

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003280

乙肝病毒核心相关抗原检测试剂盒的研发及临床检测

马家秀, 卢卉双, 张 津, 李亚兰, 杜 薇, 安娅欣, 蔡雪飞
(重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:研发一种检测乙肝病毒核心相关抗原(hepatitis B core-related antigen, HBcrAg)的定量检测试剂盒并评价其性能。**方法:**通过研究原材料抗体、优化制备工艺和调整反应体系建立 HBcrAg 化学发光免疫检测方法, 组装成试剂盒后利用重组 HBcrAg 和临床血清进行检测性能评估, 数据处理使用 IBM SPSS Statistics 20 软件。**结果:**该试剂盒标准曲线为 $y=143.37x+344.91$, $R^2=0.999\ 8$; 检测灵敏度为 1.43 pg/mL; 健康人参考区间 ≤ 25.595 pg/mL; 检测 208 例慢性乙型肝炎患者血清, 所有 (18/18) 乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) DNA $10^8\sim 10^4$ IU/mL 血清 HBcrAg 检出值都在这个临界值以上; 92.31% (24/26) HBV DNA $10^3\sim 10^2$ IU/mL 血清 HBcrAg 检出阳性; 44.51% (73/164) HBV DNA 低于检出限血清 HBcrAg 检出阳性。**结论:**本试剂盒能较好地检测慢性乙型肝炎患者血清中的 HBcrAg 水平, 在辅助慢性乙型肝炎患者治疗效果监测和正确判断治疗终点方面具有重要应用价值。

【关键词】乙肝病毒核心相关抗原; 化学发光免疫分析法; 试剂盒

【中图分类号】R446.61

【文献标志码】A

【收稿日期】2023-03-03

Development and clinical detection of hepatitis B core-related antigen test kit

Ma Jiaxiu, Lu Huishuang, Zhang Jin, Li Yalan, Du Wei, An Yaxin, Cai Xuefei

(Key Laboratory of Molecular Biology of Infectious Diseases Designated by the Chinese Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To develop a quantitative test kit for determining hepatitis B core-related antigen (HBcrAg), and to evaluate its performance. **Methods:** A chemiluminescent immunoassay for HBcrAg was established by studying the raw antibody, optimizing the preparation process, and adjusting the reaction system, and after the kit was assembled, recombinant HBcrAg and clinical serum were used to evaluate its detection performance. IBM SPSS Statistics 20 software was used for data processing. **Results:** The standard curve of the kit was $y=143.37x+344.91$ ($R^2=0.999\ 8$), with a detection sensitivity of 1.43 pg/mL and a reference interval of ≤ 25.595 pg/mL for healthy people. Serum samples were tested for 208 patients with chronic hepatitis B, and serum HBcrAg level was above this critical value for all 18 serum samples with an HBV DNA level of $10^8\sim 10^4$ IU/mL; for the 26 serum samples with an HBV DNA level of $10^3\sim 10^2$ IU/mL, 24 (92.31%) tested positive for serum HBcrAg; for the 164 serum samples with HBV DNA below the limit of detection, 73 (44.51%) tested positive for serum HBcrAg. **Conclusion:** This kit can determine the serum level of HBcrAg in patients with chronic hepatitis B and thus has an important application value in monitoring the treatment outcome of patients with chronic hepatitis B and correctly judging the endpoint of treatment.

【Key words】hepatitis B core-related antigen; chemiluminescent immunoassay; test kit

作者介绍: 马家秀, Email: 2020111774@stu.cqmu.edu.cn,

研究方向: 乙型肝炎检测。

通信作者: 蔡雪飞, Email: caixuefei@cqmu.edu.cn。

基金项目: 重庆市技术创新与应用发展专项重点资助项目 (编号: cstc2019jscx-dxwtBX0019)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1046.R.20230717.1547.032.html>
(2023-07-18)

据估计, 世界上有 2.92 亿人是乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 携带者, 中国大约有 8 600 万人^[1]。HBV 共价闭合环状 DNA (covalent closed circular DNA, cccDNA) 是慢性乙型肝炎病毒持续存在的关键^[2], 对评价抗病毒疗效和判断治疗终点有重要意义^[3-4], 但因其要求肝活检而受到限制。目

前,肝内 HBV cccDNA 最常用的血清替代标志物有 HBV DNA、乙肝表面抗原(hepatitis B s antigen, HBsAg)和乙肝 e 抗原(hepatitis B e antigen, HBeAg)^[5]。值得注意的是,因为药物治疗^[6]、基因整合^[7]和基因突变^[8-12]等原因,现有血清学指标与肝内 HBV cccDNA 相关性丧失。近年研究发现,血清中乙型肝炎核心相关抗原(hepatitis B core-related antigen, HBcrAg)是 HBV cccDNA 的潜在替代标志物^[2,13-14]。

