doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.36.043

·技术与方法·

胶体金渗滤方法检测乙肝患者血清中乙肝核心抗体的研究 *

张爱英[1#] 杨国申[2#] 李 康[3] 赵元顺[3] 陈 怡[4] 侯传浩[4] 李 宁[1,3△]

(1 首都医科大学附属北京佑安医院 北京市肝病研究所 北京 100069;2 首都医科大学燕京医学院 北京 100080;
3 首都医科大学附属北京佑安医院 北京 100069;4 首都医科大学基础医学院 北京 100069)

摘要 目的:建立胶体金免疫渗滤法检测乙肝患者血清中乙肝核心抗体(anti-HBc IgM)抗体的方法,评价其灵敏度、特异性和重复性。**方法:**预先在硝酸纤维素膜上包被乙肝核心抗原 HBcAg,将血清或者血浆加在硝酸纤维素膜上,血清或者血浆中的 anti-HBc IgM 与 HBcAg 结合。洗涤去掉非特异结合,加入胶体金标记的抗人 -IgM, 洗涤去掉没有结合的抗人 IgM 抗体。硝酸纤维素膜上的抗原 -IgM- 抗人 IgM 形成的 " 三明治 " 复合物呈现红色圆点,证实实验有效。**结果:**102 份乙肝患者血清,anti-HBc IgM 阳性标本 99 份。检出率 97%。50 份正常血清中,有一份检测结果弱阳性,特异性 98%。**结论:**胶体金免疫渗滤法检测 anti-HBc IgM 敏感性高、特异性强、重复性好,且方便快捷,不需要特殊的仪器设备,在 anti-HBc IgM 快速检测上有广阔的应用前景。

关键词:胶体金免疫渗滤;乙肝核心抗体;IgM

中图分类号:R512.62;R446 **文献标识码:**B **文章编号:**1673-6273(2014)36-7165-03

Detection of IgM anti-HbsAg in Serum by Immnogold Filtration*

ZHANG Ai-ying[1#], YANG Guo-shen[2#], Li Kang[3], ZHAO Yuan-shun[3], CHEN Yi[3], HOU Chuan-hao[4], LI Ning[1,3△]

(1 Beijing Institute of Hepatology, Beijing YouAn Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100069, China; 2 Capital Medical University YanJing Medical College, Beijing, 100080, China; 3 Beijing YouAn Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100069, China; 4 Capital Medical University School of Basic Medical Sciences, Beijing, 100069, China)

ABSTRACT Objective: To develop the immunogold filtration assay (IGFA)method for the detection of anti-HBcAg IgM and evaluate its sensitivity, specificity and reproducibility. **Methods:** Nitrocellulose membranes were coated with HbcAg. Patient's serum or plasma sample is added to the Nitrocellulose membranes, and the anti-HBc IgM was bound to the pre-coated HBcAg. After washed to remove sample serum proteins, rabbit anti-Human IgM labeled with colloidal gold was added. After washing to remove unbound anti－Human IgM, in presence of the antigen-IgM- anti-Human IgM "sandwich" complex in a red dot, which indicates the validity of the test. **Results:** The results showed that 99 out of 102 total cases were positive in serum of patients with hapetitis. The sensitivity of the IGFA was 97%. The specificity was 98% in 50 healthy individuals (1/50). **Conclusion:** IGFA has high sensitivity, strong specificity and good reproducibility and the advantage of convenient and without equipment or the detection of HbcAb. It is potential rapid tool for the detection of HbcAb in serum samples.

Key words: Immunogold filtration assay; HBcAb; IgM

Chinese Library Classification: R512.62; R446 Document code: B

Article ID: 1673-6273(2014)36-7165-03

前言

乙肝是当今医疗界难以治愈的疾病之一，是由乙肝病毒(HBV)引起的、以肝脏炎性病变为主,并可引起多器官损害的一种疾病[1]。乙型肝炎病毒与肝癌关系密切,是肝癌发生的重要危险因素，HBV 感染所致肝细胞损害和再生结节形成,是肝硬化肝癌发生的基础[2,3]。在我国肝癌患者中 90%以上有乙型肝炎(HBV)感染背景。我国每年约 30 万人死于肝病,其中 11 万人死于肝癌。肝癌恶性程度高,发展迅速,是危及人生命的常见病。但是由于肝脏强大的代偿功能,很多肝癌患者在变现出临床症状时已经是肝癌晚期。因此早期诊断、及早治疗是延长肝癌患者寿命的重要手段[4-6]。目前关于乙肝肝癌治疗有很多报

