第20卷第6期
2005年12月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

20(6):623-625
December 2005

双抗体夹心ELISA与NIH法在狂犬病疫苗抗原检测中的比较

朱　蓉，徐葛林**，孙　文，秦　莉，卢　影

（中国生物集团公司武汉生物制品研究所，湖北武汉 430060）

Comparion on Antigen Detection of Rabies Vaccine by Sandwich ELISA and NIH Assay

ZHU Rong, XU Ge-lin**, SUN Wen, QIN Li, LU Ying

(*Wuhan Institute of Biological Products, Wuhan* 430060, *China*)

Abstract: Sandwich ELISA with neutralizing McAbs against rabies virus glycoprotein can be used as a substitutive method to the NIH test. Kunming mice (12～14g) were inoculated ip with different dilution of rabies vaccines two times for NIH test (M-NIH), then challenged with CVS strain of rabies virus. At the same time, glycoprotein of rabies vaccines were tested with sandwich ELISA. A reference vaccine whose efficacy had been known was also tested with sandwich ELISA. Analysis of the data indicated that there was a significant positive correlation (0.98) between E-NIHs and relevant M-NIHs of rabies vaccines. The range of E-NIHs resulted from one batch of rabies vaccine was between 2.41 and 5.85 while the range of M-NIH was between 5.11 and 10.19. There was a significant linear relation between E-NIHs and M-NIHs of rabies vaccines. E-NIHs showed a better reproducibility, lower cost and faster than M-NIHs. ELISA is a potential substitute of rabies vaccine NIH test.

Key words: Rabies vaccine; ELISA; NIH assay

摘要：通过用单克隆抗体制备双抗体夹心ELISA，快速检测狂犬病疫苗中狂犬病毒糖蛋白(G)的含量，将狂犬病疫苗的检定时间由28天缩短至2个工作日，以此缩短疫苗库存待检时间，提高疫苗的生产和销售效率，并最终替代NIH动物法。将待检的狂犬病疫苗样品在同一性别12～14g昆明鼠体内作效力检定试验(NIH)，同时用双抗体夹心ELISA检测狂犬病疫苗中狂犬病毒G蛋白含量，用Microsoft Office Excel做出标准品和各样品疫苗的线性关系图并计算出疫苗效力值E-NIH。结果用双抗体夹心ELISA所得的E-NIH与对应的小鼠效力试验所得结果M-NIH之间呈正相关性；同一批狂犬病疫苗分次测得E-NIH值在2.41～5.85之间，而相应的M-NIH值在5.11～10.19之间。从而得出E-NIH与相应的M-NIH之间存在明显的线性关系；与NIH法比较，ELISA具有重复性好、成本低、快速等优点；用双抗体夹心ELISA替代小鼠效力试验是可能并可行的。

关键词：ELISA；狂犬病疫苗；NIH法

中图分类号：R512.99　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1003-5125(2005)06-0623-03

狂犬病毒抗原含量是狂犬病疫苗的主要质量指标之一。其中糖蛋白是狂犬病毒唯一能诱导宿主产生中和抗体并与之结合的蛋白[1]。狂犬病疫苗的保护效力主要由G蛋白起作用，一定程度上可以认为疫苗中G蛋白含量的高低决定了疫苗的保护效力。用双抗体夹心ELISA检测RV疫苗中G蛋白的含量，可以间接估算疫苗的效力。本研究探讨用双抗体夹心ELISA替代动物试验法来检定狂犬病疫苗的效力的可行性。

1　材料与方法

1.1　实验材料

12-14g清洁级单一性别昆明鼠、CVS攻击毒株、狂犬病疫苗样品及标准品、鼠抗狂犬病毒糖蛋白

收稿日期：2005-05-26，修回日期：2005-07-18

作者简介：朱　蓉(1978－)，女，四川成都籍，硕士生，研究方向为细胞免疫学。

** 通迅作者. Corresponding anthor. Tel:027-88840487; E-mail: gelinxu@163.com.

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

单抗均由本所制备和提供，辣根过氧化物酶购自Sigma公司。

1.2 包被单抗狂犬病毒G抗体的提纯

采用硫酸铵沉淀法纯化：用50%的饱和硫酸铵提纯鼠抗狂犬病毒糖蛋白抗体后，再经33%的硫酸铵沉淀两次[1]。并测其蛋白含量。

1.3 抗体的标记

用改良过碘酸钠标记法[2]提纯鼠抗狂犬病毒糖蛋白单抗；将辣根过氧化物酶溶于过碘酸钠和pH5.6的醋酸缓冲液中，分别加入乙二酸、标记抗体、硼氢化钠溶液。经透析、离心后取上清。

方阵滴定法确定酶标记抗体的工作浓度[3]。

1.4 包被抗体工作浓度的确定

将鼠抗G单抗分别以100μg/mL、10μg/mL、1μg/mL和0.1μg/mL的浓度包被酶标板孔，100μL/每孔，4℃过夜；加入倍比稀释的冻干抗原标准品，100μL/孔，37℃孵育1h；PBS-Tween20(PBST)洗涤6次后，加入工作浓度的酶标记抗体100μL/孔，37℃孵育30min后PBST洗涤10次后加入底物显色液，37℃孵育10min后加入终止液，50μL/孔。酶标仪测定每孔A_{450}值，取A_{450}线性关系最好，数值在1.0左右的浓度作为最佳包被浓度。

