

## 牛血清中 27 kDa 蛋白的免疫学特性研究\*

邵先安, 沈 燕, 徐 薇, 王 纓, 胡新美, 熊思东\*\*

(复旦大学上海医学院免疫学系, 教育部分子医学重点实验室, 上海基因免疫与疫苗研究中心 上海 200032)

### Immunological Characteristics of a 27kDa Protein in the Bovine Sera

SHAO Xian-an, SHEN Yan, XU Wei, WANG Ying, HU Xin-mei, XIONG Si-dong\*\*

(Department of Immunology and Key Laboratory of Molecular Medicine of Ministry of Education, Shanghai Medical College, Fudan University; Center for Gene Immunization and Vaccine Research, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** To investigate the characteristics of an HBsAg-like protein in the bovine serum, SDS-PAGE and Western Blot were applied for identification of the molecular weight of this protein. A specific band with the molecular weight of 27kDa was detected in SDS-PAGE and Western Blot analyses. BALB/c mice were then immunized subcutaneously by using the 27kDa protein isolated by SDS-PAGE from bovine sera. Antibodies specifically reacted with HBsAg produced by HBV was detected in the serum derived from the mice immunized with the 27kDa protein. Thus, a 27kDa protein with antigenicity similar to HBsAg produced by HBV was found and characterized immunologically in bovine sera.

**Key words:** Bovine sera; Identification; HBsAg; Western Blot; Antigenicity

**摘要:** 为探讨牛血清中存在的 HBsAg 样蛋白的性质, 给 HBV 的发病机制、治疗、预防等研究提供依据, 我们采集 93 份牛血清, 以 SDS-PAGE、Western Blot 对血清中 HBsAg 样蛋白进行研究, 发现其分子量约为 27kDa; 以 SDS-PAGE 分离牛血清中的 HBsAg 样蛋白, 经皮下多点免疫小鼠, 可产生与人 HBV 编码蛋白 HBsAg 反应的抗体。表明该 27kDa 蛋白可能存在与 HBsAg 相似的免疫学特性。

**关键词:** 牛血清; 鉴定; HBsAg; Western Blot; 抗原性

中图分类号: R516.2

文章标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)01-0006-04

人乙型肝炎病毒 (*Hepatitis B virus*, HBV) 属嗜肝 DNA 病毒科, 是引起乙型病毒性肝炎的病原体。中国是乙型肝炎的高流行区, 全球近 50% 的 HBV 表面抗原携带者在中国, 60% 的中国人受过 HBV 感染, 8%~10% 为 HBsAg 携带者, 现患慢性乙型肝炎的病人约 1000 万人, 年发病率约 158/10 万。尤为严重的是, 原发性肝癌 (HCC) 中大约 80% 与 HBV 慢性感染相关, 受 HBV 慢性感染的人群患 HCC 的相对危险性至少增加 300 倍。

迄今, 乙型肝炎的治疗尚缺乏有效的手段, 主要原因之一是 HBV 的致病机制还不完全清楚。其他种属嗜肝病毒的发现和研究为 HBV 的致病机制

阐明提供了许多有益的资料。禽嗜肝病毒首先报道于北京鸭和其他种属鸭; 其他禽类嗜肝病毒也相继在灰苍鹭、罗斯鹅、雪鹅、白鹤等中被发现<sup>[1, 2]</sup>, 这些嗜肝 DNA 病毒具有和人 HBV 相似的复制周期和其他类似特点。同时, 不同种属嗜肝病毒的研究结果显示, 嗜肝病毒一般只感染其天然宿主或者亲缘关系较近的动物, 不同种属嗜肝病毒的编码基因和编码蛋白同源性较低, 一般很难有交叉反应。但国内零星报道称牛血清中可能存在一类可与抗人 HBV 表面抗原抗体 (anti-HBs) 反应的蛋白质<sup>[3]</sup>。我们前期研究也发现牛血清中存在与人 HBV 编码蛋白 HBsAg 的抗体反应的蛋白, 该蛋白具有家族聚集性。为进一步研究该蛋白的性质, 我们以

收稿日期: 2003-06-30, 修回日期: 2003-09-10

\* 基金项目: 国家杰出青年科学基金(39925031); 国家重点基础研究发展计划 (2001CB10006)

作者简介: 邵先安 (1971-), 男, 安徽霍邱籍, 医学硕士, 主要从事分子免疫研究

\*\* 通讯作者。Corresponding author. Tel: 021-54237362, E-mail: sdxiong@shmu.edu.cn

SDS-PAGE、Western Blot 分析其分子量; 在此基础上我们从牛血清中分离 HBsAg 样蛋白免疫小鼠, 观察相应的抗体的产生, 并对该抗体与人 HBV 编码的 HBsAg 反应性进行研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

