DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.10.002
第22卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 10
2000年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2000

文章编号:1000-5404(2000)10-0919-04

论著

HBV新型免疫原的设计、合成及免疫原性研究

吴玉章,刘茂昌,贾正才,邹丽云 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨如何将表位构建成有效免疫原。方法 以Pre-S(2)蛋白两优势性B细胞表位和HBcAg两Th细胞表位为基础,设计、合成了2种MAP多肽,以此两MAP肽为免疫原免疫兔和小鼠,观察体液免疫反应。结果 此两种MAP多肽均比Pre-S(2)蛋白诱发更高抗体滴度;Th细胞表位引入可显著增强反应强度。结论 增加肽抗原结构复杂性可提高其免疫原性,其表位排列以B细胞表位在赖氨酸核心外侧为佳,MAP是一种较好的肽苗结构。

关键词:乙型肝炎病毒;Pre-S(2)蛋白;多价肽抗原系统;B细胞表位;Th细胞表位;分子设计
中图法分类号:R373.21;R392.2 文献标识码:A

Studies on molecular design, chemical synthesis and immunogenicity of novel antigenic peptides against hepatitis B virus

WU Yu-zhang, LIU Mao-chang, JIA Zheng-cai, ZOU Li-yun (Institute of Immunology PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore how to arrange and construct different epitope structure to obtain an effective immunogen. Methods Based on 2 dominant B cell epitopes within the Pre-S(2) region of HBs-Ag and 2 Th cell epitopes within HBc-Ag, 2 novel antigen peptides (MAP 1 and MAP 2) were designed and synthesized. Outbred rabbit and inbred mice were immunized with these 2 novel antigens and their humoral immune response was observed to evaluate the effect of the novel antigens in animals. Results The 2 MAPs evolked antibody with higher titer than the cognate Pre-S(2) protein and the control peptide in both the rabbits and mouse. The induction of Th cell epitopes enhanced the immunogenicity of MAP. Conclusion Increased the complexity of the peptide antigens may improve their immunogenicity. MAP structure is a good candidate to design a new generation of peptide-based vaccines.

Key words: hepatitis B virus; Pre-S(2) region; multiple antigen peptide system; B cell epitope; Th cell epitope; molecular design

蛋白质抗原免疫识别研究表明:蛋白质抗原并非通过其完整分子发挥功能,而是通过表位体现其特异性[1]。就某一蛋白质抗原而言,它不但含有B细胞表位、Th细胞表位、细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)表位、NK细胞表位、MHC限制位等与免疫识别密切相关的结构,而且还存在非优势中和性表位、抑制性表位、病理及自身抗原交叉反应性表位等于保护性免疫不利的因素。由于许多天然抗原引发的免疫反应不能满足预防感染或预防发病的需要,为了提高蛋白质抗原的保护性,就必须在表位水平上作出选择:摒除后者,保留、改善前者以得到理想的疫苗分子。

基金项目:国家自然科学基金生物高技术重点项目(39700132)
作者简介:吴玉章(1963—),男,山东省潍坊市人,博士,教授,主要从事免疫识别、分子设计与抗原工程方面的研究,发表论文86篇。电话:(023)68752680
收稿日期:2000-08-04;修回日期:2000-09-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

因此，在表位水平上对抗原性的认识已促成这样一种趋势：基于抗原分子的免疫干预手段已不再停留于病原体或天然抗原整体分子水平而开始向表位水平过渡。随着免疫原由病原体、向蛋白质分子、表位多肽过渡，分子量逐渐变小，其诱发的免疫反应针对性增强，并摆脱了抑制性和病理性表位的影响，但免疫原性也呈现依次降低的规律[1]，从而使得许多小分子疫苗不能激发满意的保护性应答。这已成为目前分子疫苗研究领域亟待突破的主要障碍之一[2]。换言之，如何根据蛋白质表位图谱，设计免疫原性强而不影响其抗原特异性的疫苗分子成为研究的重点。

