

## “a”决定簇 145 位点变异的 HBsAg 单克隆 抗体制备及 HBV 变异株快速检测方法\*

王 军<sup>1,2)</sup> 王 继<sup>1)</sup> 王 丽<sup>1)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup>东北师范大学遗传与细胞研究所, 长春 130024; <sup>2)</sup>长春市人民医院, 长春 130051)

**摘要** HBsAg 抗原 145 位突变, 可能导致临床上广泛使用的 HBsAg 诊断试剂出现漏检. 通过杂交瘤技术制备出了一种抗该突变体的单克隆抗体, 属 IgG1 亚类 ( $\kappa$  型, 效价为  $1:9 \times 10^4$ ) 与其他类型肝炎病毒抗原无交叉反应. 采用该单抗与多克隆抗体所建立的 AC-ELISA 法, 对临床上乙型肝炎病毒(HBV)的突变样品进行检测的特异性和敏感性较高.

**关键词** 乙型肝炎病毒表面抗原, 单克隆抗体, HBV 变异株, ELISA

**学科分类号** R329.2

乙型肝炎(HB)是严重危害人类健康的传染性疾病. 近年来, 随着乙肝疫苗在全球范围内的广泛接种, 可逃逸乙肝疫苗免疫产生的中和抗体的 HBsAg 变异株越来越受到关注. 特别是在接受乙肝疫苗免疫, 拉米夫定抗病毒治疗及肝移植后接受 HB 免疫球蛋白治疗的患者中, 不断发现 HBsAg “a” 决定簇突变的病毒<sup>[1~4]</sup>. 其中, G145R 变异株不仅流行广泛, 而且同野生病毒株一样, 具有致病性和传播能力, 而且与肝炎的不良预后有关<sup>[5]</sup>. 研究表明, 145 位点的突变会导致 HBsAg 抗原性改变, 致使临床上广泛使用的 HBsAg 诊断试剂对其无法检出, 造成漏检<sup>[5~7]</sup>. 更为严重的是, 用现行乙肝疫苗接种产生的抗体不能中和该变异株. 在大范围人群接种乙肝疫苗后, 由 G145R 变异株引起的感染, 很可能会成为新的公共卫生问题. 因此, 及时快速准确地检测出 “a” 决定簇突变变异株的感染很有意义. 目前, HBV 的变异可通过 PCR 和 DNA 测序等技术来检测<sup>[8]</sup>, 但这些方法费用较高、技术难度大, 尚不适于大量临床标本的分析. 本文作者制备了抗 “a” 决定簇 145 位变异 HBsAg (a-145-HBsAg) 的单克隆抗体, 并通过该单抗和抗 HBsAg 的多克隆抗体建立了 HBV 变异株的快速检测方法. 这对于 HBV 变异株感染病例的诊断具有重要的参考价值.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂.** 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂和二氨基联苯胺(DAB)购于 Promega 公司; 抗 HBsAg 多克隆抗体为四环生物工程制品厂产品; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自北京中山生物技术公司; RPMI-1640 培养基、100 倍 HT 和 50 倍 HAT、聚乙二醇 4000 为 Sigma 公司产品; 抗体亚类鉴定试剂和胎牛血清分别购于晶美公司和 Hyclone 公司.

**1.1.2 实验动物.** BALB/C 小鼠 (6~8 周龄和 10 周龄以上, 分别用于免疫和腹水制备)购自长春生物制品研究所实验动物中心.

**1.1.3 骨髓瘤细胞及免疫原.** SP2/0 骨髓瘤细胞由军需大学病毒研究所提供; 145 位点突变 S 蛋白由本实验室纯化制备.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 单克隆抗体的制备.

a. 动物免疫及细胞融合. 采用纯化后的 a-145-

\* 吉林省科技发展计划项目(20060923-02)和长春市科技局资助项目(2005-120/05GG76).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 0431-85099624, Fax: 0431-85693965, E-mail: wangli@nenu.edu.cn

收稿日期: 2007-06-12, 接受日期: 2007-07-13

HBsAg (100 mg/L) 免疫雌性 BALB/C 小鼠. 首次免疫用弗氏完全佐剂进行乳化, 之后均用弗氏不完全佐剂乳化, 共免疫 3 次, 每次间隔 2 周; 第 3 次免疫后 2 周. 尾静脉注射 50  $\mu$ g a-145-HBsAg, 3 天后取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 混合, 按常规方法在 PEG4000 的作用下进行融合及 HAT 选择培养.

b. 阳性克隆的筛选、克隆化及腹水的制备. 以纯化后的 a-145-HBsAg 作为包被抗原, 用间接 ELISA 法对杂交瘤上清进行检测. 选择阳性克隆, 并通过有限稀释法进行 2 次克隆后扩大培养, 接种于 BALB/C 小鼠腹腔制备腹水.

