

一种非常敏感的检测HBsAg的ELISA系统

姚集晋

(传染病学教研室)

检测乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的三种主要的第三代技术: 反向被动血凝试验 (APHA), 酶标记免疫吸附试验 (ELISA) 与放射免疫测定 (RIA), 近年来已被广泛应用。我国目前较多采用的是RPHA法。它有简便、价廉的优点, 但敏感度远低于其他两种方法。此外, 判断结果有时会有困难, 并有可能受主观因素影响。RIA法最为敏感与客观, 但必须有价昂的两种射线计数器, 而且还涉及处理放射性物质的问题。而ELISA法兼有两者的优点, 检测的敏感度接近于RIA的水平, 使用的试剂稳定、无毒, 保存期长, 不需要昂贵的设备, 能用肉眼或以分光光度计阅读结果。但无论哪一种检测方法, 试剂的制备, 理想的检测条件的确定, 对敏感度都有很大的影响。本文报告一种非常敏感与实用可靠的ELISA系统, 检测HBsAg达2毫微克/毫升的水平。适合临床及流行病学现场调查应用。

材料与方 法

固相支持物及其包被 聚苯乙烯96孔微量平板作为固相支持物。包被抗体为硫酸铵沉淀法制备的马抗-HBs球蛋白, 经过棋盘滴定, 确定1:1000的稀释度为最理想。用0.02M, pH7.6 tris/HCl缓冲液稀释。每孔加0.1毫升包被抗体稀释液, 置室温下3天, 然后用tris/HCl缓冲液洗涤3次, 再在每孔加满含0.5%小牛血清白蛋白的tris/HCl缓冲液, 封闭未被抗-HBs包被的部份。一小时后吸除孔内大部分缓冲液, 以胶纸封盖微量平板防止干燥, 保存于4℃备用。半年后仍有效。

抗-HBs的纯化及磷标记 用于酶标记的抗-HBs, 来自含高滴度抗-HBs的山羊血清。先用饱和硫酸铵双沉淀法分离球蛋白, 然后以亲和层析 (结合正常人血清及血浆蛋白的Sephrose CL 4B), 去除球蛋白中的抗人成分。再通过结合HBsAg的Sephrose CL 4B亲和层析柱, 使球蛋白中的抗-HBs结合到柱上, 然后用4M KCNS及0.02M, pH7.6 tris/HCl/NaCl缓冲液洗脱抗-HBs。洗脱液用0.02M, pH7.5 PBS, 4℃透析过夜以去除KCNS。再用PBS作负压透析, 浓缩为2毫克/毫升的高度纯化抗-HBs。

酶标记采用过碘酸钠法。取含量为2毫克/毫升的高度纯化抗-HBs 1.5毫升, 以

0.01M, pH9.5碳酸钠缓冲液于4℃透析过夜。取4毫克辣根过氧化物酶(Sigma, RZ 3.0)溶于1毫升新鲜配制的0.3M, pH8.1碳酸氢钠溶液。加0.1毫升1%氟二硝基苯无水乙醇溶液, 室温下置于滚动混合器上充分混和一小时。然后加入0.2毫升新鲜配制的0.1M过碘酸钠溶液, 充分混和半小时。随后移入透析袋中, 用0.001M, pH4.4乙酸钠缓冲液4℃透析过夜。次晨, 加入约0.02毫升0.2M, pH9.5碳酸钠缓冲液, 并立即加入1.3毫升经过透析的高度纯化抗-HBs, 室温下置滚动混合器上充分混和两小时。然后加入0.1毫升新鲜配制的0.1M硼氢酸钠, 放置于4℃不少于两小时。用蔗糖浓缩为1毫升左右, 通过40×2.6厘米Sephrose 6B层析柱, 去除少量未被标记的蛋白质聚合物(第一小峰)及游离酶(第三峰)。收集已被酶标记了的抗-HBs部分(第二峰, 即主峰), 再以蔗糖浓缩为4毫升左右, 在4℃下保存备用。约可供4000份标本的检测用。

酶标抗-HBs的稀释液 经过棋盘滴定, 确定稀释度为1:100的酶标抗-HBs为理想。每次在使用前配制稀释液。稀释使用0.02M, pH7.4 PBS/TWEEN缓冲液, 含1%正常人血清, 1%正常山羊血清及1%小牛血清白蛋白。

