

· 基础论著 ·

毕赤酵母及大肠埃希菌表达的重组乙型肝炎病毒 e 抗原在乙型肝炎病毒 e 抗体检测中的比较分析

洪国强 李朝霞 陈月燕 胡波 李林

【摘要】 目的 探讨毕赤酵母及大肠埃希菌表达的重组乙型肝炎病毒 e 抗原(recombinant hepatitis B e antigen, rHBeAg)在乙型肝炎病毒 e 抗体(hepatitis B e antibody, HBeAb)免疫检测中的应用。**方法** 用分子筛纯化两种 rHBeAg,进行特异性和免疫反应性鉴定;分别用纯化后毕赤酵母表达的 HBeAg(A)、大肠埃希菌表达的 HBeAg(B)作为中和试剂,单克隆 HBeAb 为固相抗体,辣根过氧化物酶标记多克隆 HBeAb 为探测抗体,用固相-液相竞争抑制法酶联免疫吸附实验检测 HBeAb 标准品及乙型肝炎病毒 PCR 阳性和阴性的临床标本。**结果** (1)检测中国药品生物制品检定所 HBeAb 国家参考品结果:试剂 A:阴性符合率(-/-)15/15,阳性符合率(+/-)10/10;灵敏度参考品最低检出量(稀释度) $1^{\#}=1:128$, $2^{\#}=1:128$, $3^{\#}=1:256$ 。试剂 B:阴性符合率(-/-)15/15;阳性符合率(+/-)9/10;灵敏度参考品最低检出量(稀释度) $1^{\#}=1:32$, $2^{\#}=1:64$, $3^{\#}=1:64$;大肠埃希菌抗原的灵敏度明显低于毕赤酵母抗原;(2)对乙型肝炎病毒 PCR 阳性及阴性的临床标本进行检测:试剂 A 和试剂 B 对 PCR 阳性组的 HBeAb 阳性检出率分别为 50.4% 和 51.6%,差异无显著统计学意义($P>0.05$);PCR 阴性组的 HBeAb 阴性检出率,试剂 A 和试剂 B 分别为 91.2% 和 86.7%,差异有显著统计学意义($P<0.01$)。**结论** 毕赤酵母表达的 HBeAg 用于 HBeAb 的检测灵敏度及特异性均优于大肠埃希菌表达产物。

【关键词】 乙型肝炎病毒 e 抗原;基因表达;毕赤酵母;酶联免疫吸附实验

Suitability of yeast and *Escherichia coli* expressed hepatitis B virus e antigen derivatives for detection of anti-HBe antibodies HONG Guo-qiang, LI Zhao-xia, CHEN Yue-yan, HU Bo, LI Lin. Department of Laboratory Medicine, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Corresponding author: LI Zhao-xia, Email: lizhaoxia1024@163.com

【Abstract】 Objective To explore the suitability of recombinant HBeAg (rHBeAg) expressed by *Pichia pastoris* and *E. coli* for immunoassay of anti-HBe antibody

基金项目:广东省科技计划项目(2006B36001010)