现代保护性免疫理论认为：有效的保护性免疫取决于一组表位的合理组合与搭配。虽然国际上许多著名实验室围绕上千种不同抗原进行了大量的免疫识别研究，积累了丰富的表位图谱资料[3,4]。但是，问题是不同表位如何组合与搭配才是构建免疫原的充分必要条件？国际上少有研究报道。另一方面，我们注意到，在小肽分子免疫原性的降低的同时，其大分子特性也已丧失。由此反推，如果恢复其大分子特性，其免疫原性是否能得到提高？既往许多作者采用表位多肽交联载体蛋白的方法确能提高其免疫原性，初步证实了这一设想。但是，采用载体蛋白有如下缺陷：①其诱发的抗体谱主要针对载体蛋白而非表位多肽。②载体蛋白含有抑制性表位及不相关成分，而且不适合于人类。

在本室对 Pre-$S_{(2)}$ 蛋白进行了高分辨率免疫识别研究基础上，以 Pre-$S_{(2)}$ 蛋白的优势 B 细胞表位 B1、B2 为基础，引入不同的 Th 细胞表位 Th1、Th2 以观察不同表位组合与搭配对免疫原性的影响；设计、合成四分枝 MAP 肽并与线性多肽 Pre-$S_{(2)}$ 蛋白相比较，观察分枝肽设计对免疫原性的影响。以期克服交联载体蛋白的固有缺陷，为用不同表位组合构建新型多肽抗原及疫苗提供线索。

1 材料与方法

1.1 多肽的设计、合成与鉴定

1.1.1 多肽的设计

1.1.1.1 MAP 抗原肽的设计　选用了两个 B 细胞表位 B1、B2[7]，和 Th 细胞表位 Th1、Th2[6]。B1 和 B2 分别来源于 Pre-$S_{(2)}$ 蛋白的 13～23 和 14～28 氨基酸序列，其中 B1 序列为 APFYLGRVRPD，B2 序列为 GFSVGGAPFYLGRVRPD；Th1 和 Th2 分别来源于乙肝病毒核心抗原(Hepatitis B core antigen，HBc Ag)43～50 和 124～140 氨基酸序列，Th1 序列为 ESPEHCS，Th2 序列为 LIPANPPRYAPPTRIWV。采用 4 分枝肽设计，分别命名为 MAP1 和 MAP2，结构见图 1。



图 1　MAP 1、MAP 2 结构示意图

Fig 1　Schematic structures of MAP 1 and MAP 2

1.1.1.2 对照肽

a. Pre-$S_{(2)}$(adw2)亚型全序列：

10　20　30　40　50

MQWNSTAFH QTLQDPRVRG LYIPAGGSSS GTVNPAPNIT ASHISSISART GDPVTN

b. 对照肽为血管内皮生长因子(Vascular epithelial growth factor，VEGF)1～26 氨基酸序列：APMAEGGGQN-HHEVVKFMDVYGRSYC，命名为 Pc。

1.1.2 MAP 肽的合成与鉴定

1.1.2.1 MAP 肽合成　肽的合成是在 ABI 431A 固相自动肽合成仪上进行。采用标准 Fmoc 方案，起始选用 0.0125 mmol Fmoc-MAP-4-Branch-PSC 树脂(ABI 公司，批号 A5F013)，按照序列使肽链从 C 端逐个向 N 端延伸，各氨基酸(美国 ABI 公司)的用量为 0.1 mmol。各种氨基酸保护基团是：各氨基酸的 α-氨基为 Pmoc 保护，其余侧链保护基团，Arg(Mtr)、tyr(tBu)、Thr(tBu)、Tyr(tBu)、Asp(OtBu)。每步缩合都加入 HoBt/Dcc 活化保护氨基酸的羧基。每步缩合用含有 20% 六氢吡啶的 NMP 溶液去除 Fmoc 保护基，分别合成 MAP1 和 MAP2。肽链合成后，按照 ABI 公司推荐的步骤，将含树脂的肽链加入处于冰浴条件下的混合反应液中，反应液的成分：结晶苯酚 0.75 g、酒石酸乙二胺(EDT)0.25 ml、苯硫基甲烷(Thionaisole)0.5 ml、去离子水0.5 ml、三氟乙酸 10 ml。在室温条件下持续搅拌，MAP1 的反应时间为 4.5 h，MAP2 的反应时间为 8.5 h。把肽链从树脂上裂解下来，同时去除多种保护基。将混合液经 4 G 的玻璃滤器过渡以滤掉切下的树脂及保护基团，并用三氟乙酸冲洗反应瓶和滤器，将滤液在常温下低压蒸发至 1～2 ml，加乙醚 50 ml 使多肽沉淀后，经 6G 滤器过滤后，冷冻干燥，所得便是肽产品。

