论著

文章编号:1000-5404(2011)06-0566-04

# 抗 preS1 分子高效单克隆抗体的制备及其在血清 LHBs 检测中的应用

李新军[1],张竹君[1],易维京[1],陈 安[1],李淑慧[1],赵忠颢[1],刘明栋[2],范毓东[3],胡川闽[1] (400038 重庆,第三军医大学:医学检验系临床生物化学教研室[1],西南医院全军感染病研究所[2],西南医院肝胆外科[3])

【摘要】 **目的** 制备可用于血清 LHBs 检测的针对 preS1 高效单克隆抗体并进行初步临床应用研究。**方法** 对乙肝 preS1 区段基因(B 基因型,adr 血清亚型)全长序列(1~119 aa)进行密码子偏嗜性改造后,克隆入质粒 pET32a 构建原核表达重组质粒并转化入大肠杆菌 BL21 (DE3),采用离子交换、HIS 亲和层析柱以及肠激酶(EK 酶)酶切等方法建立 preS1 重组蛋白的纯化工艺,制备筛选单克隆抗体的筛选原;综合应用多种生物信息学分析软件预测 LHBs preS1 区段 B 细胞表位肽 preS1(36~58 aa),合成该肽段后与 BSA 交联,通过新型免疫程序制备单克隆抗体;建立以抗 preS1 高效单克隆抗体为基础的 ELISA 方法,并对临床血清 LHBs 进行检测分析。**结果** 获得了高纯度的重组 preS1 蛋白,HPLC 分析其纯度为 98%,通过新型免疫程序制备的抗 preS1 单克隆抗体 1-E6($IgG_1$)特异性好,对 preS1(LHBs)的检出率(83.3%)高于其他同类抗体($P<0.01$)。**结论** 获得高效特异的抗 preS1 单克隆抗体 1-E6 以及高纯度重组 preS1 蛋白免疫检测标准品。

【关键词】 preS1;单克隆抗体;LHBs 检测;ELISA

【中图法分类号】 R392-33;R392.11;R446.62 【文献标志码】 A

# Preparation and identification of monoclonal antibody against preS1 and its application in detection for HBV large surface protein

Li Xinjun[1], Zhang Zhujun[1], Yi Weijing[1], Chen An[1], Li Shuhui[1], Zhao Zhonghao[1], Liu Mingdong[2], Fan Yudong[3], Hu Chuanmin[1] ([1]Department of Clinical Biochemistry, College of Medical Laboratory;[2]Institution of Infectious Diseases, [3]Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 Objective To prepare monoclonal antibodies (mAbs) against preS1 to detect large surface protein (LHBs) in the serum of HBV carriers and investigate its clinical value. Methods According to the frequency of *E. coli* codons, an *E. coli* favorite DNA fragment, encoding amino acids sequence identical to that of the wild type preS1 (1 to 119 aa) (genetypeB, serotype adr) was cloned into plasmid pET32a. The preS1 protein was induced to express and then purified by cation exchange, His-tag affinity column, and then digested by enterokinase before it was used to screen its monoclonal antibody. LHBs preS1 B cell epitope peptide (36 to 58 aa) was forecast with aid of bioinformatics analysis softwares. Then the peptide was synthesized and then cross-linked with BSA. BALB/c mice were immunized with this cross-linked peptide through a new immunization procedure to produce mAb against preS1. An ELISA method was established to detect LHBs in the serum with these mAbs in blood serum samples of 413 identified hepatitis patients and 100 health individuals, and the results were compared with those of other commercial detection method. Results Highly purified preS1 (HPLC indicated a purity of 98%) was obtained. Our renewed immunization generated mAb (1-E6) ($IgG_1$ subclass) against preS1 with good specificity. The positive rate of preS1 was higher when our mAbs 1-E6 was used than other commercial mAbs was in detection of LHBs with ELISA (83.3% *vs* 72.9%, $P<0.01$). Conclusion We obtain preS1 protein with high purity and suitable as standard substance, and efficient and specific mAb (1-E6) in detection of LHBs with ELISA.

