

酶连接免疫吸附试验检测 e 抗原

李 羽 王春香 房孝生

(河南省卫生防疫站, 郑州)

封 秀 红

(开封市卫生防疫站)

1972 年 Magnus^[1] 认为在乙型肝炎表面抗原(HB_sA_g)阳性血清中发现的一种新抗原(e 抗原),可能与乙型肝炎的传染性和预后较密切关系。此后该抗原很受重视。但多年来国内外一直使用琼脂免疫扩散法(ID)进行检测,敏感性不高。

酶连接免疫吸附试验(ELISA)是七十年代发展起来的一种新的检测技术,有敏感性高、特异性好和操作简便等优点^[2,3]。最近,我们用 ELISA 检测 e 抗原,其敏感性比琼脂免疫扩散法提高 150—300 倍,为 e 抗原的研究提供了有力工具。现将结果报告如下。

材 料 和 方 法

一、材料

1. e 抗体阳性血清: ID 滴度为 1:32。
2. 辣根过氧化物酶: RZ = 2.9。
3. 聚苯乙烯反应板: 4 × 10 孔,上海塑料三厂出品。
4. 参考 e 抗原、e 抗体: 均与卫生部药品生物制品检定所标定之 e 抗原、e 抗体核对。

二、方法

1. 含 e 抗体免疫球蛋白(I_gG)的提取: e 抗体阳性血清经硫酸铵沉淀后,通过二乙氨基乙基纤维素(DEAE-Cellulose)柱,收集 I_gG 阳性部分,再穿流正常人血清柱,最后浓缩至蛋白质含量为 5 毫克/毫升备用。

2. 酶结合: 用戊二醛二步法^[4], 10 毫克辣根过氧化物酶结合 e 抗体 I_gG 5 毫克,分装小

管,置 -20℃ 保存。

3. e 抗原测定: 用提纯的 e 抗体 I_gG 包被聚苯乙烯反应板,4℃ 过夜。洗涤 3—5 次,加待检血清标本(1:10 稀释,每份标本加两孔,每孔 0.1 毫升),37℃ 2 小时,洗涤,加酶抗体结合物,37℃ 2 小时,洗涤,加基质(邻苯二胺液),置暗处 30 分钟。加 2M 的硫酸中止反应。肉眼观察结果,每板均设阳性与阴性对照,根据显色与否和颜色深浅区别阳性与阴性。

4. 抑制试验: 取两份上述 e 抗原初筛阳性标本,一份加足量的 e 抗体血清,另一份加正常人血清,放置 37℃ 一小时,然后再按上述方法测定 e 抗原,加 e 抗体血清者,在显色反应受到抑制(与加正常血清者对比)时,才可判断为 e 抗原阳性。

5. 琼脂免疫扩散法检测 e 抗原: 按常规法,琼脂板为 0.8% 琼脂糖含 2% 聚乙二醇和 2% 葡聚糖 T100。

6. 用反向间接血凝法(RPHA)检测 HB_sA_g, 诊断血球为北京生物制品研究所生产。

结 果

1. 酶抗体结合物滴度: 10 毫克辣根过氧化物酶和 5 毫克 e 抗体 I_gG, 可得酶抗体结合物约 1.3—1.5 毫升。取酶抗体结合物 0.01 毫升加稀释液至 1.6 毫升,再按顺序做倍比稀释(从 1:160—1:5120),然后用上述各种稀释度的结合物测定同一份 e 抗原阳性标本,结果得出 1:2560 及其以前各稀释度的结合物均为阳性反应,结合物滴度为 1/2560。实际工作中常用结合物稀释 640 倍。

2. 包被用抗体的浓度: 包被用 ϵ 抗体须经纯化, 以 25、50、100、200 微克 I_gG /毫升进行包被, 测定同一份 ϵ 抗原标本, 所得结果均一样。因此用 25 微克/毫升做包被即可。

3. ELISA 与 ID 检测 ϵ 抗原的敏感性比较:

(1) 3 份 ϵ 抗原阳性标本用 ID 检测, 1 份滴度为 1:2, 其余 2 份不稀释才能检出。当用 ELISA 检测时, 3 份标本的滴度均为 1:320。说明 ELISA 比 ID 敏感性高, 可达 150—300 倍。

(2) 128 份 HB_sAg 阳性标本用 ID 检测, ϵ 抗原阳性率为 14% (18/128)。用 ELISA 检测 ϵ 抗原阳性率为 40.6% (52/128)。同样说明 ELISA 比 ID 敏感性高。