本课题组针对 HBcrAg 的检测研究已经开展了大量的前期工作,筛选并制备了多株针对 HBcrAg 公共区域的特异性抗体,开发了适用于该检测的 HBV 裂解液并申请专利(一种乙肝病毒颗粒裂解液的制备与应用,202210592981.8)。在此基础上,本研究将原材料组装成试剂盒,以重组 HBcrAg 和慢性乙型肝炎患者血清作为检测样本评估检测效果,为后续进一步开发高灵敏、高特异性磁珠化学发光免疫分析试剂盒产品提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床血清 收集 2021 年 7 月和 2023 年 1 月重庆医科大学附属第二医院 85 名健康人血清和 218 例慢性乙型肝炎患者血清,样本纳入标准:①健康人血清乙肝五项全阴;②患者血清同时具有乙肝五项和 HBV DNA 检测信息;③样本量 1 mL 以上。乙肝五项和 HBV DNA 检测信息由重庆医科大学附属第二医院采用雅培试剂盒检测并提供。实验方案已获得重庆医科大学伦理委员会批准(20200630)。

1.1.2 主要试剂 HBV 裂解液、抗 HBcrAg(anti-HBcrAg)抗体(H06C、H13C、H19C 和 H39C)和重组 HBcrAg 蛋白由本实验室前期制备并保存,其中重组 HBcrAg 蛋白序列来自 Gene Bank, AY596102 中 HBV 前核心蛋白(hepatitis B precore, preC)的基因序列长度为 193 个氨基酸(amino acid, AA);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠 IgG 购于美国 BBI 生命科学公司;链霉亲和素包被的酶标板购于重庆派锐克生物技术有限公司;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、高碘酸钠、HRP、苯甲基磺酰氟(phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF)、三-(2-甲酰乙基)膦盐酸盐(Tris-(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochloride, TCEP)和异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG)购于生工生物工程(上海)股份有限公司;耐变性 Ni 亲和层析柱、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethyl

benzidine, TMB)显色液、酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)终止液购于上海碧云天生物技术有限公司;透析袋购于重庆德诺和生物科技有限公司;吡啶酯购自 Sigma 公司,生物素购自 Thermo 公司;抗 HBV 前 S1 外膜蛋白(Anti-preS1)抗体、链霉亲和素磁珠购于北京博尔迈生物技术有限公司;凝胶层析柱(Sephadex G50)购于上海联迈生物工程有限公司。

1.1.3 主要仪器 主要仪器包括分子互作分析仪(Biacore X100, 美国 GE Healthcare),全自动化学发光仪(SMART 500S, 重庆科斯迈生物科技有限公司)和多功能酶标仪(synergy H1, 美国 BioTek 公司)。

1.2 方法

1.2.1 重组 HBcrAg 蛋白制备 选择 HBV 的 preC 基因序列(Gene Bank: AY596102),经密码子优化后由北京擎科生物技术有限公司合成并构建 pET28a(+)/preC 质粒,将质粒转化入 Rosetta 大肠杆菌,菌液培养至 600 nm 光密度值达到 0.5 左右时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 37 °C 条件下诱导培养 3 h, 8 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体沉淀后用含终浓度 2 mol/L 尿素和 0.5 mol/L NaCl 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)(pH 7.8)重悬,重悬液加入终浓度 10 mmol/L PMSF 后,冰浴条件下进行超声破菌(200 W, 运行 5 s, 停止 5 s, 共 10 min),破菌液经 12 000 r/min、20 min、4 °C 条件下离心 2 次,上清液用耐变性 Ni 亲和层析柱进行纯化,纯化产物进行 12% SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色鉴定。

1.2.2 抗原抗体亲和力和测定 采用 Biacore X100 多循环动力学表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)法测定抗 HBcrAg 单克隆抗体与重组 HBcrAg 亲和力,先将重组 HBcrAg 稀释至 10、2.5、2 μ g/mL;抗 HBcrAg 单克隆抗体分别进行倍比稀释:H06C 抗体浓度配制为 0.049、0.098、0.196、0.391、0.782、1.563、3.125、6.250 nmol/L;H13C、H19C 和 H39C 抗体浓度均配制为 0.782、1.563、3.125、6.25、12.5、25、50 nmol/L。使用仪器默认参数,解离时间设置为 300 s 或 600 s,并按照页面提示放置样品和运行程序,实验结果通过 Biacore X100 配套评估软件(版本:2.0.2)拟合并计算出解离常数 K_D 值,下载数据后使用 Graph-Pad Prism 5.0 软件可视化。

1.2.3 ELISA 法鉴定抗体表位及抗体配对 根据 HBcrAg 氨基酸(amino acid, AA)序列设计 29 段短肽(B01~B29),由擎科生物技术有限公司合成,每段短肽均标记了生物素,长度为 12 AA,相邻短肽的序列前后重合 6 AA,将短肽结合于链霉亲和素包被的酶标板,每孔 100 ng, 4 °C 过夜;TBST 洗板 5 次,加入 5% BSA 溶液,室温封闭 3 h;TBST 洗板 5 次,每孔加入 100 μ L anti-HBcrAg 抗体(0.2 μ g/mL), 37 °C 孵育 1 h;TBST 洗板 5 次,每孔加入 100 μ L HRP 标记的羊抗鼠 IgG