【**Key words**】 preS1; monoclonal antibody; large surface protein detection; ELISA

Supported by the Special Foundation of Major Program of National Science and Technology (2009ZX10607); the Program of Science and Technology Achievements Transformation of Third Military Medical University (2009XZH03). Corresponding author: Hu Chuanmin, Tel: 86-23-68752313, E-mail: chuminhu@163.com

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)颗粒被膜外壳的主要成分乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)含有大蛋白(HBV large surface protein,

【基金项目】 国家科技重大专项课题(2009ZX10607);第三军医大学科技成果转化基金课题(2009XZH03)

【通信作者】 胡川闽,电话:(023)68752313,E-mail:chuminhu@163.com

LHBs)、中蛋白(HBV middle surface protein, MHBs)和主蛋白(HBV small surface protein, SHBs)3种被膜蛋白[1]。研究表明,LHBs与有感染性的完整病毒颗粒密切相关,在病毒颗粒的装配、感染以及肝癌发生中起重要作用[2]。急性HBV感染者在感染者早期就可以在血清中检出LHBs,提示LHBs可以用作急性乙型肝炎的早期诊断指标。通过定量分析HBV感染者血清LHBs水平并与HBV DNA的荧光定量PCR结果比较,发现二者之间存在很好的相关性,表明血清LHBs水平和HBV DNA一样,可以反映血清中HBV的存在及相应的病毒载量[3]。LHBs前S1(preS1)区与病毒的感染、复制和病毒颗粒的装配密切相关,特别在参与病毒与宿主细胞的相互作用中发挥着至关重要的作用[4]。LHBs免疫检测的首要关键问题是如何获得其特异性抗体,即特异性针对preS1的抗体,所以进行预测选择preS1区域的B细胞免疫表位尤为重要。在本课题中我们运用多种生物信息学分析软件,综合考虑蛋白质的二级结构、抗原性、亲疏水性、可及性及柔韧性,预测LHBs preS1区段中的潜在B细胞表位36~58 aa。人工合成B细胞表位多肽与BSA交联后通过新型免疫程序制备单克隆抗体并将获得的单克隆抗体应用于对血清LHBs的检测,旨在检验使用我们制备的抗体与使用同类商业化抗体相比能否提高对血清LHBs的检出率。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

所用菌株 *E. coli* BL21 (DE3)、DH5α为本实验室保存,pET32a及pET28a购自Novagen公司,*Xho* Ⅰ及*Nco* Ⅰ购自ToYoBo公司,pfuDNA聚合酶、$T_4$ DNA连接酶购自Promega公司,DNA标准(DL 2000)、DNA胶回收试剂盒及质粒抽提试剂盒购自Tiangen生物科技有限公司,蛋白质标准为中科院生物制品研究所产品,纯化所用层析柱及填料购自Amersham公司,肠激酶(EK酶)为本室自制,preS1全长基因序列以及表位肽段由上海生工公司合成,单克隆抗体亚类检测试剂盒购自Sigma公司,HRP-羊抗小鼠和兔抗羊IgG来自北京中杉金桥公司,其他试剂均为国产化学分析纯。检测血清来自于西南医院感染科以及门诊体检者。

### 1.2 方法

1.2.1 重组preS1表达、纯化及鉴定 对preS1基因编码序列进行密码子偏性分析,优化后的序列加上酶切位点(*Nco* Ⅰ&*Sal* Ⅰ)及保护碱基进行全基因合成。将合成的preS1全长基因序列克隆入质粒pET28a,用*Xho* Ⅰ及*Nco* Ⅰ双酶切pET28a/preS1及pET32a,将切下preS1片段连入pET32a构建原核表达重组质粒,转化入大肠杆菌BL21 (DE3)按常规IPTG诱导表达,裂解菌体后高速离心分离细菌上清和沉淀,15% SDS-PAGE电泳鉴定其可溶性情况。纯化采用本室高效而系统的蛋白纯化方案通过初纯化,EK酶切,再纯化等步骤进行。纯化后用BCA法进行蛋白定量测定,纯度采用HPLC测定。将纯化的preS1重组蛋白用保存液稀释后分装,置于4 ℃保存,作为免疫检测标准品及制备单克隆抗体的筛选原[5]。

