

几丁质作固相载体检测人乙肝病毒表面抗原

卢春林 陆 斌 韦 钰

(东南大学生物科学与医学工程系, 南京 210018)

提 要

用戊二醛作交联剂, 将抗人乙肝病毒表面抗原 (HBsAg) 单克隆抗体共价固定于几丁质上, 固定化后的抗体具有抗原结合活性, 采用非竞争夹心法能从 HBsAg 阳性人的血清中检出明显的 HBsAg 结合反应, 再生后的几丁质能重复用于酶免疫分析。同时还比较了几丁质作固相载体与聚苯乙烯板作固相载体酶联法的有关性质。

关键词 几丁质, 乙肝病毒表面抗原, 固定化, 非竞争夹心法

许多载体可以作为免疫球蛋白的固相载体, 如塑料、尼龙、滤纸、含 Protein A 的金黄色葡萄球菌菌体^[1]。尚未见报道用几丁质 (chitin) 作固相载体, 固定抗原或抗体, 用于免疫化学测定。几丁质是许多酶的优良载体, 已成功地将胰凝乳蛋白酶、葡萄糖异构化酶、葡萄糖氧化酶、碱性磷酸化酶等^[2-4]。本文报道了用几丁质作固相载体固定鼠抗人乙肝病毒表面抗原 D 决定簇的单抗, 通过非竞争夹心法能从 10 μ l 人 HBsAg 阳性血清中测出明显的 HBsAg 阳性反应。

1 材料和方法

1.1 材料

鼠抗人 HBsAg D 决定簇单抗腹水购自卫生部上海生物制品研究所; 马抗人 HBsAg 多抗血清, HBsAg 阳性血清, 正常人 HBsAg 阴性血清购自南京军区军事医学研究所; 几丁质 (chitin) 购自上海试剂二厂, 其它化学试剂为分析纯品。

1.2 方法

1.2.1 鼠抗人 HBsAg D 决定簇单抗和马抗人 HBsAg 多抗 IgG 的纯化分别按文献 [6, 7] 所示的方法, 使用前对 IgG 反应所需的

缓冲液透析。

1.2.2 酶标马抗人 HBsAg IgG 采用简化 NaIO₄ 法^[5]。

1.2.3 单抗在几丁质上的固定, 参考 IgG 在聚苯乙烯珠子上的固定方法^[9] 略加改动。取 6 g 湿几丁质, 加 12 ml 内含 6% 戊二醛的 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (50 mmol/L Na₂HPO₄, 50 mmol/L NaH₂PO₄, pH 7.0), 室温 (25℃) 搅拌 90 min, 抽滤; 分别用 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 和 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (100 mmol/L Na₂HPO₄, 100 mmol/L NaH₂PO₄, pH 6.0) 洗两次。加 10 mg IgG (HBsAg 单抗) 溶于 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0), 室温搅拌 2 h, 静置过夜。继用 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0) 洗两次, 100 mmol/L 赖氨酸处理 60 min。最后用 100 mmol/L Na₂CO₃ 和水洗, 抽干置 4℃。

1.2.4 用非竞争夹心法检测人 HBsAg 阳性血清, 取 250 mg 已标记单抗 IgG 的几丁质, 用磷酸吐温缓冲液 (pH 7.2) 洗两次 (磷酸吐温缓冲液^[10]: 100 ml 溶液中含 0.02 g KH₂PO₄, 0.29 g Na₂HPO₄, 0.8 g NaCl, 0.02 g KCl, 0.05 g

Tween 20), 加不同剂量的 HBsAg 阳性血清, 用磷酸吐温缓冲液调结合总体积为 1.5 ml, 37°C 保温 20 min, 静置去上清。用磷酸缓冲液吐温洗两次, 加 HRP 标记的多抗 IgG, 37°C 反应 60 min, 不时振荡, 磷酸吐温缓冲液洗 6 次。用未标记的几丁质和 HBsAg 阴性血清作对照。

1.2.5 完成夹心法测定的几丁质可用 10 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 洗 5 次再生。

