

酶标记免疫技术 及其应用

江西省寄生虫病研究所编

一九七九年九月

酶标记免疫及其技术应用

编译者 戴华生 郭春祥 黄文长
郭恒昌 谢治民

江西省寄生虫病研究所

前 言

为了向科学技术进军，早日实现医学科学现代化，我们将联合国卫生组织讲学组在我国讲授介绍的有关酶标记免疫试验技术以及国内外近年来报道的有关文献资料，择译编成专辑。内容主要包括酶标记免疫技术原理、方法及其在寄生虫病、细菌、病毒性疾病和非传染性疾病等方面的应用，以供医药、卫生、科研和教学工作参考。我们希望通过汇集介绍这一迅速发展起来的七〇年代新技术，能对从事寄生虫病和其它人、畜疾病的防治、检验、医药科研工作有所裨益，并望将通过各自的工作实践，总结提高，日臻完善。

本刊由江西省医学科学研究所戴华生择译主编，上海医学化验所郭春祥、上海市闸北区中心医院郭恒昌和江西医学院寄生虫学教研组黄文长分别译写主要章节最后由我所谢治民补充节译、负责校订。在编辑过程中曾请易煌副教授和中国医学科学院寄生虫病研究所余森海协助审校谨此一并致谢。

由于编辑时间匆促，资料收集未能齐备，兼之水平有限，粗疏错误之处在所难免，敬希读者批评、指正。

江西省寄生虫病研究所

一九七九年九月二十日

目 录

概 论	
第一章 原理与分类	(2)
一、不均一的酶标记免疫试验	(3)
(一)竞争性检测	(3)
1. 用标记抗原竞争地检测抗原	(3)
2. 用标记抗体竞争地检测抗原或抗体	(3)
3. 用标记第二抗体检测抗原	(4)
4. 竞争性酶标记免疫检测抗原	(4)
(二)非竞争性检测	(4)
1. 双抗体夹心法检测抗原	(4)
2. 双抗原夹心法检测抗体	(4)
3. 间接法检测抗体	(4)
4. 间接法检测抗原	(4)
(三)其它类型	(4)
1. 用过量标记抗原检测抗体	(4)
2. 用过量标记抗体检测抗原	(4)
3. 酶标记免疫组织抗原定位	(4)
二、均一酶标记免疫试验	(5)
第二章 试剂与制备	(6)
一、固相载体	(6)
二、抗原	(7)
三、抗体	(7)
(一)抗IgG血清制备	(8)
(二)亲和层析法纯化抗IgG	(8)
(三)抗原结合片段(Fab)的制备	(8)
四、样品(血清)	(9)
五、洗涤液	(9)
六、酶	(10)
(一)在不均一-ELISA 中使用的酶	(10)
(二)在均一-ELISA 中使用的酶	(10)
七、底物	(11)
(一)3,3'-二氨基联苯胺	(11)

(二)5-氨基水杨酸·····	(11)
(三)邻苯二胺·····	(12)
(四)邻联甲苯胺·····	(12)
(五)对硝基苯磷酸盐·····	(12)
第三章 方法学 ·····	(13)
一、酶结合物的制备法 ·····	(13)
(一)标记方法·····	(13)
1. 标记蛋白质·····	(13)
(1) 戊二醛法·····	(13)
一步法·····	(14)
二步法·····	(15)
(2) 过碘酸钠法·····	(15)
(3) 二马来酰亚胺法·····	(16)
(4) MBS 法·····	(17)
(5) 4,4'-二氟-3,3'-二硝基二苯基砜(FNPS)标记法·····	(17)
(6) 细胞色素C抗体结合物制备·····	(19)
(7) 可溶性过氧化物酶-抗过氧化物酶复合物(PAP)制备·····	(19)
(8) 其它方法·····	(21)
2. 标记半抗原·····	(21)
(1) 混合酞法·····	(21)
(2) 碘化二亚胺法·····	(22)
(3) 过碘酸盐法·····	(22)
3. 免疫学标记法·····	(22)
(二)酶结合物的纯化·····	(22)
(三)酶结合物的性质·····	(23)
1. 免疫学性质·····	(23)
2. 酶的催化性质·····	(23)
3. 酶结合物的稳定性·····	(23)
(四)酶结合物的鉴定与质量标准·····	(24)
1. 酶结合物的鉴定·····	(24)
2. 酶结合物的质量标准·····	(24)
二、酶标记免疫试验 ·····	(24)
(一)均一酶标记免疫试验·····	(24)
(二)不均一酶标记免疫试验·····	(25)
1. 固相和液相的分离·····	(25)
2. 最适实验条件的选择·····	(25)
3. 结果的判读·····	(25)
三、酶标记免疫组织抗原定位法 ·····	(25)

