

用 ELISA 进行 A B 型体液与 A 和 B 型混和体液的鉴别

周 斌 郭景元

(法医学教研室)

提 要 AB型人体液中,在同一血型物质分子上,同时含有A和B抗原活性。我们应用这一研究结果,用酶联免疫吸附法(ELISA)来进行AB型体液(斑)与A和B型混和体液(斑)的血型测定和鉴别。用单克隆抗A或抗B抗体进行包被,通过用人抗A、人抗B抗体和酶标抗人IgM来进行A和B血型物质的定量分析。用这种方法10,000倍稀释的体液仍能测出。AB型体液(斑),在单克隆抗A或者抗B包被板,能同时测出A和B型血型物质。然而,A和B型混和体液(斑),在相应的抗体包被板上,则只能测出相应的一种血型物质A或B。

关键词 ABO血型 体液 唾液 精液 酶联免疫吸附法

在法医检案中,常会遇到ABO血型测定,一般通过吸收试验、解离试验以及混和凝集反应就能进行分型。但在实际工作中,遇到的检材多数并非单一的体液,而是两种或者两种以上体液的混和物。特别是强奸案的鉴定,阴道内提取的检材常常是由男性精液与女性阴道分泌物的混和物,要从混和物中判断各自的血型,目前仍较困难,本文试图应用酶联免疫吸附双抗体夹心法来进行AB型体液(斑)与A、B型混和体液(斑)的血型测定和鉴别。

材 料 与 方 法

一、抗血清

1. 抗A、抗B单克隆抗体 由司法部司法鉴定科学技术研究所陈建赠送。

2. 人抗A、人抗B血清 从本校附属第一医院输血员中分离,选其效价高,特异性好的血清置冰箱备用。寻找合适的人抗血清是本实验的关键,要求阴性孔吸光度值在0.1以上^[1]。

3. 羊抗人IgM酶标抗体 由北京市生物制品研究所购买。

二、检材的收集、制备与保存

唾液由本教研室已知A、B、AB分泌型工作人员及进修班学员提供。A型18例,B型18例,AB型18例。收集后,置沸水浴中加热

10分钟后,置冰箱内备用。将上述人员的唾液吸200 μ l,置滤纸上,室温凉干保存。

精液从本校附属第一医院检验科收集,用中和试验检测血型,收集A、B、AB分泌型人精液置冰箱内备用。收集A14例,B型14例,AB型8例。取上述精液约1ml,置纱布上,室温凉干保存。

阴道分泌物棉签由本校附属第一医院妇产科收集,室温凉干,用中和试验测其血型后选A、B、AB分泌型人阴道分泌物棉签,置室温保存备用。A型8例,B型10例,AB型3例。

三、体液斑的处理

剪取A、B、AB型体液斑(精液或唾液)约1平方厘米(含体液约20 μ l),剪碎后,将AB型放一试管内,A和B型放另一试管内,各加PBS-Tween 1ml,微量旋涡混合器混合10分钟后,移入4℃冰箱过夜,离心,取上清备用。

将体液用PBS-T稀释为1/10,1/100,1/10000的稀释度,将体液斑稀释为1/50,1/500,1/5000,1/50000的稀释度。

四、ELISA操作方法

取单克隆抗A、抗B用0.05MpH9.6碳酸纳液稀释后包被,每孔100 μ l,室温2小时。后加1%BSA-PBS 200 μ l/孔,37℃60分钟。

加经稀释的体液等检材, 100 μ l/孔, 37℃30分钟。用PBS-T洗板7次, 每次6分钟。角孔加100 μ l经BSA-PBS合适稀释的人抗A或人抗B, 室温反应1小时。用PBS-T洗板7次, 每次6分钟, 每孔加100 μ l经合适稀释的抗人IgM酶标抗体, 37℃40分钟。用PBS-T洗板7次, 每次6分钟, 用卫生纸将板拍干后, 每孔加100 μ l邻苯二胺底物, 避光放置30分钟, 加50 μ l10% H_2SO_4 终止反应, 室温放置15分钟后, 用DG-3022型酶联免疫检测仪在490nm进行测定。

五、结果判断

用每次已知A+B混和液(斑)的阴性孔OD值的均数加3个标准差($\bar{OD}_{阴} + 3SD$)作为阳阴性的临界值, 超过此值为阳性。另外, 用坐标纸以横坐标作为检材稀释度, 纵坐标为OD值作图。

实验结果

1. 用ELISA法与中和试验检测体液ABO

表1 中和试验与ELISA敏感性比较

检材稀释度		A型体液				B型体液			
		1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/10	1/100	1/1000	1/10000
中和试验	人抗A	+	+	-	-	-	-	-	-
	人抗B	-	-	-	-	+	+	-	-
ELISA	人抗A	+	+	+	±	-	-	-	-
	人抗B	-	-	-	-	+	+	+	±

表2 BA型体液(斑)和A型、B型混和体液(斑)的测定结果

检材稀释度		单克隆抗A包被板					单克隆抗B包被板				
		1/10	1/100	1/1000	1/10000	空白	1/10	1/100	1/1000	1/10000	空白
A+B 体液(斑)	人抗A	++	+	+	±	-	-	-	-	-	-
	人抗B	-	-	-	-	-	+	+	+	±	-
AB 体液(斑)	人抗A	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
	人抗B	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-

血型的敏感性比较^[2]。

A型、B型体液在中和试验时, 当用相同效价的人抗血清测定, 检材稀释到128~256倍时, 就不能测出阳性结果。但用ELISA测定时, 检材稀释5000~10000倍时, 多数仍能得出阳性结果(见表1)。可见ELISA比中和试验灵敏度要高。