1.2.6 辣根过氧化物酶 (HRP) 活性的测定参照文献[11]。每分钟 A_{470} 增加 0.001 所需的酶量定为 1 个 HRP 活性单位。

2 结果与讨论

2.1 单抗与几丁质的共价结合

几丁质的化学名称为 2-氨基-1,4-葡聚糖, 其中的氨基通过戊二醛的双功能基团与蛋白偶联。抗 HBsAg 单抗与几丁质结合, 选用的戊二醛浓度和离子强度, 参照文献[4,5]提供的优化条件, 经检测蛋白偶合率为 57.3%。因单抗量有限, 戊二醛浓度、离子强度、pH 值及温度诸因素对偶合率的影响, 未做进一步的探讨。

2.2 非竞争夹心法检测 HBsAg

人血清中的 HBsAg 有多个抗原决定簇, 能与不同来源的抗 HBsAg 抗体起免疫反应。由于纯 HBsAg 不易得到, 采用了非竞争夹心法估计人血清 HBsAg 的阴阳性, 主要过程及原理如图 1。

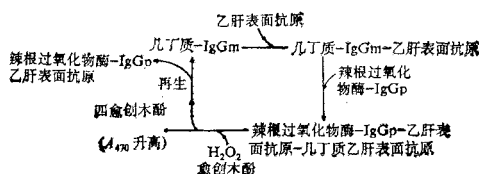


图 1 检测人血清中 HBsAg 非竞争夹心法的原理及过程图

IgGm: 鼠抗人乙肝表面抗原单抗;
IgGp: 马抗人乙肝表面抗原多抗

在 1.5 ml 结合测试体系中, 加入未作前处理的人血清, 结果显示, 5—30 μ l HBsAg 阳性血清在完成夹心结合后 HRP 活性呈线性上

升, 随着样品剂量的增加, 呈平缓而略有下降 (见图 2)。HBsAg 阴性对照 (正常血清) 不呈 HBsAg 阳性所示的趋势, 尽管也能测出 HRP 活性, 其值不到阳性血清的 1/8 (见图 2), 可见用几丁质作免疫球蛋白的固相载体, 共价偶联抗乙肝病毒表面抗原抗体, 其 IgG 仍然具有抗原结合能力。

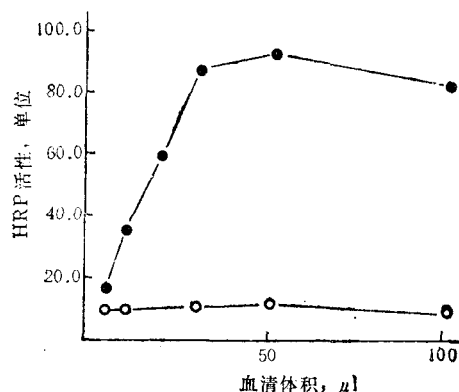


图 2 非竞争夹心法测量人血清 HBsAg 剂量曲线

●—● HBsAg⁺ 阳性对照; ○—○ HBsAg⁻ 阴性对照

2.3 固定化载体的再生与重复使用

完成夹心法结合的几丁质在测定外层标记抗体 HRP 活性时, 由于结合体系离子强度的变化, HRP-IgG 和 HBsAg 从几丁质上解离下来, 几丁质残余的 HRP 活性仅为初次测定时的 5% 左右, 因为第一次测定后, 固定化的几丁质用于第二次夹心结合实验, 如不加 HBsAg 阳性血清和酶标记抗体, 并不能从固定化几丁质中测出明显的标记酶 HRP 的活性 (见表 1)。由于上述原因, 几丁质的再生则比较容易, 简单的几次浸洗就可以。

再生后的几丁质仍具有抗原结合能力 (见表 1, 图 3)。图 3 是第五次再生后的几丁质对人血清的响应曲线。尽管 HRP 活性的绝对值减少 30% 左右 (与图 2 比较), 但剂量曲线的趋势并没有变化 (见图 3), 固定化的乙肝表面抗原湿态置 4°C, 15 d 后, 其结合 HBsAg 的能力没有多大丧失 (结果未列出), 可见乙肝表面抗原固定抗体的良好载体。