### 1.2.2 单克隆抗体特性的鉴定.

a. 抗体效价的测定. 通过硫酸铵沉淀腹水中的蛋白质, 以 a-145-HBsAg 作为包被抗原, 采用间接 ELISA 法对抗体的效价进行测定.

b. Ig 类别鉴定. 通过间接 ELISA 法, 对抗体 Ig 类及亚类进行鉴定.

c. 单克隆抗体识别抗原位点. 用本室制备的纯化“a”决定簇 145 位点突变蛋白和非突变蛋白以及牛血清白蛋白分别包被酶联板, 采用间接 ELISA 法, 分析抗原的识别位点.

1.2.3 AC-ELISA 反应条件的优化. 选择不同的实验条件, 进一步对包被抗体的浓度、包被时间、封闭液的种类、酶标二抗反应时间及底物作用时间进行摸索, 确定最佳反应条件.

1.2.4 AC-ELISA 检测样品阴性临界值的确定. 经病毒分离和 PCR 检测 20 份阴性血清样品, 用 AC-ELISA 法进行分析, 在样品符合正态分布的条件下, 计算出阳性样品  $A_{490}$  值的平均数 ( $\bar{x}$ ) 和标准差 ( $s$ ), 按计算阴阳性抗原的临界值  $\bar{x}+3s$ , 根据统计学原则, 当  $A_{490} > \bar{x}+3s$  时, 可以在 99.9% 的可信度上判断为阳性, 作为检测结果的判断标准. 为了降低假阳性或假阴性结果, 将临界值加上和减去 1 个标准差范围, 作为一个可疑区间, 介于可疑区间内的结果进行重检.

1.2.5 AC-ELISA 检测临床样品. 将临床采集的 30 份乙型肝炎住院患者血浆样品和 24 份其他类型肝炎患者血浆样品, 用于 AC-ELISA 法的检测.

## 2 结 果

### 2.1 单克隆抗体的制备

细胞融合后, 经筛选及克隆化, 获得了 3 株 (I B11, II E8 及 III E3) 可稳定分泌抗 S 蛋白的单克

隆抗体杂交瘤细胞株, 并制备了腹水. 以原核表达的 S 蛋白作为包被抗原, 用间接 ELISA 法检测 3 株单克隆抗体的效价 (表 1). 结果显示, III E3 的抗体效价最高 ( $1:8.5 \times 10^5$ ).

Table 1 McAb titers of supernatants and ascites of the hybridoma cell line

| Hybridoma cell line | Culture fluid | Ascites             |
|---------------------|---------------|---------------------|
| I B11               | 1:320         | 1:4.1 $\times 10^4$ |
| II E8               | 1:640         | 1:9.0 $\times 10^4$ |
| III E3              | 1:3200        | 1:8.5 $\times 10^5$ |

用 Ig 类及亚类鉴定试剂 (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA) 及轻链亚型鉴定试剂 ( $\lambda$  及  $\kappa$ ), 以间接 ELISA 法对抗体进行分析, 结果表明: I B11 抗体为 IgG2b 亚类,  $\lambda$  型; II E8 为 IgG1 亚类,  $\kappa$  型; III E3 为 IgG1 亚类,  $\kappa$  型.

在间接 ELISA 反应结束后, 在 490 nm 和 630 nm 双波长下测定  $A$  值. 包被有突变蛋白的酶联板的  $A$  值为 1.435, 明显高于包被非突变蛋白 ( $A=0.309$ ) 和牛血清白蛋白 ( $A=0.176$ ) 的酶联板, 说明所获得的单抗可特异结合突变蛋白.

### 2.2 AC-ELISA 的反应条件优化

通过对多种条件的摸索, 确定最佳反应条件为: 以 II E8 作为包被抗体, 用碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 稀释至 2 mg/L, 每孔 100  $\mu$ l (4 $^{\circ}$ C, 过夜). 用 PBS 含 5% 牛血清, 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h. 用 PBS+0.1% Tween20 洗涤 3 次后加入待检样品 (37 $^{\circ}$ C, 1 h). 洗涤 3 次. 将纯化的兔抗 HBsAg 多克隆抗体用 PBS 溶液稀释至 1 mg/L, 每孔加入 100  $\mu$ l (37 $^{\circ}$ C, 1 h). 洗涤后加入 1:10 000 稀释的酶标抗体 (37 $^{\circ}$ C, 1 h). 彻底洗涤后加入底物溶液显色 (37 $^{\circ}$ C, 20 min), 用 2 mol/L  $H_2SO_4$  终止反应, 用酶标仪测  $A_{490}$  值.

