

·免疫学技术与方法·

检测 HBVDNA/Ig-双特异性循环免疫复合物的免疫捕捉法 PCR^①周裕林 彭宣宪^② 柳 珑 肖军生 岑 岭 杨天赐

(厦门大学生物系厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

中国图书分类号 R392.33

摘要 目的: 建立一种免疫捕捉法 PCR 技术, 研究血清免疫复合物中不同 Ig 类型抗体结合 HBV 的情况, 并初步探讨其意义。方法: 以羊抗人 μ 、 γ 、 α 链的 IgG 为捕捉抗体, 再利用 PCR 扩增捕捉物中的 HBVDNA。结果: 成功地建立了检测 HBV-DNA/IgM、IgG 和 IgA-TCIC 的免疫捕捉法 PCR 技术。该技术特异性强、敏感性高、重复性好, 可以显著提高 HBVDNA 的检出率。同时发现, 结合 HBV 的抗体的 Ig 类型组合有明显差异, 三者均阳性最高。结论: 说明乙肝患者血清免疫复合物中有较多的病毒颗粒。研究 HBVDNA/Ig-TCIC 对乙肝发病机理的深入阐明可能具有重要意义。

关键词 免疫捕捉法 PCR 循环免疫复合物 HBVDNA

Immuno-capture PCR for HBVDNA/Ig-two-component-determined circulating immune complexes

ZHOU Yu-Lin, PENG Xuan-Xian, LIU Long et al. Department of Biology, the Education Minister Key Laboratory for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen 361005

Abstract Objective To establish an immuno-capture PCR for the study of classes of immunoglobulins complexed with HBV and of their significance. **Methods:** Using goat-IgG to human μ 、 γ 、 α chain as capture antibodies and prime-specific PCR as a detecting method. **Results:** An immuno-capture PCR had been established to detect HBVDNA/Ig-TCIC (HBVDNA/IgM-TCTC, HBVDNA/IgG-TCIC, HBVDNA/IgA-TCIC). This method was specific sensitive and reproducible, by which more patients with positive HBVDNA could be found. It was also characted that there were significantly different positive rates among the types of combinations of IgM, IgG and IgA, in which the group with the three of them was highest. **Conclusion:** These findings suggested that more HBV may be hide within circulating immune complexes and the study of HBV-DNA/Ig-TCIC may play an important role in more understanding of pathogenesis in patients with hepatitis B.

Key words Immuno-capture PCR Circulating immune complex HBVDNA

按双特异性免疫复合物 (TCIC) 的新概念, 病原体/Ig-TCIC 与抗原/Ig-TCIC 不同, 前者含有核酸, 后者可能不含遗传物质^①。病原体是传染病的始动因子, 故研究不同 Ig 类型抗体结合病原体的情况具有重要意义, 但目前少见报道。本文将免疫捕捉法和 PCR 技术有机地结合起来, 以 HBV 为研究对象, 成功地建立了检测 HBVDNA/Ig-TCIC (HBVDNA/IgM、IgG 和 IgA-TCIC) 的免疫捕捉法 PCR 技术, 并对其意义进行了初步探讨。

1 材料与方 法

1.1 研究对象 乙肝血清标本共 108 例, 采自厦门市中医院, 临床诊断按北京会议修订标准进行。另

取健康献血员血清标本 15 例和丙型肝炎血清标本 5 例分别作阴性和疾病对照。

1.2 实验材料 抗人 IgM、IgG 和 IgA (依次为 μ 、 γ 、 α 链特异性) 的羊 IgG: 卫生部上海生物制品研究所产品。HBV 基因引物: 根据 HBV adr 亚型 pADR-1 株基因, Sangon 公司合成, 经鉴定为电泳纯, 正股 1861 ~ 1878 5'-TGTTCAAGCTCCAAGCT-3'; 负股 2268 ~ 2284 3'-AGTGCGAATCCCACTC-5'。PCR 试剂盒 (热变性法): 厦门泰伦生物公司产品。限制性内切酶: Sau3A I promega 产品。

1.3 HBVDNA/IgM、IgG 和 IgA-TCIC 的检测

1.3.1 血清处理 参见文献 [2] 进行。简述如下: 取血清用终浓度为 3.5% 的 PEG 沉淀 2 次, 弃上清, 沉淀用等血清体积的 PBS 溶解。

1.3.2 免疫捕捉 分别包被羊 IgG 抗人 IgM、IgG

① 国家自然科学基金资助课题 (39660075)

② 通讯作者

作者简介: 周裕林, 男, 26 岁, 硕士, 现在厦门市妇幼保健院;

彭宣宪, 男, 43 岁, 教授, 博士生导师, 主要从事免疫生物学研究

和 IgA (依次用于 HBVDNA/IgM、IgG 和 IgA-TCIC 的检测)7.5 μg/ml, 每孔 50 μl, 4 °C 18 h, PBS-T 洗涤 3 次; 取上述沉淀溶解物 40 μl 加入反应孔, 37 °C 1 h, 同上洗涤 6 次; 每管加入无菌双蒸水 40 μl, 于 95 °C 变性 20 min, 得变性液。