1.1.2.2 对照肽的合成　以始用 0.25 mmol Fmoc-HMP 树脂，各种 Fmoc 氨基酸的量为 0.1 mmol，侧链保护为 Ser(tBu)、Thr(tBu)、Tyr(Tbu)、His(Trt)、Gln(Trt)、Asp(OtBu)、Glu(OtBu)、Arg

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(Mtr)、Lys(Boc), 合成方法同上。

1.1.3　MAP 肽的鉴定

1.1.3.1　毛细管电泳分析　　将 MAP1 和 MAP2 少量产品用去离子水溶解后, 用 0.2 μm 纤维滤膜过滤后, 用 BioFocus-3000 型(美国 BIO-RAD 公司)毛细管电泳仪采用区带电泳法进行分析, 毛细管采用孔径 25 cm, 长度 46 cm, 缓冲液采用磷酸盐缓冲液 pH2.8, 电泳方向从正极向负极移动, 恒定电压 10 kV。

1.1.3.2　氨基酸组分分析　　取合成肽产品 10 mg 经 6 mol/L 盐酸水解后在自动氨基酸组分分析仪(美国 BECKMAN 3000)上进行分析。

1.2　免疫方法及免疫学检测

1.2.1　动物及分组　　日本大耳白家兔, 5～6 月龄, 体重(2.0±0.3) kg, 雌雄不限, 随机分为 4 组, 2 只/组; C-57BL/6 J 小鼠, 2 月龄, 体重(18±2)g, 雌雄不限, 随机分为 4 组, 5 只/组。以上动物均购于四川省中药研究所。

1.2.2　免疫方法　　以 MAP1、MAP2、Pre-$S_{(2)}$及 Pc 为免疫原, 共注射 3 次, 每次间隔 2 周, 首次以 CFA 为佐剂, 加强免疫以 IFA 为佐剂。兔首次免疫的剂量为 400 μg/只, 加强注射剂量为 200 μg/只, 与 2.0 ml 佐剂完全乳化后, 在[illegible]窝、腹股沟、腋部皮下多点注射; 小鼠首次及加强免疫剂量为 50 μg/只, 与 0.3 ml 佐剂完全乳化后, 在腹股沟、腋部皮下及腹腔多点注射。

1.2.3　标本的采集与分离　　兔: 自首次免疫 2 周后开始, 抽耳缘静脉血 1 次/周, 约 5 ml/次, 取 4 ml 血抗凝后, 按常规方法分离外周血淋巴细胞, 然后进行淋巴细胞转化实验。余下的 1 ml血置 4 ℃冰箱过夜, 待血清析出后, 离心分离血清冻存于－20 ℃冰箱备用。小鼠: 末次免疫后 3 周, 眼眶放血, 收集血液, 分离血清, 并冻存于－20 ℃冰箱备用。将小鼠折颈处死, 无菌取脾, 按常规分离脾淋巴细胞, 然后行淋巴细胞转化实验。

1.2.4　酶联免疫(ELISA)方法检测抗体　　采用标准间接 ELISA 法测定血清中抗体滴度, 分别测定每组动物特异性抗体和与 Pre-$S_{(2)}$蛋白的交叉反应抗体滴度。包被液为 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液 pH 9.6, 洗涤液(PBS-T20)为 pH 7.4 浓度 0.02 mol/L的磷酸盐缓冲液(PBS)加终浓度 0.05%的吐温－20, 待测标本及抗体稀释液为 PBS-T20 含浓度 2%的绵羊血清, 酶标二抗为羊抗兔 IgG-HRP、羊抗鼠 IgG-HRP(军事医学科学院微生物流行病研究所, 批号: 199508), 底物为邻苯二胺(OPD)-H_2O_2。用 96 孔酶联板(CORNING), 包被抗原的量为 200 μl/孔, 抗原浓度为 25 μg/ml, 4 ℃过夜, 以 15%的小牛血清-PBS 封闭 37 ℃, 90 min后, 洗涤 3 次, 3 min/次, 加倍比稀释的被测动物血清 100 μl/孔, 37 ℃孵育 90 min, 洗涤 3 次后, 加入酶标二抗, 37 ℃ 30 min, 洗涤 3 次后, 加入 OPD-H_2O_2 底物, 37 ℃ 10 min, 终止反应。用 Model 3550自动酶联检测仪(美国 BIO-RAD 公司)于 490 nm 测定吸光度 A 值, 以正常兔血清或小鼠血清作阴性对照。结果以双复孔 A 值均值表示。