(1:5 000 稀释), 37 °C 孵育 1 h; TBST 洗板 5 次, 每孔加入 100 μ L TMB 显色液, 37 °C 孵育 15 min; 每孔加入 50 μ L ELISA 终止液终止反应, 酶标仪测定 450 nm 处波长的光密度值。阴性对照以 PBS 溶液代替抗 HBcAg 抗体参与反应。

抗体配对先将 4 个抗体包被 96 孔板, 每孔 100 ng, 4 °C 包被过夜; 另用 HRP 标记抗体, 具体步骤如下: 80 μ L 双蒸水溶解 0.8 mg HRP, 加入 8 μ L 高碘酸钠溶液 (0.1 mol/L) 立即混匀, 2~8 °C 反应 15 min; 接着加入 15 μ L 甘油 (1%) 常温反应 30 min; 抗体与 HRP 按质量比 1:2 计算所需 HRP 的体积, 并加入至抗体溶液中; 随后将抗体与 HRP 混合液转入透析袋, 置于碳酸盐缓冲液, 4 °C 透析过夜。将重组 HBcAg 稀释成 1 μ g/mL 作为检测样品, 每孔 100 μ L, 另外 3 个标记了 HRP 的抗体作为检测抗体, 其余操作同上。阴性对照以 PBS 溶液作为样品。

1.2.4 链霉亲和素磁珠包被生物素标记抗体 按照 20:1 的摩尔比将生物素分别与 anti-preS1、H06C 和 H13C 抗体混匀, 常温静置 30 min, 随后加入终浓度为 10 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0) 常温静置 15 min, 然后将混合液转入透析袋中, 2~8 °C、PBS 透析过夜, 最后加入等体积甘油, -20 °C 保存备用。链霉亲和素磁珠先用 PBS-T (0.05% Tween-20, pH 7.4) 清洗 3 次, 抗体与磁珠比例为 2 μ g:1 mg, 取生物素标记抗体与磁珠充分混匀, 常温结合 30 min; PBS-T 洗涤 3 次, 1 mg 已包被抗体的磁珠加入 5 μ L 10 mmol/L 生物素, 对磁珠未结合表位常温封闭 15 min; PBS-T 洗涤 3 次除去未结合的生物素, 用缓冲液 (含 2% 蔗糖, 1% BSA, 0.01% Triton X-100, 0.3% Proclin300 和 1% 甘油的 PBS, pH 7.4) 稀释磁珠至 1 mg/mL 备用。

1.2.5 吡啶酯标记抗体 吡啶酯标记 H19C 和 H39C 抗体。按照每毫克抗体加入 25 μ L 10 mmol/L 吡啶酯常温避光混匀偶联 30 min; 然后加入 Tris 溶液 (终浓度为 10 mmol/L) 常温避光混匀封闭 15 min; 通过凝胶层析柱 (Sephadex G50) 除去未结合的吡啶酯, 具体步骤为: 低速离心机 1 500g 离心 1 min 去除层析柱保存液, 加入 310 μ L PBS 润洗 3 次并去除润洗液, 换上新的 1.5 mL EP 管将待纯化液体从柱子斜面顶端缓慢滴入, 1 500g 离心 1.5 min 收集滤液, 加入等体积甘油并记录浓度, -20 °C 避光保存。

1.2.6 标准曲线与灵敏度 参考中华人民共和国卫生部 2012 年发布的《临床化学设备线性评价指南: WS/T 408-2012》, 使用 TBS 配制 5% BSA 缓冲液将标准品重组 HBcAg 稀释为系列浓度 (0、0.5、2.5、12.5、62.5、312.5 μ g/mL), 利用本试剂盒对系列浓度样本进行检测, 每个浓度检测 3 次, 并采用格拉布斯 (Grubbs) 法检验离群值, 单个离群值直接去除后计算平均值, 绘制并拟合标准曲线。若 3 个值过于分散, 则需要对整套样本重新测定。Grubbs 法检验离群值方法如

下: ①将 3 个测定值按从小到大的顺序排列, 最小值记 x_{\min} , 最大值记 x_{\max} , 并计算出 3 个测定值的平均值 (\bar{x}) 和标准差 (s); ②根据公式计算统计量 t_1 、 t_2 ; ③离群值判断, 通过查表可得, 3 次重复测定对应的 Grubbs 检验临界值为 1.153 (显著性水平 $\alpha=0.05$), 若统计量 t 值大于该临界值, 考虑为离群值。

$$t_1 = \frac{x_{\max} - \bar{x}}{s}$$

$$t_2 = \frac{\bar{x} - x_{\min}}{s}$$

重复测定重组 HBcAg 稀释液 10 次, 并计算出平均值 (\bar{x}) 和标准差 (s), 将数值 $\bar{x}+2s$ 代入标准曲线方程, 最终得到本试剂盒检测 HBcAg 水平的灵敏度。

1.2.7 参考区间建立 对 75 例健康人 (乙肝五项全阴) 血清样本进行检测, 数据分析采用 IBM SPSS Statistics 20 软件, 先用非参数检验中单样本 Kolmogorov-Smirnov 检验对 75 例阴性血清样本 HBcAg 水平是否符合正态分布进行检验, 服从正态分布则采用正态分布法分析健康人参考区间; 不服从正态分布则采用 95 百分位数法。

