

16-21

1999(3)

第7卷第1期
1992年3月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 7 No. 1
Mar. 1992

血源性 Dane 颗粒的多肽分析

郝连杰 郭林生 李方和 杨东亮 宋佩辉

(同济医科大学同济医院临床免疫研究室, 武汉 430030)

提 要

R373.21

采用 PAGE-Western Blot 技术对血源性 Dane 颗粒的多肽组份进行了分析。并结合 HBV 感染的其它血清学指标, 初步探讨了 HBV 感染者对这些多肽的抗体应答情况及意义。结果显示: Dane 颗粒在 PAGE 图谱上有 12 条多肽表型; Western Blot 证实除 S 区的 6 条多肽和来自 C 区的具有 cAg 和 eAg 两种抗原位点的同一多肽 P21 外, 还有与抗 Pol 结合的 P24-25 多肽以及与抗人免疫球蛋白结合的多肽 (P45-IgG, P76-IgM), 推测血源性 Dane 颗粒上可能存在有 Pol 基因表达的产物和结合在表面的人免疫球蛋白或相似的抗原决定簇。调查 29 例隐性 HBV 感染自限后人群和 185 例 HBV 现症感染者对这些多肽的应答情况发现: P24、P27、P39、P42 是引起免疫应答的多肽, 两组对它们的应答存在着差异 ($P < 0.01$)。表明对它们的有效应答可能有利于 HBV 感染的清除。

关键词: 乙肝病毒 病毒多肽 免疫应答 免疫转印技术 抗多肽抗体

血源性 Dane 颗粒抗原多肽在体内应答情况过去报道较少, 组成多肽及其基因来源和它们的意义尚不清楚。我们应用 PAGE-Western Blot 方法对该颗粒的多肽组份进行了分析, 并采用多种针对不同基因来源的多克隆和单克隆抗体对组成多肽进行免疫识别, 并结合 HBV 感染的其它血清学指标, 初步探讨了不同 HBV 感染者对这些多肽的抗体应答情况及意义, 现将结果简报如下。

材料与方 法

一、血源性 Dane 颗粒: 系卫生部武汉生物制品研究所采用四步超离心法从 HBsAg(+) 血浆中纯化而来。

二、抗体: HRP-马抗 HBs、HBc, B-马抗 HBs、HBe、HBc 血清 (武汉生物制品所); 兔抗 HBs (西德、Behring), 兔抗 HBc (丹麦 Dako), 兔抗 preS1 (西德 Shaller 教授); 兔抗 HBx, 兔抗 Pol (H. Will) [1]。单抗: 抗 HBs C20/02; 抗 PreS1 MA₁18/7; 抗 PreS₂ QI9/10 为西德 Gerlich 教授提供, 抗 HBx 227, 抗 Pol 335-2 为 H. Will 惠赠, 抗 E 为南京军区总医院提供; 单抗 A₁₁、A₆、WHBS₁ (抗 HBs), WHBE₁ (抗 HBe), WHBC₄ (抗 HBc) 腹水为武汉生物制品所林学颜先生提供。

三、HBV 感染者血清: 共收集单纯 HBsAg 携带者血清 20 份; 住院乙肝病人血清 165 份 (AH 34 例, CAH 69 例, CPH 11 例, LC 21 例, 肝癌 18 例, 重肝 12 例); HBV 隐性感染自限后人群血清 29 份, 合计 214 份, 诊断按 1984 年南宁会议标准 [2] 和 1979 年上海肝癌会议标准。

四、其它试剂: 低分子蛋白质分子量标准品为中国科学院上海生化所产品, ABC 试剂盒为

1990年11月26日收到, 1991年7月6日修回。

Vector公司出品, 羊抗人, 抗兔, 抗鼠为北京生物制品研究所产品。

五、SDS-PAGE-Western Blot 技术: SDS-PAGE 和转移电泳按 Laemmli^[3] 及 Towbin^[4] 的方法进行。Western Blot 的基本步骤为: 将转印有 HBV 多肽的硝酸纤维素膜 (NC) 与适当稀释的一抗/血清温育, 洗涤后加相应的酶标二抗反应, 洗涤后置 DAB-H₂O₂ 底物液内显色, 出现棕黄色条带者为阳性。

