

# 多肽研究 XX: 丙型肝炎病毒(HCV)合成多肽的抗原性及线性抗体谱

刘 刚<sup>1\*\*</sup> 梁争论<sup>2</sup> 蔡孟深<sup>1\*</sup> 庄 辉<sup>2</sup> 郭建平<sup>3</sup> 陶其敏<sup>3</sup>

(北京医科大学, <sup>1</sup>药学院有机化学研究室; <sup>2</sup>公共卫生学院流行病学研究室;

<sup>3</sup>人民医院肝病研究所, 北京 100083)

**摘要** 依据蛋白质的亲水性、可亲性、柔韧性、抗原性、电荷分布及 HPLC 滞留系数等六种性质, 使用“Goldkey”软件系统给出了 HCV-BK 各蛋白抗原决定簇预测曲线, 共设计、合成 15 个多肽片段: P1(475~495), P3(449~468), P4(658~663), P5(645~663), P6(484~489), P7(475~489), P15(655~662), P16(230~237), P17(225~237), P18(1220~1240), P19(1694~1735), P24(1230~1240), P25(1482~1493), P26(384~389)和 P27(2355~2389)。发现 NS1 区 P6 和 NS4 区 P19 有很强的抗原性。用其检测 PT-HC, 阳性率分别为 60% 和 63%。

**关键词** 丙型肝炎; 合成多肽; 抗原性; 抗原决定簇

前文已经报道丙型肝炎病毒(HCV)核心区及高变区(E2 HV)合成多肽的抗原性及免疫原性的研究结果<sup>[1,2]</sup>。本文继续报道 HCV 其余区域里合成多肽的抗原性及 HCV 线性抗体谱。

使用“Goldkey”软件系统, 综合蛋白质的亲水性、可亲性、柔韧性、抗原性、电荷分布及 HPLC 滞留系数等六种性质, 给出 HCV-BK<sup>[3]</sup>各蛋白抗原决定簇预测曲线。参考此图设计了如下多肽片段: P1: AERSRSDQRPYCWHYPPQCT(475~495), P3: NSSGCPERMAQCRTIDKFDQ(449~468), P4: DRPELS(658~663), P5: NWTRGERCDLEDRDRPELS(658~663), P6: PYCWHY(484~489), P7: AESSRSDQRPYCWHY(475~489), P15: EDRDRPEL(655~662), P16: VREGNSSR(230~237), P17: GCVPCVREGNSSR(225~237), P18: PQSFQVAHLHAPTGS-GKSTKV(1220~1240), P19: IVPDRELLYQEFDEMEECASHLPYIEQGMQLAEQFKQKALGL(1694~1735), P24: APTGSGKSTKV(1230~1240), P25: VSRSQRRGRTGR(1482~1493), P26: ETHVTG(384~389), P27: GSSAVDSGTATGPPDQASDDGDKGSDVESYSSMPE(2360~2389)。

## 材 料 和 方 法

### 材料与仪器

所有N-Boc 保护氨基酸及氯甲基化树脂(1.04 mmol Cl/g, 1% cross-linked, 200~400 mesh),

本文于 1995 年 8 月 21 日收到。

本课题系卫生部“八五”招标项目。

\* 通讯联系人。

\*\* 现在军事医学科学院毒物药物研究所从事博士后研究工作。

$N_{\alpha}$ -*t*-Boc-*L*-glutamine resin ester, 0.38 mmol  $\text{NH}_2/\text{g}$ , 1% cross-linked, 200~400 mesh。DCC, HOBt, HOSu 均购于 Sigma 公司。其中氨基酸侧链保护基为 Arg(Tos), Asp(OBzl), Cys(*p*-MBz), Glu(OBzl), Lys(2-Cl-CBZ), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Trp(For) 和 Tyr(2,6-Cl<sub>2</sub>-Bzl)。Sephadex G10, G15 和 G25(Pharmacia), 鼠抗人辣根过氧化酶, 96 孔丹麦 Nunc 酶标板均购于华美生物制品公司。

