View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Xiamen University Institutional Repository

学校编码：10384　　分类号_____密级_____
学　　号：21620110153957　　UDC_____

厦门大学

博　士　学　位　论　文

新型 HBV 基因型快速免疫检测试剂的发展及 Anti-HBc 定量水平临床意义的研究

Development of a novel fast immunoassay for HBV genotyping and study on the clinical significance of the quantitative hepatitis B core antibody level

宋浏伟

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：2015 年　　月　　日
论文答辩时间：2015 年　　月　　日
学位授予日期：2015 年　　月　　日

答辩委员会主席：郑英杰　教授
评　　阅　　人：_____

2015 年　　月

厦门大学博硕士论文摘要库

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（　　）课题（组）的研究成果，获得（　　）课题（组）经费或实验室的资助，在（　　）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）：

年　　月　　日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学博硕士论文摘要库

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）：

年　　月　　日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学博硕士论文摘要库

目录

摘要 I

Abstract IV

缩略词 VIII

第一章 前言 1

1.1 乙型肝炎病毒病原学 1

1.1.1 HBV 病毒结构 1
1.1.2 HBV 病毒基因组及编码蛋白 2
1.1.3 HBV 生命周期 3

1.2 乙型肝炎病毒感染 5

1.2.1 乙型肝炎病毒感染的流行病学 5
1.2.2 慢性乙型肝炎自然史 7
1.2.3 慢性乙型肝炎临床诊断 9
1.2.4 慢性乙型肝炎临床治疗 13

1.3 乙型肝炎病毒基因型 16

1.3.1 HBV 基因型 16
1.3.2 HBV 基因型临床意义 18
1.3.3 HBV 基因型检测方法 23

1.4 乙型肝炎病毒核心抗体定量检测 26

1.4.1 Anti-HBc 检测方法 26
1.4.2 Anti-HBc 定量临床意义 28

1.5 本论文的研究目的、意义和思路 31

第二章 材料与方法 34

2.1 研究中用到的主要仪器 34

2.2 菌株、质粒、细胞株及实验动物 35

2.3 分子及细胞生物学实验用常规试剂 36

2.4 诊断用免疫及核酸检测试剂 37

2.5 实验用溶液及培养基配制 38

厦门大学博硕士论文摘要库

2.6 常规分子生物学及细胞生物学实验方法 41

2.7 常规免疫实验操作 42

2.8 HBV 基因片段的扩增和序列测定.....47

2.9 荧光免疫检测试纸的制备 50

2.10 Anti-HBc 水平的定量方法.....51

2.11 临床标本和队列.....52

第三章 结果与分析 55

第一部分 乙型肝炎病毒基因型快速免疫检测试剂的研究. . . 55

3.1 HBV 各基因型外膜蛋白差异分析.....55

3.2 HBV 基因型特异抗体的研制.....58

3.2.1 HBV PreS 融合蛋白免疫与筛选.....58
3.2.2 HBV 各基因型 PreS1 和 PreS2 特殊片段 C149 载体展示 59
3.2.3 HBV 基因型特异性单克隆抗体筛选 61
3.2.4 基因型特异抗体评价.....63

3.3 HBV 基因型免疫快速分型试剂的构建.....67

3.3.1 荧光层析纸条构建.....67
3.3.2 HBV 基因分型扫描式荧光检测仪 69

3.4 HBV 基因型免疫快速分型试剂的评价.....71

3.4.1 分析灵敏度评价.....71
3.4.2 临床标本评价.....74
3.4.3. HBV DNA 阴性标本 76
3.4.4 HBsAg 阳性自然人群标本评价.....79
3.4.5 试剂稳定性评价.....81

3.5 HBV 基因型免疫快速分型试剂的临床应用.....82

3.5.1 干扰素治疗队列.....82
3.5.2 东台地区 HBsAg 阳性自然人群流行病学调查.....84

第二部分 乙型肝炎病毒核心抗体定量水平临床意义研究. . . 86

3.6 基线 Anti-HBc 定量预测长效干扰素治疗应答 86

3.6.1 队列基本特征.....86

厦门大学博硕士论文摘要库

3.6.2 基线 Anti-HBc 定量预测治疗应答.....91
3.7 Anti-HBc 定量：HBV 导致肝脏疾病的特异指标.....99
3.8 全自动化学发光 Anti-HBc 定量试剂的研制.....106
第四章 讨论 109
4.1 类病毒颗粒表位展示用于特殊单克隆抗体的研制.....109
4.2 新型 HBV 基因分型方法.....110
4.3 治疗前 Anti-HBc 定量是预测慢乙肝患者治疗应答的一个新指标.....113
4.4 Anti-HBc 定量是 HBV 引起肝脏疾病的特异性指标.....115
4.5 抗病毒治疗过程中 Anti-HBc 水平的动力学变化.....116
第五章 结论与展望 118
参考文献 121
在校期间科研成果 144
致谢 147

