

ELISA在抗-HB_c与IgM抗-HB_c 检测中的应用

姚集鲁

(传染病学教研室)

针对病毒抗原的特异性 IgM 抗体的检测,在急性病毒感染的早期诊断上的重要作用,日益受到重视。乙型病毒性肝炎IgM核心抗体(IgM抗-HB_c)于急性早期出现,滴度迅速上升,恢复期后IgM抗体逐渐被IgG抗体所替代。因此,检测到高滴度IgM抗-HB_c,对于确定急性乙型肝炎病毒感染,尤其是在急性期后HBsAg已经从血液中消失的情况下,有着重要作用。此外,对于HBsAg携带者的急性非乙型肝炎的鉴别诊断,也是有十分重要的帮助。

总体抗-HB_c的检测,加上对表面抗原抗体系统及e抗原抗体系统的检测,应用在流行病学调查上,能够帮助我们作出更为符合实际情况的估计。应用于乙型肝炎病毒感染的诊断,病期与传染性的评价,都有重要的作用。

本文介绍以辣根过氧化物酶标记抗-HB_c,并把它应用于ELISA系统,检测总体抗-HB_c,及检测IgM抗-HB_c。这个ELISA系统的敏感度接近RIA法的水平。在我国目前条件下,推广RIA法仍有困难,ELISA法具备的优点应该受到充分的重视。

材料与 方法

抗-HB_c

来自含高滴度抗-HB_c的HBsAg携带者血清,以离子交换层析法(DE-52)分离IgG。IgG抗-HB_c被浓缩成为2.5毫克/毫升。准备作辣根过氧化物酶标记用。

HB_cAg

来自免疫抑制的HBsAg携带者的尸体肝脏。HB_cAg被含有0.5%小牛血清白蛋白、0.05%吐温20,0.1%叠氮钠的0.02M,pH7.2磷酸盐缓冲液稀释成适当浓度的稀释液备用。

抗-μ

绵羊抗人IgM(重链)血清的IgG(即anti-μ,Sewards Laboratories Ltd)用于包被固相支持物,以检测IgM抗-HB_c。

固相支持物及其包被

固相支持物是采用96孔微量聚苯乙烯平板(DYNATECH)。检测总体抗-HB_c的固相支持物是以HB_cAg稀释液包被,检测IgM抗-HB_c者,则以抗-μ血清的稀释液包被。稀释用的是0.02M,pH7.6三羟甲基氨基甲烷缓冲液。每孔放置0.1毫升包被液,室温下3天,然后以上述缓冲液洗涤3次,再用含0.5%小牛血清白蛋白的上述缓冲液加满

每孔, 置室温下一小时, 吸除孔内大部份缓冲液后, 以胶纸封闭微量平板防止孔内干燥, 于 4 °C 保存备用。

抗-HBc的酶标记

辣根过氧化物酶以改良过碘酸钠法标记抗-HBc。具体过程如下: 4毫克辣根过氧化物酶 (Sigma, RZ3.0) 溶于新鲜配制的1毫升0.3M, pH8.1碳酸氢钠溶液, 加入0.1毫升1%氟二硝基苯无水乙醇溶液。在室温下充分混和一小时后, 加入新鲜配制的0.2毫升0.1M过碘酸钠溶液, 室温下混和半小时。移入透析袋中, 以1mM, pH4.4 乙酸钠缓冲液 4 °C 透析过夜。同时, 1.5毫升抗-HBc (2.5毫克/毫升) 亦置于另一透析袋中, 以0.01M, pH9.5碳酸钠缓冲液 4 °C 透析过夜。次日, 把0.02毫升0.2M, pH9.5碳酸钠缓冲液加进经过处理的辣根过氧化物酶, 提高到pH9.5左右。并立即与1.3毫升经过透析的抗-HBc 混合, 置室温下充分混和两小时。再加入0.1毫升新鲜配制的0.1M硼氢酸钠溶液, 置 4 °C 两小时以上, 然后浓缩为约1毫升左右。通过2.6×40 厘米的 Sepharose 6B 柱层析, 洗脱液为含 0.1%小牛血清白蛋白, 5%甘露糖的硼酸缓冲液。收集含有酶标抗-HBc 的部份, 以蔗糖浓缩成约 3 毫升左右。再用结合了正常人血清及血浆的 Sepharose CL 4B亲和层析柱, 去除其中的抗人成份。最后浓缩成约 4 毫升左右, 保存 4 °C 备用。每次用于试验前配成适当的稀释液。稀释用0.02M, pH7.4 磷酸盐缓冲液, 含1%小牛血清白蛋白, 4%正常人血清, 0.5~1毫克/毫升的经过 63'15'处理的人血清球蛋白, 以及0.05%吐温20。不应含有叠氮钠。如用于检测总体抗-HBc, 则不必含热处理的人血清球蛋白。

