

抗乙型肝炎病毒表面抗原单克隆抗体的研究

II. 抗HBsAg单克隆抗体的实际应用

刘庆良 曾蓉芳 邵美琪 顾 鸣 章谷生 刘心丹*

(卫生部上海生物制品研究所; 中国血液学免疫学研究中心, 上海)

本文用抗HBs/a McAb腹水用亲和层析法有效地提纯了HBsAg,回收率较高,并进行了CIEP检测临床血清标本,沉淀线清晰,检测灵敏度高于抗HBsAg血清。将抗HBs/a和抗HBs/d二种McAb提纯后制备诊断血球,进行RPHA检测临床血清标本千余例,并经美国Abbott实验室RIA试剂盒验证,表明其阳性检出率与中和试验符合率较国内目前以PcAb制备的诊断血球为优,显示了良好的特异性、灵敏度和准确性。抗HBsAgMcAb可作为新一代的HBsAg检测试剂。

关键词 乙型肝炎病毒表面抗原; 单克隆抗体

抗乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)的抗血清是目前诊断乙型肝炎病毒感染的主要试剂。近年来国内外已纷纷开始采用杂交瘤技术研制新一代的单克隆抗体(McAb)诊断试剂^[1-5]。我们曾建立了三十余株分泌抗HBsAgMcAb的杂交瘤细胞株^[6],对其中有代表性的12株细胞分泌的McAb进行了各种分析^[7]。本文报道这类McAb的实际应用结果。

材料和方法

(一) HBsAg的纯化

分别取抗HBs/a的两株McAb腹水,以生理盐水稀释至30mg/ml蛋白浓度,按每ml 4 B珠对10mg腹水蛋白的比例,与活化的Sepharose-4 B珠(Pharmacia产品)交联,交联方法按Pharmacia说明书进行,制备亲和层析柱。然后各柱分别加入一定量的乙肝病人混合血浆进行亲和层析。先以pH7.2, 0.01M,磷酸盐缓冲液洗脱,继以3N硫氰酸钾液解离吸附在柱上的HBsAg,分部收集,每管2ml,测

各管 A_{280nm} 值。将吸光度0.1以上各管合并,透析浓缩后测定其体积和对流免疫电泳效价,与上样的血浆量及其对流免疫电泳效价相比较,计算出回收率。并与羊抗人全血清作琼脂双扩散试验检测有无人血清成分。同时,用羊抗HBsAg抗血清(以下简称多克隆抗体:PcAb)提纯抗体后制备的亲合柱,按同法进行对比。

(二) 对流免疫电泳(CIEP)试验检测临床血清标本的HBsAg

选择具有高效价抗HBs/a的S₁₇McAb腹水,稀释400倍后与被检血清作CIEP试验,按常规方法进行^[8],采用pH8.6巴比妥钠缓冲液,1%琼脂,电压100—150V,电流3—5A/cm,时间1—1.5h。

(三) 反向被动血凝试验(RPHA)检测血清标本的HBsAg

1. HBsAg诊断血球的制备: 选择

本文于1985年2月18日收到。

* 卫生部上海生物制品研究所检定科。

周月梅同志参加了部分检测工作,并承静安区区化所和虹桥医院等提供血清标本,谨致谢意。

具有高效价抗HBs/a的S₁McAb腹水和抗HBs/d的S₄McAb腹水,分别经羊抗鼠IgG亲和层析柱纯化,以适当浓度比例组合后,致敏经醛化的人“O”型红细胞,再经冷冻真空干燥制成。致敏后的血球简称McAb诊断血球。

2. RPHA和中和试验:受检血清标本来自临床诊断或门诊怀疑为乙型肝炎的病人(以下统称病人)、正常体检人员和自愿献血员。方法采用现行的96孔“V”型板血清标本倍比稀释法进行^[9]。同时以目前上海生物制品研究所用豚鼠抗HBsAg抗体制备的冻干HBsAg诊断血球(简称PcAb诊断血球)作对比检测。RPHA阳性标本需作中和试验再证实,中和抗体为经1:8—1:16稀释的羊抗HBsAg血清。结果按血球凝集度分为+++、++、+、±和-,以+为凝集终点。被检血清的RPHA凝集度 $\geq 1:8$,其中和试验排凝集孔数低于测定排2孔或2孔以上者,判为阳性;等于或超过测定排孔者判为假阳性,其余判为阴性。

