

# 马抗乙型肝炎表面抗原的抗体(抗 HBs) 的性质及制备方法

谢彦博 王际彰 许健音

(北京生物制品研究所,北京)

本文报告用于放射免疫分析、反向被动血凝等高敏感度检测 HBsAg 试验的纯抗 HBs 的制备方法。用 HBsAg-抗 HBs 免疫复合物免疫马匹得到抗 HBs 血清,其抗 HBs 效价为 1:128—1:256,抗正常人血清蛋白抗体效价为 1:64—1:128。用半饱和硫酸铵沉淀法制备得球蛋白部分,通过 DEAE-纤维素离子交换层析柱(平衡用 0.003M 磷酸盐缓冲液,起始 pH8.0)后,用聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫电泳检测,证实为单一成份的 A 峰;马的抗 HBs 及抗正常人血清蛋白抗体(抗 HuSP)主要集中在 A 峰。将 A 峰通过偶联正常人血清的亲和层析柱,除尽其中的 HuSP,即得到纯的抗 HBs。

对其中的 A 峰进行分析定位,表明 A 峰即马的 IgG<sub>α</sub> 亚类。

采用高敏感度的检测乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的方法,如反向被动血凝、放射免疫、血球免疫粘连等,对于控制乙型肝炎的传播是一项重要的措施。用这些方法需有纯的抗乙型肝炎表面抗原的抗体(抗 HBs),这种纯抗体,国外一般采用密度梯度离心法制备的纯 HBsAg 免疫动物制得。此法需用超速离心机,故不易普遍推广。1974年,我们将 HBsAg-抗 HBs 免疫复合物免疫马匹所得的抗血清,用亲和层析法吸收其中的抗正常人血清蛋白的抗体(以下简称抗 HuSP),制出单价特异性血清<sup>[1]</sup>。在使用中发现,这种抗血清虽已不含抗 HuSP,但用于反向被动血凝时,结果常不够稳定,用于放射免疫自显影则背景较深,这是由于其中尚含有许多非抗体的蛋白质。因此我们对这种马抗血清进行了免疫化学分析,找出马抗 HBs 的定位,并应用 DEAE-纤维素离子交换层析和亲和层析制出纯的抗 HBs,已应用于反向被动血凝<sup>[2]</sup>和放射免疫自显影法<sup>[3]</sup>,效果较好。

## 实验方法和结果

### (一) 马抗 HBs 及马抗 HuSP 的初步定位

用 HBsAg-抗 HBs 在对流电泳中形成的免疫复合沉淀线免疫马匹得到 291 号马免疫血清,其抗 HBs 对流电泳效价为 1:128—1:256,同时含有对流电泳效价为 1:64—1:128 的抗 HuSP。用免疫电泳法检查,除出现 HBsAg-抗 HBs 沉淀线外,尚出现十余条正常人血清蛋白沉淀线(图版 I-1)。利用琼脂电泳和免疫电泳以分离和纯化马抗 HBs,由图版 I-2 可见,正常马血清的丙种球蛋白含量较低,免疫马血清的丙种球蛋白含量明显增高。从免疫马血清经半饱和硫酸铵沉淀法制备的球蛋白部分,主要含有丙种球蛋白、少量的甲种、乙种球蛋白及微量的清蛋白。

丙种球蛋白是高度异质性的蛋白质,但在普通的电泳条件下只表现为电泳速度

本文于 1976 年 12 月 4 日收到。

分布较宽的连续色带。用免疫电泳法则可观察到马的丙种球蛋白的异质性<sup>[4]</sup>。我们用正常马血清给家兔免疫产生兔抗马血清,用这种抗血清检查正常马血清和免疫马球蛋白的抗原性。结果见图版 I-3, 4。从图版 I-3 可见,兔抗马血清与正常马血清中的清蛋白、甲种和乙种球蛋白等生成多条沉淀线,其数目与强度则各兔有所不同。6 只兔子中有 4 只兔子(2 号、4 号、5 号和 6 号)对正常马血清的丙种球蛋白部分生成三条明显的沉淀线(a、b、c),与 Rocky<sup>[4]</sup>所报告的 IgGa、IgGb、IgGc 亚类的图形相符。免疫马球蛋白除了清蛋白沉淀线微弱之外,其余与正常马血清相同,亦可观察到 IgGa、IgGb、IgGc 三条沉淀线。我们还用比较免疫电泳法对马抗 HBs 和抗 HuSP 进行定位,即在圆孔中加入免疫马球蛋白样品,电泳后在一侧槽中加入兔抗马血清检测马球蛋白的抗原性,在另一侧槽中加入正常人血清或纯 HBsAg,经扩散后,兔抗马血清与作为抗原的免疫马球蛋白生成 IgGa、IgGb、IgGc 等沉淀线;同时,免疫马球蛋白作为抗体又可与相应的抗原,即正常人血清或纯 HBsAg 生成沉淀线。这些沉淀线的位置和 IgGa 弧线的中部相合(图版 I-4),初步说明 291 号免疫马的抗 HBs 和抗 HuSP 均属于 IgGa 亚类。