作者单位:510630 广州市,中山大学附属第三医院检验科

通讯作者:李朝霞 Email: lizhaoxia1024@163.com

(HBeAb). **Methods** Yeast-derived HBeAg and *E. coli*-derived HBeAg were purified by gel filtration. The preparation of yeast-derived HBeAg (kit A) and *E. coli*-derived HBeAg (kit B) were served respectively as the neutralizing reagents, in combination with the monoclonal HBeAb as the solid-phase antigen and horseradish peroxidase (HRP)-labeled polyclonal HBeAb as the probe, to detect HBeAb standard panel of Chinese National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products and clinical samples including hepatitis B virus PCR positive and negative specimens selected by competitive inhibition ELISA. **Results** Detection of HBeAb standard by kit A showed that the negative rates (- / -) in negative standard and positive rates (+ / +) in positive standard were 15/15 and 10/10, respectively. The dilution titres for 1[#], 2[#], 3[#] sensitivity standard were 1:128, 1:128 and 1:256, respectively; while detection by kit B showed that the negative rates in negative standard and the positive rates in positive standard were 15/15 and 9/10, respectively. The dilution titres for 1[#], 2[#], 3[#] sensitivity standard were 1:32, 1:64 and 1:64, respectively. The sensitivities of *E. coli*-derived HBeAg were obviously lower than *P. pastoris*-derived HBeAg in detection of HBeAb standard. HBeAb positive rate detection of clinical samples in PCR positive group by kit A and kit B were 50.4% and 51.6%, respectively. The difference was not significant between kit A and B ($P > 0.05$); HBeAb negative rate in PCR negative group were 91.2% and 86.7% by kit A and kit B, and the difference was significant ($P < 0.01$). **Conclusions** Compared with *E. coli*-derived HBeAg, *P. pastoris*-derived HBeAg optimized immunoassay HBeAb in sensitivity and specificity.

【Key words】 Hepatitis B e antigen; Gene expression; *Pichia pastoris*; ELISA

乙型肝炎病毒(HBV)引起的乙型肝炎发病率高,预后差。HBV感染后HBeAg刺激机体产生的HBeAb是诊断乙型肝炎重要的血清标志物之一,与慢性肝炎及肝硬化的发生关系密切。随着HBV DNA前-C基因突变的深入研究,HBeAb的诊断意义日益引起重视,已有人主张按HBeAg及HBeAb状况进行慢性乙型肝炎的分类^[1],作为病情诊断及预后估计的重要依据。目前HBeAb的检测试剂采用基因工程大肠埃希菌表达的重组HBeAg作为诊断抗原(diagnostic antigen)。由于原核细胞与肝细胞在蛋白表达后处理(protein processing)上的差异,大肠埃希菌表达的重组HBeAg在特异性及免疫反应性等方面存在明显缺陷,加之目前国内在检测方法(detective test format)上的误导,致使HBeAb检测结果的准确性存在严重问题。用于诊断的抗原质量好坏和检测方法的优劣,决定了抗体检测质量所能达到的水平,是影响检测结果准确性的基本因素。改善试剂生物原材料的质量,优化检测方法是强化特异性检测信号、避免干扰、提高检测准确性的根本途径。本研究在采用毕赤酵母表达系统获得高特异性及高免疫反应性的重

组 HBeAg 的基础上^[2], 分别采用酵母及大肠埃希菌表达的 HBeAg 作为诊断抗原, 探讨二者在 HBeAb 免疫检测中的应用效果及两种检测方法的优劣。

材料和方法

一、材料

大肠埃希菌表达的重组 HBeAg(HBeAg/*E. coli*)、HBeAb 单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记多克隆 HBeAb 由深圳华康-月亮湾医学生物工程公司惠赠; Sephacryl S-200 分子筛购自 Pharmacia; 乙型肝炎病毒 HBeAb 国家参考品购自中国药品生物制品检定所; HBV PCR 阳性及阴性标本来自经 PE 公司 5700 PCR 荧光定量分析仪筛选的中山大学附属第三医院临床标本。其余材料及试剂见文献 2。

二、方法

1. 重组表达质粒的制备: 由于野生型 HBV e 基因在毕赤酵母表达量很低, 本实验采用密码子最佳化方法, 以合成的 e 基因作为目的基因进行表达以提高表达量。合成 e 基因(syneAg)的设计、重组质粒 CZaA-syneAg 的鉴定、酵母转化及阳性克隆的筛选、毕赤酵母表达的重组 HBeAg(rHBeAg/*P. pastoris*)的制备、免疫学鉴定方法等见文献 2。

2. 酵母重组 HBeAg 及大肠埃希菌表达的 HBeAg 的纯化: 粗提的 rHBeAg/*P. pastoris* 及 HBeAg/*E. coli* 经 Sephacryl S-200 分子筛柱层析纯化, 洗脱液为 0.02 mol/L pH 7.0 PBS, 收集 HBeAg 活性峰, 倍比稀释后用 ELISA 双抗体夹心法测定纯化产物的 HBeAg 及 HBcAg 效价。