以待测标本 D_λ 值/阴性对照 D_λ 值＞2.1 为阳性, 以出现阳性反应的最高稀释度作为该标本的滴度。

1.2.5　淋巴细胞转化实验　　以含有 10%小牛血清、0.2 mmol/L 谷胺酰胺、5×10^{-5} mmol/L 二巯基乙醇及抗生素的 PRMI1640 (Gibco)完全培养基调整兔、小鼠淋巴细胞的浓度为 1×10^6/ml, 于 96 孔细胞培养板, 每孔 0.2 ml 中含细胞数 0.2×10^5, 分别加入 Pc、MAP1、MAP2、Pre-$S_{(2)}$蛋白, 最终浓度为 10 μg/ml[22], 在 37 ℃、湿度饱和、CO_2 浓度 5%的孵厢中培养 3 d, 加入 1 μCi/孔的 ^{3}H-TdR(中国科学院上海原子能研究所)继续培养。18 h 后, 收获细胞, 用多头细胞收集器将细胞收集于玻璃纤维滤纸上, 烘干后, 放入 5 ml 闪烁液的测量瓶中。用液体闪烁计数仪测每分钟脉冲数(cpm), 结果以 3 复孔的 $\bar{x}\pm s$ 表示。

刺激指数(SI)＝实验组 cpm 均值/空白对照组 cpm 均值

空白对照组指不加抗原肽刺激的标本管, 以 SI＞2 为阳性。

2　结果

2.1　多肽的鉴定

2.1.1　毛细管电泳的分析　　经分析, MAP1 和 MAP2 均呈单峰, 经积分计算, 均达 90%以上, 见图 2。

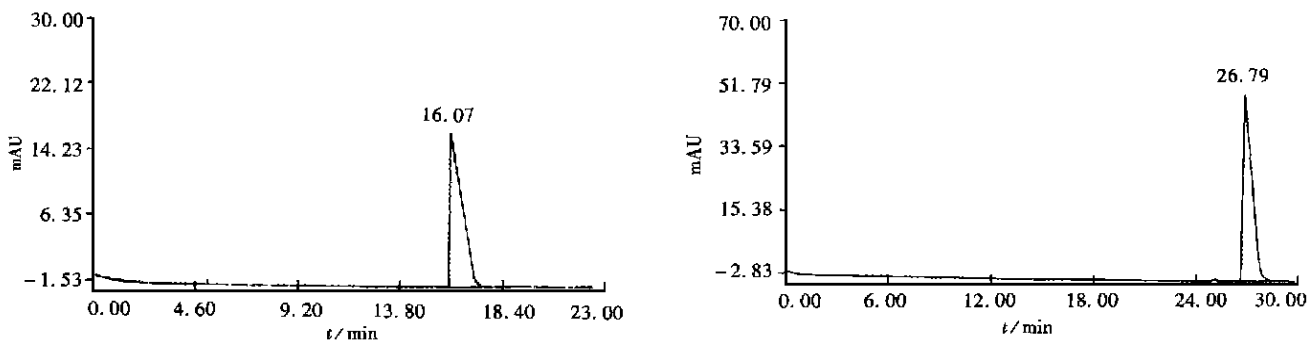


图 2　MAP1(左)MAP2(右)毛细管电泳分析结果

Fig 2　Results of capillary electrophoresis analysis of MAP1(left) and MAP2(right)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.1.2 氨基酸组分分析 其氨基成组成与理论值相符(结果未列出)。

2.2 抗体检测

2.2.1 兔抗体滴度的动态测定 首次免疫后 2 周始, 抽血 1 次/周, 分离血清, 测定特异性抗体滴度, 首次免疫 2 周后即可检出特异性抗体, 抗体滴度在测定时间内, 抗体滴度逐渐增高, MAP2 上升速度最快, 首次免疫后 8 周抗体滴度达最高, MAP1 抗体上升速度仅次于 MAP2, 高于对照的 Pre-$S_{(2)}$和 Pc, Pc 滴度最低。抗体滴度随免疫次数和时间升高。结果见图 3。

