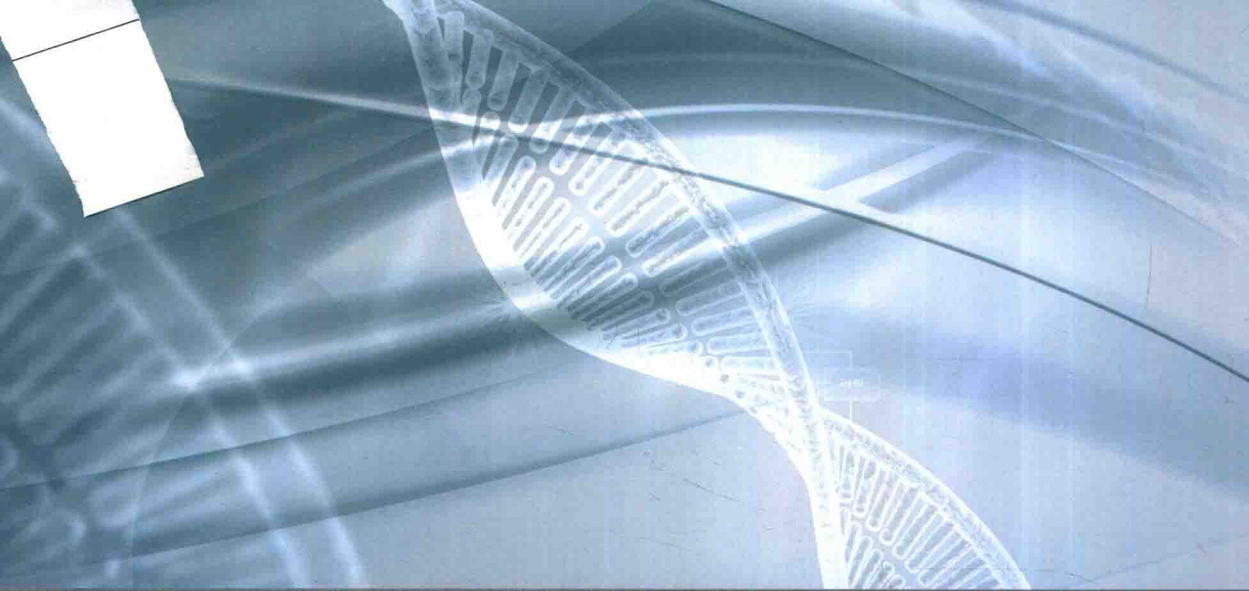




ELISA 检测技术

在检验检疫中的应用与质量控制

● 魏海燕 刘来福 韩玉田 / 主编



中国质检出版社
中国标准出版社

ELISA 检测技术

在检验检疫中的应用与质量控制

魏海燕 刘来福 韩玉田 主编

中国质检出版社
中国标准出版社

北 京

图书在版编目 (CIP) 数据

ELISA 检测技术在检验检疫中的应用与质量控制/魏海燕, 刘来福, 韩玉田主编. —北京: 中国标准出版社, 2015. 11

ISBN 978-7-5066-8100-1

I. ①E… II. ①魏… ②刘… ③韩… III. ①食品卫生—食品检验 IV. ①TS207.7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 253011 号

中国质检出版社
出版发行
中国标准出版社

北京市朝阳区和平里西街甲 2 号 (100029)

北京市西城区三里河北街 16 号 (100045)

网址: www.spc.net.cn

总编室: (010) 68533533 发行中心: (010) 51780238

读者服务部: (010) 68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 787×1092 1/16 印张 14.75 字数 332 千字

2015 年 11 月第一版 2015 年 11 月第一次印刷

*

定价 49.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 68510107

编 委 会



主 编：魏海燕 刘来福 韩玉田

编 者（按姓氏笔画为序）：

王丛丛	马泽芹	付溥博	李东燕
刘建礼	刘 莹	张 伟	张 猛
高宏伟	梁新苗	曾 静	

前言 PREFACE

酶联免疫吸附试验 (enzymes linked immunosorbent assay, ELISA) 灵敏度高、特异性强、重复性好, 且操作简单, 易于实现自动化, 既适于大规模筛查, 又可用于小量样本试验, 既能实现定性检测, 又可用于定量分析, 因而已被广泛用于食品、动植物和临床样本中致病微生物、农兽药残留、肿瘤标志物、细胞因子和激素等项目的检测。然而 ELISA 试验的影响因素众多, 实际工作中易出现样本的采集与保存方式欠佳、检测试剂的质量良莠不齐、仪器设备缺少有效的维护和校准、试验操作不规范、质控品的选择与保存方式不当等情况, 从而在很大程度上影响了检测结果的可靠性。只有通过有效的质量管理, 才能发挥 ELISA 方法学的优点, 确保其检测结果的准确性和可比性。