3. 酶免疫测定法检测HBsAg:部分血清标本同时进行了酶免疫夹心ELISA法测定。采用40孔聚苯乙烯微量反应板法^[10]。酶试剂盒为上海生物制品研究所用羊抗HBsAg抗体生产的产品,批号8404。

4. 放射免疫法检测HBsAg:部分血清标本同时进行了放射免疫夹心法测定。试剂盒为美国Abbott实验室出品Ausria, II-125RIA诊断试剂盒69614HR,为定性检测。试验方法按试剂盒说明书进行,首次检测有反应的标本,经再次检测仍有反应者判为HBsAg阳性。

实 验 结 果

(一) 抗HBsAgMcAb亲和层析法纯化抗原

选用效价与结合力不同的抗HBs/a的S₂和S₅两个McAb腹水和羊抗HBsAgPcAb分别制成亲和柱,提纯的HBsAg经免疫双扩散法检测均无人血清成分。其回收情况见表1。

表 1 McAb和PcAb亲和层析法提纯HBsAg的比较

Table 1 The comparison of HBsAg purifications by McAb and PcAb affinity chromatography

抗体种类 Antibody used	抗体效价 Titer of Ab			实验次数 Exp. No.	亲和柱 V/CA	上柱血凝	收获液	收获率 Recovery (%)
	ID	PHA	avidity			Plasma loaded	Eluant collected	
						体积×CIEP效价 V×CIEP titer	体积×CIEP效价 V×CIEP titer	
S ₂ McAb	1:400	2.2	68.4	I	10ml	40ml×1:4	25ml×1:4	63.0
		$\times 10^4$	$\times 10^{-5}$	I	10ml	35ml×1:4	20ml×1:4	56.0
S ₅ McAb	1:40	5.3	52.8	I	10ml	20ml×1:4	15ml×1:4	75.0
		$\times 10^3$	$\times 10^{-5}$	I	10ml	20ml×1:4	8 ml×1:8	80.0
Sheep anti-HBsPcAb	1:8	4.0	Not done	I	10ml	20ml×1:16	20ml×1:8	50.0

V = volume体积, V/CA = volume of affinity chromatography column亲和柱体积, ID = immunodiffusion免疫双扩散, PHA = passive hemagglutination assay被动血凝试验, CIEP = counterimmuno-electrophoresis对流免疫电泳, avidity结合力, 其测定方法请参见^[11]。

表1说明,两个McAb腹水亲和层析柱均能有效地提纯HBsAg,收获率在56—80%之间,较PcAb亲和层析的50%为高。

其中S₅McAb腹水柱的回收率又比S₂McAb柱高,达75—80%,而且在解离时,发现其解离液HBsAg浓度高峰管比其

它亲和柱提前 2—3 管, 表明吸附在该柱上的 HBsAg 解离较易, 这可能与 S₁₇McAb 的结合力较低有关。

(二) 用 CIEP 法比较 McAb 腹水和 PcAb 抗血清对 HBsAg 的检测的灵敏度

共检测 131 份病人血清标本, 先以标本原倍血清作 CIEP, 两种抗体检出的阳性数均为 35 例。进而对其中 24 例阳性标本作 1:2—1:32 倍比稀释后测定 CIEP 滴度, 结果见表 2。

表 2 McAb 腹水和 PcAb 血清测定 HBsAg 阳性标本 (CEP 法) 滴度对比
Table 2 The comparison of CIEP titers of HBsAg positive specimens determined with McAb ascites and PcAb serum

抗体种类 Antibody used	受检血清 HBsAg 滴度的分布例数 Distribution of the titers						受检血清 HBsAg 滴度统计 Calculation of the titers	
	原倍血清 original serum	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	均值 mean value	几何均值 geometric mean value (log ₂ X)
S ₁₇ McAb 腹水 S ₁₇ McAb ascites	1	5	6	11	0	1	1:4.89	2.29 ± 1.08
羊抗 HBs 血清 sheep anti-HBs serum	8	10	5	1	0	0	1:1.95	0.95 ± 0.68