高效液相色谱仪(1)系 Waters-510 型, 泵为 Model-50 型, 检测器为 Waters 490 型, 检测波长 214 nm, TSK ODS-120 C18 反相半制备柱(7.8 mm×300 mm); (2) LKB(Bromma) 2151 多波长检测器, 2152 型 LC Controllar, 2150 型 HPLC Pump,  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub>(0.78 cm×30 cm)反相半制备柱。日立 835-50 型氨基酸自动分析仪, 确定氨基酸残基组成。日本岛津 UV-260 紫外分光光度计, 配合茚三酮法测定树脂氨基负载量。SLT-450 型酶标仪自动读出吸光度。

抗-HCV 阳性血清: 30 份输血后丙型肝炎(PT-HC)系列血清采自河北省固安县, 40 份慢性非甲非乙型肝炎病人血清来自北京医科大学肝炎试剂中心。抗-HCV 标准参比血清由中国药品生物制品检定所提供。

## 实验方法

**制备氨基树脂, 固相多肽合成及纯化** 所有肽段均采用 Merrifield 固相多肽合成法完成, 合成步骤参见文献<sup>[1]</sup>。其中 P19 和 P27 使用 Ab[43]型多肽自动合成仪合成。

**酶联免疫吸附实验(ELISA)** 参见文献<sup>[1]</sup>。

## 结果和讨论

输血后非甲非乙型肝炎(PT-NANBH)绝大部分为丙型肝炎(HC), 该病慢性化程度高, 而且很可能与肝癌有关。我国单采浆献血员中 HCV 感染率高, 严重影响血液质量。目前, 由于 HCV 的高度异质性, 研制 HC 疫苗仍停留在寻找能够激起宿主产生保护性抗体的抗原上。前文我们已经报道 HCV 核心抗原 P14 的抗原性及 HCV E2 HV 高变区抗原免疫原性的研究结果<sup>[1,2]</sup>。本文继续研究 HCV 除核心区区和 E2 HV 区外所有 HCV 蛋白的抗原性。

从应用“Goldkey”程序所制的 epitope 曲线<sup>[1]</sup>看, HCV 蛋白的抗原决定簇位点非常复杂。我们在 HCV 不同区域的 epitope 曲线最高处选择上述肽段。表 1 和表 2 是采用标准固相多肽合成法合成的多肽片段 HPLC 及氨基酸组成分析结果。表 3 给出各合成多肽的酶联免疫吸附实验结果。发现 NS1 区 P6 和 NS4 区的 P19 有高抗原性。将 P6 作为单一抗原进一步与第二代 Abbott EIA 比较, 在总共 44 份 ALT 异常者血清中, Abbott EIA 检出 34 份抗 HCV 阳性, P6 检出 20 份, 阳性率 58.8%(20/34)。10 份 Abbott EIA 阴性血清, P6 亦全部阴性, 表明 P6 的特异性极高。但延长 P6 的氨基酸序列时, 合成多肽抗原性下降, 直至最后消失。如 P1(475~495)和 P7(475~489)。在 NS1 区里另外一个抗原决定簇预测位点 P4(658~663)没有显示出抗原性。同样, 延长 P4 的氨基酸序列时亦没有发现变化。见 P5(645~663), P15(655~662)。P18(1220~1240), P24(1230~1240)和 P25(1482~1493)抗原性研究结果表明, NS3 区不具备线性抗原。文献报道, 第二代 HCV 检测试剂盒中加入 NS3 区重组抗原, 使检测率提高 10~20%。因此, 该区应以构象决定簇为主。NS4 和 NS5 区存在线性抗原, NS4(P19)区强于 NS5(P27)区。当用 39 份阳性血清检测 P19 和 P27 时, 二者的阳性率分别为 64.1%(25/39)和 12.8%(5/39)。将 P6 和 P19 检测河北省固安县 PT-HC 时, 结果基本一致(见表 4)。另外, 从表 4 中可以看出, P6 和 P14 阳性一致率高, 而 P19 略低。说明宿主体内抗核心区抗体与抗 NS1 区抗体结构相似, 而与抗 NS4 区抗体结构存在差异。抗-P10(E2 HV)阳性的 PT-HC 病人中 ALT 正常者多于异常者, 是因为 HCV 感染者的抗-HCV 应答率个

