

学校编码: 10384  
学号: 21620071151918

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_  
UDC \_\_\_\_\_

# 厦 门 大 学

## 硕 士 学 位 论 文

### 一种超敏、广谱乙型肝炎病毒表面抗原诊断 试剂的研制及其临床性能研究

**Development and Clinical Trial of a High-Sensitive and  
Broad-Spectrum Immunoassay for Hepatitis B Surface  
Antigen**

李 安

指导教师姓名: 张 军 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2010 年 06 月

论文答辩日期: 2010 年 07 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席: 史维国教授

评 阅 人: 朱关福教授

孙慧副教授

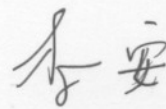
2010 年 07 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为(国家传染病诊断试剂与疫苗工程)课题(组)的研究成果，获得(国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心)经费或实验室的资助，在(国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名):



2010 年 07 月 09 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

( ) 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

(  ) 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

李安

2010年07月09日

## 摘要

我国由于 HBV 感染者众多，存在一定比例的低病毒载量的无症状携带者及感染早期的带毒者；而其也成为了 HBV 输血后传播的主要来源，这种情况无疑对 HBsAg 诊断试剂的灵敏度提出了更高的要求。同时，众多的感染者也为突变毒株的出现提供了温床；尤其是近年来乙肝疫苗、免疫球蛋白及核苷类药物等的广泛应用更加快了 HBsAg 突变株尤其是“a”表位突变株的出现。而传统的 HBsAg 诊断试剂主要采用针对“a”表位的特异性抗体，对突变毒株的检出能力有限，加之部分突变株不能被现有疫苗保护，从而给临床诊断和血液安全带来巨大威胁。当前欧美推出的一些改进型 HBsAg 检测试剂已经能检出部分 HBsAg 突变株，但是其检测灵敏度与检测野生株相比，仍有一定差距。而核酸检测限于成本昂贵、技术复杂且不易操作的缺点，很难在临床检验和血液筛查中普及应用。因此本研究致力于开发一种高灵敏度、同时能有效检测各种流行的 HBsAg 突变株的新型 HBsAg 诊断试剂，并对其进行全面的性能评估。

在前期的研究中，本室在福建厦门地区献血员中进行了为期两年的 HBsAg 分子流调，同时在北京、武汉、广州、西安等地进行了大量抽样调查，获得了数十例 HBsAg 突变株携带标本，并总结分析了流行的主流突变位点和规律。利用成熟的 HBV 1.3 倍体基因组构建技术构建了 A、B、C、D、G 等多个基因型（涵括四种血清型）及 G145R、C124Y、C138R、T140I、K141E 等多个 HBsAg 突变株 1.3 倍体克隆，并获得了各种重组病毒。同时利用杆状病毒表达系统表达纯化了多种野生型及突变型 HBsAg 重组蛋白。这些前期工作为诊断试剂的研发奠定了坚实的基础。

以上述基础为支撑，本研究采用病毒与重组蛋白交叉免疫的方式，获得了近 300 株高亲和力的单克隆抗体，并对其进行了 LIA 初筛及全面的性质鉴定。在此基础上，本研究通过进一步筛选挑选了 4 株单抗（WTS、6C10、42B6 和 15D1）及羊抗-HBsAg-HRP，研制出了一种超敏广谱的 HBsAg 诊断试剂，建立了试剂盒的生产工艺，并对其进行了大规模的性能评估。评估结果表明：本试剂对野生型 HBsAg 的分析灵敏度为 0.012IU/mL，高于做为对照的 5 种进口试剂 4-16 倍；对三种血清型及四种常见突变毒株的检测限均低于 0.05IU/mL；特异性为 99.81%

