DOI:10.16016/j.1000-5404.1986.02.014

用全细胞抗原作ELISA检测Q热立克次体单克隆抗体

李芹阶 余国泉 温博海

（微生物学教研室）

酶联免疫吸附试验（ELISA）要求包被抗原纯度高，吸附固相载体好，能保持其免疫活性，一般多用可溶性抗原包被。用超声波裂解Q热立克次体制备的可溶性ELISA抗原，已成功地应用于Q热立克次体抗体的检测[1][2]，鉴于Q热立克次体体积小、胞壁较坚固，常难以获得理想的超声波抗原，而且考虑到抗原决定簇易分布于菌体表面，因而我们建立了Q热立克次体全细胞抗原作ELISA的方法，并应用于单克隆抗体的检测，现报道如下：

材料与方法

一、抗原制备

1. Q热立克次体全细胞抗原：Q热立克次体七医株（本室分离Ⅰ相，鸡胚传16代），基本按Urvolgyi方法[3]制备纯净的立克次体全细胞抗原悬液。Ⅰ相抗原悬液经0.01MKlO$_4$液处理后转为人工Ⅰ相[4]。两相Q热立克次体全细胞悬液用分光光度计调整其浓度均为每毫升含2 mg干重的立克次体（波长420nm，光密度0.33相当100μg），使用前用方阵法与阳性参考血清滴定。

2. 可溶性抗原：前法制备的纯净立克次体抗原悬液，用超声波裂解后经中速离心，上清即可溶性抗原（蛋白浓度10mg/ml）。使用前同样与阳性参考血清作方阵滴定。

3. 普氏立克次体和莫氏立克次体颗粒性补体结合抗原，滴度分别为1∶8及1∶4，成都生物制品研究所生产。

二、标本

1、Q热立克次体单克隆Ⅰ相抗体（McAbⅠ）和Ⅱ相抗体（McAbⅡ），为本室制备[5]。

2、Q热立克次体七医株感染小白鼠35天血清。

3、普氏立克次体、莫氏立克次体家兔免疫血清。

4、对照标本为SP 2/O细胞培养上清液及正常BALB/C小鼠腹水，正常小鼠混合血清。

三、固相载体 采用四川分析仪器厂生产的55孔平底聚苯乙烯微孔板。选择一批吸附均一性试验孔间OD误差＜10%的微孔板应用。

四、酶结合物 辣根过氧化物酶（Sigma Ⅵ型RZ3.2）标记猪抗小鼠IgG，为本室制备，工作浓度1∶800。

五、ELISA方法 全细胞抗原间接法，微孔板每孔包被抗原0.2ml，在合适温度下经一定时间温育后，用5%新鲜配制甲醇液0.2ml固定15分钟，按常规法洗涤，每孔加含有0.5%牛血清白蛋白（BSA PBS吐20封闭，加待测标本每孔0.2ml，置湿盒37℃ 2小时，洗涤后加酶结合物每孔0.2ml，37℃ 2小时，洗涤后加邻苯二胺-H_2O_2溶液每孔0.2ml，室温30分钟，每孔加0.05ml 2M H_2SO_4终止反应，用GXM201型酶标光度计测OD值，以大于或等于SP 2/O细胞培养上清、或1∶100稀释阴性血清OD均值加2个标准差为阳性标准。

结果

一、抗原包被温度和时间的选择及抗原滴定

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

将Ⅰ相、Ⅱ相全细胞抗原倍比稀释分别包被微孔板，各置37℃及43℃经2小时（再放4℃过夜）、24小时、48小时后，与倍比稀释Q热立克次体小鼠免疫血清作方阵滴定。从表1及表2看出经37℃、43℃2小时温育再放4℃过夜者OD值最低，温度升高或时间延长时阳性血清OD值逐渐增高，阳性血清与阴性血清的比值（P/N）增大。总起来看，以选用43℃24小时包被为合适。在此条件下，Ⅰ相全细胞抗原最适包被浓度为1:128（15μg/ml）。Ⅱ相为1:256（7.8μg/ml）。

表1　Ⅰ相抗原不同温度及时间包被的ELISA结果

血清	37℃									43℃								
	2小时 4℃过夜			24小时			48小时			2小时 4℃过夜			24小时			48小时		
稀释度	OD (+)	OD (−)	P/N	OD (+)	OD (−)	P/N	OD (+)	OD (−)	P/N	OD (+)	OD (−)	P/N	OD (+)	OD (−)	P/N	OD (+)	OD (−)	P/N
1600	0.1	0.0_5	2	0.68	0.15	4	0.9	0.13	7	0.27	0.13	1.6	0.84	0.12	7	1.2	0.24	6
3200	0.05	0.0^3	1.6	0.48	0.13	3	0.68	0.1	7	0.19	0.10	1.9	0.5	0.09	6	0.75	0.15	6
6400	0.05	0.03	1.5	0.2	0.08	2	0.32	0.08	4	0.17	0.09	1.8	0.29	0.08	4	0.39	0.13	3
12800	0.03	0.03	1.5	0.15	0.03	1	0.14	0.05	2.8	0.09	0.05	1.8	0.12	0.05	2.4	0.28	0.10	3
25600	0.03	0.03		0.05	0.03	1	0.08	0.04	2	0.06	0.05	1.5	0.06	0.05	1.2	0.19	0.08	1.9