* 基金项目:北京市肝病研究所基金(BJIH-01206);北京佑安医院肝病艾滋病基金;首都医科大学重点实验室基金(2013GYGA03);
国家国际科技合作专项《中美英联合乙肝相关肝癌早期诊断分子标志物筛查及免疫机制研究》(S2012ZR0153)

作者简介:# 张爱英,副研究员,电话:010-83997424,E-mail: zhangaiying1996@163.com
杨国申(1996-),E-mail: yang.guo.shen.@163.com,电话:010-83997424
为共同第一作者
△通讯作者: 李宁,教授,主任医师,电话:010-83997001,E-mail: liningbjyah@vip.sina.com

(收稿日期:2013-10-01 接受日期:2013-10-28)

道，如免疫治疗[7]，慢病毒治疗[8-10]以及抗 HBV 药物治疗[11]等。乙肝病毒是一种 DNA 病毒，属于嗜肝 DNA 病毒科（hepadnavividae）DNA 分子大约含有约 3200 个核苷酸 [12]，乙肝病毒 DNA 的两链长短不一，长链完整，长度恒定，为负链。短链是正链，长度可变，大概是长链的 50%~80%。一般情况下，DNA 检查可以作为判断治疗的方式，在病人传染性评价上也有较大的意义，当体内 DNA 含量越高、患者的传染性就会相应的越强。因此，PCR 和荧光定量 PCR 是常用的病原学检测方法 [12,13]，表面抗原(HBsAg)和表面抗体(抗 HBs 或 HBsAb)、e 抗原(HBeAg)和 e 抗体(抗 HBe 或 HBeAb)、核心抗原(HBcAg)和核心抗体(抗 HBc 或 HBcAb) 是国内医院最常用的乙肝病毒 (HBV)感染检测血清标志物，又被称为乙肝五项。HBcAb- 乙肝病毒核心抗体为曾经感染过或正在感染者都会出现的标志，核心抗体 IgM 是新近感染或病毒复制标志。目前检测核心抗体 IgM 抗体的各种试剂盒已经商品化，但仍存在较大缺陷[14,15]，并且无论是 ELISA 还是 PCR 技术都需要一定的设备和专门的技术人员，操作不仅费时而且费力，而且不利于临床快速检测的要求。斑点金免疫渗滤技术（dot immunogold filtrationassay，DIGFA）作为一项具有发展前景的检测方法，具有操作简便，灵敏度高等一系列特点，同时操作者不需要特殊仪器和特殊培训，因此具有广阔的应用前景[16]。

1 材料与方法

1.1 材料

牛血清白蛋白(BSA) ，美国 Sigma；微孔滤膜；正常和乙肝患者血清样品均由北京佑安医院提供。

1.2 方法

1.2.1 胶体金的制备 100 mL 氯金酸水溶液加热至沸(0.01%)，1.5 mL 1%柠檬酸三钠新鲜配制，加入氯金酸水溶液继续加热。混合液由淡黄色转变为灰蓝色，继而转变成黑色，最后液逐渐稳定为酒红色后，继续加热 5 min。冷却后，加入去离子水至 100 mL。

1.2.2 胶体金标记抗体及纯化 抗人 IgM 抗体稀释为 1 mg / mL，逐滴（1 滴 / 5 s）加入 5 mL 胶体金溶液中。胶体金 pH 值调整为 8.0(0.1 mol / L K_2CO_3 调节)，在 200 r / min 搅拌 30 min；加入 10% BSA 0.5 mL，200r / min 搅拌 15 min；加入 10% PEG20000 至终浓度为 0.2%，搅拌 15 min；吸出上清；4℃、13 800 r / min 离心 30 min，弃上清。1% BSA 和 0. 01 mol / L PBS 溶解沉淀至 0.5 mL，即为胶体金标记的抗人 IgM 抗体探针。

1.2.3 免疫渗滤装置的制备 在硝酸纤维膜上预包被乙肝核心抗原，抗人 IgM(图 1)。硝酸纤维膜上滴加血清(1∶20)，血清中的 IgM 抗体与抗原形成抗原抗体复合物(AgAb)，随后加入抗人 IgM 胶体金，形成抗原抗体 - 抗抗体胶体金复合物[5]。硝酸纤维膜上的人 IgM 可直接与抗人 IgM 胶体金形成复合物。

1.2.4 免疫渗滤检测 免疫渗滤膜上滴加 50 μL 血清(1∶20)，3 秒钟后，每秒钟滴加 TBST 一滴。3 秒钟后，滴加 50 μL胶体金标记的抗人 IgM，阳性血清可见乙肝核心抗原与抗人 IgM 点呈现红色。阴性血清只有抗人 IgM 点呈现红色(图 2)。

