维普资讯 http://www.cqvip.com

120—124 15966(5)

第11卷第2期 中国病毒学 Vol.11 No 2
1996年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 1996

以人工合成多肽为抗原的戊型肝炎病毒抗体检测方法的建立和评价

洪世雯 何红霞
(解放军302医院,北京100039)

R512.630.4

A

提要 酶联法是HEV感染的主要检测方法,多采用基因表达产物为抗原。近来由于人工合成多肽抗原克服了基因重组抗原制备复杂、非特异结构多、难以纯化的缺点,已广泛用于多种病毒感染的检测。根据已发表的HEV氨基酸序列的保守性及亲水性等特点,设计合成了两个多肽ESP1和ESP2,分别位于ORF2和ORF3区,以此为混合抗原建立了检测HEV抗体的间接ELLSA法,与市售优质试剂比较,其阳性符合率为97.75%,阴性符合率为99.43%,总符合率为98.86%。该方法灵敏度高、特异性强、安全快速,是检测HEV感染和流行病学调查的理想方法。

关键词 戊型肝炎病毒/人工合成多肽,酶联免疫法 ELISA;诊断

感染;

自1990年Reyes等[1]成功地获得一株戊型肝炎病毒(HEV)克隆以来,戊型肝炎特异性实验室诊断方法有了很大发展。1991年美国Genelabs公司用HEV ORF3区的一段重组表达多肽抗原,研制出第一代抗HEV ELISA试剂盒。但此方法操作复杂,且只有ORF3一种抗原,灵敏度低。不久Yaubough[2]等通过免疫筛选,获得两株HEV阳性克隆,分别位于ORF2和ORF3区,建立了第二代抗HEV ELISA,其灵敏度和特异性均有所提高。目前酶联法是HEV感染的主要检测手段,多采用基因表达产物为抗原[3-6]。近年来,由于人工合成多肽克服了基因重组抗原制备复杂、非特异结构多和难以纯化的缺点,已被广泛用于多种病毒感染的检测。我们根据已发表的HEV氨基酸序列[7]的保守性及亲水性等特点设计合成了两个多肽,建立了抗HEV ELISA检测法,现介绍如下:

材料和方法

1 **HEV人工合成多肽** 用ABI公司431A自动多肽合成仪合成。两条多肽ESP1和ESP2分别位于ORF2和ORF3区。

2 **固相载体** 丹麦产可拆式NUNC聚苯乙烯酶标板。

3 **酶标抗体** 辣根过氧化物酶标记的鼠抗人单克隆IgG,效价为1:800,由中国医学科学院基础所提供。

4 **血清标本** 来自本院病人及实验室保存和中国药品生物制品检定所准参比血清。

5 **操作步骤** 采用间接ELISA法。

5.1 用包被液稀释抗原至工作浓度。每孔加100 μl,包被酶标板,置4℃过夜。

5.2 用30%小牛血清PBST封闭,每孔加100 μl,置37℃ 1h。

5.3 用洗涤液(PBST)洗板5次。

5.4 每孔加稀释液50 μl,样品5 μl,置37℃保温30 min。

本文于1995年6月13日收到,10月23日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

5.5　用洗涤液洗板5次。

5.6　用酶稀释液稀释酶标记物,每孔加50 μl,置37 ℃保温15 min。

5.7　用洗涤液洗板5次。

5.8　每孔加底物缓冲液50 μl,TMB50 μl,置37 ℃显色10 min。

5.9　每孔加2 mol/L H_2SO_2 50 μl终止反应。在BIO-RAD450型酶联仪上于450 nm测吸光值A。A值大于或等于Cut off值为阳性,反之为阴性。

结　果

1　方法的建立

1.1　多肽抗原包被液选择　分别用0.05 mol/L pH 9.6CB和0.02 mol/L pH 7.4 PBS为包被液,以等量抗原包被酶标板,在相同条件下测定阴阳对照血清,结果表明,0.05 mol/L pH 9.6CB优于0.02 mol/L pH 7.4 PBS。

1.2　多肽抗原包被量的选择　用不同量多肽ESP1和ESP2分别包被酶标板,结果显示,当包被量在4 μg/孔及以上时,检测结果无明显差异。低于2 μg/孔时阳性可检出的最高稀释度下降。以ESP1和ESP2不同剂量组合确定混合包被的最佳包被量,结果见表1。本研究选用2 μg/孔ESP1和2 μg/孔ESP2。

表1　不同EPS1和EPS2剂量组合混合包被检测结果的比较

Table 1　Comparison of results of anti-HEV by different concentrations of ESP1 and ESP2 as mixed antigens