3. 不同原料的 HBeAg 制备 ELISA 试剂并检测 HBeAb: 试剂 A: 分子筛纯化的 rHBeAg/*P. pastoris* 为中和试剂; 试剂 B: 分子筛纯化的 HBeAg/*E. coli* 为中和试剂; 单克隆 HBeAb 包被聚丙烯乙烯反应板为固相抗体, 辣根过氧化物酶标记多克隆 HBeAb 为探测抗体, 四甲基联苯胺为底物, 用 ELISA 固相-液相竞争抑制法检测中国药品生物制品检定所 HBeAb 国家参考品及 HBV PCR 阳性和阴性的临床标本, 以抑制率 $\geq 50\%$ 的阴性对照 A 值(absorbance)为 cut off, 分析检测结果。

三、统计学处理

以 SPSS 11.0 软件包进行统计学分析, 采用 2×2 交叉分类资料的 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 重组质粒 CZaA-syneAg 的鉴定、酵母转化及阳性克隆的筛选、rHBeAg/*P. pastoris* 的表达、免疫学鉴定结果等已报道于文献 2。

2. 用 ELISA 双抗体夹心法检出重组毕赤酵母培养上清中分子筛纯化后重组 HBeAg ELISA 效价达 1:163 840, 检测不到 HBcAg; 分子筛纯化后的大肠埃希菌表达的 HBeAg ELISA 效价达 1:327 680, HBcAg 效价为 1:81 920。

3. 试剂 A 和 B 检测中国药品生物制品检定所乙型肝炎病毒 HBeAb 国家参

考品,结果显示 B 试剂的灵敏度及阳性检出率明显低于试剂 A(表 1)。

表 1 对中国药品生物制品检定所 HBeAb 国家参考品的检测

试剂	阴性符合率(- / -)	阳性符合率(+ / +)	灵敏度参考品的最低检出量(稀释度)		
A	15/15	10/10	1 [#] = 1: 128	2 [#] = 1: 128	3 [#] = 1: 256
B	15/15	9/10	1 [#] = 1: 32	2 [#] = 1: 64	3 [#] = 1: 64

注:中国药品生物制品检定所 HBeAb 国家参考品:15 份阴性,10 份阳性,3 份灵敏度测试品

4. 对 HBV 临床标本 HBeAb 检测:试剂 A 和试剂 B 对 HBV PCR 阳性及阴性的临床标本检测结果见表 2。PCR 阳性组 HBeAb 阳性检出率:试剂 A [50.4% (252/500)] 与试剂 B [51.6% (258/500)] 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); PCR 阴性组 HBeAb 阴性检出率:试剂 A 阴性检出率 [91.2% (912/1000)] 与试剂 B [86.7% (867/1000)] 比较差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 2 临床标本 HBeAb 检测(例)

血清	例数	试剂 A 检出	试剂 B 检出
PCR 阳性组	500	252	258
PCR 阴性组	1000	88	133

讨 论

免疫学检测依赖抗原与抗体间的特异性结合。诊断抗原的特异性(specificity)和免疫反应性(immunoreactivity)是影响检测结果专一性及灵敏度的关键因素。目前,HBeAb 检测试剂的诊断抗原为 HBeAg。作为 HBV 感染者 HBeAb 的直接免疫原,感染者血清中的 HBeAg 特异性及免疫反应性最好,是理想的诊断抗原。但血源的 HBeAg 稳定性较差,其制备的试剂实际有效期仅 2 个月左右甚至更短,而且在制备过程中难以对有感染性的血源性原材料进行有效的灭活,因此在试剂生产及使用过程中存在生物安全问题。目前国内 HBeAb 免疫检测所用的 HBeAg 均为大肠埃希菌胞内表达的基因工程抗原。rHBeAg/*E. coli* 稳定性好、使用安全、价格低廉,但在特异性、免疫反应性及纯度 3 方面均存在严重缺陷,影响检测结果的准确性,阻碍检测方法的优化:

1. 特异性:(1) rHBeAg/*E. coli* 与乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)之间存在明显的交叉抗原性,可与乙型肝炎核心抗体(HBcAb)结合。HBeAg 和 HBcAg 均由 HBV 的 ORF-C 编码,约 75% 氨基酸序列相同^[5],却具有完全不同的 B 细胞表位即能被 B 细胞受体和特异性抗体分子识别的抗原决定簇^[2,6]。HBcAg 仅存在于 HBV 感染的肝细胞内,感染者血清中仅能检测到 HBeAg 而不能检测到 HBcAg,说明人源 HBeAg 与人源 HBcAg 之间在抗体识别水平上不存在共同表位(common epitope)及交叉反应(cross reaction)。单纯用基因切割的方法不能将 HBeAg 和 HBcAg 的抗原表位完全分离。宿主细胞对蛋白表达后的处理是 HBeAg

和 HBcAg 产生不同表位的原因^[2]。大肠埃希菌为原核细胞,其合成的重组蛋白在表达后处理上与肝细胞差别较大,当用于制备 HBeAg 和 HBcAg 这类基因同源性很高、需通过复杂的表达后处理而形成不同表位的抗原蛋白时,难以准确地模拟其母本蛋白(parent protein),因此,部分相同的一级结构可产生共同抗原,这便造成两者存在交叉抗原性;(2)rHBeAg/*E. coli* 为胞内表达产物,在收集重组蛋白时不可避免带有大肠埃希菌蛋白(native protein),用一般纯化方法很难彻底去除。不少人因感染过大肠埃希菌而存在抗-大肠埃希菌抗体,能与 rHBeAg/*E. coli* 中混杂的大肠埃希菌菌体蛋白结合。

制备多克隆 HBeAb 酶标记物的 HBeAg 来自 HBV 感染者血清,HBeAb ELISA 效价 $\geq 1:640$ 以上的血清才能用于 HBeAb 酶标记物的制备。必须使用血源 HBeAg 作为中和试剂来进行 HBeAb 原材料血清的质检,以避免 rHBeAg/*E. coli* 的 HBcAg 交叉抗原对检测的干扰,以保证检出结果是真实的 HBeAb 滴度(而不包括 HBcAb)。然而,达到效价要求的原材料血清非常稀少,来源困难,往往合并 HBcAb 阳性且常含有抗-大肠埃希菌抗体及类风湿因子(RF),均能明显影响检测结果。RF 通过反相亲和层析(正常人血清柱)较易去除,而 HBcAb 及抗-大肠埃希菌抗体用一般纯化方法很难去除,易在酶交联过程中与 HBeAb 一同形成相应的酶结合物。如采用选择性很高的纯化方法(如免疫亲和层析等),由于得率低,成本高而无法承受。可采用单克隆 HBeAb 酶标记物作为竞争法检测中的参比抗体以避免 HBcAb 及抗-大肠埃希菌抗体的干扰,但只能检出与该单抗标记物结合位点相同的某一克隆的 HBeAb,而针对其他抗原决定簇的 HBeAb 将漏检。