为此, 北京出入境检验检疫局联合国内全自动酶免设备龙头生产企业“烟台艾德康生物科技有限公司”共同承担了 2013 年国家质检总局科技计划项目“基于 ELISA 检测技术质控体系的建立与应用 (项目编号: 2013IK306)”。课题组通过大量的资料调研、文献检索和具体的试验验证, 综合分析了 ELISA 的技术特点和检测对象的性质, 建立了“ELISA 检测质量控制体系”, 形成了“ELISA 检测标准操作程序”“ELISA 检测试剂盒评价方法”“全自动酶免系统校验规程”以及“ELISA 相关设备使用、校准和期间核查指南”等规程, 建立了“ELISA 检测不确定度分析模型”与“ELISA 检测室内质控模型”, 使 ELISA 检测的质量控制方式更加科学、多样和全面。该项目于 2014 年 12 月通过验收, 专家组一致认为该项目为提升我国 ELISA 检测技术水平进行了有益的探索, 为 ELISA 检测实验室的审核和质量管理提供了科学依据。

在此基础上, 将搜集整理的资料及研究成果汇编成册, 希望可以为提升我国 ELISA 检测实验室的检测能力和管理水平起到抛砖引玉的作用。《ELISA 检测技术在检验检疫中的应用与质量控制》以 ELISA 检测结果影响因素为主线, 强化对检测过程的控制, 突出质量保障, 分别介绍了 ELISA 技术在食品安全检测、动物检疫、植物检疫和卫生检疫等领域中的应用情况和技术特点, 并根据实际工作需要, 从样本的采集与保存、试验操作关键环节、试剂的评价筛选以及仪器设备的使用、维护、校准和期

间核查等方面都做了详细的说明。此外，通过应用范例系统介绍了不确定度分析和质控图等现代质控手段，为读者正确理解和应用提供直观的指导和帮助。

本书适用于质检部门、农业部门、卫生部门、高等院校、研究院所、食品或动植物产品或生物制品生产企业以及利用 ELISA 技术从事其他检测的检验和管理人员，也可作为学习培训及日常工作参考书，同时对实验室的认可工作和质量管理方面亦有一定的专业性参考价值。

由于时间仓促和编者水平有限，纰漏和欠缺在所难免，敬请同行和广大读者批评指正。

编 者

2015 年 7 月 13 日

目录 CONTENTS

第一章 ELISA 检测技术概论	1
第一节 ELISA 技术的发展历史	1
第二节 ELISA 技术的原理与分类	2
第三节 ELISA 技术的应用	11
第四节 ELISA 检测中的常见问题及解决方法	27
参考文献	34
第二章 ELISA 在食品安全检测中的应用	37
第一节 食源性致病菌 ELISA 检测	37
第二节 食品中转基因成分 ELISA 检测	43
第三节 食品致敏原 ELISA 检测	47
第四节 生物毒素 ELISA 检测	51
第五节 兽药残留 ELISA 检测	63
第六节 农药残留 ELISA 检测	75
参考文献	82
第三章 ELISA 在卫生检疫中的应用	88
第一节 概 述	88
第二节 ELISA 在艾滋病检测中的应用	88
第三节 ELISA 在病毒性肝炎检测中的应用	92
第四节 ELISA 在梅毒检测中的应用	101
第五节 ELISA 在其他常见卫生检疫传染病中的应用	102
参考文献	107
第四章 ELISA 在动物检疫中的应用	109
第一节 动物病毒 ELISA 检测	109
第二节 动物细菌和真菌 ELISA 检测	117
第三节 动物寄生虫 ELISA 检测	122

第四节 朊病毒 ELISA 检测	127
参考文献	128
第五章 ELISA 在植物检疫中的应用	141
第一节 ELISA 在植物病毒病害上的应用	141
第二节 ELISA 在真菌、细菌检测方面的应用	149
第三节 ELISA 在生态学研究中的应用	150
参考文献	151
第六章 ELISA 检测技术的质量控制	155
第一节 检测人员的基本要求	155
第二节 样本的采集与保存	156
第三节 ELISA 试验操作技术要点	157
第四节 ELISA 检测标准操作程序	163
参考文献	165
第七章 ELISA 检测常用试剂盒的质量控制	167
第一节 ELISA 检测试剂盒概述	167
第二节 ELISA 检测试剂盒的监管现状	168
第三节 ELISA 检测试剂评价方法的研究	172
参考文献	183
第八章 ELISA 检测常用仪器的质量控制	184
第一节 酶标仪的使用和校准	184
第二节 洗板机的使用和校准	188
第三节 加样器的使用和校准	191
第四节 全自动酶免分析系统的质量控制	194
参考文献	204
第九章 ELISA 检测的室内质控方法	206
第一节 室内质量控制的主要概念	206
第二节 Levey-Jennings 质控	211
第三节 Westgard 多规则质控	218
第四节 ELISA 质控品的选择和制备	224
参考文献	225

