

单克隆多克隆抗体不同标记 ELISA 技术对HBeAg/抗-HBe检测评估

高志良 姚集鲁

(附属第三医院传染病科)

提 要 采用抗-HBe 单克隆和多克隆抗体进行生物素或酶标记作酶免疫试剂检测HBeAg及抗-HBe,结果显示单克隆抗体(McAb)敏感性高于多克隆抗体(PcAb)。生物素试剂在检测 HBeAg的稀释度为1:5 000,比酶标法ELISA高1倍多,与RIA相当,且稳定性优于RIA。生物素标记抗体至少1年内保持效价不变,1年内批间变异系数为5.8%,相同标本重复检测变异系数为5.94%,是一种较理想的检测e系统的方法之一。另外,研究发现一孔一期法同时测HBeAg/抗-HBe时,无论标记抗体为单克隆或多克隆,其包被只能用单克隆抗体。

关键词 生物素-亲和素系统;单克隆抗体;多克隆抗体;酶联免疫吸附试验;乙型肝炎病毒e抗原;乙型肝炎病毒e抗体

中图分类号 R392.11

在检测乙型肝炎病毒(HBV)感染指标中,e系统有重要的价值。一般认为,HBeAg阳性是反映病毒复制的直接指标,因为几乎全部e抗原阳性的血清可测出HBV-DNA^[1]。而抗-HBe的检出,则提示传染性减少,疾病有慢性化或发生肝内HBV-DNA整合机会大^[2]。新近研究表明,部分变异型HBV感染时,主要表现e系统检测不出。因此,发展敏感、快速的检测e系统试剂很实用。RIA固然敏感性高,但因有污染、半衰期短等使应用受限。作者用单克隆抗体(McAb)、多克隆抗体(PcAb)进行生物素或酶标记,建立ELISA检测e系统试剂,比较各种试剂的敏感性,选出较理想的方法利于实际应用。

材料与方 法

试 剂 单克隆抗-HBe两株:e_α作标记、e_β作包被。多克隆抗-HBe来自抗-HBe阳性血,经ID法测效价1:16以上,用饱和硫酸铵沉淀2次以后,DE-52离子交换层析纯化。活化生物素(BNHS)、辣根过氧化物酶(HRP):为Sigma产品、RZ=3.0。生物素-

亲和素-酶(ABC)复合物及酶标亲和素(EA):由华美公司提供。RIA e系统试剂盒:由北京生研所提供。包被液:McAb用pH 7.6,20 mmol/L Tris液、FcAb用pH 9.5,0.05 mol/L碳酸盐液。底物:四甲基联苯胺(TMB)。

检测标本 为本科门诊及住院病人血清。

方 法 HRP标记用过碘酸钠法。生物素标记技术:用去离子二甲基甲酰胺将活化生物素先配成10 mg/ml BNHS液。取96 μl上液与纯化的抗-HBe(1~5 mg/ml)1 ml混匀,室温2 h,间歇摇振,放4℃过夜后以0.01 mol/L pH 7.4 PBS透析过夜,换液3~4次。一孔一期法操作见文献[3],ABC-ELISA稍有不同:吸干包被孔,加10 μl生物素标记抗体(1:200),同时加75 μl待检血清及25 μl定量的HBeAg中和液,45℃ 1 h,洗4次后加ABC复合物100 μl,室温15~30 min,洗4次后加底物TMB 100 μl,无需避光于10~20 min后加中止液后,在酶标阅读仪450 nm测吸光度(OD)值,其样品OD值/阴性对照(S/N)≥2.1为HBeAg阳性,≤ $\frac{1}{3}$ 为抗-HBe阳性。肉眼判

断方法。HBeAg 阳性显深蓝色, 抗-HBe 阳性不显色, 正常对照呈淡蓝色。

结 果

生物素标记抗-HBe 鉴定 取两块聚乙烯板, 一块用 HBeAg 包被, 另一块为空白板。在对应孔中分别加对倍稀释的生物素标记抗体, 45℃ 1 h, 洗 4 次, 加 EA, 室温 30 min, 洗 4 次后加底物显色。用 HBeAg 包被的结果全部阳性, 且随标记抗体稀释度升高, OD 值随之下降, 而空白板结果全部阴性, 证明生物素标记抗-HBe 成功。

