DOI:10.16016/j.1000-5404.1979.02.024

应的抗菌素后能纠正本试验的结果。这2例患者未服相应的抗菌素试验，故究竟是那一因素导致木糖排出量减少尚不能肯定。

慢性萎缩性胃炎组$P<0.05$，10例中2例木糖排出量分别为0.75克和0.76克，其余皆属正常。慢性胃炎患者经用小肠吸引法和手术进行肠粘膜活检，发现小肠粘膜呈慢性空肠炎的征象。У. И. Юлдашев 将慢性空肠炎分为三型：慢性空肠炎无绒毛萎缩，慢性空肠炎伴有部份绒毛萎缩及慢性空肠炎伴有全部绒毛萎缩⑧。根据小肠病变的程度可相应的影响木糖的吸收。

慢性浅表性胃炎组$P>0.05$，全组患者木糖排出量均属正常，未发现小肠吸收不良的现象。

溃疡病（胃和十二指肠溃疡）无并发症组$P>0.05$，木糖排出量均属正常。CO^{58}标记维生素B_{12}试验，发现胃和十二指肠溃疡无并发症患者，肠吸收功能正常⑨。

胃切除术后组$P>0.05$，全组木糖排出量均属正常。胃切除术后，由于胃的排空加速、肠道细菌的繁殖，可使木糖吸收量减少⑩。但本组患者未见到吸收不良的现象。

小肠疾病2例：1例为小肠非特异性炎症，木糖排出量为0.9克；另1例为回肠末端癌，木糖排出量为1.54克。前者表现出肠道吸收不良的现象，后者则属正常。因为在正常情况下，木糖从十二指肠和上段空肠吸收。小肠非特异性炎症累及空肠较为广泛，因而导致肠道吸收不良。回肠末端癌病变局限，而又位于回肠末端，不影响木糖的吸收，故其值正常。

巨结肠症1例，木糖排出量为0.9克，低于正常值。

淋巴瘤、胃癌、慢性胆囊炎、慢性持续性肝炎及糖尿病患者，木糖排出量均属正常。上述病例数较少，故不能做出最后的评价。

参考文献

1. Santini. R. et al: Gastroenterology 40:772, 1961.
2. Tiez NW: Fundamentals of Clinical Chemistry P 827, W. B. Saunders Company 1970.
3. Гузерович АЯ и др: Болезни Тонкой кишки Р 20, Москва «Медицин» 1975.
4. Белоборобова ЭГ: Клин. Мед. 7:61,1978.
5. Фролькис АВ и др: Клин. Мед. 8:92,1971.
6. Еременко ВП и др: Клин. Мед. 2:9,1973.
7. 唐振铎等：上海医学 1:49，1978.
8. Пташекас РС и др: тер арх 2:21,1978.
9. Колесникова НИ: Клин. Мед. 10:35,1971.
10. Booth CC: Topics in gastroenterology 1:133, 1973.

酶连接免疫吸附测定法检测乙型肝炎表面抗原和免疫酶法检测Q热立克次氏体初步小结

流行病学教研室　田荣福　张　凌
微生物学教研室　李芹阶

自1971年Engvall和Perlman首次报道酶连接免疫吸附测定法（ELISA）以来，由于它具有灵敏度高，特异性强，重复性好，与敏感性相同的放射免疫法比较，还具有设备简单，酶标记物稳定，对人体无害等优点，近年来国外已广泛用于细菌、病毒、寄生虫等疾病的血清学诊断，以及药物、激素代谢物的研究等方面。

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

Wolter及Vandervelde等成功地用于检测乙型肝炎表面抗原（HBsAg），其敏感性与放射免疫法基本相同①②③。本文报道我们用ELISA检测乙型肝炎表面抗原和用免疫法检测Q热立克次氏体的初步结果。

一、原　　理

ELISA是将某种抗体或抗原吸附于固相载体表面，并保持其免疫活性，再加入待测标本，使其发生特异性结合，然后加入酶标记物，与固相免疫复合物发生特异性反应，最后加酶的底物；根据底物的颜色变化，测知待检标本中有无相应的抗原或抗体，其颜色的深浅与含量成正比。

二、材料和方法

1. **抗体的精制**：抗-HBs IgG是用北京生物制品所生产的供对流电泳用的冻干制备。经DEAE—纤维素层析，合并第一峰，浓缩后，冰冻保存备用。抗—Q热立克次氏体IgG是按常规方法制得粗制品，再经DEAE-纤维素层析制得。

