DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.02.026

含有高浓度的RNA PolⅠ，若以单位DNA量（核仁DNA量为总核量的4%～5%）来表示，核仁PolⅠ的含量或/和活性是细胞核总RNA Pol含量或/和活性的10倍[2]。因此，PolⅠ的活性对RNA的转录生成影响明显。

对用于体外转录分析所分离的细胞核，在24h内，最好分装后于液氮或－18℃保存，避免反复冻融。长期保存于液氮中的细胞核以不超过两周为佳。0℃保存的细胞核不适用于RNA的体外转录生成研究。

关键词 遗传转录；RNA聚合酶类；细胞核

参 考 文 献

1. Blair DGR. Eukaryotic RNA polymerase. Comp Biochem Physiol 1988;89(B):647
2. Yu Fuli. High Concentration of RNA polymerase I is responsible for the high rate of nucleolar transcription. Biochem J 1980;188(2):381
3. Burton K. Determination of DNA concentration with diphenylamine. Methods Enzymol 1968;12(B):163
4. George AJ, Catherine MC. Response of skeletal muscle RNA polymerase I and II to tumour growth. Biochim Biophys Acta 1988;950(2):296
5. Åström Stefan, von der Decken A. Release of transcriptionally active chromatin from liver nuclei by micrococcus nuclease. Life Sci 1980;26(1):797
6. Yu Fuli. Increased level of rat hepatic nuclear free and engaged RNA polymerase activities during liver regeneration. Biochim Biophys Res Commun 1975;64(3):1107
7. Inga Ljungquist, Åström Stefan. Effects of partial hepatectomy on RNA polymerase activities in mouse liver. Int J Biochem 1984;16(1):69
8. Dauphinais C. The control of ribosomal RNA transcription in lymphocytes; Evidence that the rate of chain elongation is the limiting factor. Eur J Biochem 1981;114(3):487

（收稿：1991-08-21；修回：1992-02-14）

合成肽抗原ELISA检测丙型肝炎病毒核心抗体实验条件的初步探讨*

郝 飞 吴纯清 陈国致 郑 红 李梦东 （第三军医大学西南医院 传染科） 630038

自1989年获得丙型肝炎病毒（HCV）克隆并测出HCV RNA的大部分核苷酸序列以来，相继建立了HCV抗体测定和聚合酶链反应（PCR）检测HCV RNA的方法，使丙型肝炎的病原诊断取得突破性进展[1][2]。目前所采用的重组抗原建立的酶联免疫吸附试验（ELISA）和重组免疫印迹法（RIBA）检测抗HCV存在着感染早期检出率低、试剂昂贵和检出的临床意义不太明确等缺点，且特异性较差[2]。最近研究表明，用人工合成多肽作抗原检测特异性抗体显示良好的应用前景[3]。我们用按HCV RNA编码的部分氨基酸序列合成的多肽抗原，建立了检测抗HCV的ELISA方法，并与用重组抗原检测的阳性血清作对比，结果较满意，现报告如下。

* 国家自然科学基金资助项目

1 材 料 和 方 法

1.1 合成肽（CP_8）

按HCV RNA序列[4]合成第39～74氨基酸的寡

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

肽即CP_8，此肽段为HCV核心蛋白第2个亲水区。CP_8由第一军医大学肝炎基础实验室提供。

1.2 血清标本

1.2.1 阳性标本 抗C_{100}阳性血清（Chiron公司试剂盒）15份。

1.2.2 待测标本 健康供血员40人份，急性甲型黄疸型肝炎20人份，慢性活动性乙型肝炎24人份，重型乙型肝炎13人份。

1.3 ELISA方法

将合成肽CP_8用0.05mol/L碳酸缓冲液稀释后，以每孔50μl包被反应板，置4℃36h。吸去包被液，用含0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液（PBS-T）洗3次，每次5min。吸干后每孔加10%小牛血清100μl封闭，置4 °C36h。洗涤3次并吸干后，每孔加稀释血清50μl，置37℃保温45min。洗涤3次吸干后，每孔加1:100辣根过氧化物酶标记的单克隆抗人IgG/γ（Sigma）50μl，置37℃保温30min，然后加2mol/L H_2SO_4 20μl终止反应，在酶标比色仪上用波长492nm测定吸光值。

2 结 果

2.1 方法的建立

2.1.1 阳性截止值(cut off) 检测40人份健康供血员血清，其抗HCV OD值在0.10～0.71之间，计算平均OD值加3个标准差（$\bar{x}\pm 3s$）为0.68，除去1例OD值0.71大于0.68后重算$M\pm s$为0.58。

2.1.2 CP_8包被液pH的选择 分别用不同pH的0.05mol/L碳酸盐缓冲液包被CP_8，在相同条件下测定5份阴性和5份阳性血清。结果(附表)可见，选择pH8.0的0.05mol/L碳酸盐缓冲液时阳性血清吸光值最高，故本方法选用pH8.0碳酸盐缓冲液作为包被液。

附表 不同pH包被液对结果影响

包被液 pH	阳性血清 ($n=5$)	阴性血清 ($n=5$)
7.0	0.57±0.12	0.32±0.11
7.5	0.83±0.18	0.28±0.15
8.0	1.21±0.20	0.31±0.13
8.5	0.86±0.13	0.39±0.17
9.0	0.68±0.09	0.42±0.16