不同的包被抗体对实验方法的影响 结果发现只有用 McAb 包被, 无论标记的抗体为 McAb 拟或 PcAb 均可用一孔一期法同时测

HBeAg/ 抗-HBe。反之, 用 PcAb 包被则行不通。

生物素标记 ELISA 法特异性试验 ①替代法: 分别用 HBsAg、HBeAg、HBcAg 作标本进行检测。结果仅 HBeAg 标本阳性, 且随稀释度增加, OD 值下降。用 HBsAg 或 HBcAg 替代 HBeAg 全部阴性。②中和试验: 用 20 份 HBeAg 阳性血清, 加入抗-HBe 阳性血进行阻断, OD 值平均下降 $\geq 40\%$ 。

敏感性试验 见表 1。用 HBeAg、抗-HBe 阳性血各一份稀释, 用多种 ELISA 及 RIA 比较, 结果示 McAb 敏感性高过 PcAb, Mc-ABC-ELISA 敏感性已达到 RIA 水平, 优于酶标法。

稳定性试验 ①HBeAg 阳性血 (S/N3~5)

表 1 RIA 与几种 ELISA 敏感性比较

方 法	HBeAg 稀释度 (S/N)								抗-HBe 稀释度 (S/N)				
	原	50	100	500	1000	2000	5000	10000	原	40	80	160	320
Mc-ELISA	9.1	5.6	4.3	3.6	2.9	2.6	1.9	1.4	0.1	0.2	0.3	0.3	1.0
Pc-ELISA	6.0	3.6	3.1	2.6	1.9	1.4	1.3	1.3	0.1	0.1	0.3	0.7	1.0
Mc-ABC-ELISA	9.4	5.7	5.4	4.3	3.6	2.9	2.4	1.9	0.1	0.1	0.1	0.3	1.0
Pc-ABC-ELISA	8.3	4.3	4.0	3.6	2.9	2.7	1.9	1.4	0.1	0.1	0.2	0.3	1.0
RIA	7.2	7.0	6.1	3.9	3.1	2.5	2.2	1.4	0.1	0.1	0.3	0.3	0.4

注: RIA: S/N ≥ 2.1 为 HBeAg 阳性, < 0.5 为抗-HBe 阳性

10 份, 每月用生物素试剂测 1 次, 连续 6 个月、9 个月、12 个月各测 1 次, 批间变异系数: 5.8%。②HBeAg 阳性血 10 份在相同条件下用 Mc-ABC-ELISA 试剂重复测 10 次, 得批

内变异系数为 5.94%。

临床应用 184 例 HBsAg 阳性血 e 系统检测结果见表 2。

表 2 184 例 HBsAg 阳性血 e 系统检测

	Mc-ELISA	Pc-ELISA	Mc-ABC-ELISA	Pc-ABC-ELISA
HBeAg	79(42)	68(37)	81(44)	78(42)
抗-HBe	57(30)	46(25)	51(27)	40(22)

注: 括号内阳性百分数

讨 论

McAb 的使用解决了 PcAb 应用的许多不

足: 如来源、纯度等。McAb 仅针对相应抗原分子上某一特定抗原决定簇, 在作双抗体夹心 ELISA 时, 单用一株可能会影响反应结果。

本文所用两株 McAb 是针对 HBeAg 抗原上不同的 2 个抗原位点(a.b)^[6], 一株作包被, 另一株作标记, 因此, 不仅可用作夹心 ELISA, 且敏感性高于 PcAb。本文进一步发现 McAb 包被时, 一孔一期法同时检测 HBeAg/抗-HBe 才会成功, 这时的标记抗体无论是 McAb 或 PcAb 均可, 但只有 PcAb 包被时则不行。其原因不清, 可能与 PcAb 含杂蛋白较多有关。目前认为抗原-抗体反应模式是一个化学-吸附两个阶段作用过程^[7]: 第一是抗原-抗体形成简单复合物, 反应是特异的; 第二是复合物之间的结合, 为非特异的。这两个阶段没有严格的时间概念。因而, 如果标记抗体与中和试剂或样本成分的结合受杂蛋白干扰或延缓, 或者结合后没有足够多标记抗体-抗原复合物与固相载体上抗体结合, 会被洗脱而出现假阴性。

为了寻找更敏感的血清学检测技术来代替放免技术。现已有生物素-亲和素系统 (BAS)^[4]、地高辛标记^[5]等。本文采用的 ABC-ELISA 是 BAS 中方法之一。其特点是高度特异及敏感, 因为在 ABC 复合物中, 当亲和素 (A) 与生物素 (B) 以适当比例作用后, A 的 4 个结合点分别与 B 结合, 同时酶标 B 上的多个 B 分子又与 A 之间结合形成晶格样复合物, 从而把抗原-抗体反应体与 B 标记连成一体, 大量酶分子被罗列, 呈现出多极放大效应。本文结果 Mc-ABC-ELISA 在检测 HBeAg 稀释度时可达 1:5 000, 与 RIA 相当, 较酶标法高 2 倍多。经替代、中和等试验证实其特异性可靠, 稳定性优于 RIA, 其批内、批间变异系数分别只有 5.94%、5.8%。生物素标记抗-HBe 于 4℃ 保存至少 1 年, 抗体效价不变, 因而是一种较为理想的检测 e 系统的方法。

