

生物素SpA对布鲁氏菌病血清

检测的初步应用

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所

李爱芳 纪绍忠 徐立康 詹中洪 蒋励斌

生物素(Biotin“B”)和亲和素(Avidin“ A”)系统“S”(BAS),自七十年代末开始在免疫学研究中得到应用^[1]。由于它通用性强,灵敏度高,使用方便,大大提高了酶联免疫、荧光免疫、放射免疫等检测技术方法的灵敏度,为检测大量标本,尤其是在流行病学研究中为微量抗原和抗体的调查开辟了新的途径,受到国内外学者的关注。又由于SpA具有广谱的第二抗体功能^[2],将它与BA结合,就会更大地发挥该系统的广谱作用。本文报道了B-SpA的制备方法,并测定了效价。应用BA-ELISA(B-SpA)和ELISA(HRP-SpA)法对比检测了动物血清中的布氏菌病的抗原和抗体。

材料和方法

一、材料

结合物: B-SpA、HRP-SpA均为自制。
酶标亲和素(A-HRP), SIGMA厂出品。
抗原: 布氏菌可溶性抗原,系104M菌用常规超声波打碎法自制。用作BA-ELISA和ELISA法检测布氏菌病血清中抗体时的包被物。

抗体: 系牛布氏菌544A(27.2亿/只)和羊Ⅱ(10亿/只)感染9个月绵羊血清(新疆兽医防疫总站布防队提供),补体结合效价1:8以上和试管凝集1:200以上的多份混合血清,经硫酸铵盐析冻干的丙球蛋白,用作BA-ELISA和ELISA双抗体夹心法,检测布氏菌病血清中抗原时的包被物,作为双抗体夹心法的第一抗

体。此外,用104M布氏菌株,经4次接种进行家兔免疫,血清的试管凝集效价1:2500,用该血清作为双抗体夹心法的第二抗体。

被检标本: 用作抗体检测的标本,为本室配合虎红抗原出售的兔抗布氏菌阳性血清(作阳性对照用。系用104M布氏菌株4次接种免疫兔,冻干前试管凝集效价1:1280。用作抗原检测的标本,为人工感染或免疫布氏菌28天的羊血清(其中有通过皮下注射的羊Rev127亿/只、牛544A 27.2亿/只、羊Ⅱ10亿/只),该标本为新疆兽医防疫总站布防队提供。

聚苯乙烯板,系上海塑料三厂出售。

二、方法

1. 生物素SpA结合物的制备:

取试管9支,按序编成1~9号,各加SpA 0.1ml(1mg/0.1ml用0.1M NaHCO₃液溶解),再分别加入BHSH(1.7mg 酯化生物素/0.1ml 二甲基甲酰胺)其酯化生物素含量为23.6 28.3 38 47.2 59 85 127.5 159.4 212.5μg; BNSH: SpA毫克分子比值按管号依次为38:1 33:1 23:1 19:1 15:1 11:1 7:1 5:1 4:1室温下振荡1小时,最后每管加入0.1M NaHCO₃液0.6ml,并用0.05M pH 7.4 PBS透析24小时。取出分装于4°C保存备用。

2. BA ELISA方法:

(1) 检测抗体: 在酶联聚苯乙烯板小孔中包被布氏菌可溶性抗原(50μg/ml)0.1ml(包被液: 0.05M pH9.5碳酸盐缓冲液),4°C过夜或37°C2小时,洗涤三次(洗液0.01M pH7.2 PBS)内含0.5% Tween-20;加入不同稀释度的被检布氏菌血清(稀释液: 洗液内含0.25%牛

血清白蛋白), 37°C 1小时, 洗涤三次; 加入使用浓度的B-SpA 0.1ml/孔(稀释液同上), 37°C 1小时洗涤三次; 加入使用浓度的A-HRP 0.1 ml/孔(稀释液同上), 37°C 40分钟, 洗涤三次(亦可将B-SpA和A-HRP预先共温一次加入); 最后按常规加联苯二胺底物液(0.1ml/孔)显色测定结果。试验中除试剂空白对照外, 并用被检动物种的正常血清作阴性对照, 以检测孔内OD值减去阴性对照孔的OD490值为测定的结果值。

