

临床检验

LINCHUANG JIANYAN

ELISA 指南 II

郑怀竞 韩 松 编 著

6.61

北京医科大学
中国协和医科大学 联合出版社

学图书馆

临床检验ELISA指南

郑怀竞 韩 松 编著

叶应妩 陶义训 审

北京医科大学
中国协和医科大学 联合出版社

(京)新登字147号

图书在版编目(CIP)数据

临床检验ELISA指南/郑怀竞,韩松编著. —北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1994.12

ISBN 7-81034-391-2

I. 临… II. ①郑…②韩… III. 实验及诊断-酶联接免疫吸附测定-手册 IV. R446.61-62

内 容 提 要

本书分六章。第一章至第四章讲述ELISA检验的原理和方法。第五、第六章介绍ELISA检验有关的质量控制方法及ELISA试剂的临床使用评价。本书系统地介绍了ELISA检验的原理、操作和质量评价,对医学免疫学检验工作者有较大的实用参考价值,也可供中、高等院校检验专业师生参考。

北京医科大学 联合出版社出版发行
中国协和医科大学

(100083 北京学院路38号 北京医科大学院内)

北京密云华都印刷厂印刷 新华书店经销

开本: 787×1092 1/32 印张: 3.0625 字数: 69千字
1994年12月第1版 1994年12月北京第1次印刷 印数 1—4000册

定价: 3.60元

序 言

近年来,生物技术的不断发展,推动着医学检验的发展,酶联免疫技术现已广泛应用于医学检验的各个领域,成为医学检验的一个常规方法,特别是用于检测病毒性肝炎标志物的检验方法已普及到县以及县以下的医疗单位。

为了提高病毒性肝炎标志物的检验质量,自1988年起,卫生部临床检验中心即开展了该检验的质量评价活动。多年来的质评工作总结显示,ELISA检测质量有了明显的提高,这就要归功于检验人员和肝炎诊断试剂厂家的努力。但其中也还存在一些问题,为了进一步地普及酶联免疫ELISA技术,提高使用该技术的检测水平,特编写了这本临床检验ELISA指南,内容主要是论述ELISA技术的基本理论知识、操作要点、有关的质量控制方法和ELISA试剂的临床使用评价,以及几年来质量评价成绩改进的情况,供使用ELISA技术的有关技术人员参考,也可供培训基层检验人员使用。

卫生部临床检验中心顾问 叶应妩

1994年6月

目 录

1. 免疫测定的基础知识	(1)
1.1 抗原	(1)
1.2 抗体	(1)
1.3 抗原抗体反应	(5)
1.4 免疫测定在临床检验中的应用	(8)
1.5 标记的免疫测定	(8)
1.6 酶免疫测定	(9)
2. ELISA的原理和类型	(11)
2.1 ELISA的原理	(11)
2.2 ELISA的类型	(11)
3. ELISA的试剂	(23)
3.1 免疫吸附剂	(23)
3.2 结合物	(30)
3.3 酶的底物	(35)
3.4 洗涤液	(36)
3.5 酶反应终止液	(37)
3.6 阳性对照品和阴性对照品	(37)
3.7 参考标准品	(38)
4. ELISA的操作要点	(39)
4.1 标本的采取和保存	(39)
4.2 试剂的准备	(40)

4.3	加样	(40)
4.4	保温	(41)
4.5	洗涤	(42)
4.6	显色和比色	(44)
4.7	结果判断	(47)
5.	有关质量控制的问题	(53)
5.1	基本概念	(54)
5.2	质量控制血清	(57)
5.3	室内质量控制程序	(59)
5.4	室间质量评价	(70)
6.	ELISA试剂的临床质量评价	(74)
6.1	诊断试剂临床质量评价要点	(74)
6.2	临床考核血清盘的制备要求	(76)
6.3	临床考核血清盘的建立	(77)
6.4	对乙肝ELISA诊断试剂的临床质量评价 ..	(79)
6.5	通过室间质量评价评价试剂质量	(90)

1. 免疫测定的基础知识

ELISA是一种免疫测定。免疫测定 (immunoassay, IA) 是应用免疫学技术测定标本中微量物质的方法。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。

1.1 抗原 (antigen, Ag)