1.2.2 抗preS1单克隆抗体的制备及鉴定 综合应用多种生物信息学分析软件,综合考虑蛋白质的二级结构、抗原性、亲疏水性、可及性及柔韧性,预测LHBs preS1区段B细胞表位肽preS1(36~58 aa),合成该肽段后与BSA交联,通过新型免疫程序免疫6~8周龄雌性BALB/c小鼠(第三军医大学实验动物中心提供)。免疫程序包含了4次免疫过程,第4次免疫3 d后取脾,与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0进行融合[6]。单克隆抗体的筛选、克隆化,腹水制备、抗体的效价、杂交瘤细胞的核型分析按本室常规方法进行,单克隆抗体亚类鉴定按照试剂盒提供的方法进行。Western blot鉴定所获得单克隆抗体的特异性,同时用抗preS1多克隆抗体作为对照抗体,抗preS1多克隆抗体为本室自制。为验证获得的单克隆抗体是否能结合天然preS1分子,使用感染了HBV的肝癌细胞HepG2.215进行细胞免疫化学实验,其中HepG2.215细胞由重庆医科大学病毒性肝炎研究所胡接力老师惠赠。

1.2.3 临床血清preS1(LHBs)的检测

1.2.3.1 抗preS1单克隆抗体测定临床血清LHBs方法的的建立 以获得的抗preS1单克隆抗体作为捕获抗体,抗体浓度5 μg/ml,每孔0.1 ml包被于ELISA检测板孔中,同时设空白孔和阴性对照孔。于4 ℃置12 h使抗体充分结合,1% BSA封闭各孔37 ℃2 h后用1‰PBST液洗板,每孔加入待测血清50 μl,振荡摇匀后37 ℃置1 h,洗板后加入HRP标记的抗HBsAg多抗(购于上海叶氏公司)作为检测抗体,37 ℃孵育40 min后洗板,利用TMB显色系统显色后,用酶标仪于450 nm处测定各孔光密度值[*D*(450)]。此即为检测preS1(LHBs)的双抗体夹心ELISA方法。

1.2.3.2 批内重复性试验 为了客观评估上述检测方法的随机误差的大小,进行批内重复性试验。选取慢性乙肝感染临床血清标本1例(乙肝大三阳,HBV-DNA $2.636\times10^5$拷贝/ml),并分作5轮,每轮4次测定,在同等试验条件下尽可能短的时间里单人操作完成测定,即可获得20个测定数据。剔除离群值后计算均值、标准差和变异系数。通过求得的变异系数的大小来判定该检测方法的精密度。

1.2.3.3 临床血清LHBs的测定 利用建立的检测血清LHBs的双抗体夹心ELISA方法,对乙肝感染血清413例及体检正常的血清100例进行检测。其中乙肝感染血清413例均来自2009年9月至2010年8月西南医院感染科门诊抽血或乙肝感染住院患者,年龄16~73岁,平均36.5岁,男性262例,女性151例,HBeAg阳性率71.3%,HBV-DNA阳性率76.7%,ALT偏高者占60.2%。体检正常的100例血清乙肝各项指标均呈阴性。同时用同类商业化抗体作为捕获抗体检测同样标本以作对照,来比较我们获得的抗preS1单克隆抗体对LHBs的检出效果。

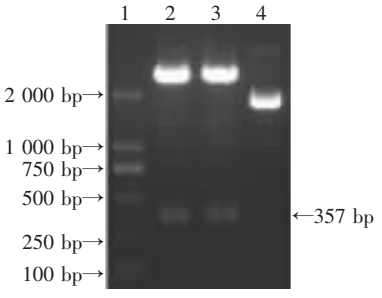
### 1.3 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件,对所获抗体对LHBs的检出率与商业化抗体对LHBs的检出率之间差异性分析行独立样本$t$检验。

