

文章编号:1002-2694(2002)06-0018-04

戊型肝炎病毒抗体双抗原夹心法 ELISA 的建立与初步应用

何志强¹ 葛胜祥¹ 邱艳² 彭耿³ 陈毅歆¹ 何水珍¹ 张军¹ 夏宁邵^{1*}

摘要:目的 建立抗戊型肝炎病毒(HEV)抗体检测的双抗原夹心 ELISA(DS-ELISA),并应用于多种动物血清的检测。方法 将大肠杆菌表达的一段 HEV ORF2 区重组抗原分别包被微孔板和进行辣根过氧化物酶(HRP)标记,利用 5 份阳性血清和 40 份阴性血清建立双抗原夹心 ELISA;用 400 份义务献血员血清比较双抗原夹心 ELISA 与间接法 IgG 抗体 ELISA 的符合情况;用 3 只 HEV 感染猴系列血清比较双抗原夹心 ELISA 试剂和 Genelabs 公司 HEV IgG 试剂;用双抗原夹心 ELISA 试剂检测新疆地区的部分牛、绵羊、山羊、猪血清和上海地区的部分鸡血清中的 HEV 抗体。结果 建立了检测 HEV 抗体的双抗原夹心 ELISA 方法,对 400 份义务献血员血清的检测表明其与间接法 IgG 抗体 ELISA 试剂的符合情况良好,并且有更高的 s/co 比值;与 Genelabs 公司 HEV IgG 试剂的比较表明双抗原夹心 ELISA 试剂的检出更早,尤其是持续时间及强度明显优于 Genelabs 试剂;在所检测的各种动物中均发现了 HEV 抗体,其中猪抗体的阳性率最高,表明双抗原夹心 ELISA 试剂可同时用于不同动物的抗 HEV 抗体检测。结论 利用大肠杆菌表达的 HEV 重组抗原建立了双抗原夹心法 ELISA,并可同时用于不同动物的抗 HEV 抗体检测。

关键词:戊型肝炎;抗体检测;双抗原夹心法 ELISA;动物;重组抗原

中图分类号:R373.2 **文献标识码:**A

Establishment and primary application of double antigen sandwich ELISA for detection of hepatitis E virus antibody

HE Zhiqiang, Ge Shengxiang, XIA Ningshao, et al

(The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering of Xiamen University, Xiamen 361005)

ABSTRACT: **Aim** To establish a double antigen sandwich ELISA (DS-ELISA) for detection of anti-hepatitis E virus antibody in different animals. **Methods** A recombinant antigen expressed in *E. coli* was used to coat microplate and conjugated with HRP respectively, the conditions of DS-ELISA were determined using five HEV antibody positive sera and forty antibody negative sera. The accordance of DS-ELISA with indirectly IgG ELISA was compared by paralleling detection of 400 blood donors' sera using both kits. The serial sera of three HEV experimental infected monkeys were detected using the DS-ELISA and IgG ELISA kit of Genelabs Co. Some cattle, sheep, goat, swine, and chicken sera were also detected with DS-ELISA. **Results** DS-ELISA for detection of anti-HEV were established. The results of parallel detection of 400 blood donor's sera by DS-ELISA and indirectly IgG ELISA showed that these two kit had good accordance, and the signal/cutoff (s/co) value of DS-ELISA was higher than indirectly ELISA. When detecting serial sera of experimental infected monkey, the seroconversion time detected with DS-ELISA were much earlier than with a well-known commercial IgG ELISA kit, and the antibody's positive period and the titer detected by DS-ELISA were better than the commercial kit too. Anti-HEV antibodies were found in all kinds of animals detected, the positive rate in swine was the highest. **Conclusion** A double antigen sandwich ELISA have been established using recombinant antigens expressed in *E. coli*, and can be used to detect anti-HEV in different kinds of animals.