第一章

ELISA 检测技术概论

酶联免疫吸附分析方法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是一种免疫测定(immunoassay, IA),即应用免疫学技术测定标本的方法,在临床检验中主要通过抗原抗体反应检测体液中的抗体或抗原性物质。

酶是能够催化化学反应的特殊蛋白质,其催化效力超过所有人造催化剂,ELISA 是将酶催化的放大作用与特异性抗原抗体反应结合起来的一种微量分析技术。酶标记抗原或抗体以后,既不影响抗原抗体反应的特异性,也不改变酶本身的活性。因此 ELISA 具有准确性高、检测时间短、价格低廉、判断结果有客观标准、结果便于记录和保存等优点,适合于大批标本的检测,广泛应用于食品安全检测、医疗检测以及免疫试验分析等领域。

第一节 ELISA 技术的发展历史

ELISA 的原理基于免疫酶标记技术,是一种免疫学检验技术,是继免疫荧光抗体技术和放射免疫分析之后发展起来的一大新型的血清学方法。

免疫检验技术是一种建立在抗原和抗体特异相互作用基础上的临床检验技术,其最早出现在 19 世纪末。1896 年, Widal 发现在一定浓度的伤寒杆菌中加入伤寒病人的血清可致伤寒杆菌发生特异的凝集现象,利用这种凝集现象可有效的诊断伤寒病,这就是最早的用于病原体感染诊断的免疫凝集试验,亦即著名的肥达试验(Widal test)。1897 年 Kraus 发现将细菌培养液与其相应的抗血清混合后可发生肉眼可见的沉淀反应,即免疫沉淀试验。到 1900 年, Bordet 发现了补体结合试验(complement fixation test, CFT),即抗原抗体反应后具有补体结合的能力,如红细胞与溶血素反应后,如有补体存在即可出现溶血现象。因此,利用这种免疫溶血机制做指示系统,可以检测另一反应系统中抗原或抗体的存在与否。1906 年 Wassermann 将这种试验用于梅毒螺旋体感染的诊断,建立了著名的用于梅毒血清学诊断的华氏反应。

标记免疫测定技术则标志着免疫测定技术进入了高灵敏免疫测定的时代。1941 年, Coons 等建立的荧光抗体技术(fluorescent antibody technique)为定位组织和细胞中的抗原物质提供了一个直接而又有效的手段。在 20 世纪 40 年代以前,所出现的免疫测定技术基本上都是定性或半定量测定方法,到 50 年代末 60 年代初,才出现完全的定量测定方法,即放射免疫试验(radioimmunoassay, RIA)。1960 年,纽约退伍军人医院的

Berson和 Yalow 发表了内源性血浆胰岛素测定的 RIA 方法。高灵敏放射免疫测定技术的出现,解决了以前难以测定的微量生物活性物质如激素的临床检测问题。尽管放射免疫测定技术的出现是免疫测定技术发展史上的一个里程碑,但由于其有试剂半衰期短、试验废液难以处理、污染环境等缺点,使得其现已逐步退出在临床常规检验中的应用,而采用非同位素标记物建立标记免疫测定技术成为发展主流。1966 年,法国巴斯德研究所的 Avrameas 和 Uriel 以及美国的 Nakane 和 Pierce 同时报道了酶免疫测定技术,其将酶替代荧光素,用于抗原在组织中的定位,可通过光学显微镜和电子显微镜来观察,并且 Avrameas 报道了将酶通过戊二醛方法标记抗原和抗体的理想条件。

1971 年,在酶免疫组织化学的基础上,瑞典斯德哥尔摩大学的 Engvall 和 Perlmann、荷兰 Organon 公司的 VanWeeman 和 Schuurs 等以及法国巴斯德研究所的 Avrameas 等同时发展了一种酶标固相免疫测定技术,这就是 ELISA 技术。Engvall 和 Perlmann 以碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)作为标记物,建立了兔血清 IgG 的定量 ELISA 测定方法。VanWeeman 和 Schuurs 则以辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)作为标记物,建立了定量检测人尿中 HCG 的 ELISA 方法。Avrameas 等以酶标记抗原建立了血清 IgG 测定方法。这种简单方便的免疫测定技术出现后,不但成为了一种非常简便的研究工具,而且迅速地应用于各种生物活性物质及标志物的临床检测,并在临床应用中逐步取代了放射免疫技术。其后,1972 年 Rubenstein 等又建立了一种无需分离洗涤步骤的均相(homogeneous)酶免疫测定技术——酶放大免疫分析技术(enzyme multiplied immunoassay technique, EMIT),这种测定技术主要限于小分子物质如药物等的测定应用。随着 20 世纪 70 年代中期杂交瘤技术的发展,出现了单克隆抗体,其应用于免疫测定,极大地提高了免疫测定的灵敏度和特异性,且为不同免疫测定方法的设计提供了广阔的想象空间,各种免疫测定技术相继出现,如一步法双抗体夹心 ELISA 测定。

