

# HBsAg的酶标记及其在检测 抗-HBs的ELISA系统中的应用

姚 集 鲁

(传染病学教研室)

抗-HBs<sub>s</sub>的出现,标志着HBV感染者已经清除了HBsAg,并产生了对HBV的一定程度的免疫能力。目前我国使用的被动血凝法检测抗-HBs,敏感度不太高。应用RIA法检测的敏感度高,但限于条件,我国尚难以广泛采用。本文报告一种ELISA系统,用改良过碘酸钠法以辣根过氧化物酶(HRPO)标记HBs,按双抗原夹心法原理检测血清中的抗-HBs。检测的敏感度可达0.04国际单位抗HBs的水平(相当于含高滴度抗-HBs<sub>s</sub>的恢复期血清1:5000的水平)。

## 材 料 与 方 法

### HBsAg的纯化

纯化的HBsAg用于包被固相支持物及用作酶标记。HBsAg来自含高滴度HBsAg的携带者血清,经100×5厘米Sephrose 6B柱层析,并以Xm100A滤膜超滤,用氯化铯密度梯度超速离心(124,000g,每次3天,共两次)收集含HBsAg的区带,制备成含量为10毫克/毫升的HBsAg制剂。

### 固相支持物的包被

固相支持物采用96孔聚苯乙烯微量平板(Dynatech)。HBsAg以0.02M, pH7.6 TRIS/HCl缓冲液稀释为1:2000,每孔放0.1毫升,置室温下3天,以0.02M, pH7.6 TRIS/NaCl/HCl缓冲液洗涤3次后,每孔加满含0.5%小牛血清白蛋白TRIS缓冲液,置于室温下一小时,以封闭未被HBsAg包被的部位。于吸除大部分孔中的缓冲液后,用胶纸封盖微量平板防止干燥。置4℃储存。并经证明在保存达半年之久仍然有效。

### HBsAg的酶标记

HBsAg的酶标记采用改良过碘酸钠法。分别对HBsAg及辣根过氧化物酶(HRPO, RZ 3)进行同样的处理。具体方法如下:0.1毫升HBsAg(10毫克/毫升)与2毫克

HRPO分别溶于新鲜配制的1毫升0.3M, PH8.1碳酸氢钠溶液。分别加入0.1毫升1%氟二硝基苯无水乙醇溶液, 室温下置滚动混合器上充分混和一小时。然后分别加入0.2毫升新鲜配制的0.1M过碘酸钠溶液, 混合半小时。分别移入透析袋中, 以1000毫升0.001M, PH4.4乙酸钠缓冲液于4℃透析过夜。次晨, 经过处理的HBsAg移到0.01M, PH9.5碳酸钠缓冲液, 4℃下继续透析两小时。经过处理及透析的HRPO, 加入约0.02毫升0.2M, PH9.5碳酸钠缓冲液以提高到PH9.5左右。然后立即把经过处理的HRPO和HBsAg混合, 室温下置滚动混合器上充分混和两小时。再加入0.1毫升新鲜配制的0.1M硼氢酸钠溶液, 摇匀后置4℃两小时以上。再经过15×1.6厘米Sephrose 6B柱层析, 把游离的未标记的酶(第二峰)从已被酶标记了的HBsAg(第一峰)分离开, 收集酶标记了的HBsAg部分, 以蔗糖浓缩为2.5毫升左右。保存于4℃备用。经棋盘滴定, 选择1:100的稀释度作为实际检测时应用。即一次标记量可检测约2500份标本。经过测试表明, 浓缩的酶标HBsAg在4℃下经过9个月, 其活性仍无大改变。

### 酶标HBsAg的稀释液

每次检测应用前配制成1:100酶标HBsAg稀释液。稀释用0.02M, pH7.4 PBS/TWEEN缓冲液, 含1%正常人血清及1%小牛血清白蛋白。

### 底物

酶的底物溶液在每次应用前新鲜配制。以8毫克ABTS〔2,2'-Azino-di(3-ethyl benzthiazolin sulfonic acid)〕溶于10毫升0.075M, PH4.0柠檬酸/磷酸氢二钠缓冲液(含0.1毫升20%过氧化氢)。每孔用0.1毫升底物溶液, 酶反应终止液为2毫克/毫升氟化钠溶液。