底物 底物溶液在每次应用前新鲜配制。用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。每孔使用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 吸除包被了抗-HBs的微量平板孔中的缓冲液后, 每孔加待检血清0.1毫升, 置室温下过夜。次晨, 以0.02M, pH7.4 PBS/TWEEN缓冲液洗涤5次。每孔加0.1毫升酶标抗-HBs稀释液, 室温下放置3小时。洗涤5次后, 每孔加底物0.1毫升。置黑暗中半小时, 加入0.2毫升氟化钠溶液终止酶反应。肉眼观察显色反应, 绿色为阳性。或以分光光度计(415毫微米)阅读记录吸收值, 计算待检血清与阴性对照血清的吸收值之比(T/N), 等于或超过3以上者为阳性。

结 果

一、敏感度与可靠性

测试正常人血清及各种浓度的HBsAg阳性血清, 结果见表1。检测HBsAg的敏感度高达2毫微克/毫升的水平。

表1 正常人血清的浓度

	正常人血清	HBsAg阳性血清(毫微克/毫升)				
		2000	200	20	10	2
显色反应	-	+	+	+	+	±
吸收值	0.020	2.538	1.359	0.246	0.141	0.060
T/N	1	127	68	12.3	7.1	3

混合的 HBsAg 阴性 (AUSRIA II) 正常人血清重复测试 100 次, 均不呈显色反应, 吸收值的均值为 0.032, 标准差为 0.011。又分别测试共 100 份 HBsAg 阴性的正常人血清, 亦无一份呈显色反应, 吸收值的均值为 0.045, 标准差为 0.013。

对含有 HBsAg 40 毫微克/毫升的阳性血清重复测试 40 次, 全部均呈明显的绿色显色反应。吸收值的均值为 0.461, 标准差为 0.087。

特异性的证实。为了证实反应的特异性, 应用含 HBsAg 200 ng/毫升的阳性血清进行测试, 同时分别使用稀释的人抗-HBs 免疫球蛋白及山羊抗-HBs 血清, 作二期及三期法中和试验。结果在没有加入抗-HBs 的对照标本, 呈现强阳性反应。但在加入抗-HBs 的标本, 结果均呈阴性反应 (包括肉眼观察显色反应及吸收值测定判断结果)。从而证明了本 ELISA 系统对检测 HBsAg 的特异性。

类风湿因子阳性血清的检测。为了观察类风湿因子引起假阳性反应的可能性的 大小。测试了 50 份已知 HBsAg 阴性, 类风湿因子阳性 (绵羊红细胞凝集试验滴度 1:32 ~ 1:1024) 的血清。结果在肉眼观察均不呈显色反应, 吸收值为 0.044 ~ 0.081 (正常阴性对照血清为 0.045), T/N 均低于 2, 无一份血清呈假阳性 HBsAg。

二、三种第三代检测方法的比较

对 19 份标准血清, 以密码编排, 在操作者不了解血清性质的情况下, 分别应用三种不同的第三代方法: RPHA (HEPATEST), RIA (AUSRIA II) 及本文的 ELISA 系统, 进行 HBsAg 的检测。结果见表 2。

结果可见, 本 ELISA 系统与 RIA (AUSRIA II) 的检测检测结果完全一致, 但 RPHA (HEPATEST) 的检测敏感度明显地低于前两者。

表 2 三种第三代测试方法的比较

HBsAg (ng/毫升)	ELISA +/-	RIA +/-	RPHA +/-
0	0/4	0/4	0/4
4	2/0	2/0	0/2
6	1/0	1/0	0/2
7	2/0	2/0	0/2
10	1/0	1/0	0/1
14	1/0	1/0	0/1
20	8/0	8/0	0/5

三、碳化二亚胺 (Carbodiimide) 对抗体包被的促进作用

抗体稀释液中含有碳化二亚胺, 能促进抗体结合到固相支持物上, 从而可以缩短包被时间而获得相近的检测敏感度。在三种不同的包被条件下, 观察对检测 HBsAg 的敏感度的影响三种条件为: 包被液中含或不含碳化二亚胺, 室温下一小时, 以及不含碳化二亚胺, 室温下 3 天。不同包被条件下包被的固相支持物, 用于检测 HBsAg 时的敏感

度比较结果见表3。

表 3 不同包被条件下检测HBsAg敏感度的比较

	正常人血清	HBsAg(毫微克/毫升)阳性血清		
		2000	200	20
I 显色反应	—	+	+	+
吸收值	0.032	2.585	1.458	0.282
II 显色反应	—	+	+	±
吸收值	0.054	1.245	0.557	0.138
III 显色反应	—	+	+	+
吸收值	0.054	2.287	1.062	0.231

