

快速斑点-ELISA法测定体液(斑)血型的建立^{*}

周 斌 郭景元 汪传喜

(法医系物证教研室)

陈 建

(司法部司法鉴定科学技术研究所)

提 要 本实验应用ABH酶标单克隆抗体,通过斑点ELISA,快速进行体液和体液斑的血型测定。在实验中,将待测抗原滴在硝酸纤维膜上,然后将膜分别放入抗A、抗B和抗H酶标单克隆抗体中,再加二氨基联苯胺底物。抗原抗体反应阳性部位将出现一个清晰的棕褐色斑点。我们共测定521份检材,结果均正确。本方法准确、简便、灵敏、快捷,结果易观察,不需特殊仪器设备,30分钟内即可获得结果。其灵敏度比常规的中和试验、吸收试验高很多。 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ 稀释的唾液、所谓非分泌型人唾液用此方法仍能测定血型。

关键词 ABH酶标单克隆抗体 斑点-ELISA ABO血型 体液斑

在法医学上体液(斑)的血型测定一般常规应用中和试验、吸收试验、解离试验及混合凝集反应^[1,2]。这些试验既耗时,又需较高的技术,且要新鲜标准红细胞指示结果。本实验系应用我们自己提纯酶标的ABH酶标单克隆抗体^[3],利用斑点ELISA简便、快速、灵敏等优点,来进行体液(斑)的血型测定。通过颜色变化直接判断血型。

材 料 与 方 法

一、ABH酶标单克隆抗体 由作者自己制备^[3]。

二、硝酸纤维膜 购自浙江省黄岩人民化工厂和美国Sigma公司。

三、检材的收集、制备和保存 唾液由已知血型的本教研室工作人员及进修班学员提供。沸水浴煮5分钟,放入 -30°C 冰箱内备用。A型35例,B型29例,O型30例,AB型15例。

唾液斑制备 将以上人员的唾液滴在滤纸

上,室温凉干,装信封内保存备用。

精液从本校附属第一医院检验科收集,用中和试验测其血型后,沸水浴中煮5分钟,置 -30°C 冰箱内备用。共收集A型14例,B型14例,O型7例,AB型8例。

精斑制备 取上述精液约1ml滴在纱布或滤纸上,室温凉干,装信封内备用。

阴道分泌物由本校附属第一医院妇产科用棉签收集,室温下凉干,用中和试验测血型后,室温下保存备用。A型8例,B型10例,O型5例,AB型3例。

四、体液斑的预处理 剪取A、B、O、AB型人体液斑(精斑、唾液斑或阴道分泌物)少许,约 $0.2 \sim 0.4\text{cm}^2$,剪碎后,加抗原稀释液200 μl ,室温放置5分钟,后用旋涡混合器搅拌5分钟,取上清液备用。

五、斑点ELISA操作方法 ①抗原稀释后滴在硝酸纤维膜上,每滴约20 μl ,放置3分钟。②将膜放入牛血清溶液中5分钟。③反应膜放入经合适稀释的酶标抗体溶液中,反应10分钟。④反应膜放入洗涤液中,洗2分钟。⑤取出膜,滴加二氨基联苯胺底物溶液。⑥用清水洗。⑦观察结果,在反应膜上出现棕褐色斑点的为

^{*} 获1990年广东省科技进步一等奖,为该奖项主体论文,并获我校第三届中青年优秀论文二等奖(1989)。该研究成果“酶标血型测定试剂盒及其制备方法”获国家发明专利

阳性,无色则为阴性。反应膜可长期保存。亦可照相。

六、灵敏度测定 ①用不同浓度唾液测定血型,取A、B、O、AB型唾液,用抗原稀释液稀释成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 等不同浓度。然后用斑点ELISA方法测定血型。②测定非分泌型人唾液的血型 取已知A型非分泌型人唾液3例,B型2例,O型4例,用斑点ELISA测定血型。

七、盲测 取40例已知血型的唾液、唾液斑、精液、精斑检材,交由他人编号后测定血

型。检材时间为1年以内。

八、实际检案 99例送检案例检材,唾液斑38例,精液和精斑61例(包括混和斑),用斑点ELISA测定血型。

结 果

一、已知检材测定结果 用抗A、抗B及抗H酶标单克隆抗体测定体液斑和体液血型的结果:阳性反应在抗原滴加部位出现清晰的棕褐色斑点。在测定178人521份不同时间的体液斑和体液检材中,核对所有结果均属正确。

附表 斑 点 ELISA 灵 敏 度 测 定

	抗 A						抗 B						抗 H					
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	blank	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	blank	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	blank
A	++++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	++++	+++	+	-	-	-	+++	++	+	-	-	-
O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	+++	++	+	-	-
AB	++++	+++	++	+	-	-	++++	+++	++	+	-	-	+++	++	+	-	-	-