(95%CI: 99.57%~99.93%)。8 份 BBI 血清转换盘的结果显示本试剂对 HBV 早期感染的检测性能在 BBI 公布的官方数据中仅次于 Prism。同时, 本试剂对 22 份从全国各地搜集的包括我国流行的各型 HBV 野生株及常见表面抗原突变株的血清标本检测性能最佳。临床灵敏度方面, 本试剂对 282 份 HBsAg 确认阳性 (纸条初筛阴性) 的无症状携带者标本的检出率为 97.52% (95%CI: 94.95%~99.00%), 与 Hepanostika Ultra, Murex V3, Architect i2000SR 相当而显著优于 AxSYM V2 及某国产 EIA 试剂。卫生部临检中心 08 年督导盘的结果也显示本试剂的性能显著优于国内同类产品。三家临床单位的临床研究结果显示: 本试剂的临床检测性能与目前临床上主流的 Architect 试剂具有等效性。上述结果显示本试剂具有良好的检测性能, 能够满足乙肝防治的需要。

关键词: HBsAg; 诊断试剂; 乙肝的防治

## Abstract

China is a high-endemic area of HBV in which there are many AsCs with low viral load and newly infected persons in the window phase who are the main source of transfusion-transmitted HBV. Consequently, HBsAg assays with higher sensitivity need to be developed to overcome this problem. Meanwhile, such a vast number of infected individuals are reservoirs of HBV mutants. Moreover, under the influence of vaccination and antiviral therapy, HBsAg mutations, especially mutations within “a” determinant can emerge faster. Since traditional HBsAg assays were based on antibodies targeting “a” determinant and therefore had deficiencies in detecting mutants in this region. What’s worse, part of these mutants could not be protected by currently used vaccines. So the deficiencies would cause clinically diagnostic escape and bring great threats to the blood safety. Fortunately, some newly developed HBsAg assays from Europe and USA can detect some of the HBsAg mutants. However, their capacities for detecting HBsAg mutants are far from satisfactory. Also, NAT is expensive and has complicated and troublesome procedures, which makes its use in clinic diagnosis and blood screening unsuitable. The purpose of this research is to develop a high-sensitive and broad-spectrum HBsAg assay which can detect all prevalent HBsAg mutants. Also, extensive evaluation work will be done.

A molecular epidemiology survey has been conducted to identify prevalent HBsAg mutants in blood donors of Xiamen for two years. Also, extensive screening work has been done at some clinical units of Beijing, Wuhan, Guangzhou and Xian, in which dozens of samples of HBsAg mutations were collected. In these research, prevalent HBsAg mutations were summarized and underlying laws of mutation were inferred. Based on a well developed strategy for constructing 1.3 ploid omni-genetic HBV, the 1.3 ploid omni-genetic clones of HBV of many genotypes (such as genotype A, B, C, D, G and so on) and HBV strains including mutations in HBsAg region (such as G145R, C124Y, C138R, T140I, K141E and so on) were constructed and recombinant virions were obtained. Meanwhile, various recombinant native and mutant HBsAg proteins which included all prevalent mutations within the “a” determinant were obtained from the Baculovirus Expression System. These initial researches have laid a solid foundation for the development of the diagnostic kit.

Finally, nearly 300 monoclonal antibodies (mAbs) with high reactivity to HBsAg

mutant HBV were raised against these virions and proteins. Then, preliminary screening (based on linear immunoassay) and characterizing work were accomplished. On the basis of these research, 4 mAbs (WTS, 6C10, 42B6 and 15D1) were chose. Using these mAbs, together with a goat anti-HBsAg-HRP, a high-sensitive and broad-spectrum HBsAg assay was developed and then evaluated. Evaluation results indicate that its analytical sensitivity is 0.012 IU/mL for native HBsAg standard, which is 4 to 16 times higher than those of five imported assays. Analytical sensitivities for other 7 positive standards are less than 0.05IU/mL (3 of them belongs to 3 serotypes and the remaining 4 are common HBsAg mutants); its speciality is 99.81% (95%CI: 99.57%~99.93%). The results obtained with 8 seroconversion panels from BBI showed that this assay is second only to prism in all assays which tested these panels and published their data to BBI. The performance of the prototype assay is best in testing a sera panel comprising 22 samples which cover all prevalent HBV serotypes and genotypes in China and includes common HBsAg mutants. And the clinical sensitivity is 97.52% (275/282, 95%CI: 94.95%~99.00%) for 282 confirmed HBsAg positive samples (all samples tested negative by rapid test) collected from asymptomatic donors, which is comparable to Hepanostika Ultra, Murex V3, Architect i2000SR and is significantly higher than AxSYM V2 and a homemade EIA. The results obtained with the instructing panel of NCCL further confirmed that the performance of this assay is greatly better than that of similar homemade assays. Finally, results of clinic trial conducted in 3 clinical units concluded that this assay is equivalent to Architect for clinical application. These results suggest that this assay is desirable for the prevention and threpy of HBV.