## (二) 马抗体 IgG 的分离和提纯

为进一步确定 291 号免疫马抗体的亚类归属,我们将其分离提纯。

DEAE-纤维素层析参考 Cordal<sup>[5]</sup>制备 IgGa、IgGb, 和 Raynaud<sup>[6]</sup>制备 IgA 的方法进行。取 DEAE-纤维素(Whatman, Chromedia DE11型)25 克,依法用含有 0.5N NaCl 的 0.5N NaOH、含有 0.5N NaCl 的 0.5N HCl 和含有 0.5N NaCl 的 0.5N NaOH 顺序处理后装入直径 2 × 55 厘米色层柱中,以 0.003M 磷酸盐缓冲液(起始 pH8.0),流洗平衡。取

经半饱和硫酸铵沉淀法制备的免疫马血清球蛋白 35 毫升(相当于 35 毫升的免疫马血清),用起始缓冲液透析平衡,2500 转/分离心 15 分钟除去生成的沉淀后上样。上样后采用分段洗脱,所用缓冲液依次为:

第一段(起始缓冲液): 0.003M P.B., pH8.0;

第二段: 0.005M P.B., pH8.0;

第三段: 0.05M P.B. + 0.02M NaCl, pH4.4;

第四段: 0.1M P.B. + 0.5M NaCl, pH4.4.

流速为 60—70 毫升/小时,自动分部收集并用 Uvicord II 型紫外吸收仪自动描记 280 毫微米波长光密度,描出曲线见图 1。在第一段出现高而稍拖尾之 A 峰,该峰

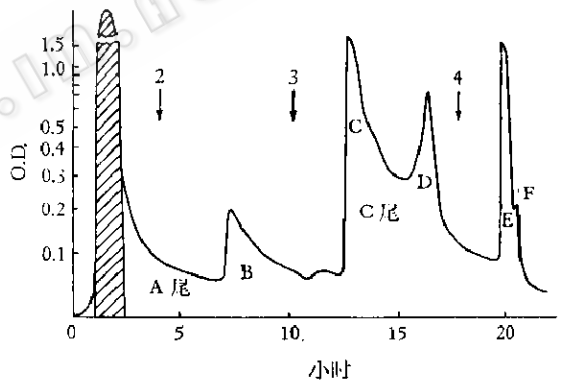


图 1 291 号免疫马球蛋白的 DEAE-纤维素离子交换层析图谱。

第一段(起始)缓冲液: 0.003M 磷酸钠缓冲液(P.B.), pH8.0;

第二段缓冲液(箭头 2): 0.005M P.B., pH8.0;

第三段缓冲液(箭头 3): 0.05M P.B. + 0.02M NaCl, pH4.4;

第四段缓冲液(箭头 4): 0.1M P.B. + 0.5M NaCl, pH4.4.

斜线阴影代表 HBsAb 阳性。

为在该起始缓冲液条件下不被吸附之物质,故称为流穿峰;第二段出现较小的 B 峰;第三段出现带拖尾之 C 峰及较对称之 D 峰;第四段出现 E 峰及另一较小的 F 峰。将收集各管用对流电泳检测其抗 HBs 及抗 HuSP 的活性,结果活性均集中在 A 峰主

体,其他各管未测出抗体活性。

### (三) DEAE-纤维素层析各分段之聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

将 A 峰各管和经过浓缩的其他各峰段作 PAGE,凝胶浓度为 6%,交联度为 2%,使用过硫酸铵作为催化剂,最后用氨基黑染色,结果见图版 I-5, 6。

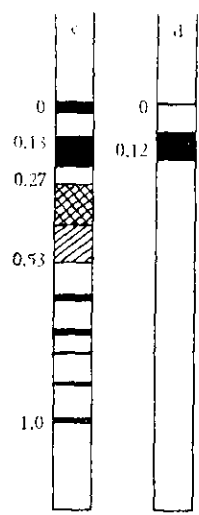


图 2 聚丙烯酰胺凝胶电泳图(图版 I-5)c 及 d 的比迁移率(以清蛋白为 1.0)。

其中 5 a 为正常马血清; 5 b 为 291 号免疫马血清。与正常马血清相比,免疫马血清在比迁移率(以清蛋白为 1.0) 0.13 处出现深而边缘较宽之色带; 5 c 为从 291 号免疫马血清制出之球蛋白,在比迁移率 0.13 处有深而边缘较宽之色带,在 0.27 处有较浅之色带,在此色带以下直至 0.53 处为界限不清的连续色区,此外尚残存很浅的清蛋白色带,