到了 20 世纪 80 年代,酶标记抗体检测和鉴定蛋白质分子的免疫转印技术相继问世,80 年代后期,随着对小分子物质半抗原研究的深入,农药、兽药等小分子物质残留的免疫分析技术成为新的研究热点,至此,ELISA 技术开始应用于食品中残留物、污染物的分析。联合国粮农组织(FAO)已经向许多国家推荐此项技术,美国化学会(ACS)将免疫分析技术、色谱分析技术共同列为农兽药残留分析的主要技术,其检测结果具有法律效力。

目前,ELISA 快速检测试剂盒、试纸条已得到广泛应用,ELISA 已成为免疫诊断、检测和分子生物学研究中应用最广泛的免疫学方法之一。

第二节 ELISA 技术的原理与分类

ELISA 是一种免疫学方法,是以免疫学反应为基础,将抗原、抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合的一种敏感性很高的试验技术。根据酶标记位置的不同以及检测目的的不同分为双抗体夹心法、间接法、竞争法、捕获法等类型。

一、ELISA 技术的原理

免疫学方法是基于抗原抗体的结合反应建立的,抗原抗体结合具有高度特异性,即一种抗原分子只能与由它刺激所产生的抗体结合而发生反应。

1. 抗原

抗原是一种能在机体中引起特异性免疫应答的物质。抗原进入机体后,可刺激机体产生抗体和引起细胞免疫。在免疫测定中,抗原是指能与抗体结合的物质。能引起抗体产生的抗原多为相对分子质量大于 5 000 的蛋白质,小分子化合物在与大分子蛋白质结合后能引起机体产生特异性抗体的,称为半抗原。抗原的特异性取决于抗原决定簇的数目、性质和空间构型。

2. 抗体

抗体是能与抗原特异性结合的免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)。Ig 分五类,即 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE。与免疫测定有关的 Ig 主要为 IgG 和 IgM。Ig 由两个轻链和两个重链的单体组成。Ig 的轻链是相同的,有 κ 和 λ 两种型别。五类 Ig 的重链结构不同,这决定了它们的抗原性也不同。IgG 和 IgM 的重链分别称为 γ 链和 μ 链。重链和轻链的 N 端的氨基酸排列顺序因各种抗体而异,称为可变区,分别用 VH 和 VL 表示。两者构成抗体的抗原结合部位,只与相应的抗原决定簇匹配,这是抗体专一性结合抗原的结构基础。

IgG 可被木瓜蛋白酶分解为三个区段,其中两个相同的区段称抗原结合片段(Fab)。每个 Fab 都保存结合抗原的能力,但只有一个抗原结合位点,是单价的,与抗原结合后不出现凝集或沉淀。抗体的特异性则取决于抗体 Ig Fab 段的可变区与相应抗原决定簇的结合能力。另一区段称 Fc 段,无抗体活性,但具有 IgG 特有的抗原性。IgG 可被胃蛋白酶分解为两个片段,一个 Fab 双体,称 $F(ab')_2$,能和两个相同的抗原结合;另一片段类似 Fc,随后被分解成小分子多肽,无生物活性。IgM 是由五个单体组成的五聚体,含 10 个重链和 10 个轻链,具有 10 个抗原结合价,由于空间位置的影响,只表现为 5 个抗原结合价。

3. 抗体的产生

机体受抗原刺激后,B 淋巴细胞产生相应的抗体。含有抗体的血清称为抗血清。每一系 B 细胞只产生针对某一抗原决定簇的抗体。如将多种抗原或含有多个抗原决定簇的抗原注入机体,则将由多系的 B 细胞产生相应的多种抗体,这些抗体均存在于免疫血清中。免疫测定中所用的抗血清一般用抗原免疫兔、羊或马制得。产生抗体的 B 细胞可在体外与繁殖力强的肿瘤细胞融合成杂交瘤细胞。将单个杂交瘤细胞分离,在体内或体外培养而分泌单克隆抗体。单克隆抗体仅针对一种抗原决定簇,具有很高的特异性。单克隆抗体通常用抗原免疫小鼠制备。将免疫的脾细胞(含产生抗体的 B 细胞)与小鼠肿瘤细胞融合,分离杂交瘤细胞,接种于小鼠腹腔,产生的腹水中含有浓度很高的单克隆抗体。