(一)直接法·····	(25)
(二)间接法·····	(26)
(三)无标记抗体酶法·····	(26)
(四)可溶性酶—抗酶复合物(PAP)法·····	(26)
(五)四步抗体法·····	(27)
(六)组织固定法·····	(27)
1.光学显微镜观察时的组织固定液·····	(27)
2.电子显微镜观察时的组织固定液·····	(28)
(七)操作程序·····	(28)
1.电子显微镜观察·····	(28)
(1)直接法·····	(28)
(2)间接法·····	(28)
2.光学显微镜检查·····	(29)
1.直接法·····	(29)
2.间接法·····	(29)
3.免疫球蛋白桥免疫显色法·····	(30)
4.可溶性酶—抗酶复合物法·····	(30)
(八)显色反应·····	(30)
(九)影响底物溶液的几个因素·····	(31)
(十)化学法抑制组织内过氧化物酶·····	(32)
四、常用的酶标记免疫检测操作程序·····	(32)
(一)酶标记结合物最适浓度测定·····	(32)
(二)固相载体吸附抗原最适浓度测定·····	(33)
(三)间接法测定抗体所需器材与试剂·····	(33)
(四)间接法检测抗体·····	(35)
(五)特定抗原基质球(DASS)法·····	(35)
(六)双抗体夹心法检测抗原·····	(38)
(七)酶标记抗原竞争法测定抗原·····	(39)
(八)竞争性酶标记免疫试验测定抗原·····	(39)
第四章 酶标记免疫技术的应用与评价·····	(40)
一、在寄生虫学中的应用·····	(40)
(一)血吸虫病·····	(40)
(二)疟疾·····	(41)
(三)阿米巴病·····	(42)
(四)弓浆虫病·····	(42)
(五)旋毛虫病·····	(43)
(六)猪囊虫病·····	(43)
二、在细菌学中的应用·····	(43)

(一)沙门氏菌属.....	(43)
(二)布氏桿菌属.....	(45)
(三)白色念珠菌.....	(45)
(四)破伤风抗毒素.....	(46)
三、在病毒学中的应用.....	(47)
(一)单纯疱疹病毒.....	(47)
(二)流感病毒、呼吸道合胞病毒、巨细胞病毒.....	(48)
(三)麻疹病毒.....	(50)
(四)天花—痘苗病毒.....	(51)
(五)脊髓灰质炎病毒.....	(51)
(六)狂犬病毒.....	(51)
(七)流行性乙型脑炎病毒.....	(52)
(八)EB 病毒.....	(52)
(九)乙型肝炎表面抗原.....	(53)
(十)南芥菜花叶病毒和东痘病毒(植物病毒).....	(54)
四、在自身免疫性疾病中的应用.....	(55)
五、在变态反应性疾病中的应用.....	(56)
六、肿瘤抗原的定位与电泳沉淀线(弧)的显示.....	(56)
七、抗体与抗体产生细胞的动力学实验.....	(57)
八、激素分泌细胞的实验.....	(57)
九、中枢神经系统解剖经路的实验.....	(57)
十、动物疾病的检查与监视.....	(57)
十一、酶标记免疫检测法若干尺度的评价.....	(59)

结束语

主要参考文献

酶标记免疫技术及其应用

概 论

酶为生物细胞所产生的, 具有高度催化效能和高度特异性的蛋白质。酶作为蛋白质, 有些含有辅基称为双成分酶, 有些不含辅基称为单成分酶。单成分酶本身具有催化活性, 故无需辅基参与即可起催化作用。酶促反应中与酶作用的物质叫做底物或基质。

酶有强大的催化活性和高度的特异性两大特点, 酶虽由活细胞内产生, 但其作用并不完全依赖细胞参与, 在细胞外, 酶也能发挥其强大的催化作用, 如过氧化氢酶在 1 分钟内能使 500 万分子的 H_2O_2 分解为 H_2O 与 O_2 。

酶标记免疫技术的设想是依据酶的两大特点, 在不破坏酶的催化活性和免疫球蛋白的免疫活性的条件下, 将酶分子标记到免疫球蛋白分子上, 或是利用酶与抗酶抗体所形成的免疫复合物作为指示剂, 进行抗原或抗体的示踪、定位或定量检测。

酶标记免疫技术是在标记抗体、荧光标记、同位素标记试验和组织化学的基础上发展起来的一种新技术。荧光免疫试验的应用已有多, 目前被认为是微生物学、临床免疫学实验室中最好的诊断方法之一, 但此试验费时多, 操作不易自动化, 不能准确定量, 结果判读带有主观性, 而且需要特殊设备(荧光显微镜)。另一种用于标记抗原或抗体的是同位素, 即放射免疫试验。此法亦具有较高的敏感性和重演性, 大规模测定时可以自动化。但同位素的价格昂贵且半衰期短, 判读结果需有复杂的设备, 试剂的运输、应用和处理需有专门的安全措施, 这就意味着它的应用有较大的局限性。而酶标记免疫试验兼有免疫荧光和放射免疫的优点, 克服了这两种方法的许多缺点。酶标记的试剂制备容易, 酶与抗体(或抗原)结合物高度稳定而有效期长, 其敏感性接近于放射免疫试验而结果的观察比较客观, 可以直视或用简单的仪器进行观察。

酶标记免疫技术最初研究者的兴趣在于直视检测和抗原定位。Sfernberger⁽⁶¹⁾及其同事们首先用间接酶标记免疫技术测定抗体。后来发展为用可溶性抗原或抗体与不溶性固相载体结合, 而保留免疫成份的反应性, 这就是Engvall⁽¹⁴⁾及其同事们首创的酶免疫试验(Enzyme Immunoassay, EIA), 是酶标记免疫吸附试验(ELISA)的基础。