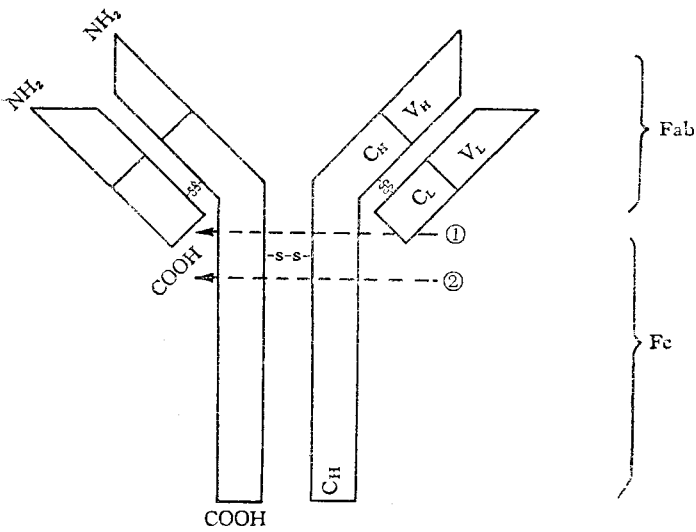
抗原是能在机体中引起特异性免疫应答的物质。抗原进入机体后, 可刺激机体产生抗体和引起细胞免疫。在免疫测定中, 抗原是指能与抗体结合的物质。能在机体中引起抗体产生的抗原多为分子量大于5 000的蛋白质, 例如乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、甲胎蛋白(AFP)等。小分子化合物在与大分子蛋白质结合后能引起机体产生特异性抗体的, 称为半抗原(hapten), 例如某些激素、药物等。抗原的反应性取决于抗原决定簇(antigenic determinant), 或称为表位(epitope)。一个抗原分子可带有不同的决定簇, 例如HBsAg中可带有a、d、y、w、r等决定簇。

1.2 抗体

1.2.1 抗体的结构

抗体是能与抗原特异性结合的免疫球蛋白 (immunog-

lobulin, 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(L)和两个重链(H)的单体组成。Ig 的轻链是相同的，有 κ (kappa)和 λ (Lambda)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 (gamma)链和 μ (mu)链。IgG 的结构见图1-1。



① 木瓜酶裂解部位 ② 胃蛋白酶裂解部位

图1-1 IgG结构示意图

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 V_H 和 V_L 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，发生特异性结合（见图1-2），是抗体专一性结合抗原的结构基础。

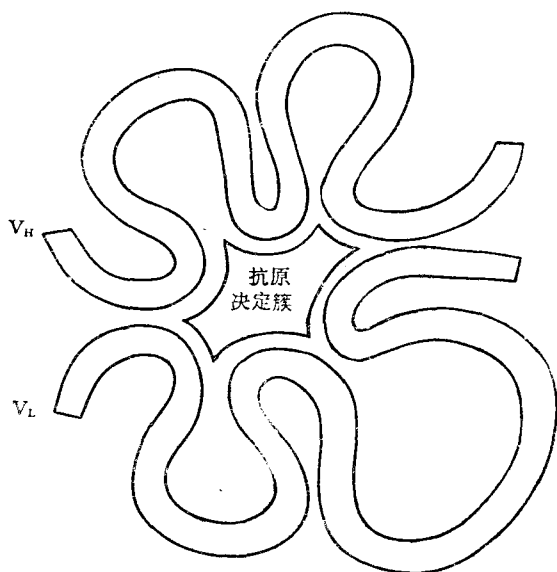


图1-2 可变区抗原结合部位示意图

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(F_{ab})。每个F_{ab}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。另一区段称F_c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 F_{ab} 双体，称

$F(ab')_2$ ，能和两个相同的抗原结合；另一片段类似 F_1 ，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，只表现为五个抗原结合价。IgM分子量约为900 000，IgG分子量约为150 000。

机体被微生物感染后，先产生IgM抗体，然后产生IgG抗体。经过一段时期，IgM抗体量逐渐减少而趋消失，而IgG抗体可长期存在，在疾病痊愈后可持续数年之久。IgM抗体一般为保护性抗体，具有免疫性。因此IgM抗体的测定，对某些传染病如甲型肝炎有较高的临床诊断价值。图1-3为甲型肝炎病人血清中IgM抗体和IgG抗体出现的时间和水平。

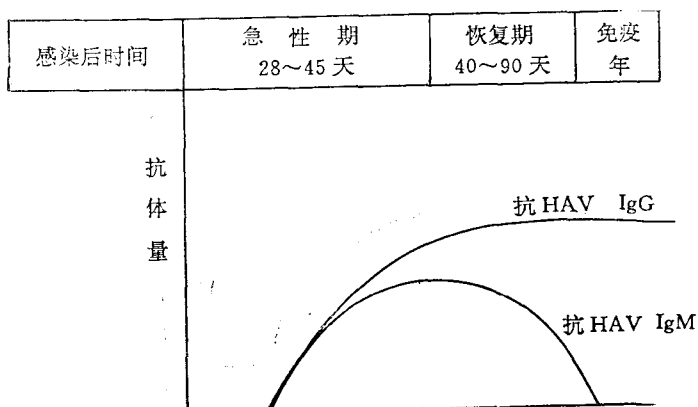


图1-3 甲型肝炎病人血清中IgG抗体和IgM抗体水平的变化。

1.2.2 抗体的产生

机体受抗原刺激后，B淋巴细胞产生与抗原相应的抗体。含有抗体的血清称为抗血清(antiserum)。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的抗体称单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb或MAb)。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。将免疫鼠的脾细胞(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。

1.3 抗原抗体反应

1.3.1 可逆性

抗原与抗体结合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(affinity)是抗原抗体间的固有结合力，可用平衡常数K表示：

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

Ag·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中的极小部分。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。

