病毒学杂志 3，1987
Virologica Sinica

标记抗生物素-生物素酶联免疫吸附试验（LAB-ELISA）检测血清抗-HBc/IgM的研究

李方和 陈红云 喻植群 李育学 郝连杰

（同济医科大学附属同济医院临床免疫研究室，武汉）

提 要

本文将BAS用于固相免疫吸附试验，建立LAB-ELISA抗-HBc/IgM试验方法，并与普通ELISA法进行了比较。实验表明：本法敏感性较普通ELISA高2--4倍，检出率高出后者6.8%，且具有较好的重复性。为血清抗-HBc/IgM检测提供了一种新的、切实可行的方法。

本试验采用改良过碘酸盐法制备酶标记抗生物素，以含A蛋白葡萄球菌菌体亲和吸附试验制备抗-μ抗体，在稀释液中加入凝聚正常兔IgG以克服类风湿因子的干扰、考核方法的特异性采用了含A蛋白葡萄球菌菌体吸附试验及抗HBc-抑制试验。

抗-HBc/IgM的检测对评价乙型肝炎病毒（HBV）复制状况，区分HBV现症与既往感染具有重要的意义。目前多采用酶联免疫吸附试验测定。新近，不少作者报道生物素-抗生物素系统（BAS）引入免疫试验，能提高方法的敏感性，特异性及稳定性，已应用于多种领域[1-6]。但是采用BAS检测抗-HBc/IgM迄今尚未见报导。本文介绍以辣根过氧化物酶标记抗生物素，建立血清抗-HBc/IgM试验方法，并对有关问题进行了探讨。

材料和方法

材料

生物素-N-羟基琥珀酰亚胺酯（BNHS，Sigma NO：H-1759）、抗生物素，Sigma，NO：H-9275）、辣根过氧化物酶（Sigma、Type Ⅵ、NO：P-8375）、葡萄球菌A蛋白菌体（Staph Aureus Cowan Ⅰ，上海生物制品研究所）、羊抗-人IgM血清（北京生物制品研究所）等自市售获得；大肠杆菌克隆化HBcAg系中国医学科学院病毒研究所肝炎研究室供应。

辣根过氧化物酶标记抗生物素（A—P）：采用改良过碘酸盐法标记[7]。取辣根过氧化物酶5mg溶于1ml蒸馏水中，加0.1mol/L高碘酸钠溶液0.4ml，室温振荡20分钟；加

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

入乙二醇溶液0.2ml，继续振荡10分钟，置透析袋中，对pH9.5碳酸盐缓冲溶液换液透析过夜，然后加入抗生物素溶液0.5ml（2.5mg），室温轻搅2小时，对pH7.2PBS透析平衡，以3%牛血清白蛋白溶液适当稀释后分装，置－30°C贮存。将此法标记之A-P与Sigma同类产品及本室双醛法标记的A-P进行比较，其显色效果相当。

生物素标记抗-HBc（B-抗-HBc）：抗-HBc IgG自慢性HBV携带者血清中提取，以亲和层析法除去其中可能存在的抗-HBs。按照Guesdon报道的方法进行生物素标记[6]，标记物以40%甘油稀释后置－30°C贮存。

抗人μ链抗体IgG（抗-μ）：采用SPA菌体吸附试验制备。取HBV标志阴性血清2ml，以PBS作1/10稀释，加入10% SPA菌体2ml，37°C保温30分钟，4°C过夜，以PBS离心洗涤至上清液无蛋白质，去上清，沉淀仍以PBS配成10%悬液，取SPA菌体悬液1ml，加至5ml经离子交换层析法纯化的羊抗人IgM（2mg/ml）中，混匀，37°C温育30分钟，4°C放置2小时，6000r/m低温离心20分钟，取上清，加甘油至40%浓度，置－30°C贮存。采用此法制备的抗-μ，经ELISA实验证实无抗人轻链抗体组份。