Keywords: HBsAg; Diagnosis; Prevention and Therapy of HB

## 目 录

摘要.....	I
Abstract .....	III
<b>第一章 前 言.....</b>	<b>1</b>
<b>一、 HBV 的生物学特性 .....</b>	<b>3</b>
1. HBV 的病毒结构和基因组结构.....	3
2. HBV 的复制及生活史.....	9
3. HBV 的分子进化学及变异性.....	10
<b>二、 HBV 的实验室诊断 .....</b>	<b>12</b>
1. HBV 的免疫学诊断.....	12
2. HBV 的分子诊断.....	19
<b>三、 HBV 输血残留风险、对策及本研究的意义 .....</b>	<b>21</b>
1. HBV 复制模型及检测窗口期.....	21
2. HBsAg 突变及隐匿性感染 .....	24
3. HBV 输血后传播的残留风险.....	26
4. 本研究的目的、思路和意义.....	26
<b>第二章 材料和方法 .....</b>	<b>28</b>
<b>一、 材料.....</b>	<b>28</b>
1. 主要仪器.....	28
2. 主要试剂与材料.....	29
3. 常用溶液和培养液的配制.....	30
<b>二、 方法 .....</b>	<b>35</b>
1. 抗 HBsAg 单抗的制备.....	35
2. 酶联免疫吸附法 (ELISA) 及化学发光酶联免疫分析 (CLEIA) ...	41
3. 单抗的性质鉴定及评估.....	43
4. 病毒 DNA 的提取及分区 PCR .....	45
5. 基因型及 HBsAg“a”表位突变分析 .....	46
6. 临床性能研究.....	47
<b>第三章 结果与分析 .....</b>	<b>49</b>
<b>一、 乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)抗体库的建立与鉴定 .....</b>	<b>49</b>
1. HBsAg 单抗的制备与初筛.....	49



2.	HBsAg 单抗的性质鉴定.....	50
<b>二、</b>	<b>广谱超敏 HBsAg 诊断试剂（化学发光法）的研制.....</b>	<b>55</b>
1.	化学发光检测技术.....	55
2.	配对单抗的确定.....	56
3.	检测体系的建立.....	57
<b>三、</b>	<b>广谱超敏 HBsAg 诊断试剂的初步评价与应用.....</b>	<b>67</b>
1.	特异性及临界值的确定.....	67
2.	试剂灵敏度.....	68
3.	临床研究.....	80
<b>第四章</b>	<b>讨论 .....</b>	<b>85</b>
<b>一、</b>	<b>广谱超敏乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂的研制 .....</b>	<b>85</b>
1.	抗-HBsAg 单克隆抗体的免疫和初筛策略 .....	85
2.	抗-HBsAg 单克隆抗体的性质鉴定 .....	85
3.	化学发光检测技术.....	87
4.	单抗原料的要求.....	87
<b>二、</b>	<b>广谱超敏乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂的性能评估及应用 .....</b>	<b>88</b>
1.	性能评估.....	88
2.	应用.....	88
<b>三、</b>	<b>未来的工作 .....</b>	<b>89</b>
1.	检测灵敏度.....	89
2.	检测的广谱性.....	90
<b>小结</b> .....	<b>.....</b>	<b>91</b>
<b>参考文献</b> .....	<b>.....</b>	<b>92</b>
<b>致谢</b> .....	<b>.....</b>	<b>99</b>
<b>附录</b> .....	<b>.....</b>	<b>100</b>

## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract in English .....</b>	<b>III</b>
<b>Chapter 1: Preface .....</b>	<b>1</b>
1.1 The biological properties of Hepatitis B Virus.....	3
1.2 Laboratory diagnosis of Hepatitis B Virus.....	12
1.3 Residual risk of transfusion-transmitted HBV & significance and content of this research .....	21
<b>Chapter2: Materials and Methods .....</b>	<b>28</b>
2.1 Instrument.....	28
2.2 Reagents and Supplies.....	29
2.3 Solvents and medium .....	31
2.4 Methods .....	35
<b>Chapter3: Results and Analysis.....</b>	<b>49</b>
3.1 Establishment and characterization of anti-HBsAg library.....	49
3.2 Development of this assay .....	55
3.3 Evaluation and application of the HBsAg assay .....	67
<b>Chapter4: Discussion.....</b>	<b>85</b>
4.1 Development of the high-sensitive and broad-spectrum HBsAg assay .....	85
4.2 Performance and application of the HBsAg assay .....	88
4.3 The next work .....	89
<b>Summary.....</b>	<b>91</b>
<b>References.....</b>	<b>92</b>
<b>Acknowledgement .....</b>	<b>99</b>
<b>Appendix.....</b>	<b>100</b>

---

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 第一章 前言

乙型肝炎病毒 (Hepatitis B Virus) 感染已成为世界范围内共同而且重要的公共卫生问题。临床以肝功能异常为主要特征并且伴多样性的临床表现。目前全世界共有 20 亿人曾感染 HBV<sup>[1-2]</sup>, 3.5~4 亿慢性 HBV 感染者, 约占全球人口的 6%; 在全世界现有 HBV 感染者中 75%~80% 在非洲, 亚洲和西太平洋地区 (图 1-1)。慢性 HBV 携带者中有相当一部分发展成为 CHB, 部分患者发展成为 HC, HCC 或非致癌性 HC 并发症(图 1-2), 每年因 HBV 感染而死亡的人数超过 110 万<sup>[3-5]</sup>。卫生部 2006 年公布全国乙型肝炎病毒流行病学调查的结果: 全国 1~59 岁人群乙肝表面抗原携带率为 7.18%, 比 1992 年的 9.75% 降低了 26.36%。城市、农村人群乙肝表面抗原携带率差异不显著, 西部地区人群乙肝表面抗原携带率高于东部地区。1~4 岁人群乙肝表面抗原携带率最低, 为 0.96%; 5~14 岁人群为 2.42%; 15~59 岁人群乙肝表面抗原携带率最高, 达 8.57% (图 1-3)。

