

快速IgM抗体捕捉 ELISA 的建立及其在 乙脑早期诊断中的初步应用

张明杰 汪美先 姜绍淳

马文煜 于碧云

(第四军医大学微生物学教研室, 西安)

提 要

用辣根过氧化物酶标记的抗日本脑炎病毒 (JEV) 种特异性单克隆抗体为结合物, 建立了一种快速 IgM 抗体捕捉酶联免疫测定法 (RMAC-ELISA), 并初步用于乙脑的快速诊断, 取得了良好的效果。该法通过用鞣酸预处理微板, 提高反应温度, 在稀释液中加入 PEG 并提高 NaCl 浓度, 用鸡蛋清代替牛血清白蛋白或鸡血清, 用自来水代替 PBS 作为洗液, 用快速漱洗3次代替3×5分钟洗涤, 用TMBS代替OPD底物, 用酶标单克隆抗体代替多克隆结合物等措施, 加快了反应速度, 缩短了反应时间, 简化了操作步骤, 提高了敏感性, 保证了特异性。从微板预处理至出结果, 仅需1小时。由于该法具有简便、快速、特异、敏感等特性, 不仅可以用于乙脑的早期诊断及实验室研究, 还有可能推广到其它的免疫学检测方法中去。

关键词: IgM抗体; 酶联免疫测定; 日本脑炎

日本脑炎 (简称乙脑) 是一种由病毒感染引起的急性传染病, 发病急, 病情变化快。因此, 早期快速特异的诊断是十分重要的。已报道的方法比较多, 如抗体捕捉放射免疫测定法^[1]、抗体捕捉酶联免疫测定法^[2]、生物素标记抗原ELISA夹心法^[3]、反向被动血凝抑制试验^[4]等, 但在快速性、特异性或敏感性等方面, 仍难以满足人们的需要。本文报告的RMAC-ELISA, 具有快速、简便、特异、敏感等特点, 不仅可以用于疾病的快速诊断, 而且可以用于实验室的免疫学研究。

材 料 与 方 法

一、材料

1. 固相载体: 天津塑料制品厂生产的40孔微板, 用0.2%的鞣酸于40℃处理10分钟, 洗净后备用。

2. 主要试剂: 包被抗体为北京生物制品所生产的马抗人IgM血清中提取的IgG, 使用浓度5μg/ml; JEV特异性抗原 (特抗) 为SA₁₄株感染的鼠脑悬液, 以正常鼠脑悬液为正抗, 使用效价

本文于1988年7月27日收到

均为1:20; 酶结合物为按本室常规法用辣根过氧化物酶标记的JEV种特异性单克隆抗体2H₄, 使用效价1:2,000; 底物为上海第二医科大学化学教研室生产的TMBS, 参照文献[5]的方法配制; 终止液为2mol/L的硫酸。

3. 缓冲液: 包被液为0.1mol/L的Tris-EDTA, pH8.4; 稀释液为含0.5mol/L NaCl、4%PEG (MW=6,000)、0.6%鸡蛋清的PBS-T, pH7.4; 底物液为pH5.0, 0.1mol/L的醋酸钠-柠檬酸缓冲液。

4. 被测标本: 疑似乙脑患者血清80份, 由西安市儿童医院提供; 正常人血清100份, 腺病毒及肾综合征出血热病毒IgM抗体阳性血清各10份, 类风湿因子阳性血清15份, 均由西京医院惠赠。以上标本, 定性检测时作1:100稀释, 定量检测时从1:100起作2倍系列稀释。

5. 测定仪: DG-1型酶联检测仪, 华东电子管厂产。

二、方法

1. 快速IgM抗体捕捉ELISA(RMAC-ELISA)

在鞣酸预处理的微板上包被马抗人IgM50 μ l, 40 $^{\circ}$ C孵育10分钟, 用自来水快速清洗3次后拍干(下同); 加待测标本, 孵育、洗涤; 平行加特抗和正抗50 μ l, 孵育、洗涤; 加酶结合物50 μ l, 孵育、洗涤; 加TMBS底物, 孵育后用25 μ l终止液终止反应, 测定OD450nm, 以P/N \geq 2.1为阳性。

