维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)01-0014-03

鸭乙型肝炎病毒表面抗原的纯化及应用

唐　霓，黄爱龙，郭树华，张定凤

（重庆医科大学病毒性肝炎研究所　重庆　400010）

【摘　要】目的：从鸭乙型肝炎病毒（DHBV）感染鸭血清中纯化表面抗原（DHBsAg），初步应用于病毒感染后复制的研究。方法：用蔗糖密度梯度离心纯化病毒表面抗原，经Bradford法定量血清中该蛋白含量；建立DHBsAg ELISA检测方法，并与DHBV DNA斑点杂交相比较。结果：纯化DHBsAg经ELISA检测OD490nm≥1.0，Western杂交显示主要肽分子量为17KDa和35KDa；Bradford法定量血清蛋白含量为2.85～5.10 μg/ml. DHBsAg ELISA检测100份血清标本阳性数为84例，斑点杂交检测阳性数为88例.两者吻合率为94%。结论：DHBsAg的制备及ELISA方法的建立，为进一步研究病毒感染后复制及体内免疫应答状况奠定了基础。

【关键词】鸭乙型肝炎病毒表面抗原；Western 杂交

【中国图书分类法分类号】R512　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2000-01-11

Preparation and identification of duck hepatitis B virus (DHBV) surface antigen from infected duck serum

TANG Ni, et al

（The Research Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University, 400010）

【Abstract】 *Objective*: Preparation of DHBsAg from DHBV infected ducks and its application for the study of virus replication. *Methods*: The positive serum were layered over a step gradient of 20% and 66% sucrose, DHBsAg were harvested at the interface between 20% and 66% sucrose, and then analyzed by Bradford method. Meanwhile, DHBsAg ELISA and DHBV DNA dot blot hybridization assayed 100 serum samples. *Results*: Purified antigen were detected OD490nm ≥ 1.0 by DHBsAg ELISA assay and quantified 2.85~5.10 μ g/ml by Bradford method. Both 35KDa and 17KDa pres/s bands were present in DHBV-infected serum. DHBsAg assayed 84 positive in 100 serum samples, while DHBV DNA dot blot hybridization detected 88 positive, showing good accordance. *Conclusion*: Preparation of DHBsAg from DHBV-infected ducks and application of DHBsAg ELISA assay will be helpful to the study of kinetics of DHBV and immune response of ducks to the virus.

【Key words】 Duck hepatitis B virus surface antigen； Western blot

鸭乙型肝炎病毒与人乙型肝炎病毒同属嗜肝DNA病毒科，在病毒复制形式、感染转归等方面都相似，常成为研究HBV发病机理、防治等的参考实验动物模型。近年来监测DHBV感染过程中复制和免疫应答状况的检测指标已得到不断的完善[1]。为建立简便、特异的检测系统，了解病毒感染后复制及体内免疫应答状况，本文自重庆地区感染麻鸭血清中分离纯化鸭乙型肝炎病毒表面抗原(DHBsAg)，用针对PreS特异单克隆抗体杂交瘤细胞1H1制备的腹水进行检测，初步应用于感染鸭病毒复制的研究。

作者介绍：唐　霓（1973-　），女，博士

1　材料与方法

1　含DHBVPreS单克隆抗体腹水的制备

针对DHBsAg PreS区单抗杂交瘤细胞株1H1由澳大利亚阿德莱德大学微生物和免疫学系Dr. Allison Jilbert馈赠。细胞培养条件为RPMI1640，10%胎牛血清（Hyclone），100u/ml青霉素，100 μg/ml链霉素。细胞生长的最佳状态为5×10^4～5×10^5个细胞/ml，每2～3天换液1次。

选取2月龄雄性BALB/C小鼠，经腹腔注射0.5ml不完全弗氏佐剂，一周后收集生长状态良好的1H1细胞，用PBS洗涤一次，细胞计数后重悬于0.5ml PBS，以每只鼠5×10^6细胞比例注入腹腔。1～2周后等待腹水形成，断颈处死小鼠，收集腹水3000g离心10min，吸取上清液56℃水浴45min热处理，分装并冻存于-70℃.