六、分子量测定: 将低分子量蛋白质标准品按要求处理, 与待检样品一同电泳和/或转印, 染色。以蛋白质标准品分子量的对数对其相对迁移率作标准曲线, 然后根据阳性条带的相对迁移率, 从标准曲线上查出其分子量数值。

结 果

一、不同结果的方法学原因

1. 分析16组不同样品处理发现, 单纯的去垢剂或单纯的蛋白酶组结果表现为条带少, 前者条带的分子量高, 后者分子量低, 不含蛋白酶的 2-ME 各组条带多, 分子量范

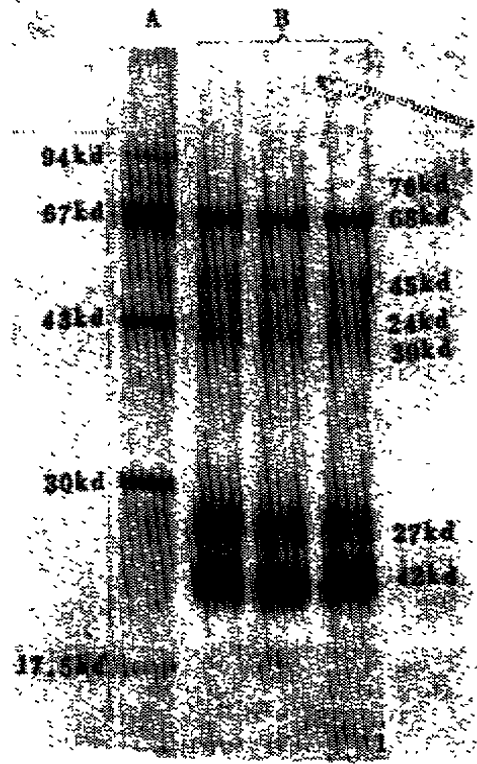


图1 Dane颗粒PAGE电泳后银染色结果
A: 为低分子量标准蛋白条带。
B: 为Dane颗粒PAGE后的显色条带

Fig.1 The staining results of polypeptides derived from Dane Particles by silver staining
The lanes of A, B and C were the polypeptic phenotype of Dane particles separated by SDS-PAGE, lane D was the markers of low molecular weight proteins.

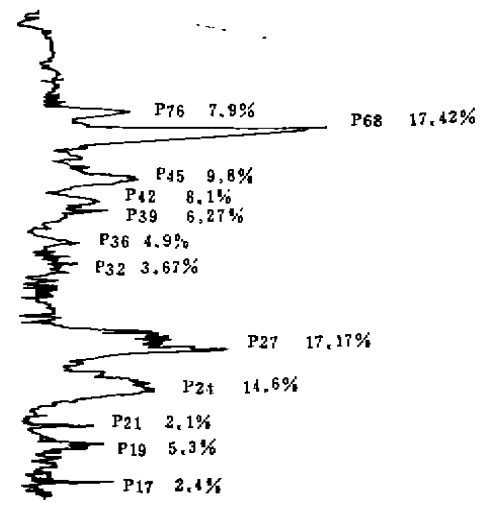


图2 Dane颗粒结构多肽的扫描结果

Fig.2 The map of constitutive polypeptides of Dane Particles by thin-layer scanner(CS-910)

围广；

2. 16组不同浓度 2-ME 在不同作用条件下的结果提示：随着 2-ME 增加，处理条件（温度）增强时，（5% 2-ME, 100℃ 5'），部分高分子条带消失，识别效果增强；

3. 相同条件下不同浓度的抗原保护剂（蔗糖）对结果也有影响，浓度高者高分子条带多，低者高分子条带消失。表明结果差异的原因主要与选用的样品处理剂的性质和变性是否完全有关。因此，我们认为浓度为 2.5% SDS、5% 2-ME、10% 蔗糖、0.05% NP-40 100℃ 水浴 5 分钟为最佳样品处理条件。