4. ELISA 检测 ϵ 抗原的特异性: ID 检测

ϵ 抗原阳性的 18 份标本, 用 ELISA 检测均为阳性; ELISA 检测 ϵ 抗原阳性的 28 份标本, 其显色反应可被 ϵ 抗体阳性血清抑制, 说明 ELISA 检测 ϵ 抗原的特异性是好的。另外, 我们从 81 份血清 (包括 65 份 HB_sAg 阴性血清) 中用乳凝法检出 8 份类风湿因子阳性标本, 用 ELISA 检测时, 均不出现非特异性阳性反应。

5. ϵ 抗原与 HB_sAg 滴度的关系 (见表 1): 52 份 ϵ 抗原阳性标本的 HB_sAg 几何平均滴度为 1:642, 其余 76 份 ϵ 抗原阴性标本的几何平均滴度为 1:50, 两者有显著差异 ($t = 8.86$, $p < 0.001$)。从表中还可以看出, HB_sAg 滴度越高, ϵ 抗原阳性率亦越高, 两者有明显的正相关 ($r_s = 0.915$)。

表 1 HB_sAg 滴度与 ϵ 抗原阳性率的关系

	HB_sAg 滴度*										合计	几何平均滴度
	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096		
标本数	9	25	12	17	11	12	5	15	7	15	128	1:141
ϵ 抗原阳性数	1	3	0	7	2	4	4	10	6	15	52	1:642
ϵ 抗原阴性数	8	22	12	10	9	8	1	5	1	0	76	1:50
ϵ 抗原阳性率(%)	11	12	0	41	18	33	80	66	85	100	40.6	

* 用反向间接血凝法检测。

讨 论

1. 检测 ϵ 抗原的敏感方法之所以建立较晚, 主要由于该抗原在血液内多和血清蛋白结合在一起^[2], 不易纯化, 以致无法制备高滴度的动物免疫血清来发展检测 ϵ 抗原的敏感方法。目前只能采用高滴度的人 ϵ 抗体血清。Waart^[6] 用 ID 滴度 $\geq 1:8$ 的 ϵ 抗体血清进行实验, ELISA 比 ID 的敏感性高 128 倍。我们所用 ϵ 抗体滴度较高 (1:32), 故敏感性提高约 150—300 倍, 接近固相放射免疫试验的水平^[7,8]。敏感性的提高使 ϵ 抗原的检出率也有相应的提高 (由 14% 上升到 40%)。如果我们在检测时不把样品稀释, 则阳性率会更高。

2. ϵ 抗体阳性血清能对 ELISA 检测的 ϵ 抗原显示特异的中和作用。在提取含 ϵ 抗体 I_gG

过程中, 用正常人血清进行固相吸收, 除去可能存在的抗正常人血清抗体, 从而排除了这方面的非特异反应。至于类风湿因子能否引起非特异阳性反应, 文献报道不一^[6,9], 我们经初步试验没有发现此类反应。

3. ϵ 抗原的存在与血清中 HB_sAg 的滴度有平行关系。 HB_sAg 滴度为 1:16—1:32, ϵ 抗原阳性率 12%, 滴度 $\geq 1:2048$, 阳性率达 95%。事实证明, HB_sAg 滴度高的孕妇对其婴儿有较大的传染性^[9,10]。因此, 在临床与流行病学上 ϵ 抗原乃做为传染性的指标之一。至于其在指示预后方面的意义, 尚须做动态观察才能弄清。

4. 经初步试验表明, ELISA 抑制法亦可检测 ϵ 抗体, 敏感性比 ID 高 40 倍 (1 份 ϵ 抗体血清 ID 滴度为 1:16, ELISA 抑制法为 1:640), 并可提高 ϵ 抗体检出率。

参 考 文 献

- [1] Magnius, L. O. et al: *J. Immunol.*, 109: 1617, 1972.
- [2] Engvall, E. et al: *Immunochemistry*, 8: 871, 1971.
- [3] Wolters, G. et al: *J. Clin. Pathol.* 29: 873, 1976.
- [4] Avrameas, S. et al: *Immunochemistry*, 8: 1175, 1971.
- [5] Neurath, A. R. et al: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 1702, 1977.
- [6] Waart, M. et al: *J. Med. Virol.* 3: 43, 1978.
- [7] Frösner, G. G. et al: *J. Med. Virol.* 3: 67, 1978.
- [8] Neurath, A. R. et al: *J. Gen. Virol.* 42: 493, 1979.
- [9] Stevens, C. E. et al: *N. Engl. J. Med.* 292: 771, 1975.
- [10] 陆志默等: 上海医学, 2:17, 1979。