

单克隆抗体组对重组乙肝表面抗原突变体的结合能力分析

祝长城, 李基* (上海科华生物工程股份有限公司, 上海 200233)

[关键词] 乙肝表面抗原突变体; 高灵敏度 [中图分类号] R446.62 [文献标志码] B

世界卫生组织(WHO)报道, 超过20亿人曾经感染过HBV^[1], 其中有3.5亿是慢性持续感染^[2], 以及每年超过百万的慢性乙肝携带者死于肝硬化或肝癌^[3]。HBV是一种双链环状DNA病毒^[4], DNA长度约为3200 bp, 是通过一RNA作为媒介进行复制的^[5], 主要是因为DNA聚合酶具有的逆转录酶活性。正是由于逆转录复制的错误率较高, 导致了乙肝病毒基因易发生变异, 倘若发生在编码表面抗原的抗体结合部位(aa124~147)的基因发生变异, 将导致部分突变的抗原对野生型抗原具有高亲和力的单克隆抗体(mAb)的结合力降低, 从而引起乙肝表面抗原诊断试剂盒的漏检。故筛选对不同突变位点的乙肝表面抗原突变体具有高亲和力的mAb至关重要, 本实验对乙肝表面抗原mAb库中的59多个mAb进行分析, 并对不同类型的mAb归类, 找出互补的mAb进行组合来制备和完善乙肝表面抗原诊断试剂盒。

1 材料和方法

1.1 材料 乙肝表面抗原mAb(共59个)来源于上海科华生物工程股份有限公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗乙肝表面抗体(HB1-HRP)来源于上海科华生物工程股份有限公司。乙肝表面抗原突变体(T126S, Q129H, M133L, T143L,

D144A, G145R)来源于上海科华生物工程股份有限公司^[6]。adw2亚型来源于Bioscience公司, adr和ay亚型来源于中国药品生物制品检定所; 用HBsAg阴性血清稀释adw2至0.11 IU/mL, adr至0.08 ng/mL, ay至0.1 ng/mL。其他辅助试剂和设备如洗涤液, 显色剂, 洗板机, 酶标仪等均来自上海科华生物工程股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 包被板的制备 分别将59个乙肝表面抗原单克隆抗体以1 μg/mL溶于pH9.6的碳酸缓冲液中, 取100 μL于96孔微孔板中, 2~8℃过夜, 用牛血清白蛋白封闭后, 冻干, 封板, 于2~8℃储存备用。

1.2.2 酶结合物的制备 将辣根过氧化物酶标记的山羊抗乙肝表面抗体(HB1-HRP)以1 μg/mL稀释于含有牛血清的磷酸缓冲液中, 于2~8℃储存备用。

1.2.3 乙肝表面抗原突变体的检测 采用双抗体夹心法对不同突变位点的乙肝表面抗原突变体以一定浓度稀释于乙肝五项全阴的阴性血清中, 进行检测分析。

1.2.4 乙肝表面抗原诊断试剂盒的制备和完善 挑选出若干个互补的乙肝表面抗原mAb作为包被抗体, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗乙肝表面抗体(HB1-HRP)作为酶结合物, 采用方阵滴定法, 确定最佳的包被浓度和酶的浓度, 使得试剂盒的灵敏度和特异性达到最佳, 其检测原理见图1。

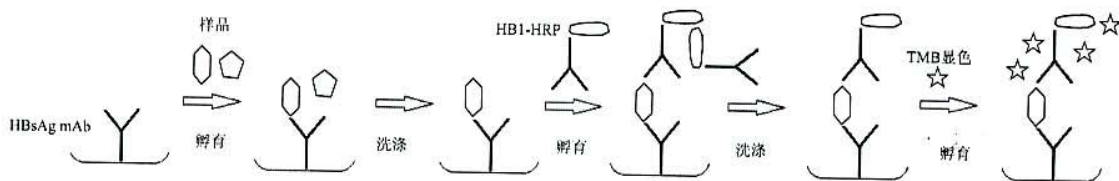


图1 乙肝表面抗原诊断试剂盒(酶联免疫法)的检测原理

2 结果

2.1 乙肝表面抗原mAb对不同位点的乙肝表面抗原突变体的检测及乙肝表面抗原mAb的分类 不同的mAb对不同位点的乙肝表面抗原突变体有不同的识别能力, 某些mAb对Q129H具有较强的亲和

力, 另外一些mAb则对T143L, D144A, G145R等具有较强的亲和力, 表明不同类型mAb是针对于乙肝表面抗原不同位点, 根据乙肝表面抗原mAb针对于不同的乙肝表面抗原位点, 大致将所筛选的59个mAb分为14类(表1)。

收稿日期: 2012-09-19; 接受日期: 2012-10-31

作者简介: 祝长城(1984-), 男, 江苏徐州人, 硕士

Tel: 021-64850088; E-mail: changchengzh@163.com

* Corresponding author, 李基, E-mail: lijij@skhb.com

2.2 乙肝表面抗原诊断试剂盒的完善 挑选出2株 mAb(mhbs9 和 mhbs39)进行混合包被, 方阵滴定法优化, 优化后的试剂盒对当前临床出现的乙肝表面抗原突变体具有较高的结合能力(表2), 可以有效解决试剂盒漏检。