表明 McAb 腹水的检测灵敏度超过 PcAb 血清, 在检测的 24 份血清中有 21 份效价比 PcAb 血清高, 其中半数高 4 倍以上, 且沉淀线比较清晰, 腹水作 400 倍稀释使用也较经济。

(三) McAb 诊断血球的临床应用

1. McAb 诊断血球的自凝、非特异凝集和效价的检定: 试制的几批 McAb 诊断血球以稀释液作空白对照无自凝现象; 与正常人血清的非特异性凝集 < 1:2; 以卫生部药品生物制品检定所发下的 HBsAg

阳性第二参考品为抗原进行 RPHA, 各批血球效价均在 1:128000 左右, 能与最低浓度为 0.5 ng/ml 的 HBsAg 发生凝集, 按 1:8 倍计算可测出的 HBsAg 最低浓度约为 4 ng/ml, 接近 Abbott 实验室生产的 HBsAg 诊断血球的灵敏度。

2. McAb 诊断血球和 PcAb 诊断血球对临床血清标本 HBsAg 检测灵敏度的比较: 用两种诊断血球平行检测 30 份 HBsAg 阳性血清, 结果见表 3。

表 3 用不同诊断血球检测 30 份 HBsAg 阳性标本的 RPHA 凝集效价比较
Table 3 The comparison of RPHA titers of 30 HBsAg positive specimens with different diagnostic RBC

诊断血球种类 Type of diagnostic RBC	效价均值 mean value	效价几何均值 geometric mean value (log ₂ X)
McAb-RBC	1:5293	12.37 ± 3.35
PcAb-RBC	1:251	7.97 ± 2.49 t = 2.116, p < 0.05

表3表明McAb诊断血球的检测灵敏度明显高于PcAb诊断血球,一般高4—8倍。

3. 各种诊断血球检测临床同批标本的阳性率和符合率:采用McAb诊断血球

与PcAb诊断血球,对一千余例血清标本进行了对比检测,其阳性检出率见表4;其与中和试验的符合率见表5。

表 4 不同诊断血球检测临床标本的HBsAg阳性率
Table 4 The positive rates of clinical specimens for HBsAg detected using the different diagnostic RBC in RPHA

标 本 Specimens		McAb血球检出阳性 positive rate by McAb-RBC	PcAb血球检出阳性 positive rate by PcAb-RBC	X ²	P
来源 source	数目 number				
病人 Patients	243*	70(28.8%)	39(16.1%)	29.0	<0.01
	325	189(58.1%)	156(48.0%)	31.0	<0.01
健康人 Normal individuals	128	10(7.8%)	4(3.1%)	5.14	<0.05
献血者 Blood donors	479	26(5.4%)	10(2.1%)	17.1	<0.01

* 本组病人标本检测用的PcAb-RBC为上海湖南试剂室出品的液体诊断血球

表 5 不同诊断血球检测标本的RPHA阳性和中和试验的符合率
Table 5 The accordance of RPHA positives using different diagnostic RBC with neutralization test

标 本 Specimens		诊断血球类型 Type of diag- nostic RBC	RPHA阳性数 Positive in Rpha	中和试验符合数 Confirmed positive in neutralization	符 合 率 Accordant rate%
来源 Source	数目 Number				
病人血清 Patients	568	McAb-RBC	259	259	100.0
	184*	PcAb-RBC	81	73	90.1
	243	PcAb-RBC	44	39	88.6
健康人血清 Normal indivi- duals	128	McAb-RBC	10	10	100.0
	128	PcAb-RBC	5	4	80.0
献血者血清 Blood donors	479	McAb-RBC	28	26	92.9
	479	PcAb-RBC	13	10	77.0

* 用PcAb-RBC共测了325份标本,但其中只同时做了184份标本的中和试验,故本表统计184例。

结果表明McAb诊断血球的阳性检出率明显高于PcAb诊断血球,而且凡PcAb诊断血球检测为阳性的标本,McAb诊断血球无一例漏检。与中和试验的符合率也是McAb诊断血球最高,表明其特异性良好。

