

# 免疫粘附血凝试验用乙型肝炎表面抗原特异性抗血清的制备

河南省卫生防疫站肝炎组

免疫粘附血凝 (IAHA) 试验检测乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 敏感性高, 但需要 HBsAg 单价特异性抗血清 (anti-HBs), 否则易出现假阳性反应。为获得单价 anti-HBs, 在没有纯 HBsAg 供免疫的情况下多采用亲和层析法; 即将正常人血清蛋白经溴化氰联结于珠状琼脂糖凝胶, 装柱后, 将动物抗血清穿流过柱, 以吸收其中抗正常人血清蛋白抗体。所获单价 anti-HBs 即可用于 IAHA 试验或再经其他处理用于反向被动血凝试验<sup>[1]</sup>。但亲和层析法, 操作复杂, 一般实验室不易做到。

我们用 Avrameas 等人<sup>[2]</sup>方法, 加戊二醛于正常人血清(或血浆), 使蛋白聚合为不溶性物质, 装柱后, 亦可用于吸收动物抗血清中抗正常人血清蛋白抗体, 制得的单价 anti-HBs 已用于 IAHA 试验。简介如下:

## 一、豚鼠抗乙型肝炎表面抗原特异性

### 抗血清 (anti-HBs)

HBsAg 阳性血清经硫酸铵沉淀—加热法纯化<sup>[3]</sup>, 再经葡聚糖 G-200 凝胶过滤, 浓缩至对电泳泳度 1:32, 加等量福氏完全佐剂, 免疫豚鼠。所得 anti-HBs 的滴度以电泳泳法检查为 1:64, 其抗正常人血清蛋白抗体滴度为 1:8—1:16。

## 二、马冻干抗血清 (anti-HBs)

系武汉军区军事医学研究所制备, 原始 anti-HBs 滴度 1:128, 抗正常人血清蛋白抗体滴度 1:4。

## 三、正常人血清(血浆)之聚合

1. 以电泳泳法检查 HBsAg 阴性正常人混合血清 10 毫升, 置透析袋内, 在生理盐水中 4℃ 透析过夜, 次日加 1M 的 pH 7.0 磷酸缓冲液 (P. B. S.) 1 毫升, 然后点滴加入 2.5% 戊二醛(溶于 0.1M 的 P. B. S. 中, 边加边摇) 3 毫升。血清很快变为胶状物, 室温放置 3 小时, 将胶状物切碎, 加入适量 0.1M 的 P. B. S., 用玻璃匀浆器一部分一部分地研碎, 粗颗粒可多研几次。3000 转/分离心 5 分钟, 用 0.1M P. B. S. 洗涤数次, 再用 0.2M 甘氨酸盐酸缓冲液 (pH 2.4) 洗涤数次, 最后悬于 0.1M P. B. S. 中。

2. 正常人血浆干粉 500 毫克溶于 0.2M 醋酸缓冲液 (pH 5.0) 10 毫升, 点滴加入 2.5% 戊二醛(溶于上述醋酸缓冲液) 3 毫升, 边加边摇, 室温放置 5 小时, 将形成的胶状物研碎, 以后各步骤与 1 同, 最后亦悬于 0.1M 的 P. B. S. 内。

3. 将上述 1、2 戊二醛聚合的正常人血清(血浆)不溶性蛋白混合, 装柱 (1.5 × 15 厘米), 以洗脱液平衡备用。

## 四、加 样

加豚鼠抗血清或马抗血清 1 毫升, 样品进入柱体后接洗脱液 (0.1M 的 P. B. S.), 流速 6—8 毫升/小时, 收集蛋白反应阳性部分(用 20% 磺基水杨酸测试), 置玻璃纸袋, 电风吹风浓缩至原体积。过柱样品后, 加 P. B. S. 洗涤, 再缓慢通过 0.2M 甘氨酸盐酸缓冲液 50—80 毫升以解离已吸附的抗正常人血清蛋白抗体, 再以 P. B. S. 充分洗涤, 备再次加样。

## 五、结 果

1. 抗正常人血清蛋白抗体吸收情况: 过柱前, 豚鼠及马抗血清中均含有抗正常人血清蛋白抗体, 对电泳泳滴度分别为 1:16 及 1:4。过柱后, 用对电泳泳及电泳泳法检查均未能再发现此类抗体(见表), 说明吸收是完全的。

2. anti-HBs 回收情况: 过柱吸收后, 豚鼠及马抗血清的 anti-HBs 滴度(电泳泳法)有所下降(见表), 这可能是在操作过程中抗体有些丢失, 但也难于排出做免疫吸附剂的正常人血清(血浆)含有低滴度 HBsAg 的可能性。

表 抗血清过柱吸收前后滴度比较

动物	批号	抗正常人血清蛋白 抗体滴度*		anti-HBs 滴度*	
		过柱前	过柱后	过柱前	过柱后
豚鼠	1	1:16	0	1:64	1:32
	2	1:16	0	1:32	1:16
马	3	1:4	0	1:64	1:48
	4	1:4	0	1:64	1:32

\* 电泳泳法滴度。

3. 豚鼠及马抗血清过柱后, 不再做别的处理即可直接用于 IAHA 试验, 如用于反向被动血凝试验, 则需除去抗血清中除抗体球蛋白以外的蛋白成分, 方可作致敏血球之用。

## 参 考 资 料

- [1] 北京生物制品研究所, 生物化学室与诊断用品室, 微生物学通报, 1975, 第 2 卷第 2 期 17 页。
- [2] Avrameas S. 等 Immunochem. 6: 53, 1969.