### 2.3 样品临界值的测定

20 份经病毒分离和 PCR 检测 HBV 阴性的血清样品, 按上述 AC-ELISA 法进行检测, 如图 1 所示: 20 份样品的  $A_{490}$  值介于 0.197~0.304 之间.  $A_{490}$  的平均值 ( $\bar{x}$ ) 和标准差 ( $s$ ) 分别为 0.253 和 0.027, 因此, 阴性样品的临界值为  $\bar{x}+3s=0.334$ . 当  $A_{490} > 0.334$ , 可以在 99.9% 的可信度上判断为阳性, 作为检测结果的判断标准. 为了减少假阳性或假阴性结果, 将临界值加上和减去 1 个标准差的范围, 作为一个可疑区间 (即  $0.307 < A_{490} < 0.361$ ) 介于可疑区间内的结果需要重检.

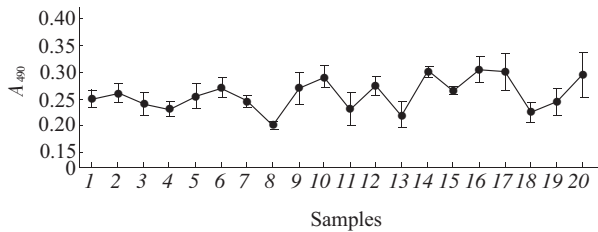


Fig. 1 Analysis of the negative control samples by AC-ELISA method

Table 2 Analysis of the samples from hepatitis patients by AC-ELISA method

| Samples from hepatitis B patients |       |       |       | samples from other hepatitis patients |       |       |       |       |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 0.265                             | 0.220 | 0.503 | 0.255 | 0.252                                 | 0.218 | 0.335 | 0.297 | 0.258 |
| 0.209                             | 0.458 | 0.442 | 0.469 | 0.202                                 | 0.231 | 0.225 | 0.259 | 0.228 |
| 0.497                             | 0.502 | 0.360 | 0.254 | 0.319                                 | 0.277 | 0.222 | 0.231 | 0.286 |
| 0.301                             | 0.277 | 0.132 | 0.470 | 0.222                                 | 0.251 | 0.206 | 0.145 | 0.136 |
| 0.263                             | 0.254 | 0.088 | 0.154 | 0.442                                 | 0.228 | 0.235 | 0.297 | 0.258 |
| 0.218                             | 0.253 | 0.236 | 0.357 | 0.251                                 | 0.264 | 0.136 | 0.258 | 0.186 |

3 讨 论

乙型肝炎病毒(HBV)在复制中由于存在逆转录过程,因而较其他病毒更容易发生突变<sup>[9]</sup>.乙型肝炎病毒的每一个基因区域和编码的每一个蛋白质均可发生突变,藉此可发生疫苗逃避、诊断逃避、免疫逃避和抗病毒治疗逃避等,不同的基因区发生突变其临床意义也不同.

乙肝表面抗原(HBsAg)的突变,特别是“a”决定簇的145位氨基酸的突变比其他位点更为常见,而且对抗HBs抗体的识别具有更明显的影响<sup>[5,10]</sup>.此位点的突变会改变HBsAg的抗原性,使其不能被常规的诊断试剂所识别,从而造成漏检.目前检测HBV突变的方法有数种,大多是检测HBV的DNA,主要包括直接杂交、核酸序列测定、限制性片段长度多态性分析(RFLP)法、PCR核酸杂交等方法<sup>[8]</sup>.其中直接杂交法操作相对简单,所用试剂较少,血清样品可不经处理直接进行HBV的DNA检测,但检测灵敏度较低.序列分析和RFLP法结果准确可靠,但不适合大批量样品检测.PCR是对HBV DNA进行扩增的有效手段,PCR法与杂交法结合是提高PCR法的特异性和灵敏性的重要途径.但PCR在操作中,需揭开检测管进行分析,是造成PCR污染的一个重要原因.

2.4 AC-ELISA 对临床样品的检测

将临床采集的30份乙型肝炎住院患者血浆样品和24份其他型肝炎患者血浆样品,用上述AC-ELISA进行检测(表2).按诊断标准,共从30份乙型肝炎患者血浆样品中检出8份阳性样品( $A_{490} > 0.361$ )和3份疑似样品( $0.307 < A_{490} < 0.361$ ).经序列分析,8份阳性样品中有6份为S区145位点变异株.从24份其他型肝炎患者血浆样品中检出1份疑似样品.

荧光杂交法则将污染的可能性大大降低,并且操作简单、快速敏感,但试剂和仪器高昂,使其推广应用受到了限制.

