

# 酶联免疫吸附试验及其应用

作者：鲍行豪

## 一、前言

近二十几年来，免疫学分析方法发展很快，特别是在使用标记了的抗原和抗体的分析技术以后，使原来许多经典的分析方法在敏感性和特异性方面都不能相比。继 50 年代的免疫荧光（IFA）和 60 年代的放射免疫（RIA）分析技术之后，在 70 年代初期又建立了用酶来标记抗原或抗体的分析技术。由于酶的高效生物催化作用，一个酶分子在数分钟内可以催化几十几百个底物分子发生反应，产生了放大作用，使得原来极其微乎其微的抗原或抗体在数分钟后就可被识别出来，这种技术被称为酶联免疫吸附试验法（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA），本法自 70 年代初期由 VAN WEEMEN、SCHUARS、ENGVALL 及 PERLMARN 等相继分别报道后，现已引起广泛重视。

ELISA 法是免疫诊断中的一项新技术，现已成功地应用于多种病原微生物所引起的传染病、寄生虫病及非传染病等方面的免疫诊断。也已应用于大分子抗原和小分子抗原的定量测定，根据已经使用的结果，认为 ELISA 法具有灵敏、特异、简单、快速、稳定及易于自动化操作等特点。不仅适用于临床标本的检查，而且由于一天之内可以检查几百甚至上千份标本，因此，也适合于血清流行病学调查。本法不仅可以用来测定抗体，而且也可用于测定体液中的循环抗原，所以也是一种早期诊断的良好方法。因此 ELISA 法在生物医学各领域的应用范围日益扩大，可概括四个方面：

- 1、免疫酶染色各种细胞内成份的定位。
- 2、研究抗酶抗体的合成。
- 3、显现微量的免疫沉淀反应。
- 4、定量检测体液中抗原或抗体成份。

## 二、方法的基本原理和种类

ELISA 的基本原理有三条：

- （1）抗原或抗体能以物理性地吸附于固相载体表面，可能是蛋白和聚苯乙烯表面间的疏水性部分相互吸附，并保持其免疫学活性；
- （2）抗原或抗体可通过共价键与酶连接形成酶结合物，而此种酶结合物仍能保持其免疫学和酶学活性；

(3) 酶结合物与相应抗原或抗体结合后，可根据加入底物的颜色反应来判定是否有免疫反应的存在，而且颜色反应的深浅是与标本中相应抗原或抗体的量成正比例的，因此，可以按底物显色的程度显示试验结果。

由于 ELISA 法一方面是建立在抗原与抗体免疫学反应的基础上，因而，具有特异性。而另一方面又由于酶标记抗原或抗体是酶分子与抗原或抗体分子的结合物，它可以催化底物分子发生反应，产生放大作用，正因为此种放大作用而使本法具有很高的敏感性。因此，ELISA 法是一种既敏感又特异的方法。常用的 ELISA 有以下两个方面。

(一)测定抗原的，主要有四种方法。

1、竞争法 (Competition method) :方法的基本原理可见图 1: 本法首先将特异性抗体吸附于固相载体表面，我们把抗原和抗体吸附到固相载体表面的这个过程，称为包被 (Coated)，也可叫做致敏。经洗涤后分成两组：一组加酶标记抗原和被测抗原的混合液，而另一组只加酶标记抗原，再经孵育洗涤后加底物显色，这两组底物降解量之差，即为我们所要测定的未知抗原的量。

这种方法所测定的抗原只要有一个结合部位即可，因此，对小分子抗原如激素和药物之类的测定常用此法。该法的优点是快，因为只有一个保温洗涤过程。但需用较多量的酶标记抗原为其缺点。

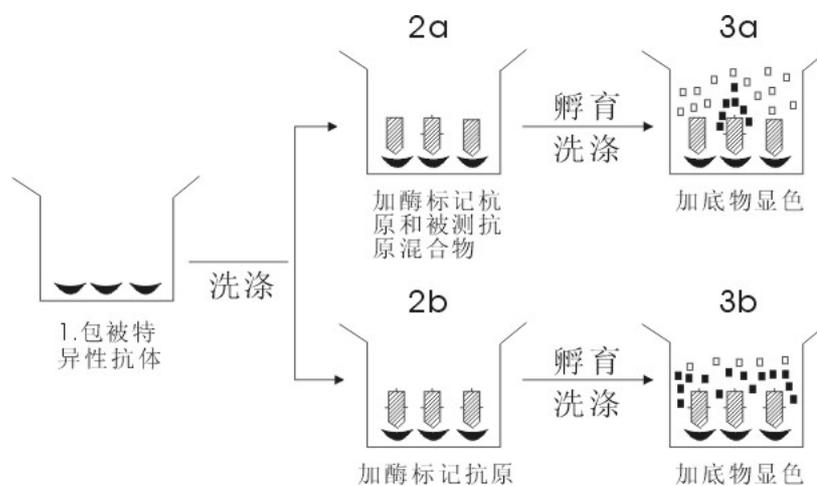


图 1: 竞争法测抗原示意图

## 2、双抗体夹心法

方法的基本原理可用图 2 来表示



图 2. 双抗体夹心法测抗原示意图

本法首先也是用特异性抗体包被于固相载体，经洗涤后加入含有抗原之待测样品，如待检样品中有相应抗原存在，即可与包被于固相载体上的特异性抗体结合，经保温孵育洗涤后，即可加入酶标记特异性抗体，再经孵育洗涤后，加底物显色进行测定，底物降解的量即为欲测抗原的量。

这种方法欲测的抗原必须有两个可以与抗体结合的部位，因为其一端要包被于固相载体上的抗体作用，而另一端则要与酶标记特异性抗体作用。因此，不能用于分子量小于 5000 的半抗原之类的抗原测定。我们用在霍乱肠毒素的测定。HbSAg 及 HbS 的测定。

3、改良双抗体夹心法：本法是双抗体夹心法的一种改良形式，也是用于测定抗原的，其原理可用图 3 来表示。

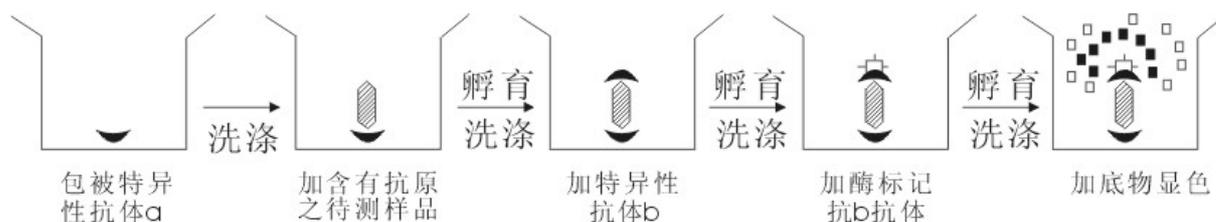


图 3. 改良双抗体夹心法测抗原示意图

本法首先是将特异性抗体 a 包被于固相载体，经洗涤加入含有欲测抗原之待检样品。经孵育洗涤后再加一次未标记的特异性抗体 b，而这次加入的抗体 b 于第一次包被于固相载体上的特异性抗体 a 对被测抗原来说都是特异性的，但不是用同种动物免疫制备的，否则可出现非特异性反应。经孵育洗涤后，再加酶标记抗 b 抗体，再经孵育洗涤后加底物显色进行测定。这种方法与双