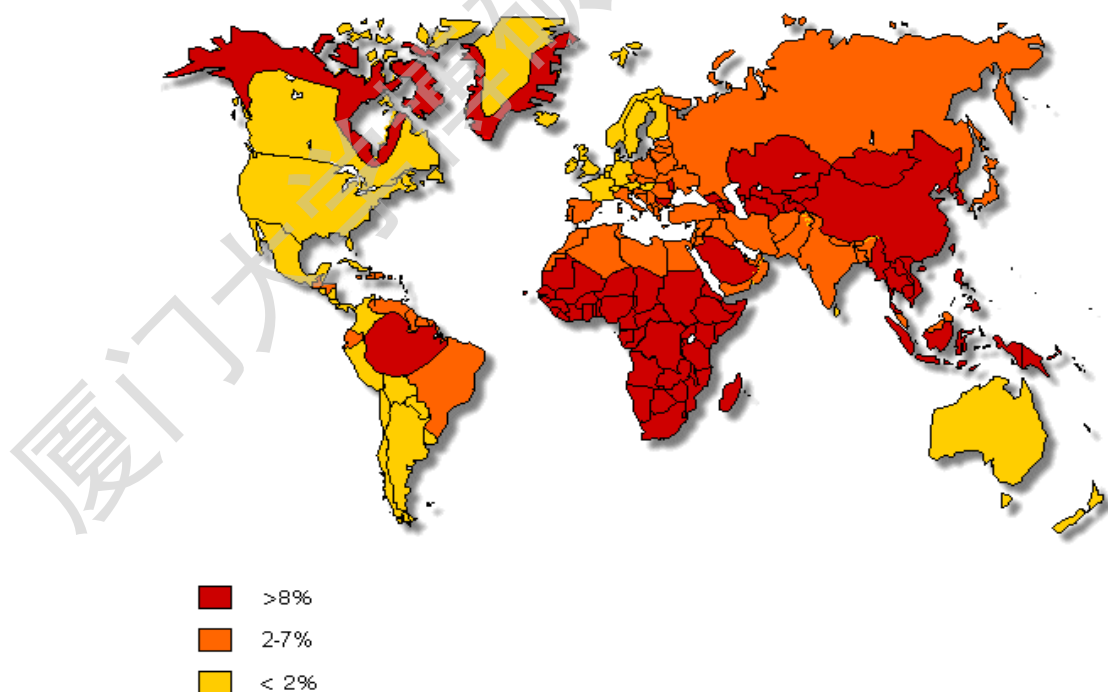


图1-1 HBV感染的全球分布情况  
Fig.1-1 Global distribution of HBV infection

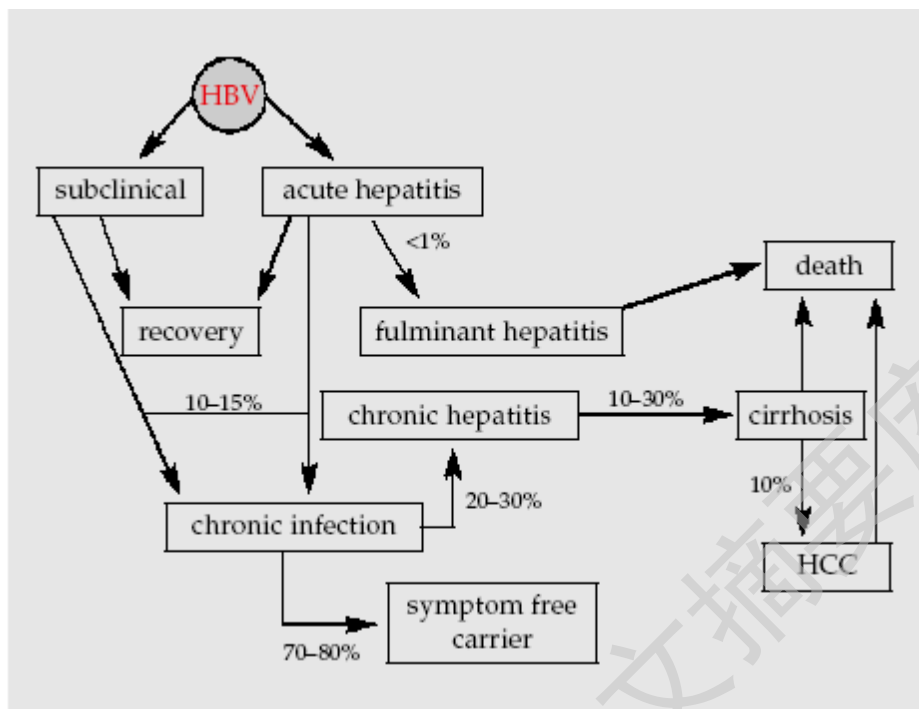


图1-2 感染HBV后可能诱发的危害  
Fig. 1-2 Possible outcomes of HBV infection

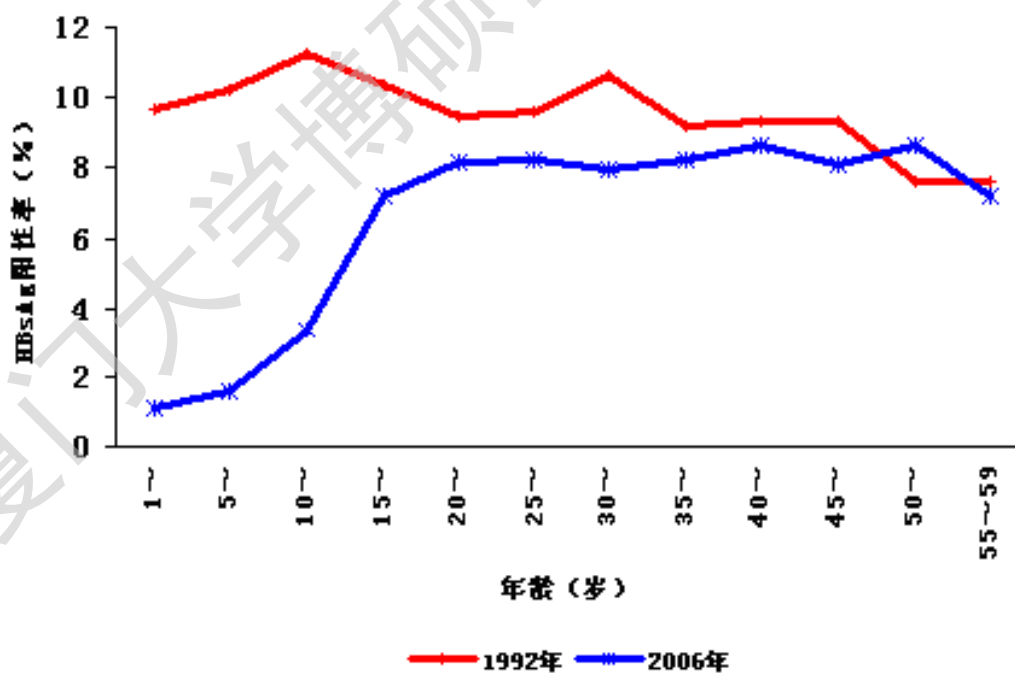


图1-3 中国各年龄人群血清HBsAg阳性率  
Fig.1-3 Distribution of carrying ratio of HBsAg in people of different age

## 一、 HBV的生物学特性

### 1. HBV的病毒结构和基因组结构

HBV (Hepatitis B virus) 属嗜肝 DNA 病毒科 (hepadna viridae) 不完全双链 DNA 病毒, 其复制过程需经细胞内核糖核酸中间体 (RNA intermediate) 而与逆转录相关, 是一种逆转录病毒。(表 1-1)

表 1-1 乙型肝炎病毒的病毒学特点<sup>[3]</sup>  
Table 1-1 Features of Hepatitis B virus

分子病毒学特点	HBV(Dane particle)
结构	42nm; 具包膜; 不完全 ds 基因组
分类	嗜肝型脱氧核糖核酸病毒科
感染受体	未知; 一般认为 preS1,preS2,sAg 协同
复制特点	通过 RNA 介导的逆转录复制方式
变异速度	低 (每年 1/10 万 base)
