

一步夹心法检测 HBsAg 的高灵敏度 单克隆试剂 ELISA 技术

姚集鲁 郑锡澄 郭万里

(病毒性肝炎研究室)

在病毒性肝炎防治工作中, HBsAg 的检测至为重要。我国近年来的 HBsAg 检测技术有很大进步,但目前仍有不少问题。放射免疫技术仅能在少数研究单位应用。ELISA 试剂仍不理想,检测过程采用二步孵育法,费时费力,酶标记抗体消耗量大,不利于推广普及。本文介绍一种新的单克隆试剂 ELISA 技术,以一步孵育夹心法,使 HBsAg 的检测时间缩短,操作简化,酶标抗体大为节省,灵敏度明显提高。

材料与方 法

单克隆抗-HBs H3F5 株杂交瘤细胞,接种雄性 Balb/c 小鼠获得的腹水,以饱和硫酸铵沉淀法分离含有抗-HBs 的球蛋白,经预试后确定以 1:3000 的稀释液,作为固相载体的包被抗体液。另一株单克隆抗-HBs 杂交瘤细胞 D2H5 株接种小鼠,产生的腹水用 DE-52 分离 IgG 抗-HBs,与过氧化物酶偶合,作为酶标记抗-HBs 用于本 ELISA 系统。经滴定决定以 1:300 稀释液为工作溶液。选用四甲基联苯胺(Tetramethylbenzidine)作为底物。终止反应用 2M 硫酸溶液。

检测过程:置10微升酶标记抗-HBs 稀释液(含 20%正常小鼠血清)于包被了抗-HBs 的每一反应孔中,随后在每孔分别加入90微升待检血清或对照血清。混合后置45℃水浴中1小时,取出洗涤5次。吸干残留在反应孔中的液体后,加入底物溶液(不必避光)20~30分钟后,可用肉眼观察,呈现蓝色者为阳性反应。阴性标本不显色。亦可用 2M 硫酸溶液终

止酶反应,阳性孔从蓝色转变为黄色,用酶标阅读器置 450nm 下阅读光吸收值, S/N 值超过 2.1 以上时为阳性反应。

结 果

对正常人 HBV 标志物阴性血清,以及 HBsAg 阳性标准血清稀释系列,进行灵敏度测试,检测 HBsAg 的灵敏度可达 1~3ng HBsAg/ml 的水平。见表 1。

表1 检测 HBsAg 的灵敏度

HBsAg (ng/ml)	正常 血清	0.3	1.0	3.0	10.0
光吸收值	0.016	0.019	0.035	0.099	0.373
S/N 比值	1.0	1.2	2.1	5.0	23.3

在不同的孵育条件下,灵敏度水平稍有变动。在 37℃ 2 小时,灵敏度水平只达 10ng/ml。室温(20~25℃)2 小时或 4 小时,灵敏度仅达 10ng/ml 的水平。然而,在室温过夜孵育、或 45℃ 1 小时,以及 45℃ 2 小时,检测的灵敏度基本相近。

对已知 HBV 标志物阴性的正常人血清 32 份,混合后进行分次重复检测,共达 32 次,无一发现阳性。光吸收值在 0.011~0.030 之间。均值为 0.020。

对已知 HBsAg 阳性(RIA 法,北京某单位的商品性试剂盒)的携带者血清 269 份,以本法重复检测,发现全部均有明显的显色反应,光吸收值均在 0.200 以上。两法由不同操作者分别完成,结果完全一致。

此外,我们又对送到我室常规检验的各种

类型人群的血清标本 1,000 份,由不同的操作者,互不了解彼此情况的条件下,同时分别应用本法及 RIA 法检测。976 份标本两种方法检测结果完全一致。11 份标本为 RIA 法检查阳性,本法为阳性。该 11 份标本抗-HBc 无 1 例为阳性。13 份血清标本以本文的 ELISA 法检测为 HBsAg 阳性,RIA 法为阳性。然而,这 13 份标本中有 10 份为抗-HBc 阳性。

表2 1000 份广州地区人群血清
HBsAg 检测

	RIA 法	
	阳性	阴性
ELISA 法阳性	194	13
ELISA 法阴性	11	782

讨论与结论

本文报告的虽然仍然是夹心法原理的 ELISA 法,但我们是采用一步孵育,即待检血清与酶标记抗-HBs 同时孵育。这与目前我国各地报告的 ELISA 技术不同,这些试剂盒都采用两步分期孵育,即待检血清先作孵育,洗涤后才加入酶标抗-HBs 孵育。再经洗涤后始加底物显色。

本文介绍的一步夹心法检测 HBsAg 的 ELISA 技术,优点是操作简便,节省大量试剂(尤其是酶标记抗-HBs 的用量),灵敏度相当理想,与目前我国商品性 RIA 试剂盒的 HBsAg 检出结果极为接近。

一步夹心法能够成功的因素,主要是我们应用两株不同的单克隆抗-HBs,分别作为固

相载体的包被抗体及过氧化物酶标记抗体。这两株单克隆抗-HBs 对 HBsAg 有高度亲合力,是经过筛选而获得。含单克隆抗-HBs 的腹水,经过 DE-52 层析,分离到 IgG 抗-HBs,始用作过氧化物酶标记。高纯度的抗-HBs 用于酶标记,亦是本法成功因素。

本法的设备条件要求不高,既可用酶标阅读器记录光吸收值判定结果,也可由肉眼观察显色情况而鉴别。四甲基联苯胺作为底物,不必避光观察,灵敏度高,安全可靠,易于判定,大大优于目前常用的邻苯二胺或 ABTS。此外,本法既可放置 45℃ 水浴 1 小时孵育,也可以置室温过夜之后洗涤,加底物显色,操作甚为简便。基层单位也可推广应用。

由于本法使用小鼠单克隆抗体,我们在酶标抗体稀释液中除加入适当量灭活正常人血清外,还加入 20% 正常小鼠血清,以消除假阳性反应。我们发现在少数标本中,如不加入正常小鼠血清,会出现轻度显色反应。

最后,我们认为本法是一种简单、迅速、灵敏,特异性高的检测 HBsAg 技术。能满足我们研究与临床诊断的要求。

参考文献

- [1] R. Tedder, et al. production of monoclonal antibodies to hepatitis B surface and core antigens, and use in the detection of viral antigens in liver biopsies. J Hyg Camb 1983; 90(1):35.
- [2] G. Wolters, et al. Improved ELISA for the detection of HBsAg J Virol Methods 1985; 10: 299.

One Step Incubation ELISA for the Detection of HBsAg

Yao Jilu Guo Wanli

(Viral Hepatitis Research Unit)

Abstract

A new technique for the detection of HBsAg by one step incubation ELISA was developed. Two strains of monoclonal hybridoma cell (D2H5 and H3F5) were selected for the production of monoclonal anti-HBs, and the antibodies were used respectively for conjugation with peroxidase or for coating the solid phase in this ELISA system.

The serum samples and the enzyme conjugate were added to the coated wells at the same stage. After incubation at 45°C for one hour, the wells were washed and substrate (TMB) was added for colour development. The sensitivity level of this ELISA system was up to 1 to 3 ng HBsAg/ml with P/N ratio 2.1 to 6.0.

32 HBsAg negative samples were tested by this system repeatedly, no false positive result was found. 269 HBsAg carrier sera were detected parallelly by both RIA and this ELISA system by different technicians, and the results were all found to be positive. 1000 samples from the population in Guangzhou area were determined by RIA and this ELISA system by two groups of technician, the results were highly comparable. The authors considered this assay to be a technique of high sensitivity, simplicity and specificity.