1.2.8 试剂盒对慢性乙型肝炎患者血清阳性检出率研究 将收集到的 208 例患者血清按照不同 HBV-DNA 水平分为 3 组 (表 1), 分别统计检出率。

表 1 慢性乙型肝炎患者不同 HBV-DNA 水平分组

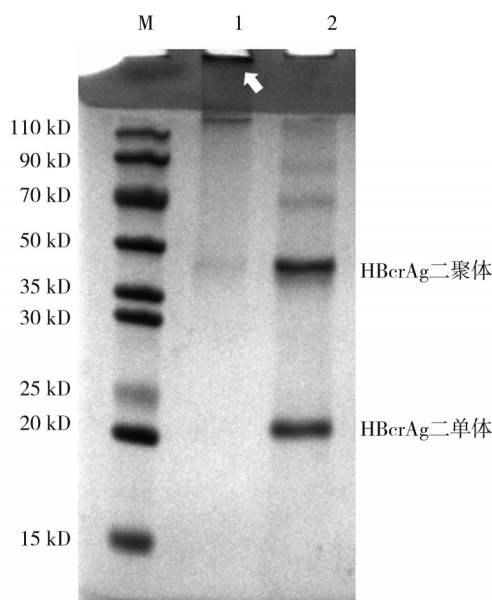
HBV-DNA (HBsAg 阳性)	样本数
$10^8 \sim 10^4$ IU/mL	18
$10^3 \sim 10^2$ IU/mL	26
低于检出限	164

1.2.9 检测流程 全自动化学发光检测仪吸取 100 μ L 血清样本与 100 μ L 抗体包被磁珠 (anti-preS1、H06C 和 H13C, 1:1:1 混合) 37 °C 孵育 15 min, 洗涤 (PBS-T, 含 0.05% Tween-20, pH 7.4) 加入 50 μ L 裂解液 (0.30% NP-40, 1.5% SDS, 3.0 mol/L 尿素, 60 mmol/L Tris-HCl) 和 100 μ L 标记抗体 (H19C-AE 和 H39C-AE) 37 °C 孵育 20 min, 洗涤并加入 100 μ L 预激发液 (0.1 mol/L HNO_3 , 1% H_2O_2) 37 °C 孵育 2 min, 最后加入 100 μ L 激发液 (0.1 mol/L NaOH) 检测。

2 结果

2.1 HBcAg 重组蛋白的纯化

由于 HBcAg 重组蛋白保持一定的 HBcAg 结构特性, 在纯化状态下容易发生聚集组装成为多聚体乃至聚集沉淀 (图 1 中 1 泳道点样孔处白色箭头指示), 通过降低盐浓度 (NaCl 浓度由 0.5 mol/L 稀释至 0.1 mol/L)、添加终浓度 20 mmol/L 的 TCEP 可以稳定地还原分子间二硫键, 使 HBcAg 重组蛋白保持单体和二聚体的状态 (图 1)。



注:M 指蛋白标准分子量 Marker;1 指 HBcrAg 多聚体的聚集;
2 指还原条件下的 HBcrAg 重组蛋白

图 1 HBcrAg 重组蛋白的表达与纯化

2.2 不同 Anti-HBcrAg 单克隆抗体与重组 HBcrAg 的亲和力

通过 Biacore X100 分子互作仪测定不同 Anti-HBcrAg 单克隆抗体与重组 HBcrAg 的亲和力。首先将重组 HBcrAg 捕获到 NTA 传感芯片上,通过多循环动力学,流动相 Anti-HBcrAg 单克隆抗体至少设置了 6 个不同浓度进样,仪器配套评估软件动力学拟合表明,4 个 Anti-HBcrAg 单克隆抗体

与重组 HBcrAg 的亲和力为纳摩尔级,存在浓度依赖性相互作用,动态拟合的 K_D 值分别为 H06C 抗体 0.089 nmol/L (图 2A)、H13C 抗体 2.98 nmol/L (图 2B)、H19C 抗体 0.29 nmol/L (图 2C)、H39C 抗体 0.33 nmol/L (图 2D)。

2.3 抗体表位分析与抗体配对评价

2.3.1 抗体表位分析 通过与 29 条 12 肽的 ELISA 检测,确定每个抗体的表位(表 2)。其中 H06C 抗体的表位位于 7 ~ 18 和 49 ~ 60AA, H13C 抗体的表位位于 37 ~ 48AA, H19C 和 H39C 抗体表位均位于 97 ~ 108AA。