KEY WORDS: Hepatitis E; Antibody detection; Double antigen sandwich ELISA; Animal; Recombinant antigen

戊型肝炎(戊肝)是一种由戊型肝炎病毒(HEV)导致的肠道传播的急性传染性肝炎,主要流行于亚洲、非洲和中美洲发展中国家,是一种世界性的危害严重的传染病^[1]。我国是戊肝主要流行区之一,1986~1988年在新疆南部地区发生的大规模

*通讯作者

作者单位:1. 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室(厦门,361005)

2. 北京红十字血液中心

3. 北京万泰生物药业有限公司

戊肝暴发流行,造成近 20 万人发病,死亡 1 000 余人;除新疆外,我国吉林、辽宁、内蒙古及山东等地均有戊肝暴发流行的报道,而所有省市自治区均有散发性戊肝报道,约占急性散发性病毒性肝炎的 10%^[2]。近几年来,在猪、牛、羊、鸡、鼠等与人关系密切的动物中陆续发现了 HEV 感染^[3~6]。动物中 HEV 抗体及病毒的陆续检出,以及动物病毒对灵长类动物感染能力的证实,使得戊肝是一种人兽共患病的看法已逐渐被人们所接受^[7,8]。目前对动物 HEV 与人类 HEV 流行之间的关系研究已越来越受到重视,但迄今仍未有通用的动物 HEV 抗体诊断试剂面世,只是个别研究单位根据特定的动物种类临时组装间接法 IgG 试剂进行检测,使不同结果的可比性和研究的广泛性均受到了较大限制。最近,我们利用大肠杆菌表达出 HEV 结构蛋白 ORF2 的一个片段,该重组蛋白 NE2 能自发形成二聚体并组装出更高的聚体形式,对急性血清和恢复期血清均有着很强的反应性,免疫恒河猴可以保护其免受 HEV 的感染^[9~11]。本研究在此基础上,进一步建立了双抗原夹心法 ELISA 试剂,并利用其对我国部分地区的猪、牛、绵羊、山羊、鸡等与人关系密切的家畜家禽进行了 HEV 抗体的检测。

1 材料与与方法

1.1 抗原 HEV 重组蛋白 NE2 为大肠杆菌表达的非融合蛋白,包含 HEV ORF2 的 a. a. 394 ~ a. a. 604 的片段,主要以包涵体形式表达。包涵体经 4M 尿素洗涤后取上清透析复性,再经分子筛 HPLC 纯化,纯度大于 95%。纯化的 NE2 蛋白在 PBS 溶液中形成多种聚合形式^[11]。

1.2 辣根过氧化物酶(HRP)的标记 采用改良过碘酸钠法将 HRP(Sigma 公司)标记 NE2 蛋白^[12]。

1.3 双抗原夹心法 ELISA (DS-ELISA) HPLC 纯化的 NE2 抗原,溶解于 0.05mol/L 碳酸包被缓冲液(pH9.5)中,100 μ l/孔包被 96 孔聚乙烯微量滴定板,37 $^{\circ}$ C 吸附 2h,4 $^{\circ}$ C 过夜;PBST 洗液(pH7.4)洗涤 1 遍,200 μ l/孔封闭液(含 2%明胶、0.2%酪蛋白和 2%蔗糖的 PBS)37 $^{\circ}$ C 封闭 2h,甩尽、拍干后真空封闭,4 $^{\circ}$ C 保存备用。检测时,于每孔中加入 50 μ l 待检血清,轻拍混匀后每孔加入 50 μ l 稀释好的 NE2-HRP,轻拍混匀后 37 $^{\circ}$ C 温育 30min;洗涤 6 次,扣干,加入显色剂(TMB 底物,北京万泰生物药业有限公司提供),37 $^{\circ}$ C 温育 10min 后,加终止液 50 μ l (2M H₂SO₄) 终止,于酶标仪(TECAN 公司)上读取 OD_{450/620nm} 的读值。

1.4 间接法抗 HEV-IgG ELISA 如上以 NE2 抗

原包被微孔板,检测时,于每孔中加入 100 μ l 样品稀释液(20mM pH7.2PBS,1%酪蛋白),然后加入 10 μ l 血清,轻拍混匀后 37 $^{\circ}$ C 温育 30min;用 PBST 洗涤 5 次,扣干后每孔加入 100 μ l 稀释好的抗人 IgG-HRP(北京万泰生物药业公司提供),轻拍混匀后 37 $^{\circ}$ C 温育 30min;洗涤 5 次,扣干,加入显色剂,37 $^{\circ}$ C 温育 10min,终止液 50 μ l (2M H₂SO₄) 终止,于酶标仪上读取 OD_{450/620nm} 的读值。

