

可捕获 HBV 的 preS1 单克隆抗体的制备及性质初探

顾颖,朱子恒,李少伟,张军,夏宁邵*

(厦门大学生命科学学院,国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心,福建 厦门 361005)

摘要: 用天然乙型肝炎病毒(HBV)颗粒(Dane 颗粒和管状颗粒)和 HBV 前 S1(preS1)区基因工程重组蛋白 GST-preS1 联合免疫 Balb/c 小鼠,经杂交瘤技术制备了 7 株单克隆抗体(mAb),采用 ELISA、免疫捕获 PCR 等方式鉴定其有关特性.各株 mAb 分别为 IgG1 和 IgG2a,轻链均为 κ 型.腹水 mAb 的滴度为 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$.用间接法 ELISA 显示,所有 7 株 preS1 mAb 均可以识别 HBV 天然抗原,其中 mAb 4D11 与 HBV 天然抗原的结合能力最强.通过竞争抑制法 ELISA 检测推断 preS1(21-47)上至少含有两个 B 细胞表位,mAb 4D11、1G5、7B6 和 7H11 具有共同的 B 细胞抗原识别位点;mAb 3H5、6F1 和 2A6 识别另外一个位点.本研究获得的可与 HBV 天然抗原结合的 preS1 单抗为 HBV preS1 检测试剂的研制提供了重要工具,对 HBV preS1 具有中和免疫活性抗原的设计及相关研究有重要帮助.

关键词: 单克隆抗体;HBV;preS1;B 细胞抗原识别位点

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)02-0222-05

HBV 感染具有较严格的宿主种属特异性和组织嗜性,较为确切的证据显示它只对人和黑猩猩具有感染性^[1],主要侵害肝组织.preS1、S2 蛋白是 HBV 急性感染早期的标志物,同时也是病毒清除的最早迹象.在慢性感染中,preS1 蛋白与病毒的复制有着密切的关系.因此,在临床上 preS1 的检测对于病程发展具有标志性的作用.另一方面,膜蛋白决定了 HBV 的感染嗜性,膜蛋白通过与肝细胞膜上的结合介导病毒吸附和进入肝细胞^[2].近年来关于病毒受体的研究一直是个热点,对受体结合部位主要有 3 种观点:1)preS1 是病毒与肝细胞膜受体的结合部位,其相应的受体可能是免疫球蛋白 A 受体、白介素 6 受体等^[3-4];2)preS2 是结合部位,其相应受体包括多聚人类血清白蛋白受体(PHSAR)、转铁蛋白受体、纤连蛋白^[5];3)主蛋白 HBsAg 是病毒受体结合部位,相应的受体包括载脂蛋白 H(apolipoprotein H)、磷脂酰结合蛋白 V(annexin V)等^[6].多数人接受第一种观点,因为 preS1(21-47)合成肽及其响应抗体可以体外抑制 HBV 与人肝癌细胞的结合;preS1(21-47)的变异可导致 HBV 失去感染力,preS1 作为主要的手提结合位点启动 HBV 与肝细胞结合的多位点、协同作用过程^[7].我们以全长的 preS1 重组抗原 GST-preS1 为免疫原,制备单克隆抗体,并研究了各 mAb 与天然病毒的结合能力,并以此

为依据确定了各 mAb 在 preS1(21-47)合成肽及在 HBV 天然病毒上所识别表位之间的关系.其中高亲和力的 mAb 可以用于 preS1 检测试剂的研制.

1 材料与方法

1.1 材料

纯化的 Dane 颗粒购自卫生部武汉生物制品研究所,直接电镜观察 Dane 颗粒含量超过 60%,每毫升样品中 Dane 颗粒数目约 1011vge(viral genome equivalents).

GST-preS1 重组蛋白由本实验室表达;PreS1(21-47)合成肽由西安美联公司合成.

Balb/c 小鼠购自厦门大学抗癌中心;Sp2/0 细胞由兰州生物制品研究所惠赠.

