant multiepitope protein as a hepatitis C diagnostic intermediate of high sensitivity and specificity[J]. Protein Exp Purificat, 2006, 47(1): 319-328

(下转第55页)

外痔的病变特征似乎也支持动静脉畸形、动静脉瘘的存在。肛垫的充血,必须靠动脉供血、静脉闭合来完成。内外痔之间和外痔的静脉丛参与这个过程,这些静脉丛从外包绕着大量肌肉和弹性纤维,通过这些肌肉的收缩来完成静脉丛的闭合。如果肛垫内存在动静脉畸形、动静脉瘘,长期过度充血引起肛垫支撑结构的破坏使肛垫始终处于充血状态,加重排便过程中静脉回血压力,引起侧支血管开放和静脉血管的增生,使包绕在动、静脉丛外肌肉和弹性纤维过度伸展破坏,从而引起内外痔的血管的融合,外痔的肿胀。若血液回流受影响,则可引起血栓、炎性反应、增生、纤维化等一系列病理生理反应。

根据上述组织病理学结合超声影像学发现,推测痔组织内动静脉畸形、动静脉瘘存在。痔血管的形态学改变在痔形成过程中是不可忽略重要因素,可以较全面地揭示痔的形成机制。而经直肠彩色多普勒超声能为痔病的临床治疗提供一种高敏感、特异、准确的诊断方法,可更精确地指导手术治疗。希望此发现能够为广大研究者提供新的研究方向或者切入点以此推进痔病机制研究。

参考文献

- 1 肖团有, 孙锋, 黄丹丹, 等. 脱垂性痔形成机制研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2016, 30(7): 637-638
- 2 吴长君, 刘银龙, 王俊峰, 等. 肛管的双平面超声声像图研究[J]. 中华超声影像学杂志, 2010, 19(11): 960-962
- 3 高家治, 刘华, 王振宜, 等. 痔病症状发作诱发因素的对照研究及

其与中医证型相关性[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2013, 19(3): 223-226

- 4 张东铭. 痔与便秘[J]. 中华全科医师杂志, 2005, 4(7): 403-405
- 5 张东铭. 大肠肛门局部解剖与手术学[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1999: 88-89
- 6 任东林. 任东林肛肠外科手术集[M]. 北京: 人民军医出版社, 2013: 62-63
- 7 张东铭. 痔病的病理及病理生理学[J]. 大肠肛门病外科杂志, 2002, 8(5): 16-25
- 8 孙平良, 肖振球, 尹雪曼, 等. 嵌顿痔的临床病理研究[J]. 广西中医学院学报, 2003, 6(1): 8-11
- 9 陈光忠, 李铁林, 姜晓丹, 等. 脑动静脉畸形血管形态构筑及相关生物学研究[J]. 中华神经医学杂志, 2005, 4(8): 779-782
- 10 柳登高, 马绪臣, 高岩, 等. 动静脉瘘、动静脉畸形组织病理学观察[J]. 现代口腔医学杂志, 2002, 16(1): 17-20
- 11 Scioscia M, Zantedeschi B, Trivella G, et al. A suggestive diagnosis of uterine arteriovenous fistula based on ultrasonography and hysteroscopy[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2012, 160(1): 116-117
- 12 苗立友, 陈俊, 曹荔, 等. 二维及多普勒超声在后天性子宫动静脉瘘的临床应用[J]. 东南大学学报: 医学版, 2014, 33(4): 482-485
- 13 李佳, 熊屏, 龚霞, 等. 动静脉畸形与静脉畸形的超声图像对比分析[J]. 中国超声医学杂志, 2019, 35(1): 22-24
- 14 Rangarajan RD, Moloney JC, Anderson HJ. Diagnosis and nonsurgical management of uterine arteriovenous malformation[J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2007, 30(6): 1267-1270
- 15 Adilijiang Aimaiti, Mamutijiang Ababaikere, Irshat, et al. Sonographic appearance of anal cushions of hemorrhoids[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(20): 3664-3674

(收稿日期: 2019-10-31)
(修回日期: 2019-12-31)

(上接第50页)

- 8 Zhang Y, Chen LM, He M. Hepatitis C virus in mainland China with an emphasis on genotype and subtype distribution[J]. Virol J, 2017, 14(1): 41
- 9 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
- 10 管洁, 邓瑶, 陈红, 等. 表达丙型肝炎病毒(HCV)截短型 NS3 与 core 融合抗原的重组腺病毒疫苗在小鼠中的免疫原性与保护效果分析[J]. 病毒学报, 2015, 31(1): 7-13
- 11 Naik AS, Palmer BA, Crosbie O, et al. Humoral immune system targets clonotypic antibody-associated hepatitis C virus[J]. J General Virol, 2017, 98(Pt. 2): 179-189
- 12 谢无畏, 孟超, 关素梅. 丙型肝炎病毒 NS3 抗原检测现状分析[J]. 北京医学, 2018, 2: 144-145, 149
- 13 Piepenbrink KH, Rapp CA, Pierce BG, et al. Structure-based design of hepatitis C virus vaccines that elicit neutralizing antibody responses to a conserved epitope[J]. J Virol, 2017, 91(20): e01032-17
- 14 Palenzuela DO, 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

- 15 Tu B, Ziemann RN, Tieman BC, et al. Generation and characterization of chimeric antibodies against NS3, NS4, NS5, and core antigens of hepatitis C virus[J]. Clin Vaccine Immunol, 2010, 17(6): 1040-1047
- 16 Sillanpää M, Melén K, Porkka P, et al. Hepatitis C virus core, NS3, NS4B and NS5A are the major immunogenic proteins in humoral immunity in chronic HCV infection[J]. Virol J, 2009, 6(1): 84
- 17 Chusri P, Kumthip K, Pantip C, et al. Influence of amino acid variations in the NS3, NS4A and NS4B of HCV genotypes 1a, 1b, 3a, 3b and 6f on the response to pegylated interferon and ribavirin combination therapy[J]. Virus Res, 2015, 196: 37-43
- 18 Kim DS, Kim SW, Song JM, et al. A new prokaryotic expression vector for the expression of antimicrobial peptide abaecin using SUMO fusion tag[J]. BMC Biotechnol, 2019, 19(1): 13
- 19 Lavanchy D, Steinmann J, Möritz A, et al. Evaluation of a new automated third-generation anti-HCV enzyme immunoassay[J]. J Clin Lab Analysis, 2015, 10(5): 269-276

(收稿日期: 2019-11-05)
(修回日期: 2019-12-23)