## 2 结果

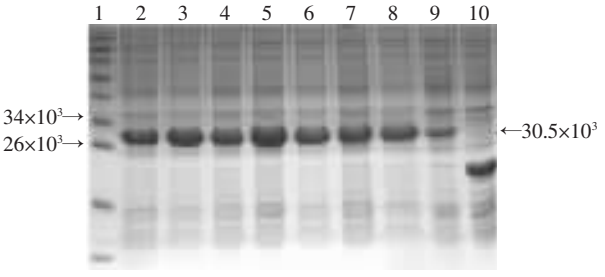
### 2.1 重组 preS1 表达、纯化及鉴定

将 preS1 全长基因片段 357 bp 克隆入原核表达重组质粒 pET32a，并转化入 DH5α 菌质粒扩增，提取质粒用 *Xho* Ⅰ及 *Nco* Ⅰ双酶切重组质粒，通过琼脂糖凝胶电泳结果显示 preS1 原核表达重组质粒 pET32a/preS1 构建成功（图 1）。将构建成功的质粒转化入表达宿主 BL21（DE3），用 1.0 mmol/L 的 IPTG 在 37 ℃条件下诱导表达 5 h。电泳结果表明，pET32a/preS1 在 BL21 中表达融合蛋白，相对分子质量分别为 $30.5\times10^3$ 左右（图 2），表达量占菌体总蛋白的 30% 以上。经鉴定表达蛋白破菌后几乎都存在上清中，为可溶性表达（图 3A）。经 SDS-PAGE 分析得到了高纯度的重组 preS1 蛋白（图 3B），HPLC 分析其纯度为 98%，相对分子质量为 $12.5\times10^3$。将纯化的 preS1 重组蛋白用保存液稀释后等份分装，置于 4 ℃保存，作为免疫检测标准品及制备单克隆抗体的筛选原。



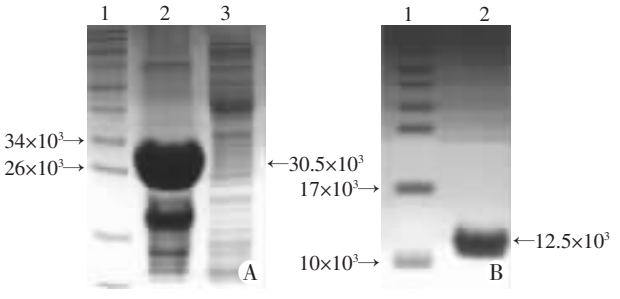

1：DNA 标准（DL 2000）；2－3：*Xho* Ⅰ及 *Nco* Ⅰ双酶切 pET32a/preS1；4：*Xho* Ⅰ及 *Nco* Ⅰ双酶切 pET32a

**图 1 琼脂糖凝胶电泳鉴定 pET32a/preS1 的构建**




1：蛋白质标准；2－8：BL21/pET32a/preS1 IPTG 诱导表达；9：BL21/pET32a/preS1 未诱导表达；10：BL21/pET32a IPTG 诱导表达对照

**图 2 SDS-PAGE 分析重组 preS1 蛋白诱导表达**

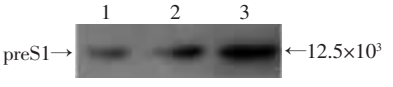



A：融合蛋白 Trx-preS1 可溶性表达　1：蛋白质标准；2：破菌后上清；3：破菌后沉淀；B：重组 Trx-preS1 蛋白 EK 酶切除 Trx 并纯化后　1：蛋白质标准；2：纯化后的 preS1 蛋白