2. **酶标抗体制备**：用过氧碘酸盐法④⑤。

（1）5毫克辣根过氧化物酶（上海东风化学试剂厂，RZ2.2）溶于1毫升新配制的0.3M $NaHCO_3$缓冲液（pH8.1）。

（2）加1%二硝基氟苯无水乙醇溶液1毫升，室温轻搅1小时。

（3）加1毫升0.06MKIO_4，室温搅半小时。

（4）加1毫升0.16M乙二醇，室温轻搅1小时。

（5）对1000毫升0.01M碳酸盐缓冲液pH9.5，在4°C透析过夜，换液3次。

（6）加5 mg IgG，室温轻搅2小时。

（7）加5 mg$NaBH_4$，放4°C3小时后对生理盐水透析过夜，换液3次。

（8）搅拌下滴加等体积饱和度硫酸铵，4°C 1小时后，3,500—4,000转/分，离心15分钟。

（9）沉淀用50%饱和度硫酸铵洗二次，3,500转/分，离心15分钟。使未结合的酶溶解，离心弃去。

（10）沉淀溶于pH7.4 0.02M PBS 2毫升。

（11）对0.02M PBS pH7.4 4°C透析过夜，换液多次，纳氏试剂测定无铵离子为止。如有沉淀用2,000—3,000转/分，离心10分钟去沉淀。

（12）测定280毫微米和403毫微米的光密度，计算标记抗体的克分子比值。

3. **微量血凝板的包被**：

40孔的聚苯乙烯微量血凝板，每个凹孔中滴加0.3毫升0.1M碳酸盐缓冲液pH9.6稀释的抗—HBs IgG（0.03mg/ml），37°C温育2—3小时后，放4°C备用，用前抽去包被液，用0.05%吐温20PBS洗3次。

4. **ELISA检测HBsAg的步骤**：

0.1—0.3毫升待测标本（阳性或阴性对照），加入包被好的微量血凝板凹孔内，每份标本加2孔，加盖，37°C 2小时后吸弃，洗3—4次。

每孔加0.2—0.3毫升酶标记抗体，37°C 2小时后，倾弃，洗4—5次。

每孔加0.3毫升新鲜配制的邻苯二胺和H_2O_2的基质溶液，37°C一小时后，加0.05毫升4N H_2SO_4终止酶反应。

用肉眼观测反应产物颜色判定结果，或用分光光度计测读492毫微米的消光值，待测标本与阴性对照消光值的率≥2.1时为阳性，≥1.5—2.0为可凝。比率计算。

$$\frac{\text{待测标本值}-\text{空白对照值}}{\text{阴性对照值}-\text{空白对照}} \geqslant 2.1$$

空白对照值是0.3毫升基质溶液加0.05毫升4 N硫酸的消光值，阴性对照为多份阴

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

性标本的平均值。

5. Q热立克次氏体的检测：

（1）感染鸡胚卵黄囊10^{-1}0.2ml小鼠腹腔注射，第五天解剖取脾脏印片。

（2）除去内源性过氧化物酶，用0.3% H_2O_2处理30′（甲醇稀释），用蒸馏水洗至无酶为止，再用P.B洗四次，每次五分钟。

（3）滴一滴酶标抗体放在湿盒中37°C 30分钟，用0.01M PBS pH6.8洗三次，每次五分钟。

（4）用3′，3′联苯胺基质液显色10分钟，用1N H_2SO_4中止酶反应。

三、结　果

用过氧碘酸盐法制备酶标记抗体，我们共进行四次，马抗—HBs IgG和兔抗—QIgG各两次。用分光光度法（光程1厘米）测定标记抗体的克分子比值。

酶的含量测定：毫克/毫升 = 403毫微米光密度×0.4。

抗—HBs酶的量，第一次0.74毫克，第二次0.45毫克。抗Q热立克次氏体酶的量为0.331毫克和0.384毫克。

IgG的含量测定：

毫克/毫升 =（280毫微米光密度—403毫微米光密度×0.3）×0.62

抗—HBs IgG量分别为：4.826毫克，3.238毫克。

抗—Q热立克次氏体IgG分别为：3.156毫克，3.680毫克。

酶标记抗体的克分子比值为：

$$\text{克分子比值} = \frac{\text{毫克/毫升(酶)}}{40,000} \div \frac{\text{毫克/毫升(IgG)}}{160,000}$$

$$= \frac{\text{毫克/毫升(酶)} \times 4}{\text{毫克/毫升(IgG)}}$$

根据公式计算，酶标记抗体克分子比值分别为：马抗—HBs，0.55和0.61；兔抗—Q热立克次氏体，0.40和0.42。有8%—12%的酶被标记上。第一次标记的抗—HBs，用于ELISA检测HBsAg，120倍的稀释度为最适稀释度；第二次标记的抗体低于120倍。

