

生物素-抗生物素系统免疫酶法 用于乙型肝炎“e”系统检测的研究

罗肇敏 何祥旺

(武汉市第七医院肝病实验室, 武汉)

DETECTION OF HBEAG AND ANTI-HBE IN SERA BY BIOTIN-AVIDIN-PEROXIDASE METHOD

Luo Zhao-min He Xiang-wang
(The No. 7 Hospital of Wuhan, Wuhan)

近年来生物素-抗生物素系统 (Biotin-Avidin-System) 在免疫学技术中的应用, 日益为国内、外学者所重视。这一技术的使用, 大大提高了方法的灵敏度, 为微量抗原和抗体的检测开辟了新的途径。我们在探讨这一新的技术中, 运用标记抗生物素和生物素法 (LAB法), 检测乙型肝炎e系统, 初步获得良好的效果, 现报道如下:

材料和方法

一、材料和试剂

1. 纯化抗-HBe: 本室自制。
2. Avidin-HRP: 本室自制。
3. Biotin-抗HBe: 本室自制。
4. 包被液: 0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液。
5. 洗涤液: 0.02mol/L pH9.0 Tris-Tween20(0.05%)
6. Avidin-HRP稀释液: 本室自备。
7. Biotin-抗HBe稀释液: pH7.4 PBS-Tween20(含20%小牛血清)
8. 底物缓冲液: pH5.0 柠檬酸缓冲液, 临用前加入邻苯二胺, 3% H₂O₂。
9. 反应终止剂: 2mol/L H₂SO₄。
10. 乙肝“e”系统 ELISA 药盒: 本室自备。
11. 510酶标比色计: 波长492nm。
12. 40孔聚苯乙烯微板(上海塑料三厂产品)。

本稿1986年4月18日收到

13. 被检血清：系本院肝科收治住院各型肝炎患者，其诊断按1984年南宁会议修订的标准。

二、试验方法 1. 检测 HBeAg：抗 HBe 包被→0.1% 牛白封板→洗涤、加样→洗涤、加 Biotin-抗HBe→洗涤、加 Avidin-HRP→洗涤、加底物→判结果。

1. 结果判定：

(1) 肉眼判定：正常阴性对照为无色，阳性对照为黄色，以阴、阳性对照为准，无色为阴性，“+”以上黄色为阳性。

(2) 比色计判定：492nm 处检测孔 OD 值/阴性对照平均 OD 值 ≥ 2.0 时为阳性。

2. 检测抗-HBe。

除点样的同时加入适量稀释的 HBeAg 血清外其它操作均同 HBeAg。

结果判定：

(1) 肉眼判定：阴性对照为黄色或浅黄色，阳性对照为无色，测定孔颜色比阴性对照孔颜色明显下降者为阳性。

(2) 比色计判定：492nm 处检测孔 OD 值/阴性对照孔平均 OD 值 < 0.5 时为阳性。

3. LAB 法检测 HBeAg 抑制试验

(1) 包被、洗涤同 HBeAg。

(2) 加样：每份标本加样 2 孔，每孔 $50\mu l$ ，其中一孔加已知抗 HBe 的血清 $50\mu l$ ；另一孔加正常人血清 $50\mu l$ ， 37°C ，1.5 小时。

(3) 以下步骤均同 HBeAg。

结果判定：

(1) 肉眼判定：二孔比较，其中加抗-HBe 血清孔颜色明显下降者为 HBeAg 阳性，否则为假阳性。

(2) 比色计判定： $(1 - 492\text{nm} \text{抑制孔 OD 值} / \text{检测孔 OD 值}) \times 100 = \text{抑制率}$ ，凡 $\geq 50\%$ 的被检测标本为阳性。

本文每次试验结果均重复 2 ~ 4 次，每次之间无明显差异。

结 果 与 讨 论

一、敏感度：LAB 法同 ELISA 法在一定浓度检测 HBeAg 阳性血清时，以正常人血清作阴性对照，两例结果 LAB 法最高滴度为 1:1600~1:3200，ELISA 法最高滴度为 1:800~1:1600，前者较后者敏感 2 倍。

表 1 两种方法对 HBeAg 检出滴度比较
Table 1 Comparison of two methods for detecting HBeAg titer

样 本	稀 释 度 1:	100	200	400	800	1600	3200	6400
1 * 例	LAB 检出 P/N 值	5.7	6.1	4.7	3.4	3.1	1.3	1.6
	ELISA 检出 P/N 值	5.6	5.0	4.4	2.6	1.8	1.0	1.0
2 * 例	LAB 检出 P/N 值	6.3	5.2	4.2	3.6	2.7	2.3	1.9
	ELISA 检出 P/N 值	11.0	10.6	4.7	2.9	2.1	1.6	1.6

二、特异性：LAB 法 HBeAg 阳性标本抑制试验，同时设抑制组、对照组。抑制组加已知抗-HBe血清，对照组加正常人血清。如表 2 八份标本为例，P/N 值均 ≥ 2.0 ，经抑制试验 P/N 值明显降低 (≤ 2)，每份阳性标本的抑制率均 $\geq 50\%$ 。

表 2 LAB 法 HBeAg 阳性标本抑制试验
Table 2 Inhibition Tests of HBeAg Positive Samples by LAB Method

组别	阴性对照 OD值	N=0.141						N=0.081
		标本号	27	52	56	105	108	
抑制组	OD 值	0.15	0.13	0.26	0.15	0.20	0.14	0.17
	P/N 值	1.06	0.92	1.84	1.06	1.42	1.0	1.21
对照组	OD 值	0.33	5.30	0.59	0.31	0.41	0.31	0.31
	P/N 值	2.34	2.13	4.19	2.2	2.91	2.2	3.83
抑制率		55%	57%	55%	52%	51%	54%	67%
								52%

本文共检测 156 份标本（见表 3），其中 LAB 法检出的 HBeAg 有 8 例 ELISA 法为阴性。经抑制试验抑制率均大于 50%（阳性）；ELISA 法检出的 HBeAg 有 7 例 LAB 法为阴性；其中 5 例经 ELISA 法抑制试验抑制率 $< 50\%$ （阴性），2 例抑制率 $> 50\%$ （阳性）。

表 3 LAB 与 ELISA 两法检测 e 系统结果比较（总例数：166 例）
Table 3 Agreements of LAB and ELISA Methods in Detection
of HBeAg and Anti-HBe

两法检出区分	样品来源	HBeAg 检出率 (%)	抗 HBe 检出率 (%)	抑制试验
两法同时阳性	乙肝患者	27(44/166)	9.6(16/166)	
	自然人群	1.8(3/166)	3.0(5/166)	
LAB 法阴性	乙肝患者	1.2(2/166)		>50%
	自然人群	3.6(6/166)		>50%
EIA 法阴性	乙肝患者			1.2%(2/166)>50%
	自然人群			3.0%(5/166)<50%
		两法符合率 90.7%	LAB 法假阴性 1.2%	
		LAB 法假阳性 0%	EIA 法假阳性 4.8%	
		EIA 法假阴性 3.0%		

LAB 法是高度敏感、高度特异的检测方法，重复性好。对于乙型肝炎的诊断、流行病学调查、优生等都有实用价值，此法所需纯化抗-HBe 量极少，可以节约大量昂贵的标记抗体和纯化抗体，并能得到较理想的技术效果。