EPS1	EPS2	Anti-HEV(−)		Anti-HEV(+)						
μg/well	μg/well	1:10	1:20	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
4	4	0.05	0.07	1.05	1.03	0.83	0.41	0.27	0.19	0.08
4	2	0.03	0.02	1.12	1.00	0.79	0.46	0.30	0.15	0.07
2	4	0.06	0.04	1.08	0.98	0.69	0.33	0.25	0.14	0.09
2	2	0.05	0.03	1.20	1.07	0.74	0.46	0.23	0.16	0.08

1.3　包被温度和时间的选择　选用4 ℃、37 ℃下包被抗原30 min、1、2、4、8、12 h结果以4 ℃ 12 h最佳。

1.4　封闭液选择　设不封闭、含10%、30%小牛血清的PBST及含0.5%牛血清白蛋白的PBST,结果无明显差异。本方法选择含30%小牛血清的PBST。

1.5　样品稀释液选择　比较了PBST、含10%小牛血清的PBST、含1%牛血清白蛋白的PBST,结果无明显差异,本研究选择PBST作样品稀释液。

1.6　样品稀释度的选择　取一组已知抗HEV阴阳性标本,结果以1:10稀释样品抗HEV检出率最高。结果见表2。

表2　不同样品稀释度Anti-HEV检出率的比较

Table 2　Comparison of positive rate of anti-HEV with different dilutions of samples

样品稀释度 Dilution of sample	阴性率(n=10) Negative (n=10)	阳性率(n=10) Positive (n=10)
1:5	10/10	10/10
1:10	10/10	10/10
1:20	10/10	10/10
1:40	10/10	9/10

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.7 样品孵育条件选择 选5种孵育条件,检测一组抗HEV阴阳性样品,结果见表3,本方法选择37℃30 min。

表3 不同样品孵育条件对检测结果的影响

Table 3 The effect of different incubation of samples on results of anti-HEV

温度和时间	Anti-HEV(-)			Anti-HEV(+)		
Temp. and Time	1	2	3	1	2	3
4℃12 h	0.14	0.07	0.09	0.35	0.95	1.50
37℃1 h	0.15	0.08	0.06	0.46	1.21	1.95
37℃30'	0.09	0.03	0.08	0.46	1.15	1.81
37℃15'	0.10	0.06	0.04	0.31	0.90	1.66
43℃15'	0.15	0.08	0.09	0.42	1.19	2.00

1.8 酶稀释液选择 比较PBST、含10%小牛血清的PBST、含1%牛血清白蛋白的PBST,结果以PBST为佳。

1.9 酶标记物孵育条件选择 比较以下4种孵育条件,结果见表4,本方法选择37℃15 min。

表4 不同酶标记物孵育条件对检测结果的影响

Table 4 The effect of different incubation nf conjugate on results of anti-HEV

温度和时间	Anti-HEV(-)			Anti-HEV(+)		
Temp. and time	1	2	3	1	2	3
37℃30'	0.17	0.08	0.05	0.44	0.87	1.85
37℃15'	0.15	0.06	0.03	0.46	0.90	1.81
43℃10'	0.18	0.09	0.06	0.51	1.01	1.98

1.10 酶标记物稀释度选择 对酶标记物进行方阵滴定,结果选择酶标记物稀释度为1:800。

1.11 阳性界值确定 检测275份健康人血清抗HEV,平均A值为0.10,标准误差s为0.03,标准Cut off值为阴性均值+3s=0.19。检测34份阳性标本确定校正Cut off值为0.13×阳性对照平均值+阴性对照平均值。

2 方法的评价

2.1 灵敏度和特异性 以新加坡生物诊断试剂公司抗HEV试剂检测的89份阳性标本和175份阴性标本(包括中国药品生物制品检定所准参比血清30份)的结果为标准,本试剂检测灵敏度为97.75%(87/89),特异性为99.43%(174/175),总符合率为98.86%。另检测10例戊肝病人急性期和恢复期双份血清,除一例急性期血清未检出外,HEV抗体均为阳性。

2.2 样品稀释度与A值的关系 取已知阳性样品1份,作倍比稀释,观察样品稀释度与A值关系,结果显示两者呈直线负相关。

2.3 重复性 取一份中强阳性样品同一酶标板测定15孔,其批内变异系数为5.6%,用不同批酶标板对同一份中强阳性样品反复检测15次,批间变异系数为8.7%,试剂重复性好。

2.4 稳定性 试剂存放在4℃1、3、6和9个月及37℃5d,检测阴阳性标本各3份,与同一批试剂新制备时检测结果无明显差异,表明本试剂稳定性好。见表5。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表5　稳定性试验结果

