

# 一种简便快速的血清HBsAg检测方法

标记抗生物素—生物素斑点酶联免疫

吸附试验 (LAB—Dot ELISA)

同济医科大学附属同济医院临床免疫研究室

郝连杰 祝 焱\* 李方和 俞植群 陈红云

**提要** 应用标记抗生物素—生物素斑点酶联免疫吸附试验检测了190例血清HBsAg, 检出HBsAg最低浓度可达 $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$ , 较反向间接血凝法(RPHA)敏感8~16倍, 具有一定的特异性及重复性。本方法简便经济, 需时仅3小时, 并可在点样后室温贮存一月以上再检测, 携带方便, 特别适于流行病学调查。

**关键词** 乙肝表面抗原 生物素 抗生物素 斑点酶联免疫吸附试验

近年来, 国外许多作者用硝酸纤维素纸(NC)作为载体进行斑点酶联免疫吸附试验(Dot—ELISA)检测病毒、细菌、寄生虫抗原和抗体以及筛选杂交瘤上清液<sup>[1~5]</sup>, 其特点在于简便、快速、经济、且具有较好的敏感性、特异性及重复性。国内在此方面的研究甚少。本研究是在本室建立的标记抗生物素—生物素酶联免疫吸附试验(LAB—ELISA)检测血清HBsAg的基础上<sup>[6]</sup>, 以NC作为载体, 检测190例血清HBsAg, 并对实验有关问题进行探讨。现将结果报告如下。

## 材料和方法

生物素—N—羟基琥珀酰亚胺酯(BNHS Sigma No: H—1759)、抗生物素(Sigma H-9275)、辣根过氧化物酶(Sigma Type. VI, No: P-8375)均为美国Sigma公司产品。抗-HBs/a为武汉生物制品研究所提供。

生物素标记抗-HBs/a(B-抗-HBs)按Guesdon<sup>[7]</sup>报道的方法制备。

辣根过氧化物酶标记抗生物素(A-P)按改良过碘酸盐法<sup>[8]</sup>制备。

NC纸为浙江黄岩人民化工厂产品。

HBsAg诊断血清为北京生物制品研究所产品。

受检血清均来自本室临床乙肝标志检测标本。

实验方法按Kumar<sup>[3]</sup>等报道的方法加以改进, 试验步骤如下:

1. 将受检血清以pH7.2、0.01M PBS 1:10稀释, 取 $2\mu\text{l}$ 点在NC纸上, 风干后以Tris-HCl缓冲液(0.05M、pH7.4、含0.5M NaCl、0.05% Tween 20)洗涤5次(下同), 并以此0.05% Tween 20 Tris-HCl缓冲液室温阻断非特异结合部位20分钟。

2. 以B-抗HBs/a溶液(10%小牛血清Tris-HCl缓冲液1:2000稀释)室温与NC纸孵育1小时, 洗涤。

3. 以A-P溶液(稀释液同2, 1:1600稀释)室温与NC纸孵育30分钟, 洗涤。

4. 将NC纸浸入新鲜配制的3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐-双氧水底物溶液中, 室温放置5~15分钟显色。

\*本室进修生

5. 结果判断以出现棕色斑点者为阳性。

RPHA检测HBsAg按常规，以血清1:16稀释时，50%以上血球凝集者为阳性。

### 结 果

#### 一、LAB-Dot ELISA实验方法的敏感性

采用回收试验对LAB-Dot-ELISA检测HBsAg的敏感性进行了测定。将纯化HBsAg加至HBsAg阴性血清中，系列稀释后以LAB-Dot-ELISA法进行测定，结果本法HBsAg最低检出浓度为0.01μg/ml。此外，还对8例HBsAg阳性血清采用LAB-Dot ELISA及RPHA进行了滴度测定，结果LAB-Dot ELISA检测血清HBsAg滴度较RPHA法高8~16倍(表1)。

表1 两种血清学方法检测HBsAg敏感性(滴度)比较

	血清HBsAg阳性滴度							
	1	2	3	4	5	6	7	8
LAB-Dot ELISA	256	512	1024	2048	4096	8192	4096	1024
RPHA	16	32	64	128	256	1024	512	64
敏感倍数	16	16	16	16	16	8	8	16

#### 二、LAB-Dot ELISA试验方法的特异性

对25例HBsAg阳性血清进行抑制试验以评价其特异性。取本法阳性血清稀释后分别点在两张相同的NC纸上。一张以Tris-HCl缓冲液1:50稀释兔抗-HBs孵育1小时，另一张以Tris-HCl缓冲液1:50稀释正常兔血清孵育1小时，再做LAB-Dot ELISA检测。其结果经抑制的NC纸斑点显色均明显浅于未抑制的NC纸的斑点。

#### 三、LAB-Dot ELISA实验方法的稳定性

3天内连续将25份血清1:10稀释3次以LAB-Dot ELISA进行重复测定，其结果三次均一致。将5份RPHA法HBsAg阳性血清系列稀释后点在NC纸上在室温干燥贮存，分别

于第一周、第二周、第四周检测。结果三次检测斑点显色大致相同，HBsAg检测效价亦无显著变化(表2)。

表2 两种血清学方法检测血清HBsAg结果比较

		LAB-Dot ELISA	
		+	-
RPHA	+	125	2
	-	32	31

#### 四、LAB-Dot ELISA HBsAg检测结果

190例受检血清LAB-Dot ELISA检出阳性率为82.6%、RPHA检出阳性率为65.7%，前者较后者阳性检出率高16.9%，两者相差非常显著(P<0.01)。两法符合率为82.6%。