近年来 Voller等⁽⁹²⁾在 ELISA 方面进行了大量的工作, 并发展了一种微量反应板酶标记免疫吸附试验, 即目前应用最广泛的 ELISA 方法。

酶标记免疫试验不仅具有高度特异性, 能产生可见的或电子致密的反应产物, 而且由于酶在其与底物的反应中不被消耗, 一个酶分子可以促成很多反应产物沉淀于相应的抗原抗体结合物部位, 从而表现出高度的灵敏性; 因此, 一般而言, 凡是荧光抗体和铁蛋白抗体所能应用的范围几乎都可以用酶标记免疫技术来代替。酶标记抗原与未标记抗原对相应抗体的结

合起竞争作用,故此法又可代替放射性标记法,对溶液中的抗原性物质作定量研究。由于酶本身具有抗原性,可以直接给动物注射,然后不需标记手续借未标记抗体—酶法(搭桥法)即可进行抗原抗体的研究。由于酶标记免疫试验所呈现的种种优点,目前已广泛地应用于各种传染性疾病与非传染性疾病。

寄生虫病在酶标记免疫技术的实践发展中突出地占着显著的地位,若干重要的人体寄生虫病如血吸虫病、疟疾、锥虫病、弓浆虫病、旋毛虫病及阿米巴病等均较早地用ELISA来测定其抗体或评价防治运动的效果。

在传染病中,该法已成功地用于人类病毒性和细菌性疾病的临床诊断和实验研究,也可作为梅毒血清学诊断的过筛试验。

在非传染性疾病中,酶标记免疫试验用于自身免疫性疾病,如红斑性狼疮的抗核抗体、抗酸、抗胃壁细胞、抗平滑肌、抗线粒体抗体的测定以及抗体产生细胞的动力学实验。还可检测绒毛膜促性腺激素、胰岛素……等和肿瘤抗原的定位。

此外酶标免疫试验尚可用于食品卫生学上检测与家畜的各种传染病和农业上的多种植物病毒的监测。

国外对酶标记免疫技术的评价甚高,认为是血清学上革命的新成果。展望在不久的将来,酶标记免疫技术在医学上将具有重大的意义。

第一章 原理与分类

酶标记免疫试验法(ELISA)与荧光免疫试验(FIA)⁽¹⁻³⁾、放射免疫试验(RIA)⁽⁴⁻⁸⁾相似,它们都使用标记的免疫反应物(包括抗原、抗体或半抗原)。在ELISA中,免疫反应物通过化学或免疫学的方法与酶联结形成酶结合物,由于在标记过程中有关免疫反应物的决定簇和酶的活性中心并未受到严重的影响,因此酶结合物仍然保留与相应的抗体或抗原相互作用的免疫特异性及酶的催化活性。

用酶标法检测样品时,酶结合物能与待检样品中相应的抗原或抗体结合成为带酶的免疫复合物,除有的半抗原检测外,大多数情况下均应分离酶标记的免疫复合物和游离的酶结合物,然后检测酶的活性;加入酶的底物,由于酶的催化作用,无色的底物产生水解、氧化或还原等反应而形成有色终产物,可用肉眼或分光光度计定性或定量地检测其含量。在FIA中是用荧光素进行标记,最后直接用荧光显微镜观察组织切片或涂片上特异性荧光。在RIA中则用同位素标记,最后用较复杂的仪器来测定特异放射性。

抗原和抗体之间的相互作用具有高度的特异性,在ELISA中又因酶的催化具有高度的放大作用,许多种酶分子每分钟能催化生成 10^6 以上分子的产物⁽¹⁰⁾,因此这一检测方法的特异性强,敏感度高,在一般情况下其敏感性与RIA相当。目前这一技术不仅应用于细胞水平(光学显微镜)和分子水平(电子显微镜)的组织定位,而且还用于可溶性抗原、半抗原或抗体的定量测定。

目前使用ELISA进行定量测定的方法繁多,概括起来,可作以下分类。⁽¹¹⁻¹²⁾

- 1.按所检测的反应物种类可分为:测定抗原、半抗原和抗体等类型;
- 2.按标记反应物的种类可分为:标记抗原、半抗原和标记抗体等类型;

3.按反应性质可分为：竞争性和非竞争性两类；

4.按是否要分离带酶的免疫复合物和游离的酶结合物，可分为均-(homogenous)和不均-(heterogenous)两类。

大多数酶免疫试验属于不均-ELISA，只有少数属于均-ELISA，前者按标记物的免疫反应机理和标记反应物的种类，可用表1简单地表示。

现按上述分类对各种检测方法的反应机理分别叙述于下：

一、不均一的酶免疫试验

在这类检测中，酶结合物直接或间接地与样品中的抗原、半抗原或抗体进行免疫化学反应生成酶免疫复合物，它与游离的酶结合物在性质上或多或少地是相同的，因此需要把带酶的免疫复合物与游离酶结合物分离以后再进行酶的活性测定，并计算样品中抗原、半抗原或抗体的含量。

目前已经应用的不均一酶免疫检测方法有以下几种：

(一) 竞争性检测⁽¹⁸⁻²⁰⁾：

1.用标记抗原(Ag*)竞争地检测抗原(Agx)：〔表1中A1〕

将酶标记的已知量抗原Ag*和样品中的抗原Agx同时混合保温，由于Ag*和Agx二者具有相同的抗原决定簇，因此彼此竞争地与有限量的抗体(Ab)相互作用形成免疫复合物。当Agx的含量较多时，Agx与Ab结合成复合物的量也较多，Ag*与Ab结合形成Ag*-Ab复合物的量就相对地少，其减少程度取决于“竞争性”抗原Agx的浓度，也就是说Agx竞争性地抑制了Ag*与有限量抗体的结合，Agx含量愈大，抑制的程度也大，利用这种特异的竞争性抑制就可进行定量检测。