HepG2.2.15 细胞 (ATCC 号: CRL-11997), 本室存用; 羊抗鼠 IgG-HRP (Southern Biotechnology), 检测 HBsAg 的 ELISA 试剂盒 (上海科华公司产品, 批号为 20011101); 胰蛋白酶 (Difco 公司); 1640 培养基 (Atlanta biologicals); 30% 聚丙烯酰胺-双丙烯酰胺 (Promega corporation); 纯化 HBsAg 蛋白 (北京肝炎所); Supersignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce 公司); Hoefer® TE70 蛋白电泳仪 (Amersham Pharmacia Biotech); Hoefer® TE70 转膜仪 (Amersham Pharmacia Biotech); Unico™ UV-2000 型 721 分光光度计; ELX800 型自动酶标仪 (Bio-Tech instrument Incln.)。

### 1.2 血清标本的采集

牛血清采自上海某乳业公司牧场的考克斯品系奶牛, 采用一次性无菌注射器经尾静脉采血 10mL, 分离血清后 -20°C 冰箱放置待用。

### 1.3 Western Blot

牛血清蛋白经 SDS-PAGE, 然后将蛋白转移至 PVDF 膜。用 5% 的脱脂牛奶封闭 1h, 以 PBS 洗膜三次, 干后按 200 $\mu$ L/cm<sup>2</sup> 滴加 1:500 稀释的抗-HBs 多克隆抗血清, 37°C 振荡孵育过夜; 取出膜漂洗三次, 干后按 200 $\mu$ L/cm<sup>2</sup> 加 1:1000 稀释兔抗鼠 IgG-HRP, 37°C 保温 2h。最后以新鲜配制的 DAB 液进行显色, 方法同 DOT-EIA<sup>[4]</sup>。

### 1.4 回收蛋白

采用割胶回收的方法收集 27kDa 蛋白<sup>[5]</sup>。SDS-PAGE 后, 割下含有目的蛋白的凝胶, 充分研磨, 加 PBS 液适量, 以纯化的 HBsAg 标准品做标准曲线, 用 ELISA 法检测 27kDa 蛋白的浓度。ELISA 检测按试剂盒说明操作 (同上)。最后调整终浓度至 200 $\mu$ g/mL。

### 1.5 制备抗体

羊毛脂: 石蜡油为 1:5 配成不完全弗氏佐剂, 加卡介苗 3-4 $\mu$ g/mL。抗原与佐剂之比为 1:1。每次注射量不超过 0.5mL。27kDa 蛋白浓度调节到 200 $\mu$ g/mL, 终浓度 100 $\mu$ g/mL, 分四处给小鼠皮下注射 50 $\mu$ L 免疫原乳剂, 5 周后加强免疫一次, 方法同前, 剂量减半。10d 后小鼠眼眶静脉采血, 每

两周经眼球采血一次, 检测抗体水平。小鼠分组情况: 100 $\mu$ g/mL 27kDa 蛋白实验组 (3 只小鼠)、弗氏佐剂+胶对照组 (2 只小鼠)。

### 1.6 ELISA 检测

用 pH9.6, 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液将 HBsAg 抗原稀释成 5 $\mu$ g/mL, 定量加到 96 孔塑料板上, 每孔 100 $\mu$ L, 洗涤液 (pH7.4 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液) 洗 4 次, 5% 的脱脂牛奶 37°C 封闭 1h。每孔加待测稀释血清 100 $\mu$ L, 于 37°C 作用 1h, 加 IgG-HRP 作用 1h 后滴加新配制底物液, 暗处反应 15min 后终止, 测定各孔 OD 值, 以 P/N 值大于 2.1 判为阳性。

### 1.7 DOT-EIA 检测

分别以 HepG2.2.15 细胞的分泌上清<sup>[6-7]</sup> (含 HBsAg) 和纯化的 HBsAg 点于膜上, 放于湿盒内 37°C 收干 1h, 以 PBS 漂洗、干燥后, 滴加待测的 27kDa 蛋白免疫小鼠血清, 37°C 作用 1h, 以 PBS 漂洗后加 1:5000 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP, 37°C 反应 1h, 显色扫描记录结果。