4. 抗原抗体反应

抗原抗体间是通过很弱的短距引力而结合的。此类结合力是一种高度特异性的非共价键作用力,如氢键、静电引力、疏水相互作用力和范德华引力等。其中疏水相互作用力和静电引力是主要的作用力。只有这两种作用力使抗体和抗原分子接近到一定程度,范德华力和氢键作用才能开始起作用。以上几种作用力均比共价键作用弱得多,因此,只有存在大量这种作用力,并且抗体和抗原间有非常好的配合,抗体和抗原间才能发生有效作用。这反映了抗体抗原作用高度特异性的特征。

抗原抗体反应具有可逆性,其形成抗原抗体复合物的过程是一种动态平衡,其反应式为:



抗体的亲和力是抗原抗体间的固有结合力,可以用平衡常数 K 表示:

$$K = [\text{Ag} \cdot \text{Ab}] / [\text{Ag}][\text{Ab}]$$

$\text{Ag} \cdot \text{Ab}$ 的解离程度与 K 值有关。高亲和力抗体的抗原结合点与抗原的决定簇在空间构型上非常适合,两者结合牢固,不易解离。解离后的抗原或抗体均能保持原有的结构和活性,因此可用亲和层析法来提纯抗原或抗体。在抗血清中,特异性的 IgG 抗体仅占总 IgG 的极小部分,用亲和层析法提取的特异性抗体,称为亲和层析纯抗体,应用于免疫测定中可得到更好的效果。

抗原抗体反应具有最适比例,此最合适的范围称为等价带,在等价带前后分别为抗体过剩带和抗原过剩带。如果抗原或抗体极度过剩,则无沉淀物形成,在免疫测定中称为带现象,抗体过量称为前带,抗原过量称为后带。在用免疫学方法测定抗原时,应使反应系统中有足够的抗体量,否则测得的量会小于实际含量,甚至出现假阴性。

抗原抗体反应具有特异性,抗原抗体的结合实质上只发生在抗原的抗原决定簇与抗体的抗原结合位点之间。由于两者在化学结构和空间构型上呈互补关系,所以抗原抗体反应具有高度的特异性。

抗原抗体反应具有敏感性,在测定血清中某一物质的含量时,化学比色法的敏感度为 mg/mL 的水平,酶反应测定法的敏感度约为 $5 \mu\text{g/mL} \sim 10 \mu\text{g/mL}$,免疫测定中凝胶扩散法和浊度法的敏感度与酶反应法相仿。标记的免疫测定的敏感度可提高数千倍,达 ng/mL 的水平。

5. 标记的免疫测定

可以看出,免疫测定是一种很敏感的测定方法,抗原抗体反应后直接测定形成的沉淀或浊度,敏感度可达 $5 \mu\text{g/mL} \sim 10 \mu\text{g/mL}$,但在临床检验中,某些待测物在标本中的含量远低于这一水平,因此要寻找进一步增加敏感度的方法。标记的免疫测定是将检测试剂中的抗原或抗体用可微量测定的物质加以标记,通过测定标记物来提高敏感度。在放射免疫测定和酶免疫测定中,标记物分别为放射性核素和酶,最后通过测定放射性和酶活力来计算待检物的量,敏感度可比直接测定沉淀物提高数百至数千倍。在标记免疫测定中,一般加入过量的标记试剂以保证与待测物彻底反应。如不将两者分离而测定标记物,测得的结果将为两者之和。因此,游离标记物与结合标记物的分离是标记免疫测定

中的重要步骤。固相载体是可采取的方法之一,如将抗原或抗体包被在固相载体上,然后再与标记的抗原或抗体直接反应,结合的标记物被固定在载体上,而游离的标记物留于溶液中。这样可以通过洗涤将游离的标记抗体除去,结合标记物的测定可在固相上进行。

6. 酶免疫测定

酶免疫(enzyme immunoassay, EIA)测定可分为均相和非均相两种类型。在均相 EIA 中可不需进行游离的和结合的标记物的分离而直接测定标记物。例如在某种条件下,抗原抗体反应后形成的酶标记抗原抗体复合物中的酶失去其对底物作用的活力,因而测出的酶活力直接反映游离的酶标记物。均相 EIA 在临床检验中较少应用。非均相 EIA 需先进行游离的和结合的标记物的分离。如前所述,固相载体可作为一种分离手段。这种固相酶免疫测定方法就是 ELISA。

7. ELISA 的原理

ELISA 的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性,酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性,又保留酶的活性。在测定时,待检样品与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中未反应的其他物质分开。再加入酶标记的抗原或抗体,也通过反应而结合在固相载体上。此时固相上的酶量与样品中待检物质的量呈一定的比例。加入酶反应的底物后,底物被酶催化成为有色产物,产物的量与样品中待检物质的量直接相关,故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。由于酶的催化效率很高,间接地放大了免疫反应的结果,使测定方法达到很高的敏感度。