ELISA检测HBsAg，判定结果用分光光度计测读消光值。消光值测定用特制的光程为3毫米的微量比色杯，最少量0.25ml即可测定。每份标本可测定2个消光值，求其平均数。在实验过程中对15份已知的阳性和阴性标本进行测定，其消光值的率都>2.1。用ELISA和对流电泳法同时对98份传染科门诊和住院病人的血清标本进行检测，其62份与反向血凝法进行了比较，其结果见表1、表2：

表1 ELISA与对流电泳法对98份标本检测结果

	+	−	±	合　计
对流电泳法	14	79	5	98
ELISA	25	69	4	98

表2 ELISA与反向血凝法对62份病人标本检测结果

	+	±	−	合　计
反向血凝法	16	3	43	62
ELISA	19	3	40	62

从以上结果可以看出，ELISA检测HBsAg的检出率比对流电泳法高，与反向血凝法差别不大。

免疫酶法检测Q热立克次氏体，其符合率与普通的Gimenez法和荧光抗体染色法基本相同。但着色较浅，可能是由于酶标抗体的克分子比值较低所致。

四、讨　论

应用ELISA和免疫酶法，其中最主要的条件是要求酶标抗体的免疫学和酶学活性要好，它是提高灵敏度的关键之一。目前，制备酶标抗体的方法有三种：戊二醛一步法，戊二醛二步法和过氧碘酸盐法。以过氧碘酸盐法为最好，能将70%的酶与90%抗体IgG结

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

合，而戊二醛法只能将2%酶结合于抗体IgG上。我们用过氧碘酸盐法进行四次标记的结果，有8%—12%酶与抗体IgG结合；克分子比值在0.40—0.61，最理想的比值是1—2，也就是一个分子的抗体IgG上有2—4分子的酶。我们使用的实验方法和条件与文献报道相同，从四次结果比较一致来看，也说明方法上无大的差别，但克分子比值较低，可能是由于酶的纯度不够造成的。国外文献报道所使用的酶RZ在3.0以上，而我们使用的酶RZ只有2.2。要想提高标记抗体的克分子比值，有必要对酶进行提纯。

另外，酶标用抗体IgG的保存时间不能过久，最好是新制备的。我们所使用的马抗-HBs保存时间较久，经DEAE-纤维素层析后立即标记的抗体免疫活性比保存一个月后标记的抗体活性要高。在ELISA检测HBsAg的实验中标记抗体的最适稀释度第一次比第二次要高。

在固相载体的使用上，我们用国产的聚苯乙烯微量血凝板与Dynatech聚苯乙烯微量血凝板进行实验，其效果相同。

据初步观察，每个凹孔中所加的标本量0.1毫升与0.3毫升，温育时间(1—2小时)，温度(28°C与37°C)对检测结果影响不大。因此，ELISA对实验条件易于掌握。用分光光度法判定结果，科学性强，可以避免肉眼观测的误差。

五、小　结

1. 用过氧碘酸盐法成功地制备了四批酶标抗体，其方法简单，耗酶和标记抗体量少，产率高。但酶标抗体克分子比值较低，有待提高。

2. 用免疫酶法检测Q热立克次氏体，初步获得成功，但着色较浅，可能与酶标抗体克分子比值低有关。

3. 从以上的初步结果表明，ELISA检测HBsAg具有较高的敏感性和特异性，而且操作简便、快速、不需特殊仪器，试剂用量少等优点，便于推广使用。从对98份病人标本的检测结果来看，其灵敏度比对流电泳法高；与反向血凝法比较差别不明显，但国外文献报道ELISA比反向血凝法灵敏度高，原因何在，有待于进一步研究。

(工作中，承一院传染科提供标本，并协助做对流电泳和反向血凝，谨此致谢。)

参考文献

1. Wolter, G. et al: J. Clin. Pathol.29: 873,1976

2. Wolter, G. et al: J. Infect. Dis. 136. s831.1977

3. Vandervelde, E. M.et al. J. Clin. Pathol. 30:714.1977

4. Nakan, P. K.et al: J.Histochem. Cytochem. 22. 1084. 1974

5. 盛树力，生物制品通讯，(6)：288,1978

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