PEG1500、次黄嘌呤、胸腺嘧啶、氨基喋呤和 DM-SO 等为 Sigma 公司的产品;RPMI1640 基础培养基为 Gibco 公司的产品;胎牛血清为 Hyclone 公司的产品;HRP-山羊抗小鼠(GAM) IgG 抗体由厦门大学抗癌中心惠赠;AP 标记的 GAM(H+L)酶标二抗为 Protos 公司的产品;HRP-GAM IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 为 Serotec 公司的产品;GAM-UNLB 和 GAM-UNLB 为 SBA 公司的产品;酶标自动检测仪为 TECAN 公司的产品.

1.2 方法

1.2.1 抗 HBV preS1 mAb 的制备及一般特性的鉴定
动物免疫:纯化的 Dane 颗粒静脉免疫 Balb/c 小鼠,2 周后用重组 GST-preS1 蛋白按 5 μ g/只肌肉注

收稿日期:2007-07-09

基金项目:国家 863 计划项目专题(2006AA020905),福建省科技重大专项(2004YZ01)资助

*通讯作者:nsxia@xmu.edu.cn

射再次免疫.融合前3天,尾静脉注射纯化 GST-preS1 1次,5 μg/只.

细胞融合^[8-9]、克隆化及腹水制备,均按常规方法进行.采用间接酶联免疫吸附实验(ELISA)法筛选与 preS1(21-47)合成肽反应呈阳性的杂交瘤细胞株.

用硫酸铵盐析及 DEAE 柱层析依次纯化 mAb 腹水^[10].

采用间接 ELISA 法鉴定 mAbs 的特性.鉴定 mAb 的 Ig 亚类所用二抗为 HRP-GAM IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3;鉴定 mAb 的型所用二抗为 HRP-GAM -UNLB 和 HRP-GAM -UNLB.同时,采用间接 ELISA 法检测杂交瘤细胞培养上清及腹水中 mAb 的滴度.

1.2.2 单抗捕获病毒的 PCR 试验

用稀释后的各单抗包被 Eppendoff 管,封闭后加入 Dane 颗粒溶液与单抗作用.吸洗掉未结合的 Dane 溶液后,用终浓度为 1% 的 SDS 和终浓度为 200 μg/mL 的蛋白酶 K,56℃ 处理 2 h.分离提取结合 Dane 颗粒的 DNA,并进行 PCR 反应检测.PCR 检测体系:10 ×buffer 2 μL, Taq 0.2 μL, dNTP 0.2 μL, BvCF 0.2 μL, BvCR 0.2 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μL, ddH₂O 11 μL, 样本 5 μL.反应条件:94℃ 预变性 4 min,随后又经 94℃ 1 min;53℃ 40 s;72℃ 30 s,计 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min.目的片段为 HBc 全长基因,引物序列如下:

BvCF:5'-GGA TCCCA TATGGACATTGACCCA-3

(HBc:nt1-15)

BvCR:5'-GAATTCTTAACATTGAGATTCCCG-3

(HBc:nt549-534)

1.2.3 间接法 ELISA 检测 mAb 捕获 HBV 天然抗原的能力

按 10⁹ vge/孔包被 Dane 颗粒(含少量的球形颗粒和管状颗粒,被作为 HBV 天然抗原使用),37℃ 温育 2 h 后 4℃ 过夜.PBST 洗板一次,封闭液 37℃ 封闭 2 h.加稀释后的待检样品(纯化的单克隆抗体,所有样品均为双孔重复)0.1 mL 于上述已包被之反应孔中,置 37℃ 孵育 30 min, PBST 洗涤 5 次.于反应孔中加入羊抗鼠酶标抗体 0.1 mL. 37℃ 孵育 30 min, PBST 洗涤 5 次,显色.

1.2.4 抗 HBV mAb 之间的相互竞争阻断试验^[11]

以改良过的碘酸钠法标记各 mAb 4D11 和 mAb 6F1^[12],同上用 10⁹ vge/孔 Dane 颗粒包被 ELISA 板,进行其他 mAb 与 mAb 4D11 以及与 mAb 6F1 的竞争阻断实验.每孔加 50 μL 稀释后的酶标 preS1 mAb、50 μL 待测单抗,以 HEV 单抗 E1、E2 作为对照.37℃ 温育 1 h, PBST 洗涤 5 次,显色.于酶标仪上读取 OD_{450/620nm} 的值,计算竞争阻断率(竞争抑制率=(未竞争平均 OD 值 - 竞争平均 OD 值)/未竞争平均 OD 值 ×100%),竞争抑制率 ≥50% 判为阳性.