ELISA 的基本原理有以下三点:

(1) 抗原或抗体能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。

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。

二、ELISA 技术的分类

关于 ELISA 的分类,由于 ELISA 可用于测定抗原,也可用于测定抗体,其有三个必要的试剂:

a) 固相的抗原素原或抗体,即“免疫吸附剂”;

- b) 酶标记的抗原或抗体,称为“结合物”;
- c) 酶反应的底物。

不同文献对其从原理或操作上有着不同的分类意见。这里先将 ELISA 分为以下四大类:

- a) 直接 ELISA;
- b) 间接 ELISA;
- c) 夹心 ELISA;
- d) 竞争抑制 ELISA。

其他的 ELISA 都隶属于这四类 ELISA 或由这四类 ELISA 组合衍生而成。

1. 直接 ELISA

直接 ELISA 是所有 ELISA 中步骤最简单的一种,其方法是将抗原按一定的比例用包被缓冲液稀释好包被到固相载体上,包被完成后简单洗涤,再加入封闭液,封闭结束后再次洗涤除去多余封闭液,加入稀释好的特异性的酶标抗体,37℃温育1h或4℃温育过夜后,洗涤除去多余的抗体,加入底物显色并判读结果。最后显色的深浅与加入的酶标抗体量成正比。

直接 ELISA 主要适用于检测单抗亚型,实际操作中可以将经过亲和纯化的单抗包被在酶标板上,封闭后加入酶标分型二抗,最后加底物显色即可。此外用直接 ELISA 可以检测血清种属,也有人用直接 ELISA 进行单克隆抗体制备中的初步筛选。不过虽然直接 ELISA 操作很简单,步骤也比较简练,但是其应用范围还是非常有限的,一个重要的原因是这种 ELISA 中只经过了一步信号放大(酶的放大),所以其灵敏度不是很高,另外其测定的对象也非常有限,只能测定酶标记的分子。

2. 间接 ELISA

间接 ELISA 的步骤与直接 ELISA 步骤前面的部分基本一致,不同的是,间接 ELISA 中与包被好的抗原结合的不是酶标抗体,而是非酶标的,另外再引入第二种抗体(即二抗),二抗是经过酶标的,它可以与第一种抗体(与抗原直接结合的抗体,即一抗)特异性结合。最后加入底物显色并判读结果。当二抗的浓度一定的时候,最终的显色结果与一抗的量是正相关的。

间接 ELISA 的原理为利用酶标记的抗抗体(抗人免疫球蛋白抗体)检测与固相抗原结合的受检抗体,故称为间接 ELISA。同直接 ELISA,将抗原包被到酶标板上,洗涤后封闭,再次洗涤后加入稀释好的待检抗体(一抗),温育后洗掉未与抗原结合的一抗,再加入酶标二抗,再次温育,此时酶标二抗即可与一抗结合,最后加入底物显色。由于二抗一般为多抗,因此一个一抗分子上可以结合多个二抗分子,同时一个二抗分子上可以标记上多个酶分子,所以当待测抗体为多抗时(可以由多个一抗分子与抗原结合),信号经过两步放大,最终提高了检测的灵敏度。另外由于二抗制备比较容易,而且很早就开始商品化,所以操作者无需要将一抗进行酶标,大大缩减了工作量。

间接 ELISA 是检测标志性抗体的重要手段,主要用于对病原体抗体的检测从而进行传染病的诊断,还可用于检测抗体的效价、血清的效价以及单克隆抗体的筛选。间接

ELISA 的优点是只要变换包被抗原就可利用同一酶标抗抗体建立检测相应抗体的方法。其具体操作步骤如下:

(1) 将特异性抗原与固相载体联结,形成固相抗原。洗涤除去未结合的抗原及杂质。

(2) 加稀释的受检血清,保温反应。血清中的特异抗体与固相抗原结合,形成固相抗原抗体复合物。经洗涤后,固相载体上只留下特异性抗体,血清中的其他成分在洗涤过程中被洗去。

(3) 加酶标抗抗体。可用酶标抗人 Ig 以检测总抗体,但一般多用酶标抗人 IgG 检测 IgG 抗体。固相免疫复合物中的抗体与酶标抗体结合,从而间接地标记上酶。洗涤后,固相载体上的酶量与标本中受检抗体的量正相关。

(4) 加底物显色

间接 ELISA 成功的关键在于抗原的纯度。虽然有时用粗提抗原包被也能取得实际有效的结果,但应尽可能予以纯化,以提高试验的特异性。特别应注意除去能与一般健康人血清发生反应的杂质,例如以大肠埃希氏菌为工程酶的重组抗原,如其中含有大肠埃希氏菌成分,很可能与受过大肠埃希氏菌感染者血液中的抗大肠埃希氏菌抗体发生反应。抗原中也不能含有与酶标抗人 Ig 反应的物质,例如,来自人血浆或人体组织的抗原,如不将其中的 Ig 去除,试验中也会发生假阳性反应。另外,如果抗原中含有无关蛋白,也会因竞争吸附而影响包被效果。