抗体夹心法不同之处是多加了一层抗体。因此，放大的倍数更高，故比双抗体夹心法更加灵敏。同时避免标记特异性抗体，而另一优点是只要标记一种抗抗体，即可达到多种应用。

用于测定抗原的尚有第 4 种叫做抑制性测定法（见图 4），它是先用抗原包被固相载体，然后分为二组，一组加入用参考抗体和被检标本混合孵育后的混合溶液，假如标本中不含抗原，则参考抗体未被结合。因此它可以和包被于固相载体上的抗原结合。如标本中含有抗原，则抗原先与参考抗体结合，故参考抗体不再与包被于固相载体上的抗原结合。对加入酶结合物（抗球蛋白）和底物仅显示剩余结合的抗体量。再与另一组不加待检标本的参考系统比较，被检标本对底物显色的抑制程度与标本中所含抗原量成比例，二者之差，即为欲测抗原的量。

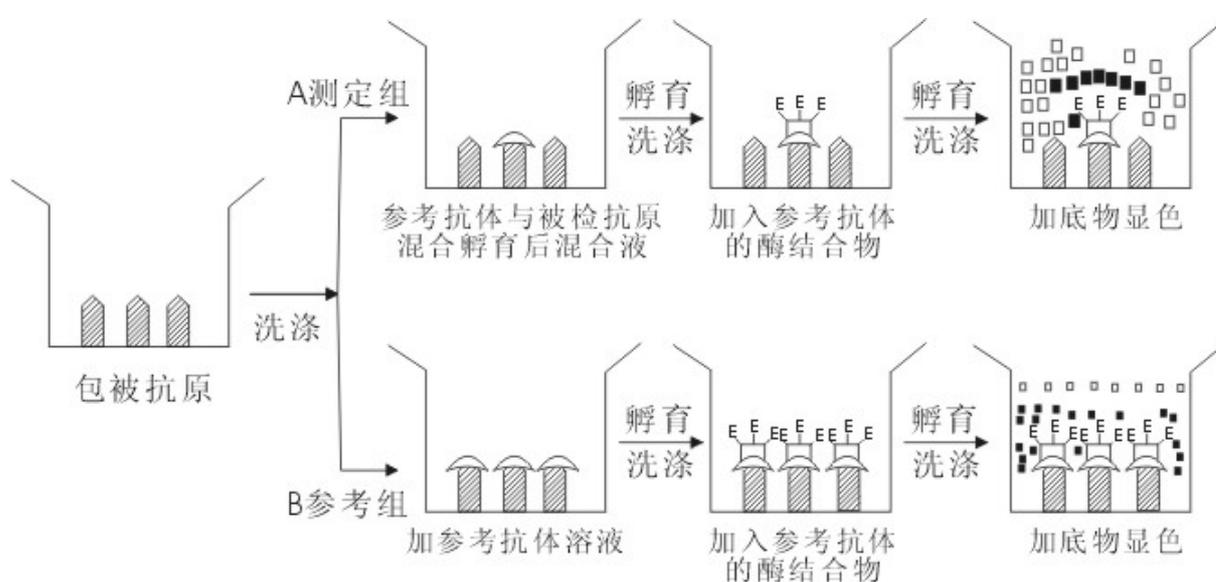


图 4. 抑制性测定法的原理

被检标本对底物显色的抑制程度与标本中所含抗原的量成比例，二者之差即为欲测抗原的量。

(二)测定抗体方面：所用的方法称为间接法，也是目前最常用的方法，其原理可用图 5 来表示。

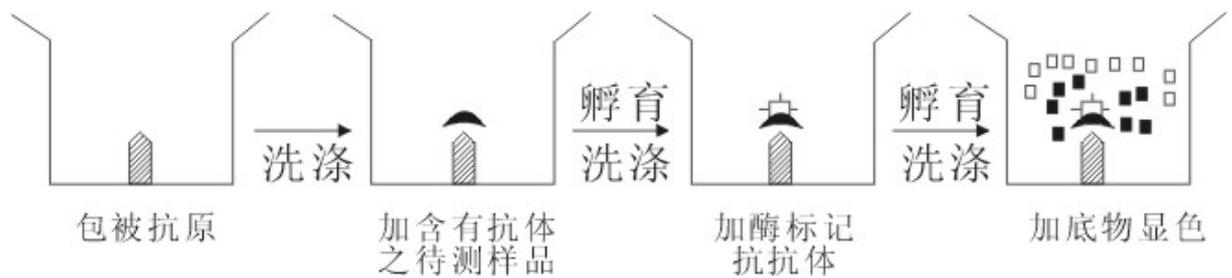


图 5. 间接法测抗体示意图

间接法首先用抗原包被于固相载体，这些包被的抗原必须是可溶性的，或者至少是极微小的颗粒，经洗涤，加入含有被测抗体之标本，再经孵育洗涤后，加入酶标记抗抗体，（对人的标本来说即加酶标抗人球蛋白 IgG、IgM），再经孵育洗涤后，加底物显色，底物降解的量，即为欲测抗体的量，其结果可用目测或用分光光度计定量测定，本法用不同种抗原包被固相载体后，只要用一种酶标记抗人球蛋白，即可作多种人的传染病、寄生虫病以及其他疾病的血清学诊断。如用酶标记抗人 IgM，则可用于早期诊断。

### 三、ELISA 的影响因素

这是 ELISA 检测中的重要部分，可从 9 个方面加以说明。

（一）固相载体：可溶性抗原或抗体吸附于固相载体而成为不溶形式，这是进行酶标记测定的基本条件。许多物质可作为固相载体，如纤维素、交联右旋糖苷、琼脂糖珠、聚丙烯、聚苯乙烯、聚乙烯及聚氯乙烯等等。但在 ELISA 中最常用的是聚苯乙烯或聚氯乙烯微量反应板及塑料管。由于微量反应板所用试剂量少，操作方便，适合于大规模应用。国产聚苯乙烯微量反应板（上海塑料三厂出品）目前已大量应用于 ELISA 测定，并且获得了满意的结果。但每批微量反应板对抗原或抗体蛋白质的吸附性能是有显著差别的。实验证明，吸附效果似乎与塑料的类型及其表面性质有关。特别是塑料制品在加工过程中因工艺不同或受其他因素的影响而造成吸附性能的极大差异，甚至完全丧失吸附能力。因此，对每批制品在使用前，必须经过实验室鉴定，鉴定的方法和标准是对每批购置的微量反应板或塑料管抽样，用 0.2ug/ml 纯化的正常人 IgG 进行包被，经洗涤后加酶标记抗人球蛋白进行反应，再经孵育洗涤，加底物显色终止反应后，逐孔在酶标比色计中测定其消光值、光密度（O.D 值）。一般认为全板中每两孔间 O.D 值的误差不超过 10%为合格。如果中间孔与四周孔 O.D 值相差太大，或者反应板的这一边与另一边凹孔的 O.D 值相差大，均不合格。此外，还要检查阳性和阴性参考血清 O.D 值是否有明显差别。一般要求有 10 倍左右的差异为合格，微量反应板或塑料管在使用前并不一定通过特殊处理。用蒸馏水冲洗即可应用。