4. McAb诊断血球RPHA法与免疫酶法检测同批标本的比较:130份病人血清经McAb诊断血球测定为阳性的有44份(33.8%),免疫酶ELISA法测定为阳性的有38份(29.2%),PcAb诊断血球测定

表 6 不同诊断血球RPHA法与RIA检测临床标本的HBsAg阳性率
Table 6 The positive rates for HBsAg detected by RPHA and RIA

被检标本数 Number of specimens	PcAb诊断血球检测阳性 Positive screen rate by PcAb-RBC	McAb诊断血球检测阳性 Positive screen rate by McAb-RBC	RIA检测阳性 Positive screen rate by AUSRIA I-125
164	38(23.7%)	68(41.4%)	85(51.8%)

为阳性的有24份(18.5%)。说明McAb诊断血球的阳性检出率也略高于目前市售用PcAb制备的免疫酶试剂盒($X^2 = 4.17$, $p < 0.05$)。

5. McAb诊断血球RPHA法与 Ausria II-125RIA 法检测同批标本的比较: 被检测的164份病人血清中, 包括了部分为HBsAg低滴度的标本, 以使对比更能说明问题, 测定结果见表6。并且RIA检测为阴性的标本, McAb诊断血球无一例测出为阳性; 而McAb诊断血球测出为阳性的标本, RIA检测均证实为阳性, 表明McAb诊断血球特异性良好。从表6可知, RIA比McAb诊断血球多检测出17份阳性, 这17份标本用McAb诊断血球作RPHA时, 有10份呈现1:4凝集度, 但低于判断标准仍作阴性统计; 作RIA时, 它们的cpm也大多低于1000。

讨 论

McAb是针对一个抗原决定簇的高度特异而均一的生物制剂, 具有恒定的亲和力; 而免疫动物的异种抗血清则是随免疫动物个体甚至采血次数而变化的非均质性PcAb的混合物。因此, 特异性McAb为临床诊断分析提供了极为有用的工具。我们应用抗HBsAg的腹水直接制备亲和层析柱提纯HBsAg效果较好。其中S₆McAb柱的抗原回收率较高, 而且抗原解离也较容易, 这可能是与S₆McAb的结合力

(52.8%)较低有关。S₂McAb的结合力(68.4%)较高, 用以制备亲和柱提纯HBsAg效果反不如S₅McAb。故此, 通常认为提纯抗原应选择结合力(或亲和能力)较低的抗体来制备亲和层析柱^[2]。由于我们获得了32株结合力与效价高低不同的抗HBsAgMcAb, 这就使我们有可能选择结合力较低的McAb制备亲和柱来提纯抗原, 而选择高效价高结合力McAb(如S₁₇、S₄等)^[7]来制备诊断试剂以提高检测灵敏度。

鉴于目前临床检测HBsAg多用RPHA法, 但用常规PcAb制备的诊断血球在检测的准确性和敏感性上还欠理想, 国内外已开始采用McAb。如Kunitomo等^[12]和长春生物制品研究所^[13]等采用抗HBs/a McAb制备诊断血球, 其特异性较好, 检测灵敏度相当于或略高于PcAb诊断血球, 可测出6ng/ml浓度的HBsAg^[12]。我们采用抗HBs/a和抗HBs/d两种McAb组合后致敏的血球, 在灵敏度和凝集强度上比单用一个McAb致敏的血球更好。在提纯McAb方法上, 我们采用羊抗鼠IgG亲和层析柱法效果良好, 使用方便, 每毫升腹水可获纯化McAb 5—10mg; 致敏血球时用量很少, 1支血球制剂只需两种McAb各2—10μg即可, 而用提纯的PcAb每支需100—150μg。临床检测表明, McAb诊断血球灵敏度较高, 与中和试验的阳性符合率好, 假阳性现象很少, 显示良好的特异性, 用美国Abbott实验室生产的