1.5 双抗体夹心ELISA

用pH9.6碳酸缓冲液稀释鼠抗狂犬病毒糖蛋白单抗至最佳浓度后包被96孔板，4℃过夜；PBST洗3次，加入封闭液200μL孔，37℃湿孵1h；再加入待检疫苗和标准品疫苗，100μL/孔，具体方法同上，酶标仪测定每孔A_{450}值。用Microsoft Office Excel做出参考疫苗和各样品疫苗的线性关系图并计算出疫苗效力值E-NIH。

样品E-NIH＝anti-log(log样品原液A_{450}×log参考疫苗效力÷log参考疫苗原液A_{450})

1.6 小鼠效力试验

按文献方法操作[6]。用pH7.6的PBS将待检疫苗和参考疫苗做5倍系列稀释，腹腔免疫12-14g昆明鼠，0.5mL/只，1周后再免疫一次。第一次免疫后14d，用CVS攻击毒进行脑内攻击。逐日观察并记录小鼠的发病和死亡数至第28天，用Reed-Muench法计算样品效力单位含量。

2 结果

2.1 抗体的工作浓度

鼠抗狂犬病毒糖蛋白单抗经纯化后抗体浓度为7.4μg/mL。经试验，包被抗体的最佳浓度确定为1μg/mL；取A_{450}线性关系最好、数值在1.0左右的抗体浓度作为酶标记抗体的最佳工作浓度，即1∶3000。

2.2 体内法与体外法数据的比较

用体外单克隆抗体双抗体夹心ELISA和体内NIH动物法检测34批狂犬病疫苗所得效力(其效力值分别用E-NIH和M-NIH代替)显示，ELISA检测的E-NIH值与相应的体内动物法所得效力M-NIH值在一个数量级内，二者具有可比性。从图1可见，这两种方法检测34批疫苗样品效力所得的结果趋势相同；二者相关系数为0.98，表明二者之间存在一定的数量关系，呈正相关；经数据处理，两者的线形相关散点图(图2)显示其线性回归拟合直线方程为$y=0.9272x+0.6105$，$R^2=0.96$，同时t检验[7]结果为29.02，$p<0.01$，均表明E-NIH与M-NIH之间的线性关系具有极显著的意义。

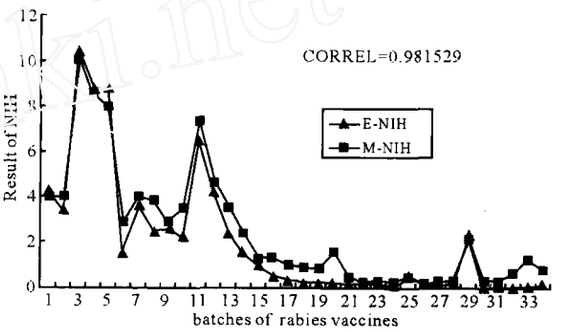

图1 34批疫苗样品的E-NIH和对应的M-NIH值

Fig. 1 The result of E-NIHs and M-NIHs of 34 batches rabies vaccines

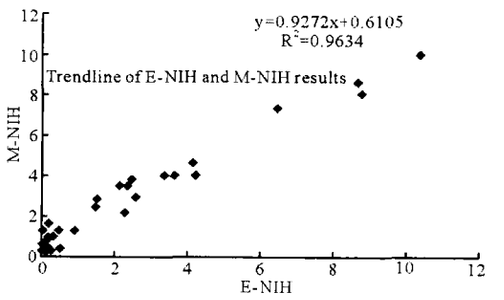

图2 34批疫苗样品的E-NIH和对应M-NIH值间线性关系的散点图

Fig. 2 The trendline of E-NIHs and M-NIHs of 34 batches of rabies vaccine

2.3 重复性

一份疫苗样品(M-NIH为4.0 IU/mL)9次检测所得的E-NIH值结果为3.6±1.3；一份疫苗样品(M-NIH为7.5 IU/mL)5次检测所得M-NIH为7.7±2.3(图3)，表明E-NIH值比M-NIH值的重复性好，更稳定、可靠。