由于上述原因,以 rHBeAg/*E. coli* 和多克隆 HBeAb 酶标记物组成的 HBeAb 检测试剂的检测信号可能由 3 对抗原-抗体反应提供:(1)rHBeAg/*E. coli*-酶标记 HBeAb;(2)rHBeAg/*E. coli*-酶标记 HBcAb;(3)rHBeAg/*E. coli* 中的大肠埃希菌抗原-酶标记抗-大肠埃希菌抗体^[4]。由于(2)、(3)为非特异性检测信号,以此 3 对抗原-抗体反应为基础来进行方阵滴定(棋盘滴定),并依据滴定结果确定诊断抗原和探测抗体的工作浓度,显然存在重大缺陷:(1)多克隆 HBeAb 酶标记物中的 HBcAb 与 rHBeAg/*E. coli* 结合,形成固相 rHBeAg/*E. coli*-酶标记 HBcAb 复合物,提供假阴性检测信号;(2)标本中如含有 HBcAb,将和酶标记 HBcAb 竞争与固相 rHBeAg/*E. coli* 结合,抑制固相 rHBeAg/*E. coli*-酶标记 HBcAb 复合物的形成,提供假阳性检测信号(方阵滴定时,固相 rHBeAg/*E. coli*-酶标记 HBcAb 复合物提供的检测信号是阴性检测信号的一部分);(3)在用抗原直接包被时(液相-液相竞争法),多克隆 HBeAb 酶标记物中的抗-大肠埃希菌抗体与 rHBeAg/*E. coli* 中混杂的大肠埃希菌抗原结合,将形成固相大肠埃希菌抗原-酶标记抗-大肠埃希菌抗体复合物,提供假阴性检测信号;(4)标本中如含有抗-大肠埃希菌抗体,将和酶标记抗-大肠埃希菌抗体竞争与固相大肠埃希菌抗原结合,抑制酶标记抗-大肠埃希菌抗体与固相菌体抗原结合,提供假阳性检测信号(固相菌体抗原-酶标记抗-大肠埃希菌抗体复合物提供的检测信号在方阵滴定时亦是阴性检测信号的一部分)。

由于 HBcAb 和抗-大肠埃希菌抗体可参与检测过程的免疫反应,因此 rHBeAg/*E. coli* 和多克隆 HBeAb 酶标记物组成的 HBeAb 检测试剂检测时将产生何种误差,取决于具体标本中这两种成分的含量以及检测方法的选择(如不采用抗原直接包被的液相-液相竞争法,可避免抗-大肠埃希菌抗体的干扰,详见后)。

2. 免疫反应性:rHBeAg/*E. coli* 可能缺失一部分天然的 HBeAg 所具有的非线性表位。由于大肠埃希菌表达的重组蛋白在肽链折叠及表达后修饰上与肝细胞所产生的 HBV 病毒蛋白存在较大差异,对于立体构型依赖性的、在肽链经折叠、卷曲形成二、三级结构的基础上,由不相邻的氨基酸残基所组成的非线性表位(discontinued epitope),大肠埃希菌的表达产物往往不能准确模拟^[4],如 HBeAg N-端的136~145 aa 附近就存在着此类立体构型依赖性的非线性表位,它需要与前-C 区部分氨基酸相互作用才能表现出其抗原性^[7,8]。在抗体检测中,检测信号由诊断抗原分子上的不同表位与相应的所有被检抗体结合而共同提供,是各种抗原表位-抗体结合信号的叠加总和。由于部分非线性表位的缺失,无法与相应的特异性抗体结合,将使检测信号减弱,导致灵敏度降低甚至漏检。

3. 检测方法:目前国内外均采用竞争抑制法检测 HBeAb,此法反应体系复杂,检测信号弱,不能精确定量,为抗体检测诸方法中最差者,只是在检测抗原质量不能满足其他检测方法时的不得已选择。理论上除了单结合位点的目的检测物外,均不应采用竞争法进行检测。总抗体检测的理想方法为双抗原夹心法,检测信号强而清晰,灵敏度高,操作简便。但夹心法对诊断抗原有很高的要求:(1)诊断抗原与检测样本中除被检抗体之外的其他成分不能发生结合反应,否则将出现明显的假阳性结果;(2)用于酶标记的诊断抗原不含影响标记酶稳定性的成分;(3)抗原与标记物交联后,其表位不被标记物所屏蔽,应保持其原有的免疫反应性。rHBeAg/*E. coli* 不能满足双抗原夹心法检测的要求:(1)由于 rHBeAg/*E. coli*与 HBcAb 之间的交叉反应及大肠埃希菌菌体蛋白与人源标本抗-大肠埃希菌抗体之间的反应,双抗原夹心法检测时可能形成固相 rHBeAg/*E. coli*-HBcAb-酶标记 rHBeAg/*E. coli* 及固相大肠埃希菌抗原-抗-大肠埃希菌抗体-酶标记大肠埃希菌抗原两种非特异性的双抗原夹心免疫复合物,提供假阳性检测信号;同理,rHBeAg/*E. coli* 也不能用于间接法抗体的检测;(2)重组抗原中混杂大量来源于表达于宿主细胞内的蛋白酶(protease),可分解酶标记抗原分子上的标记酶(如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等),影响抗原-酶结合物的稳定性。如按一般处理重组蛋白的常规加入蛋白酶抑制剂(protease inhibitor)抑制蛋白酶的活性,则将同时抑制标记在抗原上的标记酶活性,使酶标抗原失活。蛋白酶种类繁多,分子量及其他理化性质各异,一般的纯化方法很难去除。