(二) 抗原：在 ELISA 中，包被于固相载体表面的抗原或抗体的来源和制备方法对试验结果都有影响。包被所用的抗原必须是可溶性的，而且要求是优质和稳定的制剂，纯度和免疫原性要高。如果不纯，由于抗原中所含杂质就会竞争固相载体上的有限位置，降低敏感性和特异性。此外还应考虑到制备包被抗原不应破坏其免疫学活性。经试验证明，适用于其他血清学试验的抗原并非均适合用于 ELISA 法。因此，对某一疾病的诊断，必须通过实践，才能选出适用的优质抗原。对大多数传染病和寄生虫病的血清学诊断中所用的抗原并非要求十分严格，一般能用于补体结合试验的可溶性抗原均可用于 ELISA，例如超声波抗原、冻融抗原、细菌的外膜抗原、脂多糖 (LPS)、细菌的外毒素以及用表面活性剂 (如 SDS) 所提取的抗原等，在作 ELISA 时，必须要有 1-2 种试剂、要求纯化，但用表面活性剂提取的抗原在包被前必须透析除去表面活性剂，否则就不易吸附到固相载体上去。此外，对某些抗原必须进行提纯，如病毒的组织培养和鸡胚培养物以及病毒接种动物的脏器等，它们当中存在着许多非抗原的蛋白质，必须设法除去，常用梯度超速离心或亲和层析法提纯，不经提纯是不能使用的。在用特异性抗体包被固相载体时也要提纯。用抗原或抗体蛋白包被固相载体时选择的浓度要适当。如浓度太高，则低效价抗体可能测不出来，或包被过量形成多层抗原吸附，故在操作过程中可能脱落从而降低敏感性和可重复性。用最适稀释度抗原，包被固相载体不仅经济，而且可以克服前带现象。那么用多大浓度抗原进行包被最为合适呢？可通过棋盘滴定法进行测定，但用单项滴定法更为简便，其方法是将抗原进行一系列稀释包被微量反应板，再用一定稀释度的阳性参考血清和阴性参考血清进行孵育后洗涤，再加酶结合物进行反应，经孵育洗涤后，加底物溶液显色，终止反应后分别测定 O.D 值，选择 O.D 值  $\geq 1.0$  的那个抗原稀释度为最适包被浓度。一般总是要选择那个 O.D 值稍大于 1.0，而不选择小于 1.0 的抗原浓度。阴性参考血清 O.D 值要求  $< 0.1-0.2$ 。也就是要求阳性参考血清和阴性参考血清的 O.D 值有明显差别。抗原包被固相载体除浓度外，对时间、温度、PH 均有关系。温度高 (如 37℃、45℃、或 56℃)，包被时间可缩短，温度低可延长包被时间。但为了方便起见，通常采用 4℃ 包被过夜，可使抗原吸附得更加完全且均匀。在用聚苯乙烯或聚乙烯微量反应板或塑料管作固相载体时，在碱性条件下 (如 0.1mol/L、PH9.6 碳酸盐缓冲液稀释抗原) 4℃ 包被过夜较为合适。但在某些试验中，如用 LPS 或毒素蛋白包被时，用 PH 7.2-7.4 PBS 稀释才是满意的。包被特异蛋白质的浓度为 1-10ug/ml，而对某些病原微生物抗原以 5-20ug/ml 较为合适，但均应通过滴定。

(三) 试验样品：血清、血浆或其他体液，均可作为 ELISA 的试验样品 (标本)。但应注意分离血清时，血液要求放置室温中凝固收缩，不宜置冰箱 (4℃) 中凝固，否则会使大部分 IgM 和少量 IgG 丧失活性。关于人血清在保存过程中抗体的稳定性报导尚不多。但一般认为作 ELISA 血清最好要新鲜，若要贮藏，必须少量分装保存于低温冰箱，并防止反复冻融。血浆可用肝素毛细管法采血，而血清可用滤纸片法采血。

被检血清或血浆标本，可用含保护性封阻剂（吐温-20）或称湿润剂的缓冲液来稀释。也可加入一些蛋白质，如 1%牛血清白蛋白等来稀释。然后再加到已经用抗原或抗体包被的固相载体中进行孵育。此种被试标本可作一系列稀释度测定，也可用一个稀释度测定。对于作某一个传染病的诊断来说，最好先用一系列稀释度作一批标本测定，求出对诊断有意义的一个稀释度（即测定剂量反应曲线），然后用一个稀释测定即可。最适稀释度和孵育时间均需从实践中摸索出来，对一般病原微生物所引起的传染病的血清学诊断，以 1:200 稀释度测定比较适当，而试验标本的（即含抗体）作用时间一般为室温或 37℃ 1-2 小时。但现在对有些标本（如流脑抗原）测定时，仅用 37℃ 5 分钟。对单克隆抗体检测也可缩短作用时间。

（四）结合物：在 ELISA 中，用酶标记的抗体或抗原统称为结合物，此为进行 ELISA 检测的关键试剂。常规使用 ELISA 法的主要问题是能够简便地制备酶结合物，而此种制备好的酶结合物要求稳定，具有很高的酶活性，抗原或抗体的特异性，产量高及成本低。

用什么样的酶来标记抗原或抗体呢？可根据以下几点来选择适当的酶。

- 1、酶制品的纯度及活力高，催化效力也高，放大倍数大（即一个酶分子能催化几十几百个底物分子发生反应的酶）。
- 2、酶及制备好的酶结合物在检测或贮存中能保持稳定。
- 3、酶制剂易得、价廉。
- 4、既要适用于标记抗原，又适用于标记抗体，标记后不影响抗原或抗体的免疫学特性，也不降低酶的活性。
- 5、酶的反应产物稳定，检测时简便、快速。在定量测定中产物必须是可溶性的。
- 6、要有安全、价廉、易得的底物。

符合上述条件的酶有：碱性磷酸酶，一般用分子量为  $5 \times 10^5$  (Alkaline Phosphatase, 简称 AP), 辣根过氧化物酶 (Horse Radish Peroxidase, 简称 HRP, 分子量为  $4 \times 10^4$ ), 另外尚有葡萄糖氧化酶,  $\beta$ -半乳糖苷酶, 糖化酶及乙酰胆碱酯酶等等。其中以前两种 (AP 和 HRP) 最为常用。

AP 活力高，制备好的酶结合物可加  $\text{NaN}_3$  防腐，但此种酶不易获得，因其是从小牛肠粘膜中或大肠杆菌中提取，而且价格比较昂贵。因此，目前国内外大多使用 HRP。HRP 活性也高，价格较便宜。但制得酶结合物不能加  $\text{NaN}_3$  防腐。因  $\text{NaN}_3$  能抑制 HRP 的活性，但可作低温保存或加 60% 缓冲甘油等量混合后少量分装，保存冰箱，一般可用 1-2 年。