(2)检测抗原: 首先包被羊抗布氏菌丙球蛋白0.1ml/孔(双抗体夹心的第一抗体, 100µg/ml), 加入不同稀释度的被检标本0.1ml/孔, 然后加兔抗布氏菌免疫血清抗体0.1ml/孔(双抗体夹心法中的第二抗体), 其他方法、步骤、对照等均与检测抗体相同。结果以检测孔和阴性对照孔OD490比值(S/N)在3以上的为阳性。

3. HRP-SpA常规酶联试验(ELISA)方法:

无论检测布氏菌抗体或抗原, 均用查抗体的ELISA法和查抗原的双抗体夹心ELISA法, 所不同的是以HRP-SpA代替B-SpA。试验中用作包被的抗原、抗体、被检测的标本、底物液均与BA ELISA法相同; 而洗液为0.05% Tween-20蒸馏水, 稀释液为BA ELISA洗液。

结 果

一、BA ELISA条件的探索:

表2 B-SpA结合物效价的测定

血清	OD490									B-SpA
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1:800	0.24	1.00	1.41	0.99	1.85	2.33	2.83	1.61	1.33	1:10万
1:1600	0.13	0.59	0.71	0.58	1.05	1.29	2.06	0.92	0.71	1:20 "
1:3200	0.09	0.49	0.58	0.52	0.97	1.13	1.81	0.91	0.75	1:30 "
1:6400	0.12	0.45	0.26	0.46	0.67	0.83	1.40	0.58	0.41	1:40 "

二、生物素和SpA的结合比。

A-HRP 0.3125µg/ml为使用浓度, 兔抗布氏菌血清的使用稀释度 1:3200, 9个不同

不同稀释度兔抗布氏菌免疫血清和B-SpA, 用BA ELISA检测抗体的方法进行方阵试验, 初步测知9个号B-SpA结合物的效价均在1:800以上; 选其中6号作A-HRP使用浓度的试验。

1. A-HRP使用浓度的探索:

用1:400兔抗布氏菌免疫血清, 和不同稀释度6号B-SpA和A-HRP, 用BA ELISA检测抗体的方法进行方阵试验。结果最大稀释度的A-HRP(0.3125µg/ml)和B-SpA(1:64 OD490值仍为1.32, 因此选用A-HRP的使用浓度为0.3125µg/ml。详见表1。