表1 乙肝表面抗原 mAb 对重组乙肝表面抗原突变体及亚型的检测

类型	筛选参数 抗体类型	重组乙肝表面抗原突变体						亚型 adw2
		T126S	Q129H	M133L	T143L	D144A	G145R	
1	mhbs1 ~ mhbs8	1.13	8.77	11.67	0.22	0.32	0.20	1.89
2	mhbs9 ~ mhbs12	2.14	10.09	14.03	3.99	0.29	2.39	2.28
3	mhbs13 ~ mhbs20	0.16	0.39	1.32	0.94	0.38	0.27	0.94
4	mhbs21 ~ mhbs27	0.15	0.54	1.35	0.73	0.42	0.73	0.29
5	mhbs28 ~ mhbs29	0.19	0.60	0.88	0.32	0.15	0.18	0.24
6	mhbs30 ~ mhbs35	0.82	6.61	9.90	2.96	0.27	0.58	1.67
7	mhbs36 ~ mhbs37	1.40	8.52	11.07	3.40	0.95	4.58	1.95
8	mhbs38	1.10	1.61	11.78	3.29	2.52	7.67	0.81
9	mhbs39 ~ mhbs44	1.11	5.81	11.87	3.58	3.34	7.80	0.99
10	mhbs45 ~ mhbs48	0.51	0.58	7.91	2.96	2.06	4.27	0.81
11	mhbs49 ~ mhbs51	0.80	5.68	9.50	2.28	1.46	3.84	1.74
12	mhbs52 ~ mhbs54	1.72	6.98	10.57	1.49	1.28	0.37	1.27
13	mhbs55 ~ mhbs57	0.16	0.32	0.46	0.38	0.42	0.23	1.76
14	mhbs58 ~ mhbs59	0.13	0.43	0.47	0.25	0.33	0.27	0.30

注: 表格中数值为 S/COV.

表2 改进后的试剂盒对乙肝表面抗原突变体和亚型的检测

样本类型	重组乙肝表面抗原突变体						亚型		
	T126S	Q129H	M133L	T143L	D144A	G145R	adw2	adr	ay
检测结果	1.87	6.50	12.36	3.10	2.05	4.06	1.49	1.38	1.30

注: 表格中数值为 S/COV.

3 讨论

HBV 表面抗原(HBsAg)是诊断 HBV 感染最重要也是最常用的标志物^[7], 但是由于免疫耐受等导致 HBV 编码“a”决定簇的基因区发生突变, 从而引起某些突变位点的 HBsAg 不能被一些市售诊断试剂盒中的 mAb 或多抗识别^[8], 因此提高 HBsAg 试剂盒的临床灵敏度和突变体的识别能力是必要的。随着乙肝疫苗在全球范围内的广泛接种, 先后在全世界范围内发现了可逃逸乙肝疫苗免疫后产生中和抗体的乙肝表面抗原变异的乙肝病毒株, 其中最为常见的点突变有 G145R, T126S, Q129H, M133L, T143L, D144A 等^[9-10], 特别是 G145R 变异株, 即第 145 位氨基酸由甘氨酸(Gly)突变为精氨酸(Arg)的变异株, 不仅在所有变异株中流行最广, 而且和野毒株一样具有致病性和传播能力, 能在体内稳定存在 10 年以上, 另外该变异株与 mAb 或多抗形式的表面抗体结合能力减弱甚至完全丧失, 从而造成漏检严重^[11-12], 而且该变异株在乙肝疫苗接种后的人群发生率更高; 因此筛选对不同突变位点的乙肝表面抗原突变体具有高亲和力的 mAb 至关重要, 制备高灵敏度的乙肝表面抗原诊断试剂盒至关重要, 并为高灵敏表面抗原诊断试剂盒的制备奠定了基础, 从而解决因基因突变引起的漏检问题, 提高血液安全度。

参考文献:

- [1] Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection[J]. Int J Med Sci, 2005, 2(1): 50-57.
- [2] Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 2008, 49: 652-657.
- [3] Schochetman G, Mary C. HIV variants and hepatitis b surface antigen mutants: diagnostic challenges for immunoassays[J]. J Med Virol, 2006, 78(Suppl 1): S3-S6.
- [4] Levrero M, Pollicino T, Petersen J, et al. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 2009, 51: 581-592.
- [5] Jolivet-Reynaud C, Lésénéchal M, O'Donnell B, et al. Localization of hepatitis B surface antigen epitopes present on variants and specifically recognised by anti-hepatitis B surface antigen monoclonal antibodies[J]. J Med Virol, 2001, 65(2): 241-249.
- [6] 祝长城, 罗春贞, 王 纛. 乙肝表面抗原突变体的表达及其初步应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(12): 1136-1139.
- [7] Jinlin H, Zhanggui W, Jinjun G, et al. Prevalence of naturally occurring surface gene variants of hepatitis B virus in nonimmunized surface antigen-negative Chinese carriers[J]. Hepatol, 2001, 34(5): 1027-1032.
- [8] Gibb R, Nimmo GR, O'Loughlin P, et al. Detection of HBsAg mutants in a population with a low prevalence of hepatitis B virus infection[J]. J Med Virol, 2007, 79(4): 351-355.
- [9] Anna MG, Mauli P, Fred SS, et al. Detection of Highly prevalent hepatitis b virus coinfection among HIV seropositive persons in Ghana [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(9): 3223-3230.

(下转 206 页)