**图 3 SDS-PAGE 分析 preS1 可溶性表达及纯化**

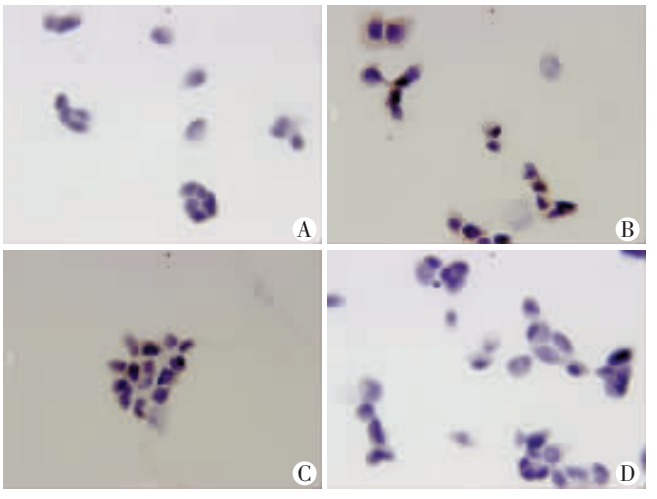
### 2.2 抗 preS1 单克隆抗体的制备及鉴定

通过细胞融合，获得 7 株分泌抗 preS1 抗体的杂交瘤细胞株，分别为 1-E6、1-A10、2-G5、2-A11、2-E3、3-A7 和 3-B3。经过亚型分析，克隆化扩大化培养筛选出分泌 IgG 亚类抗体的杂交瘤细胞株 1-E6（$IgG_1$）和 2-G5（$IgG_{2a}$），培养上清效价均可达 1∶1 024 000，其余为 IgM 亚类。核型分析表明，杂交瘤细胞株 1-E6 和 2-G5 的染色体数目分别为 101 和 96，说明该 2 株杂交瘤细胞为小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞的融合体。杂交瘤细胞经数次冻存，体外传代培养 3 个月以上能稳定分泌抗体。在 Friguent 方法基础上我们运用更加稳定可靠的基于抗原/抗体竞争结合原理的单抗亲和力常数（Kd）检测方法[7] 检测 1-E6 的 Kd 为 $6.7\times10^{-11}$ mol/L，2-G5 的 Kd 为 $5.3\times10^{-10}$ mol/L，表明 1-E6 比 2-G5 对 preS1 具有更高亲和力。Western blot 分析证实 1-E6 和 2-G5 可以结合重组 preS1 分子（图 4），免疫细胞化学分析可知 1-E6 和 2-G5 可以在体外结合天然 preS1 蛋白（图 5），证实了 1-E6 和 2-G5 的特异性。




1：抗 preS1 多抗；2：2-G5；3：1-E6

**图 4 Western blot 鉴定 1-E6 和 2-G5 结合重组 preS1 分子**




IgG：正常鼠免疫球蛋白　A：HepG2.215；B：HepG2.215 + IgG；C：HepG2.215 + 2-G5；D：HepG2.215 + 1-E6

**图 5 免疫细胞化学验证 1-E6 和 2-G5 结合天然 preS1 蛋白**（S-P ×200）

### 2.3 临床血清标本 preS1（LHBs）的检测

在对建立的检测方法进行的批内重复试验中，1-E6 作为捕获抗体的 ELISA 检测时的变异系数 *CV* 值为 2.8，2-G5 作为捕获抗体的 ELISA 检测时的变异系数 *CV* 值为 4.3，均在 ELISA 常规方法精密度误差允许范围内。在对血清的检测中，通过测定首批临床 103 例血清样本 LHBs 可知，用市售 preS1 检测试剂盒检出阳性 57 例，使用 2-G5 和 1-E6 作为捕获抗体分别检出阳性 36 例和 69 例。通过对阳性标本的分析可知，1-E6 检出的 69 例覆盖了用商业化抗体检出的 57 例，初步说明 1-E6 在检测方面的高效性。为了验证 1-E6 在检测 preS1 方面是否存在假阳性现象，分别用商业化抗体和 1-E6 检测了另一批乙肝血清 310 例，同时对 100 例体检正常血清进行检测以验证是否存在

假阳性现象。结果证实了1-E6对preS1(LHBs)的检出率(83.3%)与市售商业化抗体(commercial mAb,C mAb)对preS1(LHBs)的检出率(72.9%)相比差异具有统计学意义($P<0.01$),并且不存在假阳性。说明1-E6在检测preS1(LHBs)方面具有高效性和高特异性。

## 3 讨论

LHBs是乙肝病毒包膜的构成部分。它的双重拓扑构象是病毒包装的关键,这种亚病毒颗粒对HBV感染细胞具有增强作用,并可反式激活细胞内HBV复制和基因表达[8]。研究表明,LHBs与其他HBV表面被膜蛋白的不同之处在于它具有N端的preS1区域,preS1区域有大量的B细胞和T细胞免疫表位,这些细胞表位的发现对于探讨HBV preS1的生物学功能及其在HBV感染中的作用具有重要意义[9-10]。HBV结合肝细胞表面受体的功能是由preS1区完成的,通过肝细胞表面的preS1相关受体蛋白介导入细胞是HBV感染的一个关键环节,因此研究这一区域的生物功能及免疫学特性具有明确的临床意义。对于无症状表面抗原携带状态以及乙肝感染自然病程状态下,preS1蛋白水平和HBV-DNA水平有一定相关性。另有研究发现,在以核苷类似物干预为手段的抗病毒治疗情况下,HBV-DNA水平和preS1蛋白水平并无特定相关性[11],可能是与核苷类似物干扰阻断病毒复制有关。因此,可通过抗病毒治疗前后对preS1及HBV-DNA水平的检测分析来帮助评估治疗效果。preSl抗原作为一种新型的HBV的标志物,因其与HBV-DNA有密切的相关性,可以作为急性乙型肝炎的检测指标和慢性乙型肝炎抗病毒治疗时的观察指标[12]。