凝聚IgG制备：将经DEAE Sephadex A50离子交换层析纯化之正常兔IgG（10mg／ml）置65°C水浴15分钟，待冷，4°C贮存备用。

方法 抗-HBc/IgM检测采用捕获法，实验步骤如下：

1.将抗-μ以pH9.6碳酸盐缓冲液稀释至0.5μg/ml，加至反应板各孔中，每孔0.1ml，4°C过夜，以pH7.2 PBS-Tween 20洗涤3次，甩干；

2.加入稀释待检血清标本，每孔0.1ml，每板同时加入相同稀释度之阳性（1孔）及阴性（3孔）血清，并留1孔仅加血清稀释液以做为对照。37°C放置2～4小时，洗涤法同上；

3.加入HBcAg（以含0.1%凝聚正常兔IgG，10%牛血清之PBS-Tween20缓冲液稀释）各0.1ml，4°C过夜，洗涤方法同上；

4.加入B-抗-HBc（以含0.1%凝聚正常兔IgG，10%牛血清，pH 8.0，含NaCl 0.15mol/L之Tris-Tween20缓冲液稀释），每孔0.1ml，37°C育温$1\frac{1}{2}$小时，以pH8.0，含NaCl 0.15mol/L之Tris-Tween 20缓冲液洗涤3次，甩干；

5.加入A-P（以含10%小牛血清之同上Tris-Tween 20缓冲液稀释），每孔0.1ml，37°C温育30分钟，洗涤方法同上；

6.加入邻苯二胺-双氧水底物溶液，置室温显色5～15分钟，加入2mol/L硫酸终止反应；

7.以G×M-201酶标光度计比色，并计算P/N指数，以P/N指数≥2.1者为抗-HBc／IgM阳性。

结　　果

一、方法的特异性：

取LAB-ELISA检测抗-HBc/IgM呈阳性反应血清8份（其中类风湿因子阳性血清

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3份），以PBS做1/100稀释后加等量1%SPA菌体悬液，混匀，置37°C温育30分钟，6000r/m ×20分钟低温离心，取上清、再以PBS稀释至1/1000，然后进行抗-HBc/IgM及总抗-HBc检测，并在同一反应板上加入相同稀释度的经SPA菌体处理前的标本。结果经SPA菌体处理后血清抗-HBc/IgM活性为未经处理时50.4～74.8%（平均62.4±7.5%），而处理后总抗-HBc活性仅为未处理时2.5～20%。SPA菌体处理前后抗-HBc/IgM及总抗-HBc检测结果见表1

表1. SPA菌体吸收实验结果

Tab 1, Comparison of results(P/N) before and after absorption with SPA germ

No	抗-HBc/IgM(P/N)			总抗-HBc(稀释度)		
	吸附前	吸附后	活性保存(%)	吸附前	吸附后	活性保留(%)
1	30.2	20.0	66.2	32000	1600	5.0
2	10.4	5.6	53.8	16000	1600	10.0
3	29.6	14.9	50.4	128000	3200	2.5
4	32.0	20.4	63.8	64000	6400	10.0
5	5.8	4.4	75.9	32000	1600	5.0
*6	29.3	18.7	63.8	64000	6400	10.0
*7	29.1	18.7	64.3	256000	25600	10.0
*8	6.9	5.3	76.8	32000	6400	20.0

注：*为类风湿因子阳性者

取同上8份血清在同一块反应板上分两组进行抗-HBe/IgM检测，在加入HBcAg反应后，抑制孔内加入抗-HBc IgG各0.1ml，37°C温育$1\frac{1}{2}$小时，对照组以PBS取代抗-HBc，洗涤、加入B-抗HBc继续完成以后各步操作。结果8份血清抑制试验全部为阳性，平均抑制率达89.1%，类风湿因子阳性标本与阴性标本的抑制率无明显差别。

二、方法的稳定性：

对8份血清重复四次进行抗-HBc/IgM检测结果见表2。

表2. 抗-HBc/IgM检测方法的重复性(P/N值)