1.2　DHBsAg ELISA 检测

维普资讯 http://www.cqvip.com

血清样品以1：500稀释于PBS并过夜包被，加1：5000稀释的单抗腹水1H1 100μl/孔，37℃作用1h。再加入羊抗鼠HRP IgG（Jackson），最后加底物液避光显色15min，OD490nm读数。

1.3 血清标本DHBsAg与DHBV DNA斑点杂交检测

共选取100份血清标本，用上述方法检测DHBsAg，与斑点杂交结果相比较。杂交所用探针为地高辛标记的DHBV全基因组探针，探针检测下限为56.4pg DHBV DNA/ml。

1.4 DHBsAg的纯化

根据文献略作修改[2]。用巴氏德吸管吸取5ml 20%蔗糖溶液轻铺于离心管底部，再吸取1ml 66%蔗糖溶液，将吸管口插入离心管底部缓慢加入，加完后可在两种梯度溶液间见一条明显的分界线。37℃静置1h后，将5ml血清铺加于蔗糖梯度溶液表面185 390g（HITACHI RP-83T）4℃离心4h。离心完毕，按200μl/管分别收集，进行ELISA及蛋白质定量检测。

阳性组分在TN缓冲液中（20mM Tris.Cl PH7.4，150mM NaCl）4℃透析过夜。PEG8000浓缩样品后，取部分做Western blot检测，其余贮于-70℃。

1.5 DHBsAg定量

采用Bradford法检测，以牛血清白蛋白作为标准品对照[3]。

1.6 Western blot

根据文献略作修改[4]。

2 结 果

2.1 血清标本DHBsAg与DHBV DNA斑点杂交检测结果

实验结果显示，DHBsAg ELISA检测与血清斑点杂交法比较，检出阳性例数为84，符合率为94%，重复检测阳性及阴性血清各5份，ELISA结果完全吻合。少数标本DHBV DNA阳性而DHBsAg阴性，均为斑点杂交弱阳性血清，说明DHBsAg ELISA不如DHBV DNA斑点杂交敏感。用制备的含PreS单抗腹水作为1° Ab，抗体效价可达1:5000，检测结果特异性好。

表1 DHBsAg与DHBV DNA检测结果

组别		斑点杂交 +	斑点杂交 −
DHBsAg	+	84	2
	−	4	10

2.2 超速离心分段收集样品DHBsAg ELISA检测结果

A1-10按照从20%到66%蔗糖分段收集，从表中可以看出：DHBsAg高峰管接近于66%蔗糖表面；靠近20%蔗糖溶液，DHBsAg含量较少。

表2 超离分段收集样品DHBsAg检测

样品管号	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
OD490nm	0.08	0.05	0.04	0.12	0.36	0.49	0.89	1.07	1.12	1 05

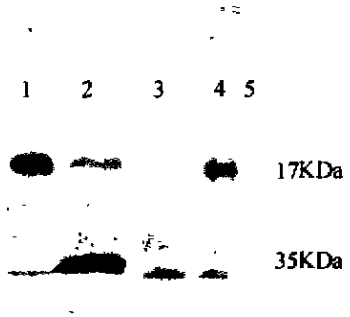
2.3 Bradford法定量纯化蛋白质

纯化样品经12% SDS-PAGE电泳后转移至硝酸纤维素膜上，经Western杂交并与蛋白质分子量标准比较泳动距离，用Gel软件分析：在大约17KDa、35KDa水平出现阳性条带。其中纯化样品2经DHBsAg ELISA检测为强阳性结果，其特异抗原条带较明显。

表3 纯化样品蛋白质定量结果

纯化样品	1	2	3	4	5
蛋白含量μg/ml	3.93	5.10	2.85	3.18	4.62

2.3 Western blot 鉴定（见图1）



1～4：纯化样品，5：阴性血清对照

图1 Western 杂交检测纯化样品S抗原结果

纯化样品经12% SDS-PAGE电泳后转移至硝酸纤维素膜上，经Western杂交并与蛋白质分子量标准比较泳动距离，用Gel软件分析：在大约17KDa、35KDa水平出现阳性条带。其中纯化样品2经DHBsAg ELISA检测为强阳性结果，其特异抗原条带较明显。

3 讨 论

自1980年Manson等首先从北京鸭血清中发现DHBV以来，各国学者对DHBV的形态结构、复制规律等生物学特性进行了广泛研究。以往DHBV感染复制检测指标多为斑点杂交、电镜观察以及DHBV多聚酶活性检测，而用纯化的DHBsAg免疫