A 峰各管均为单一的色带,只是在胶面上有少量不进胶的着色物,可能为聚合的免疫球蛋白。5 d 为 A 峰顶部单管之照片,其单一的色带的比迁移率为 0.12 (见图 2); c 为 A 峰尾部,亦为单一色带,比迁移率为 0.13。5 f 为 B 峰,在 0.15 处有较深之色带,其下还有少量着色物质,所以纯度较差。5 g 为 C 峰及 5 h 为 C 峰尾,均有三条色带,其位置相应为 0.15, 0.27, 0.39, 0.17, 0.28, 0.44。5 i 为 D 峰,较不均一,有多条色带,但主带位置在 0.51 处; 5 j 为 E 峰,最不均一,共有色带十几条。由于 A 峰是按照 Cordal 制备马 IgGa, B 峰是制备马 IgGb 的条件制备出来的,可以推测,比迁移率为 0.12—0.13 的 A 峰为马 IgGa,比迁移率为 0.15 的 B 峰为不纯的马 IgGb。C 峰及 D 峰是按照 Ray-

naud 制备 IgA 的条件制备出来的, PAGE 试验表明其纯度较差。E 峰是包括铜蓝蛋白、多种甲、乙球蛋白和微量清蛋白的混合物。

### (四) 抗原性及抗体活性的分析

将所得各峰样品以免抗马血清用免疫电泳检查其抗原性,结果见图版 II-1。1b 为 A 峰,可见一条较深的长弧线,其泳速最慢; 1f 为 B 峰,亦为一条弧线,其泳速较 A 峰为快。如将 A、B 峰以 1:1 比例混合再作免疫电泳(1d)则可重现免疫马球蛋白之图谱(1c,参考 1a),即出现 IgGa、IgGb 沉淀线,因而证明了 A 峰即 IgGa, B 峰即 IgGb。用比较免疫电泳法检查各峰的抗体活性的结果见图版 II-2, 3, 4,可见抗体活性(抗 HBs 及抗 HuSP)均集中在 A 峰(IgGa), B 峰(IgGb)经高度浓缩后仍只有微弱的抗体活性,可能因其中尚混有微量的 IgGa 之故。

### (五) 抗 HBs 的提纯

用 DEAE-纤维素层析法可制得纯 IgGa,用不含 HBsAg 的正常人血清偶联到 Sepharose 4B 上作为免疫吸收剂,其中的抗 HuSP 可通过亲和层析法除去。详细方法见参考资料<sup>[1]</sup>。这样制得的抗 HBs 经 PAGE 及免疫电泳检查均为单一的 IgGa,蛋白质含量一般 20 毫克/毫升,对电泳效价一般为 1:128,未测出抗 HuSP (图版 II-5),亦未测出正常人血清蛋白成份(如正常人血清免疫吸收剂质量不好,在层析过程中正常人血清蛋白可能脱落,影响抗 HBs 制品质量),琼脂扩散(图版 II-6)及免疫电泳试验(图版 II-7)亦证明不含抗 HuSP 抗体。

## 讨 论

(一) 放射免疫及反向被动血凝等高灵敏度检测 HBsAg 的方法需要有纯的抗 HBs。这种纯度有两个方面。其一,从免疫

学的角度来看,除了抗HBs之外,不能含有抗正常人抗体,也不能含有正常人血清蛋白与抗正常人抗体生成的可溶性抗原抗体复合物。由于高纯度的HBsAg的制备比较困难,一般实验室制备的抗血清中除了抗HBs之外,尚含有不等量的抗正常人抗体。用普通的液相免疫吸收法虽能吸收抗正常人抗体,但产品中含有大量的正常人血清蛋白以及可溶性抗原抗体复合物,因而只能用于低敏感度的检测方法。用亲和层析吸收法则可以避免这种缺点。其二,从生物化学的角度来看,动物抗HBs血清中除了抗HBs之外尚有大量的其他血清蛋白质,免疫球蛋白本身也分为许多类及亚类,因此必须将非抗HBs的血清蛋白质,其中包括各种免疫球蛋白尽量除去。我们的工作表明马的抗HBs主要属于IgGa亚类,可以用DEAE-纤维素层析法提纯。这样经过DEAE-纤维素层析-亲和层析制备的纯抗HBs已用于反向被动血凝和放射免疫自显影,效果较好。