对32例LAB-Dot ELISA法HBsAg阳性而RPHA法阴性的血清进行了HBeAg,抗-HBe及抗-HBc的检测(ELISA法)，结果其中30例抗-HBc阳性(>1:100)，15例抗-HBe同时阳性、5例HBeAg阳性、三者中有一项次以上阳性者占93.7%。

### 讨 论

本文采用LAB-Dot ELISA进行血清HBsAg检测获得较好的结果。阳性显色十分明显，阴性标本不显色，偶见个别阴性标本在点样周围出现极淡的显色圈。肉眼可十分方便地判读结果。

本方法与RPHA法作了比较，结果表明，LAB-Dot ELISA的敏感性高出RPHA法8~16倍，采用回收试验亦证明，其敏感性可达10ng/ml，其阳性检出率较RPHA法亦显著升高(P<0.01)，25份血清3次重复检测结果一致，抑制试验取得了明显的效果。在LAB-Dot ELISA法HBsAg阳性而RPHA阴性的32份血清中，其中30例其它乙肝标志阳性。将受检血清点样之后室温干燥贮存一月以上仍可得出满意的效果。上述资料表明，本方法具有较高的敏感性、特异性及重复性。其检出率显著高于RPHA法，且操作简便易行，整个实验

仅需3小时,不需复杂设备,携带方便,特别适于大规模流行病学调查和临床快速诊断,亦便于基层医疗单位开展。本方法还可用于其它病原体抗原和抗体的检测[1~5],满足不同临床和科研需要。

我们在实验中观察到受检血清高稀释度者斑点显色反较低稀释度者为深,这种前带现象,可能与其它血清蛋白在一定面积上吸附遮盖了一部分表面抗原决定簇有关。此外,实验中还观察到溶血标本和全血标本对结果的干扰,使之出现假阳性,可能是细胞内过氧化物酶释放的缘故。

**A Simple and Rapid Method for Detection of Serum HBsAg — Labelled Avidin-Biotin Dot Enzyme Linked Immunosorbent Assay**  
*Hao Lianjie, et al., Department of Infectious Disease Tongji Hospital, Tongji Medical University, Wuhan*

Hepatitis B surface antigen (HBsAg) in 190 sera specimen were detected with labelled avidin-biotin dot enzyme linked immunosorbent assay (LAB-Dot ELISA). It was shown that the positive rate by LAB-Dot ELISA and by reverse passive hemagglutination (RPHA) were 82.6% and 65.7%, respectively. Using LAB-Dot ELISA the lowest concentration for detecting HBsAg was up to 0.01µg/ml. It was more sensitive 8 to 16 times than RPHA. The specificity and reproducibility of this method were also confirmed. The

LAB-Dot ELISA was simple and inexpensive. The entire assay could be completed within 3 hours. After dotting the nitrocellulose sheet could be stored over one month It was suitable especially for the epidemiological investigations of hepatitis B.

**Key Words** HBsAg Biotin Avidin Dot ELISA

**参 考 文 献**

1. Towbin H, et al. Immunoblotting and dot immunobinding--current status and outlook. *J Immunol Method* 1984; 72: 313.
2. Styra M, et al. Dot-based ELISA and RIA: Two rapid assays that screen hybridoma supernatants against whole live cells. *J Immunol Method* 1984; 73: 75.
3. kumar S, et al. A dot enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against entamoeba histolytica. *J Immunol Method* 1985; 83: 125.
4. Handman E, et al. Nitrocellulose-based assays for the detection of glycolipids and other antigen: Mechanism of binding to nitrocellulose. *J Immunol Method* 1985; 83: 113.
5. Dao ML, .An improved method of antigen detection on nitrocellulose in situ staining of alkaline phosphatase conjugated antibody. *J Immunol Method* 1985; 82: 225.
6. 郝连杰, 等. 标记抗生物素-生物素酶联免疫吸附试验检测血清HBsAg的初步报告, 同济医科大学学报 1986; 15(6): 434.
7. Guesdon JL, et al. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 1979; 27: 1131.
8. 蒋成淦. 酶免疫测定法. 第一版. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 11.

## 衡水地区家鼠型出血热调查分析

河北省衡水地区卫生防疫站 张国华

1984年1月至1985年5月间,我区发生了流行性出血热(下称EHF)的流行,首批病人28例,其传染源是褐家鼠和小家鼠,临床类型以重型为主,与国内其他地区家鼠型出血热以临床轻型为主有明显的不同,现报告如下。

**一、流行病学特点:** 发病者男多于女23:5; 年龄17~65岁。职业以农民为主。发病于1月1例, 2月3例, 3月5例, 4月14例, 5月5例。分布在7个县, 20个乡, 26个自然村。均为一户1例, 25例一

村1例, 仅3例发生在一个自然村。

**二、临床资料:** 多数病人有典型的五期经过, 临床经过重。按卫生部颁布标准: 轻型5例, 中型7例, 重型14例, 危重型2例; 死亡6例。28例中24例作IFAT检查, 均呈阳性。抗体滴度在1:80~2560之间。

**三、传染源调查:** 5种鼠肺477份, 其中褐家鼠165份, 阳性20份, 阳性率2.8%; 小家鼠肺252份, 阳性7份, 阳性率2.8%, 其余鼠种全部阴性。