### 1.8 ECL-DOT-EIA 法检测

用临床患者乙肝标志物 HBsAg 阴性标本 34 例, HBsAg 阳性血清 20 例 (均经 Abbott 检测) 各 10 $\mu$ L 点于膜上, 以 DOT-EIA 检测, 方法同上, 所用一抗为待测的 27kDa 蛋白免疫小鼠血清; 最后以发光法显示阳性信号的存在。即在加完 IgG-HRP 后作用 1h, 经洗涤液漂洗、空气中自然干燥后, 加 1:1 配制的发光液, 并进行自显影。

### 1.9 统计学处理

独立样本 *t* 检验和  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

### 2.1 HBsAg 样蛋白的分子量分析

前期实验结果表明牛血清中存在与鼠抗人抗-HBs 抗体反应的蛋白。实验中, 我们不仅采用被国家 FDA 认证的上海科华公司三个批次的试剂进行了检测, 而且对部分牛血清用国际公认的 Abbott 方法进行了检测; 另外我们还采用了本室制备的抗-HBs 多克隆抗体进行了检测, 三种检测结果具有一致性。在 93 份牛血清中, 经 ELISA 检测 42 份阳性, 其 OD 值 0.105~1.402, P/N 值从 2.1 到 28.04, P/N 范围为 9.28 $\pm$ 7.50; 51 份阴性血清 OD 值 0~0.102, P/N 值从 0 到 2.09, P/N 范围为 1.19 $\pm$ 0.50。为进一步阐明该蛋白的生物学特性, 我们采用 SDS-PAGE 和 Western Blot (图 1) 研究显示该蛋白的分子量约为 27kDa, 与人 HBV 的 S 区基因所编码的糖基化蛋白 HBsAg 大小相似。

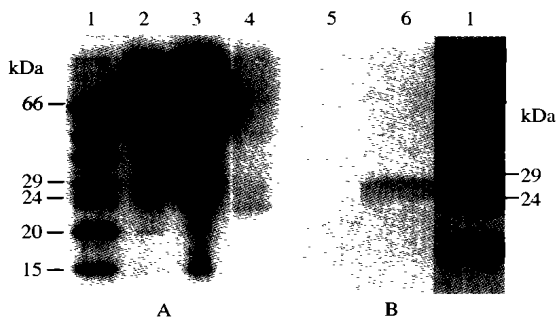


图 1 牛血清 SDS-PAGE(A)和 westernblot(B)分析

Fig.1 Analysis of bovine sera by SDS-PAGE (A) and Western-blot(B)

1,Protein molecular weight standard; 2, HBsAg-like protein negative sera; 3, HBsAg-like protein positive sera; 4,Purified HBsAg;5, HBsAg-like protein negative sera; 6, HBsAg-like protein positive sera.

2.2 27kDa 蛋白免疫小鼠产生抗-HBs 抗体

基于牛血清中存在的 HBsAg 样蛋白与人 HBV 的编码蛋白 HBsAg 具有相似的分子量, 且能与后者产生的抗体相结合, 为进一步深入研究该 27kDa 的免疫学特性, 我们以 SDS-PAGE 分离牛血清中的 27kDa 蛋白, 免疫小鼠后, 可检测到抗-HBs 抗体产生 (图 2), 且抗体维持时间不少于 18 周。

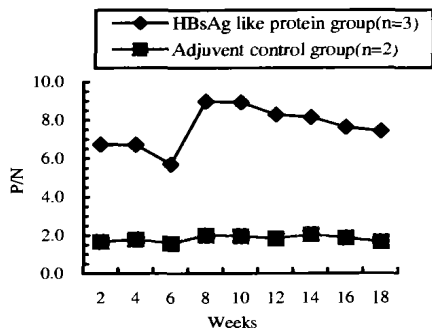


图 2 27kDa 蛋白免疫小鼠血清中抗-HBs 抗体的产生

Fig.2 Detection of anti-HBs in sera from 27kDa protein immunized mice

2.3 抗-HBs 抗体与纯化 HBsAg 及 HepG2.2.15 细胞分泌上清反应

鉴于以 27kDa 蛋白免疫 BALB/c 鼠能产生抗-HBs 抗体, 为进一步研究 27kDa 蛋白诱生的抗-HBs 抗体与 HBV 感染产生的 HBsAg 是否反应, 我们采用 DOT-EIA 对该抗体与纯化 HBsAg、HepG2.2.15 细胞分泌上清的结合特性进行研究, 结果表明该抗体能与纯化 HBsAg、HepG2.2.15 细胞分泌上清结合 (图 3), 提示 27kDa 蛋白与 HBsAg 可能具有相似的免疫原性和空间结构。