2.3.2 抗体配对评价 独立样本 t 检验结果显示:抗体 H06C 做捕获(图 3A),与抗体 H13C 配对,重组 HBcrAg 高于 PBS 的平均水平,差异具有统计学意义($t=3.021, P=0.039$);与抗体 H19C 配对,重组 HBcrAg 高于 PBS 的平均水平,差异具有统计学意义($t=3.389, P=0.028$);与抗体 H39C 配对,重组 HBcrAg 高于 PBS 的平均水平,差异具有统计学意义($t=12.595, P=0.000$)。抗体 H13C 做捕获(图 3B),与抗体 H06C 配对,重组 HBcrAg 低于 PBS 的平均水平,差异不具有统计学意义($t=-0.108, P=0.920$);与抗体 H19C 配对,重组 HBcrAg 高于 PBS 的平均水平,差异具有统计学意义($t=40.390, P=0.000$);与抗体 H39C 配对,重组 HBcrAg 高于 PBS 的平均水平,差异具有统计学意义($t=12.806, P=0.000$)。抗体 H19C 做捕获(图 3C),与抗体 H06C 配对,重组 HBcrAg 高于 PBS 的平均水平,差异具有统计学意义($t=5.798, P=0.004$);与抗体 H13C 配对,重组 HBcrAg 高于 PBS 的平均水平,差异具有统计学意义

