

# 酶标 SPA 免疫酶法检测宫颈癌患者血清中单纯疱疹病毒抗体

谷志远 张桂英 宋海静

(解放军总医院中心实验室, 北京)

免疫酶法用于检测病人体液中病毒特异性抗体与其它方法相比, 是一种简便易行、敏感性、特异性较好的方法, 应用日广<sup>[1-4]</sup>。用它检测病毒 IgG 抗体, 通常以酶标抗人 IgG (简称酶标抗体) 作为第二抗体。本文将辣根过氧化物酶标记葡萄球菌 A 蛋白 (简称酶标 SPA) 用于免疫酶法中检测宫颈癌患者血清中单纯疱疹病毒 (HSV) IgG 抗体, 对实验方法稍做改进, 并与

酶标抗体免疫酶法及免疫荧光法作了比较, 收到较好效果。兹介绍如下。

## 材 料 和 方 法

1. 血清标本: 临床确诊的宫颈癌患者血清 30 份, 正常妇女对照血清 28 份, 置 -30℃ 冰箱

---

本文承蒙黄志尚教授审阅, 特此致谢。

待用。

2. 病毒: 采用 HSV-1 Sm44 株, HSV-2 Sav 株, 均购自北京药品生物制品检定所。

3. 抗原靶细胞片制备: 用 HSV-1、HSV-2 分别接种 BHK-21 细胞单层, 待病变达“++”时弃培养液, 经 0.01 M pH7.4 PBS 漂洗二次, 用橡皮刮子刮落细胞, 将浓的细胞悬液涂在特制带圈载玻片上, 风干, 冷丙酮 4℃ 固定 10 分钟, 置 -30℃ 保存备用。同时制备正常细胞玻片作为对照。

4. 酶标记物及荧光抗体: 采用 Sigma 产辣根过氧化物酶。SPA、羊抗人 IgG 分别购自上海生物制品所及军事医学科学院五所。酶标 SPA 按 Wilson 简易法制备<sup>[5]</sup>。酶标羊抗人 IgG 按过碘酸钠法制备<sup>[6]</sup>。荧光素标记羊抗人 IgG 是上海生物制品所生产。经滴定最适工作浓度分别为 1:200、1:40、1:16。

5. 酶显色底物溶液: 3,3 二氨基联苯胺 5 mg 加 0.05 M pH 7.6 Tris-HCl 10 ml, 临用前加 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1ml。

6. 免疫酶染色法及结果判定: 将待检血清用 0.01 M pH 7.4 PBS 作倍比稀释, 依次滴到抗原靶细胞片的小圈内, 放湿盒中 37℃ 温育 30

分钟, 经缓慢流水冲洗 15 分钟, 蒸馏水漂洗, 风干, 滴加最适工作浓度酶标记物, 同上法温育洗涤, 酶显色底物溶液避光下处理 5 分钟, 水洗, 风干, 用 0.1% 台酚蓝 (Trypan blue) 衬染 60 秒钟, 水洗风干后在普通光学显微镜下观察判定结果。阳性细胞胞浆呈黄褐色, 细胞核呈蓝色; 阴性细胞和正常靶细胞对照片中的细胞胞浆及核均呈蓝色。根据胞浆染色程度和数目, 以棕褐色为“+++”, 棕黄色为“++”, 黄色为“+”表示。以血清最高稀释度能出现“+”者为抗体效价。

每次实验同时做阳性血清、阴性血清、正常细胞和内源酶染色对照。

7. 间接免疫荧光染色法: 按常规方法进行。伊文思蓝衬染, 日本 Nikon 荧光显微镜观察结果。

8. 抗体阳性率计算法: HSV-2 抗体阳性率根据 II/I (HSV-2/HSV-1) 抗体滴度的指数值计算<sup>[7]</sup>, 数值 ≥ 85 为阳性, 否则为阴性。计算公式如下:

$$II/I = \frac{\log 10 \text{HSV-2 抗体滴度}}{\log 10 \text{HSV-1 抗体滴度}} \times 100$$

HSV-1 抗体阳性率根据 I/II 抗体滴度的指

表 1 三种方法检测两组血清中 HSV/IgG 抗体的 GMT

组 别	酶标 SPA 法		酶标抗体法		免疫荧光法	
	HSV-1	HSV-2	HSV-1	HSV-2	HSV-1	HSV-2
宫颈癌患者	557	432	557	413	532	394
正常妇女	366	151	359	158	349	144

表内数字为抗体滴度的倒数。

表 2 两组血清 HSV/IgG 抗体阳性率

组 别	检测倒数	HSV-1		HSV-2	
		阳性例数	阳性率%	阳性例数	阳性率%
宫颈癌患者组	30	29	97	27	90
正常妇女组	28	28	100	15	54

数值计算, 结果判断同上。

## 结 果

### (一) 免疫酶法检测 HSV/IgG 抗体的特

### 异性检验

以宫颈癌患者 HSV 阳性血清与抗原靶细胞片作用后, 分别用酶标羊抗兔 IgG 和酶标兔抗鼠 IgG 取代酶标 SPA 或酶标羊抗人 IgG, 结

果均未见假阳性反应。正常细胞、阴性血清、内源酶和单用酶标记物染色等对照试验及阻断试验均呈阴性反应。

## (二) 宫颈癌患者血清中 HSV-IgG 抗体检测结果

用酶标 SPA 免疫酶法、酶标抗体免疫酶法及免疫荧光法平行检测了 30 名宫颈癌患者, 28 名正常妇女血清中 HSV-1/IgG、HSV-2/IgG 抗体滴度, 结果如表 1、2 所示。