1.3.3 PCR 扩增 10 *buffer 5 μl、混合 dNTP 液 (各 10 mmol/L)1 μl、MgCl₂ (25 mmol/L)4 μl、引物各 15 pmol、1U Taq 酶和变性液 30 μl, 补足水至 50 μl 反应体积。94 °C 变性 1 min, 55 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共循环 35 次, 最后以 72 °C 10 min 结束循环。每批做阴阳性标本各 3 管。

1.4 热变性法检测全血清 HBVDNA 参见文献 [3] 进行, 扩增条件同上。

2 结果

2.1 特异性考察

2.1.1 阻断试验 随机取阳性血清 5 份, 参照文献 [4] 进行。结果 IgM 和 IgA 组 2 例阳性和 1 例强阳性标本阻断后为阴性, 另 2 例强阳性标本阻断后为弱阳性; IgG 组阻断后只 1 例弱阳性, 其余均为阴性。

2.1.2 中和试验 取上述阻断试验用标本, 参照文献 [4] 进行。结果 3 组均为 2 例阳性和 1 例强阳性标本中和后为阴性, 另 2 例强阳性标本中和后为弱阳性。

2.1.3 替代试验 对 15 例健康献血员和 5 例丙肝患者血清进行检测, 结果所有健康献血员标本均为阴性, 5 例丙肝患者中有 1 例标本为 HBVDNA/IgM 和 IgA-TCIC 同时阳性。

2.1.4 重复性考察 每批试验均同时做 3 例阳性和 3 例阴性标本, 共做 15 批。所有 45 份阴性标本均为阴性; 在 45 份阳性标本中, “++”为 38 次 (84.4%), 其余 7 次在上下波动。

2.1.5 酶切鉴定 随机取反应产物进行 Sau3A I 酶切, 结果其片段与理论分析一致, 见图 1。

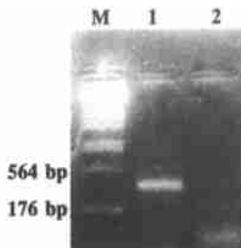


图 1 PCR 产物限制性酶切图谱
Fig. 1 Restriction mapping and electrophoresis analysis of PCR production

Note: M, marker; 1, positive control; 2, Sau3A I cuts

表 1 3 类 HBVDNA/Ig-TCIC 8 种组合模式的检测结果

Tab. 1 Distribution of cases in eight models of HBVDNA/Ig-TCIC

HBVDNA/ IgM-TCIC	HBVDNA/ IgG-TCIC	HBVDNA/ IgA-TCIC	Cases
+	+	+	36
+	+	-	9
+	-	+	11
-	+	+	8
+	-	-	14
-	+	-	6
-	-	+	10
-	-	-	14

Note: P < 0.01

2.2 3 种方法检测血清 HBVDNA 的比较 随机取乙肝标本 23 例, 同时用热变性 PCR 技术、PCR 试剂盒和免疫捕捉法 PCR 技术检测, 3 种方法的阳性率依次为 52.2%、56.5% 和 87.0%。χ² 检验表明, 前两者间无明显差异, 但均显著低于免疫捕捉法 PCR 的检出率。

2.3 乙肝 3 类 HBVDNA/Ig-TCIC 的检测结果 108 例乙肝的 HBVDNA/IgM、IgG 和 IgA-TCIC 阳性率依次为 70.4%、56.5% 和 64.8%, 相互间无明显差异。按 3 者阴阳性不同可以组合成 8 种模式。χ² 检验表明, 全部模式间存在非常显著差异, 其中 3 类均阳性组非常显著高于其它 7 种模式。HBVDNA/IgM-TCIC 单阳性显著高于 HBVDNA/IgG-TCIC 单阳性, 见表 1。

3 讨论

本文先以羊抗人 μ、γ、α 链特异性的羊 IgG 包被反应板, 分别用以捕捉特异性抗 Dane 颗粒的 IgM、IgG 和 IgA 类抗体, 再利用 PCR 的强大扩增能力和引物特异性对捕捉物中的 HBVDNA 进行检测, 从而建立了检测 3 种 HBVDNA/Ig-TCIC 的免疫捕捉法 PCR 技术。实验证明, 该法特异性强、敏感性高、重复性好。采用该法对 108 例乙肝临床标本进行检测, 结果其 HBVDNA/IgM、IgG 和 IgA-TCIC 阳性率依次为 70.4%、56.5% 和 64.8%, 相互间无明显差异。值得注意的是, HBVDNA/Ig-TCIC 的反应模式差异非常显著, 以 3 者均阳性最为多见, 而以 HBVDNA/IgG-TCIC 单独性和 3 者均阴性较少见。这些结果提示, Ig 的异质性在结合病原体中亦得到体现^[5]。

