

抗生物素蛋白-生物素免疫荧光技术 检测细胞培养中增殖的 甲型肝炎病毒抗原

张华远

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

RICHARD J. DAEMER

(Center for Drugs and Biologics, FDA, U.S.A.)

检测细胞培养增殖甲型肝炎病毒抗原(HA_{Ag})的敏感方法主要有直接免疫荧光(DIF), 间接免疫荧光(IDIF), 固相放射免疫(RIA)及放射免疫斑分析(RIFA)等^[1,2]。

本文第一次报告用抗生物素蛋白-生物素(Avidin-Biotin)放大作用提高免疫荧光技术的敏感性应用在细胞培养中检测HA_{Ag}, 生物素化抗甲肝IgG与抗生物素蛋白联结的荧光素偶合检测(BA-FA)与DIF比较, BA-FA不仅可获得背景清晰的荧光, 而且快速、节省特异抗体, BA-FA特异性亦好。

材料和方法

1. 荧光素标记抗体 试验性感染甲型肝炎病毒MS-1株黑猩猩恢复期血清, 硫酸铵沉淀、DEAE纤维素柱提取IgG, 滴度为ABBOTT HAVAB^R RIA 1:128 1mg/ml。甲型肝炎免疫球蛋白国际参照品(IRP-HISG) HAVAB^R RIA滴度为1:4 1mg/ml。以上两种来源的IgG anti-HAV 都各用于生物素, 荧光素标记, 以便同一来源的抗体用两种方法DIF和BA-FA比较。

异硫氰酸荧光素(FITC)标记IgG^[4,5]: 待标记的IgG稀释为1%, 对10倍于IgG体积的0.1mg FITC/ml透析, 24小时连续电磁搅拌过夜, 再将透析袋对PBS(pH 7.3)透析直至荧光素不能在透析液中测出。结合物分装冻存储备用。

2. 生物素化 IgG Anti-HAV^[6,7] 两种IgG anti-HAV 均在4℃对pH8.0的0.1mol/L碳酸盐缓冲液透析过夜, 200μl活化生物素(Boehringer Mannheim Biochemicals Indianapolis, IN)溶解在二甲基亚砜(DMSO)溶液中, 1mg/ml, 加入1ml透

本文1986年4月22日收到。

本文系作者1984年6~8月在FDA完成的部分工作。

析后的IgG, 混匀后室温反应4小时, 混合液在4°C对pH7.4的PBS透析, 其间换透析液数次, 加入甘油保存于-10°C。

3. DIF和BA-FA 原代非洲绿猴肾细胞, 人二倍体细胞MRC-5各接种在24孔盘载玻片上, 长成单层后每孔接种0.1ml 10^{-1} , 10^{-2} 稀释的HM-175株, 每次各稀释度至少检测四个载玻片, 此HM-175株已适应到AGMK上, 同一来源的IgG Anti-HAV制备的DIF, BA-FA同时检测以便比较。

DIF法仅加FITC标记的IgG Anti-HAV结合物^[1]。

BA-FA: 载玻片用PBS洗后, 冷丙酮固定1分钟, 加50%胎血血清, 然后20 μ l适当稀释的生物素化抗IgG-anti-HAV, 湿盒中4°C过夜, 次日用PBS洗载片后, 加抗生物素蛋白荧光素结合物(Sigma Chemical Company, ST Louis, Mo), 湿盒中室温反应30分钟, 清洗后固定封片, 荧光显微镜下观察。

4. 阻断试验 为证明BA-FA检测HAAg的特异性, 用试验性感染甲型肝炎MS-1株的黑猩猩感染前后血清作阻断试验, 待检载片和对照各用感染后、前血清处理30分钟, 再按BA-FA常规方法完成。

结 果

透析标记法制备的异硫氰酸荧光素IgG Anti-HAV(黑猩猩)结合物F/P克分子比在1—2之间。

表1. DIF和BA-FA检测AGMK、MRC-5上HAAg

Table 1. Detection of HAAg in AGMK and MRC-5 by DIF and BA-FA

细胞	方法*	检出HAAg阳性感染滴度/天			
		5	8	42	47
AGMK	DIF	10^1	10^{-1}		
	BA-FA	10^{-1}	10^{-2}		
MRC-5	DIF			10^0	10^0
	BA-FA			10^{-1}	10^{-1}

*DIF、BA-FA均用黑猩猩IgG anti-HAV标记试剂

表2 AGMK上检测HAAg阻断试验(BA-FA)

Table 2 Blocking Test with BA-FA in AGMK

HM-175	检测时间(天)	阻断结果	
		恢复期	感染前
10^{-2}	31	—	+
1:5	34	—	+

滴定选出DIF、BA-FA所用试剂的工作浓度后, 用DIF和BA-FA对比检测接种HM-175的AGMK或MRC-5细胞, 结果见表1:

接种HM-175后第二天开始检测AGMK上HAAg, 第五天 10^{-1} 接种HM-175载片上BA-FA观察到特异的HAAg荧光, DIF第8天才观察到, BA-FA第8天已可观察到 10^{-2} 接种的HAAg荧光, 在AGMK上重复检测结果相同。

为证明BA-FA特异性, 感染甲肝前及恢复期黑猩猩血清用于阻断试验结果见表2。

HM-175 10^{-2} 稀释接种后31天或1:5接种后34天AGMK用恢复期黑猩猩血清均能阻断HAAg荧光, 而感染前血清对照组显示++至+++阳性荧光细胞。

