DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.05.001

论著

人工合成丁型肝炎病毒抗原片段及其诊断应用

郑 红 李奇芬 吴纯清 李梦东 （第三军医大学西南医院传染科）630038
林晓红 崔恒苒 崔大敷 黄维德 （中国科学院上海生物化学研究所）

提 要 本文选择、设计并合成了含天然 HDAg 上的部分片段的 27 肽，用于建立检测抗 HD 的 ELISA 方法。试验结果表明，包被的合成肽抗原与已知抗 HD 阳性冻存血清呈抗 HD 阳性反应；它能与天然 HDAg 竞争抗 HD，具天然 HDAg 上相应片段的抗原活性；该合成肽抗原专一性强，与正常人血清，正常小鼠血清，单纯甲型、乙型、丙型肝炎抗体阳性血清无免疫交叉反应。用建立的 ELISA 法，检测 1992 年 1～5 月的部分献血员及住本科各型肝炎患者血清标本的抗 HD。300 例献血员中 1 例抗 HD 阳性(0.33%)，其 ALT 增高 2 倍以上。非乙型肝炎 41 例，甲型肝炎 52 例，抗 HD 均阴性。各型乙型肝炎 211 例，抗 HD 阳性 21 例(9.95%)。其中，携带者 2/82 例 (2.5%)；急黄肝 6/43 例 (13.95%)；慢活肝 6/60 例 (10.00%)；重肝 4/18 例 (22.20%)；肝炎肝硬化 3/8 例 (37.50%)，结果与本科已往报告基本一致。

关键词 人工合成肽；丁型肝炎病毒

人的丁型肝炎病毒(HDV)在感染宿主时必须有乙型肝炎病毒(HBV)的辅助[1,2]。它与 HBV 可重叠感染正常机体，导致不同的临床后果[3]。丁型肝炎病毒抗原(HDAg)是迄今证实的由该病毒编码的唯一单链蛋白[4]。现已证实 HDAg 有与 HDV 核酸结合的活性，为 HDV 的复制所必需，在 HDV 的致病机理中有重要意义[5,6]。由于天然 HDAg 材料来源困难，提取纯化过程复杂、产率低、产物稳定性差，难获得纯度高、稳定性好、足量的 HDAg。我们参考现有文献资料自行选择、设计并合成了含天然 HDAg 上的部分片段的 27 肽。实验证实该合成肽具有天然 HDAg 上相应片段的抗原活性，能专一地为天然抗 HD 所识别。

1 实验方法

1.1 用合成肽抗原建立 ELISA 法检测抗 HD

用合成肽抗原包被聚乙烯塑料板，50μl/孔，4℃过夜。加待检原倍血清，50μl/孔，37℃水浴 1 h。洗涤后，加羊抗人 IgG-HRP，50μl/孔，37℃水浴 1 h。洗涤后加 OPD 底物显色液，50 μl/孔。3～5 min 后用 2mol/L H_2SO_4 终止反应，在 492nm 波长测定被检孔 OD 值。

1.2 对照实验

选曾采用 Abbott 抗 HD 检测药盒，北京预防医科院病毒所、河南医科所抗 HD 药盒检测所得抗 HD 阳性的冻存血清，加入已包被合成肽抗原的包被板中，按实验方法 1.1 进行 ELISA 试验。

1.3 中和试验

在 ELISA 试验中，加血清标本的同时加入等量的已知 HDAg 阳性血清以中和血标本中的抗 HD。

1.4 专一性试验

在 ELISA 试验中，待测血清分别为正常人血清，单纯甲型、乙型、丙型肝炎抗体阳性血清及正常小鼠血清。

1.5 临床标本检测

采用建立的 ELISA 方法，检测 1992 年 1 月至 5 月初在本科住院的各型肝炎患者血清标本。

2 结果与讨论

2.1 在建立 ELISA 方法中，选献血员血清标本为阴性参照，随机抽取献血员血标本 n =

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

103 份，阴性对照 $OD_{492nm}=\bar{x}\pm s=0.0632\pm0.0248$。参照 Abbott 药盒，阳性对照与阴性对照 OD 值之差≥0.4 为检测有效；临界值(Cut off 值)=0.6×阳性对照 OD 均值+0.4×阴性参照 OD 均值，大于临界值为阳性结果。

2.2 在对照实验(表 1)中，采用合成肽抗原检测抗 HD 与 Abbott 药盒采用旱獭抗原、河南医科所采用的土拨鼠抗原及北京预防医科院病毒所的基因工程抗原检测抗 HD 的结果是相吻合的，表明合成肽抗原能为天然抗 HD 所识别。