厦门大学博硕士论文摘要库

Table of contents

Abstract in Chineses. I

Abstract in English. IV

Abbreviations VIII

Chapter 1 Preface. 1

1.1 Virology of hepatitis B virus.....1

1.1.1 Structure of HBV 1
1.1.2 Genome and proteins of HBV.....2
1.1.3 Life cycle of HBV.....3

1.2 Hepatitis B virus infection 5

1.2.1 Epidemiology of hepatitis B infection 5
1.2.2 Natural history of chronic hepatitis B infection.....7
1.2.3 Clinical diagnostic of chronic hepatitis B 9
1.2.4 Clinical therapy of chronic hepatitis B 13

1.3 Hepatitis B virus genotype.....16

1.3.1 HBV genotype 16
1.3.2 Clincial significance of HBV genotype 18
1.3.3 Detection methods of HBV genotype 23

1.4 Anti-HBc quantification level.....26

1.4.1 Dection methods for Anti-HBc 26
1.4.2 Clinical significance of Anti-HBc quantification 28

1.5 Purpose and significance of the study 31

Chapter 2 Materials and methods. 34

2.1 Instruments.....34

2.2 E.coli strains, plasmids, cell lines and animals.....35

2.3 Reagents for routine molecular and cell biology experiments 36

2.4 Immnoassay and nucleic acid assay for diagnostics.....37

2.5 Solvents and medium.....38

厦门大学博硕士论文摘要库

2.6 Methods for routine molecular and cell biology experiments.....41

2.7 Methods for routine experiments of immunology.....42

2.8 Amplification and sequencing of HBV gene fragment 47

2.9 Preperation of the lateral-flow strips 50

2.10 Methods for Anti-HBc quantification.....51

2.11 Clinical samples and cohorts 52

Chapter 3 Results and analysis 55

Part A Study on novel fast immunoassay for HBV genotyping 55

3.1 Difference analysis of HBV membrane proteins with different genotype.....55

3.2 Development of HBV genotype specific monoclonal antibodies 58

3.2.1 HBV PreS fusion expression for immunization and screening 58
3.2.2 Special epitopes in HBV PreS1 and PreS2 protein displayed on C149 vector.....59
3.2.3 Screen of HBV genotype specific monoclonal antibodies.....61
3.2.4 Evaluation of HBV genotype specific monoclonal antibodies 63

3.3 Development of fast immunoassay for HBV genotyping 67

3.3.1 Development of lateral-flow immunoassay for HBV genotyping.....67
3.3.2 Scanning luminoscope for fast HBV genotyping 69

3.4 Evaluation of fast immunoassay for HBV genotyping.....71

3.4.1 Evaluation of the analytical sensitivity.....71
3.4.2 Clinical samples for evaluation.....74
3.4.3 HBV DNA negative samples 76
3.4.4 HBsAg carriers from general population.....79
3.4.5 Evalutaion of the stability.....81