体差异较大,抗体谱和抗体阳转时间差别较大所致。故对 HCV 感染者不同的采血时间可影响抗-HCV检测结果。因此,在组成 HCV 检测试剂和组成合成多肽疫苗免疫抗原时至少应当同时包含核心区及 NS4 区线性抗原。我们合并 CP10, P14 和 P19 后,HCV 检出率提高 6.67%(表 4)。

综合上述实验结果可以看出,人体抗-HCV 抗体很复杂,见表 4。单一区内的线性抗原尚难组成有效的免疫抗原。HCV 核心区(C 区)位于聚蛋白前体氨基酸序列的 1~190 位。此区序列有高度的遗传保守性和亲水性,代表 HCV 基本生物功能。该区合成多肽抗原性最高(93.33%)<sup>[2]</sup>。包膜蛋白 E1 区和 E2/NS1 区分别位于 191~383 位及 384~750 位。该区是 HCV 基因组变异最大的部位。HCV-1 和 HCV-J 的同源率仅为 75.5% 和 72.5%<sup>[5]</sup>。此处抗原表现出了复杂性。其中 NS1 区 P6 和 E2 HV 区段的多肽 P10 有较强的抗原性,PT-HC 阳性率分别为 60% 和 30%。NS3 区为构象抗原决定簇,NS4 和 NS5 存在线性抗原(P19 和 P27),它们亦是合成多肽疫苗的组成部分。

Tab 1 The conditions of analytic or preparative HPLC

Peptide	K' (min)	Eluotropic condition * * *	Flow rate	Column
P1	31	0.2% TFA—MeOH(70:30)	V1	a*
P3	43	0.1% TFA—CH <sub>3</sub> CN(85:15)	V2	b**
P4	8.5	0.1% TFA—MeOH(65:15)	V1	b**
P5	28	0.1% TFA—MeOH(90:10)	V1	a*
P6	11	0.1% TFA—CH <sub>3</sub> CN(85:15)	V2	b**
P7	30	0.2% TFA—MeOH(70:30)	V1	a*
P15	18	0.1% TFA—CH <sub>3</sub> CN(90:10)	V1	b**
P16	14.5	0.1% TFA—CH <sub>3</sub> CN(90:10)	V1	b**
P17	23	0.1% TFA—CH <sub>3</sub> CN(90:10)	V1	b**
P18	37	0~10 min 0.1% TFA—CH <sub>3</sub> CN(98:2) 10~25 min 0.1% TFA—CH <sub>3</sub> CN(90:10) 25~45 min 0.1% TFA—CH <sub>3</sub> CN(80:20)	V1	b**
P19	54	0~15 min 0.1% TFA—CH <sub>3</sub> CN(98:2) 15~30 min 0.1% TFA—CH <sub>3</sub> CN(95:5) 25~45 min 0.1% TFA—CH <sub>3</sub> CN(90:10) 45~60 min 0.1% TFA—CH <sub>3</sub> CN(85:15)	V1	b**
P24	15	0.1% TFA—MeOH(90:10)	V1	a*
P25	13	0.1% TFA—MeOH(90:10)	V1	a*
P26	11	0.1% TFA—CH <sub>3</sub> CN(85:15)	V2	b**
P27	37	0~10 min 0.1% TFA—CH <sub>3</sub> CN(96:4) 10~25 min 0.1% TFA—CH <sub>3</sub> CN(90:10) 25~50 min 0.1% TFA—CH <sub>3</sub> CN(85:15)	V1	b**

a.  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> 0.78 cm  $\times$  30 cm; b. Ultropac column, TSK ODS-120T 10  $\mu$ m, 7.8 mm  $\times$  300 mm; \* . LKB 2151 variable wavelength monitor, LKB 2150 HPLC pump, LKB 2152 LC controller; \* \* . 510-Model Waters Liquid Chromatograph; V1 = 1.0 ml  $\cdot$  min<sup>-1</sup>; V2 = 1.5 ml  $\cdot$  min<sup>-1</sup>. Detection wavelength: 215 nm; \* \* \* . Elution with a nonlinear gradient condition.