为提高 HBeAb 检测的准确性,我们选用毕赤酵母表达系统制备重组 HBeAg 作为诊断抗原。毕赤酵母表达系统具有以下优点:(1)该系统为真核表达系统,能对表达产物进行多种表达后修饰,重组蛋白具有正确的折叠及由此产生的非线性表位,使所合成的蛋白具有与乙型肝炎病毒蛋白相似的结构和生物学活

性^[9-11]。作为重组抗原时,能拥有与母本抗原相近的表位,因此针对被检抗体具有良好的特异性及免疫反应性;(2)毕赤酵母能识别 HBeAg 前体蛋白的分泌信号肽,实现 HBeAg 的靶向分泌表达。因此,无须裂解细胞来收集产物。来源于细胞培养上清液的重组抗原成分单一^[2],不含干扰检测的菌体蛋白及蛋白酶,无须复杂的下游处理,检测结果仍具有较高的特异性,也为 HBeAb 检测方法的优化提供了条件;(3)毕赤酵母表达系统高表达、高稳定、易于操作等特点,成为大规模生物制品生产中的优势。

由于血清 HBeAg 的存在,因此虽同为竞争法,HBeAb 的检测与 HBcAb 相比干扰因素明显,检测方法的选择对结果的影响更大。检测 HBeAb 的经典方法为固相-液相竞争法:第一步在包被 HBeAb 的固相载体上加入样本与中和试剂 HBeAg,让固相 HBeAb 和样本中的 HBeAb 竞争与中和试剂 HBeAg 结合;第二步加入标记 HBeAb。如样本中无 HBeAb,第一步反应将形成固相 HBeAb-HBeAg,第二步将形成 HBeAb-HBeAg-标记 HBeAb,提供竞争法的阴性检测信号;如样本中有 HBeAb,将与固相 HBeAb 竞争结合中和试剂 HBeAg,可能封闭中和试剂 HBeAg 的抗体结合位点,抑制 HBeAg 与固相 HBeAb 结合,也抑制了固相 HBeAb-HBeAg-标记 HBeAb 的形成,提供竞争法的阳性检测信号;样本中的 HBeAb 与固相 HBeAb 也可能同时与中和试剂 HBeAg 结合,形成固相 HBeAb-HBeAg-HBeAb 夹心复合物,由于固相 HBeAb-HBeAg 的抗体结合位点已被样本中的 HBeAb 所占据,抑制了其再与加入的标记 HBeAb 结合及固相 HBeAb-HBeAg-标记 HBeAb 的形成,亦提供阳性检测信号。此方法的关键是在第一步反应后,应将固相免疫复合物与液相中成分进行洗板分离后,再进行第二步反应,以避免标本中可能存在的 HBeAg 与试剂中的标记抗体(HBeAb)结合而影响检测结果,操作过程为两步法。现在很多国内试剂生产厂家及医疗单位为简化操作程序,缩短检测时间,将 ELISA 检测 HBeAb 的方法改为液相-液相竞争法,此方法以 HBeAg 包被反应板作为固相抗原,同时加入样本和标记抗体,让样本中的 HBeAb 和标记 HBeAb 竞争与固相 HBeAg 结合,根据固相 HBeAg-标记 HBeAb 复合物形成被抑制的程度进行结果判断,以达到一步法检测的目的。由于被检样本与标记 HBeAb 一步加样,当部分样本中存在较高浓度的 HBeAg 时,其在液相中与标记抗体的结合可能封闭标记抗体的抗原结合位点,使之无法与固相 HBeAg 结合,抑制固相 HBeAg-标记 HBeAb 复合物的形成,当样本 HBeAg 强阳性而 HBeAb 阴性时,可能导致假阳性结果。更多的国内试剂为了避免 HBeAg 包被的困难,甚至采用固相-液相-液相竞争法(HBeAb 包被),由于中和试剂、被检样本及标记抗体一步加样,此时中和试剂 HBeAg 和标本中 HBeAg 均在液相中,可协同封闭标记抗体的抗原结合位点,假阳性的情况更为严重。为避免样本中的 HBeAg 对检测的干扰,本实验采用固相-液相竞争法来评价诊断抗原 HBeAg 的质量。固相-液相竞争法还可通过固相 HBeAb 对中和试剂 HBeAg 的捕获,避免抗原直接包被时 rHBeAg/*E. coli* 中的大肠埃希菌蛋白通过非特异性吸附形成固相抗原,对检测产生干扰。