二、血源性 Dane 颗粒的多肽组成图谱

采用 SDS-PAGE 及岛津 930 一薄层扫描仪对电泳纯度的血源性 Dane 颗粒的多肽组成进行了分析，发现 SDS-PAGE 银染凝胶上（图 1）和考马斯亮兰染色的扫描图谱上（图 2）均可见 12 条条带，分子量分别为 17、19、21、24、27、32、36、39、42、45、68、76kd。其中 P24、P27、P68 约占整个多肽的 60%、P32、P36 占 9%，P39、P42 占 14%，而百分含量低的主要为小分子多肽。

三、Dane 颗粒多肽的 Western Blot 识别

采用多种针对不同基因产物的单克隆和多克隆抗体识别发现（图 3），抗 HBs 在

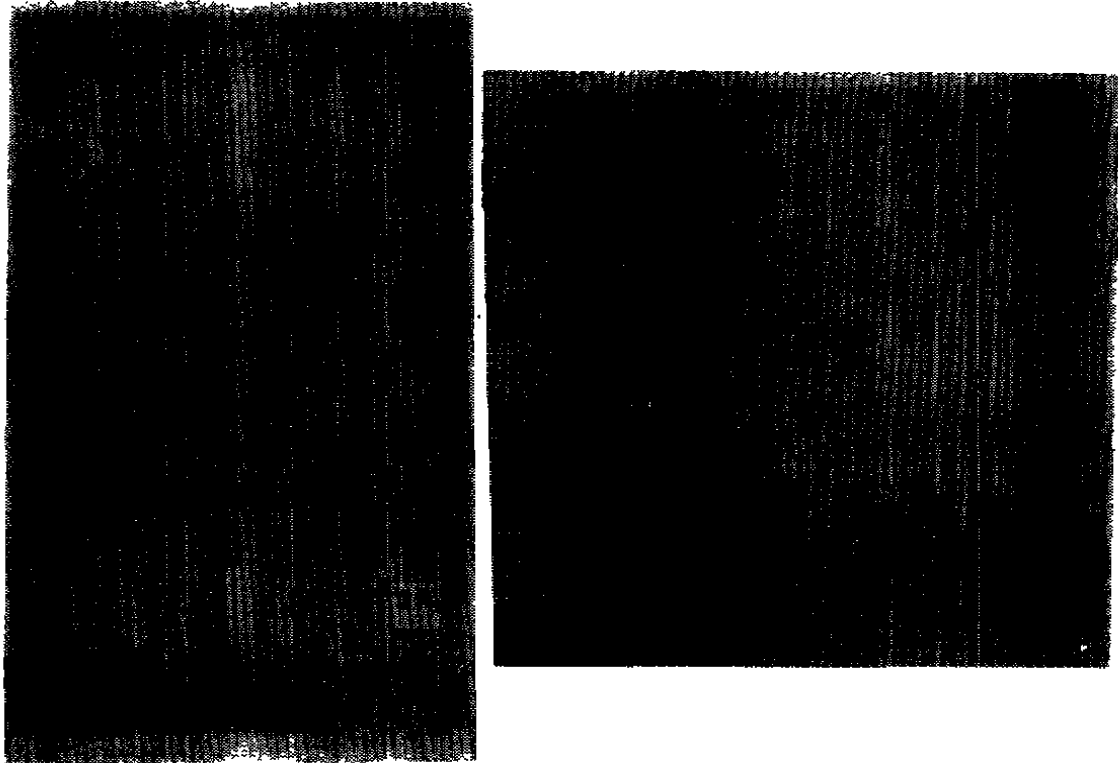


图 3 Dane 颗粒多肽 Western Blot 识别结果

A. 多克隆抗体识别结果 B. 单克隆抗体识别结果

Fig. 3 A. The blotting of polypeptides generated from Dane Particles by polyclonal antibodies against the different products of HBV genome
B. The blotting of polypeptides generated from Dane Particles by monoclonal antibodies against the different products of HBV genome