由于 HRP 最为常用，故先把 HRP 的一般性质介绍一下，以便在制备酶结合物时可引起注意。

(HRP 的性质): HRP 系从辣根菜的根中所提取，这种酶是无色酶蛋白与暗棕色的铁卟

啉 (E 铁血素) 相结合的一种卟蛋白，可简写成  $\text{Fe-E} \begin{array}{l} \text{NH}_2 \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$ ，由多个 (6-7 个) 同功

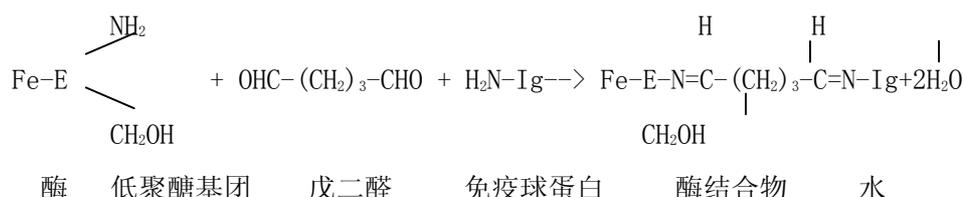
酶所组成。分子量约为 40000，等电点为 PH7.2。能被 58-62%饱和硫酸铵沉淀，在 PH3.5-12 均较稳定。63℃15 分钟，室温数周、甲苯和其他苯类有机溶剂处理都不影响它的活性。

由于 HRP 中的酶蛋白和铁卟啉分别在波长 280nm 和 403nm 有二个最大吸收峰，其两者的比值，即  $O.D_{403nm}/O.D_{280nm}$  称为 RZ 值（系由德文 Reinnoit-Zah）而来，表示酶的纯度。高纯度酶制品 RZ 值可达 3.4。而 RZ 值 0.6 的酶其中非酶蛋白含量高达 75%。不适合作 ELISA 用，经纯化后才能应用。目前我国产的 HRP RZ 值达 2.5-3.0，亦可作 ELISA 用。

抗体：制备酶结合物的抗体最好要提纯。被标记的抗体要求效价及亲和力都要高，因为纯化抗体可增加反应的特异性。如果采用级特异性的酶结合物（例如酶标抗 IgM、酶标抗 IgG）。有助于区别活动性感染（早期诊断）和已过性感染（追溯诊断）。但在大多数情况下，用抗血清中的全球蛋白成份与酶结合所制成的结合物亦可应用，而且相当稳定。其方法是用硫酸铵沉淀抗血清三次（50%饱和的 1 次，33%饱和的 2 次），经透析除盐，即可用于标记。或者经 DEAE-纤维素柱层析后所制成的 IgG 亦可标记。如将 IgG 再通过葡聚糖凝胶 G-200 胶滤（用 PH7.2 PBS 洗脱）所得纯化 IgG 用 HRP 标记则更佳。但损失较大，也有人用亲和层析法提纯抗体来标记的。但在用酶来标记抗体前，需测定一下抗体球蛋白效价和蛋白含量。一般用 Beutner 氏琼脂糖散法测效价（即玻片双相琼脂扩散法），中央孔加 1mg/ml 抗原，周围孔加不同稀释度粗制或提纯抗体（马或羊抗人 IgG），室温扩散 24 小时，沉淀反应效价达到 1:16 以上者即可应用。而蛋白质含量可用 751 紫外线分光光度计测定，也可用 Folin 酚法测定。

结合：用什么样的方法将 HRP 与抗体球蛋白结合起来呢？当然不能用强烈的方法，因为强烈的方法会使酶和抗体失去活性。故只能用温和的方法把酶和抗体结合起来。因此，必须使用结合剂。理想的结合剂应具备下列条件：（1）不影响酶及抗体活性，（2）不产生干扰物质，（3）抗体和酶结合后应有较高的产量，（4）不出现非特异性反应，（5）结合程序简便，（6）来源易、价廉。目前常用的有戊二醛和过碘酸钠二种。由于对所使用结合剂的针对性，因此标记的方法也有戊二醛交联法和过碘酸钠氧化法两类。

1、戊二醛交联法：戊二醛是一种能使蛋白质与蛋白质联结最常用的双功能试剂。它有 2 个对称的活性醛基，可分别与酶蛋白和免疫球蛋白上的游离氨基（酚基、咪唑基、巯基）以共价键边接起来而形成的酶结合物。例如酶（Fe-E-NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH,）通过戊二醛与免疫球蛋白（Ig-NH<sub>2</sub>）的交联反应式如下：

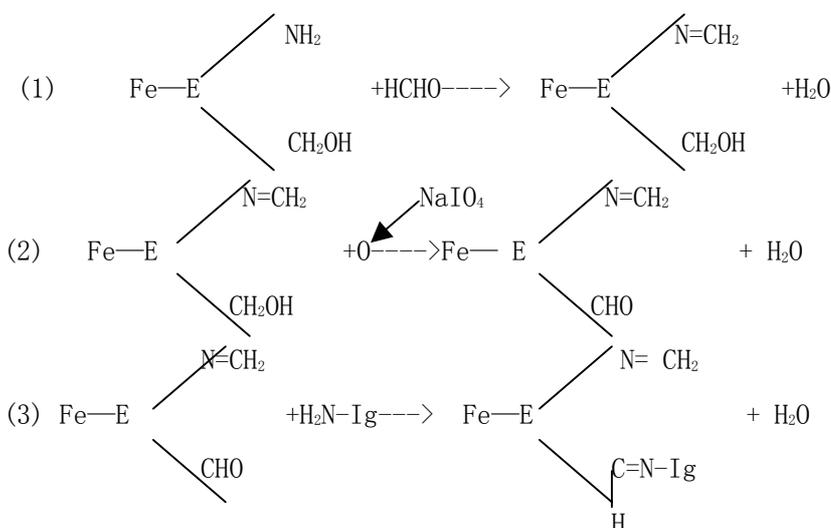


用戊二醛标记又可分为一步法和二步法。一步法主要是将酶、抗体球蛋白和戊二醛同时混合

而直接制备。此法虽然简单，但因酶蛋白的活性氨基少，免疫球蛋白的活性氨基多，在戊二醛作用下，容易形成免疫球蛋白的聚合物，当然也可形成酶蛋白的聚合物。因而，形成酶标记抗体的比例较少，同时抗体和酶的活性丧失较多，结合物的酶活性较低，但较简便。戊二醛二步法中先用过量的戊二醛与酶作用，使戊二醛上的一个活性醛基先与酶蛋白上的一个氨基结合后，除去过量戊二醛（可通过葡聚糖凝胶 G-25 过柱或用透析法除去），然后，再加入抗体球蛋白，使之与酶—戊二醛复合物反应，形成酶结合物。而酶结合物的多余醛基可用加入小分子的氨基酸如赖氨酸除去，于稳定酶结合物的特异性。在戊二醛二步法中，酶本身并不产生缩合，因为在第二步酶分子上的一个游离氨基仅与戊二醛上的一个活性醛基联结，而戊二醛上另一个活性醛基则可与第二步加入的抗体球蛋白分子上的氨基结合生成酶结合物，因此，两步法优点是能生成均一的酶结合物，大多可使一个分子酶与一个分子球蛋白作用，抗体和酶的活性损失较少，所得酶结合物活性比一步法高 10 倍左右。