表2　Ⅱ相抗原不同温度及时间包被的ELISA结果

血清	37℃									43℃								
	2小时 4℃过夜			24小时			48小时			2小时 4℃过夜			24小时			48小时		
稀释度	OD (+)	OD (−)	P/N	OD (+)	OD (−)	P/N	OD (+)	OD (−)	P/N	OD (+)	OD (−)	P/N	OD (+)	OD (−)	P/N	OD (+)	OD (−)	P/N
1600	0.43	0.13	3	1.15	0.23	5	1.2	0.12	5	0.41	0.12	3	1.4	0.22	6	1.4	0.32	4
32000	0.35	0.1	3	0.85	0.15	5	1.2	0.23	5	0.37	0.11	3	1.4	0.22	6	1.4	0.28	5
64000	0.27	0.08	3	0.61	0.15	4	0.8	0.20	4	0.27	0.08	4	1.25	0.19	6	1.25	0.21	5.9
12800	0.23	0.08	2	0.45	0.11	4	0.49	0.1	4	0.24	0.08	3	0.82	0.15	5	0.8	0.18	4
25600	0.16	0.08	2	0.25	0.09	2	0.3	0.09	3	0.18	0.08	2	0.5	0.11	4	0.51	0.15	3.4

二、特异性试验

1. 交叉试验：ELISA间接法测定Q热立克次体全细胞抗原和可溶性抗原与Q热立克次体两抗相单克隆抗体（每相5份杂交瘤细胞培养上清混合）以及普氏和莫氏立克次体免疫血清的反应性，结果见表3。

2. 阻断试验：杂交瘤细胞（1—4 B_5，2—2F_8）上清液10倍浓缩，分别加等量Q热立克次体细胞抗原，置37℃2小时、再4℃48小时吸收后作阻断试验，结果表明1—4 B_5上清液（Ⅰ相），经Ⅰ相抗原吸收后其Ⅰ相抗体滴度减低10^4倍，Ⅱ相抗原吸收后Ⅰ相抗体滴度减低10^2倍；2—2F_8上清（Ⅱ相）Ⅱ相抗原吸收后Ⅱ相抗体减低至少10^6倍，Ⅰ相吸收后Ⅱ相抗体减低10^2倍，见图1。

三、重现性试验　用Ⅰ相和人工Ⅱ相Q热立克次体全细胞抗原分别与5株杂交瘤细胞培养上清，在连续3天内每天作一次ELISA，每份标本(McAb Ⅰ 1:100, McAb Ⅱ

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

表3　全细胞原抗ELISA的特异性

标　本	包被抗原(μg/ml或稀释度)				
	Ⅰ相全抗原 (15μg)	Ⅱ相全抗原 (7.8μg)	可溶性抗原 (10μg)	普氏抗原 (1:60)	莫氏抗原 (1:60)
Q热 McAbⅠ热	1600	<100	200	<100	<100
Q热 McAbⅡ	100	3200	400	<100	<100
普氏立克次体家兔免疫血清	<100	<100	<100	>3200	<100
莫氏立克次体家兔免疫血清	<100	<100	<100	<100	>3200

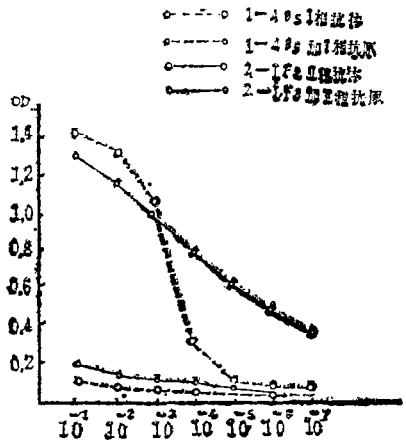


图1.　阻断试验结果

1:400) 5孔，测定的结果批间变异系数Ⅰ相为4.5～8.5%，Ⅱ相为1.8～4%。

四、单克隆抗体ELISA与IFA测定敏感性比较

5株杂交瘤细胞培养上清及腹水分别作全细胞抗原ELISA及IFA，结果同一份标本的ELISAⅠ相和Ⅱ相抗体滴度绝大多数均高于IFA滴度10～100倍。

讨　论

关于用全细胞抗原包被作ELISA，国内有采用离心方法包被炭疽杆菌全细胞抗原作ELISA，取得了满意结果的报导[5]。我们在提高抗原包被温育温度和时间，并加以固定的条件下，进行Q热立克次体全细胞抗原包被的ELISA试验，结果也很理想，而且不需要复杂的操作和特制的设备。

用全细胞抗原作ELISA检测单克隆抗体的滴度明显高于用可溶性抗原检测者，是否因为全细胞表面集中抗原决定簇而致反应敏感，还是由于可溶性抗原浓度不够，有待进一步研究。Ⅱ相抗原可能由于其表面电荷的作用，容易在固相载体上吸附，因而其包被时间延长与否的影响似乎不如Ⅰ相抗原明显；而且两相抗原包被的时间因素似比温度作用显著，是否因为时间延长以致立克次体更能自然沉降而有利于其在固相载体上的吸附，值得进一步探讨。

小　结

用Q热立克次体全细胞抗原，在43℃温育24小时，并以甲醇固定的条件下包被聚苯乙烯微孔板，作ELISA检测单克隆抗体，结果特异、敏感、重现性好，方法也简便易行，可以代替可溶性抗原试验。

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

参 考 文 献

1. 俞树荣，等。中华微生物学和免疫学杂志 1983；5：315
2. 李芹阶，等。第三军医大学学报 1984；2：193
3. Urvolgyi I. Acta Virol 1976；20:28
4. Schramek S, et al. Acta Virol 1970；14:415.
5. 余国泉，等.中国免疫学杂志 1986；2(3)
6. 薛采芳，等。中华微生物学和免疫学杂志 1984；6：375

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