维普资讯 http://www.cqvip.com

家兔所制备的多克隆抗体进行血清DHBsAg的检测，也是了解病毒复制与表达特异抗原蛋白的重要指标[5]。由于多克隆抗体的制备和纯化程序复杂，特异性不高制约了其作为病毒复制的特异性检测指标。Pugh于1995年首先建立针对DHBV PreS/S大蛋白的单抗1H1和针对S区的单抗7C-12细胞株，并以杂交瘤细胞培养上清或含单抗的腹水用于血清DHBsAg ELISA的检测，取得了较好的结果[6]。我室在澳大利亚Adelaide大学帮助下，建立了DHBsAg ELISA检测方法，对100例血清标本的检测结果显示：DHBsAg阳性数为84，斑点杂交阳性数为88，两者吻合率为94%。DHBsAg ELISA检测方法快速简便、结果稳定可靠。4例DHBV DNA阳性而DHBsAg阴性标本，DHBV DNA斑点杂交均为弱阳性，提示DHBsAg的检测方法不如DHBV DNA斑点杂交敏感。

HBV研究发现：PreS蛋白含有T、B细胞抗原决定簇，具有强免疫原性，PreS区的免疫识别位点及T细胞识别位点已相继鉴定[7]。Chassot、Cheung等也在DHBV PreS区发现了抗原表位的免疫决定区：位于DHBV大蛋白的N末端PreS部分58-107位氨基酸[8,9]；而用含DHBVPreS/S的DNA疫苗免疫北京鸭，也可产生免疫保护效应[10]。因此展开对DHBV表面抗原的生物学特性研究，是研究病毒编码抗原的重要内容。Schlicht曾用PEX表达载体表达了MS2-DHBV PreS融合蛋白，但DHBV PreS蛋白的原核表达相当困难，一般均需采用分子量大的融合蛋白形式，而且PreS蛋白较不稳定，纯化该蛋白也有一定难度[11]。因此直接从感染DHBV滴度较高的鸭血清中采用超速离心的方法分离纯化DHBsAg，成为研究S抗原理化特性及特异免疫应答的重要手段。

我室曾用慢性DHBV感染重庆麻鸭作为动物模型，考核了一系列抗病毒药物的有效性及毒副反应。重庆地区麻鸭的自然感染率与其它地区有所不同，其感染DHBV S抗原的生物学特性一直有待研究。我们通过蔗糖超速离心从感染鸭血清中纯化DHBsAg发现：DHBsAg的高峰管集中在66%与20%蔗糖的交界面上，Bradford法定量蛋白浓度为2.85 μg/ml～5.10 μg/ml血清。经Western blot分析证实，分离DHBsAg主要肽分子量为17KDa、35KDa，与Marion、张维等报道的DHBsAg主要肽分子量相近。

血清DHBsAg的制备和纯化，为进一步进行DHBsAb ELISA检测、研究鸭外周血单个核细胞（PBMCs）对DHBV特异抗原应答状况奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Jilbrt AR, Miller DS, Sougal CA, et al. Kinetics of duck hepatitis B virus infection following low dose virus inoculation: one virus DNA genome infectious in neonatal ducks [J]. Virology, 1996; 226:338-345.

[2] 黄祯祥. 医学病毒学基础及实验技术[M]. 第一版，北京：科学出版社，1990; 452-457.

[3] F.奥斯伯. 精编分子生物学实验指南[M]. 第一版，北京：科学出版社，1998; 332.

[4] J.萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 第二版，北京：科学出版社，1996; 888-898.

[5] Jilbert AR, Freiman JS, Gowans EJ, et al. Duck hepatitis B virus DNA in liver, spleen and pancreas: analysis by in situ and southern blot hybridization[J]. Virology ,1987;158:330-338.

[6] Pugh JC, Di Q, Mason WS ,et al. Susceptibility to duck hepatitis B virus infection is associated with the presence of cell surface receptor sites that efficiently bind viral particles[J]. J Virol ,1995; 69:4814-4822.

[7] Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis[J]. Ann Rev Immunol, 1995;13:29-60.

[8] Chassot S, Lambert V, Kay A ,et al . Identification major antigenic domain of duck hepatitis B virus pre-s protein by peptide scanning[J]. Virology,1994;200:72-78.

[9] Cheung RC, Yuasa S, Pham Q ,et al. Peptide mapping of neutralizing and non neutralizing epitopes of duck hepatitis B virus pre-s polypeptide[J]. Virology,1991;181:14-21.

[10] Triyatni M, Jilbert AR, Qiao M, et al. Protective efficacy of DNA vaccines against duck hepatitis B virus infection[J] . J Virol, 1998;72:84-94

[11] 李 玮. 鸭乙型肝炎病毒表面抗原在大肠杆菌中的表达[J]. 生物化学与生物物理学报，1992; 24:61.