间接 ELISA 中另一种干扰因素为正常血清中所含的高浓度的非特异性抗体。病人血清中受检的特异性 IgG 只占总 IgG 中的一小部分。IgG 的吸附性很强,非特异 IgG 可直接吸附到固相载体上,有时也可吸附到包被抗原的表面。因此,在间接 ELISA 中,抗原包被后一般用无关蛋白质(例如牛血清蛋白)再包被一次,以封闭固相上的空余间隙。另外,在检测过程中标本须先行稀释(1:40~1:200),以避免过高的阴性本底影响结果的判断。

3. 夹心 ELISA

夹心 ELISA 又被称为三明治式 ELISA,可分为直接夹心 ELISA 和间接夹心 ELISA 两种。

其中,直接夹心 ELISA 又分为双抗夹心 ELISA 和双抗原夹心 ELISA。

直接双抗夹心 ELISA:是检测抗原最常用的方法,其原理主要是:将第一种抗体(捕获抗体)包被在固相载体上,封闭后加入待检抗原,温育后加入第二种抗体(检测抗体),捕获抗体和检测抗体可以是针对不同表位的两种单抗,也可以是针对同一抗原的一种单抗与一种多抗,但是检测抗体需要经过酶标。

其操作步骤如下:

(1) 将特异性抗体与固相载体联结,形成固相抗体。洗涤除去未结合的抗体及杂质。

(2) 加受检标本,保温反应。标本中的抗原与固相抗体结合,形成固相抗原抗体复合物。洗涤除去其他未结合物质。

(3) 加酶标抗体,保温反应。固相免疫复合物上的抗原与酶标抗体结合。彻底洗涤未结合的酶标抗体。此时固相载体上带有的酶量与标本中受检抗原的量相关。

(4) 加底物显色。固相上的酶催化底物成为有色产物。通过比色,测知标本中抗原

的量。在临床检验中,此法适用于检验各种蛋白质等大分子抗原,例如 HBsAg、HBeAg、AFP、HCG 等。只要获得针对受检抗原的异性抗体,就可用于包被固相载体和制备酶结合物。如抗体的来源为抗血清,包被和酶标用的抗体最好分别取自不同种属的动物。如应用单克隆抗体,一般选择两个针对抗原上不同决定簇的单抗,分别用于包被固相载体和制备酶结合物。这种双位点夹心法具有很高的特异性,而且可以将受检标本和酶标抗体一起保温反应,作一步检测。

在一步法测定中,当标本中受检抗原的含量很高时,过量抗原分别和固相抗体及酶标抗体结合,而不再形成“夹心复合物”。类同于沉淀反应中抗原过剩的后带现象,此时反应后显色的吸光值(位于抗原过剩带上)与标准曲线(位于抗体过剩带上)某一抗原浓度的吸光值相同,如按常法测读,所得结果将低于实际的含量,这种现象被称为钩状效应,因为标准曲线到达高峰后呈钩状弯落。钩状效应严重时,反应甚至可不显色而出现假阴性结果。因此在使用一步法试剂测定标本中含量可异常增高的物质(例如血清中 HBsAg、AFP 和尿液 HCG 等)时,应注意可测范围的最高值。用高亲和力的单克隆抗体制备此类试剂可削弱钩状效应。

如果在被测分子的不同位点上含有多个相同的决定簇,例如 HBsAg 的 a 决定簇,也可用针对此决定的同一单抗分别包被固相和制备酶结合物。但在 HBsAg 的检测中应注意亚型问题,HBsAg 有 adr、adw、ayr、ayw4 个亚型,虽然每种亚型均有相同的 a 决定簇的反应性,这也是用单抗作夹心法应注意的问题。

双抗体夹心法测抗原需要注意的另一点是类风湿因子(RF)的干扰。RF 是一种自身抗体,多为 IgM 型,能和多种动物 IgG 的 Fc 段结合。用作双抗体夹心法检测的血清标本中如含有 RF,它可充当抗原成分,同时与固相抗体和酶标抗体结合,表现出假阳性反应。采用 F(ab')或 Fab 片段作酶结合物的试剂,由于去除了 Fc 段,从而消除了 RF 的干扰。双抗体夹心法 ELISA 试剂是否受 RF 的影响,已被列为这类试剂的一项考核指标。

双抗体夹心法欲测的抗原必须有两个可以与抗体结合的部位,因为其一端要与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,不能用于相对分子质量小于 5 000 的半抗原之类的抗原测定。此方法常用于霍乱肠毒素的测定。