对 184 例 HBsAg 阳性的血清用 4 种 ELISA 方法平行检测 e 系统。发现 Mc-ABC-ELISA 对 HBeAg 检出率最高, 虽与其几种其它方法差别不显著, 但说明一般常规检测标本中, HBeAg 的含量也比较高, 因而, 可能用本文中的 4 种 ELISA 均可测出, 但当遇到低滴度 HBeAg 血清标本时, Mc-ABC-ELISA 就会显示出其高灵敏性的优势。

参 考 文 献

1. Kaneko G, et al. Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:312
2. Carloni G, et al. Detection of HBV infectivity by spot hybridization in HBeAg-negative chronic carriers: HBV-DNA in sera from asymptomatic and symptomatic subjects. J Med Virol 1987; 21(1):15
3. 姚集鲁, 等. 单克隆抗体酶免疫一孔一期培养法检测 HBeAg 与抗-HBe. 中华传染病杂志 1988; 9(3):165
4. 章谷生, 等. 生物素-亲和素系统在免疫学检测中的应用. 上海免疫学杂志 1985; 5(2): 112
5. Dooley S, et al. Rapid detection of DNA-binding factors using protein blotting and digoxigenin-11-dUTP marked probes. Nucleic Acids Res 1988; 16:11839
6. Takahashi K, et al. Immunochemical structure of hepatitis B e antigen in the serum. J Immunol 1983; 130:2903
7. 贾万钧, 等. 免疫血清检验指导. 北京: 化学工业出版社, 1988: 4

(1992-09-14 收稿 1993-03-30 修回)

更 正

本刊 1993; 14(3) 目次第 1 页倒 1 行“选择性减胎术处理 4 和 3 胎早期妊娠”遗漏了作者姓名。现补充: 庄广伦、方群、游泽山, 等。目次第 2 页错字“责任编辑”应为“责任编辑”, 倒 1 行英文顾问: 施钦仁的英文名称“Sinsnes”漏了“k”字应为 Skinsnes。封底版权页英文“June”应为“September”。插 2 页: 图 4 应为图 1, 图 1 应为图 2, 图 2 应为 3, 图 3 应为图 4。特此更正, 并致歉意。

APPLICATION OF ELISA TECHNIQUES USING MONOCLONAL AND POLYCLONAL ANTIBODY REAGENTS LABELLING WITH BIOTIN FOR THE DETECTION OF HBeAg AND ANTI-HBe

Gao Zhiliang Yao Jilu

(Department of Infectious Diseases, Third Affiliated Hospital)

Application of ELISA techniques using monoclonal and polyclonal anti-HBe reagents labelling with biotin was reported. Its sensitivity is similar to RIA and higher than Mc-ELISA. Anti-HBe conjugate is stable for at least one year. The succeed of single well and one step incubation techniques for the detection of HBeAg and anti-HBe depended on using McAb rather than PcAb for coating. Therefore, Mc-ABC-ELISA is the choice of method for the detection of HBeAg and anti-HBe.

Key words biotin-avidin system; monoclonal antibody; polyclonal antibody; ELISA; HBeAg; anti-HBe



•新成果•

动脉硬化性脑梗塞(脑血栓形成)遗传学系列研究

课题负责 刘焯霖

(附属第一医院神经科)

动脉硬化性脑梗塞(脑血栓形成)是严重危害人类健康常见疾病之一,遗传因素在本病发病机制中的作用尚不清楚。作者针对这一问题把群体遗传学、生化遗传学、分子遗传学的研究方法结合起来,对动脉硬化性脑梗塞这一常见的脑血管疾病的遗传问题,进行了多层次、多指标的综合研究,发现了低HDL-C及其亚组分,APO AI-CIII-AIV基因簇变异是本病的重要危险因素,明确群体中本病为遗传度为 $41 \pm 7\%$,阐明了遗传因素在脑血管病发病机制中的重要作用,填补了国内空白,对脑血管病的发病及防治研究具有重要的科学意义,其成果不仅具有理论指导意义,而且可应用于人群的普查、筛选、咨询、检测易感家族和个体,更好地防治脑血管病。本研究成果具有先进性、创新性、实用性,处于国内外领先地位,该成果已获1992年国家教委科技进步奖二等奖。

(陈丽芳)