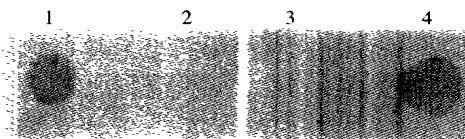


图 3 抗-HBs 抗体与纯化 HBsAg、HepG2.2.15 细胞分泌上清反应

Fig.3 Reaction of anti-HBs antibody with purified HBsAg and supernatant of HepG2.2.15 cells

1, Purified HBsAg; 2, Human sera without HBsAg; 3, DMEM culture without HepG2.2.15 cells; 4,Supernatant of HepG2.2.15 cells

2.4 27kDa 蛋白诱生的抗-HBs 抗体与 HBsAg 阳性病人血清反应

鉴于经 27kDa 蛋白免疫小鼠后产生的抗-HBs 抗体能与纯化 HBsAg、HepG2.2.15 细胞分泌上清结合, 为了进一步研究该抗体是否与天然感染 HBV 产生的 HBsAg 结合, 我们以 DOT-EIA 研究显示 20 份 Abbott 检测 HBsAg 阳性临床患者血清中有 19 份与 27kDa 蛋白诱生的抗-HBs 抗体反应, 而 34 份 Abbott 检测 HBsAg 阴性临床患者血清中有 33 份表现出不与抗-HBs 抗体结合 (图 4)。

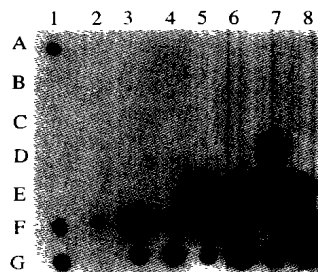


图 4 抗-HBs 抗体与病人血清的反应

Fig.4 Reaction between anti-HBs antibody and patients' sera  
A1, Positive control; A2, negative control; A3-E4, HBsAg negative sera detected by Abbott; E5-G8, HBsAg positive sera detected by Abbott

经  $X^2$  检验,  $P < 0.05$ , 表明 Abbott 检测 HBsAg 阳性临床患者血清与 27kDa 蛋白诱生的抗-HBs 抗体反应, 而 Abbott 阴性血清不与 27kDa 蛋白诱生的抗-HBs 抗体反应 (表 1)。

表 1 27kDa 蛋白诱生的抗-HBs 抗体与病人血清的反应  
Tab.1 Reaction of anti-HBs induced by 27kDa protein with patients' sera

		Abbott		P
		Positive(n)	Negative(n)	
DOT-EIA	Positive(n)	19	1	20
	Negative(n)	1	33	34
	Total(n)	20	34	54 *

\*  $P < 0.05$

### 3 讨论

众多嗜肝病毒的研究表明, 不同种类的嗜肝病毒仅感染其天然宿主和亲缘关系较近的动物<sup>[1,2,8-10]</sup>, 例如人 HBV 仅感染黑猩猩等灵长类动物<sup>[10]</sup>, 并且异源嗜肝病毒的编码基因和所编码的蛋白之间一般很难有交叉反应。但上世纪 80 年代末有零星报道称牛血清中可能存在与抗-HBs 抗体反应的蛋白<sup>[3]</sup>; 我们前期结果显示在牛血清中 HBsAg 样蛋白的阳性率达 45.16%, 且该蛋白具有家族聚集性。

HBsAg 是 HBV 的 S 基因所编码的表面蛋白, 由于编码基因和翻译后糖基化程度的不同, HBsAg 可形成 6 到 7 种分子量不同的多肽。HBsAg 包裹 HBV 病毒颗粒, 使病毒能够附着和侵入新的细胞。此外, HBsAg 还是引起宿主保护性应答反应的主要抗原, 是临床重要的评估 HBV 存在或复制的指标之一。HBsAg 阳性见于 HBV 感染早期或病毒携带者; HBsAg 弱阳性是免疫功能受损后, 机体与 HBV 或其应答产物产生新的免疫平衡所致<sup>[11]</sup>。无论是具有感染性的 Dane 颗粒, 还是小球形颗粒或者管形颗粒, 其表面均有大、中、小三种蛋白, 只是三者的比例不同。Rothmann 等<sup>[12]</sup>研究发现 DHBV 大蛋白的磷酸化介导病毒和宿主之间的“cross talk”, 其 118 位丝氨酸的磷酸化后经 ERK 途径使 MAPK 磷酸化, 从而反式活化基因的表达。