国内HBV感染患者基因型主要为B和C型[13-14],血清型主要是adr亚型。目前临床中对LHBs的检测是基于preS1进行,它是含119个氨基酸残基的较长序列[15-16]。检测的基础就是高效的抗preS1单克隆抗体的研制,但是因为国内的preS1单克隆抗体目前成功的很少,另外部分来自国外的抗体成本较高,其效价和特异性均有待于进一步提高。因此,针对preS1的检测价格昂贵,基于LHBs检测的HBV感染的新型诊断方法远没有普及,因此高效的抗preS1单克隆抗体的研制十分必要。在本课题中我们根据预测的针对preS1的新检测靶位,制备了高效特异的单克隆抗体1-E6。在对临床血清样本的初步检测研究中,通过与市售同类抗体检测标本对比发现,1-E6能提高LHBs的检出阳性率,同时也验证了检出率的提高不是由于假阳性所致。高效特异的抗preS1单克隆抗体1-E6的成功制备为乙肝LHBs免疫检测试剂盒的研发以及产业化奠定了良好的基础。

## 参考文献:

[1] Chi S W, Maeng C Y, Kim S J, *et al*. Broadly neutralizing anti-hepatitis B virus antibody reveals a complementarity determining region H3 lid-opening mechanism[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(22):9230-9235.

[2] Hu W, Li F, Yang X, *et al*. A flexible peptide linker enhances the immunoreactivity of two copies HBsAg preS1(21-47) fusion protein[J]. J Biotechnol, 2004, 107(1):83-90.

[3] Le-Guillou D B, Duclos-Vallee J C, Eberle F, *et al*. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection and quantification of hepatitis B virus PreS1 envelope antigen in serum samples:comparison with two commercial assays for monitoring hepatitis B virus DNA[J]. J Viral Hepat, 2000, 7(5):387-392.

[4] Chouteau P, Le-Seyec J, Cannie I, *et al*. A short N-proximal region in the large envelope protein harbors a determinant that contributes to the species specificity of human hepatitis B virus[J]. J Virol, 2001, 75(23):11565-11572.

[5] 易维京,李鹏,李淑慧,等. 人NT-proBNP的高效原核表达及免疫学检测标准品的研究[J]. 第三军医大学学报,2008,30(6):525-529.

[6] 郭建秀,李鹏,伍艳芳,等. 抗人MIF单克隆抗体的制备及其活性的初步鉴定[J]. 第三军医大学学报,2006,28(6):546-549.

[7] 郭杰标,郭锐,刘艳华. 以抗体竞争结合抗原测定单抗亲和力常数的研究[J]. 南方医科大学学报,2006,26(7):1057-1059.

[8] 王智斌,谭太昌. 乙型肝炎病毒大蛋白检测的临床意义[J]. 实用医院临床杂志,2009,6(4):69-70.

[9] Park J H, Cho E W, Lee Y J, *et al*. Determination of the protective effects of neutralizing anti-hepatitis B virus (HBV) immunoglobulins by epitope mapping with recombinant HBV surface-antigen proteins[J]. Microbiol Immunol, 2000, 44(8):703-710.

[10] Maeng C Y, Ryu C J, Gripon P, *et al*. Fine mapping of virus-neutralizing epitopes on hepatitis B virus PreS1[J]. Virology, 2000, 270(1):9-16.

[11] 谭朝霞,谭文婷,汤影子,等. 核苷类似物干预下乙型肝炎病毒前S抗原消长与DNA复制水平的关系[J]. 中华肝脏病杂志,2009,17(2):91-94.

[12] Yuan Q, Ge S X, Xiong J, *et al*. A novel immunoassay for PreS1 and/or core-related antigens for detection of HBsAg variants[J]. J Virol Methods, 2010, 168(1/2):108-113.

[13] 张韧,王敏,符瑞佳,等. HBV基因型在我国九省市的分布及与临床指标的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志,2010,2(3):152-155.

[14] 刘旭锦,王凯,范玉琛. HBV基因型研究进展[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2007,21(4):402-403.

[15] Chi S W, Kim J, Yi G S, *et al*. Broadly neutralizing anti-HBV antibody binds to non-epitope regions of preS1[J]. FEBS Lett, 2009, 583(18):3095-3100.

[16] Shen M, Wang S, Ge G, *et al*. Profiles of B and T cell immune responses elicited by different forms of the hepatitis B virus surface antigen[J]. Vaccine, 2010, 28(45):7288-7296.

(收稿 2010-11-18 修回 2010-12-24)

(编辑 汪勤俭)