P₂₄、P₂₇、P₁₆、P₁₈、P₄₂处, 抗 pres₁ 在 P₃₉、P₄₂ 处, 抗 pres₂ 在 P₃₉、P₃₉、P₄₂ 处, 抗 HBc、抗 HBe 两者均可在 P₂₁ 处出现特异性阳性条带, 抗 Pol 在 P₂₄₋₂₅ 处出现一较宽的棕色条带。在单克隆抗体识别中, 仅针对 S 区不同结构域产物的单抗出现反应条带, 其它各株(包括其它抗 S 区产物的单抗)均为阴性反应, 延长反应时间在 P₄₈ 处出现一非特异的浅黄色条带。而抗人免疫球蛋白的抗体能与 P₇₆ (IgM)、P₄₅ (IgG) 结合呈色(图 4)。表明 Dane 颗粒上除 S 区多肽和来自 C 区的具有 cAg 和 eAg 两种抗原位点的



图 4 Dane 颗粒多肽与羊抗人免疫球蛋白反应的结果: A. 酶标羊抗人 IgG; B. 酶标羊抗人 IgM; C. 酶标羊抗兔 IgG; D. 酶标羊抗兔 IgM; E. 酶标羊抗鼠 IgG; F. 酶标羊抗鼠 IgM。

Fig. 4 The immune recognition of human components derived from Dane Particles

同一多肽 P₂₁ 处, 还具有 pol 区的产物多肽 P₂₄₋₂₅ 及与抗人 Ig 相结合的多肽 P₄₅、P₇₆。

四、不同 HBV 感染者对 Dane 多肽应答情况的调查, 我们调查了 214 例不同 HBV 感染者对 Dane 颗粒多肽的抗体应答, 结果见表 1。表明 HBV 感染者对 Dane 颗粒多肽产生有限的抗体应答, 两组对 P₂₄、P₂₇ 和 P₃₉、P₄₂ 多肽的应答差异有极显著性意义 (P < 0.01)。

表 1 不同 HBV 感染者对 Dane 颗粒多肽应答结果

Table 1 The results of antibody response ability to polypeptides derived from Dane particles by different HBV infected subjects

多 肽 Polypeptides	现症组 HBV infecting patients		自限后组 Healthy persons following latent HBV infection	
	受检数 Detective No.	阳性数 positive No.	受检数 Detective No.	阳性数 positive No.
P ₂₄ P ₂₇	185	5	29	7 P=0.0000
P ₃₉ P ₄₂	185	2	29	5 P=0.00057
P ₆₃	185	2	29	0 P=1.000

天

讨 论

用 Western Blot 技术分析病毒抗原性多肽具有特异性强、稳定性好以及能同时检测不同抗原亚基抗体等特点⁽⁶⁾。我们的实验也证明了这一点。分析样品处理对结果的影响发现：选用的样品处理剂的性质和样品处理是否完全是造成结果差异的主要原因。蛋白酶能破坏蛋白质的一级结构，单纯的去垢剂又不能解除链间二硫键⁽⁴⁾。因此，采用 2-ME（二巯基乙醇）配以相应的去垢剂才能满足上述要求。进一步研究证实，2-ME 的浓度、处理条件和抗原保护剂的含量都与样品处理程度有关。因此，我们推荐终浓度为 2.5% SDS、5% 2-ME、0.05% NP40、10% 蔗糖、100℃ 5 分钟水浴为较理想的样品处理条件。

血源性 Dane 颗粒在 PAGE 图谱和扫描图谱上均有 12 条多肽表型，P₂₄P₂₇P₆₈ 含量较高，表明它们为 HBV 的主要多肽成分，preS₁ 和 preS₂ 分别占整个多肽的 14% 和 9%，同 Gerber 最近描述的相应含量相一致⁽⁷⁾。有学者证实，pres 蛋白含量与 PHSA 受体含量呈正相关⁽⁸⁾，而 Gerber 则明确指出 pres 蛋白含量与感染颗粒的含量是一致的⁽⁷⁾。提示 Pres 蛋白含量可能代表了 HBV 的感染能力。