底物

底物必须新鲜配制, 置黑暗中保存。8毫克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%过氧化氢液。酶反应的终止液是2毫克/毫升的氟化钠溶液。

总体抗-HBc的检测

按照竞争性抑制原理进行。一期法: 0.08毫升待检血清与0.02毫升酶标抗-HBc 稀释液, 同时加进包被了HBcAg的微量平板凹孔中, 置室温下过夜。次日于洗涤5次后, 每孔加底物0.1毫升, 置黑暗中半小时。以氟化钠溶液终止酶反应, 肉眼观察结果, 抗-HBc 阴性标本应呈现绿色显色反应, 阳性标本则不显色。以分光光度计 415nm 阅读吸收值。凡是吸收值低于正常阴性对照标本的50% (即抑制达50%以上) 作为抗-HBc 阳性。二期法: 基本上同一期法, 但先加0.1毫升待检血清, 于室温下过夜, 次日洗涤4次后, 加0.1毫升酶标抗-HBc 稀释液。置室温下3小时。洗涤4次后加底物, 置黑暗中半小时后终止酶反应。结果阅读同一期法。

IgM抗-HBc的检测

这是按照近年来才发展起来的特异性抗体“捕捉”原理设计的检测技术。已在许多特异性IgM 抗体的检测中应用。待检血清先用含有0.5%小牛血清白蛋白与0.05%吐温20的0.02M pH7.4 磷酸盐缓冲液稀释成1:2,000。0.1毫升经过稀释的待检血清, 置于已被抗-μ包被的微量平板的凹孔中, 室温下过夜。次晨以含0.05%吐温的磷酸盐缓冲液洗涤4次, 每孔加0.1毫升 HBcAg 稀释液, 室温下4小时。然后在洗涤4次后, 加入0.1毫升

酶标抗-HBc 稀释液, 置室温下 3 小时。再洗涤 4 次后, 每孔加 0.1 毫升底物, 置黑暗中半小时。然后用氟化钠溶液终止酶反应。阴性标本不呈显色反应, 阳性者呈绿色。以分光光度计阅读结果 (415nm), 待检血清与正常阴性对照血清的吸收值之比 (T/N) 大于 2 者为阳性。

结 果

一、总体抗-HBc 的检测

正常人血清, 已知抗-HBc 为阴性 (RIA法), 以本 ELISA 法检测 150 次。结果全部均呈深绿色的显色反应, 没有假阳性出现。

急性恢复期高滴度抗-HBc 阳性标准血清的稀释系列: 1:100、1:1000、1:10,000、1:20,000、1:50,000, 分别应用一期法及二期法检测抗-HBc。从表 1、2 可见, 一期法的检测敏感度可达 1:1,000, 但是二期法的检测敏感度, 则可以高达 1:20,000。

表 1 一期法检测抗-HBc

	正常阴性	抗-HBc 阳性标准血清稀释系列				
	血清	1:100	1:1,000	1:10,000	1:20,000	1:50,000
显色反应	++++	-	++	++++	++++	++++
吸收道	2.818	0.173	0.601	2.791	2.789	2.810
T/N×100%	100%	6%	21%	98%	98%	100%
结果判定	-	+	+	-	-	-

表 2 二期法检测抗-HBc

	正常阴性	抗-HBc 阳性标准血清稀释系列				
	血清	1:100	1:1000	1:10,000	1:20,000	1:50,000
显色反应	++++	-	-	-	+	+++
吸收值	1.953	0.152	0.220	0.235	0.358	1.009
T/N×100%	100%	8%	11%	12%	18%	52%
结果判定	-	+	+	+	+	-