注 1. 酶反应时间为一小时

注 2. I、含碳化二亚铵，室温下一小时。

II、不含碳化二亚铵，室温下一小时。

III、不含碳化二亚铵，室温下3天。

从表3可见，用不含碳化二亚铵的包被液，室温下3天所包被的固相支持物，用于检测HBsAg时，敏感度是理想的。但如缩短包被时间为一小时，则敏感度大为下降。然而，包被液中含有碳化二亚铵，包被时间仍为一小时，敏感度都有显著的提高。

四、使用纯化程度不同的抗-HBs用作酶标记，对检测HBsAg的敏感度的影响。

用作酶标记的抗-HBs纯度不同，对检测的敏感度有很大的影响。应用纯化程度不太高的抗-HBs制剂，如用离子交换层析分离山羊抗-HBs血清，获得IgG抗-HBs用作酶标记时，检测HBsAg的敏感仅达100ng/毫升的水平。但如以高度纯化的抗-HBs（即IgG抗-HBs进一步经过HBsAg Sepharose CL 4B亲和层析柱处理而得的抗-HBs）用作酶标记，检测HBsAg的敏感度可达2毫微克/毫升。

五、聚乙二醇（Polyethylene glycol）加进酶标记抗体稀释液中，对敏感度的影响。

曾有报告认为聚乙二醇能促进酶标抗体结合到抗原上去，从而提高ELISA的检测敏感度。但本ELISA系统却未支持这一点。曾对正常人血清及含有不同浓度HBsAg的阳性血清进行测试。在酶标抗-HBs的稀释液中，不含聚乙二醇以及含有2%、4%或8%聚乙二醇。酶标抗体反应时间为一小时。结果如表4所示。在含有聚乙二醇的测试系列，能够加强阳性标本的显色反应，分光光度计阅读的吸收值也显著提高。与此同时，正常阴性对照血清也发现本底色颜色与吸收值提高的现象。从而对T/N比值没有改善，检测敏感度没有提高。

表 4 聚乙二醇加进酶标抗体稀释液中对敏感度的影响

酶标抗-HBs 稀释液	正常人血清	HBsAg 阳性血清 (毫微克/毫升)		
		200	20	2
不含聚乙二醇	0.054	1.089	0.289	0.073
含 2% 聚乙二醇	0.097	2.037	0.564	0.143
含 4% 聚乙二醇	0.171	2.494	0.818	0.211
含 8% 聚乙二醇	0.728	2.827	2.094	1.113

结 语

本文报告的 ELISA 系统是一种非常敏感与实用可靠的检测 HBsAg 的方法。可以用目测,又可以分光光度计阅读结果。检测 HBsAg 的水平高达 2 毫微克/毫升,接近 RIA (AUSRIA II) 的水平,大大优于 RPHA 法。

用于酶标记的抗-HBs 的纯化,是提高检测 HBsAg 的敏感的重要步骤。为了获得理想的敏感度,还必须把整个检测系统中的每一步骤理想化。例如通过棋盘滴定确定包被抗体与酶标抗体的最佳稀释度;通过比较不同温度及时间的待检血清孵育与酶标抗体孵育;观察对检测敏感度的影响,选定实验条件。反应在室温下进行较为简便。提高温度可以缩短反应时间,但同时也提高了正常阴性对照的“本底”,使敏感度受影响。

固相支持物的包被时间以室温下 3 天为宜。时间短于 1 天,会使敏感度下降。但如在包被液加入碳化二亚铵,则可提高敏感度。

在本试验的条件下,聚乙二醇未能证明有提高检测敏感度的效果。

参 考 文 献

- [1] Smith A M and Tedder R S; J Virol Methods 3; 1, 1981
- [2] Nakena P K and Kawaoi A; J Histochem Cytochem 22, 1084, 1974
- [3] Salonen E M and Vaheri A; J Immunol Methods 41; 95, 1981

A Sensitive and Practical ELISA System for Detection of HBsAg

Yao Jilu

(Department of Infectious Diseases, Zhong Shan Medical College)

Abstract

An ELISA system for detection of HBsAg is set up. The results can be read either by eye or by spectrophotometer. The assay is operated at room temperature. In the optimum conditions the detectable level of HBsAg is up to 2 ng per ml serum.

The purification of the anti-HBs used for labelling with enzyme is extremely important for enhancing sensitivity of the assay. For this purpose affinity chromatography is necessary.

With adding carbodiimide to coating solution the solid phase coating time can be shortened and compared with normal 3 day method.

Polyethylene glycol added to enzyme-conjugate dilution give no significant effect on enhancing the sensitivity in this assay.

(This work was carried out in the Department of Virology, Middlesex Hospital Medical School in 1981 under the instruction of Dr Dane as a part of the project "Production of monoclonal antibodies and their application to ELISA & RIA")