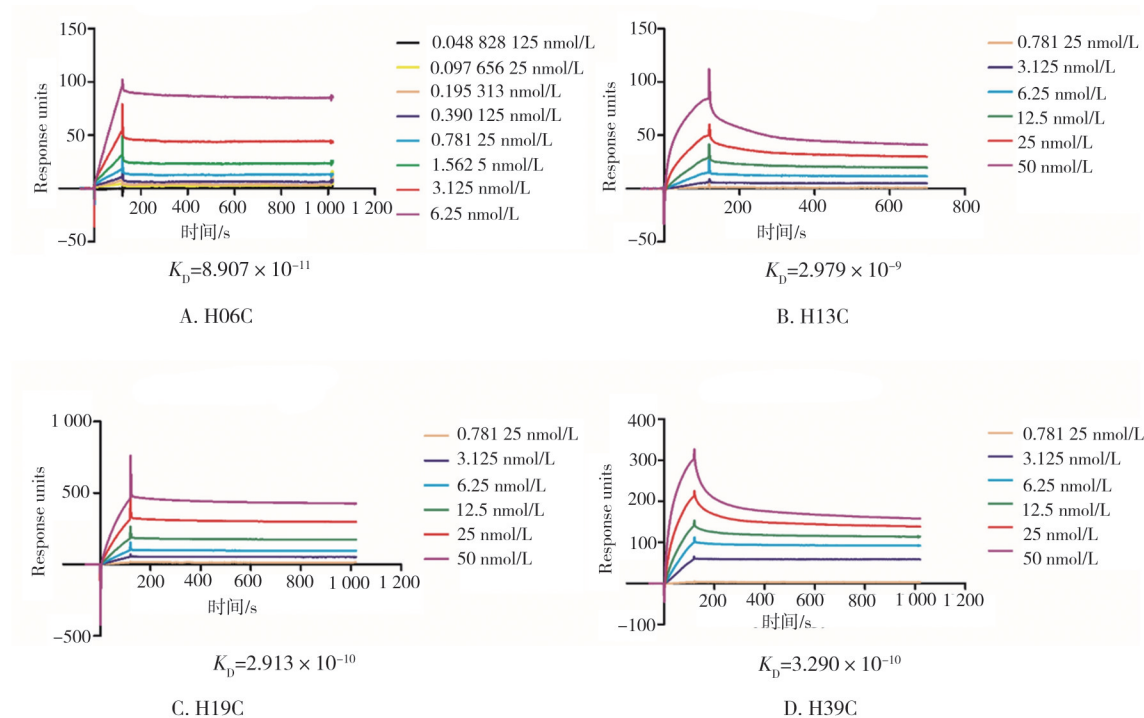


图 2 SPR 测定不同 Anti-HBcrAg 单克隆抗体与重组 HBcrAg 的亲和力

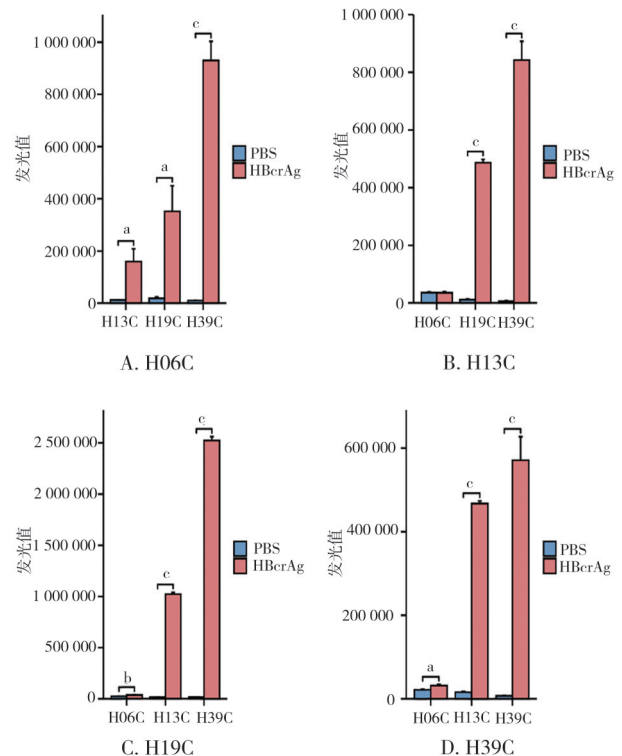
表 2 Anti-HBcrAg 单克隆抗体的表位鉴定

编号	AA 序列	H06C	H13C	H19C	H39C
B1	01 ~ 12	-	-	-	-
B2	07 ~ 18	+	-	-	-
B3	13 ~ 24	-	-	-	-
B4	19 ~ 30	-	-	-	-
B5	25 ~ 36	-	-	-	-
B6	31 ~ 42	-	-	-	-
B7	37 ~ 48	-	+	-	-
B8	43 ~ 54	-	-	-	-
B9	49 ~ 60	+	-	-	-
B10	55 ~ 66	-	-	-	-
B11	61 ~ 72	-	-	-	-
B12	67 ~ 78	-	-	-	-
B13	73 ~ 84	-	-	-	-
B14	79 ~ 90	-	-	-	-
B15	85 ~ 96	-	-	-	-
B16	91 ~ 102	-	-	-	-
B17	97 ~ 108	-	-	+	+
B18	103 ~ 114	-	-	-	-
B19	109 ~ 120	-	-	-	-
B20	115 ~ 126	-	-	-	-
B21	121 ~ 132	-	-	-	-
B22	127 ~ 138	-	-	-	-
B23	133 ~ 144	-	-	-	-
B24	139 ~ 150	-	-	-	-
B25	145 ~ 156	-	-	-	-
B26	151 ~ 162	-	-	-	-
B27	157 ~ 168	-	-	-	-
B28	163 ~ 174	-	-	-	-
B29	169 ~ 183	-	-	-	-

($t=57.791, P=0.000$); 与抗体 H39C 配对, 重组 HBcrAg 高于 PBS 的平均水平, 差异具有统计学意义($t=67.463, P=0.000$)。抗体 H39C 做捕获 (图 3D), 与抗体 H06C 配对, 重组 HBcrAg 高于 PBS 的平均水平, 差异具有统计学意义($t=3.404, P=0.027$); 与抗体 H13C 配对, 重组 HBcrAg 高于 PBS 的平均水平, 差异具有统计学意义($t=71.209, P=0.000$); 与抗体 H19C 配对, 重组 HBcrAg 高于 PBS 的平均水平, 差异具有统计学意义($t=10.027, P=0.001$)。

2.4 样本裂解液主要成分含量的确定

本检测体系中, 裂解液的效果对检测至关重要。在本课题组前期研究基础上分别混合 10 例健康人血清 (乙肝五项全阴) 和 10 例大三阳血清 (HBsAg/HBeAg/HBcAb 阳性) 用于试剂盒研发的样本裂解液 (0.60% NP-40, 1.5% SDS, 3.0 mol/L 尿素, 60 mmol/L Tris-HCl) 主要成分含量进行调整, 第一轮配制不同 NP-40 含量 (0.15%、0.30%、0.60% 和 0.90%) 的裂



注: a, $P < 0.05$; b, $P < 0.01$; c, $P < 0.001$

图 3 ELISA 法检测重组 HBcrAg

解液, 结果见表 3, 选用 0.30% NP-40 含量进行第二轮试验, 配制不同 SDS 含量 (0.6%、1.2%、1.5%、1.8% 和 3.0%) 的裂解液, 结果见表 4, 1.5% SDS 含量的检测效果最好, 阴、阳性血清发光值相差 7.3 倍; 第三轮按照前两轮中确定的 NP-40 和 SDS 含量, 配制不同尿素含量 (1.5、3.0、6.0 mol/L) 的裂解液, 尿素含量为 3.0 mol/L 时检测效果最佳 (表 5), 所以选择裂解液配方为 0.30% NP-40、1.5% SDS、3.0 mol/L 尿素、60 mmol/L Tris-HCl 进行后续研究。检测程序设置同方法部分。

表 3 不同 NP-40 含量裂解液检测阳性血清和阴性血清的发光值倍数关系

NP-40 含量/%	倍数 (阳性血清发光值/阴性血清发光值)
0.15	3.1
0.30	8.0
0.60	3.1
0.90	3.2

表 4 不同 SDS 含量裂解液检测阳性血清和阴性血清的发光值倍数关系

SDS 含量/%	倍数 (阳性血清发光值/阴性血清发光值)
0.6	1.2
1.2	2.4
1.5	7.3
1.8	1.0
3.0	1.1

表5 不同尿素含量裂解液检测阳性血清和阴性血清的发光值
倍数关系

尿素含量/(mol/L)	倍数(阳性血清发光值/阴性血清发光值)
1.5	7.2
3.0	7.3
6.0	1.1

2.5 标准曲线与检测灵敏度

以标准品重组 HBcrAg 系列浓度为横坐标,本试剂盒检测的发光值为纵坐标,绘制并拟合得到标准曲线(图4),方程为 $y=143.37x+344.91$, $R^2=0.9998$ 。平行检测 10 次标准品重组 HBcrAg 稀释液,计算发光值相应的 \bar{x} 和 s ,分别是 434.6 和 57.98,将 $\bar{x}+2s$ 的值代入标准曲线方程,得到本试剂盒对 HBcrAg 检测的灵敏度为 1.43 pg/mL。