2 实验结果

2.1 抗 preS1 mAb 杂交瘤细胞株的建立

免疫 5 只 Balb/c 小鼠,取其脾细胞与 Sp2/0 细胞融合 3 次,融合率依次为 90%、88% 和 96%,相对应的阳性率分别为 50%、56% 和 60%.用 preS1(21-47)合成肽筛选出分泌特异 mAb 的杂交瘤细胞株,经 4 次克隆化后,最终获得 7 株细胞株能稳定分泌特异性抗 preS1 的 mAb,分别命名为 1G5、2A6、3H5、4D11、6F1、7B6 和 7H11.用硫酸铵沉淀和 DE-52 柱层析等对 mAb 腹水进行纯化,每毫升腹水可得 0.5~2 mg 的 mAb,纯度在 80% 以上.

用间接 ELISA 法测定各 mAb 类型如表 1:4D11 和 7H11 为 IgG1,其余 5 株 mAb 为 IgG2a;轻链除 7B6 为 κ 型外,其余均为 λ 型.采用间接 ELISA 法,检测系列稀释的培养上清及腹水中 mAb 的滴度.结果表明,培养上清中 mAb 的滴度为 1 ×10⁴~1.5 ×10⁵;腹水 mAb 的滴度为 1 ×10⁷~1 ×10⁹.

2.2 各株 mAb 与 HBV 天然抗原的结合能力

(1) 将筛选出的各株 mAb 包被在 Eppendoff 管上,以 HEV mAb E1、E2 作为对照,捕获溶液中的 Dane 颗粒,并用 PCR 检测捕获结果(图 1).各反应孔中均有明显的目的片段,各株单抗均可捕获溶液中的 Dane 颗粒.由于 PCR 反应较灵敏,各单抗与 Dane 颗粒结合能力的强弱无法量化区分.

(2) 包被 Dane 颗粒(含少量的管状颗粒和球形颗粒)用间接法 ELISA 检测 7 株 preS1 mAb 与 HBV 天然抗原(Dane 颗粒及管状颗粒)的结合能力.结果(图

表 1 抗 preS1 mAb 亚类及型

Tab. 1 Isotype of the anti-preS1 mAbs

mAb	1G5	2A6	3H5	4D11	6F1	7B6	7H11
重链	IgG2a	IgG2a	IgG2a	IgG1	IgG2a	IgG2a	IgG1
轻链							

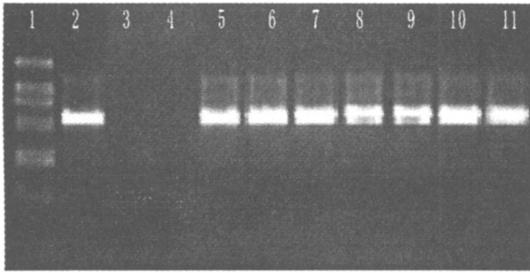


图 1 HBV 特异性抗体体外病毒中和能力分析

Fig. 1 Analysis of virus-neutralizing ability of HBV specific antibody in vitro

- 1. 2000DL Marker; 2. Dane particle; 3. HEV mAb E1; 4. HEV mAb E2; 5. anti-preS1 mAb 1G5; 6. anti-preS1 mAb 2A6; 7. anti-preS1 mAb 3H5; 8. anti-preS1 mAb 4D11; 9. anti-preS1 mAb 6F1; 10. anti-preS1 mAb 7B6; 11. anti-preS1 mAb 7H11

2) 显示,所有 7 株 preS1mAb 及作为阳性对照的 HBsAb 均可以识别 HBV 天然抗原. 作为阴性对照, 戊型肝炎病毒(HEV)的 mAbE1、E2 不能识别病毒天然抗原. 相同浓度下(20 μg/mL), 7 株 preS1 mAb 中, mAb 4D11 与 HBV 天然抗原的结合能力最强.