Ausria11-125RIA 试剂盒也证实了这一点。此外, McAb 诊断血球的凝集相清晰、没有“前带现象”,从而改善了检测的准确性。据我们观察, McAb 诊断血球的阳性检出率比较高是因为(1)灵敏度较高,(2)特异性好,表现在对滴度 < 1:32 的标本, McAb 诊断血球的 RPHA 结果与其中和试验结果绝大多数相符;而此时 PcAb 诊断血球的 RPHA 与中和试验结果不相符合的较多,只得判为假阳性或阴性。然而据报道,采用 McAb 仍难完全排除假阳性^[12],我们也见类似情况。故仍需采用中和试验加以确证,这对一些低

滴度的标本尤为必需。McAb 的效价和亲和力量虽很高,但制备的诊断血球采用 RPHA 法进行检验,其凝集度须 $\geq 1:8$ 方判作阳性,因而其检测灵敏度不及 RIA 法,这主要是由于血凝法本身的局限性。近来,我们已初步制成酶标记抗 HBsAg McAb,用以装配检测 HBsAg 的酶免疫 ELISA 试剂盒,可望使检测灵敏度再提高一步。

综上所述,用抗 HBsAg McAb 制备的试剂在诊断的灵敏度、特异性和准确性方面均比目前国内相应的 PcAb 试剂为优,从而为临床 HBsAg 的诊断提供了新一代的检测试剂,值得推广应用。

参 考 文 献

- [1] Schih, J.W. et al.: *J. Virol. Meth.*, 1:257, 1980.
- [2] David, G.S. et al.: *Med. Lab. Sci.*, 38:341, 1981.
- [3] Wands, J.R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78:1214, 1981.
- [4] 郭恒昌等, *中华微生物学和免疫学杂志*, 2:280, 1982.
- [5] 周景筠等, *上海免疫学杂志*, 4:40, 1984.
- [6] 曾蓉芳等, *上海免疫学杂志*, 4:129, 1984.
- [7] 曾蓉芳等, *上海医学*, 8(3):159, 1985.
- [8] 余二贺等主编, *临床免疫学技术*, 上海科学技术出版社, 上海, 1982, p.44.
- [9] 余二贺等主编, *临床免疫学技术*, 上海科学技术出版社, 上海, 1982, p89.
- [10] 蒋成淦编著, *酶免疫测定法*, 人民卫生出版社, 北京, 1984, p.140.
- [11] 严泳棠等, *上海免疫学杂志*, 4:145, 1984.
- [12] Kunitomo, K. et al.: *Vox Sang.*, 45:104, 1983.
- [13] 长春生物制品研究所, *杂交瘤专题讨论汇编*, 上海市免疫学会出版, 上海1983, p.41.

THE INVESTIGATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HEPATITES B VIRUS SURFACE ANTIGEN

II. THE APPLICATIONS OF ANTI-HBsAg MONOCLONAL ANTIBODIES.

Liu Qingliang Zhen Rongfung Sao Meiqi Gu Ming

Zhang Gusheng Liu Xingdan

(Shanghai Institute of Biological Products, Ministry of Public Health,
Sino-Japanese Collaboration Centre for Hematology and Immunology, Shanghai)

Twelve hybridoma cell lines secreting anti-HBsAg McAb have been established in our laboratory. HBsAg in serum or plasma has been effectively purified by the ascitic anti-HBs/a McAb affinity chromatography, and its

recovery rate was higher. When clinical specimens were detected by the ascitic anti-HBs/a McAb CIEP, the sensitivity was higher than that by sheep anti-HBs PcAb serum.

Sensitized RBC for HBsAg diagnosis were prepared using RBC coupled with a mixture of purified anti-HBs/d and anti-HBs/a McAbs. RPHA test was used to screen more than 1000 specimens and the data obtained from part of those specimens were reconfirmed by AUSRIA II-125 radioimmunoassay (Abbott Laboratories).

The results show that the percentage of positive specimens detected and the accordance rate with neutralization assay by McAb diagnostic RBC were superior to that by PcAb diagnostic RBC which was made at home, and the specificity, sensitivity as well as the accuracy of McAb diagnostic RBC in RPHA were fine.

We conclude that the anti-HBs McAb can be used as a new generation reagent for the detection of HBsAg.

Key words

HBsAg; monoclonal antibodies