对 99 份医院送检血清, 同时用本 ELISA 系统及常规的 RIA 法作平行试验。两种方法的检测结果十分相近。仅 4 份血清以 RIA 法检测为阳性而 ELISA 法阴性。两者符合率高达 96%。结果见表-3。

表 3 ELISA 与 RIA 法检测抗-HBc 的比较

抗-HBc	+	±	-	共计
ELISA	63	2	34	99
RIA法	67	2	30	99

二、IgM 抗-HBc 的检测

对正常人血清, 以本 ELISA 系统检测 50 次, 及有发现任何一次出现显色反应, 即没有出现假阳性现象。

选择含高滴度 IgM 抗-HBc 阳性血清作为阳性标准血清。将该血清订为含有 1,000 单位 IgM 抗-HBc。经过一系列的稀释, 制备分别含有 100、50、25、10、5、3 单位 IgM 抗-HBc 的阳性标准血清。用这系列阳性标准血清, 并以正常阴性血清作对照, 进行本 ELISA 系统检测 IgM-HBc 的敏感度观察。这个系列的阳性标准血清还被用作待检血清的 IgM 抗-HBc 含量标准。敏感度观察的结果见表 4。

表 4 ELISA 法检测 IgM 抗-HBc

	正常阴性 对照血清	100	50	25	10	5	3
显色反应	-	++++	++++	+++	++	+	+
吸收值	0.090	2.709	2.590	1.731	0.864	0.490	0.242
T/N	1	30.1	28.8	19.2	9.6	5.4	2.7

对 133 份医院送检血清, 同时以本 ELISA 系统及常规 RIA 法进行检测比较。结果显示两者所得的结果是十分近似的。详见表 5。

表 5 ELISA 法与 RIA 法检测 IgM 抗-HBc

IgM 抗-HBc	100u	50u	25u	10u	5u	3u	-	共计
ELISA	21	7	2	8	9	8	78	133
RIA	21	8	2	5	10	9	78	133

讨 论

辣根过氧化物酶标记抗-HBc, 使用不同的技术方法, 既可以用于检测总体抗-HBc, 也可以用于检测 IgM 抗-HBc。敏感度接近固相放射免疫测定的水平。这个 ELISA 系统简单、方便, 结果令人满意。但目前核心抗原的来源与制备上的问题, 妨碍了它的广泛应用。然而, 开展非甲非乙型肝炎的研究, 必须有切实排除急性乙型肝炎的办法, IgM 抗-HBc 的检测就是一项十分重要的项目。核心抗原问题是急待解决的。

检测 IgM 抗-HBc 的 ELISA 系统是十分敏感的技术。经验表明, 达到 25 单位以上者, 常提示为急性乙型肝炎。但目前尚缺乏统一的诊断界线。此外, 目前也缺乏统一的阳性标准血清。因此, 确定一套阳性标准血清, 调查较大量的不同类型的乙型肝炎患者, 制订合理的诊断标准, 也是需要解决的重要问题。

总体抗-HBc 检测应用的稀释液、洗涤剂以及血清等, 都不应含有叠氮钠。叠氮钠的存在大大地降低了检测的敏感度, 甚至使试验失败。一期法检测抗-HBc 虽然较简便, 但其灵敏度大大低于二期法。应该推荐使用二期法以获得较高的敏感度。

参 考 文 献

- [1] Smith A M and R S Tedder: J Virol Methods 3:1,1981
[2] Roggendorf M et al: J Clin Microbiol 13(4):618,1981
[3] Tedder R S and Wilson-Croome R: J Med Virol 6:235,1980

(本文的工作在英国Middlesex医院完成)

ELISA System for Detection of Anti-HBc and IgM Anti-HBc

Yao Jilu

(Department of Infectious Diseases, Zhong Shan Medical College)

Abstract

IgG anti-HBc is purified by DE-52 from high titre convalescent patient serum and is labelled with horseradish peroxidase.

Enzyme labelled anti-HBc is used for detection of total anti-HBc by ELISA system (competitive method) and used for detection of IgM anti-HBc by ELISA system (antibody capture assay).

The detectable level of both anti-HBc and IgM anti-HBc are closed to those of RIA.

(This work was carried out in the Department of Virology, Middlesex Hospital Medical School, London, U.K.)