1.3.2 最适比例

在恒定量的抗体中加入递增量的抗原形成抗原抗体复合物(沉淀)的量见图1-4。曲线的高峰部分是抗原抗体比例最合适的范围，称为等价带(zone of equivalence)。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(zone phenomenon)。抗体过量称为前带(prezone)，抗原过量称为后带(postzone)。在用免疫学方法测定抗原时，应使反

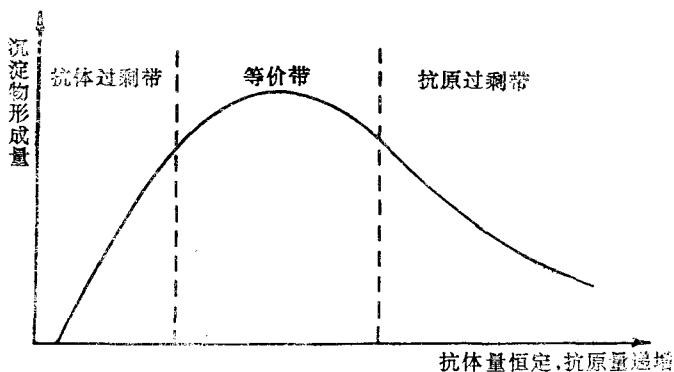


图1-4 抗原抗体反应中沉淀物形成量与抗原、抗体的比例关系

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。

1.3.3 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。例如乙肝病毒中的表面抗原(HBsAg)、e抗原(HBeAg)和核心抗原(HBcAg)，虽来源于同一病毒，但仅与其相应的抗体结合，而不与另外两种抗体反应。抗原抗体反应的这种特异性使免疫测定能在一非常复杂的蛋白质化合物(例如血清)中测定某一特定的物质，而不需先分离待检物。

但是这种特异性也不是绝对的。假使两种化合物有着部分相同的结构，在抗原抗体反应中可出现交叉反应。例如，绒毛膜促性腺激素(hCG)和黄体生成激素(LH)均由 α 和 β 两个亚单位组成，其结构的不同处在 β 亚单位，而两者的 α 亚单位是类同的。用hCG免疫动物所得的抗血清中含有抗 α -hCG和抗 β -hCG两种抗体，抗 α -hCG抗体将与LH中的 α 亚单位发生交叉反应。在临床检验中，如用抗hCG抗血清作为妊娠诊断试剂测定尿液中hCG，只能用于hCG浓度较高的试验，否则妇女生理性排泄入尿液中的微量的LH将与之发生交叉反应。因此在作为早孕诊断(敏感度应达到50mIU/ml hCG)的试剂中必须应用只对hCG特异的抗 β -hCG抗体，这样即可避免再与 α 亚单位相同的其他激素(LH、FSH、TSH)发生交叉反应。

1.3.4 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水平，酶反应测定法的敏感度约为5~10 μ 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水平。例如，用放射免疫测定法或酶免疫测定法测定HBsAg，其敏感度可达0.1ng/ml。

1.4 免疫测定在临床检验中的应用

由于各种抗原成份，包括小分子的半抗原，均可用以制备特异性的抗血清或单克隆抗体，利用这种抗体作为试剂就可检测标本中相应的抗原，因此免疫测定的应用范围极广，在临床检验中可用于测定：

- (1) 体液中的各种蛋白质，包括含量极少的蛋白质如甲胎蛋白等。
- (2) 激素，包括小分子量的甾体激素等。
- (3) 抗生素和药物。
- (4) 病原体抗原，如HBsAg、HBeAg等。
- (5) 另外，也可利用纯化的抗原检测标本中的抗体，例如抗-HBs等。

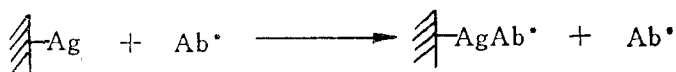
1.5 标记的免疫测定

如上所述，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5~10 μ 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，最后用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。以标记抗体(Ab^*)检测抗原(Ag)为例，反应式如下：



在反应产物中有与 Ag 结合的 Ab^* 和游离的 Ab^* ，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。可采用多种手段，固相载体是其中之一。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起反应，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。以固相抗原为例，反应式如下：



这样可以通过洗涤将游离的 Ab^* 除去，结合标记物的测定可在固相上进行。

1.6 酶免疫测定

酶免疫测定(enzyme immunoassay, EIA)可分为均相(homogenous)和非均相(heterogenous)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，固相载体可用作一种分离手段。这种固相酶免疫测定方法在1971年最初建立时称为酶联免疫吸附剂测定(enzyme linked immunosorbent assay),简称ELISA,在国内有译作酶联免疫吸附试验的,虽然含义不完全确切,但已习用。

(韩 松)

2. ELISA的原理和类型

2.1 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，使受检标本(测定其中的抗体或抗原)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标本中受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，产物的量与标本中受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。

2.2 ELISA的类型

ELISA可用于测定抗原，也可用于测定抗体。在这种测定方法中有三个必要的试剂：(1)固相的抗原或抗体，即“免疫吸附剂”(immunosorbent)；(2)酶标记的抗原或抗体，称为“结合物”(conjugate)；(3)酶反应的底物。根