

用酶标记抗体法检测乙型肝炎表面抗原的初步报告

周葆华 王玉琴

(北京第二传染病医院病毒性肝炎研究室, 北京)

马连提 赵爱珍 陈仁

(北京第二医学院微生物学教研组, 北京)

乙型肝炎表面抗原(以下简称 HBsAg)的检测一般采用对流电泳(CEP)或放射自显影(RCEP)等方法。这些方法或不够灵敏,或需要特殊设备,操作复杂,所以还不能推广应用。

近年来建立了固相免疫酶法(DASS)^[1,2],其原理是使抗原和抗体在支持物(Sepharose-4B)上互相作用,然后用酶标记抗体,最后用酶的底物显色,根据是否显色及颜色的深浅判断反应的结果。此法灵敏度较高,操作简便。

本文报道一种 HBsAg 的过筛检测方法。

材料和方法

(一) 抗乙型肝炎表面抗原的血清(抗-HBs):

由北京生物制品研究所供给。

(二) 酶标记抗体的制备: 用过碘酸钠法^[3]。

取5毫克辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, 西德 Boehringer Mannheim GmbH 产品, 分析二级, R_2 0.51), 溶于1毫升0.3 M 碳酸氢钠中, 加0.1毫升1%二硝基氟苯无水乙醇溶液, 在室温下轻搅1小时。然后加入1毫升0.06 M NaIO₄, 在室温下搅30分钟。再加入1毫升0.16 M 乙二醇, 继续在室温下轻搅1小时。在4°C对1000毫升0.01 M pH 9.5 碳酸盐缓冲液透析18小时, 在此过程中换缓冲液三次(共3000毫升), 透析后加含5毫克纯化的抗-HBs 免疫球蛋白G的0.01 M 碳酸氢钠缓冲液1毫升, 在室温轻搅2—3小时。再加5毫克 NaBH₄, 于4°C放置3小时, 对PBS (0.01 M, pH 7.4) 透析后, 在4°C 10000 转/分离心。上清即为酶标记抗体。

(三) 抗-HBs 和琼脂糖珠的偶合: 取1克溴化氢活化的琼脂糖珠凝胶(瑞典 Pharmacia 产品), 放玻璃滤器内用200毫升0.001 M HCl 溶液

膨胀并洗涤15分钟, 然后与5毫克抗-HBs 免疫球蛋白G (溶于5毫升含0.5 M NaCl 的0.1 M NaHCO₃ 缓冲液中), 在试管内混合, 在室温下反复旋转2小时, 反应后用相同缓冲液洗2次, 除去游离的免疫球蛋白。再与0.5 M pH 8.2 乙醇胺反应2小时, 除去残余的活化基因。然后分别用含有1 M NaCl 的0.1 M pH 4.0 的醋酸缓冲液, 含有1 M NaCl 的0.1 M pH 8.5 硼酸缓冲液, 5倍量0.02 M pH 7.8 PBS 洗三次, 除去非共价吸附的免疫球蛋白, 并稀释成适当的浓度, 于4°C 冰箱保存。

(四) 过筛检测方法: 取清洁的载玻片, 用涂血片法涂上一层2%的明胶, 放室温自然干燥成一薄膜, 用毛细管加偶合的琼脂糖珠约10—20个于明胶膜上, 待干后备用。

试验时, 加一小滴(约10—15微升)待检新鲜血清和相应对照液于琼脂糖珠上, 在室温反应30分钟后, 用0.05 M pH 7.6 含0.6 M NaCl 的 PBS 浸泡15分钟。晾干后加一小滴用0.5 M pH 7.4 PBS 稀释的酶标记抗体, 在室温反应30分钟, 再用同样缓冲液浸泡15分钟。晾干后加一滴酶底物(0.075% 3, 3'-二氨基联苯胺内含30% H₂O₂, 0.001毫升), 显色8分钟后浸于0.05 M pH 7.6 Tris-HCl 缓冲液中, 5分钟后取出, 在普通光学显微镜下观察, 根据琼脂糖珠呈色的深浅, 以不同“+”作记录。(—): 无色; (+): 浅黄色; (++) 黄色; (+++): 棕黄色; (++++): 棕褐色。(++) 以上者为阳性结果。(见图版1-1—5)

(五) 酶标记抗体最适稀释度的选择: 在1:4,

本文于1978年12月18日收到。

北京生物制品研究所供给抗-HBs 血清。

1:8, 1:16, 1:32……1:512 稀释的 HBsAg 阳性血清和 1:50, 1:100, 1:200 稀释的酶标记抗体之间,用方阵法定选 1:50-1:100 之间稀释的酶标记抗体为最适浓度。本试验选用 1:50 的稀释度。

(六) 反应特异性的鉴定: 在反应系统中,以小牛血清代替试验血清,或不加酶标记抗体,或用马抗-HBs 血清与 HBsAg 阳性血清预先作用,琼脂糖珠均不呈“++”,正常马血清不起抑制作用,仅在加入 HBsAg 阳性血清时呈“++”,表明显色结果是特异性抗原-抗体反应所致。

结果和讨论

我们应用上述的方法,检测了 164 例各类型肝炎病人的血清标本,与反向被动血凝 (RPHA),放射免疫自显影及对流电泳三种方法进行比较,如表 1,表 2 所示。

对 DASS 法和 CEP 法均呈阳性反应的 10 份血清标本进行滴度比较。测定结果是 DASS 法滴度较 CEP 法平均高 12.8 倍。(见表 3)

以上结果可以看出本法测定乙型肝炎表面抗原,操作简便,灵敏度比较高,节省时间,初步认为此法可在实践中应用。

表 1 四种方法检测各类型肝炎病人血清 HBsAg 阳性率的比较

方 法	DASS		RPHA		RCEP		CEP	
	阳性数	%	阳性数	%	阳性数	%	阳性数	%
164	64	39	85	51.6	50	30	27	16.5

表 2 DASS 法与 RPHA, RCEP 和 CEP 法检测 164 例血清标本 HBsAg 的比较

结 果	DASS (+)						DASS (-)															
	RPHA (+)		RCEP (+)		CEP (+)		RPHA (-)		RCEP (-)		CEP (-)											
	例数	%	例数	%	例数	%	例数	%	例数	%	例数	%										
164	47	29.37	22	16.5	8	4.8	27	16.8	37	22.5	38	23	12	7	0	0	71	43.7	88	53.6	100	61

表 3 DASS 法与 CEP 法检测 HBsAg 滴度的比较

标本号	CEP 滴度	DASS 滴度	滴度增加倍数
献血员 1	1:64	1:256	4
献血员 2	1:32	1:256	8
献血员 3	1:16	1:64	4
肝炎病人 4	1:8	1:64	8
肝炎病人 5	1:8	1:8	16
肝炎病人 6	1:8	1:256	32
肝炎病人 7	1:2	1:32	16
肝炎病人 8	1:8	1:8	16
肝炎病人 9	1:4	1:64	16
肝炎病人 10	1:4	1:32	8

参 考 文 献

[1] Engvall, E. et al.: *Immunochemistry*, 8: 871, 1971.

[2] Streefken, J. G. et al.: *Annals of The New York Academy of Sciences*, 254: 212, 1975.