2. AB型体液(斑)与A型和B型混和体液(斑)的血型测定和鉴别。

本实验共检测体液(斑)检材185例, 其中包括唾液及唾液斑95例, 精液(斑)、阴道分泌物90例。在单克隆抗A包被板, AB型体液即能检出A, 也能检出B型血型物质, 而A+B型混和体液则只能检出A型血型物质。在单克隆抗B包被板, AB型人不仅能检出B, 而且能检出A型抗原活性。而A+B混和体液则只能检出B型抗原活性(见表2、图1, 2, 3, 4)。这是由于AB型人在同一血型物质分子上, 同时含有A型和B型抗原活性^{[3][4][5]}, 所以, 当用抗A或抗B包被时, A和B抗原同

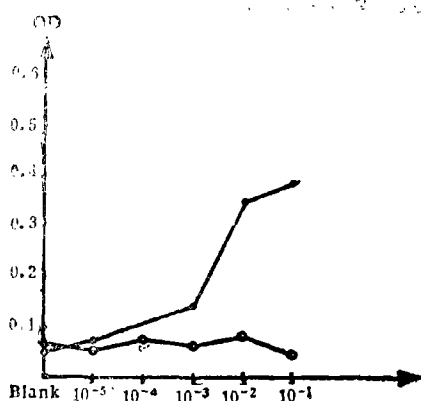


图1 在单克隆抗A包被板上,用人抗A、人抗B测定A+B型体液的OD值
人抗A—○— 人抗B—○—

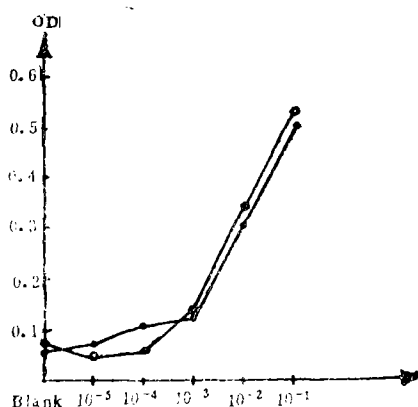


图4 在单克隆抗B包被板上,用人抗A,人抗B测定AC型体液的OD值
人抗A—○— 人抗B—○—

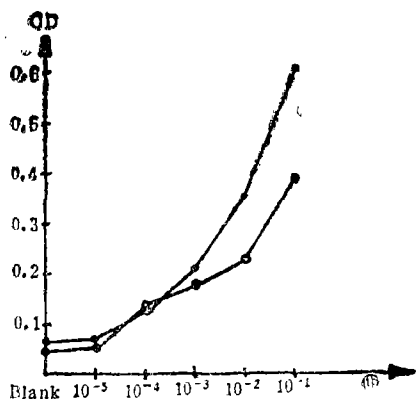


图2 在单克隆抗A包被板上,用人抗A、人抗B测定AB型体液的OD值
人抗A—○— 人抗B—○—

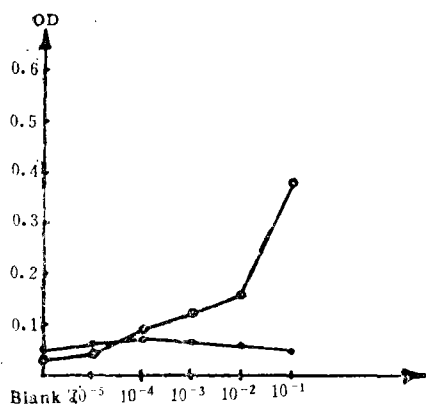


图3 在克隆抗B包被板上,用人抗A,人抗B测定A+B型体液的OD值
人抗A—○— 人抗B—○—

时被吸附,而A+B型体液由于A和B抗原是在二个分子上,则只能检出包被抗体相应的抗原。

(感谢司法部司法鉴定科学技术研究所陈建同志,上海市中心血站卢月香同志,长春生物制品研究所曾国华主任在实验中给予的大力协助)

参 考 文 献

- [1] 蒋成淦 陶义训. 酶免疫测定法. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1984; 77~82.
- [2] 郭景元主编. 实用法医学. 第1版. 上海科学技术出版社, 1984; 607.
- [3] Morgan W, [et al. The product of the human blood group A and B genes in individuals belonging to group AB. Nature 1956; 177:521.
- [4] Yuasa I. Detection of blood group AB macromolecules from biological materials with mixed body fluids. Jpn J Legal Med 1982; 36:533.
- [5] Mototsugu S, et al. Differentiation of group ABSe semen from mixtures of group ASe and BSe semens by enzyme-linked immunosorbent assay. Jpn J Legal Med 1986; 40(3):293.

Differentiation of Group ABSe Body Fluids from Mixtures of Group ASe and BSe Body Fluids by ELISA

Zhou Bin Guo Jingyuan

(Department of Forensic Serology)

Abstract

It has been known that blood group substances in body fluids from group AB individuals possess both group A and B activities on the same macromolecules. We applied the results of such studies to differentiate group ABSe body fluids (or stains) from mixtures of group ASe and BSe body fluids (or stains) by a sensitive "sandwich method" enzymelinked immunosorbent (ELISA).

The polystyrene ELISA plates were sensitized with monoclonal anti-A or anti-B. A and B substance fixed to plates was quantitatively analysed by the combined use of human anti-A or anti-B and labelled anti-human IgM. The 10000 fold diluted body fluid could be detected by this method. In type AB body fluids, A and B substance were detected with monoclonal anti-A sensitized plate or anti-B sensitized. In the mixture of type A and B body fluids, however, only type A or type B substance was detected with corresponding plate.

Key words ABO blood-group system Body fluids Saliva Semen ELISA