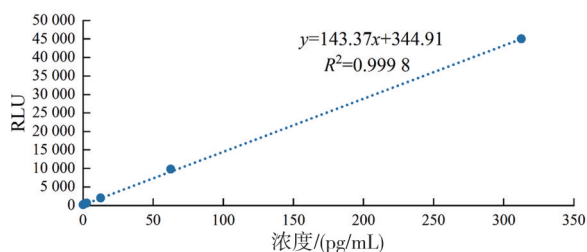


图4 HBcrAg 标准曲线

2.6 健康人参考区间

通过本试剂盒检测 75 例健康人(乙肝五项全阴)血清样本得到的 HBcrAg 水平使用 IBM SPSS Statistics 20 进行分析,单样本 Kolmogorov-Smirnov 检验显示数据不服从正态分布,接着采用百分位数法建立参考区间,得到 95 百分位阈值为 25.595 pg/mL,即健康人参考区间为 ≤ 25.595 pg/mL。

2.7 208 例慢性乙型肝炎患者血清中 HBcrAg 水平检测

将重组 HBcrAg 作为标准品建立标准曲线,通过检测 75 例健康人血清将正常参考区间设定为 ≤ 25.595 pg/mL。在这些工作基础上,为了评估本试剂盒对患者血清检出效率,使用本试剂盒对收集的 208 例不同 HBV-DNA 水平的患者血清进行检测,HBcrAg 检测水平 >25.595 pg/mL 的血清被认为是阳性样本。对样本进行分别计数,所有 HBV DNA $10^8 \sim 10^4$ IU/mL 血清 HBcrAg 检出水平均在这个临界值以上;92.31% HBV DNA $10^3 \sim 10^2$ IU/mL 血清 HBcrAg 检出阳性;44.51% HBV DNA 低于检出限血清 HBcrAg 检出阳性(表6)。

表6 试剂盒对慢性乙型肝炎患者血清 HBcrAg 的阳性检出率结果

HBV-DNA (HBsAg 阳性)	样本数	阳性检出数	阳性检出率/%
$10^8 \sim 10^4$ IU/mL	18	18	100.00
$10^3 \sim 10^2$ IU/mL	26	24	92.31
低于检出限	164	73	44.51

3 讨论

HBcrAg 由 3 种具有 149 个相同氨基酸序列的相关蛋白组成,即 HBcAg、HBeAg 和 1 个 22 kD 的 pre C 蛋白(p22Cr)^[15]。已有文献报道,HBeAg 阴转者血清 HBcrAg 与肝内 HBV cccDNA 呈显著正相关,核苷类似物(nucleoside analogues, Nas)治疗 96 周后 HBcrAg 下降与 HBV cccDNA 下降显著相关^[7]。已成为监测肝内 cccDNA 及其转录活性的潜在标记物,其定量检测在监测乙肝患者治疗疗效和正确判断治疗终点方面具有重要意义^[2,7,14]。目前国际上商品化的 HBcrAg 检测即化学发光酶免疫分析(CLEIA; Lumipulse G HBcrAg, Fujirebio)^[16],供应商只有日本富士瑞必欧株式会社一家,收费较高,且目前仅用于研究用途。

本研究以研发经济实惠且适用于临床全自动化仪器的国产 HBcrAg 定量检测试剂盒(磁珠吡啶酯化学发光免疫分析法)为目的,对本课题组前期制备的针对 HBcrAg 公共多肽区域结合的特异性抗体进行亲和力测定、表位鉴定和配对分析,最终选择 H06C 和 H13C 抗体作为捕获 HBcrAg 的固定化抗体,而 H19C 和 H39C 作为吡啶酯标记抗体,以用于 HBcrAg 的测定。由于高浓度的样本裂解液通常会使蛋白质变性并破坏抗原抗体的结合表位,而低浓度的样本裂解液达不到预期处理效果,影响检测。对样本裂解液成分进行优化,最终确定裂解液配方进行后续研究。

通过检测 75 例健康人(乙肝五项全阴)血清,将 HBcrAg 阳性的临界值设定为 25.595 pg/mL,检测 208 例慢性乙型肝炎患者血清,所有 HBV DNA $10^8 \sim 10^4$ IU/mL 血清 HBcrAg 检出值都在这个临界值以上;92.31% 的 HBV DNA $10^3 \sim 10^2$ IU/mL 血清 HBcrAg 检出阳性,这表明本 HBcrAg 检测试剂盒对慢性乙型肝炎患者血清 HBcrAg 具有很好的检出效果。值得注意的是,在检测的 164 例 HBV DNA 低于检出限血清中,有 73 例 HBcrAg 检出阳性,这意味着在 HBV DNA 检测不到时,44.51% 的乙肝患者肝内 HBV cccDNA 还有活性,可能导致病毒持续感染和再激活,进一步验证了现有研究结果^[9,17-21]。对这类