2.3 各株 mAb 间的相互竞争抑制作用

(1) 各株 mAb 针对 HBV 天然表位的相互竞争抑制作用对 mAb 4D11 进行 HRP 标记, 建立竞争抑制法 ELISA 检测系统, 通过 7 株 mAb 对 HRP-mAb 4D11 与病毒天然抗原结合的竞争抑制, 分析各 mAb 在 HBV 天然抗原上所识别的表位之间的关系. 结果如图 3 所示, mAb 4D11、1G5、7B6 和 7H11 可显著抑制 4D11 与 HBV 天然抗原的结合, 抑制率均高于 50% (图 3), 其它 3 种 mAb 3H5、6F1 和 2A6 对 4D11 与 HBV 天然抗原的结合无抑制作用. 表明 4 种抗 preS1 mAb 4D11、1G5、7B6 和 7H11 具有共同的 B 细胞抗原识别位点.

(2) 为分析另外 3 种 mAb 3H5、6F1 和 2A6 的所识别的表位之间的关系, 我们又对 mAb 6F1 进行了酶标, 按照相同的方法检测 7 株 mAb 之间的竞争抑制作用. 结果(图 4)表明, 3H5 和 2A6 均可显著抑制 6F1 与 HBV 天然抗原的结合(图 4, 抑制率超过 50%), 4D11、1G5、7B6 和 7H11 则无抑制作用. 我们推断 preS1(21-47) 上至少含有两个 B 细胞表位, 一个可被 mAb 4D11、1G5、7B6 和 7H11 识别, 另一个可被 mAb 3H5、6F1 和 2A6 识别.

3 讨论

本研究获得了 7 株特异性针对 preS1(21-47) 的

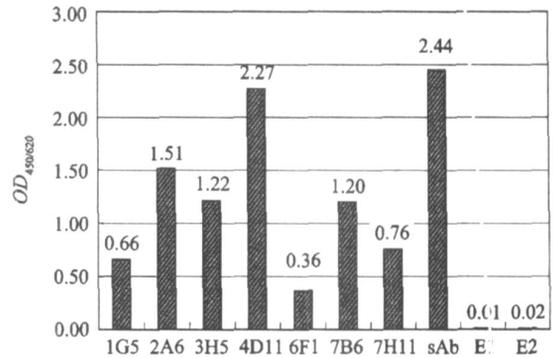


图 2 preS1 单抗与 HBV 天然抗原的结合能力

Fig. 2 The binding activity of preS1mAbs to native HBV antigens

Positive control: HBsAb

Negative control: anti-HEV mAb E1 and E2

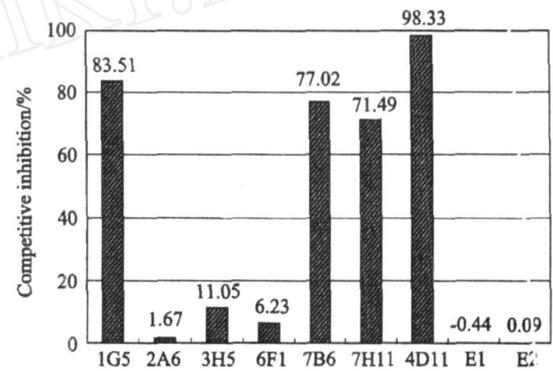


图 3 不同 preS1 单抗对 preS1 单抗 4D11 与 HBV 天然抗原结合的竞争抑制

Fig. 3 Competitive inhibition of anti-preS1 mAbs against HRP-4D11 binding with native HBV antigens

Negative control: anti-HEV mAb E1 and E2

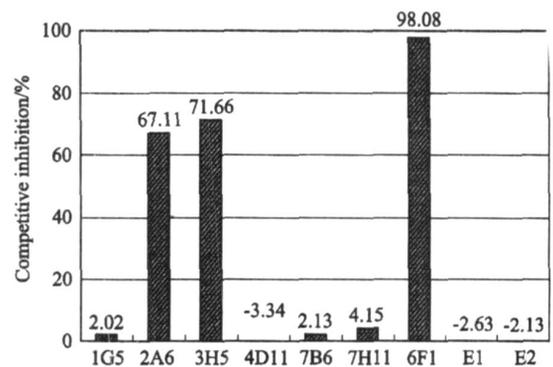


图 4 不同 preS1 单抗对 preS1 单抗 6F1 与 HBV 天然抗原结合的竞争抑制

Fig. 4 Competitive inhibition of anti-preS1 mAbs against HRP-6F1 binding with native HBV antigens