其方法是将 10mg HRP 溶于 0.2ml 含 1.25%戊二醛的 PH 6.8 0.1mol/L PBS 中，置室温 18 小时，充分透析或经葡聚糖凝胶 G-25 层析除去多余戊二醛，加生理盐水至 1ml，然后加入 5mg 纯化的抗体球蛋白及 0.1ml PH 9.6 的 1 mol/L 碳酸盐缓冲液，混合后于 4℃冰箱放置 24 小时，加入 0.1ml 0.2 mol/L 的赖氨酸溶液，室温置 2 小时，用 PH 7.2、0.15 mol/L PBS 充分透析，藉离心除去沉淀，上清即为酶结合物。必要时可作进一步纯化后使用。

2、过碘酸钠氧化法：本法是目前酶标记抗体较好的方法，能使 70%酶与 90%以上球蛋白结合。采用本法首先是用氟代二硝基苯（Fluoro dinitro benzene 2.4—硝基苯，FDNB）封闭 HRP 表面的游离氨基（亦可用甲醛或戊二醛来封闭），从而提高酶结合抗体球蛋白的能力，避免酶的自身交联。然后用过碘酸钠来氧化 HRP 表面结构的糖链部份（即低聚糖基团）使成醛基，使其直接与抗体球蛋白上的游离氨基形成共价键而结合。最后用硼氢酸钠还原，使 HRP 表面醛基能充分与抗体球蛋白上氨基进行反应，使之形成稳定的结合物。其反应式如下：



其标记步骤是：10mg HRP 溶于新鲜配制的 0.3 mol/L PH 8.1 碳酸氢钠 2ml 中，加 0.2ml 1% 氟代二硝基苯无水乙醇溶液，室温中搅拌 1 小时以封闭 HRP 表面的游离氨基。再加 2ml 0.08 mol/L NaIO<sub>4</sub> 水溶液，于室温中轻搅 30 分钟，用 0.16 mol/L 乙二醇溶液终止氧化反应。1 小时后移入透析袋中置 0.01 mol/L PH 9.5 的碳酸盐缓冲液中透析过夜，除去试剂，透析袋中的即为醛化酶。

取 6ml 醛化酶加 20mg 抗体球蛋白（用 2ml 碳酸盐缓冲液溶解），混匀，室温搅拌 2-3 小时后加 10mg 硼氢酸钠盐，4℃ 冰箱 4 小时或过夜。次日取出加等量饱和硫酸铵沉淀酶结合物（去游离酶），并用 50% 饱和硫酸铵洗涤 1-2 次。再溶于 3ml PH 7.4 PBS 中，并置透析袋经透析除盐，如有沉淀藉离心除去。上清酶结合物加入等量 60% 甘油 PBS，分装保存，冰箱备用。

如采用改良过碘酸钠简化法制备酶结合物，比原法更简便、快速，所获制品质量良好。其方法是取 10mg HRP 加 1ml 0.1 mol/L 醋酸钠或水溶解，充分混匀，约 5 分钟后加 0.08 mol/L NaIO<sub>4</sub> 水溶液 1.0ml 混合后，置冰箱内 20 分钟，加 0.4 mol/L 乙二醇溶液 0.5ml 终止氧化反应，30 分钟后加 21% NaCl 溶液 0.3ml，再加 1.2ml 冰冷的无水乙醇（AR）沉淀醛化酶，离心去上清，沉淀酶再用 6ml 80% 冰冷的乙醇溶液浸泡洗涤一次后，离心倾去乙醇（尽量去除乙醇），沉淀用 PH 9.6 的 0.05 mol/L 碳酸钠缓冲液 2ml 溶解，然后加入 2ml 羊或马抗人 IgG（内含蛋白量 20mg 左右），搅拌均匀，置冰箱内过夜，次日取出加 10mg NaBH<sub>4</sub> 混匀，3 小时后加等量饱和硫酸铵沉淀酶结合物，离心，去上清，沉淀用 50% 饱和硫酸铵洗涤一次，离心，再去上清，沉淀用 0.01 mol/L PBS 3ml 溶解，置透析袋中用冰冷的生理盐水透析除盐（需换液 5 次），如有沉淀藉离心除去，上清呈淡棕色即为酶结合物。加 60% 甘油 PBS，分装保存备用。

制备好的酶结合物，要作两者克分子比和使用稀释度的测定，标记率的测定 ( $A_{403}/A_{280}—0.4—1.0$  为宜)。

1、酶结合物克分子比测定：将制备好的酶结合物经适当稀释在分光光度计中以 280nm 和 403nm 测 O.D 值，然后按下列公式计算两者的克分子比。

(1) 酶戊二醛交联法的计算：

酶量：mg/ml =  $0. D_{403nm} \times 0.4$ ，其中 0.4 为酶  $0. D_{403nm} = 1.0$  时相当于 0.4mg 酶。

球蛋白量：mg/ml =  $(0. D_{280nm} - 0. D_{403nm} \times 0.42) \times 0.94 \times 0.62$

其中  $0. D_{403nm} \times 0.42$  为酶蛋白结合戊二醛后在 280nm 应有的 O.D，抗体球蛋白 0.62 为蛋白质与酶—戊二醛结合后  $0. D_{280nm}$  值约应以加 6%，故以 0.94 校正之。换算系数，故最后要乘于 0.62。

(2) 用过碘酸钠氧化法的计算：

酶量：mg/ml 同上：

球蛋白量：mg/ml =  $(0. D_{280nm} - 0. D_{403nm} \times 0.3) \times 0.62$

其中  $0. D_{403nm} \times 0.3$  为酶蛋白本身在 280nm 应有的 O.D 值。

已知酶量和球蛋白量，即可求出酶结合物的克分子比。

$$\text{克分子比} = \frac{\text{mg/ml (酶)}}{40000} \div \frac{\text{mg/ml(球蛋白)}}{160000} = \frac{\text{mg (酶)} \times 4}{\text{mg (球蛋白)}}$$

一般要求制备好的酶结合物二者克分子比在 0.8-1.2，但不能超过 2 或稍高。

2、酶结合物使用稀释度测定：先将一定浓度的抗原（如为抗人酶结合物，则用 1 μg/ml 正常人 IgG）包被固相载体，洗涤后加一系列不同稀释度之酶结合物进行孵育，洗涤加底物显色，并终止反应。在酶标比色计中测定不同稀释度酶结合物的 O.D 值，选择 O.D 值 ≥ 1.0 的那个酶结合物稀释度即为本批酶结合物的使用浓度，见表中约 1: 12000 稀释。

酶结合物稀释度	1: 3000	1: 6000	1: 9000	1: 12000	1: 15000	1: 18000
O.D 值	2.45	1.96	1.59	1.12	0.74	0.405