表1. 不均一ELISA分类表

若在检测中使用的是固相抗体〔表1中A1(1)〕或对第一抗体特异的固相第二抗体〔表1中A1(2)〕，分离固相和液相后测定酶的活性，就可求得样品中抗原Agx的浓度。

2.用标记抗体Ab*竞争地检测抗原或抗体〔表1中A2〕：

(1) 检测抗原〔表1中A2(1)〕：

利用固相抗原与样品中的抗原(Agx)竞争性地结合有限量的标记抗体(Ab*)的机理，来检测样品中的抗原。

(2) 检测抗体〔表1中A2(2)〕：

反应机理 分类	标记物	1. Ag*		2. Ab*		3. Ab ₂ * (或 Ab ₃ *)	
		试剂	样品	试剂	样品	试剂	样品
A. 竞争法	(1)	Agx	Ag*	Agx	Ab*	Agx	Ab ₂ *
	(2)	Agx	Ag*	Agx	Ab*	Agx	Ab ₂ *
B. 非竞争法 (夹心法)	(1)	Agx	Ag*	Ab*	Ab*	Ab ₂ *	Ab ₂ *
	(2)	Agx	Ag*	Ab*	Ab*	Ab ₂ *	Ab ₂ *

注：Ag = 抗原(包括半抗原或抗原)
 Ab(或Ab₂) = 与抗原的特异性抗体
 Ab₂ = 第二抗体(一般指抗IgG)
 Ab₃ = 抗酶抗体
 * 表示酶标记
 固 = 表示固相吸附
 — 表示免疫反应
 表示竞争性免疫反应

同理可用标记的抗体(Ab^*)与试样中的抗体(Ab_x)竞争性地结合一定量的固相抗原,来检测样品中的抗体。

3. 用标记第二抗体 Ab_2^* 检测抗原〔表 1 中 $A3_{(1)}$ 〕

用固相抗原与样品中抗原混合,使竞争性地结合抗体,分离液相与固相后加入标记的第二抗体,检测样品中的抗原。

4. 竞争性酶标记免疫试验检测抗原〔表 $A3_{(2)}$ 〕⁽²¹⁾;

固相抗原和样品中抗原(Ag_x)竞争地结合第一抗体(Ab_1),结合到固相抗原上的第一抗体的量,是通过连结第二抗体与标记的第三抗体后,检测酶的活性而得出的。由于酶的活性与样品中抗原 Ag_x 的浓度成正比,从而求得 Ag_x 的量。

(二) 非竞争性检测(夹心法)⁽²²⁻²⁵⁾〔表 1 中 $B1$ 、 $B2$ 、 $B3_{(1)}$ 、 $B3_{(2)}$ 〕:

1. 双抗体夹心法检测抗原〔表 1 中 $B2$ 〕:

这种方法要求抗原至少有二个结合点。样品中的抗原 Ag_x 与过量固相抗体结合,经保温后洗涤,再加入过量的酶标记的同一抗体(Ab^*),进一步洗涤后检测固相上的酶标记物,从而直接求得样品中抗原的含量。

2. 双抗原夹心法检测抗体〔表 1 中 $B1$ 〕:

同 $B2$ 的方法相似,用标记的抗原 Ag^* 检测样品中的抗体。

3. 间接法检测抗体〔表 1 中 $B3_{(1)}$ 〕

样品中的抗体 Ab_x 结合到过量的固相抗原上,保温后洗涤,然后加入标记的第二抗体(Ab_2^*),保温洗涤后检测酶的活性,可得到样品中抗体的含量。

4. 间接法检测抗原〔表 1 中 $B3_{(2)}$ 〕

样品中的抗原(Ag_x)结合于过量的固相抗体,保温后洗涤,然后加入过量的同种抗体,再洗涤后加入标记的第二抗体(Ab_2^*),最后洗涤并测定酶的活性以求得样品中抗原的量。

(三) 其它类型⁽²⁶⁾:

1. 用过量的标记抗原(Ag^*)与样品中的抗体(Ab_x)反应,保温后加入过量的固相抗体,使与仍然游离的标记抗原起反应,离心分离固相和液相,测定固相或液相的酶活力,即可求得样品中抗体的量。

2. 用过量的标记抗体(Ab^*)与样品中的抗原(Ag_x)反应,保温后加入过量的固相抗原,使与仍然游离的标记抗体起反应,离心分离后,测定固相或液相的酶活力,即可求得样品中抗原的量。

在有些分类中把前面提到的四种竞争性检测法称为同时竞争类型,而把上述这二种检测方法列为继续竞争类型。

3. 酶标记免疫组织抗原定位:

酶标记免疫技术的基本原理与免疫荧光和免疫铁蛋白技术相同。当固定在组织或细胞内的抗原或抗体与相应的抗体或抗原发生反应,形成抗原——抗体复合物时,必须籍荧光素、酶或同位素标记的试剂,方能在光学或电子显微镜下显示此复合物。