Tab 2, Repeatibility of Anti-HBc-IgM assay with LAB-ELISA

重复次数	1	2	3	4	5	6	7	8
第一次	18.2	5.1	14.0	16.4	2.9	26.7	19.6	19.6
第二次	20.9	5.6	12.4	20.4	2.9	32.2	17.6	18.6
第三次	17.1	5.8	11.1	18.2	1.7	26.4	18.0	19.3
第四次	17.8	5.2	13.8	18.2	4.0	29.3	21.8	21.1
均值	18.5	5.4	12.8	18.3	2.9	28.7	19.3	19.7
标准差	1.10	0.3	1.4	1.6	0.9	2.7	1.9	1.1
变异系数(%)	9.0	6.1	10.5	8.9	32.7	9.4	9.9	5.4

三、血清稀释度对实验结果的影响

取抗-HBc/IgM阳性血清8份，系列稀释后进行检测，观察血清稀释度对检测结果的影响，结果8份血清中5份在采用较低血清稀释度时检测P/N指数反低于高稀释度

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

时 抗-HBc/IgM检测P/N指数与血清稀释度之间的关系见图1。据此，我们将血清稀释度定为1/1000。

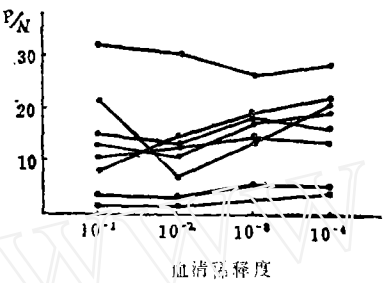

图1 血清稀释度与检测结果的关系

Fig. 1. Relationship between results of Anti-HBc-IgM detection and dilution of sera

四、方法的敏感性

采用双抗体夹心法对LAB-ELISA与普通ELISA的敏感性进行了考核。将克隆化HBcAg系列稀释，加至包被有抗-HBc IgG的反应板各孔中，4°C放置过夜，然后分别加入酶标记抗-HBc及B-抗-HBc进行LAB-ELISA及普通ELISA实验，比较两种试验方法的敏感性，结果采用LAB-ELISA检测敏感性较普通ELISA高2～4倍，两组实验检测结果见表3。

表3. 两种不同实验方法敏感性比较(OD值)

Tab 3. Comparison of sensitivity of LAB-ELISA and standard ELISA(OD)

HBcAg稀释度	原	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	空白对照
LAB-ELISA	1.5	1.5	1.26	0.95	0.72	0.46	0.21	0.11
普通ELISA	1.5	1.10	0.73	0.48	0.29	0.13	0.16	0.08

表4. 两种试验方法抗-HBc/IgM检测结果比较

Tab 4. Comparison of results of Anti-HBc-IgM detection with LAB-ELISA and Standard ELISA

		LAB-ELISA +	LAB-ELISA −
普通ELISA	+	118	3
	−	17	57

同时，我们采用LAB-ELISA及普通ELISA对193份肝炎患者血清进行了对比检测，（结果见表4），前者检出率（69.2%）稍高于后者（62.4%），两法检出率比较无显著差异（P>0.05）。

讨 论

BAS在免疫实验中通常采取LAB、桥联抗生物素-生物素试验（BrAB）及生物素—抗生物素复合物试验（ABC）等三种试验方式，在ELISA中多数作者采用LAB[1-5]。将BAS用于免疫实验不仅可提高方法的敏感性、特异性及稳定性，并能缩短操作时间，节省反应试剂，且有标记技术简单，标记物性质稳定，用途广泛等优点[1-6,8,9]，实用价值较高。我室将LAB用于血清抗-HBc/IgM检测，实验表明其检出率较普通ELISA高6.8%，检测敏感性较后者高2～4倍，并具有很好的特异性及重复性。为血清抗-HBc/IgM检测提供了一个切实可行的新方法。

进行LAB试验，A-P一般均采用戊二醛双醛法制备[1-6]。本室采用改良过碘酸盐法进行标记，亦取得理想结果。与双醛法标记物和Sigma同类产品进行比较，三者显色效果相当，工作效价前者稍高于后两者。