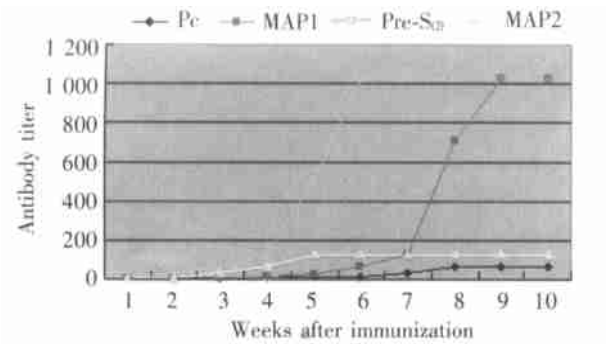


图 3 不同抗原免疫后家兔抗体动态检测

Fig 3 Dynamics of antibody responses of rabbit immunized with different antigens

2.2.2 兔、小鼠抗体滴度 包被以特异性抗原, 分别测定兔、小鼠特异性抗体滴度。小鼠: 抗体滴度由高到低依次为 MAP2、MAP1、Pre-$S_{(2)}$、Pc; 兔: MAP1、MAP2 激发的抗体滴度相等, 高于 Pre-$S_{(2)}$蛋白, Pc 最低。抗体滴度部趋势是 MAP 肽在兔和小鼠激发的抗体滴度高于 Pre-$S_{(2)}$蛋白及对照的 Pc, 而 Pre-$S_{(2)}$蛋白又较 Pc 的 Pre-$S_{(2)}$抗体滴度高, 见表 1。

表 1 第 9 周兔和小鼠血清抗体滴度检测结果

Tab 1 Serum antibody titer in mouse and rabbit at the 9th week

	Mouse	Rabbit
MAP1	≥1∶1024	≥1∶1024
MAP2	≥1∶2048	≥1∶1024
Pre-$S_{(2)}$	≥1∶256	≥1∶256
Pc	≥1∶128	≥1∶64

2.2.3 小鼠 Pre-$S_{(2)}$特异性抗体滴度 以 Pre-$S_{(2)}$蛋白搂包被抗原, 测定各种抗血清与 Pre-$S_{(2)}$蛋白的交叉反应。结果见表 2, MAP1 和 MAP2 刺激兔和小鼠能产生 Pre-$S_{(2)}$蛋白特异性抗体, 其中以 MAP2 对小鼠激发的抗体滴度最高。MAP1 与 Pre-$S_{(2)}$激发的抗体滴度相邻相仿, 而作为对照的 Pc 激发的抗体与 Pre-$S_{(2)}$交叉反应性最低, 结果见表 2。

2.3 淋巴细胞转化实验

兔、小鼠淋巴细胞分别加入 MAP1、MAP2、Pre-$S_{(2)}$及对 Pc 抗原, 观察不同抗原对淋巴细胞增殖的影响, 见图 4, 5。兔: MAP1, MAP2, Pre-$S_{(2)}$致敏的淋巴细胞在受到致敏原再刺激时, 淋巴细胞发生增殖, 而对于其它抗原的刺激时, 却未见增殖反应, Pc 致敏的淋巴细胞在受到致敏原或共它抗原刺激, 均未见增殖反应; 小鼠: MAP1、MAP2、Pre-$S_{(2)}$及 Pc 致敏的淋巴细胞在受到致敏原再刺激时, 淋巴细胞发生增殖, 而对于其它抗原的刺激时, 却未见增殖反应。

表 2 兔、小鼠血清抗体与 Pre-$S_{(2)}$蛋白交叉反应滴度

Tab 2 Titer of Pre-$S_{(2)}$-specific antibody in mouse and ribbit

	Mouse	Rabbit
MAP1	≥1∶256	≥1∶512
MAP2	≥1∶1024	≥1∶512
Pre-$S_{(2)}$	≥1∶256	≥1∶256
Pc	≥1∶8	≥1∶16P