3.5 Application of the fast immunoassay for HBV genotyping 82

3.5.1 Peg-IFN treatment cohort 82
3.5.2 Epidemiological study on HBsAg carriers in Dongtai area.....84

Part B Study on the clinical significance of Anti-HBc 86

厦门大学博硕士论文摘要库

3.6 Baseline Anti-HBc level predict treatment response in chronic hepatitis B patients receiving Peg-IFN 86

3.6.1 Cohort characteristics.....86

3.6.2 Baseline Anti-HBc level predict treatment response 91

3.7 Anti-HBc quantification level: A specific biomarker for HBV induced liver disease 99

3.8 Development of Anti-HBc quantification assay based on chemiluminesence magnetic particle method.....106

Chapter 4 Discussion 109

4.1 Virus like particles display epitopes for special mAbs development 109

4.2 Novel HBV genotyping method 110

4.3 Baseline Anti-HBc level is a novel predictor for chronic hepatitis B patients treatment response 113

4.4 Anti-HBc quantification level is a specific biomarker for HBV induced liver disease 115

4.5 Kinetics of Anti-HBc level during antiviral treatment 116

Chapter 5 Conclusions and perspectives. 118

Reference 121

Publications 144

Acknowlegement 147

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

乙型肝炎病毒（Hepatitis B virus, HBV）感染是一个严重的，世界范围内的公共卫生问题，可以导致肝炎，肝硬化（LC）和肝细胞癌（HCC），每年可以引起100万以上的人死亡。在HBV感染的临床诊断中，不同的HBV相关标志物指示了病毒产生，病毒多态性以及宿主免疫反应三个方面，从而全面了解HBV感染者的疾病状态，预测自然转归和治疗应答，监测疾病进展和治疗效果，对HBV感染者的管理和治疗起到关键的指导作用。目前在指示病毒产生的标志物方面，HBsAg，HBV DNA和HBeAg的检测手段相对成熟，商品化试剂检测性能优秀，已广泛应用于临床，然而指示病毒多态性的HBV基因型的检测受到方法学的限制难以在临床得到广泛的应用，另外，目前尚无有效反映宿主免疫应答强弱的指标，而本课题组前期研究发现Anti-HBc定量水平可能是反映宿主免疫应答的一个新指标。因此，本文针对HBV感染临床诊断及监测领域这两个重要问题进行探讨，共由两部分研究组成。

其中第一部分主要发展一种新型HBV基因型快速检测试剂。乙型肝炎病毒根据其全基因组核苷酸序列的异质性大于8%可以分为A-H 8种基因型。HBV不同基因型呈现显著的地域分布特点，A/D型代表了欧洲、北美，B/C型代表了亚洲主要流行的病毒株。大量临床研究指出HBV基因型显著影响感染者自然史，肝脏疾病进展以及抗病毒治疗应答，其在指导HBV感染者的管理和临床治疗中具有重要的意义和价值。然而，目前HBV基因型常用检测方法均基于核酸检测，包括测序，核酸杂交，基因芯片，RFLP等，均需要进行核酸的提取和扩增，检测步骤复杂，时间消耗多，仪器和实验条件要求高，因此在临床上难以推广应用。

本研究通过表位展示HBV core颗粒免疫的方式，研制出四株HBV基因型特异性单克隆抗体2B2，16D12，6H3和3E6，由这4株单克隆抗体所组成的反应谱可以有效区分HBV A/B/C/D四种基因型。利用上述研制的四株单抗构建了含有6条检测带的荧光免疫层析快速检测试剂（GT-LFIA），A/B/C/D四种基因型病毒可以根据在该试剂中不同的反应谱而区分，本研究同时研制出配套扫描式荧光检测仪，可以根据各检测线位置荧光峰值和内置计算流程自动判定检测结果。该

厦门大学博硕士论文摘要库

试剂可以在一步加样后 20 分钟得到检测结果。随后对该试剂进行全面的评价。GT-LFIA 可以区分 A/B/C/D 四种基因型，试剂分析灵敏度为 2.5-10 IU/mL。以直接测序为对照，该试剂检测 456 例临床标本总体分型成功率，分型准确率以及检测一致性分别为 96.27%（94.10-97.81）, 99.54%（98.36-99.94）, 以及 95.83%（93.57-97.47）。在 21 例接受核苷类似物治疗的临床慢乙肝患者中，在随访过程中 HBV DNA 阴性的标本无法使用传统方法获得基因型结果，而 GT-LFIA 试剂可以成功分型，并且结果与病人基线标本使用测序或者 GT-LFIA 检测结果一致。另外，在来自一般人群筛选出 HBsAg 阳性的 324 份标本中，GT-LFIA 检测出其中 271 份（83.6%; 95% CI, 79.2 – 87.5%），显著高于 s 区测序法 213 份（65.7%; 95% CI, 60.3 – 70.9%）（p<0.001）。两种方法的符合率为 98.0% (95% CI, 94.9 – 99.2%)。当 HBV DNA < 10 IU/mL 或者为 10-1000 IU/mL 时，GT-LFIA 分型率显著高于测序分型（53.5% vs 2.3%, p<0.001; 85.3% vs 70.6%, p<0.001）。

综上所述，本研究发展了一种新型快速 HBV 基因分型试剂，可以一步操作，20 分钟得到检测结果，相比目前常用的 HBV 基因分型方法，大大简化了操作步骤，同时大大缩短了检测时间，而且不需要依赖大型贵重仪器，对于操作者也没有高的技术要求，适合临床推广应用，大规模流行病学调查，以及在发展中和资源缺乏的国家和地区使用，具有广阔的应用前景。