Tab 2 The amino acid composition of synthetic peptides

Peptide	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Pro
P1	1.1 (1)	0.9 (1)	2.1 (2)	2.7 (3)	-	1.0 (1)	1.5 (2)	-	-	-	-	1.9 (2)	-	-	0.6 (1)	2.8 (3)	3.8 (4)
P3	3.3 (3)	0.7 (1)	2.3 (2)	2.8 (3)	1.0 (1)	1.1 (1)	1.8 (2)	-	1.1 (1)	1.2 (1)	-	-	0.8 (1)	1.1 (1)	-	2.3 (2)	0.6 (1)
P4	1.2 (1)	-	1.1 (1)	0.9 (1)	-	-	-	-	-	-	0.9 (1)	-	-	-	-	1.4 (1)	1.0 (1)
P5	3.8 (4)	0.7 (1)	1.1 (1)	1.9 (2)	1.0 (1)	0.8 (1)	-	-	-	2.0 (2)	1.1 (1)	-	-	-	-	4.4 (4)	1.1 (1)
P6	-	-	-	-	-	-	0.8 (1)	-	-	-	-	2.1 (2)	-	-	1.0 (1)	-	1.0 (1)
P7	0.8 (1)	-	2.8 (3)	1.8 (2)	-	0.9 (1)	0.7 (1)	-	-	-	-	2.2 (2)	-	-	0.9 (1)	1.9 (2)	1.0 (1)
P15	1.9 (2)	-	-	2.1 (2)	-	-	-	-	-	-	0.7 (1)	-	-	-	-	1.9 (2)	1.0 (1)
P16	-	-	1.9 (2)	1.9 (2)	1.0 (1)	-	-	0.8 (1)	-	-	-	-	-	-	-	2.0 (2)	-
P17	0.9 (1)	-	1.9 (2)	0.7 (1)	2.0 (2)	-	2.1 (2)	1.8 (2)	-	-	-	-	-	-	-	1.5 (2)	1.1 (1)
P18	-	1.6 (2)	2.6 (3)	1.8 (2)	1.9 (2)	2.0 (2)	-	2.0 (2)	-	-	1.0 (1)	-	0.9 (1)	1.6 (2)	1.7 (2)	-	1.9 (2)
P19	2.1 (2)	-	1.0 (1)	11.4 (12)	1.8 (2)	3.1 (3)	1.1 (1)	1.0 (1)	2.0 (2)	2.1 (2)	5.8 (6)	1.9 (2)	2.4 (2)	2.3 (2)	1.1 (1)	1.0 (1)	2.0 (2)
P24	-	2.3 (2)	1.9 (2)	-	2.0 (2)	0.8 (1)	-	1.1 (1)	-	-	-	-	-	2.2 (2)	-	-	1.0 (1)
P25	-	1.1 (1)	2.1 (2)	0.7 (1)	2.0 (2)	-	-	0.8 (1)	-	-	-	-	-	-	-	4.8 (5)	-
P26	0.9 (1)	2.0 (2)	-	-	1.0 (1)	-	-	-	1.1 (1)	-	-	-	-	-	0.7 (1)	-	-
P27	5.7 (6)	1.9 (2)	7.5 (8)	2.8 (3)	5.1 (5)	2.9 (3)	-	1.9 (2)	1.0 (1)	-	-	0.8 (1)	-	1.0 (1)	-	-	2.8 (3)

\* The synthetic peptides reacted with  $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl for 3 hours at  $120^\circ\text{C}$ .

Tab 3 The antigenicities of synthetic peptides

Peptide	Serum sample									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
P1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
P3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
P4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P6	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
P7	+	+	±	+	-	-	-	-	-	-
P15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P18	-	-	-	-	-	-	-	-	N	N
P19	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
P24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P25	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P27	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

\* Control positive serum.