实验结果显示毕赤酵母表达系统高效分泌表达了 HBeAg, ELISA 证实重组 HBeAg 免疫反应性良好, 特异性高, 在抗体识别水平上已不存在与 HBcAg 的交叉反应。分子筛柱层析操作简便、得率高, 为制备诊断抗原的常规方法, 但选择性较差。用该方法纯化两种抗原检测 HBeAb 国家参考品的结果显示, rHBeAg/*P. pastoris* 的灵敏度及阳性检出率明显高于 HBeAg/*E. coli*, 提示后者可能有表位缺失, 免疫反应性不如前者; 对 HBV PCR 阳性标本的 HBeAb 阳性检出率, HBeAg/*E. coli* 与 rHBeAg/*P. pastoris* 相比差异无显著统计学意义; 但 HBeAg/*E. coli* 对 HBV PCR 阴性标本的 HBeAb 阴性检出率明显低于 rHBeAg/*P. pastoris*, 差异有显著统计学意义。如果 HBeAg/*E. coli* 在 HBV PCR 阴性标本中检出的 HBeAb 是真实的阳性结果, 其检测灵敏度应高于 rHBeAg/*P. pastoris*, 因此也应在 HBeAb 国家参考品的灵敏度检测和阳性检出率、以及 PCR 阳性组标本的 HBeAb 阳性检出率等指标上, 同时高于 rHBeAg/*P. pastoris*。但 HBeAg/*E. coli* 在 HBeAb 国家参考品检测上的灵敏度及阳性检出率明显低于 rHBeAg/*P. pastoris*, 二者在 PCR 阳性标本的 HBeAb 阳性检出率上亦无显著差异。HBV 感染者 HBcAb 较 HBeAb 出现时间早, 持续时间长, 在病毒清除后仍能在较长时间内维持一定的滴度^[1], 而 HBeAb 在病毒清除后很快消失^[2,12], 因此无论是在感染者或既往感染者, HBcAb 的阳性率均应高于 HBeAb。因此, 综合 HBeAb 标准品及 HBV PCR 阴性和阳性标本的检测结果, 结合 HBV 感染后 HBeAb 和 HBcAb 的动态变化规律分析, 合理的解释应是: HBeAg/*E. coli* 的 HBeAb 检测结果可能存在由 HBcAb 交叉反应引起的假阳性。这种假阳性出现在 HBV PCR 阴性标本的检测结果中, 造成其阴性检出率低于 *P. pastoris*; HBV PCR 阳性组中 HBeAb 的阳性标本较多, HBeAg/*E. coli* 由于灵敏度较低, 可能出现明显的漏检。当这种假阳性出现时, 掩盖了其实际 HBeAb 阳性检出率的低下, 造成两组的阳性检出率无显著差异。