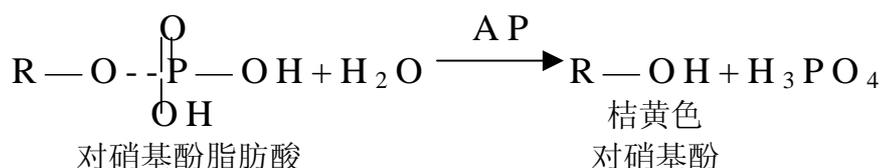
（五）洗涤剂与稀释剂：为了使特异性结合的抗体量尽可能多，包被微量反应板凹孔的抗原应该稍微过量。但在孵育或洗涤过程中，已吸附的抗原可能有部份会从固相载体上被洗涤下来。从而使加入被检血清中的特异性抗体以外的蛋白质很可能会吸附到原来包被抗原凹孔的空白处，增加本底颜色，产生假阳性反应，这是限制 ELISA 特异性的一个因素。因此不少学者在稀释剂及洗涤剂中加入各种保护性阻剂来抑制非特异性蛋白的竞争性吸附作用。已经证明牛血清白蛋白（BSA）和吐温-20 有良好的封阻作用。其加入的量 BSA 为 0.5%~1%；吐温-20 为 0.05%。（有人曾经比较了四种洗涤剂，结果认为蒸馏水加 0.05%吐温-20 或 0.02 mol/L PBS (PH7.4) 加 0.05%吐温-20 都是良好的）。在一般的洗涤剂和稀释剂中还加有 NaN<sub>3</sub>防腐，但是用 HRP 制备酶结合物时则不能加 NaN<sub>3</sub>，因 NaN<sub>3</sub>能抑制 HRP 的活性，需要注意 BSA 加入洗涤剂或稀释剂中虽可改善 ELISA 的结果观察，但由于 BSA 比较昂贵，又不易得到，故也不是非加不可的。有人在洗涤剂中加入 0.1%白明胶，2%兔血清，有利于加强封阻作用。最近有人报告用 PH7.4 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液中加入 0.05%吐温-20 作洗涤剂，效果很好，被检血清和酶结合物的稀释剂，可与洗涤剂相同，但不需加 0.2%的 KCl。

在稀释剂和洗涤剂中所加的吐温-20 很重要。它不仅能消除非特异性的本底反应，而且还可增加阳性标本的敏感度，这可能与吐温-20 能分离所吸附的非特异性物质有关。目前采用的洗涤剂为 PH7.4 PBS（含 0.2%KCL）加 0.05%吐温-20，如无吐温-20，也可用吐温-40 或吐温-60 代替。但吐温-80 本底较高，不宜应用。（0.5 mol/L NaCl）和 2%兔血清加入稀释剂中，可提高特异性。

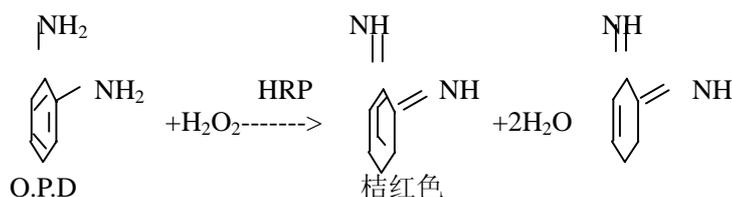
（六）底物：各种酶都有对底物的特异性，所以使用不同种类的酶要求有不同的底物。一旦酶结合物已经确定（如 AP 或 HRP），那么可供选择底物的范围是很有限的。在这有限底物的范围内如何选择合适的底物呢？应按下列几个条件进行选择。（1）底物在未被酶催化以前应该是无色

的，而经酶催化后有明显的颜色变化，这样可使结果分辨清楚；(2) 所显色泽易干洗脱；(3) 显色后的产物要求稳定，在作定量测定时所产生的有色物质应该是可溶性的；(4) 价廉，易得而且无毒。

因此，对 AP 酶结合物来讲，一般均用硝基苯磷酸盐，显色后呈桔黄色，色泽稳定，用 2 mol/L NaOH 终止反应，可用波长 403nm 测定 O.D 值。AP 催化底物产生颜色的反应如下：



对 HRP 酶结合物来说，主要通过酶的催化作用使过氧化氢还原。同时使另一个底物氧化产生色变，可供选择的底物有几种，过去都用 5-氨基水杨酸，它经酶催化后产生棕色产物便于观察，缺点是容易产生沉淀，用于定量测定时有困难。目前大多数使用邻苯二胺 (Ortho-Phenylene-diamine, 简称 OPD)，稳定、敏感，其降解产物呈桔红色，可溶。用 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 或柠檬酸终止反应，可在 492nm 波长的酶标比色计上测定 O.D 值，也可目测。HRP 在催化反应中可使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解出新生氧，本身还原成水，而使 OPD 氧化生成有色产物，反应式如下：



O、P、D 对光不稳定，故加后需放暗处作用。但据报告有致突变性，

O.P.D 对光不稳定，故加后需放暗处作用，但据报告有致突变性，使时需注意。此外尚可选用邻联甲苯胺 (Ortho-Toluidine, 简称 OT)，显色以后呈兰色，可用波长 630nm 测 O.D 值，不需终止反应。也可用目测，但显色后不稳定，40 分钟色泽会自行减退，故需及时测定结果。加终止

剂后呈现黄色，则需用波长 405nm 测定 O.D 值。

底物配制方法如下：

1、用 O.P.D 作底物：先配制 PH5.0 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液。取 0.1 mol/L (19.2 克/升)，柠檬酸溶液 24.3ml，加 0.2 mol/L (27.4 克/升) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液 25.7ml，再加蒸馏水 50ml，然后将 40mg O.P.D 溶解其中，再加 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.10ml 即可应用，用时新鲜配制、避光。

2、用 OT 作底物，先配 PH3.7 的醋酸盐缓冲液，取 0.2M 醋酸 (12ml/升) 和醋酸钠 (16.4 克/升) 溶液等量混和，然后称取 OT 21.2mg 先溶于 1ml 二甲基乙酰胺中，再将 OT 溶液倾入 100ml PH3.7 的醋酸盐缓冲液中，并加入 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.05ml 即得，用前新鲜配制。

(七) 作用时间：加底物后要多长时间终止反应测定结果呢？一般可采取二种方法。

1) 任意确定一个时间，如 20 分钟或 30 分钟终止反应，测定被检标本和阳性参考标本的 O.D 值。这样所得的数据要进行校正，校正可按下列公式：

$$\text{校正后 O.D 绝对值} = \text{被检标本的 O.D 值} \times \frac{1.0}{\text{阳性标本的 O.D 值}}$$

2) 制备好一批酶结合物后预试时间，在反应温度固定时，当阳性参考血清 O.D 值达到 1.0 时终止反应，记录这个时间，如 30 分钟，以后用本批酶结合物测定待检样品时都采用同一时间终止反应，这个办法不需要校正，比较方便。

国外在使用自动测定仪时，加底物后随时测定，每块试验板上阳性参考血清的 O.D 值，当其达到 1.0 时，立即将全板上被试标本终止反应进行测定，这样所得结果比较一致。我国也有自动酶标测定仪，但由于固相载体不够均匀，也很难用板来直接测定。

在 ELISA 中所加酶结合物之浓度，加后孵育时间以及加底物后孵育时间。这三个因素也是互相有影响的。一般讲，酶结合物浓度低，则要求孵育时间长些，而酶结合物浓度高则要求孵育时间短些，可根据实验的具体情况，变更不同因素，以取得良好的结果。