**Tab 4 The testing results of the synthetic peptides with the PT-HC of Gu An county, He Bei province**

PTH	HCV protein region							ALT
	C region		E2 HV	NS1	NS4	NS5	CP10 + P14 + P19	
	CP10 <sup>[6]</sup>	P14 <sup>[2]</sup>	P10	P6	P19	P26		
1-1	+	+	-	+	+	-	+	>400
1-2	+	+	-	+	+	-	+	370
1-3	+	+	-	+	+	-	+	>400
2-1	+	+	+	+	+	-	+	110
2-2	+	+	+	+	+	-	+	45
2-3	+	+	+	+	+	-	+	35
3-1	+	+	+	-	+	+	+	>400
3-2	+	+	+	-	+	+	+	100
4-1	-	-	-	-	-	-	-	315
4-2	-	-	-	-	-	-	-	160
4-3	-	-	-	-	-	-	-	220
5-1	+	+	-	+	-	-	+	360
5-2	-	+	-	+	-	-	+	370
5-3	-	+	-	+	-	-	+	120
6-1	+	+	-	+	+	-	+	120
6-2	+	+	+	+	+	-	+	45
6-3	+	+	+	+	+	-	+	45
7-1	+	+	+	-	+	+	+	150
7-2	+	+	+	-	+	+	+	100
7-3	-	-	-	-	+	-	+	115
8-1	-	+	-	-	-	-	+	>400
8-2	+	+	-	-	-	-	+	>400
8-3	+	+	-	-	-	-	+	>400
9-1	-	-	-	-	+	-	+	315
9-2	+	+	-	+	-	-	+	>400
9-3	+	+	-	+	+	-	+	300
10-1	+	+	-	+	+	-	+	>400
10-2	+	+	-	+	+	-	+	290
10-3	+	+	-	+	+	-	+	200

The positive ratio: CP10 70% (21/30); P14 80% (24/30); P10 30% (9/30); P6 60% (18/30); P19 63.33% (19/30); CP10 + P14 + P19 86.67% (26/30).

总之,研制合成多肽疫苗尚有不少困难。未来合成 HCV 多肽疫苗应当以多段抗原片段组成混合免疫抗原,尤其是在 HCV 高变区(E2 HV)里应当找到有一定代表性且具免疫原性的多肽抗原方能取得突破性进展。

**致谢** 抗原决定簇预测曲线系在军事医学科学院基础医学研究所孙涛的协助下完成。

## 参 考 文 献

- 1 刘刚, 梁争论, 蔡孟深等. 多肽研究 XIX: 丙型肝炎的免疫选择性. 药学报, 1996, 31:358
- 2 梁争论, 刘刚, 庄辉等. 利用丙型肝炎核心区合成多肽抗原诊断丙型肝炎感染血清. 中国公共卫生杂志, 1994, 17:77
- 3 Chien DY, Choo Q-L, Tabrizi A, *et al.* Diagnosis of hepatitis C virus(HCV) infection using an immunodominant chimeric polyprotein to capture circulating antibodies: Reevaluation of the role of HCV in liver disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:10011
- 4 Mchntchison JG, Person JL, Govindarajan S *et al.* Improved detection of hepatitis C virus antibodies in high-risk populations. *Hepatology*, 1992, 15:19
- 5 Weiner AJ, Christopherson C, Hall JE *et al.* Sequence variation in hepatitis C virus isolates. *J Hepatol*, 1991, B(Suppl 4):6

## STUDIES ON SYNTHETIC PEPTIDE XX: THE ANTIGENICITY AND LINEAR EPI TOPE MAP OF SYNTHETIC PEPTIDE HEPATITIS C VIRUS

G Liu<sup>1</sup>, ZL Liang<sup>2</sup>, MS Cai<sup>1</sup>, H Zhuang<sup>2</sup>, JP Guo<sup>3</sup> and QM Tao<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>*School of Pharmaceutical Sciences*; <sup>2</sup>*Public Health*; <sup>3</sup>*Institute of Hepatitis, Beijing Medical University, Beijing 100083*)

**ABSTRACT** Hepatitis C virus(HCV), the major causative agent of post transfusion non-A, non-B hepatitis(NANB), had been cloned and expressed<sup>[3]</sup>. According to the protein sequence of HCV-BK and its epitope profiles which combined the hydrophilicity, accessibility, flexibility, antigenicity, charge distribution and HPLC reserve coefficient of protein using the "Goldkey" computer program, we designed and synthesized the following peptides: P1(475~495), P3(449~468), P4(658~663), P5(645~663), P6(484~489), P7(475~489), P15(655~662), P16(230~237), P17(225~237), P18(1220~1240), P19(1694~1735), P24(1230~1240), P25(1482~1493), P26(384~389), P27(2355~2389). The results of ELISA showed that P6(60% positive results) and P19(63% positive results) testing with PT-HC of Gu An, Hebei province were the major antigens in NS1 and in NS4 region, respectively.

**Key words** Hepatitis C virus; Synthetic peptides; Antigenicity; Epitopes