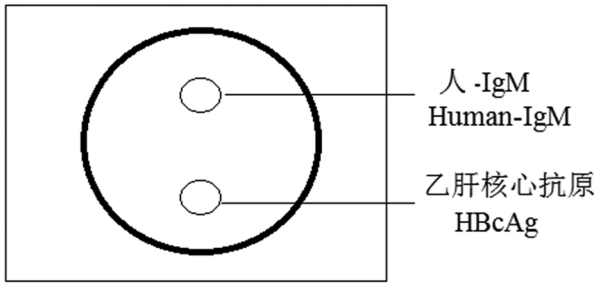

图 2 免疫渗滤实验结果图 A：阳性结果；B：阴性结果

Fig. 2 The results of immunogold filtration A: Positive results; B: Negative results

1.3 统计学方法

统计学处理数据采用 SPSS15.0 统计软件进行处理，部分数据以均数± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。数据采用 X^2 检验。取 P=0.05 为检验标准，当 P<0.05 时差别有统计学意义。

2 结果

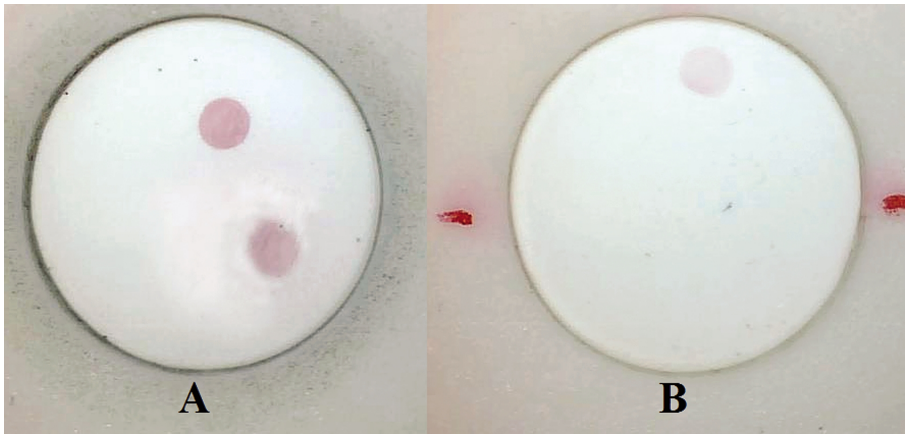

图 1 检测 HbcAb 免疫渗滤装置

Fig. 1 Dot-immunoglod filtration assay for detection of HbcAb

硝酸纤维素膜上预先包被人 -IgM(上面圆点)和乙肝核心抗原(下面圆点)

The nitrocellulose membrane was pre-coated with Human-IgM (up Dot) and HBcAg

检测 102 份乙肝患者血清，99 个患者检出抗 HBV IgM 阳性，检出率 97%。检测 50 份正常血清，49 位检出抗 HBV IgM 阴性，有一份检测结果弱阳性，特异性 98%。检测结果统计分析使用卡方检验，健康和乙肝患者的检测结果有明显的统计学差异（表 1）。

表 1 胶体金免疫渗滤检测抗乙肝核心抗原 IgM 检测结果

Table 1 The results of anti-HbcAg IgM detection by using immunogold filtration

组别 Group	检测例数 Tested samples	阳性例数 Positive numbers	阳性率 Positive rate
乙肝患者 Hepatitis	102	99	97%
健康个体 Healthy control	50	1	2%

注：乙肝组与健康个体组比较，P<0.01。

Note：Hepatitis versus healthy controls P<0.01.

3 讨论

乙肝病毒感染患者后，HBcAg 刺激肝细胞产生的抗体[17]，包括：IgG、IgM、IgA 和 IgE 型。Ig M 抗体是分子量最大的 Ig，沉降系数为 19S，称为巨球蛋白，一般不能通过血管壁，主要存在于血液中。占血清免疫球蛋白总量的 5%～10%，血清浓度约 1 mg/ml。通常是表示感染初期免疫反应产生的免疫球蛋白，乙肝患者血清中检出抗乙肝 IgM 提示该患者新近发生感染。抗 -HBc IgM 与 HBV 复制的标志物（HBeAg、HBV DNA）有相关性，HBV 感染早期一周左右出现，HBV 急性感染可检测到该抗体[18]。少数患者在感染后 3 年仍能检测抗 -HBc IgM。T 淋巴细胞被 HBcAg 激活后分化为浆细胞产生抗 -HBc IgG，抗 -HBc IgG 的出现时间比 IgM 晚，持续时间长。血清中抗 -HBc IgG 高滴度水平则表示 HBV 的近期感染或慢性感染的急性发作。有研究显示高达 60.5%的健康献血抗 -HBc IgG 阳性[19]。在感染早期不一定能够检测到抗 -HBc IgG，所有该课题选择抗 -HBc IgM 检测。