乙肝患者,停药前可以对 HBcrAg 进行连续监测,若 HBcrAg 检测出现阳性,应当引起临床高度重视。

综上所述,HBcrAg 作为临床上肝内 HBV cccDNA 有潜力的血清学替代标志物,其重要成分 HBcrAg 检测可以作为 HBV DNA 低于检出限且 HBeAg 阴性患者治疗终点判断的补充检测或辅助检测,但目前临床上还未有对应的检测试剂盒可以使用。本研究初步构建了 HBcrAg 临床检测系统,利用合适的裂解液对样本中的病毒实现核心抗原充分暴露的同时又不影响检测,从而反映乙肝病毒载量,并且磁珠吡啶酯化学发光免疫分析法有较好的特异性与灵敏度,推荐临床使用。但本研究使用样本数较少,且未进行完整的试剂盒性能验证,因此对数据的分析存在一定局限性,还需要进一步扩大样本量检测和完善试剂盒其他性能评价。

参 考 文 献

- [1] Collaborators PO. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2018, 3(6):383-403.
- [2] Wong DK, Seto WK, Cheung KS, et al. Hepatitis B virus core-related antigen as a surrogate marker for covalently closed circular DNA [J]. *Liver Int*, 2017, 37(7):995-1001.
- [3] Bourne EJ, Dienstag JL, Lopez VA, et al. Quantitative analysis of HBV cccDNA from clinical specimens: correlation with clinical and virological response during antiviral therapy[J]. *J Viral Hepat*, 2007, 14(1):55-63.
- [4] Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B[J]. *Gut*, 2015, 64(12):1972-1984.
- [5] Lampertico P, Agarwal K, Berg T, et al. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(2):370-398.
- [6] Wong DK, Seto WK, Fung J, et al. Reduction of hepatitis B surface antigen and covalently closed circular DNA by nucleos(t)ide analogues of different potency[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2013, 11(8):1004-1010. e1.
- [7] Wang L, Cao X, Wang ZZ, et al. Correlation of HBcrAg with intrahepatic hepatitis B virus total DNA and covalently closed circular DNA in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients[J]. *J Clin Microbiol*, 2019, 57(1):e01303-e01318.
- [8] Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection[J]. *Lancet*, 1989, 2(8663):588-591.
- [9] Laras A, Koskinas J, Avgidis K, et al. Incidence and clinical significance of hepatitis B virus precore gene translation initiation mutations in e antigen-negative patients[J]. *J Viral Hepat*, 1998, 5(4):241-248.
- [10] Chan HL, Hussain M, Lok AS. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis B e antigen seroconversion[J]. *Hepatology*, 1999, 29(3):976-984.
- [11] Grandjacques C, Pradat P, Stuyver L, et al. Rapid detection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of hepatitis B virus genome: correlation with viral persistence and disease severity[J]. *J Hepatol*, 2000, 33(3):430-439.
- [12] Lin CL, Liao LY, Liu CJ, et al. Hepatitis B genotypes and precore/basal core promoter mutants in HBeAg-negative chronic hepatitis B[J]. *J Gastroenterol*, 2002, 37(4):283-287.
- [13] Chen EQ, Feng S, Wang ML, et al. Serum hepatitis B core-related antigen is a satisfactory surrogate marker of intrahepatic covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):173.
- [14] Testoni B, Lebossé F, Scholtes C, et al. Serum hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) correlates with covalently closed circular DNA transcriptional activity in chronic hepatitis B patients[J]. *J Hepatol*, 2019, 70(4):615-625.
- [15] Takahashi K, Machida A, Funatsu G, et al. Immunochemical structure of hepatitis B e antigen in the serum[J]. *J Immunol*, 1983, 130(6):2903-2907.
- [16] Kimura T, Rokuhara A, Sakamoto Y, et al. Sensitive enzyme immunoassay for hepatitis B virus core-related antigens and their correlation to virus load[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(2):439-445.
- [17] Hadziyannis SJ, Lieberman HM, Karvountzis GG, et al. Analysis of liver disease, nuclear HBcrAg, viral replication, and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HBeAg vs. anti-HBe positive carriers of hepatitis B virus[J]. *Hepatology*, 1983, 3(5):656-662.
- [18] Matsuyama Y, Omata M, Yokosuka O, et al. Discordance of hepatitis B e antigen/antibody and hepatitis B virus deoxyribonucleic acid in serum. Analysis of 1063 specimens[J]. *Gastroenterology*, 1985, 89(5):1104-1108.
- [19] Bonino F, Rosina F, Rizzetto M, et al. Chronic hepatitis in HBsAg carriers with serum HBV-DNA and anti-HBe[J]. *Gastroenterology*, 1986, 90(5 Pt 1):1268-1273.
- [20] Seto WK, Hui AJ, Wong VW, et al. Treatment cessation of entecavir in Asian patients with hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B: a multicentre prospective study[J]. *Gut*, 2015, 64(4):667-672.
- [21] Jeng WJ, Chen YC, Chien RN, et al. Incidence and predictors of hepatitis B surface antigen seroclearance after cessation of nucleos(t)ide analogue therapy in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B [J]. *Hepatology*, 2018, 68(2):425-434.

(责任编辑:冉明会)