本文作者通过抗S蛋白单克隆抗体及其多克隆抗体建立了145位突变HBsAg的AC-ELISA检测方法,经过对临床样品的检测结果证明,该方法具有较高的检测特异性及敏感性.进一步制备针对其他位点突变的单克隆抗体,并将多个单克隆抗体混合作为包被抗体,再与多克隆抗体建立HBsAg的ELISA方法,有望解决隐性HBV持续性感染的漏检问题,从而使更多的人免受HBV的侵袭.

参 考 文 献

1 Roqu e-Afonso A M, Ferey M P, Belkhiri D, *et al.* HBs antigen mutants: prevalence, clinical and diagnostic implications. *Pathol Biol (Paris)*, 2005, **53**(8~9): 56~58

2 Mathet V L, Feld M, Espinola L, *et al.* Hepatitis B virus S gene mutants in a patient with chronic active hepatitis with circulating Anti-HBs antibodies. *J Med Virol*, 2003, **69**(1): 18~26

3 Kazim S N, Sarin S K, Sharma B C, *et al.* Characterization of naturally occurring and Lamivudine-induced surface gene mutants of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B in India. *Intervirology*, 2006, **49**(3): 152~160

4 Lee S Y, Choi M S, Lee D, *et al.* Overlapping gene mutations of hepatitis B virus in a chronic hepatitis B patient with hepatitis B surface antigen loss during lamivudine therapy. *J Korean Med Sci*, 2005, **20**(3): 433~437

- 5 Cooreman M P, Leroux-Roels G, Paulij W P. Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. *J Biomed Sci*, 2001, **8**(3): 237~247
  - 6 Koyanagi T, Nakamuta M, Sakai H, *et al.* Analysis of HBs antigen negative variant of hepatitis B virus: unique substitutions, Glu129 to Asp and Gly145 to Ala in the surface antigen gene. *Med Sci Monit*, 2000, **6**(6): 1165~1169
  - 7 Mizuochi T, Okada Y, Umemori K, *et al.* Reactivity of genotypically distinct hepatitis B virus surface antigens in 10 commercial diagnostic kits available in Japan. *Jpn J Infect Dis*, 2005, **58**(2): 83~87
  - 8 张晓春, 许欣. HBV DNA 检测方法研究进展, 现代预防医学, 2002, **29**(6): 798~799
  - 9 王永忠, 阮丽花, 周国平, 等. DNA 芯片在乙型肝炎病毒基因突变分析中的应用. 放射免疫学杂志, 2005, **18**(5): 397~398
  - 10 徐丽宏, 梁国栋, 付士红. G145R 突变后 HBsAg ‘a’ 决定簇合成肽的免疫学特性分析. 中华微生物学和免疫学杂志. 2005, **25**(8): 642~647
- Zhang X C, Xu X. *Modern Preventive Medicine*, 2002, **29**(6): 798~799
- Wang Y Z, Ruan L H, Zhou G P, *et al.* *Radioimmunity Journal*. 2005, **18**(5): 397~398
- Xu L H, Liang G D, Fu S H. *Journal of China Microbiology and immunology*. 2005, **25**(8): 642~647

## Preparation of Monoclonal Antibody Against “a” Determinant With Mutation on Site 145 and Rapid Diagnosis Assay for HBV Mutant Strain\*

WANG Jun<sup>1,2)</sup>, WANG Ji<sup>1)</sup>, WANG Li<sup>1)</sup>\*\*

<sup>(1)</sup>*Institute of Genetics and Cytology, Northeast Normal University, Changchun 130024, China;*

<sup>(2)</sup>*People's Hospital of Changchun, Changchun 130051, China)*

**Abstract** Hepatitis B virus surface antigen with mutation on site 145 may cause omission in detection of hepatitis B virus with HBsAg diagnostic reagent. Monoclonal antibody against this mutation was obtained through hybridoma technique. The sub-class of the monoclonal antibody was determined to be IgG1 (κ type, the titer is 1 : 9×10<sup>4</sup>), and the monoclonal antibody has no cross-reaction to other hepatitis virus. The method of AC-ELISA which was established with monoclonal antibody and polyclonal antibody showed high analysing susceptibility for HBV mutant samples.

**Key words** hepatitis B virus surface antigen(HBsAg), monoclonal antibody, HBV mutant strain, ELISA

---

\*This work was supported by a grant from The Science and Technology Development Planning Project of Jilin Province (20060923-02), and The Bureau of Science and Technology of Changchun City (2005-120/05GG76).

\*\*Corresponding author. Tel: 86-431-85099624, Fax: 86-431-85693965, E-mail: wangli@nenu.edu.cn

Received: June 12, 2007 Accepted: July 13, 2007