基因分型	8 种亚型, 8% 种间差异
是否整合入宿主基因组	是
病毒动力学	2-3days 的半衰期, 每天产生 10 亿到 100 亿个毒粒
理化性质	强抵抗能力, 30-32°C 至少存在 6months, -20°C 可存活 15years
宿主范围	仅限于人, 黑猩猩和恒河猴等高等灵长类动物
分布特点	A 型: 北欧和非洲; B 型和 C 型: 东亚; D 型: 中东, 北非, 南欧; E 型: 南非 <sup>[6]</sup> ; F 型: 中南美洲 <sup>[6-8]</sup> ; G: 法国, 北美 <sup>[9]</sup> ; H: 拉丁美洲北部, 中美洲, 墨西哥 <sup>[10]</sup>

#### 1.1 HBV 的颗粒结构

1965 年, Blumberg 等<sup>[11]</sup>发现“澳大利亚抗原”, 1970 年 Dane 等<sup>[12]</sup>在电镜下鉴定了 HBV 颗粒, 又称 Dane 颗粒。Dane 颗粒为双层壳的圆形颗粒, 直径约 42nm, 分核心及外壳两部分, 核心颗粒是直径约 27nm 的 20 面体。核心中含病毒基因组、病毒编码的多聚酶等, 其外是脂蛋白外膜。在一个典型的 HBV 感染者血液中, HBV 可能存在以下三种颗粒结构: Dane 颗粒 (具 LHBs, MHBs 和 SHBs, core particle, HBV-DNA); filamentous 颗粒 (具 LHBs, MHBs 和 SHBs); spherical 颗粒 (仅具有 MHBs 和 SHBs), 三者的大致摩尔比为  $10^8: 10^{10}: 10^{13}$ <sup>[13]</sup>。(图

1-4)