采用本法检测抗-HBc/IgM，必须获得高效价抗-μ。鉴于目前克隆化及动物源性抗-μ都不易获得，有作者曾采用戊二醛偶联人IgG亲和吸附实验制备抗-μ抗体[10]。我室

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

采用SPA菌体亲和吸附试验自羊抗人IgM血清中制备抗-μ，制备物经改良ELISA试验证实不含抗人轻链组分。与戊二醛偶联人IgG亲和吸附试验比较，本法不需提纯人IgG，操作简便，收获率亦相对较高。用于血清抗-HBc/IgM检测，效果与采用单克隆抗-μ相当，为抗-HBc/IgM及其它抗型抗体检测的普遍开展提供了可能性。

血清中类风湿因子（RF）可干扰抗-HBc/IgM检测结果，文献报道HBV标志阴性RF阳性血清6～73%出现抗-HBc/IgM假阳性。消除RF干扰通常可采用提高血清稀释度，在稀释液中加入异种动物血清，正常人血清，人IgG及凝聚人IgG等措施[11-13]，新近又有报道采用酶标记抗-HBc/Fab_2进行实验，可排除RF干扰[13]。但这些措施中前四种仅可部分对抗RF影响，加入凝聚人IgG及采用酶标记抗-HBc-Fab_2等措施又由于标记技术复杂、来源困难而难以广泛应用。凝聚兔IgG能与人RF结合，并曾用于血清RF检测[14,15]。利用这一特点，我们在稀释液中加入凝聚正常兔IgG以消除类风湿因子的干扰取得了满意的结果。

参 考 文 献

[1] Kendall C. et al, 1983, *J Immunol Method* 56:329.
[2] Yolken RH. et al., 1983, *J Immunol Method* 56:319.
[3] Adler-Storthz K. et al., 1983, *J Clin Microbtol* 18:1329.
[4] Wagener C. et al., 1984, *J Immunol Method* 68:269.
[5] Chang HC. et al., 1984, *J Immunol Method* 72:401.
[6] Guesdon JL. et al., 1979, *J Histochem Cytochem* 27:1131.
[7] 蒋成淦，1984，酶免疫测定法 人民卫生出版社 P 45.
[8] 郝连杰等，1986，同济医科大学学报 15:101。
[9] Falini B. et al., 1983, *Arch Pathol Lab Med* 107:105.
[10] 赵耀基等，1984，上海医学 7:343。
[11] 汪义和等，1984，中华微生物学和免疫学杂志 4:120.
[12] Lemon SM. et al., 1981, *Infect Dis* 143:903.
[13] 赵耀基等，1985，上海医学 8:222.
[14] Talal N. 1977, Autoimmunity:Genetic, Immunologic, Virologic and Clinical Aspects, Academic press, Inc(London) LTD p 571。
[15] Freedman SO. et al.,(陈泽仁译)，1982，临床免疫学 上海科技出版社 p 249。

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

DETECTION OF IgM ANTI-HBc BY ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY WITH AVIDIN LABELLED PEROXIDASE AND BIOTIN LABELLED ANTI-HBc

Li Fang-he, et al.

(Laboratory of Clinical Immunology, Tongji Hospital, Tongji Medical University, Wuhan)

A new immunoenzymatic assay was established with avidin labelled peroxidase(A-P) and biotin labelled anti-HBc (B-Anti-HBc) for detecting IgM antibody to hepatitis B core antigen.

A-P, B-Anti-HBc and antiserum to human μ chain for the assay were prepared by our laboratory. Aggregated normal rabbit IgG was added to the buffer solution employed as a dilution to overcome the influence of rheumatoid factor of the blood specimens. The specificity of the method was proved by SPA absorption method and anti-HBc inhibition test. The results of examination showed that the sensitivity of the new assay was 2-4 times higher than that of the standard ELISA and the detection rate in the former (69.2%) was higher than that of the latter (62.4%). The stability of the method was determined as well.

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net