表1 BA ELISA法中A-HRP使用浓度的探索

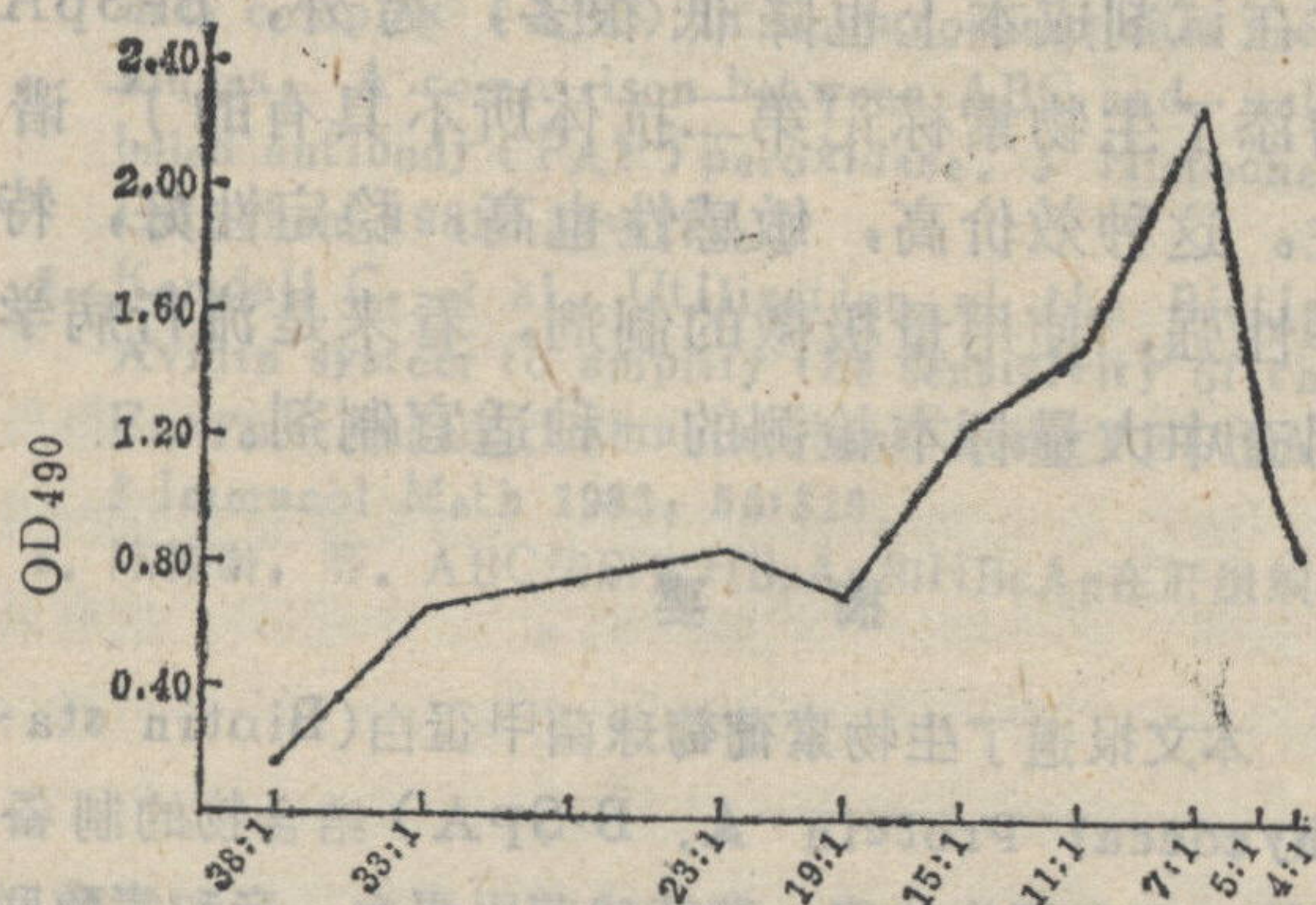
A-HRP	B-SpA 稀释度			
	1:8000	1:1.6万	1:3.2万	1:6.4万
2.5µg/ml	3.76	3.03	2.25	2.04
1.25µg/ml	3.25	3.33	2.75	2.66
0.625µg/ml	3.25	2.88	2.28	2.16
0.3125µg/ml	2.86	2.25	1.84	1.32

2. B-SpA效价的测定:

使用不同稀释度的兔抗布氏菌免疫血清和B-SpA, A-HRP使用浓度为0.3125µg/ml, 用BA ELISA检测抗体的方法, 测定了B-SpA效价; 结果是: B-SpA结合物7号效价最高, 当1:40万稀释(与兔抗布氏菌免疫血清1:6400)OD490值仍为1.4; 6号1:30万、5号1:20万(分别与兔抗布氏菌免疫血清1:3200和1:1600)OD490值均在1以上。详见表2。