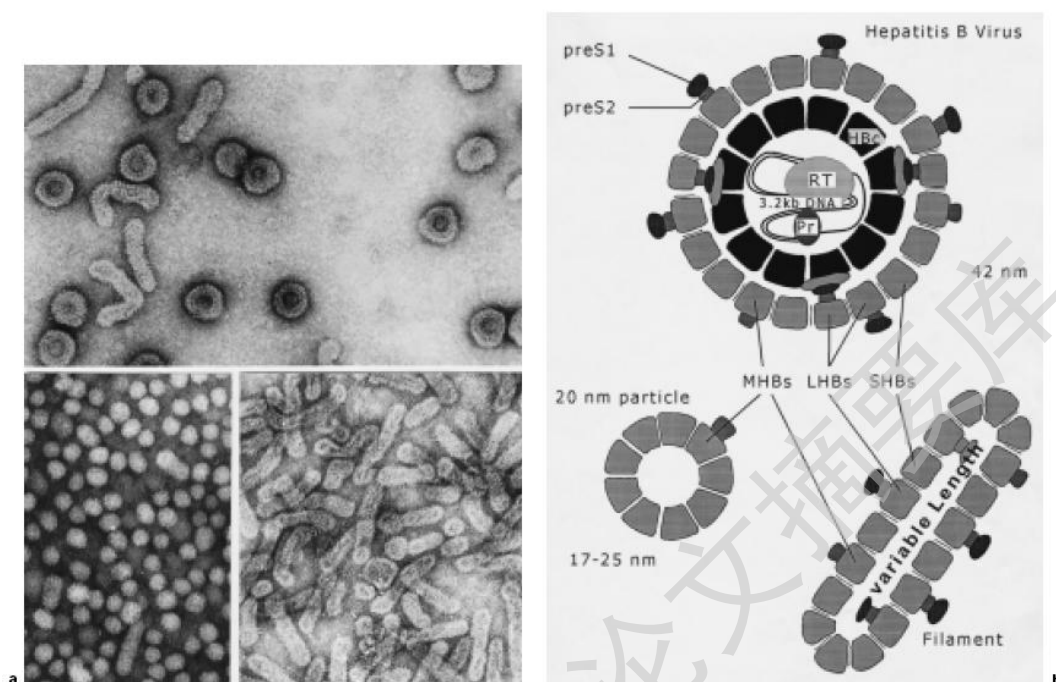


图1-4a: HBV颗粒 (Dane颗粒, 上), spherical颗粒 (左下), filamentous颗粒 (右下) 的电镜照片。b: HBV颗粒 (Dane颗粒, 上), spherical颗粒 (左下), filamentous颗粒 (右下) 的模式图

**Fig.1-4a: Electron micrograph (negative contrast) of hepatitis B virus particles (top), filamentous (bottom, right) and spherical (bottom, left) HBsAg particles. b: Model representation of the particle structure and the viral surface proteins (LHBs, MHBs, SHBs) with the S, PreS1 and PreS2 domains. Inside the virus particle can be found the core protein (HBC), the viral DNA and the virus-coded polymerase with reverse transcriptase (RT) and protein primer (PR) domains.**

## 1.2 HBV 的基因组结构

HBV 是已知最小的真核细胞 DNA 病毒之一, 基因组为一全长约 3.2kb (3182~3221) 的小环形 DNA。HBV DNA 双链长度不对称, 单链部分占全长的 15~50%, 全长的负链与病毒 mRNA 互补; 正链仅 5' 末端固定, 长度约 1700-2600nt。HBV 颗粒核心内含有 DNA 聚合酶 (DNAP/逆转录酶), 以负链 DNA 为模板, 将正链 DNA 3' 末端延长而成为完全的 dsDNA。环状结构由负链和正链的附着末端 (约 224bp) 维持, 其两侧存在 11bp 正向重复序列 (DR1 和 DR2)。此重复序列与 HBV-DNA 的复制及与宿主 DNA 的整合相关。负链 DNA 从 DR1 内开始, 5' 末端与 5' 末端结合蛋白以共价键结合, 3' 末端有长约 5~8bp 的冗余序列并与 5'

末端形成末端重复。正链 DNA 5' 末端有帽子结构 (cap sequence) 18bpRNA 以共价键结合, 而形成 DR2。正链 DNA 3' 末端则结合 DNAP。