(二)关于抗HBs之化学本质的报道不多, Kim等报道<sup>[7]</sup>豚鼠及兔的抗HBs为IgG,但其免疫电泳沉淀线与已知的球蛋白品种均不融合。人的抗HBs亦有此种情况<sup>[8]</sup>。马的免疫球蛋白可分为IgGa、IgGb、IgGc、IgA(或T蛋白)、IgM、10Sr<sub>1</sub>等6种<sup>[4]</sup>。马的抗HBs的本质尚未见有报道。Johnston等报道<sup>[9]</sup>马抗人IgG的抗体可分为r<sub>1</sub>(IgA)、r<sub>2</sub>(IgG)两类。它们的比例在不同的免疫时相有所不同;它们与人IgG生成的反应类型也有不同。我们的工作说明马抗HBs主

要为IgGa,至于其他各类及亚类的免疫球蛋白如IgGb、IgGc、IgA等有无抗HBs活性的问题,有待制出纯的各该Ig后方能决定。

(三)关于用DEAE-纤维素层析制备IgG的条件,文献报道较多。总的原则是利用IgG的等电点比其他血清蛋白质高的特点,使IgG不经吸附直接流穿出来,其他蛋白质则吸附在柱上,因此起始缓冲液的选择非常重要。对于人IgG,曾有报道用0.01MP.B., pH7.4作为起始缓冲液;我们曾报道<sup>[2]</sup>用Raynaud<sup>[6]</sup>的0.0175M磷酸盐缓冲液(起始pH6.3)提取马的IgG,但所得A峰用PAGE检查只有前面数管为单一色带。本文中改用0.003M磷酸盐缓冲液(pH8.0),则A峰主体均为单一色带。用此条件对正常马血清及其他马抗血清进行分段也可得到相似的结果。

### 参 考 资 料

- [1] 北京生物制品研究所生化室诊断用品室: 微生物学通报, 2 (2): 17, 1975。
- [2] 许健音等: 微生物学报, 16: 148, 1976。
- [3] 天津市卫生防疫站肝炎小组: 天津医药, 1975年第7期 358页。
- [4] Rocky, J. H. et al.: *J. Exp. Med.*, 120: 589, 1964.
- [5] Cordal, M. E. et al.: *Immunochem.*, 11: 765, 1974.
- [6] Raynaud, M. et al.: *Ann. L'Inst. Past.*, 109:525, 1965.
- [7] Kim, C. Y. et al.: *J. Infect. Dis.*, 124: 411, 1971.
- [8] Kim, C. Y. et al.: *J. Infect. Dis.*, 123: 618, 1971.
- [9] Johnston, S. L. et al.: *J. Immunol.*, 100: 942, 1968.

## PREPARATION AND SOME PROPERTIES OF HORSE ANTI-HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN ANTIBODY (ANTI-HBs)

Xie Yan-bo, Wang Ji-zhang and Xu Jian-yin

(National Vaccine and Serum Institute, Beijing)

A method for the preparation of purified horse anti-HBs, antibody suitable for use in highly sensitive methods such as radioimmunoassay and reversed passive hemagglutination is described.

The antiserum was obtained from the horses by injecting HBsAg-anti-HBs immune complex with a counter-current electrophoretic titer ranging 1:128—1:256 for HBsAg and 1:64—1:128 for normal human serum proteins (NHuSP). The globulin fraction, prepared by half-saturated ammonium sulfate precipitation, was applied to a DEAE-cellulose (DE 11) ion-exchange chromatographic column, equilibrated with 0.003 M phosphate buffer, pH 8.0. The break-through peak, called peak A, was analysed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and shown to be a single band. A single precipitation line was also given by immunoelectrophoretic analysis. Horse anti-HBs and anti-NHuSP antibodies were present in peak A. The peak A was then passed through an affinity chromatographic column, prepared by cross-linking NHuSP to CNBr-activated Sepharose 4B. The anti-NHuSP were exhaustively absorbed and the break-through peak containing the pure anti-

HBs was concentrated to 20 mg protein/ml. This purified anti-HBs preparation was used satisfactorily in radioimmuno-counter current electrophoresis and reversed passive hemagglutination.

During the development of this preparative method, the electrophoretic localization of horse anti-HBs and anti-NHuSP was studied. The immune horse serum globulin was separated by DEAE cellulose chromatography using stepwise elutions into various peaks designated A—F. PAGE, immunoelectrophoresis and comparative immunoelectrophoresis were used to verify the purity, composition as well as immunological activities of these peaks. By PAGE studies the single band in peak A was found to have a relative mobility of 0.12 (as compared to serum albumin). Peak B was found to be virtually homogeneous and to have a relative mobility of 0.15, but the other peaks were found to be inhomogeneous. Immunoelectrophoretic studies using rabbit anti-horse serum protein antiserum (RAHSP) showed 3 precipitation arcs with horse IgGc subclasses as reported by Rocky et al. Peak A in which the anti-HBs activity located was identified to be IgG<sub>a</sub> by this method.