Negative control: anti-HEV mAb E1 and E2

IgG 单克隆抗体. 通过包被病毒的间接 ELISA 法验证了 7 株单克隆抗体都可以结合天然 HBV 抗原, 其结合能力有所差别: 在抗体浓度相同的情况下, mAb 4D11 与 HBV 天然抗原的结合能力更强, 相应的 mAb 6F1 的结合能力比较弱. 利用其中特异性强的高亲和力 mAb, 可以用于研制高灵敏度的乙肝 preS1 检测试剂^[13]. 有研究表明, 在 HBV 急性感染中 preS1、S2 蛋白的检出在 HBV DNA 检测阳性之前, 在 HbsAg 之前消失, 是急性感染病程的明显标志. 另一方面 preS1 蛋白的持续存在也易发展成为慢性乙肝. 在慢性患者中, DNA 斑点杂交呈阳性的个例中检测出 preS1 蛋白的几率明显高于 DNA 斑点杂交阴性个例; HbeAg 阳性个例中几乎均可以检测出 preS 蛋白, 即 preS 蛋白与 HBV 滴度直接相关, 其中 preS1 蛋白与病毒复制的关系密切. 可见, 建立临床 preS1 蛋白的检测系统对于乙肝病程的预测有着重要的价值^[14].

通过包被病毒的间接 ELISA 竞争阻断实验及包被 21-47 合成肽的间接 ELISA 竞争阻断实验, 我们发现, 这 7 株特异性针对合成肽 preS1 (21-47) 的单克隆抗体, 所识别的具体 B 细胞表位还有一定的差异; 并且从两种竞争阻断实验结果的差别可以说明, 各 mAb 所识别的表位在 21-47 及 HBV 天然抗原上的具体位置有一定的差异. mAb 1G5、4D11、7B6 和 7H11 识别 preS1 (21-47) 上同一个 B 细胞表位, 彼此之间有明显的竞争抑制; mAb 2A6、3H5 和 6F1 识别另外一个 B 细胞表位. 这提示 preS1 (21-47) 蛋白上至少有 2 个 B 细胞表位.

此外, 我们实验室还利用 mAb 4D11 与 HBV 天然抗原的结合力强的特性, 通过小鼠抗血清对 HRP-mAb 4D11 与 HBV 天然抗原结合的竞争抑制(结果另文发表), 间接地评价抗 preS1 多抗血清与 HBV 天然抗原的结合力, 从而初步评定重组抗原的应用价值, 筛选出可以诱导机体产生大量与 HBV 天然抗原结合抗体的重组蛋白. 这可以作为治疗性乙肝疫苗的初步筛选方式.

近年来的研究指出 HBV 与肝细胞的结合可能是一种多位点、协同的作用过程^[7], 其中有人认为主要的受体结合位点位于 preS1 29-34, 次级受体结合位点位于 HbsAg, 二者分别结合不同的肝细胞受体; 也有人提出病毒的主要肝细胞膜受体结合位点可能不在 HbsAg 上^[1], 他们通过体外中和实验发现仅抗 preS1 抗体的 Fab 段可以抑制病毒与 Hep G2 细胞的结合, 抗 HBs 抗体的 Fab 段则无抑制作用. 我们所获得的 7 株 mAb 在体外中和实验中都不能有效的阻断病毒对 Hep G2 细胞的感染(结果另文报导), 这可能是由于

mAb 的亲和力不够, 或者是因为用做抗原的 GST-preS1 没有能够很好的模拟天然 HBV 病毒上的中和表位的构象. 这些方面的问题, 可以通过改变重组抗原设计, 及免疫方案的改进来解决, 本研究为进一步筛选其他重要表位区域的抗 HBV 中和 mAb 提供了一个模式.