2. 2ME-HI: 按文献[6]进行。

3. IgM抗体捕捉ELISA(MAC-ELISA): 见文献[2]。

结 果

一、快速性及敏感性

80份被检标本, 2ME-HI及MAC-ELISA阳性的均为50份, 而RMAC-ELISA阳性的为53份(表1)。

表1 三种方法的快速性及检出率比较
Table1 Comparison among three methods in rapidly and detecting ratio

	Time (hr)	Positive/Detected	Detecting ratio(%)
2ME-HI	5	50/80	62.50
MAC-ELISA	17	50/80	62.50
RMAC-ELISA	1	53/80	62.25

其中10份经定量检测表明, 在抗原、包被抗体及酶结合物的含量比在MAC-ELISA减少3/4的条件下, RMAC-ELISA的效价比MAC-ELISA约高0—32倍(表2)。

表2 两种方法的效价比较
Table2 Comparison between two ELISA in their titres

	37B	28A	48A	51A	54A	69A	70A	79A	81A	102A	\bar{x}
RMAC-ELISA	10	12	10	9	4	7	7	9	10	8	8.6
MAC-ELISA	7	7	5	9	4	5	5	9	7	7	6.6

The antibody dilutions were expressed as $100 \times \log_2$ of the dilution factor

二、特异性及重复性

取5份阳性血清,系列稀释后与1:20的JEV特抗或正抗等量混合,中和后按文献^[7]进行检测。结果5份血清对JEV抗原都有一定程度的阻断作用。血清浓度越高,阻断作用越强。这表明检出的抗体具有JEV特异性。表3所列为具有阻断作用的最高血清稀释度。

表3 阻断试验结果
Table 3 Block assay with five different sera

	37A	37B	38A	71A	134A
Serum dilution	800	400	800	100	800
Blocked(OD ₄₅₀)	0.21	0.31	0.79	0.34	0.22
Control(OD ₄₅₀)	0.82	0.62	1.58	0.85	0.77
Block ratio(%)	74.39	50.00	50.00	60.00	70.14

取10份效价不同的阳性血清,参照文献^[8]用2ME处理后再进行测定,结果全转为阴性,表明检出的抗体为IgM类。用肾综合征出血热病毒、腺病毒IgM抗体阳性血清及正常人血清的取代试验都为阴性结果,表明该试验不受非特异性IgM抗体升高的影响。用类风湿因子阳性血清的取代试验也全为阴性结果,表明该法不受类风湿因子的干扰。

10份JEV-IgM阳性血清,经本法重复测定5次,效价无明显的波动,变异系数CV=6.7%。

讨 论

一种检测方法欲产生理想的结果,应至少具备两个条件,即使用材料良好,试验条件适宜。在一般ELISA中,往往包被时间较长,为4℃过夜或37℃2小时。本法应用鞣酸预处理微板,增强了微板对抗体的吸附力。鞣酸是一种凝集素,易与固相载体吸附,并可非特异地结合糖蛋白。鞣化后的微板,短时间内就可使更多的抗体吸附其上,仅需10分钟就能得到与一般法2—14小时相似的结果。

在抗原抗体的结合以及酶促反应的动力学中,温度是一个十分重要的因素。在适宜的温度下,反应速度最快。在一定的范围内,温度越低,反应速度越慢;随着温度的升高,反应物的分子运动加快,分子间碰撞的机会增多,易于相遇并结合,使反应加速;但温度过高,却可使酶失活,抗原与抗体的结合物解离。在该法中,各种反应均在40℃下进行,仅需10分钟就可能达到比一般法37℃1小时还要好的结果。张广浩等发现,在同一方法中,41℃15分钟与37℃120分钟的结果相似⁽⁹⁾。

PEG类非离子型多聚体,通过对免疫复合物的空间排除效应,能大大增强可溶性抗原与抗体之间的相互作用,并已广泛用于免疫沉淀及免疫比浊。Salonen等在固相ELISA中应用PEG,使反应从37℃2小时变为室温30分钟⁽¹⁰⁾。随着浓度的变化,盐对蛋白质有两种截然不同的作用,即盐析和盐溶。在抗原与抗体的结合中,疏水键和盐键是