由于 ELISA 中变异因素多，对于要诊断某一疾病时，必须进行一系列实验室预试，摸索，或叫实验研究，在酶结合物已经确定的情况下，一般要求预测以下 5 个条件：

- (1) 抗原包被浓度；
- (2) 被检血清稀释度，即测剂量反应曲线；
- (3) 第一抗体作用时间；
- (4) 酶结合物作用时间；
- (5) 底物作用时间。

一旦试验条件摸清，以后在正式测定时，必须固定条件，不要随时改变，以使试验系统保持

足够的稳定性。

(八) 结果判断:ELISA 的试验结果可用肉眼观察颜色反应的深浅作出判断,也可用分光光度计作精确测定。当然,后者更为正确。而肉眼观察更为简便,而且也有一定正确性。据 Adler(1980)报告,目测为 $\pm 1^+$ 、 $2^+$ 、 $3^+$ 、 $4^+$ 相当于分光光度计测定 O.D 值。

不论用哪种方法判定结果,每次都要有阳性和阴性参考血清作对照,这样可以消除一些外界的影响因素。

$\leq 0.04$ “ $\pm$ ”	$0.06 \sim 0.092$ 和 $0.08 \sim 0.25$ “+”
$0.26 \sim 0.5$ “++”	$0.51 \sim 1.0$ “+++” $> 1.0$ “++++”

(九) 试验的重复性(精确度),有二种方法来检验试验的精确度:通常用变异系数来表示:  
1、几个样品用 ELISA 法同时进行多次测定求出 CV%;  
2、不同时间对不同操作者对某几个样进行多次测定求出变异系数。CV 是个体参数标准差与平均数的比率。

$S / \bar{X} = CV$ , CV 应低 10%, 不应大于 10~15%。

不论目测或分光光度计测定,均可作一个稀释度或一系列稀释度测定,一般常规诊断只用一个稀释度判断阳性或阴性就可以了,这样比较方便,现在推荐传染病的血清诊断用 1:200 一个稀释度。有些需要精确定量的,可作一系列稀释度测定。

记录结果有下列几种方法:

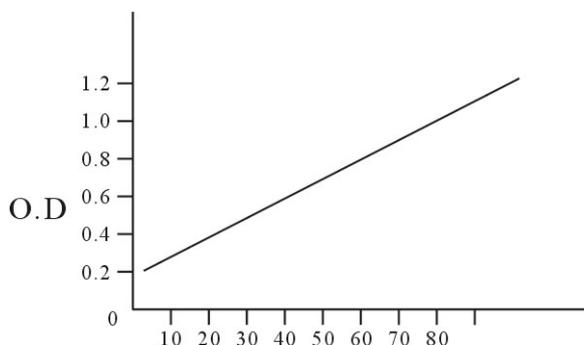
1、“+”或“-”:所有超过规定的 O.D 值(如 0.D, 0.4)的标本均属阳性,此规定 O.D 值是根据事先测定大量阴性标本所取得的,此规定值是阴性标本的上限。或者以一组阴性标本 O.D 平均值加 2~3 个标准差作为阳性阈值。

2、直接以 O.D 值来表示,如 0.4、0.7、1.2, O.D 值越大,阳性反应越强,但此数值是在固定实验条件下得到的结果,而且每次实验都要有参考标本作对照。

3、以终点滴度表示:将标本作连续稀释,最高稀释度能出现阳性反应者(即 OD 值仍大于阳性阈值,即为该标本的滴度。

4、以“比值”表示:求出被检标本的 O.D 值与一组阴性标本 O.D 值的比值,例如为阴性标本的 2 倍或 3 倍,即为阳性,比值小于 2.1 而大于 1.5 为可疑, <1.5 为阴性。

测定标本 O.D 值-空白 O.D 值  
—————  $\geq 2.1$   
阴性对照 O.D 值-空白 O.D 值  
如在此测定时以空白校正“0”点。



5、以“单位”来表示：在测定被检标本的同时，再测定一个含已知单位数的阳性参考血清，用不同稀释度作 ELISA 检测后，以 O.D 值为纵坐标，单位数为横坐标，画出标准曲线。以

后可根据被检标本的 O.D 值，从曲线上找出相应的单位数，再乘于血清的稀释倍数，即可得出被检标本的单位数。

作试验时的阴性参考血清最好不要显色，否则会对结果判断带来困难，特别在目测时，当阳性标本 O.D 值>2.0 时，应作适当稀释后再作测定。

(十) 对使用仪器要求：所用仪器如吸管、烧杯试管都要清洁，用于酶结合和底物的吸管和容器一定要分开。试剂要求标准化。

#### 四、具体操作法

上面已经把 ELISA 中各步骤的影响因素作了说明，为了便于工作下面把 ELISA 的操作程序列于表 1 供参考：

表 1：ELISA 操作步骤

方 法 步骤	间接法（测抗体）	双抗体夹心法 （测抗原）	竞争法（测抗原）	抑制性测定法
1	包被抗原：用包被缓冲液稀释抗原至最适浓度（5~20 μg/ml）各 0.3ml 加于微反应板每个凹孔中，4℃过夜或 37℃水浴 2~3 小时，贮存冰箱	包被抗体：用包被缓冲液稀释特异性抗体球蛋白至最适浓度（1~10 μg/ml），每凹孔加 0.3ml，4℃过夜，或 37℃水浴 3 小时，贮存冰箱	包被特异性抗体：  同左	包被抗原：  同左
2	洗涤：移去包被液，凹孔用洗涤缓冲液（含 0.05%吐温-20）洗 3 次，每次 5 分钟	同左	同左	同左

3	加被检标本：每凹孔加入用含有0.05%吐温-20的稀释缓冲液稀释的被检血清各0.2ml，37℃，作用1~2小时	每凹孔加入0.2ml用稀释缓冲液稀释的含抗原的被检标本，37℃作用1~2小时。	分2组，a组加酶标记抗原和被检抗原混合液0.2ml，另一组只加酶标记抗原液0.2ml，37℃作用1~2小时。（混合液可作成不同稀释度）。	a组加参考抗体和被检抗原混合液0.2ml，另一组加参考抗体与等量稀释剂0.2ml，37℃作用1~2小时。
4	洗涤：重复2	同左	洗涤：同左	洗涤
5	加入酶结合物：每凹孔加入稀释缓冲液稀释的酶结合物0.2ml 37℃作用1~2小时	加入0.2ml用稀释缓冲液稀释的酶标记特异性抗体溶液，37℃作用1~2小时或由预试实验确定作用时间。	/	各加入0.2ml抗参考抗体的酶结合物 37℃作用1~2小时
方法步骤	间接法（测抗体）	双抗体夹心法（测抗原）	竞争法（测抗原）	抑制性测定法
6	洗涤：重复2	同左	/	洗涤
7	加入0.2ml底物溶液于每个凹孔，(O.P.D或O.T)，室温作用30分钟（另作一空白对照，0.4ml底物加0.1ml终止剂）。	同左	同左	同左