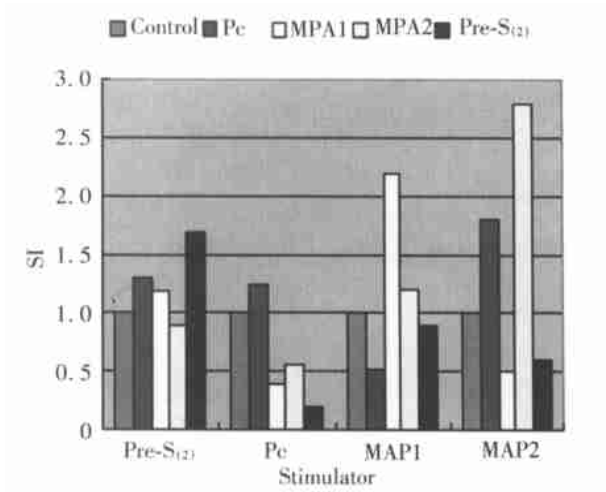


图 4 不同抗原致敏的兔 T 细胞对不同抗原的增殖反应

Fig 4 Proliferation of T cell from different antigens immunized rabbit against those antigens respectively

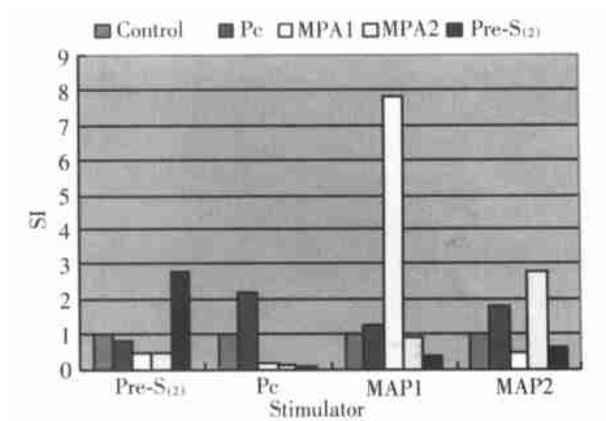


图 5 不同抗原致敏的小鼠淋巴细胞对不同抗原刺激的增殖反应

Fig 5 Proliferation of T cell from different antigens immunized C57BL/6J mice against those antigens respectively

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

HBV env 基因编码一个 55 个氨基酸的 Pre-S(2) 蛋白, Pre-S(2) 蛋白对产生保护性免疫反应具有重要作用。土拨鼠肝炎病毒、地松鼠肝炎病毒、鸭肝炎病毒也存在类似的区域, 推测该区域与乙肝病毒的缩主特异性和器官特异性有关。而在不同亚型人乙肝病毒中该区域高度保守, 因此推断该区域激发的免疫反应可能克服乙肝病毒亚型间的免疫逃避。既往研究发现, Pre-S(2) 蛋白不含半胱氨酸, 为线性结构, 其保护性表位为顺序依赖型, 这为基于表位而设计新型抗原分子的免疫学研究提供了很好的模型。在本室对 Pre-S(2) 蛋白精细免疫识别研究的基础上, 将 Pre-S(2) 蛋白 B 细胞表位图谱上的两个 B 细胞表位 B1、B2 作为本研究的主要对象, 探讨不同表位组合和不同抗原结构对其免疫原性的影响。

多肽抗原表位成份简单, 引发的免疫反应针对性强, 但其分子量变小, 在体内易降解, 因而有免疫原性低的缺陷。既往多是用表位肽交联载体蛋白的方法来提高其免疫原性, 但载体蛋白有其固有缺陷。本研究采用 MAP 结构, 它是以寡聚赖氨酸为核心的放射状分枝肽, 其寡聚赖氨酸核心分子量小, 免疫原性弱, 既往研究已证实, 不足以诱发特异性的免疫反应。

本实验发现, MAP 肽诱发的免疫反应明显高于对照的线性 Pre-S(2) 蛋白和 Pc, 证明 MAP 肽的结构能明显提高抗原肽的免疫原性。提示分枝肽结构可能部分恢复其大分子特征, 从而提高其免疫原性。