二、用斑点ELISA测定血型灵敏度 10^{-4} ~ 10^{-6} 稀释的唾液,即0.0001 μ l新鲜唾液即能测出血型(见附表),随着唾液稀释度的增加,斑点的颜色也逐渐变浅。

已知非分泌型人,用中和试验未能测出唾液,精液中血型物质,用此方法仍能测出血型。

三、盲测结果 盲测40例,检材时间为1天至1年,结果判断全部正确。

四、实际检案结果 唾液斑38例,测得A型13例、B型11例、O型11例,AB型3例。精液和精斑(包括混和斑)61例,测得A型15例、B型20例、O型19例,AB型7例。以上检材同时由他人用其他方法测定,两者结果相符。

讨 论

本文描述了一种应用酶标ABH单克隆抗体斑点ELISA法快速进行体液和体液斑的血型测定方法。用此方法测定体液和体液斑的血型,30分钟内即可得出结果,通过结合在抗体上的酶

作用底物出现颜色变化来直接判断血型。作者在本文中直接将酶标记在ABH单克隆抗体上,从而使反应时间比Cecka^[4]的少很多,其操作也更为简便,不需第二抗体。本实验灵敏度极高,当唾液稀释为 10^{-4} ~ 10^{-5} 时,仍能得到满意的结果。这与Cecka和Bolton^[5]报道的灵敏度相近。当用中和试验,吸收试验测不出血型的非分泌型人唾液,用此方法仍能得出正确结果。

在本文中,由于抗原,抗体反应时间短,仅用10分钟,所以,我们采用了较高浓度的酶标抗体。为了防止非特异性吸附,我们采用了小牛血清来进行封闭,抑制抗体的非特异性吸附,降低反应膜的背景颜色。在实验中,唾液的稀释度一般以1:200~1:500为较佳。

在检案工作中,我们发现有些新鲜唾液或精液检材,在阴性部位也有少量的颜色反应,从而影响结果判断。我们将新鲜体液经沸水浴加热5分钟后,这些阳性反应即消失。估计可能由于新鲜体液中具有内源性过氧化物酶活性,

从而催化底物显色。因而,对新鲜体液的血型测定,最好预先加热5分钟。从而破坏过氧化物酶活性。在现场测定亦可加过氧化氢处理5分钟后再进行血型测定。

在测定中,如抗A,抗B和抗H3种抗体颜色均较浅或无色时,则可将体液稀释度调整为1:10~1:50后,重新测定。A和B型人体液与抗H有不同程度的反应,有些较强,有些较弱甚至无颜色反应,但O型体液则均有反应。

综上所述,应用斑点ELISA测定血型,具有简便、快速、灵敏、特异、结果易观察,无需特殊仪器等优点。整个过程30分钟内即可完成,所需试剂易保存携带。因此,用此方法测定血型,可代替过去常规的中和试验等。

参 考 文 献

- [1] 郭景元主编. 实用法医学. 第1版. 上海:科学技术出版社. 1984:630.
- [2] 郭景元主编. 法医学. 第1版. 北京:人民卫生出版社. 1987:175~178.
- [3] 郭景元, 周斌. ABH 单克隆抗体的提纯和标酶. 法医学杂志 1988; 4(3):1.
- [4] Cecka JM, et al. Direct blood group typing of forensic samples using a simple monoclonal antibody assay. *Forensic Sci Int* 1987; 34(3):205.
- [5] Bolton S, Thorpe JW. Enzyme-Linked immunosorbent assay for A and B water soluble blood group substances. *J Forensic Sci* 1986; 31(1):27.

THE REPID DETERMINATION OF ABO GROUP FROM BODY FLUIDS (OR STAINS) BY DOT-ELISA USING ENZYME-LABELLED MONOCLONAL ANTIBODY

Zhou Bin Guo Jingyuan Wang Chuanxi

(Department of Forensic Medicine)

Chen Jian

(Institute of Forensic Sciences, Ministry of Justice)

Using ABH enzyme-labelled monoclonal antibody, we could rapidly detect ABO group from body fluids and body fluid stains by dot-ELISA. In this test, the antigen was immobilized on nitrocellulose paper and the entire piece of paper was coated with an appropriate dilution of enzyme-labelled McAb directly against the antigen of interest and finally 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) substrate solution was added. The site of positive is clearly visible as a brown spot. We detected 521 samples and got a satisfactory result. We also detected 99 practical case samples by this method. The result is the same as using other methods by other people. This method is accurate, simple, direct, rapid, sensitive, easy to observe, requisite with no special equipment and complete in 30 minutes. The test was proved to be clearly more sensitive for the detection of ABO blood group in secretor-saliva than the conventional hemagglutination inhibition test, 10^{-4} - 10^{-5} dilution of saliva and ABO group of non-secretor-saliva and urine could also be easily detected by this method.

Key words ABH enzyme-labelled McAb Dot-ELISA ABO blood group
Body fluids Body fluid stains