本研究表明, rHBeAg/*P. pastoris* 免疫反应性好, 特异性高, 能克服大肠埃希菌表达 HBeAg 与 HBcAg 的交叉抗原性、表位缺失等缺陷, 用于 HBeAb 检测时, 在灵敏度、特异性等指标上优于 HBeAg/*E. coli*。研究结果对于改善 HBeAb 竞争法诊断试剂的质量, 提高检测结果的准确性等有现实意义; 同时对于正确认识各种干扰因素对不同 HBeAb 检测方法的影响, 警惕所用检测方法可能产生的误差, 合理分析检测的结果等, 也有所帮助。

毕赤酵母合成的 HBeAg 在抗体识别水平上与 HBcAb 无交叉反应, 不含干扰人源标本检测结果及影响标记酶稳定的宿主细胞蛋白成分, 为研制 HBeAg 抗原酶交联 (conjugation) 提供了条件。本研究通过 rHBeAg/*P. pastoris* 和 rHBeAg/*E. coli* 的应用评价, 进一步奠定了优化 HBeAb 检测方法学的研究基础。如能在低成本的前提下, 保证抗原酶结合物的免疫反应性, 解决抗原包被的效率及固相化分子的定向 (orientation) 等问题, 双抗原夹心法 HBeAb 诊断试剂的研制及应用可能有光明的前景。

参 考 文 献

- 1 李梦东,王宇明,主编.实用传染病学.第1版.北京:人民卫生出版社,2004.377-391.
- 2 李朝霞,洪国强,胡波,等.乙型肝炎病毒合成e基因在毕赤酵母中的表达及产物免疫学特性.中华检验医学杂志,2006,9:807-812.
- 3 Sinclair G, Choy FY. Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*.2002;26: 96-105.
- 4 梁敏坚,洪国强,李朝霞,等.乙型肝炎病毒核心基因在毕赤酵母中的表达及表达产物在乙型肝炎病毒核心抗体检测中的应用评价.中华检验医学杂志,2005,28:417-422.
- 5 黄耀焯主编.肝病分子生物学.第1版.福州:福建科学技术出版社,2003.98-100.
- 6 Jean-luc P, Eric W, March HV, et al. Epitope prediction from the primary structure of protein. In: Wisdom GB, ed, *Peptide antigen*. 1th ed. Division of biochemistry, school of biology and biochemistry, the Queen's University, Medical Biology Centre, Belfast UK,1994. 7-8.
- 7 Ou JH. Molecular biology of hepatitis B virus e antigen. *J Gastroenterol Hepatol*,1997,12: S178-187.
- 8 Salfeld J, Pfaff E, Noah M, et al. Antigenic determinants and functional domains in core antigen and e antigen from hepatitis B virus. *J Virol*,1989, 63: 798-808.
- 9 Hilario E, Lатар RC, Alegria MC, et al. High-level production of functional muscle alpha-tropomyosin in *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun*,2001,284: 955-960.
- 10 Zani M, Brillard-Bourdet M, Lazure C, et al. Purification and characterization of active recombinant rat kallikrein rK9. *Biochim Biophys Acta*,2001,1547: 387-396.
- 11 Guo RT, Chou LJ, Chen YC, et al. Expression in *Pichia pastoris* and characterization by circular dichroism and NMR of rhodostomin. *Proteins*,2001,43: 499-508.
- 12 Majius LO, Lindholm A, Lundin P, et al. A new antigen-antibody system. Clinical significance in long-time carriers of hepatitis B surface antigen. *JAMA*,1975,231: 356-359.

(收稿日期:2008-05-05)

(本文编辑:温少芳)

洪国强,李朝霞,陈月燕,等.毕赤酵母及大肠埃希菌表达的重组乙型肝炎病毒e抗原在乙型肝炎病毒e抗体检测中的比较分析[J/CD].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2008,2(4):255-263.