表 1 HDV 多肽抗原与 3 种不同来源检测抗 HD 试剂比较

标本患者日期	抗 HD			
	Abbott	北京预防医科院病毒所	河南医科所	HDV 多肽抗原(OD_{492})
1984.10.9 杨某	+			+(0.89)
1984.10.7 杨某	+			+(0.51)
1984.5.17 赵某	+			+(0.47)
1986.6.2 赵某	+			+(0.66)
1985.1.22 高某	+			+(0.78)
1984.10.24 张某	+			+(0.63)
1985.3.31 黎某	+			+(1.15)
1988.4.2 马某	+			+(0.77)
1990.11.11 潘某		+(抑制率 81.8%)		+(0.64)
1991.6.26 李某			+(3⁺)	+(0.62)
1990.11.6 李某		+(86.36%)		+(0.51)
1990.11.3 谭某			+(3⁺)	+(0.59)
1991.9.24 荀某			+(4⁺)	+(0.55)
1991.9.24 杨某			+	+(0.47)

2.3 在中和试验(表 2)中，当被检抗体阳性血清中加入抗原阳性血清时，OD_{492} 值由阳性降至阴性范围内。显然，合成肽抗原具有天然 HDAg 上相应片段的抗原活性，能与天然 HDAg 竞争抗 HD。

表 2 HDV 合成肽抗原检测血清抗 HD 的中和试验

标本	抗 HD OD_{492}	
	血标本(1∶2 稀释)	血标本+白某*血标本(1∶1)
徐某	0.55(+)	0.125
杨某	0.71(+)	0.09
	0.35(+)	0.14
马某	0.37(+)	0.09
黎某	0.46(+)	0.10
高某	0.65(+)	0.10
张某	0.37(+)	0.14
温某	0.15(−)	0.11
白某	0.13(−)	
(−)对照		0.13
阳性对照	0.63/0.43	
阴性对照	0.08/0.06	

* 白某血清为 HDAg 阳性标本

2.4 专一试验(表 3)表明，合成肽抗原的专一性强，与正常小鼠血清、单纯甲型、乙型、丙型肝炎抗体阳性血清无免疫交叉反应。

表 3 HDV 合成肽抗原专一性试验

标本	抗 HAVIgM	抗 HBcIgM	抗 HC (CP_9CP_{10})	抗 HD (合成肽)
刘某	−	−	+	−(0.10)
杨某	−	−	+	−(0.13)
陈某	−	−	+	−(0.12)
彭某	−	+	−	−(0.06)
杨某	−	+	−	−(0.05)
杨某	−	+	−	−(0.12)
李某*	−	+	+	+(0.62)
谭某*	−	+	+	+(0.59)
肖某	+	−	−	−(0.06)
李某	+	−	−	−(0.08)
李某	+	−	−	−(0.12)
官某**	+	+	−	−(0.09)
陈某	−	+	−	+(0.52)
小鼠(1)***				−(0.02)
小鼠(2)				−(0.04)
小鼠(3)				−(0.04)

* 为丙型和丁型肝炎病毒混合感染

** 为甲型、乙型肝炎病毒混合感染

*** 酶标抗体为羊抗鼠 IgG-HRP

2.5 在检测的 1992 年 1 月至 5 月初住本科

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

各型肝炎患者血标本中抗 HD 的存在状况(表 4)与本科已往报告的结果基本一致。

表 4 HDV 合成肽抗原检测各类肝炎患者血清抗 HD 状况

组别	抗 HD		
	检测数	阳性数	阳性率(%)
献血员	300	1	0.33
非乙型肝炎	41	0	
甲型肝炎	52	0	
各型乙型肝炎	211	21	9.95
HBsAg 健康携带者	82	2	2.50
急黄肝	43	6	13.95
慢活肝	60	6	10.00
重肝	18	4	22.20
肝炎肝硬化	8	3	37.50

人工合成多肽能快速、简便、省时地获得纯度高、安全性好的代表天然蛋白质上不同功能及抗原区域的多肽片段。HDV 合成肽抗原的获得及应用在一定程度上替代了天然 HDAg,为 HDAg 生物活性的深入研究、HDV 感染的流行病学及其发病机理的研究创造了基础和条件。

参考文献

1. Rizzetto MC, Canese MG, Arico S, et al. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (δ/anti-δ) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. Gut, 1977; 18(12): 997～1003
2. Rizzetto M, Hoyer R, Canese MG, et al. δ agent: Association of δ antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of δ-infected chimpanzees. Proc Natl Acad Sci USA, 1980; 77(10): 6124～6128
3. Pastore G, Monno L, Santantonio T, et al. Hepatitis B virus clearance from serum and liver after acute hepatitis delta virus superinfection in chronic HBsAg carriers. J Med Virol, 1990; 31(4): 284～290
4. Weiener AJ, Choo QL, Wang KS, et al. A single antigenomic open reading frame of the hepatitis delta virus encodes the Epitope(s) of both hepatitis delte antigen polypeptieds P24δ and P27δ. J Virol, 1988; 62(2): 594～599
5. Chang MF, Bader SC, Soed LH, et al. Human hepatitis delta antigen is a nuclear phosphoprotein with RNA－binding activity. J Virol, 1988; 62(7): 2403～2410
6. Lin JH, Chang MF, Badker SC, et al. Characterization of hepatitis delta antigen: Specific binding to hepatitis delta virus RNA. J Virol, 1990; 64(9): 4051～4058