结合比的B-SpA结合物均为1:20万稀释。用BA ELISA检测抗体的方法进行测定, 结果结合比中(38:1 33:1 23:1 19:1 15

: 1 11:1 7:1 5:1 4:1)的OD490值均在1.0以上为15:1至5:1; 而以7:1最佳, 其OD490值高达2.27, 见附图。



附图 用BA ELISA法测定BNHS和SpA毫克分子的最适比

三、用BA ELISA法检测布氏菌病血清中抗体、抗原的结果。

1. BA ELISA与ELISA法检测兔抗布氏菌血清中抗体的比较。

用A-HRP0.3125μg/ml, B-SpA 7号使用稀释度1:40万, HRP-SpA使用稀释度1:10000, 检测兔抗布氏菌血清。结果是: BA ELISA法比ELISA法灵敏度高8倍, 而B-SpA的使用稀释度比HRP-SpA的高40倍。详见

表4 双抗体夹心BA ELISA法检测绵羊血清中布氏菌抗原结果

实验结果	OD490									阴性对照
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
实验 第一次	0.08	0.05	0.04	0.03	0.21	0.04	0.07	0.18	0.12	0.02
实验 第二次	0.06	0.07	0.02	0.04	0.24	0.13	0.02	0.18	0.15	0.02
平均值	0.07	0.06	0.03	0.035	0.225	0.085	0.045	0.18	0.135	0.02
S/N值	3.5	3	1.5	1.8	11.3	4.3	2.3	9	6.8	0

讨 论

BAS方法中(ABC方法中是预先按一定比例将亲和素和酶标生物素共温, 使形成复合物ABC), 只有当亲和素和B-HRP两者的比例合适, 才互相形成晶格似结构, 使BA的复合物ABC)的放大作用显示出来[4]。我们的实验表明, 当生物素和SpA两者结合比为7:1 (mM/mM)时, 与A-HRP0.3125μg/ml 反应

表3。

表3 BA ELISA与ELISA法检测兔抗布氏菌血清中抗体的比较

被检血清	OD490		BA-SpA与HRP-SpA稀释倍比(万)
	B-SPA(7号)	HRP-SPA	
1:800	2.38	1.34	10:1
1:1600	2.06	1.07	20:1
1:3200	1.81	0.84	30:1
1:6400	1.40	0.54	40:1

2. BA-ELISA双抗体夹心与ELISA双抗体夹心法检测羊抗布氏菌血清中抗原的比较。

使用A-HRP0.3125μg/ml, B-SpA 7号使用稀释度1:30万, HRP-SpA使用稀释度1:6700, 夹心第二抗体兔抗布氏菌免疫血清1:800。用BA ELISA和ELISA双抗体夹心法检测了羊抗布氏菌血清9份, 结果是: 双抗体夹心ELISA法S(被检孔的OD值)/N(阴性孔的OD值)均在1.5以下, 即全为阴性; 而双抗体夹心BA ELISA法有3份S/N比值在3以上(1、2、6号血清), 另有3份在6以上(5、8、9号血清); 由此可见该法在检测抗原方面也是极有前途的。详见表4。

最好; 由图1、表2结果可以看出, B-SpA中BNHS含量过大或过小都会影响其反应性。其原因可能是: 生物素在BA ELISA系统中起至关重要的桥联作用, 因为生物素的多寡涉及到SpA的结合量, 而SpA的量又直接关系到与被检系统的反应; 另一方面生物素又直接影响与A-HRP的显色反应系统, 因此生物素与抗体(SpA)结合比中, 生物素的用量就甚为重要。关于结合比量的计算[5], 有的用重量比

计算^[1]，还有提出结合物用克分子比较重量比为佳，甚至提出用克分子数比^[8]；我们认为结合物的比值不应以单纯的重量相比，因此采用了克分子比计算，获得的结合物的使用稀释度可高达1:40万，用于BA ELISA法检测抗原和抗体都得到较为满意的结果。