两种非常重要的力, 而一定浓度的盐则有助于这两种键的形成。候林浦等发现, 在稀释液中加入0.5mol/L的NaCl, 可使P/N值提高, 敏感性增强。

在酶促反应中, 底物是一个十分重要的因素, TMBS是一种新型的HRP底物, 它具有溶解性好、稳定性强、敏感性高、价格便宜、无致癌作用等特点, 既可用于ELISA, 也可用于酶染色, 优于OPD及TMB^[6]。为了防止标本稀释后因蛋白质含量不同而引起的差异, 消除非特异性, 可在稀释液中加入无关蛋白质, 在检测乙脑的ELISA中, 常用的有牛血清白蛋白及鸡血清等。而这些材料存在价格昂贵及制备繁杂等缺陷。我们应用鸡蛋清来代替, 在获得同样效果的同时, 又克服了以上不足之处。

综上所述, 鞣酸对微板的预处理, 在稀释液中加入PEG并提高盐浓度, 提高反应温度, 以及应用鸡蛋清和TMBS底物等措施, 是该法快速、敏感、简便的基础。而酶标记单克隆抗体结合物的应用, 则保证了该法的特异性。2H₄是一种JEV种特异性单克隆抗体, 它与其余的披膜病毒无交叉反应。在同时有数种不同的黄病毒流行的地区, 这种特异性具有重要的意义。

考 参 文 献

- [1] Burke, DS, et al., 1982, *J. Clin. Microbiol.*, 15(3): 363.
- [2] Burke, DS, et al., 1982, *J. Clin. Microbiol.*, 16(6): 1034.
- [3] Chang, HC, et al., 1984, *J. Immunol. Meth.*, 72(2): 401.
- [4] 陈伯权等, 1987, 中华微生物学和免疫学杂志, 7(1): 43.
- [5] 黎世涛, 王秀珍, 1986, 中国免疫学杂志, 2(2): 83.
- [6] Hammon, WM, et al., 1969, *Arbovirus, in Diagnosis procedures for Viral and Rickettsial Infections*(Ed. Lannette, EH, et al), P. 277, Amer. Health Association, New York.
- [7] 姜绍淳等, 1983, 第四军医大学数报, 4(4): 280.
- [8] 顾方舟等, 1983, 中华微生物学和免疫学杂志, 3(6): 373.
- [9] 张广浩等, 1987, 西安医科大学学报, 8(2): 164.
- [10] Solonen, EM, et al., 1981, *J. Immunol. Meth.*, 41: 95.
- [11] 候林浦等, 1983, 中华流行病学杂志, 4(4): 204.

A Rapid IgM Antibody Capture ELISA and its Employ in the Early Diagnosis of Japanese Encephalitis

Zhang Ming-jie et al

(Dept. Microbiology, 4th Military Med. College, Xi-an)

A rapid IgM antibody capture (RMAC) ELISA using enzyme labeled one of the species specific McAb 2H₄ as tracer was studied for the early diagnosis. The antibody thus obtained was confirmed specific, because it was destructable by 2-ME, could be blocked by JEV antigen, and had no cross reactivity with

HFRS virus or adenovirus IgM antibody positive sera, as well as was not interfered by RF. 10 serum specimens were tested for JEV-IgM by conventional MAC-ELISA and RMAC-ELISA simultaneously, and the latter one was more sensitive. By pretesting the microplate with tannic acid, rapid washing with tap water instead of three times of 5 minutes with PBS after each incubations, reacting 10 minutes at 40°C with PEG, egg white and higher concentration of NaCl in PBS instead of 1 hour at 37°C with only PBS for each of the incubations, the RMAC-ELISA not only had higher sensitivity, but also could be finished in less than 1 hour. Since the RMAC-ELISA was a simple, convenient, rapid and sensitive method, it could be employed in ordinary virology lab for both basic research and early diagnosis of JEV infection, and it could be extended to other immunoassays either.

Key words: IgM antibody capture ELISA, Japanese encephalitis virus