酶标记免疫技术是在不破坏酶活性和免疫球蛋白的免疫反应性的条件下,将过氧化物酶通过化学方法或免疫学方法标记到免疫球蛋白分子上,当这种标记抗体遇细胞内、外相应的抗原时则发生反应。过氧化物酶的催化作用,使适当的底物水解、氧化或还原,然后在光学显

显微镜下观察其颜色变化。此免疫组织化学反应产物具有一定的电子密度，故尚适用于电子显微镜观察，也可将过氧化物酶与抗过氧化物酶抗体形成的可溶性免疫复合物，直接或间接地与组织或细胞内的抗原或抗体产生特异反应，然后进行抗原或抗体的示踪、定位。

过氧化物酶与IgG结合后，其分子量约200,000，较其它酶与IgG结合，或铁蛋白结合物分子量小，效果更满意。

组织内可能存在的过氧化物酶对反应的干扰，可用化学方法予以抑制。

光学显微镜水平上的组织内酶标技术，除用过氧化物酶标记抗体外，尚可用碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、亮氨酸酶、葡萄糖氧化酶，细胞色素C、 β -半乳糖苷酶等进行。

在电子显微镜水平上则多用过氧化物酶，因它能产生较满意的电子密度沉淀物。

二、均一酶标记免疫试验 (27—30)

当酶与半抗原联结形成的酶结合物与相应的抗体反应后，由于抗体分子的空间阻碍效应或因酶的构型发生变化而妨碍它与底物的作用，因此酶呈抑制状态。当加入样品后，样品中的半抗原能竞争地结合已与酶结合物反应的抗体，这时酶结合物就不再结合有抗体分子，从而使酶解除了抑制状态，重显活性（见图1）：

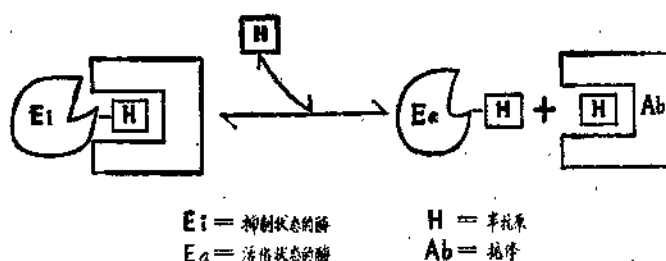


图1. 均一酶标记免疫试验示意图

酶结合物从原来的抑制状态变为活化状态后，二者之间有显著的区别，因此不需分离即可直接测定酶的活性，并计算样品中半抗原的含量。

目前，均一酶免疫试验仅用于测定小分子的化合物，而用酶标记的大分子抗原，由于其抗原决定簇与酶的活性中心距离较大，当它再与抗体结合后并不能抑制酶的活性，因此目前尚未有检测大分子的均一酶免疫试验。

第二章 试剂与制备

一、固相载体

可供酶标记免疫试验用的固相载体的物质很多。1975年Deelder和Streefkerk设计的特定抗原基质球法⁽⁸¹⁻⁸²⁾(DASS)是用琼脂糖珠(商品名Sepharese-4B)作为固相载体。载体的羟基($-OH$)经溴化氰(CNBr)活化变为活泼的“亚氨基碳酸盐”,然后在弱碱条件下,直接偶联含有游离氨基($-NH_2$)的抗原蛋白或抗体蛋白。

此外,用Gurvich⁽⁸³⁾和Axen⁽⁸⁴⁾等叙述的方法可将抗原或抗体共价地联结到纤维素、聚丙烯酰胺凝胶上。用氯甲酸乙酯⁽⁸⁵⁾、戊二醛⁽⁸⁶⁾作交联剂,使免疫反应物固相化来制备免疫吸附剂。

用这类偶联方法制得的固相免疫吸附剂、载体和蛋白质(抗原或抗体)之间的共价键结合较牢固,但由于操作比较复杂,不适于大规模应用。

1971—1972年Engvall等设计的酶标记免疫吸附测定法⁽¹³⁾,采用聚苯乙烯塑料小试管(或微量反应板)作为固相载体,目前国外已经广泛地使用。尤其是聚苯乙烯微量反应板,因为所用的试剂微量,操作方便,适于大规模操作。国产的聚苯乙烯微量反应板(上海塑料三厂出品)也已用于酶标记免疫测定,且得到满意的结果。作为载体的塑料制品还有聚乙烯、聚丙烯等。下面着重讨论聚苯乙烯微量反应板作载体吸附蛋白质的条件和要求。

普遍认为抗原或抗体是以物理吸附的形式吸附于聚苯乙烯载体表面的,但还不清楚是蛋白质的哪一部分容易吸附上。实验表明,其吸附的效果似与塑料的类型和表面的性质有关。例如塑料制品在加工过程中往往会因工艺的不同或受其它因素的影响而造成吸附性能的极大差异,甚至会完全丧失吸附能力,因此在使用前必须先通过试验选择吸附性能良好的塑料制品以备应用。