1.5 血清 3 只 HEV 感染恒河猴系列血清参见文献^[11];5 份戊肝病人血清和 40 份阴性血清由北京万泰公司提供;400 份义务献血员血清由北京红十字血液中心提供;24 份猪血清、12 份牛血清、24 份绵羊血清和 30 份山羊血清采自新疆,173 份鸡血清采自上海。

1.6 对照试剂 对照试剂为 Genelabs 公司抗 HEV IgG 试剂(GL-IgG,批号 BF1021)和 NE2 包被的间接法抗 HEV-IgG ELISA。

2 结果

2.1 双抗原夹心法 ELISA 的建立 经正交法优化抗原包被浓度和酶标记抗原使用浓度以及反应条件后,对 5 份戊肝病人血清和 40 份阴性血清进行检测,结果阴性血清 OD 值最大为 0.129,平均 OD 值为 0.046,方差(SD)为 0.024,因此确定试剂临界值(CO)为:阴性均值+5SD=0.166;5 份阳性血清 OD 值均在 1.5 以上,对倍稀释后检测可见 OD 值随稀释度升高而下降(图 1),从而初步建立了戊肝抗体检测的 DS-ELISA。

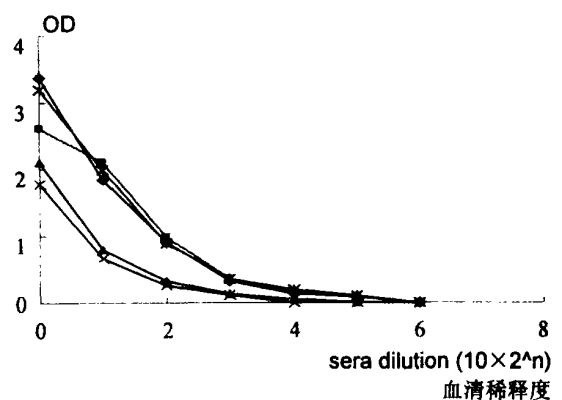


图 1 双抗原夹心法 ELISA 对系列稀释血清的检测

Fig. 1 The detection of serial dilution sera by double antigen sandwich ELISA

2.2 双抗原夹心法 ELISA 与间接法 ELISA 对人血清的检测 对北京市 400 名无偿献血员的血清用 DS-ELISA 与间接法 ELISA 进行检测,结果二者

符合情况良好,对阳性标本双抗原夹心法的检测值/临界值(s/co)要高于间接法(图2)。

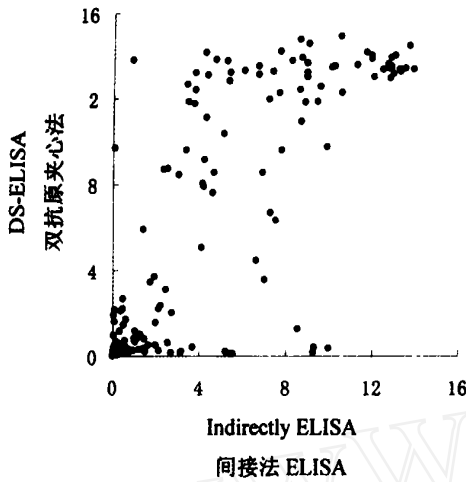


图2 双抗原夹心法与间接法 ELISA 对 400 份献血员血清检测的检测值/临界值(s/co)

Fig.2 The s/co value of 400 blood donors by double antigen sandwich ELISA(DS-ELISA)and indirectly ELISA

2.3 双抗原夹心法 ELISA 对 HEV 感染猴系列血清的检出 用 DS - ELISA 及现有商业试剂 (GL - IgG) 对 3 只 HEV 感染的恒河猴的系列血清进行检测,结果 DS - ELISA 的抗体阳转时间较 GL - IgG 试剂为早(图3)。

2.4 双抗原夹心法 ELISA 对牛、羊、猪血清的检出 用 DS - ELISA 对我国新疆地区的牛、羊、猪血清及上海地区的鸡血清进行检测,结果见表1,这几种动物中均有 HEV 抗体检出,其中猪的阳性率高达 79.7%。