(收稿:1992-06-29;修回:1992-07-30)

Synthesis of oligopeptide of HDV antigen and its application in diagnosis

Zheng Hong, Li Qifen, Lin Xiaohong, et al (Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract A 27-peptide, a fragment of hepatitis delta antigen (HDAg), was synthesized and used to develop an ELISA method for the detection of anti-HD. It was found that positive anti-HD reaction occurred between the coated 27-peptide and a stored sample of serum which was known anti-HD positive. Absorption test revealed that the synthetic peptide competed with natural HDAg for anti-HD, suggesting that the peptide possessed the antigenicity similar to that ofnatural HDAg. The antigenicity of the synthetic peptide was quite specific wihtout cross reaction with normal human and mouse sera and with anti-HA. anti-HB and anti-HC sera.

Among 300 blood donors, there was only 1 case (0.33%) anti-HD positive with an ALT level 2 times higher than normal. In 41 cases of non-B hepatitis and 52 cases of HAV hepatitis, none was

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

anti-HD positive. In 211 cases of various types of HBV hepatitis, 21 were (9.95%) anti-HD positive, among whom 2/82 (2.5%) werehealthy HBV carriers, 6/43 (13.95%) were patients with acute icteric hepatitis, 6/60 (10.00%) were patients of chronic active hepatitis, 4/18 (22.20%) were patients of severe hepatitis, and 3/8 (37.50%) were those with liver cirrhosis. These results were consistent with those in our previous reports.

Key words synthetic oligopeptide; hepatitis delta virus

个案与短篇

老年人上消化道内镜检查 1225 例总结

冷恩仁 陈东风 武兵兵 (第三军医大学大坪医院消化科) 630042

我院从 1977 年 12 月至 1991 年 8 月上消化道内镜检查 14 400 例，老年人 1 225 例(8.51%)，总结报道如下：

1 内镜资料

1225 例中住院病人 439 例，门诊病人 786 例，其中男 950 例，女 275 例，男：女 3.45:1，年龄 60～64 岁 723 例(58%)，65～69 岁 334 例(27.27%)，70～74 岁 127 例(10.37%)，75～79 岁 35 例(2.86%)，80 岁以上 6 例。平均年龄 65.51 岁。检查前合并症上消化道出血 134 例(10.9%)，肝硬化 15 例，依次为慢支炎肺气肿、脑血管疾病、尿毒症、心律失常等。

检查结果：以慢性浅表性胃炎 532 例(43.43%)最多见，胃溃疡(Gu)157 例(12.82%)，胃癌(Gca)134 例(10.94%)，十二指肠溃疡(Du)134 例(10.94%)，食道癌 65 例(5.31%)，慢性萎缩性胃炎 63 例(5.14%)，十二指肠炎 56 例(4.57%)，复合性溃疡 15 例(1.22%)等。

疾病与性别：男 950 例，其中慢性浅表性胃炎 374 例(39.37%)，Gu 131 例(13.79%)，Gca 118 例(12.42%)，Du 116 例(12.21%)。女 275 例，慢性浅表性胃炎 158 例(57.45%)，Gu26 例(9.45%)，Gca 16 例(5.28%)，Du 18 例(6.55%)。

在 168 例中作 HP 检查，阳性者 86 例(51.19%)，阴性 82 例(48.81%)。

2 讨论

消化道内镜检查并发症多有报告，本组无 1 例发生并发症。严格掌握检查适应症，操作精心，争取病人配合是关键。

老年上消化道疾病本组资料为慢性胃炎发病率最高，且女＞男($P<0.001$)，其中慢性浅表性胃炎女＞男($P<0.001$)，而慢性萎缩性胃炎发病率男女间无差异($P>0.05$)，本组资料与认为慢性胃炎随年龄增长而发生率升高的趋势不相符合。消化性溃疡(Pu)306 例(24.98%)发病率男＞女($P<0.001$)，而 Gu 发病率男女间无差异性($P>0.05$)。Du 男＞女($P<0.25$)。在 Pu 中 Gu 与 Du 发病率无差异($P>0.05$)。Gca 以 60～69 岁多见(占 91.18%)。食道癌 65 例(5.31%)，发病率男女无差异($P>0.05$)。

HP 感染率随年龄增长而增加，在美国每增长一岁，感染率增加 1%～2%。我国平均感染率为 67.94%[1]。本组老年人感染率低，可能与地区性有关，待进一步探讨。

关键词 内窥镜术；老年人；消化系统

参考文献

1. 肖清水，等。内镜。1990;7(4):242～243

(收稿：1991-12-09；修回：1992-07-02)

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