2.4 与临床常用方法的比较

确定乙肝表面抗原测试方法的灵敏度是一

表 1 首次夹心测定 HRP 活性后的固定化几丁质的结合能力

夹心法测活后的几丁质 (100mg)	HBsAg 血清 (10 μ l)	HRP-IgG (1000U)	残余或恢复活性 首次测定 HRP 活性 $\times 100\%$
+	-	-	4.8%
+	-	+	5.6%
+	+	+	96.4%

注: 夹心法测 HRP 活性后的几丁质, 需经过 5 次 10mmol/L 磷酸缓冲液 (10mmol/L Na_2HPO_4 , 10mmol/L NaH_2PO_4 pH 7.0) 浸洗, 再用于表中各类结合测量。

表 2 几丁质与临床使用的聚苯乙烯板作抗源固相载体检测人乙肝表面抗原有关性质的比较

固相载体	抗体与载体的 结合力	HBsAg 1 μ l	阳性血清 5 μ l	(免疫效价为 1:16)		
				10 μ l	20 μ l	100 μ l
几丁质	共价键	-	+/—	++	+++	+++
聚苯乙烯板	非共价键	-	-	+/-	++	+++

个非常复杂的过程, 安全要求高。我们未作灵敏度的测定, 但比较了几丁质作固相载体与临床上常用的用聚苯乙烯板作固相载体, 检测人乙肝表面抗原的酶学方法, 有关结果见表 2。

计它的灵敏度可能在 100 pg 左右, 当然仍需作进一步的探讨和确证, 同样临床使用也是如此。

实验过程中抗体效价的测定, 是由南京军区军事医学研究所免疫室提供, 在此深表谢意。

参 考 文 献

- 1 Tijssen P. *Practice and Theory of Enzyme Immunoassay*. New York: Elsevier, 1985: 298—328
- 2 Shinsaku H, Perfecto QF et al. *Agric Biol Chem*, 1982; **46**: 1639
- 3 申炳华, 李华, 李大海. 生物工程学报, 1988; **4**: 234
- 4 陈盛, 吴海生. 生物化学与生物物理进展, 1990; **17**: 383
- 5 隋德新, 姜涌明等. 生物化学与生物物理进展, 1990; **17**: 311
- 6 章谷生, 容泉培. 单克隆抗体在医学上的应用. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 345—347
- 7 Tijssen P. *Practice and theory of enzyme immunoassays*. New York: Elsevier, 1985: 101—102
- 8 Tijssen P. *Practice and theory of enzyme immunoassays*. New York: Elsevier, 1985: 236—242
- 9 Tijssen P. *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. New York: Elsevier, 1985: 307—308
- 10 Tijssen P. *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. New York: Elsevier, 1985: 331
- 11 张龙翔等. 生化实验方法与技术. 北京: 高教出版社, 1987: 179—183

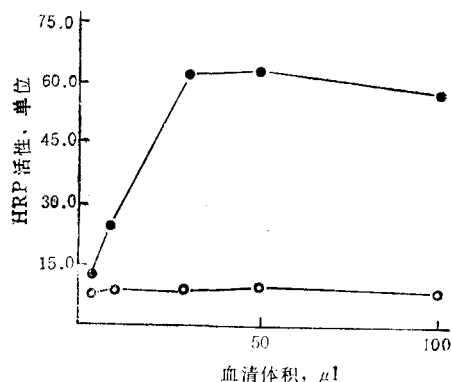


图 3 第五次再生后的固定化几丁质对人血清的响应曲线
○——○ HBsAg⁻ 阴性对照, ●——● HBsAg⁺ 阳性对照

现行临床用聚苯乙烯板作固相载体, 酶联法检测乙肝表面抗原的灵敏度在 1 ng 左右, 但在 10 μ l HBsAg 阳性血清反应不明显。而几丁质作固相载体, 在 10 μ l 血清中反应显著, 估