BAS在免疫学中的应用是七十年代末才开始的，国内近几年才在应用BAS于诊断中有ABC法的报道，但制剂多为成套进口的，在BAS中用BA ELISA法并以B-SpA代替第二抗体尚未见有报告。我们用自制的B-SpA，在BA ELISA法中代替B抗兔IgG检测了兔抗布氏菌血清的布菌抗体，比ELISA(HRP-SpA为第二抗体)法敏感8倍，而ELISA(HRPSpA)法检测布病的可靠性已有报道^[2]。Langone用不同类别的IgG抑制¹²⁵I SpA结合IgG的试验证明：绵羊IgG与SpA的结合力极差，只有兔IgG结合力的1/800；薛采芳等报告用SpA的ELISA法检查13种哺乳动物血清中的IgG证明，其中绵羊、山羊、牛犊、马、大白鼠等血清中的IgG与SpA不起反应^[10]。我们使用绵羊抗布氏菌Ig作第一抗体(它不与SpA结合)，用兔抗布氏菌抗体作第二抗体(能与SpA结合)的BA ELISA夹心法，检测了人工感染的布氏菌的绵羊血清中布氏菌抗原(当以正常绵羊血清用于对照孔测OD值时结果明显低于试验组)，证明检查布氏菌抗原的结果是特异性的。BA ELISA法无论在检测抗体或抗原中都比ELISA法敏感，这与文献报道是一致的^[7]。

关于BAS酶联免疫比ELISA较灵敏的原理：一方面是由于亲和素和生物素的亲和力是抗原抗体亲和力的百万倍，因此当亲和素和生物素结合后不会被温育洗涤等解离而降低效价；另一方面是由于生物素既可标记抗体又可标记酶，还有和亲和素结合的通用性；另外一个抗体分子理论上可偶联90个生物素分子，一个亲和素分子有四个生物素结合部位，这样通过生物素形成多级放大，因此它比单纯的酶标抗体法敏感很多。且据文献报道^[7]，生物素标记

制剂易于保存，其活性变化小，经较长时期它的灵敏度也无明显下降，加以由于各类试剂均可高度稀释，这样就明显地减少了非特异性，同时在试剂成本上也降低很多，另外，B-SpA增添了生物素标记第二抗体所不具有的广谱性。这种效价高，敏感性也高，稳定性好，特异性强，使用量极微的制剂，看来是流行病学调查中大量标本检测的一种适宜制剂。

摘 要

本文报道了生物素葡萄球菌甲蛋白(Biotin staphylococcal Protein A, B-SPA)结合物的制备方法。建立了生物素、葡萄球菌甲蛋白、亲和素酶联免疫吸附试验(BA ELISA)方法的适宜条件，并用此法测定了B-SPA的效价，其灵敏度高达1:40万。用BA ELISA法检测了兔抗布氏菌的免疫血清，抗体滴度比常规ELISA法可高达8倍。检测布氏菌病血清中的抗原，用此法比ELISA更灵敏。为流行病学、血清学调查提供了一个非常灵敏的方法。

A Preliminary Study of Biotin-SpA in Detection of Antigen and Antibodies in Sera of Brucella Animals Li Ai-fang, et al., Institut of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medical Sciences

In this paper, a method of biotin and staphylococcal protein A (B-SpA) conjugation preparation has been described. The optimum condition for ELISA in B-SpA-avidin-peroxidase system (BA-ELISA) was established. The titer of B-SpA by means of BA-ELISA is 1:400,000. Compared with the conventional ELISA for determining the antibody level of immune rabbit sera against brucella the sensitivity of BA-ELISA is 8-fold as much as the former. The sensitivity of BA-ELISA for detecting brucella antigen is also higher than that with conventional ELISA. The method, BA-ELISA is highly sensitive and specific and it seems that the BA-ELISA may facilitate epidemiological studies.

参 考 文 献

1. Yoken RH, et al. Enzyme immunoassays for the detection of bacterial antigens utilizing Biotin-labeled antibody and peroxidase Biotin-Avidin complex. J Immunol method 1983; 56:319.
2. 李爱芳, 等. SpA-HRPO结合物应用于某些动物源性

传染病诊断的研究. 中华流行病学杂志 1983; 4(4): 244.