表1 双抗原夹心法 ELISA 对不同动物的抗 HEV 抗体的检测
Table 1 The detection of anti - HEV in different animals by double antigen sandwich ELISA

动物 Animal	检测数 Detection No.	阳性数 Positive No.	阳性率 Positive rate(%)
牛 Cattle	202	13	6.4
绵羊 Sheep	24	3	12.5
山羊 Goat	30	2	6.7
猪 Swine	443	353	79.7
鸡 Chicken	173	3	1.7

3 讨 论

在本研究中,我们利用大肠杆菌表达的一段能

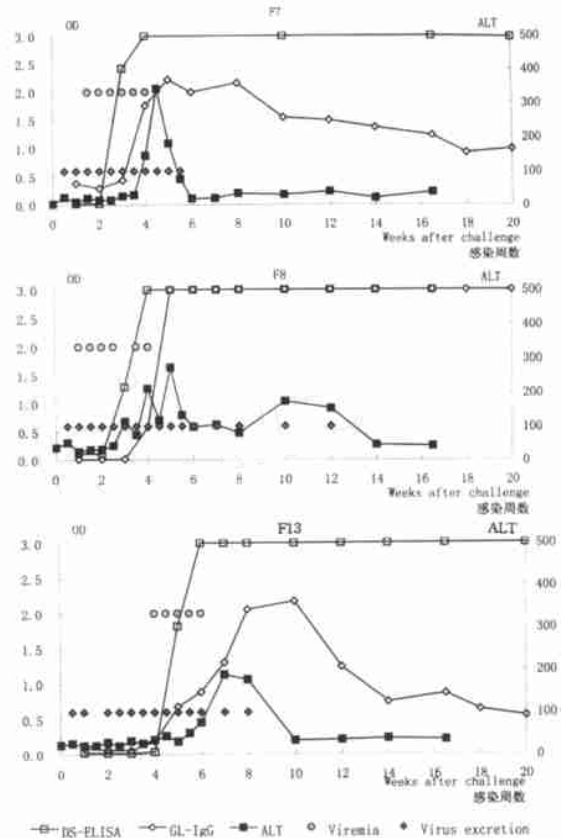


图3 双抗原夹心法 ELISA 对 HEV 感染猴系列血清的检出
Fig.3 The detection of serial sera of HEV infected monkeys by double antigen sandwich ELISA

模拟 HEV 表面重要构象性表位的重组抗原,建立了双抗原夹心 ELISA 方法,利用 400 份义务献血员的血清与采用同一抗原的间接法 ELISA 平行检测,结果符合良好,而双夹心法的 s/co 比值较间接法更高;同时利用 HEV 静脉攻击感染的恒河猴系列血清与现有临床上最常用的商业试剂(Genelabs 公司)进行平行比较,结果表面双夹心法试剂的检出时间较 Genelabs 试剂早 1 周左右,且一直维持较高水平,而 Genelabs 试剂在 20 周左右即有明显下降,表明本研究建立的双抗原夹心法试剂较 Genelabs 试剂的灵敏度高出许多,这与多篇文献报道的 Genelabs 试剂检出的抗体多数在恢复期会迅速消失的结果是相符的,而本研究所采用抗原则包含了在恢复期也可长期持续存在的抗体表位^[13-17]。利用本研究建立的方法在新疆地区的猪、牛、绵羊和山羊以及上海地区的鸡中均检出了 HEV 抗体,表明该方法可同时适用于不同物种的 HEV 抗体的检测,而国内外迄今未见有类似的试剂报道。

在上世纪 90 年代早期,Balayan 和其同事^[18]就

已报道了前苏联地区猪、羊和鼠中的 HEV 感染,随后,在 1997 年美国 Meng 等^[5,7]由猪身上分离出一株 HEV 病毒,并发现其可感染黑猩猩和恒河猴,从而首次证实了 HEV 种间传播的可能性。世界上其他地区的猪 HEV 的陆续分离以及血清学调查表明猪的 HEV 感染是一种无处不在的现象。抗 HEV 同样在家鼠及其它啮齿类动物中也常见,而 1999 年从鸡身上分离出的 HEV 病毒可能与“肝脾肿大”有关^[19]。越来越多的证据表明 HEV 有比人们起初相信的更为显著的多样性,更广泛的分布以及更宽的宿主范围。虽然戊肝作为一种人兽共患病的看法已被越来越多人接受,但迄今仍没有发现任何一个自然发生的 HEV 种间传播的直接证据,对动物宿主与人类 HEV 流行的关系的研究方兴未艾^[20,21],本研究提供了一种跨越物种屏障的通用的 HEV 抗体检测试剂盒,为迅速广泛深入地开展这一国际热点领域的研究奠定了坚实基础。