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

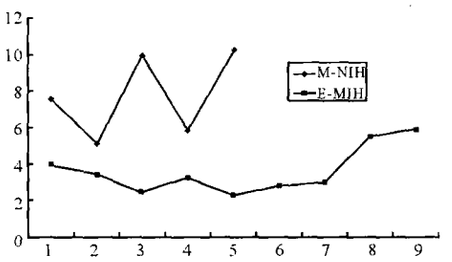

图 3　ELISA 和 NIH 法重复检测疫苗样品的实验结果

Fig. 3　The repeating test of ELISA and NIH test

2.4　灵敏度

ELISA 检测可测得狂犬病疫苗的 E-NIH 最低为 0.064，通过换算相当于效力为 0.67 IU/mL 的疫苗。

2.5　特异性

本法用纯化鼠抗狂犬病毒糖蛋白单抗作包被抗体，只对狂犬病毒 G 蛋白产生特异性结合，对其他任何蛋白均不发生反应[12]，因此无非特异性反应。

3　讨论

ELISA 作为一种快速简捷的测定方法已广泛用于各种免疫学检测中。本试验采用单克隆双抗体夹心 ELISA 进行检测，国内外尚未见报道。本方法不使用动物，实验时间不超过 2 个工作日，且灵敏度与动物法基本相同，特异性高，不存在个体差异问题，能达到快速、准确检测疫苗生产各阶段 RV G 蛋白含量的目的，且由于使用精确度很高的微量移液器，操作误差也相应减小，这样得出的结果自然更准确更能令人信服。因此体外法更稳定、可靠且重复性好。

狂犬病目前在中国和许多发展中国家仍是一个严重问题[9-11]，防治狂犬病的主要措施目前仍以疫苗接种为主，所以检测狂犬病疫苗效力是否合格十分重要。而目前使用的动物实验法检测费用高、操作繁琐、耗时长（28d），结果误差大，重复性低。据 WHO 统计证实，动物测定的疫苗效力值 M-NIH 与疫苗的真实效力值之间可以相差 4 倍[8]，即同一疫苗的 M-NIH 值最大可以相差 16 倍之多；随着我国加入 WTO 和国际动物保护协会对实验用动物的制约，狂犬病疫苗效力的检定迫切需要改进以与国际接轨，因而建立快速、准确、实用且不用动物的狂犬病疫苗效力检测方法势在必行。WHO 已将糖蛋白的检测方法列入疫苗效力检测的参考法，希望最终能够用体外测抗原量的方法替代目前用动物测疫苗效力的方法[8]；曾鸣等人曾用ELISA检测RV疫苗抗原成分，但由于种种原因未能开展这方面的工作[4,5]。我室已研制出抗狂犬病毒糖蛋白单抗[12]，中和效价达到 20000 IU/mL 左右，在此基础上用单抗包被的双抗体夹心 ELISA 方法检测疫苗中 G 蛋白含量，可极大地降低疫苗生产及检定成本，缩短疫苗半成品及成品检定时间并减轻工作量。

从本试验结果可以看出，ELISA 所得效力 E-NIH 与动物法所得效力 M-NIH 相比，两者具有正相关趋势，存在明显的线性关系。用双抗体夹心 ELISA 替代小鼠效力实验在实践上是可行的。本实验采用同一工艺生产的不同批次疫苗为样品，用相同工艺的同一批冻干疫苗作为参考疫苗来调节各疫苗样品的 E-NIH 值，且与 NIH 动物法同步进行测定。这样，既避免了动物实验法检测费用高、操作繁琐、耗时长（28d），结果误差大，重复性低等不足，又保证了不同时间检测结果的一致性和可比性，使得结果更具说服力。结果中有少数结果不是很理想，其 E-NIH 和 M-NIH 值趋势并不完全一致，这与 M-NIH 试验结果的重复性较差有关。

参考文献

[1]　杜　平. 医用实验病毒学[M]. 上海：上海微生物学会，1982. 137-142.

[2]　朱培坤. 酶免疫技术[M]. 第一版. 山东：山东科学技术出版社，1983. 47-61.

[3]　徐宜为. 免疫检测技术[M]. 第二版. 北京：科学出版社，1997. 167-182.

[4]　王玉琳，封多佳，吕宏亮，等. 双抗体夹心 ELISA 检测狂犬病疫苗抗原活性组分[J]. 微生物学免疫学进展，1999. 27(3)：31-33.

[5]　曾　鸣，王玉琳，梁　勇，等. ELISA 和 NIH 法检测狂犬病疫苗抗原量的比较研究[J]. 微生物学免疫学进展，1996，24(3)：20-22.

[6]　中国生物制品标准化委员会. 中国生物制品规程[M]. 北京：化学工业出版社，2000. 204-209.

[7]　刘筱娴. 医学统计学[M]. 第一版. 科学出版社，2000. 127-130.

[8]　WHO expert committee on rabies. Eight report. WHO Technical Report Series 824[M], Geneva Switzerland 1992. 12.

[9]　林放涛，于思庶. 狂犬病学[M]. 福建：福建科学技术出版社，1992. 98-108.

[10]　Meslin F X, Kapian M M, Koprowski H. Laboratory Technologies in Rabies[M]. WHO, Geneva, 1996. 105-122.

[11]　俞永新. 狂犬病毒和狂犬病疫苗[M]. 北京：中国医药科技出版社，2001，13-137.

[12]　徐葛林，鲁晓知，朱家鸿，等. 抗狂犬病毒糖蛋白及核蛋白单抗的研制及应用[J]. 中国生物制品学杂志，1996，9(1)：13-24.

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net