双抗原夹心 ELISA 的原理和操作与双抗体夹心 ELISA 基本相同,不同的是包被的是抗原,待检对象是抗体。用特异性抗原进行包被和制备酶结合物,以检测相应的抗体。与间接法测抗体的不同之处为以酶标抗原代替酶标抗抗体,所以特异性比间接法更好。此法中受检标本不需稀释,可直接用于测定,因此其敏感度相对高于间接法。另外,由于间接 ELISA 中使用的二抗一般只能识别 IgG,而双抗原夹心 ELISA 中任何类似的免疫球蛋白都可以被检测出,因此双抗原夹心 ELISA 比间接 ELISA 也更灵敏。乙肝标志物中抗 HBs 的检测常采用本法。本法关键在于酶标抗原的制备,应根据抗原结构的不同,寻找合适的标记方法。

间接夹心 ELISA 是基于两种不同种属来源的抗体的夹心 ELISA,其原理是将一种种属来源的特异性抗体包被于固相载体上(作为捕获抗体),封闭,加入待检抗原,温育,洗涤后加入另一种种属来源的特异性抗体(非酶标,作为检测抗体),最后加入酶标二抗(特异性识别检测抗体),再加底物显色。与直接双抗体夹心 ELISA 相比,间接夹心 ELISA

中引入了特异性识别检测抗体的酶标二抗,相当于整个体系的信号增加了一步放大系统,于是最终的结果比直接双抗夹心 ELISA 更灵敏。同时,由于间接夹心 ELISA 中的酶标二抗仅能识别检测抗体,而不能识别捕获抗体,所以体系的特异性也得到了保障。值得提出的是,间接夹心 ELISA 并不是严格要求捕获抗体与检测抗体来源于同一物种,也可以是这种情形:仅用特异性的抗体的 Fab 片段包被固相载体作为捕获抗体,而用未经处理的同种属来源的特异性抗体作为检测抗体,酶标二抗选用只针对检测抗体的 Fc 段的二抗,这样的酶标二抗同样不能识别捕获抗体,从而使这种体系里的捕获抗体与检测抗体起到类似于不同种属来源的效果。间接夹心 ELISA 涉及的体系比较复杂,用到的试剂也比其他的 ELISA 复杂,但是其检测灵敏度上的优越性使它在检测那些低丰度抗原的样品中应用得十分广泛。

此外,还有一种改良双抗体夹心法,这是双抗体夹心法的一种改良形式,也是用于测定抗原的。此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 与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的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。而另一优点是避免标记特异性抗体,只要标记一种抗抗体,即可达到多种应用。

4. 竞争抑制 ELISA

竞争抑制 ELISA 又叫封闭 ELISA,其主要原理是用待检抗原或抗体去干扰已经预先设计好的体系,最终显色的结果与待检抗原或抗体的干扰程度成负相关。竞争抑制 ELISA 灵活性很强,可以在此基础上设计出更复杂的试验方案,从而派生出所谓的直接竞争抑制 ELISA、间接竞争抑制 ELISA、夹心竞争 ELISA 等特殊的 ELISA 方法。

直接竞争抑制 ELISA,此方法为预先将抗原包被在固相载体上,并加入酶标的特异性抗体。试验时,加入待检抗原(或抗体),如果待检对象是抗原,则待检抗原就与预先包被在固相载体上的抗原竞争结构酶标抗体;如果待检测对象是抗体,则待检抗体就与系统中原有的酶标抗体竞争结合包被在固相载体上的抗原。洗涤过程就可以洗掉被竞争下的酶标抗体,最后加底物显色。最终显色的结果与待检抗原(或抗体)量成反比。注意在直接竞争抑制 ELISA 中,同一预制备的体系既可以测定抗原,也可以测定抗体。

同间接 ELISA 一样,直接竞争抑制 ELISA 也有两步信号放大的过程,因此其灵敏度也比较高,但是预先包被好固相载体并加入酶标抗体后,试验时只需要将待检抗原或抗体稀释后加到体系中进行反应即可,大大简化了 ELISA 的操作过程。

间接竞争抑制 ELISA,此法可以看作是用待检抗原或待检抗体干扰一个预先制备的间接 ELISA 系统。其具体原理是:将抗原包被于固相载体上,依次加入特异性的抗体以及此抗体对应的酶标二抗作为预制备的体系。试验时,加入稀释好的待检抗原(或抗体),待检标本中的抗原(或抗体)就和预制备体系中固相载体上结合的抗原(或抗体)竞争结合特异性的抗体(或固相载体上结合的抗原)。

同间接 ELISA 一样,间接竞争抑制 ELISA 也有三步信号放大的过程,所以其灵敏