在恢复其大分子特性后, 在 MAP 肽抗原表位经重新搭配、组合, 表位分子内环境已不同于原来的天然蛋白, 虽然表位氨基酸序列未变, 但其构象是如何变化, 抗原进入体内到淋巴细胞和活化需经过抗原被吞噬、降解、呈递多个复杂的环节, 在体内激发的抗体是否还能识别原来的天然蛋白抗原？本研究以 Pre-S(2) 蛋白为包被抗原, 检测不同免疫原激发的抗体与 Pre-S(2) 的交叉反应, 发现 MAP1 和 MAP2 产生抗体都能和 Pre-S(2) 蛋白结合, 说明含有 Pre-S(2) 蛋白 B 细胞表位的 MAP 肽所激发的抗体仍能识别 Pre-S(2) 蛋白, 因此, 该抗原的免疫特异性是由特异性氨基酸序列决定。MAP 结构的引入是替代传统肽交联蛋白载体并提高免疫原性的有效办法。

构建有效的新型抗原肽, 必须研究 T、B 细胞表位的不同组合, 本研究引入了两个能够协助 HBsAg 特异性 B 细胞产生抗体的 Th 细胞表位, 连结于 MAP 肽的靠核心端。研究发现 MAP1、MAP2 及 Pre-S(2) 蛋白都能刺激特异性淋巴细胞发生增殖, 且相互之间没有交叉刺激作用, 说明活化的淋巴细胞亚群为抗原特异性的, 换言之, MAP1、MAP2 及 Pre-S(2) 蛋白都含有能被兔、小鼠 APC 呈递且被 T 淋巴细胞的识别的细胞表位。MAP 肽免疫动物之后, 能刺激 T 细胞活化, 则产生较高滴度的抗体, 既往研究表明: 仅采用单一 B 细胞表位的构建 MAP 肽, 其免疫原性仍不够理想。Pre-S(2) 蛋白能刺激兔、小鼠 T 细胞的活化, 则 Pre-S(2) 蛋白产生抗体滴度明显高于对照的 Pc。而 Pc 含有能被小鼠 MHC 分子识别的 T 细胞表位, 可能与 Pc 在小鼠诱发的抗体滴度稍高于兔有关。以上实验说明, 引入 Th 细胞表位能增强抗原肽的免疫原性。值得一提的是, MAP1 对小鼠淋巴细胞 SI 明显高于其它抗原 ($P<0.05$), 但 MAP1 诱发的抗体滴度并非最高, 而低于 MAP2, 是否抗体产生主要决定因素在于 B 细胞表位的免疫原性？Th 细胞的活化在抗体产生的定量如何, 尚需进一步研究。

以往合成肽的鉴定多用反相高效液相色谱 (RP-HPLC), 本实验则采用了毛细管电泳分析仪来进行合成肽的鉴定。毛细管电泳与 RP-HPLC 相比有方便、迅速、样本需要量少等优点。但毛细管电泳技术关键是进行电泳条件选择。通过本研究, 我们的体会是, 在影响分离的诸因素中, 缓冲液的 pH 的作用最显著, MAP1 和 MAP2 的等电点都偏碱性, 采用 pH2.8 的磷酸盐缓冲液分离效果较好。其它影响因素依次为电压、温度和缓冲液的浓度。升高温度和提高电压都有利于缩短分离时间, 但同时分辨率有所下降。

参考文献:

[1] 吴玉章. 蛋白质抗原表位的研究[J]. 科学, 1994, 185: 93—96.

[2] Ert C, Xiang Z. Novel vaccine approach[J]. J Immunol, 1996, 156(10): 3 579—3 584.

[3] Wu Y Z, Zhu X H. A new approach for B-cell epitope prediction in viral proteins[J]. Chin Sci Bull, 1995, 40(9): 761—767.

[4] Horsfall A C, Hay F C, Soltys A J, *et al*. Epitope mapping[J]. Immunol Today, 1991, 12(7): 211—213.

[5] 吴玉章, 朱锡华, 张　凌. Pre-S(2) 蛋白 B 细胞表位的精细特异性[J]. 免疫学杂志, 1994, 10(2): 80—85.

[6] Ferrari C, Bertoletti A, Penna A, *et al*. Identification of immunodominant T cell epitopes of the hepatitis B virus nucleocapid antigen[J]. J Clin Invest, 1991, 88(1): 214—219.

[7] 吴玉章, 朱锡华, 张凌. Pre-S(2) 蛋白抗体结合部位的确定[J]. 免疫学杂志, 1993, 9(1): 8—14.

(编辑　汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net