讨 论

BA-FA 在病毒学领域首次是用于单纯疱疹病毒检测^[8], 在细胞培养上不仅获得质量佳的荧光, 而且快速适合临床诊断的需要。随着 Avidin-Biotin 系统在免疫学分析、定位研究方面应用日益广泛, 其高度亲和力、稳定性, 简化实验手续, 提高敏感性等优点日渐被认识, 不少 Avidin-Biotin 衍生的结合物已被接受成为商品用在有关的研究、实用领域。

自1979年 Provest 成功地在细胞培养上第一次分离培养到甲型肝炎病毒以来^[9], 研究表明, HAV 在细胞培养上生长复制周期较长, 病毒或病毒抗原产量低^[10], 尽管有少数报道个别毒株例外。因此在分离、筛选毒株的传代、中和等试验时, 除选择敏感的细胞, 易于适应的毒株外, 建立快速敏感检测细胞培养上复制的甲型肝炎病毒或抗原的技术也是十分需要的, 为比较细胞培养上用BA-FA和常规检测HAAg的DIF技术, 采用同一来源IgG anti-HAV 进行荧光标记及生物素标记。文中所用二种方法, 即DIF和BA-FA都属于直接法, 由于抗体来源相同, 细胞中HAAg与IgG anti-HAV 其间特异性反应有可比的基础。BA-FA还具有Avidin-Biotin之间高亲和力结合、理论上比抗原-抗体之间的结合力至少高出上万倍, 检测敏感性由于其放大作用而明显提高, 我们的实验结果也证明BA-FA比之DIF有提高敏感性的效果。无论在AGMK上或MRC-5细胞上, 用同一毒种、浓度、方法接种, BA-FA检出HAAg比DIF都早。在AGMK上 10^{-4} HAV浓度培养5天显示阳性荧光, 比DIF法早3天。AGMK上适应的HM-175接种到MRC-5上第一代, DIF 47天仍然阴性, 而BA-FA第42天获得阳性结果。

甲型肝炎感染前后的标准血清用在BA-FA阻断试验, 选1:5较高病毒浓度和 10^{-2} 较低病毒浓度, 上毒后足以形成较强HAAg荧光时进行阻断, 结果证明方法的特异性是可靠的。

根据实验结果计算, 即以黑猩猩恢复期血清所提取之IgG anti-HAV 各用于 Biotin 标记及异硫氰酸荧光素标记为例, 测出各自用于DIF及BA-FA工作浓度后, 以每张载玻片检测HAAg所需同样体积(20 μ l) IgG anti-HAV 荧光素与生物素化 IgG anti-HAV 中特异IgG量计算, DIF所需特异IgG约为BA-FA 13倍。因此, 从节省抗体、经济效果出发, BA-FA也有可取之处。

纵观上述, Avidin-Biotin 用于免疫荧光技术检测 HAAg, 即保持了免疫荧光可用于定位等固有的长处, 由于其放大作用, 又提高了敏感性。在分离、疫苗株筛选中。这种方法有希望成为又一种有用的检测手段。

另外本文用透析标记法制备的 IgG anti-HAV 和异硫氰酸荧光素结合物, F/P 克分子比达到良好的质量标准。

在摸索BA-FA试验过程中, 加入适量牛血清仍可阻断非特异吸附, 减少背景干扰。

本文原试图用IRP-HISG作为特异抗甲肝IgG来源用在BA-FA中, 结果发现, 尽管Avidin-Biotin系统有生物放大作用, 可以提高检测的敏感性, 但不能弥补用于生物素化IgG纯度不够, 滴度较低造成非特异荧光较强的结果。因此, 即使在免疫荧光中应用Avidin-Biotin系统, 特异抗体质量仍然不能降低。

参 考 文 献

- [1] Daemer RJ, Feinstone SM, Gust ID, et al., 1981, *Infect Immun* 32:388-393.
- [2] Lemon SM, Binn IN, Marchwicki RH, 1983 *J.Clin. Micro*, 17:834-839.
- [3] Gerety RJ, Smallwood LA, Finlayson JS, et al., 1982 Second WNO/IABS Symposium on Viral Hepatitis, Standardization in Immunoprophylaxis of Infections by Hepatitis Viruses, Athens Greece 411-416.
- [4] Clark HF, Shepard CC., 1963, Discussion and Preliminary Reports 642-644.
- [5] 邵惠训等: 免疫荧光技术及其在病毒学工作中的应用 (待发表)
- [6] Subba Rao PV., 1983, McCartney-Francis NL, Metoalfe DD. *J. Immun. Meth.* 57:71-85.
- [7] Tarleton RL., Kuhn RE. 1983, *J. Immun Meth* 60:213-220.
- [8] Nerurkar LS., Madden DL, et al., 1983, *J.Clin. Micro*. 17:149-154.
- [9] Prevoist PJ., and Hilleman MR., 1979, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 160:213-221.
- [10] Purcell RH., Feinstone SM, Daemer RJ, et al., 1984, *Viral Hepatitis and Liver Disease* 9-22.

DETECTION OF HEPATITIS A ANTIGEN BY A CELL CULTURE FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE WITH BIOTIN-AVIDIN

Zhang Hua-yuan*

Richard J. Daemer**

(* National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing.)

(** National Center for Drugs and Biologics, FDA, Bethesda, MD 20205, U.S.A.)

This paper describes an improved fluorescent antibody technique for the detection of HAV. The assay is unique in its use of the characteristic of a high affinity complex between fluorescence-conjugated avidin and biotin-linked anti-HAV to increase sensitivity.

We have made a comparison between direct-fluorescent and fluorescent-antibody technique with biotin-avidin with same lot IgG antibody and same lot ACMK inoculated HAV.

Because of the high binding affinity of this system due to multiple binding of biotin to avidin and multiple attachment of biotin to the antibody molecule, the biotin-avidin fluorescent antibody technique produced a quality of fluorescent and quite low background, more rapid, less expensive test.