聚苯乙烯微量反应板的吸附性能应进行以下测试:1.在微量反应板的每一个小孔中,加入同一份阳性抗原(或抗体),使之吸附于孔的塑料表面,然后按所采用的酶免疫检测方法进行操作,加底物显色后用分光光度计测定每一个小孔的光密度($O\cdot D$),一般认为每孔 $O\cdot D$ 误差在 $\pm 10\%$ 的范围内即可使用;2.将阳性与阴性参考血清分别稀释,在同一块反应板上进行试验,最后测定阳性孔和阴性孔的光密度,应选择阳性孔与阴性孔之间的光密度差值大的塑料板进行检测,这样可以提高检测的敏感度。当确定适用的塑料制品批号后,最好集中选购一批,以保证实验有良好的重演性。

聚苯乙烯塑料小试管或微量反应板,在应用前一般不需要进行特殊的处理,用蒸馏水冲洗干净即可,避免用阴离子去污剂洗涤(如含十二烷基磺酸钠的洗涤剂等)⁽⁸⁷⁾,否则可能会改变载体的表面性质而丧失吸附抗原(或抗体)的能力。至于载体能否反复使用以及如何洗涤的问题,可以根据实验材料具体掌握,若发现空白对照显色较深或阳性样品显色结果不理想时,就应弃去不用。国外一般固相载体使用一次后就不再重复使用。

用聚苯乙烯等载体吸附蛋白质抗原（或抗体）时，只要将稀释的抗原（或抗体）溶液加到载体中（如微型反应板的小孔），放置一定时间后使抗原（或抗体）吸附于载体表面，然后用洗涤剂洗去多余的抗原（或抗体）即可使用。此过程称为吸附（或称为致敏、包被、涂复等），现对吸附条件作下列简单说明⁽⁸⁸⁾。

1. PH：可溶性抗原（或抗体）吸附时的pH以9左右为好，通常用PH9.6碳酸缓冲液稀释。一般认为在PH7~10的范围内皆可达到良好的吸附效果。当pH<6.0时，非特异性吸附会增加。

2. 吸附时间：加入可溶性抗原（或抗体）致敏的时间长短可根据实验的需要确定，一般在4℃的冰箱内过夜，吸附即较完全而且均匀，有时也有采用37℃吸附1~5小时者。

3. 蛋白质浓度：为了使载体表面能吸附更多的抗原（或抗体），要求吸附所用的抗原（或抗体）溶液有一个最适的浓度，在用聚苯乙烯微量反应板吸附蛋白质时，其浓度一般100微克/毫升左右。若浓度太高，则抗原（或抗体）蛋白分子之间的相互作用力较大而影响载体对蛋白质的吸附；若浓度太低，载体表面可能留下没有吸附抗原（或抗体）的部位，这些空缺部位将在酶免疫试验时继续吸附加入的标记抗体（或抗原），造成非特异性吸附。因此，必须用缓冲液对吸附所用的抗原（或抗体）作适当稀释，具体操作可通过棋盘滴定法来选择抗原（或抗体）的最适浓度（见后），在这一浓度下，阳性与阴性血清之间能呈现最大的差异。

4. 蛋白质的种类：载体表面对各种蛋白质（抗原或抗体）的吸附能力不完全相同。首先要求被吸附的蛋白质（抗原或抗体）是可溶性的，而对某一蛋白质的吸附效果如何，要用参考血清作吸附性能试验后才能确定。另外，不同的载体吸附蛋白质的能力也不一定相同，通常认为聚苯乙烯吸附抗原效果较好，而聚乙烯吸附抗体较好，但都须通过实验来选择。

5. 其它因素：为保证实验结果的重演性，当使用塑料小试管（或微量反应板）时，应该用定量加液器（或定量滴管）定量地加入欲吸附的抗原（或抗体）蛋白，使蛋白质溶液复盖于相同的载体表面，同时还需注意在吸附时不要振摇与搅拌，以确保吸附容量的恒定。

二、抗 原

前面已经提到，在酶标记免疫吸附试验中所用的抗原为可溶性抗原，在吸附于载体后即成为不溶性固相抗原。吸附所用的抗原宜用优质、稳定的制剂，并要求其纯度和免疫原性较高。

制备可溶性抗原可根据各种抗原的性质来进行，有的是把纯化的颗粒抗原悬混于少量PBS中，再于低温下冻融，经超声波粉碎后，用10,000转/分低温离心30分钟，取上清液贮存于低温冰箱或冰冻干燥保存备用⁽⁸⁹⁾。某些可溶性抗原的制备方法可参见酶标记免疫试验的应用部份。

三、抗 体

抗体在用酶标记之后免疫活性往往会降低，因此最好是选择高纯度、高效价、与抗原亲和力和强的抗体作标记，以减少非特异显色，提高方法的敏感度。抗体纯化的水平则取决于试验

要求的特异程度。若用间接法测定抗体时,所用的抗抗体(如抗IgG)不一定都要经过亲和层析纯化⁽⁴⁹⁾,一般只需将经过硫酸铵或硫酸钠盐析法得到的总的球蛋白部份进行酶标记即可。

在用双抗体夹心法检测抗原时,致敏载体和特异性标记抗体的纯度要求,基本如上所述。抗体的制备及纯化方法如下。

(一) 抗IgG血清的制备及纯化:

1. 抗IgG血清的制备:

选适龄、健康的雄性家兔或山羊为免疫动物。取纯化IgG (0.5毫克/公斤)加Freund's完全佐剂(羊毛脂1份,石蜡油1份,卡介苗3—4毫克/毫升佐剂)乳化后,采用多途径(皮下、皮内、肌肉)、多部位注射。