免疫渗滤利用抗原抗体特异性结合的原理，并且采用毛细管作用和渗滤的原理，胶体金标记抗人 IgM，在硝酸纤维膜上形成红色圆形斑点[20]。免疫渗滤的结果数分钟即可观察，快速、简便。整个检测过程不需要大型的仪器设备，经济方便。同时具有灵敏度高、特异性高的特点[21]。该课题采用了免疫渗滤方法检测乙肝患者血清中的 IgM 抗体，获得很好的效果，有着较好的特异性和重复性。这为临床乙肝患者的检测提供了有力的免疫学与生物化学诊断依据，有着广阔的应用前景。

参 考 文 献 (References)

[1] Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assessment [J]. J Hepatol, 2006, 44(1 Suppl): S71-76

[2] Li L, Liu W, Chen YH, et al. Antiviral drug resistance increases hepatocellular carcinoma: A prospective decompensated cirrhosis cohort study[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(45): 8373-8381

[3] De Schryver A, Claesen B, Meheus A, et al. Hepatitis B vaccination policies for student healthcare workers in Europe [J]. J Hosp Infect, 2013, S0195-6701(13): 00384-00388

[4] Kubo S, Takemura S, Sakata C, et al. Adjuvant Therapy after Curative Resection for Hepatocellular Carcinoma Associated with Hepatitis Virus[J]. Liver Cancer, 2013, 2(1): 40-46

[5] Song P, Gao J, Inagaki Y, et al. Biomarkers: Evaluation of Screening for and Early Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma in Japan and China[J]. Liver Cancer, 2013, 2(1): 31-39

[6] Lin S, Hoffmann K, Schemmer P. Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review [J]. Liver Cancer, 2012, 1(3-4):144-158

[7] Bertoletti A, Gehring AJ. Immune therapeutic strategies in chronic hepatitis B virus infection: virus or inflammation control? [J]. PLoS Pathog, 2013, 9(12): e1003784

[8] Koklu S, Gulsen MT, Tuna Y, et al. Lamivudine Treatment Failure Risks in Chronic Hepatitis B Patients with Low Viral Load [J]. Digestion, 2013, 88(4): 266-271

[9] Daniello C, Maruzzo M, Basso U. Prevention of Hepatitis B Virus Reactivation With Lamivudine in a Patient With Advanced Renal Cell Carcinoma Treated With Everolimus [J]. Am J Ther, 2005, 80(3): 197-203

[10] Chen XL, Li M, Zhang XL. HBV genotype b/c and response to Lamivudine therapy: a systematic review [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013, 672614

[11] Liu SZ, Sun DX. Recent progress in the development of novel anti-hepatitis B virus drugs [J]. Chinese Journal of Hepatology, 2013, 21(9): 712-714

[12] Ohne K, Kani S, Ohashi M, et al. Clinical evaluation of a newly developed high-sensitive detection of hepatitis B virus surface antigen by a semi-automated immune complex transfer chemiluminescent enzyme immunoassay[J]. Rinsho Byori, 2013, 61(9): 787-794

[13] Asratian AA, Danilenko ED, Kazarian SM, et al. Detection of the markers of hepatites B and C and herpesvirus infection during pregnancy[J]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 2009, 5: 22-27

[14] Bottero J, Boyd A, Gozlan J, et al. Performance of rapid tests for detection of HBsAg and anti-HBsAb in a large cohort, France [J]. J Hepatol, 2013, 58(3): 473-478

[15] Findik D, Arslan U, Baykan M. Determination of hepatitis B virus DNA incidence, viral load, and mutations in blood donors with HBsAg and anti-HBs-negative serology and antibodies to hepatitis B core antigen[J]. Eur J Intern Med, 2007, 18(8): 571-575

（下转第 7059 页）

Mediating Tonic Inhibition and Neurosteroid Sensitivity [J].J Neurosci, 2014, 34(43): 14181-14197

[7] Napoli E, Hung C, Wong S, et al. Toxicity of the flame-retardant BDE-49 on brain mitochondria and neuronal progenitor striatal cells enhanced by a PTEN-deficient background[J]. Toxicol Sci, 2013, 132 (1): 196-210

[8] Tang Ji-hong, Qi Yu-feng, Zhu Yu-xia, et al. Etfects of clonazepam pretreatment on expression of r-amino-nbutyric acid A receptor γ2 subunit of hippocampus in epileptic rats [J]. Journal of Clinical Neurology, 2013, 26(3): 195-197