Western Blot 结果提示，P₂₄P₂₇，P₃₂P₃₈，P₃₉P₄₂ 在结构上密切相关，分别来源于 S 区的三个不同结构域即 S 区 pre S₂ + S 区，pres₁ + S₂ + S 区；P₂₁ 来源于 C 区，具有 cAg 和 eAg 两种抗原位点。P₂₄ 可能含有 pol 区的基因产物，当然这种结合不能排除 pol 与 S 基因的重叠而引起的交叉反应⁽¹⁾。此外 P₇₈P₄₅ 具有人免疫球蛋白相似的抗原性。这些多肽是以免疫复合物的形式结合到 Dane 颗粒表面上的，还是该颗粒固有的，尚不清楚。进一步对其研究将有利于阐明 HBV 的感染能力，免疫发病机理和慢性化过程。

部分抗体识别呈阴性反应表明了该方法的敏感性有限，我们用 LAB-ELISA 和 Western Blot 同时检测 214 例标本中的抗 HB_s 发现前者的检出率为 22.9%，后者为 5.6%，差别有极显著性意义，这可能与实验本身及固相因素的影响有关，另外，更主要的是与所选用抗体所针对的抗原位点特性、特别是构型依赖性位点有关⁽⁹⁾。因此，要客观评价 Western Blot 的敏感性，充分利用它的特异性稳定性等优点。

调查不同 HBV 感染者血清中针对 Dane 颗粒多肽的抗体发现。现症感染者同 HBV 隐性感染自限后人群对 P₃₀P₄₂，P₂₄P₂₇ 多肽的抗体应答存在着差异，这种差异实质上反映了机体对这些多肽的免疫应答能力。由于这两组病例刚好代表了 HBV 感染后两种不同的预后状态，因而认为机体对它的免疫应答状态与 HBV 感染的转归密切相关⁽¹¹⁾，推测对这组多肽的有效应答对于清除 HBV 感染，促进病情恢复起重要作用。

参 考 文 献

- [1] Will H, et al., 1986, *Science* 231: 594—596.
- [2] 病毒性肝炎防治方案, 1984, *中华内科杂志* 23: 312—314.
- [3] Luemmler UK, et al., 1970, *Nature*(London) 227: 680-685.
- [4] Towbin H, et al., 1979, *Pro Natl Acad Sci USA* 76(9): 4350-4354.
- [5] Towbin H, et al., 1984, *J Immunology Method* 72: 313—340.
- [6] 徐秀璋. 蛋白质顺序分析技术 科学技术出版社, 第44—54页.
- [7] Gerber MA, et al., 1989, *Hepatology* 9(2): 328—330.
- [8] Takahashi K et al., 1988, *J Immunol* 136(9): 3467—3472.
- [9] Swenson PD, et al., 1983, Antigenic analysis of HBsAg with McAb specific for s protein and pre-S sequence. In: Zuckerman AJ, ed. *Viral hepatitis and liver diseases* Alan R, Liss, Inc. 627—631.
- [10] Theilmann K, et al., 1987, *J Hepatol* 4: 22—28.

The Analysis of Antigenic Polypeptides of Dane Particles

Hao Lian-jie Guo Lin-sheng Li Fen-he

Yang Dong-liang Song Pei-hui

(Clinical Immunology Research Unit, Tongji Hospital, Tongji Medical
University, Wuhan 430030)

We have demonstrated the constitutive polypeptides (PP) of Dane particles employing SDS-PAGE Western Blot assay, investigated the antibody response ability to those PP in the HBV infected subjects in comparison with other HBV serum markers. The results suggest that there may be 12 bands in the PAGE-graph of Dane particles. The Western blot confirmed that 6 PPs (P_{24} P_{27} P_{32} P_{35} P_{39} P_{42}) derived from S-ORF and 1 (P_{21}) bearing core and e determinants was associated with C-ORF P_{24-25} could be visualized with rabbit anti-pol serum and P_{45} P_{76} visualized with only peroxidase-labelled goat anti-human IgG and IgM as probe respectively. This observation leads to speculation that P_{24-25} would possess some epitopes of Pol protein, P_{45} P_{76} would express a similar epitopes to human IgG and IgM. The prevalence of anti- P_{24} P_{27} P_{39} P_{42} was different between the group of health person following latent HBV infection and the HBV infected patients. It's the major PPs to induce immune response This implied that the effective immune response to those PPs may help to eliminate the hepatitis B virus.

Key words: Hepatitis B virus Antigenic polypeptides Immune response Western Blot Anti-polypeptides antibody