间隔2—3周后再以首次的 $\frac{1}{2}$ 量抗原,加Freund's不完全佐剂(羊毛脂1份,石蜡油1份)用同法加强免疫一次,再间隔2—3周又以同法加强免疫一次。于首次注射后两个月放血测试。

由于在酶标记过程中,抗体活性会有所减弱,因此需制备高效价的抗血清,且抗体的亲和力要强。为提高抗体的亲和力,可延长动物的免疫周期。

2. IgG 纯化:

(1) 取100毫升(ml)血清加100ml生理盐水,再加入192ml饱和硫酸铵,搅拌,置4℃过夜。

(2) 3500转离心沉淀30分钟,弃去上清液,沉淀用90ml冷生理盐水溶解,加45ml饱和硫酸铵,搅拌,放置1小时,离心沉淀,弃去上清液。如是反复三次。

(3) 将沉淀溶于20ml冷生理盐水,置透析袋对PBS透析或通过Sephadex G50除去铵盐。此即为粗制 γ 球蛋白。

(4) 将上述粗制 γ 球蛋白溶液通过DEAE—纤维素柱,用0.01M pH8.6 PBS洗脱,于280毫微米波长测光密度,收集蛋白峰并浓缩。此即为粗制IgG。

(5) 将上述浓缩液通过Sephadex G200柱,用PBS (PH7.2)洗脱,收集蛋白峰,浓缩,得纯化IgG,供免疫用。

(二) 亲和层析法纯化抗IgG:

在酶标记过程中,全部蛋白包括非抗体蛋白均可与酶结合。非抗体蛋白越多,酶的不必要消耗也越多,非特异染色也明显。应用亲和层析法纯化的抗IgG或特异抗体能避免酶的不必要消耗并减少非特异染色。制得之酶—抗体结合物用于组织抗原标记能获得满意结果。

方法:取纯化IgG (10mg/ml) 10ml于0.1M碳酸氢钠液中平衡过夜,用溴化氰活化的7%琼脂糖珠—4B 15ml与之交联,活化条件: pH11, 8分钟, 15℃。于4℃缓慢搅拌16小时,以0.01M PBS pH7.4洗涤琼脂糖珠—4B,直至洗涤液O·D值为0。加抗IgG血清于上述琼脂糖珠—4B柱,待与载体上的IgG充分结合后,用0.01M PBS洗涤。再用pH2.0的0.2M甘氨酸—盐酸缓冲液解离。收集蛋白峰,调pH为中性,浓缩,即得纯化抗IgG。

此外,用聚丙烯酰胺亲和层析法⁽⁵⁰⁾,同样能获得满意的纯化抗体。

(三) 抗原结合片段(Fab)的制备:

免疫球蛋白G链可用酶法或化学法断开,常用的酶有木瓜酶、胃蛋白酶,胰蛋白酶等。

制备 Fab 片段前必须取得高效价, 高纯度的 rG 球蛋白这样可尽量避免非特异染色出现。用酒精分离、中性盐沉淀、不溶性蛋白复合物形成、离子交换层析、凝胶过滤、亲和层析等方法提取的免疫球蛋白, 若含有少量非特异抗体, 可用戊二醛制备的固相免疫吸附柱将非特异抗体成分吸去⁽⁷¹⁾。

取动物(兔) IgG 抗体150mg, 于 pH7.0 含 0.01M 半胱氨酸和 2M EDTA 的 0.1M 磷酸钠中, 用 1.5~3.0mg 胃酶消化四小时, 加 0.01M 碘乙酰胺中止反应⁽⁷²⁾。经胃酶消化后在两条重链的二硫键靠 C 端处, 断成大小不等的二个片断。大的片断(5S)是一个双体, 为 $F(ab)_2$, 能与二个抗原分子结合。小的片断称 FC' 。

未消化的 IgG 可通过 Sephadex G-100 凝胶过滤(用 0.05M Tris-盐酸缓冲液洗脱)或亲和层析、羟甲基纤维素柱(40×2.5cm)层析(0.1M—0.9M 醋酸钠, pH5.5 分级洗脱)去除。剩余的 Fab 和 FC 片断用 DEAE-纤维素分离⁽⁷³⁾, Fab 片断用 0.0175M pH6.9 磷酸缓冲液洗脱。

四、样 品 (血 清) ⁽⁴¹⁾

血清或血浆都可用作酶标记免疫试验。在分离血清时, 血液最好在室温中放置几小时待凝固后分离, 而不宜置 4℃ 下凝固, 否则容易引起大量的 IgM 及少量的 IgG 的丧失。关于人血清在贮存过程中的抗体稳定性的报道还不多, 但一般认为血清最好是新鲜的, 若要贮藏必须分小量贮存于低温冰箱, 并防止反复冻融, 必要时血清可以脱脂保存。血浆则可用肝素毛细管法或滤纸法取得, 具体方法如下:

毛细管法: 用酒精棉花消毒手指, 并用干棉花揩干避免流血, 用针刺破皮肤出血, 用含干燥硫柳汞的肝素毛细管取血。毛细管一端封闭, 在数小时内离心, 然后在血浆与红细胞交界处把毛细管折断, 将含血浆的毛细管二端再封闭, 贮存备用。