[9] Yang X, Wang S, Lin Y, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition protects epileptic hippocampal neurons from apoptosis via suppressing Akt-mediated apoptosis-inducing factor translocation in vitro[J]. Neuroscience, 2013, 231(34): 353-362

[10] Koyama R. Cellular and molecular mechanisms underlying aberrant network reorganization in the epileptic brain [J]. Yakugaku Zasshi, 2014, 134(11): 1171-1177

[11] Luan G, Zhao Y, Zhai F, et al. Ketogenic diet reduces Smac/Diablo and cytochrome c release and attenuates neuronal death in a mouse model of limbic epilepsy[J]. Brain Res Bull, 2012, 89(3-4): 79-85

[12] Mishra AM, Bai X, Motelow JE, et al. Increased resting functional connectivity in spike-wave 12.epilepsy in WAG/Rij rats[J]. Epilepsia, 2013, 54(7): 1214-1222

[13] Liang LP, Waldbaum S, Rowley S, et al. Mitochondrial oxidative stress and epilepsy in SOD2 deficient mice: attenuation by a lipophilic metalloporphyrin[J]. Neurobiol Dis, 2012, 45(3):1068-1076

[14] Ni Wen-jie, Zhao Li-xin, Duan Shu-qin, et al. Effects of Nuclear Factor-kappa B Expression in Hippocampal Nerve Cells of Epileptic Rats through Dazhen Acupuncture Manipulation on Du Meridian[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-/Cerebrovascular Disease, 2014, 12(4): 471-474

[15] Mayr JA, Zimmermann FA, Fauth C, et al. Lipoic acid synthetase deficiency causes neonatal-onset epilepsy, defective mitochondrial energy metabolism, and glycine elevation[J]. Am J Hum Genet, 2011, 89(6): 792-797

[16] Deng Y, Wang M, Jiang L, et al. A comparison of extracellular excitatory amino acids release inhibition of acute lamotrigine and topiramate treatment in the hippocampus of PTZ-kindled epileptic rats[J]. J Biomed Nanotechnol, 2013, 9(6): 1123-1128

[17] Cordelli DM, Pellicciari A, Kiriazopulos D, et al. Epilepsy in Mowat-Wilson syndrome: is it a matter of GABA? [J]. Epilepsia, 2013, 54(7): 1331-1332

[18] Feldmann M, Asselin MC, Liu J,et al. P-glycoprotein expression and function in patients with temporal lobe epilepsy: a case-control study [J]. Lancet Neurol, 2013, 12(8): 777-785

[19] Christian CA, Herbert AG, Holt RL, et al. Endogenous positive allosteric modulation of GABA (A) receptors by diazepam binding inhibitor[J]. Neuron, 2013, 78(6): 1063-1074

[20] Abbasian M, Sayyah M, Babapour, et al. Intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide increases gene expression of connexin32 gap junction in rat hippocampus[J]. Basic Clin Neurosci, 2013, 4(4): 334-340

（上接第 7167 页）

[16] Wang S, Zhang C, Wang JP, et al. Development of colloidal gold-based flow-through and lateral-flow immunoassays for the rapid detection of the insecticide carbaryl Anal [J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 546 (2): 161-166

[17] de Souza MQ, Galdino AS, Dos Santos JC, et al. A recombinant multiepitope protein for hepatitis B diagnosis [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013, Article ID 148317

[18] Zhang L, Meng H, Han X, et al. The relationship between HBV serum markers and the clinicopathological characteristics of hepatitis B virus-associated glomerulonephritis (HBV-GN) in the northeastern chinese population[J]. Virol J, 2012 ,9(200): 1-9

[19] Akinbami AA, Oshinaike OO, Dosunmu OA, et al. Seroprevalence of hepatitis B e antigen (HBe antigen) and B core antibodies (IgG anti-HBcore and IgM anti-HBcore) among hepatitis B surface antigen positive blood donors at a Tertiary Centre in Nigeria [J]. BMC Res Notes, 2012, 5(167): 1-5

[20] Wang XJ, Zhan WB, Xing J. Development of dot-immunogold filtration assay to detect white spot syndrome virus of shrimp [J]. J. Virol Methods, 2006, 132(1-2): 212-215

[21] Xiang X, Tianping W, Zhigang T. Development of a rapid, sensitive, dye immunoassay for schistosomiasis diagnosis: a colloidal dye immunofiltration assay[J]. J Immunol Methods, 2003, 280(1-2): 49-57