本论文第二部分主要研究乙型肝炎病毒核心抗体定量水平的临床意义。乙型肝炎病毒核心抗体（Antibody against hepatitis B core protein, Anti-HBc）是五个经典 HBV 血清学指标之一，在 HBV 感染早期即可在血清中检测到，常持续存在终身。一直以来，Anti-HBc 定性检测是判断个体是否曾被 HBV 感染的重要指标。但是目前对于 Anti-HBc 定量（qAnti-HBc）检测临床意义的认识很少。本课题组前期研究发现 qAnti-HBc 水平在 HBV 感染不同阶段变化显著，其水平与肝炎状态呈显著正相关，可能是宿主免疫应答强弱的新指标，并且小样本研究发现基线 qAnti-HBc 水平可以预测慢乙肝病人接受阿德福韦酯或者长效干扰素的抗病毒治疗应答效果。因此，本研究进一步验证和研究了 qAnti-HBc 水平的临床意义。

140 例来自全国多中心的 HBeAg 阳性慢乙肝病人，接受 48 周 PEG-IFN 治疗后停药随访 24 周。基线 qAnti-HBc 与反映宿主免疫状态的指标 ALT（R=0.28，

厦门大学博硕士论文摘要库

p<0.001）和 AST（R=0.36，p<0.001）呈现显著正相关，而与反应病毒水平的指标 HBsAg（R=-0.19，p=0.025）和 HBV DNA（R=-0.25，p=0.003）呈现显著负相关。治疗过程中，qAnti-HBc 是唯一可以同时独立预测血清学应答[SR（1 log10 IU/mL increment, OR, 5.732, 95% CI, 1.584-20.743, p=0.008）], 病毒学应答[VR（OR, 6.009, 95% CI, 1.544-23.378, p=0.010）]和联合应答[CR（OR, 4.56, 95% CI, 1.29-16.19, p=0.019）]的基线指标。以 30,000 IU/mL 为 cutoff 值，基线 qAnti-HBc 水平高的病人有显著更高的 SR 率（46% vs 18.9%, RR, 2.44, 95% CI, 1.44-4.11, p<0.001)，VR 率（38% vs 13.3% , RR, 2.85, 95% CI, 1.51-5.38, p<0.01)和 CR 率（40% vs 14.4% , RR, 2.77, 95% CI, 1.51-5.08, p<0.01)。并且在治疗和随访过程中病毒学水平受到显著更强的抑制，ALT 复常率显著更高。另外，在来自 111 例慢乙肝感染者的 212 份标本中，包括非活动性 HBV 携带者（IC，免疫耐受期，低复制期和合并慢性丁型肝炎感染者），HBeAg 阳性和阴性慢乙肝患者（CHB），以及 HBeAg 阴性慢乙肝患者接受抗病毒治疗终点和随访终点时的标本。qAnti-HBc 水平在 IC 和抗病毒治疗后有持续应答的 HBeAg 阴性慢乙肝患者随访终点中显著低于 HBeAg 阳性和阴性慢乙肝患者（p<0.001）。使用 qAnti-HBc 可以有效区分 CHB 和 IC, （AUROC, 0.947, 95% CI 0.86-0.97, p<0.0001）；另外，使用 qAnti-HBc 同样可以有效区分持续应答的 HBeAg 阴性慢乙肝患者与未治疗的 HBeAg 阴性慢乙肝患者（AUROC, 0.928, 95% CI 0.89-0.97, p<0.0001）。

综上所述，本研究在多中心大样本队列研究中进一步证明了基线 qAnti-HBc 水平可以有效预测慢乙肝病人接受 PEG-IFN 的治疗应答效果。另外，初步研究揭示了 qAnti-HBc 水平是 HBV 引起肝脏疾病的特异性指标，可以帮助判断 HBV 感染者的不同疾病阶段，是 HBV 慢性感染者管理的重要指标，同时也可能用于临床 HBV 慢性感染者合并其它肝脏疾病时的鉴别诊断。目前本研究已研制出 qAnti-HBc 全自动化学发光定量雏形试剂，具有重要的临床应用价值。