滤纸法: 在现场工作时, 有时不能马上将毛细管及时运送测定, 可用滤纸法取血代替。即把毛细管中采集的血标本定量地吸在滤纸上, 在试验前把血样浸洗下来。如血标本为 50 微升 (μ l) 每一滤纸可置于 0.5 毫升 (ml) pH7.2 缓冲液中于 4℃ 浸渍过夜, 若血球压积值为 50%, 其稀释度相当于 1:20。在操作时, 滤纸血样必须尽快干燥, 不能接触固定液, 贮存温度也不宜太高, 若能立即置 -20℃ 中, 则活性可维持一年左右。但最近有人通过实验证明, 血液吸于滤纸上可能会损害 IgM 的活性, 因此认为在流行病学调查时仍以新鲜的血浆标本为好。

在酶免疫试验中, 若只采用一个血清的稀释度, 可用阳性及阴性参考血清初试, 以已知阳性和阴性标本且能产生最大光密度差值的血清稀释度作为试验时的稀释度。测抗体时, 血清稀释度一般为 1:200~1:500, 测抗原时也可通过实验确定。但是, 当要判断终点滴度时, 受检血清需作系列稀释。

五、洗 涤 液

洗涤液宜采用含吐温 (Tween) 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 或生理盐水。吐温是聚氧乙烯去水山梨醇脂肪酸酯, 为非离子型的表面张力物质, 常用作助溶剂。吐温的编号依聚合山梨

醇所结合的脂肪酸种类不同而定,如吐温-20是结合月桂酸,吐温-40结合棕榈酸,吐温-60结合硬脂酸,吐温-80结合油酸。在酶标记免疫试验中大多用含吐温-20的缓冲液作洗涤剂,并作稀释样品和酶结合物之用,以减少非特异性吸附。

图2 为于洗涤液中加入Tween 20或牛血清白蛋白对ELISA灵敏度的影响⁽⁸²⁾。

六、酶 (11,12,38)

酶的催化性使它适宜于作为标记物,在免疫测定中起指示剂的作用,但目前还没有一种酶能理想地用于所有的标记,在实际应用中必须选择一种酶以适合特定的检测系统。选择酶的标准可归纳如下:

- (1) 酶制品纯度高、活力高;
- (2) 酶及其结合物在检测和贮存中保持稳定;
- (3) 易于溶解;
- (4) 酶分子中存在能与其它分子交联的反应基团,交联后保持酶的活性。

- (5) 酶标记后所得的结合物产量高、效率高;
- (6) 有价廉、安全、易得的底物;
- (7) 反应产物稳定、检测简便、快速;
- (8) 在实验系统中没有抑制剂和干扰因素;
- (9) 对于均-ELISA,要求酶一半抗原结合物与抗体结合后呈抑制状态,同时检测的条件与半抗原-抗体结合的条件要相适应。

以下几种酶已在酶标记免疫试验中使用:

(一) 在不均-ELISA中使用的有:辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、糖化酶、碳酸酐酶、乙酰胆碱酯酶等。

(二) 在均-ELISA中使用的有:溶菌酶、苹果酸脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶等。

在上述的各种酶中,辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶(AKP)是目前最常用的。1976年在美国召开的“酶标记免疫试验特异检测传染源”会议中,总结了辣根过氧化物酶在操作上与碱性磷酸酶大致相同。我们在具体应用时可根据酶的来源、活力和纯度而定。下面主要介绍在酶标记中所用的辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶的一些基本性质及其质量要

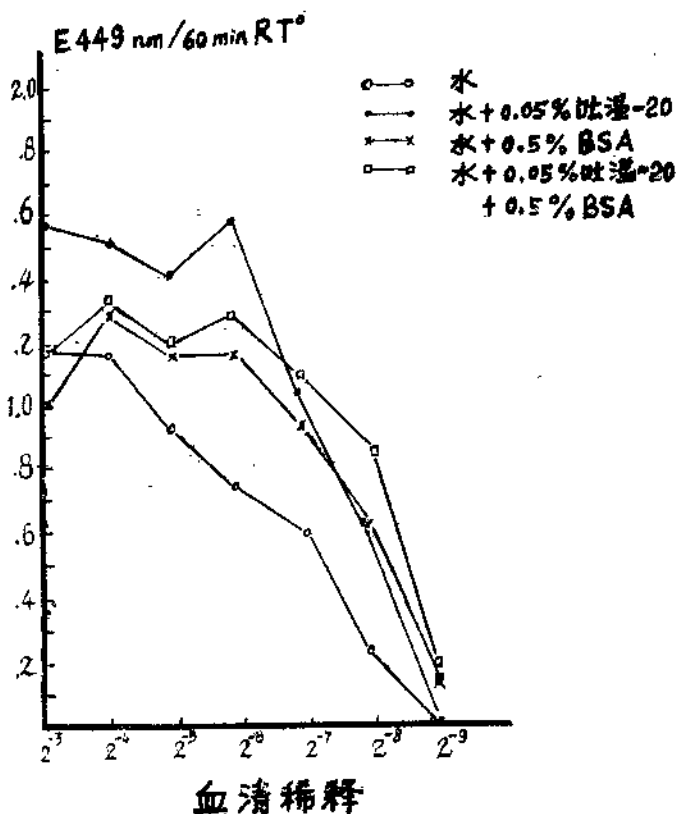


图2. 洗涤液中加入吐温-20或BSA对ELISA灵敏度的影响