参考文献:

- [1] Qiao M, Macnaughton T B, Gowans E J. Adsorption and penetration of hepatitis B virus in a nonpermissive cell line [J]. *Virology*, 1994, 201(2): 356 - 363.
- [2] De M S, Gong Z J, Suwandhi W, et al. Organ and species specificity of hepatitis B virus (HBV) infection: a review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes [J]. *J Viral Hepat*, 1997, 4(3): 145 - 153.
- [3] Heinz D, Peters M, Prange R, et al. Possible role of human interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in hepatitis B virus infection [J]. *J Viral Hepat*, 2001, 8(3): 186 - 193.
- [4] De Falco S, Ruvoletto M G, Verdoliva A, et al. Cloning and expression of a novel hepatitis B virus-binding protein from Hep G2 cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(39): 36613 - 36623.
- [5] Budkowska A, Bedossa P, Groh F, et al. Fibronectin of human liver sinusoids binds hepatitis B virus: identification by an anti-idiotypic antibody bearing the internal image of the pre-S2 domain [J]. *J Virol*, 1995, 69(2): 840 - 848.
- [6] Hertogs K, Depla E, Crabbe T, et al. Spontaneous development of anti-hepatitis B virus envelope (anti-idiotypic) antibodies in animals immunized with human liver endonexin II or with the F(ab)2 fragment of anti-human liver endonexin II immunoglobulin G: evidence for a receptor-ligand-like relationship between small hepatitis B surface antigen and endonexin II [J]. *J Virol*, 1994, 68(3): 1516 - 1521.
- [7] Paran N, Geiger B, Shaul Y. HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment [J]. *EMBO J*, 2001, 20(16): 4443 - 4453.
- [8] 顾颖, 张军, 李少伟, 等. 生物传感器对抗戊型肝炎病毒单克隆抗体部分特性的研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2002, 18(6): 617 - 620.
- [9] Adler B, Faine S. A pomana serogroup-specific agglutinating antigen in *Leptospira*, identified by monoclonal antibodies [J]. *Pathology*, 1983, 15: 247 - 250.
- [10] Harlow E, Lane D. *Monoclonal antibodies* [M] // Harlow E, Lane D editors. *Antibodies: a laboratory manual*. New

- York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998: 298 - 300.
- [11] 顾颖, 葛胜祥, 黄果勇, 等. 戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体的鉴定[J]. 病毒学报, 2003, 19(3): 217 - 223.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]//金冬雁, 黎孟风, 张德政, 等译. 2版. 北京: 科学出版社, 1998: 888 - 898.
- [13] 袁权, 葛胜祥, 闫强, 等. 一种联合检测乙型肝炎病毒前S1抗原与核心抗原方法的建立及其与病毒核酸检测结果的一致性[J]. 病毒学报, 2007, 23(4): 252 - 257.
- [14] Tatsuji K, Akinori R, Akihiro M, et al. New enzyme immunoassay for detection of hepatitis B virus core antigen (HBcAg) and relation between levels of HBcAg and HBV DNA[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41: 1901 - 1906.

Isolation and Characteration of the Anti-native HBV preS1 Monoclonal Antibodies

GU Ying, ZHU Zi-heng, LI Shao-wei, ZHANG Jun, XIA Ning-shao *

(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract : The Balb/c mice were immunized with native HBV antigen (Dane particles and tubular particles) and purified recombinant protein GST-preS1. Seven mAbs anti-HBV preS1 mAbs were prepared by hybridoma technique, and the relative properties of the mAbs were identified by ELISA and immu-capture PCR. Of these mAbs, mAb 4D11 and 7H11 were IgG1, the others were IgG2a. The isotype of mAb 7B6 light chains were lamda (), the others were kappa (). All of these mAbs could recognize native HBV antigens (Dane particles and tubular particles), further study shows that they could recognize two different B cell epitopes of preS1 (21-47), one recognized by mAb 4D11, 1G5, 7B6 and 7H11, the other is recognized by mAb 3H5, 6F1 and 2A6. The mAbs abilities of recognizing the native HBV antigen show use of developing reagent to test HBV preS1, and assisting in the design of neutralizing antigen.

Key words : monoclonal antibody; hepatitis B virus; preS1; B cell epitope