基于以上认识, 对牛血清中 HBV 感染相关指标 HBsAg 样蛋白的深入研究可能具有重要意义。本研究用鼠抗人多克隆抗血清作为一抗, 羊抗鼠 IgG-HRP 为二抗的 Western Blot 显示牛血清中 HBsAg 样蛋白相对分子量大约为 27, 000 道尔顿, 该蛋白与人 HBV 的 S 基因编码的 HBsAg 糖基化后的蛋白分子大小相似。

进一步研究 27kDa 蛋白发现: 以该蛋白免疫小鼠后, 可产生抗-HBs 抗体, 该抗体不仅能与纯化 HBsAg、HepG2.2.15 细胞分泌上清反应, 而且还能与临床患者中经 Abbott 检测 HBsAg 阳性的血清反应。经纯化 HBsAg 与 27kDa 蛋白诱生的抗-HBs 抗体的反应表明 27kDa 蛋白可能有与 HBsAg 相同或者相似的抗原表位, 它们具有相似的免疫原性, 二者的一级结构是否相同尚待进一步研究。HepG2.2.15 细胞是一株有完整 HBV 基因组整合, 能持续转录, 翻译, 产生 HBsAg、HBeAg、Dane 颗粒等, 类似人慢性 HBV 感染模型<sup>[13]</sup>。该细胞株的分泌上清内存在 HBsAg, 其与 27kDa 蛋白诱生的抗-HBs 抗体的反应显示在体外 HBV 感染模型中天然

存在的 HBsAg 与 27kDa 蛋白可能具有相同或相似的空间结构。经 Abbott 检测的 HBsAg 阳性患者血清与 27kDa 蛋白诱生的抗-HBs 抗体反应表明 27kDa 蛋白可能与体内自然感染 HBV 的患者血清中的 HBsAg 具有相同或相似性。提示 27kDa 蛋白具有与 HBsAg 相似的免疫原性, 能诱发产生抗-HBs 抗体, 且该抗体表现出与各种不同状态 HBsAg 的结合特性。27kDa 蛋白的存在是否预示牛血清中有嗜肝病毒的存在, 以及该蛋白在防治乙型肝炎中是否具有更进一步的理论和实践意义尚待研究。

### 参考文献

- [1] Chang S F, Netter H J, Michael B, *et al.* A new avian hepadnavirus infection Snow Geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA[J]. *Virology*. 1999, 262: 39-54.
- [2] Pult I, Netter H J, Michael B, *et al.* Identification and analysis of a new Hepadnavirus in White Stork[J]. *Virology*. 2001, 289: 114-128.
- [3] 刘土均, 张献孔, 苏占军, 等. 用 ELISA 和 IEM 技术检测 257 头奶牛血清中类人乙肝病毒的试验研究[J]. *中国人兽共患病杂志*, 1987, 3 (3): 27-29.
- [4] Murphy G, Maguire R T, Rogers B, *et al.* Comparison of serum PSMA, PSA level with results of cytogen-356 ProstaScint® Scanning in prostatic cancer patients[J]. *The prostate*. 1997, 33: 281-285.
- [5] 田厚文, 韩立群, 任 皎, 等. 人乳头瘤病毒 58 型 L1 壳蛋白在原核细胞中的高效表达及抗体制备[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2001, 15(4): 317-320.
- [6] 吴淑坤, 林雨霖, 姚学军, 等. 一种体外初筛抗乙型肝炎病毒药物试验方法[J]. *中国医院药学杂志*, 2001, 21(4): 218-219
- [7] 曹鸿鹏, 陶佩珍. 拉夫米啶等六种药物的体外抗乙型肝炎病毒作用[J]. *中华医学杂志*, 2001, 81(16): 1004-1007
- [8] Sprengel R, Kaleta E F, Will H. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons[J]. *J Virol*. 1988, 62: 3832-3839.
- [9] Alexej P, Heinz H, Tatyana K, *et al.* New hepatitis B virus of cranes that has an unexpected broad host range[J]. *J Virol*. 2003, 77(3): 1964-1976.
- [10] Lanford R E, Chavez D, Brasky K M, *et al.* Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 5757-5761.
- [11] 姜玉章, 余亚新. HBsAg 低值弱阳性的检测及其临床意义[J]. *中华微生物和免疫学杂志*, 2001, 21 (3): 350.
- [12] Rothmann K, Schnolzer M, Radziwill G, *et al.* Host cell-virus cross talk: phosphorylation of a hepatitis B virus envelope protein mediates intracellular signaling[J]. *J Virol* 1998, 72(12): 10138-47.
- [13] 卢桥生, 章 廉, 梁焯森, 等. 土拨鼠肝炎病毒野毒及前 C 人工变异株的体外表达[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1997, 11(2): 107-109.