4 参考文献

1. Irshad M. Hepatitis E virus: an update on its molecular, clinical and epidemiological characteristics [J]. *Intervirology* 1999, 42: 252 ~ 262.
2. Zhuang H, Cao XY, Liu CB et al. Hepatitis E in China [J]. *Gastroenterologia Japonica*, 1999, 36: 135 ~ 138.
3. Favorov MO, Kosoy MY, Tsarev SA et al. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States [J]. *J Infect Dis*, 2000, 181: 449 ~ 455.
4. Arankalle VA, Joshi MV, Kulkarni AM et al. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species [J]. *J Viral Hepat*, 2001, 8: 223 ~ 227.
5. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94: 9860 ~ 9865.
6. Meng XJ, Dea S, Engle RE et al. Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is common or is rare in the human population [J]. *J Med Virol*, 1999, 59: 297 ~ 302.
7. Meng XJ, Halbur PG, Shapiro MS et al. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus [J]. *J Virol*, 1998, 72: 9714 ~ 9721.
8. Meng XJ. Novel strains of hepatitis E virus identified from humans and other animal species: is hepatitis E a zoonosis [J]. *J Hepatol*, 2000, 33: 842 ~ 845.
9. Zhang JZ, Ng MH, Xia NS et al. Conformational antigenic determinants generated by interactions between a bacterially expressed recombinant peptide of the hepatitis E virus structural protein [J]. *J Med Virol*, 2001, 64: 125 ~ 132.
10. Im S, Zhang JZ, Zhuang H et al. A bacterially expressed peptide prevents experimental infection of primates by the hepatitis E virus [J]. *Vaccine*, 2001, 19: 3726 ~ 3732.
11. 李少伟, 张军, 何志强等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 片段的聚合现象研究 [J]. *生物工程学报*, 2002, 18(4): 54 ~ 58.
12. Tijssen P and Kurstak E. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassays [J]. *Anal Biochem*, 1984, 136: 451 ~ 457.
13. Mast EE, Alter MJ, Holland PV et al. for the Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel [J]. *Hepatology*, 1998, 27: 857 ~ 861.
14. 张华远. 戊型肝炎检测方法及疫苗研究进展 [J]. *微生物学免疫学进展*, 1998, 26: 73 ~ 76.
15. 庄辉, 李凡, 朱永红, 等. 戊型肝炎病人和实验感染戊型肝炎病毒的猕猴血清抗-HEV ORF2 和 ORF3 的动态变化 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1995, 9: 299 ~ 302.
16. 戎广亚, 孙杰, 周继文, 等. 戊型肝炎病人血清抗-HEV IgG 与 IgM 和 HEV RNA 的动态变化 [J]. *病毒学报*, 1998, 14: 268 ~ 270.
17. Zhang JZ, Im SW, Lau SH et al. Occurrence of hepatitis E virus IgM, low avidity IgG serum antibodies, and viremia in sporadic cases of non-A, -B, and -C acute hepatitis [J]. *J Med Virol*, 2002, 66: 40 ~ 48.
18. Karetnyi IuV, Dzhumaliev D I, Usmanov RK et al. The possible involvement of rodents in the spread of viral hepatitis E [J]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 1993, 4: 52 ~ 56.
19. Haqshenas G, Shivaprasad HL, Woolcock PR et al. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82: 2449 ~ 2462.
20. Drobeniuc J, Favorov MO, Shapiro CN et al. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine [J]. *J Infect Dis*, 2001, 184: 1594 ~ 1597.
21. Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F et al. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 117 ~ 122.

2002 年 4 月 3 日收稿 2002 年 6 月 10 日修回