用三种方法检出的宫颈癌患者血清中 HSV-2/IgG 几何平均滴度 (GMT) 均比正常妇女高得多, 相差非常显著 ( $P < 0.01$ ); HSV-1/IgG 的 GMT 与正常妇女相比, 则无显著差别 ( $P > 0.05$ )。三种方法检测的抗体滴度之间无明显差别。大多数标本的抗体滴度, 三种方法测得结果一致, 少数标本的抗体滴度三者相差不超过一个滴度。表 2 为酶标 SPA 法检测的两组血清 HSV-IgG 抗体阳性率。两组 HSV-1 的阳性率差异不明显 (精确检验  $P = 0.517$ ); HSV-2 差异极显著,  $X^2 = 9.621, P < 0.01$ , 宫颈癌患者组较正常妇女组为高。

## (三) 衬染及流水洗片效果

免疫酶法通常有背景染色, 非特异染色干扰。为此我们比较了苏木精、甲基绿、台酚蓝等染色液作衬染消除这种干扰的效果。实验证明, 待检血清及酶标记物顺次与抗原靶细胞作用, 经底物显色后再进行衬染, 没有干扰底物显色反应。苏木精、甲基绿、台酚蓝衬染, 阳性细胞核分别呈淡红色、淡绿色、蓝色; 细胞胞浆随抗体滴度不同呈黄褐色、棕黄色、黄色。苏木精、甲基绿衬染细胞核与胞浆染色的对比度不如台酚蓝衬染鲜明; 阴性细胞及正常细胞对照片中的细胞染色也不如台酚蓝着色浓深。因而认为 0.1% 台酚蓝衬染效果最好, 判定抗体滴度终点明晰可辨。其染色时间不要超过 60 秒。

常规免疫酶染色法是用 PBS 洗涤抗原靶细胞片。我们对比了缓慢流水冲洗与用 PBS 洗涤的效果。结果表明, 缓慢流水冲洗不影响染色反应, 也没有改变细胞形态, 所得抗体滴度与用 PBS 洗涤一致。

# 讨 论

本实验检出的宫颈癌患者血清中 HSV-2/IgG 抗体阳性率和 GMT 显著高于正常妇女, 符合其它作者 HSV-2 感染可能与宫颈癌发生有关的报道<sup>[8,9]</sup>。宫颈癌患者 HSV-1/IgG 抗体 GMT 高于正常妇女, 可能是由于宫颈癌患者 HSV-2 感染高于正常妇女及 HSV-1 和 HSV-2 之间有相同抗原结构, 存在抗原交叉反应。

应用免疫荧光法及酶标抗体免疫酶法检测 HSV-IgG 抗体已有报道<sup>[1,9,10]</sup>。应用酶标 SPA 免疫酶法检测 HSV-IgG 抗体尚未见报道。本文证明三种方法检测 HSV-IgG 抗体的敏感性和特异性均相似。由于免疫酶法不需要荧光显微镜, 染色标本又可长期保存复查, 因此简便易行。这两种免疫酶法相比较, 酶标 SPA 免疫酶法更具优点。酶标 SPA 能与入及多种哺乳动物 IgG 的 Fc 段结合, 因此它既可用于人血清抗体的检测, 也可以用于动物的实验研究。SPA 有市售纯品, 制备结合物时不需进一步纯化, 按 Wilson 简易法标记 SPA, 所得结合物效价高、性能稳定, 其工作浓度稀释度较高, 且 SPA 对 IgG 的反应较专一, 因而酶标 SPA 免疫酶法非特异反应小, 背景着色浅。

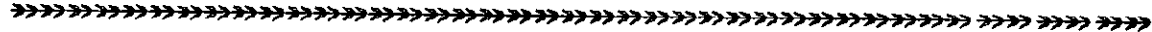
以 0.1% 台酚蓝衬染, 没有影响酶底物显色反应, 而且有利于消除非特异反应, 提高了免疫酶染色法的特异性, 使得判定抗体滴度终点明晰可辨, 减少了操作人员间判定结果的误差。靶细胞片的洗涤, 用缓慢流水冲洗代替 PBS 浸洗, 效果较好, 简化了操作, 节省了试剂。

酶标 SPA 免疫酶法较酶标抗体免疫酶法及免疫荧光法在检测 HSV-IgG 抗体中似有更多优点, 是一种快速、简便、敏感、特异、重复性好的检测技术, 尤其有利于基层医疗单位采用, 在临床实验室诊断和流行病学调查中有推广应用的价值。

## 参 考 文 献

[1] Morisset, R. et al.: *Viral Immunodiagnosis*, p. 31

(下转第 143 页)



(上接第 132 页)

- Academic Press, Inc., New York, 1973.
- [ 2 ] Gerna, C. et al.: *J. Infect. Dis.*, 133(4): 469—472, 1976.
- [ 3 ] 曾毅等: 中华肿瘤杂志, 1(1): 8—11, 1979。
- [ 4 ] 张维等: 中华微生物学和免疫学杂志, 3(3): 181—183, 1983。
- [ 5 ] 周惠珍等: 微生物学通报, 13(4), 1986。
- [ 6 ] Nakane, P. K. et al.: *J. Histochemistry and Cytochemistry*, 22(12): 1084—1091, 1974.
- [ 7 ] Rawls, W. E. et al.: *J. Immunol.*, 104(3): 599—606, 1970.
- [ 8 ] Heise, E. R. et al.: *Cancer Res.*, 39(10): 4022—4026, 1979
- [ 9 ] 范江等: 中华微生物学和免疫学杂志, 2(4): 240—243, 1982。
- [ 10 ] Smith, J. W. et al.: *Infect. Immunol.*, 5(3): 305—310, 1972.

JOURNALS.IM.AC.CN