Table 5　Results of stability

血清样品	新试剂	37℃天(day)			40℃月(month)				
Sample	New	1	3	5	1	3	5	7	9
Anti-HEV(－)									
1	0.08	0.11	0.08	0.09	0.07	0.09	0.13	0.07	0.07
2	0.03	0.05	0.02	0.03	0.02	0.05	0.04	0.01	0.03
3	0.07	0.03	0.06	0.04	0.00	0.00	0.06	0.03	0.05
Anti-HEV(＋)									
1	1.57	0.50	0.47	0.51	0.41	0.54	0.47	0.40	0.43
2	1.12	0.96	0.98	0.90	0.82	0.89	1.02	0.93	0.87
3	1.89	1.87	1.80	1.79	1.68	1.90	1.85	1.76	1.70

讨　论

近年来，戊型肝炎发病率逐年增加，对人类健康造成严重威胁，灵敏、特异的诊断试剂对HEV感染监控至关重要。随着HEV分子克隆技术的成功，相继建立了数种戊型肝炎血清抗体检测方法[1-6]。但国外试剂价格昂贵，难于在我国大范围用于临床检测及流行病学调查。我们用自行设计合成的多肽抗原建立的抗HEV ELISA法，不仅灵敏度高，特异性强，且成本较低，试剂稳定，重复性好。以市售优质试剂盒和中国药品生物制品检定所拟定准参比血清检验该方法，灵敏度为97.75%，特异性为99.43%，检测10例戊型肝炎病人双份血清，结果表明HEV抗体出现早，持续时间长，作为戊肝病毒感染的早期实验室诊断指标是有效的，与Goldsmith等[8,9]的报道一致。由结果可以看出，人工合成多肽可用于HEV感染的临床检测和流行病学调查。但由于HEV不同株之间存在差异，且抗原决定簇不只局限于单一区域[7,10,11]，故试剂盒仍需继续改进以提高灵敏度，减少漏检率。

参　考　文　献

1 Reyes GR, Purdy MA, Kim J *et al*. Isolation of a cDNA from the virus resposible for enterically transmitted non-A non-B hepatitis. Science, 1990;247:1335～1339

2 Yarbough PO, Tam AW, Fry KE, *et al*. Hepatitis E virus: Indentification of type-common epitopes. J Virol, 1991;11:5790～5797

3 Skidmore SJ, Yarbough PO, Gabor KA, *et al*. Hepatits E virus: The cause of a Waterborn bepatitis outerbreak J Med Virol, 1992;37:58～60

4 Ichikawa M, Araki M, Rikihisa T, *et al*. Cloning and expression of cDNAs from enterically transmitted non-A, non-B hepatitis virus. Microbiol Immunol, 1991;35:(7):535～543

5 Uchida T, Suzuki K, Hayashi N *et al*. Hepatitis E virus: cDNA Cloning and expression. Microbiol Immunol, 1992;36(1):67～79

6 Purdy MA, MaCaustland A, Krawczynski K *et al*. Expression of a hepatitis E vitus－type E fussion protein containing epitopes recognized by antibody in sera from human cases and experimentally infected primates. J Arch Virol 1992;123:335－349

7 Tam AW, Smith MM, Guerra ME, *et al*. Hepatitis E virus: Molecular cloning and sequencing of the full length viral genome. Virology 1991;185:120～131

8 Goldsmith R, Yarbough PO, Reyes GR, *et al*. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of acute sporadic hepatitis E in

维普资讯 http://www.cqvip.com

Egyptian Children, Lancet, 1992;339:(8789):328~331

9 Saeed AA, Al-rasheed A, Olewicz G, *et al*. ELISA for Diagnosis of acute sporadic hepatitis E. Lancet, 1992;339(8797):882

10 Khudyakov YE, Khudyakova NS, Fields HA, *et al*. Epitope mapping in proteins of Hepatitis E virus. Virology, 1993;194:89~96

11 Kaur M, Hyams KC, Purdy MA, *et al*. Human Linear B-Cell epitopes encoded by the hepatitis E virus include determinants in the RNA-dependent RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA, 1992;89:3855~3858

The Establishment and Evaluation of a Method for Detecting Anti-HEV Using Peptides

Hong Shiwen He Hongxia

(302 *Hospital*, *Beijing* 100039)

Mostly employing recombinant antigen, indirect enzyme linked immunosorbent assay is used to detect HEV infection. Since synthetic peptides can be synthetised easily and have less nonspecific structures, they have been extensively used in the laboratory diagnosis of viral diseases. Based on the reported nucleotide sequence of HEV genome and conservatism and hydrophilicity of amino acid sequence, two synthetic peptides from ORF2 and ORF3 were prepared and used to develope an EIA for detecting Anti-HEV. Detected 264 clinical specimens, the coincident rate for positive was 97.75% and for negative 99.43%, as comparing with DBL reagent (Singapore). This method has a high sensitivity, specificity safety and speed. It is an ideal method for detection of HEV infection and survey of HEV epidemiology.

Key words Hepatitis E virus, Synthetic peptides, ELISA