关键词：乙型肝炎病毒，隐匿性乙型肝炎病毒感染，慢性乙型肝炎病毒感染，乙型肝炎病毒核心抗体水平，治疗应答预测，E 抗原血清学转换，宿主免疫应答，单克隆抗体，侧向流免疫检测，基因型

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

The hepatitis B virus (HBV) is a serious, worldwide public health problem because HBV infection can cause hepatitis, liver cirrhosis (LC) and hepatocellular carcinoma (HCC), resulting in more than one million deaths annually. In the clinical diagnostic of HBV infection, different HBV related biomarkers reflect the production of virus, virus polymorphism, and the host immune response, in order to fully understand the disease status of HBV infection, predict natural progression and treatment response, monitor the disease progression and effection of therapy, therefore play an critical role in guiding management and threatment of HBV infection. Currently, the detection methods for biomarkers reflecting the production of virus, as HBsAg, HBV DNA and HBeAg are relatively mature, and the commercial assays are enough excellent to be widely applied. However, the detection of HBV genotype that reflect the virus polymorphism can not be applied widly because of the limitation of the detection methodology. In addition, currently, there is no effect biomarker for host immune response, and our previously study revealed that Anti-HBc quantification level is a potential new biomarker for host immune response. Therefore, in this thesis, we focused on the two important topics in the field of clinical diagnosis and monitoring of hepatitis B infection. The thesis was consist of two parts of study.

The first study was aimed to develop a novel fast HBV genotyping assay. HBV has been classified into 8 different genotypes (A–H) as determined by whole-genome sequence heterogeneity exceeding 8%. The different genotypes exhibit distinct geographic distribution characteristics, and the HBV genotypes A/D and B/C represent the predominant epidemic strains in Europe/North America and Asia. Evidence from clinical studies indicates that the HBV genotype significantly influences the natural history, liver disease progression and antiviral treatment response, and it is of great clinical significance in guiding management and clinical therapy of HBV carriers. However, the current techniques for HBV genotyping are mainly based on nucleic acid

厦门大学博硕士论文摘要库

tests (NATs) for genotype-specific sequences, including direct whole genome sequencing followed by phylogenetic analysis, reverse hybridization methods, restriction fragment polymorphisms, oligonucleotide microarray chips and real-time PCR. However, NAT-based techniques are expensive, time-consuming and inconvenient, given the requirement for a DNA extraction procedure.

In this study, with HBV core particle displayed epitopes for immunization, we developed four HBV genotype specific monoclonal antibodies (mAbs) 2B2, 16D12, 6H3 and 3E6. The reaction patteren of the four mAbs can effectively differentiate HBV genotype A/B/C/D. With the four mAbs, we further developed a fast fluorescent lateral-flow immunoassay (GT-LFIA) with six detection band. HBV genotype A/B/C/D can be differentiated according to the different reaction patteren. We also developed a matched scanning luminoscope for detection the position and intensity of fluorescent signal peak, and the genotyping results could be automatically presented according to a judgment flowchart constructed with software. The assay can present the genotyping result with a one-step operation and with 20 minuts. Then, the new assay was fully evaluated. The GT-LFIA assay can differentiate four genotypes including HBV A, B, C and D, and the analytical sensitivity were 2.5-10 IU/mL. Compared with direct sequencing, the genotype-differentiable rate, correct rate and concordance rate of the GT-LFIA assay were 96.27% (94.10-97.81), 99.54% (98.36-99.94) and 95.83% (93.57-97.47) in detecting 456 clinical samples. In the 21 patients receiving nucleos(t)ide analogue therapy, for end-of-treatment specimens that were HBV DNA undetectable and were not applicable for DNA-dependent genotyping, the GT-LFIA presented genotyping results that were consistent with those obtained in pretreatment specimens by viral genome sequencing and the GT-LFIA. In addition, in 324 samples from HBsAg positive carriers screened from general population, the GT-LFIA got 271 (83.6%; 95% CI, 79.2–87.5%) results and significantly more than 213 (65.7%; 95% CI, 60.3 – 70.9%) that was observed with s gene sequencing ($p<0.001$). The concordance rate of the two methods was 98.0% (95% CI, 94.9 – 99.2%), and the genotyping rate was siginicantly higher (53.5% vs 2.3%, $p<0.001$; 85.3% vs 70.6%, $p<0.001$) than sequencing in samples with HBV DNA < 10 IU/mL or in 10-1000 IU/mL.

厦门大学博硕士论文摘要库

Degree papers are in the “Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database”.

Fulltexts 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 for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库