注：表中值为OD_{492}值

2.1.3 CP_8包被浓度的选择 分别以每孔含CP_8 4、2、1和0.5μg 4种浓度包被，测定5份阳性血清和5份阴性血清，结果（图1）可以看出，选择2μg/孔浓度包被CP_8即可测出阳性标本。

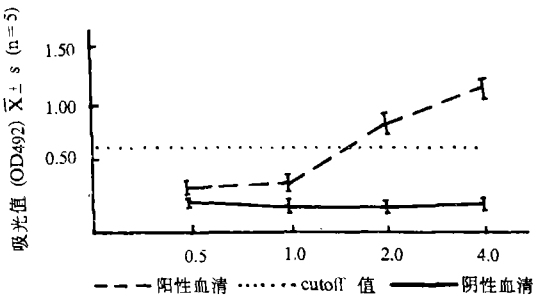


图1 不同包被浓度抗原对结果的影响

2.1.4 血清稀释倍数的选择 对同1份阳性和阴性血清分别按1:25、1:50、1:75和1:100倍数稀释，相同条件下测定不同稀释倍数的OD_{492}值，结果（图2）看出，选择1:50稀释倍数可减少非特异性吸附。

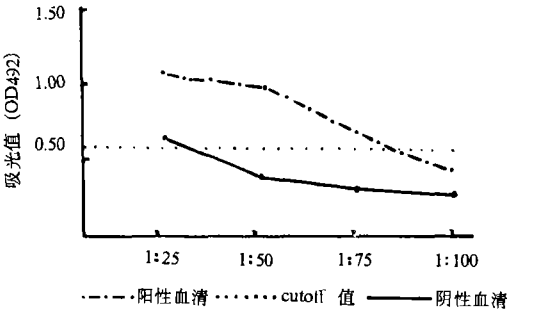


图2 不同血清稀释倍数对结果的影响

2.2 方法的考核

2.2.1 变异测定 取1份阳性血清，同时测定9孔，计算批内变异系数为7.81%。另先后4次测定同1份阳性血清，计算批间差异系数为8.14%。

2.2.2 稳定性 将包被的酶标反应板封闭干燥后置-20℃冰箱保存，每隔1周测1次，观察抗原的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

稳定性，前后检测4次结果无显著差异。

2.2.3 特异性 用本方法测定15份抗C_{100}阳性血清，有11例阳性，阳性符合率73.33%。40例健康献血员中有1例阳性，检测20例急性甲型黄疸型肝炎抗HCV均阴性，24例慢性活动性乙型肝炎中有2例阳性（8.3%），13例重型乙型肝炎有4例阳性（23.08%）。

3 讨 论

检测HCV抗体，可作为判断HCV感染的标志。目前多用重组抗原建立ELISA法或RIBA法检测抗HCV，但重组抗原含其它蛋白成份，特异性较差，且不能明确检出抗体的意义，也不能早期诊断[1][2]。用PCR检测HCV RNA，虽敏感性高，特异性好，但因试剂昂贵和操作过程复杂而限制其推广应用[3]。人工合成肽抗原分子量小，结构简单，避免混有其它蛋白成分而提高检出的特异性。用本方法检测抗C_{100}阳性血清，其检出率仅73.33%，与同类报道相似[3]，支持上述观点。

HCV基因组氨基酸序列已经阐明[1]，故选择保守区抗原性较强的肽段合成是检测成功的关键。HCV RNA虽变异较大，但核心区较为保守，且检测核心蛋白抗体可达到早期诊断和提高特异性等目的，故合成核心区的多肽有较大的实际意义。合成肽分子较小，结构简单，因此易受检测条件因素的影响。从本实验结果看，包被多肽浓度、包被液pH、被测血清稀释度等均对抗体检测的敏感性和特异性有影响。但合成肽在低温干燥条件下保存，显示良好的稳定性。总之，进一步完善人工合成肽检测特异性抗体的方法，可使ELISA的优越性和多肽抗原的特异性更具特色。如选择HCV序列不同区段合成多肽检测相应抗体，可望能明确各区段抗体检出的意义。

关键词：肝炎病毒；抗体，病毒；肽合成

参 考 文 献

1. Choo QL, Weiner AJ, Overby LR, et al. Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. Br Med Bull 1990; 46:432～441
2. Houghton M, Weiner AJ, Han J, et al. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implication for diagnosis, development and control of viral disease. Hepatology 1991; 14:381～388
3. Hosein B, Fang CT, Popovsky MA, et al. Improved serodiagnosis of hepatitis C virus infection with synthetic peptide antigen from capsid protein. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:3647～3651
4. Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, et al. The 5'-termina sequence of the hepatitis C virus genome. Jpn J Exp Med 1990; 60:167-177
5. Kaneko S, Unoura M, Kobayashi K, et al. Detection of serum hepatitis C virus RNA. Lancet 1990; 335:976

（收稿：1991-11-01；修回：1992-01-16）

胆道梗阻感染和胆道梗阻时有效肝脏血流量的测定*

孙文兵 韩本立 段恒春 李 昆 （第三军医大学西南医院 肝胆外科） 630038

胆道梗阻和急性梗阻性胆管炎是常见的胆道疾患，常可引起肝脏严重损害甚至衰竭[1]，肝脏微循环障碍是导致肝衰的因素之一[2]，因此，研究胆道梗阻和急性梗阻性胆管炎时有效肝脏血流量（effective hepatic blood flow，EHBF）的变化规律对于胆源性肝衰的预防和急救具有重要的理论意义，我们用放射性人体微凝白蛋白（^{125}I-

* 国家自然科学基金资助项目

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net