为考察该阳性率的意义, 我们随机取 23 份血清标本同时按本文建立的 PCR 和市售 PCR 试剂盒

N型GPA发生交叉反应抗体的阳性率可达20%以上,而特异性抗M型或抗N型GPA抗体的阳性率仅为0.1%左右。这种特异性抗体产生的极低频率正是由于抗原结构的微小差别所致。我们制备的3株McAb,经多方面鉴定,证明其中3G4和5E11为抗M型GPA,5C7为抗N型GPA,相互之间不存在交叉反应,具有良好的特异性。已有的研究证明,GPA肽链N末端第39位氨基酸是胰蛋白酶作用的敏感位点,而神经氨酸酶则可以水解糖链中的N-乙酰神经氨酸。抗原表位测定结果显示,两酶分别作用红细胞后,均抑制3株McAb对相应红细胞膜抗原的结合,表明这些McAb所针对的抗原决定簇位于GPA肽链N末端39位氨基酸以内,且神经氨酸是抗原决定簇不可缺少的组成成分。抗体与抗原的结合不仅与肽链的氨基酸序列有关,而且依赖完整糖链的存在。由此推测抗原决定簇是由糖和肽共同组成,这点与国内外的有关报道相一致^[6,7]。

为了给“GPA突变分析”技术的建立提供必要条件,我们制备了特异性抗M型和N型GPA的McAb。目前,已完成抗体的纯化和标记,并结合流式细胞仪分析,观察其在“GPA突变分析”技术中应用的可行性。除此之外,这些McAb也是良好的血

型试剂,在血液免疫学、遗传学和法医学的研究领域中都有实际应用价值。

4 参考文献

- 1 王继先.放射生物剂量学.北京:原子能出版社,1997:109-122
- 2 Langlois R G, Nisbet B A, Bigbee W L *et al.* An improved flow cytometric assay for somatic mutations at the glycophorin A locus in humans. *Cytometry*, 1990; 11: 513
- 3 Jensen R H, Bigbee W L. Direct immunofluorescence labeling provides an improved method for the glycophorin A somatic cell mutation assay. *Cytometry*, 1996; 23: 337
- 4 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术.北京:高等教育出版社,1981:21-23
- 5 毛建平,孙志贤.人红细胞膜血型糖蛋白的研究进展.生物化学与生物物理进展,1994; 21(1): 6
- 6 Bigbee W L, Vanderlaan M, Fong S S N *et al.* Monoclonal antibodies specific for the M- and N-forms of human glycophorin A. *Molecular Immunology*, 1983; 20(12): 1353
- 7 张建,鲍蓄,段薇 *et al.* 抗M血型抗原单克隆抗体特性的研究.中国生物制品学杂志,1996; 9(2): 58

[收稿 1999-01-27 修回 1999-03-29]

(编辑 许四平)

(上接第72页)

(引物基本相同)进行全血清热变性检测,结果相互间无明显差异,且均非常显著低于免疫捕捉法PCR的阳性率。这一结果说明,本免疫捕捉法所得的高阳性率可能是与抗体复合的病毒颗粒较多和免疫捕捉法PCR敏感较高的共同结果。

与由Sano创建,Ruzicka完善的免疫PCR技术不同^[6,7],本法并不是用人工偶联DNA作为扩增对象,而是扩增自然与抗体相结合的病原体DNA。本技术操作简单,材料易得,设备要求不高,可以扩展至对其它病原体/Ig-TCIC的检测。

HBV引物序列可从各功能区选择,其中前-C/C区和前-X/X区因易变异和阳性率较高而最受重视^[8,9]。本文考虑到对突变产物分析等后续工作及阳性率便于与市售试验盒比较这些因素,特选用前-C/C区附近的序列,其扩增片段为424 bp。我们亦考虑同时采用前-X/X区的引物,进一步研究其意义。

4 参考文献

- 1 彭宣宪.双特异性免疫复合物的研究进展.上海免疫学杂志,

1996; 16(5): 315

- 2 彭宣宪,高静,黄雪芳 *et al.* 脐血免疫复合物的检测及其意义.中国公共卫生学报,1997; 16(4): 187
- 3 邵力,巫协宁,徐萍 *et al.* 聚合酶链反应检测血清HBV-DNA方法的建立及实验条件分析.中国免疫学杂志,1993; 9(1): 58
- 4 彭宣宪,方亮.乙型肝炎患者血清中IgA类HBsAg特异性免疫复合物的初步研究.中华微生物学和免疫学杂志,1988; 8(6): 379
- 5 彭宣宪,王三英,黄雪芳.乙肝IgM和IgG-补体双特异性循环免疫复合物的意义.病毒学报,1997; 13(4): 224
- 6 Sano T, Smith C L, Cantor C R. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science*, 1992; 258(2): 120
- 7 Ruzicka V, Marz W, Russ A *et al.* Immuno-PCR with a commercially available avidin system. *Science*, 1993; 260(6): 698
- 8 姚楨.分子乙型肝炎相关病学.北京:中国医药出版社,1998: 8-38
- 9 Hsia C C, Nakashima Y, Tabor E. Deletion mutants of the hepatitis B virus X gene in human hepatocellular carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997; 241(7): 726

[收稿 1998-05-26 修回 1999-01-28]

(编辑 许四平)