HBV-DNA 共有 4 个 ORF, 即: S ORF; P ORF; C ORF; X ORF<sup>[14-15]</sup>。四种 ORF 分别有各自的启动子, S ORF 分别编码三个包膜蛋白: LHBs (preS1+preS2+S)、MHBs (preS2+S) 和 SHBs (S)。C ORF 分为 C 基因和前 C 区 (preC), 各有起始密码 ATG, 该段最为保守, 是免疫攻击的 CTL 靶表位主要所在, 其变异易引起乙肝病毒的持续感染。P ORF 编码 HBV-DNA 聚合酶等, 几乎参与病毒复制的全过程。X 基因产物是一种重要的反式调节因子, 具有转录激活功能, 其在病毒生命周期中的功能尚未充分阐明。HBx 蛋白可以激活细胞的原癌基因和改变细胞的生长特性, 可能与肝细胞癌的发生有关<sup>[16-18]</sup>。在 X 基因和 C 基因的启动子上游, 有增强子 Enh I 和 Enh II, S 区基因存在糖皮质激素应答元件 (GRE), 糖皮质激素与其受体结合, 可促进转录活性。(图 1-5)

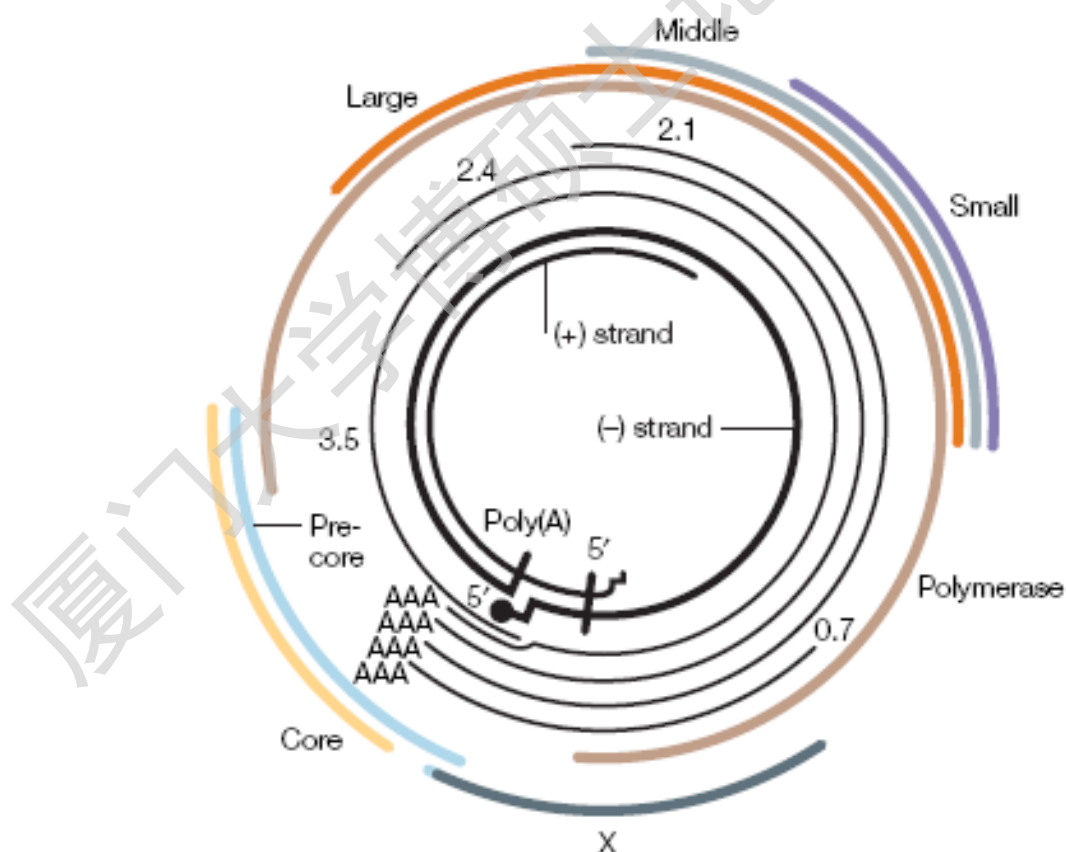


图 1-5 乙肝病毒的基因组结构<sup>[5]</sup>  
Fig.1-5 The genome structure of HBV



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库