3. 章谷生, 等. 生物素-亲和素系统(BAS)及其应用. 全国McAb ELISA学术交流会论文集. 1984: 6~11.

4. Hsu SM, et al. Use of Avidin-Biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) peroxidase. J Histochem Cytochem 1981; 29:577.

5. Kemdall C, et al. Utilization of the Biotin/Avidin system to amplify the sensitivity of the Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). J Immunol Meth 1983; 56:329.

6. 陈梅龄, 等. ABC法研究HBsAg和HBcAg在肝组织内

的分布. 中华内科杂志 1985; 24卷增刊: 30.

7. 程振球. 抗生物素蛋白-生物素系统在免疫学中的应用. 全国McAb ELISA学术交流会论文集. 1984: 1~5.

8. 施秉钧, 等. 生物素衍生物的制备, 抗生物素的纯化及它们在免疫酶标中的初步应用. 中华微生物学免疫学杂志 1985; 5(3): 161.

9. Langone J. Iodine-125-labeled protein A, With IgG and use a tracer in radioimmunoassay. J Methods in Enzymology 1980; 70:356.

10. 薛采芳, 等. 酶标记葡萄球菌A蛋白及其在酶联免疫吸附试验中的应用. 大连正常菌群SpA会议资料. 1981: 205~206.

(工作中得到王枢群副研究员和阎守敦大夫等的大支持特力此致谢)

应用市售冻干抗体进行酶联免疫吸附试验检测 抗-HBcIgM的初步研究

济南部队军事医学研究所 杨占清 吴钦永 彭贺臣 于晓敏

目前, 国内报告酶联免疫吸附试验(ELISA)检测乙型肝炎核心抗体IgM(抗-HBcIgM)所用抗体大多是国外引进或经实验室提纯的国产抗体, 提纯抗体的方法需要低温条件和一定的仪器设备, 基层实验室难以进行. 我们使用中央卫生部生物制品研究所生产的市售冻干抗人IgM抗体, 不经实验室再提纯处理, 直接用于ELISA检测抗-HBcIgM, 与再提纯的ELISA进行比较, 获得满意效果, 现简要报告如下.

材料与方法: 本文所用的溶液和操作流程与文献报道的基本一致. 核心抗原(HBcAg)和酶结合物(抗-HBc·HRP)购于北京军事医学科学院, 抗-HBcIgM阳性与阴性对照血清由第四军医大学流行病学教研室赠送.

结果与讨论: 应用本方法检测抗-HBcIgM结果见附表.

由表可见, 对各型肝炎检测结果与国内报告的情况基本一致. 应用于临床检测HBsAg阴性急性肝炎患者可提高乙型肝炎早期诊断率达39.7%. 而且本法敏感性高、重复性好. 以2-巯基乙醇破坏IgM, 证明检出系统是特异的. 检测10份类风湿因子阳性血清结果均为阴性. 用本抗体和再提纯抗体同时检测33份标本, 检出抗-HBcIgM阳性与阴性结果完全一致. 本方法

附表 住院肝炎病人及健康人抗-HBcIgM检测结果

	检测人数	抗-HBcIgM	
		阳性数	阳性率(%)
急性肝炎			
HBsAg(+)	36	29	80.6
HBsAg(-)	63	25	39.7
慢活肝			
HBsAg(+)	21	17	81.0
HBsAg(-)	6	3	50.0
慢迁肝			
HBsAg(+)	14	13	92.9
HBsAg(-)	6	2	33.3
肝硬化			
HBsAg(+)	5	3	60.0
HBsAg(-)	1	0	0
HBsAg携带者	11	3	27.3
健康人	58	0	0

不需要特殊仪器设备, 可用目测判定结果, 具有安全、价廉, 操作简便, 便于流行病学调查的大批标本的检测等优点, 在目前没有成套试剂生产供应情况下, 市售冻干抗体直接应用酶标法, 对基层实验室具有一定的实用价值和推广意义.