8	加终止剂：每凹孔加 2M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 或 2M 柠檬酸 0.05ml。	同左	同左	同左
9	观察记录结果：目测或用酶标比色计测定 (O.P.D 用 492nm) O.D 值。	同左	用酶标比色计测定 a、b 两组 O.D 值，并求出 a、b、O.D 值的差数	同左

## 五、ELISA 的应用

ELISA 应用的范围很广，而且正在不断地扩大，原则上 ELISA 可用于检测一切抗原、抗体及半抗原，可以直接定量测定体液中的可溶性抗原。酶免疫试验 (EIA) 结合光学显微镜或电子显微镜可进行抗原定位与结构的研究，用酶标记抗原或抗体结合免疫扩散及免疫电泳可提高试验的敏感性。在实际应用方面可作疾病的临床诊断、疾病监察、疾病普查、法医检查、兽医及农业上的植物病害的诊断检定等。因此，它和生物化学、免疫学、微生物学、药理学、流行病学及传染病学等方面密切相关。

检查抗原和半抗原方面：在内分泌方面已经用于检测雌性激素、绒毛膜促性腺激素、黄体素、胰岛素、皮质醇、促甲状腺素和孕酮等，其敏感性与 RIA 相当，在血液学方面可用于检查凝固因子 (如第 VIII 凝固因子)、红细胞抗原及结合球蛋白 (Hapto Globin) 等，在肿瘤方面已试用检查甲胎蛋白 (AFP) 癌胚抗原 (CEA)，对前者的敏感性已达到与放射免疫试验相当的水平，但对 CEA 检查的敏感性较低，目前尚不能用于常规诊断，在传染病的诊断方面正在日益扩大，其中最满意的是用于检查乙型肝炎表面抗原。国内外已有 ELISA 检测的商品供应。尚有用于检查霍乱弧菌、大肠杆菌、绿脓杆菌和破伤风梭菌毒素；脑膜炎球菌及淋球菌抗原；检查免疫抑制病人中常见的白色念珠菌抗原，检查病人或病兽的粪便中的轮状病毒，自病人标本中检查甲肝病毒、疱疹病毒、麻疹病毒、流感、呼吸道融合及巨细胞病毒等。还可用于植物组织浆液中检查植物病毒。此外尚试用于测钩体抗原及血吸虫病的循环抗原等。在免疫化学方面可用于检测白蛋白，免疫球蛋白的各种组份，也可用于检测补体成份，如：C<sub>1q</sub>，还能用于检测蛇毒。

检查抗体方面：用 ELISA 间接法检查抗体，已获得对多种传染病和寄生虫病的血清学诊断，亦开始广泛用于现场流行病学调查。在寄生虫病方面，它用于对疟原虫、阿米巴、利日曼原虫、锥虫、血吸虫、囊虫、弓浆虫、肺吸虫、肝吸虫、血丝虫、旋毛虫病等血清学诊断，这对人医和兽医都很重要。在病原微生物方面已用于检查链球菌、沙门氏菌、布氏杆菌、结核杆菌、麻疯杆菌、霍乱弧菌、淋球菌、假丝酵母菌等的抗体，还可用于破伤风抗毒素和霍乱弧菌抗毒素的测定以及检测斑疹伤寒立克次氏体感染后的抗体，可作诊断。对立克次氏体还可用以鉴别密切有关的

种属。也有用于检查鹦鹉热衣原体抗体的报导。试用于病毒抗体检查报告的有：流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹、风疹、轮状病毒、疱疹病毒、巨细胞病毒、EB 病毒、腺病毒、肠道病毒、脑炎病毒、黄热病毒、狂犬病毒和脊髓灰质炎病毒等，其敏感性都超过目前常用的检查方法。此外，还可用于鉴定病毒型别，例如疱疹病毒。如能进一步改进方法用于检查特异性 IgM，可以作为早期诊断以及了解体内有关抗原的清除情况。在免疫性疾病方面有试用作自身疫病抗体测定以及对过敏的诊断，例如检测各种过敏原的抗体、DNA 抗体及甲状腺球蛋白抗体，红斑性痕疮抗体等等。在卫生学方面，可用于检测食品中葡萄球菌肠毒素及沙门氏菌毒素等等。

## 六、ELISA 存在的问题

从以上的简单介绍中可以看出，ELISA 法由于本身所具备的优越性，是一项很有发展前途的血清学诊断方法，而且应用的领域也越来越广泛。但是我们认为 ELISA 不是万应良方，用它来代替一切，这是不当的。因为 ELISA 法还有局限性：

- 1、由于 ELISA 所用的抗原大部分还是混合的可溶性抗原，所以对同一微生物寄生虫或其他物质不同部位的抗原还没有分开。
- 2、内源性过氧化酶的普遍存在，如人脑组织中，呼吸道分泌物的炎症细胞中及某些病毒的组织培养中均有内源性过氧化物酶的活力，常不易除去，如果用某些方法除去时，则病毒的抗原性亦受到破坏，对于用 ELISA 检测不利。
- 3、对 ELISA 法的非特异性评价的资料尚不够完善，因此，对出现一些非特异性反应的时候，往往不易解释。
- 4、固相载体的质量常不统一，主要是原料及制备工艺还不一致，致使不同批号的固相载体有时本底值较高，有时吸附性能很差，影响试验结果。
- 5、试剂不统一，现在处于“八仙过海，各显神通”，标准还不能统一。

下面将 ELISA 法与免疫荧光（IFA）和放射免疫（RIA）的各自优缺点作一简要的比较（表 4），供参考：

表 4: 三种方法的优缺点比较：

方法种类 比较指标	ELISA	RIA	IFA
敏感性	高	高	较低
特异性	取决于抗原制备	同左	较高
重演性	尚满意	尚满意	尚满意
结果判断	客观	客观	有主观因素
抗原制备	较容易或复杂	同左	较容易

结合物制备	正在标准化	已标准化	已标准化
在野外条件下用于大量人群标本的普查	可以	困难	尚可以
分析自动化	可以	可以	困难
主要设备	酶标比色计	粒子计数器	荧光显微镜
试验成本	低	高	较高
试剂半衰期	长	短	长
对人的危害性	无或很少	有	无或很少
主要检测对象	抗体或抗原	抗原	抗原或抗体
应用范围	小的诊断实验室	大的中心实验室	小的诊断实验室

综上所述，ELISA 在国内外已使用得非常广泛，但对该法在应用中的评价尚不一致，过去在 ELISA 法开始建立时有全面肯定的趋势，而在广泛研究和实践中发现了一些缺点，遇到了一些困难，如在重演性问题、特异性问题以及能否考核疗效问题等等。所以在 70 年代末期也有人采取否定的态度，全面肯定或全盘否定，这些都是不正确的，对一种新方法的建立和深入研究，要采取一分为二的方法加以评价，既要看到方法的优点，也要重视存在的问题，便于进一步研究加以克服。世界卫生组织专家组提出对 ELISA 的评价认为：“ELISA 作为免疫诊断应用是一个好办法，但要做好它不容易。”因此，还需进一步研究改进，加以完善。从而使之成为对多种疾病诊断较为理想的方法是完全可能的。



## 上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市宜山路 705 号 B 座 18 楼

邮编：200233

联系：市场部

电话：64858053 800-988-1995

E-mail:master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