### 试验方法

吸除包被了HBsAg的微量平板孔中的缓冲液之后, 加入0.1毫升待检血清, 室温下放置过夜。次日以0.02M, pH7.4PBS/tween缓冲液洗涤5次后, 加0.1毫升酶标HBsAg稀释液, 室温下放置3小时, 洗涤5次后, 加0.1毫升底物溶液, 置黑暗中半小时, 以0.2毫升氟化钠溶液终止酶反应。肉眼观察显色反应(无色为阴性反应, 阳性反应则呈绿色)或以分光光度计(415nm)阅读吸收值。待检血清吸收值与阴性对照血清吸收值之比(T/N)大于2者为阳性。

## 结 果

以正常人血清(抗-HBs已知为阴性)及每毫升含0.1, 0.04, 0.02国际单位抗-HBs标准血清, 用本ELISA系统检测。同时, 又以含高滴度抗-HBs的恢复期阳性对照血清(约相当于每毫升含200国际单位)的一系列稀释, 进行测试。结果见附表。

试验结果表明, 应用本ELISA系统检测抗-HBs的敏感度, 肉眼测定可达0.1国际

单位, 如以分光光度计阅读, 可以达到0.04国际单位的水平。

试验血清	显色反应	吸 收 值	T/N
正常阴性血清	-	0.063	1.0
0.1国际单位/毫升	+	0.328	5.2
0.04国际单位/毫升	±	0.143	2.2
0.02国际单位/毫升	-	0.102	1.7
高滴度抗-HBs阳性对照血清			
1 : 100	+	2.846	45.2
1 : 1000	+	0.623	10.0
1 : 2000	+	0.360	5.0
1 : 5000	-	0.123	2.0

## 讨 论

本文的结果表明, 辣根过氧化物酶标记到HBsAg上, 并用于检测抗-HBs的ELISA系统, 检测敏感度能达0.1~0.04国际单位的水平。到底在血清中含有多高浓度的抗-HBs才能认为对HBV感染有免疫力, 迄今尚无统一意见。但一般认为如果血清抗-HBs水平达到每毫升0.05国际单位, 就可能有一定程度免疫能力。由此, 本系统检测抗-HBs, 基本上能满足一般临床及流行病学调查的要求。

不同浓度的HBsAg包被固相支持物, 对检测抗-HBs的敏感度有影响。通过棋盘滴定表明, 1 : 2000最为理想。但稀释达1 : 10000时, 敏感度仍然可达0.1国际单位的水平(分光光度计阅读结果)。

用于酶标记的HBsAg, 在标记过程中的处理亦十分重要。最初, 只对辣根过氧化物酶用氟二硝基苯及过碘酸钠处理, 然后与HBsAg反应, 结果标记并不理想。后来, 在处理辣根过氧化物酶的同时, 亦分别用氟二硝基苯与过碘酸钠处理HBsAg。然后再让处理过的酶和HBsAg混合。这种处理获得的酶标记HBsAg比较理想。这种酶标抗原, 在4℃下保存相当稳定, 经过9个月的储存后, 检测抗-HBs的敏感度仍能维持在0.1国际单位的水平。

(本文的工作在英国Middlesex医院病毒学系完成)

## 参 考 文 献

Nakeua P k and A. kawaoi; J Histochem Cytochem 22, 1084, 1974

Enzyme-labelling of HBsAg and Application of  
the Conjugate to the ELISA System for  
Detecting Anti-HBs

Yao Jilu

(Department of Infectious Diseases, Zhong Shan Medical College)

**Abstract**

HBsAg has been labelled with horseradish peroxidase successfully by the method presented by Nakena & Kawaoi with some modifications. The conjugate is stable for more than 9 months without significant change in activity. The detectable level of anti-HBs is up to 0.04 IU per ml serum and is thought to be satisfactory for clinical and epidemiological investigation.