

ELISA

在临床微生物检验中的应用

英 Wreghitt TG

● 郑永晨 等译



94
R446.61
1
2

XDP75/103

ELISA 在临床检验中的应用

Wreghitt TG 等著〔英〕

郑永晨	张澍滑	袁佐鸣	译
王恩荣	刘玉忠	胡国义	
王正路	罗金发	侯英山	
武凤林	赵硕旻	曲 莉	



3 0147 0397 3

吉林科学技术出版社



004995

【吉】新登字 03 号

ELISA 在临床微生物检验中的应用

郑永晨 等译

责任编辑:齐向东

封面设计:张莉量

出版 吉林科学技术出版社 787×1092 毫米 32 开本 7.25 印张
发行

152,000 字

1992 年 7 月第 1 版 1992 年 7 月第 1 次印刷

印数:1—2000 册 定价 5.10 元

印刷 吉林工业大学印刷厂

ISBN 7-5384-0900-9/R·173

译 者 的 话

酶联免疫吸附试验(ELISA)自1970年代问世以来,经过20多年的临床实践已充分体现了这一技术的实用价值。在欧美一些发达国家,ELISA广泛地应用于医学、生物学等领域,并有这方面的专著。

本书是 Wreghitt TG 等专家编写,1990年在英国出版发行。全书共20章,包括用ELISA检测病毒、细菌、真菌、支原体和寄生虫等。书中比较系统地介绍了如何建立ELISA和怎样具体应用于临床,并介绍了怎样进行质量控制,使检测结果更具可信性。本书内容翔实、丰富,尤其在我国尚无这方面的专著的情况下,对教学、医疗和科研等方面有很好的参考价值。

在我国仅乙型肝炎的ELISA诊断试剂常规应用于临床,其他方面的ELISA诊断方法尚未常规应用,因此本书对开展ELISA在临床上的应用有十分重要的意义。读者可根据各自的需要参考本书的章节,即可自行建立一系列ELISA诊断方法用于临床,以提高临床诊断水平,做到早诊断早治疗,避免滥用药物。

由于我们的水平所限,翻译过程事错误在所难免,敬请读者指正。

译 者

一九九二年三月

前 言

本书介绍了许多临床微生物实验室应用的 ELISA 技术,并且比较了 ELISA 与其他方法在诊断感染性疾病方面的优缺点。

酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA) 有二个类型,即均相反应和非均相反应。均相反应是一步完成,也就是说所有的试剂同时加入,这一类型一般不用于检测微生物的抗原或抗体,因其只能检测较小分子,如地高辛和庆大霉素。因此,本书只介绍非均相 ELISA,所用的试剂是分步加入的。

所有的 ELISA 都需用酶标抗体,酶标抗体的首次应用是 Avrameas 与 Vridl 和 Nakane 与 Pierce 用于研究组织中抗原的定位。酶标抗体在检测细胞抗原时至少与荧光素标记抗体有一样的酶感性。后来又很快发现酶标记的抗原和抗体可对血清中的许多成分进行定量检测。1971年,Engvall、Perlmann 和 Schuurs 分别独自工作,首先报道了 ELISA 技术。Engvall 与 Perlmann 用的是碱性磷酸酶, Van Weemen 与 Schuurs 用的是辣根过氧化物酶。还有许多其他的酶也可以应用,如 β -半乳糖苷酶。酶标记的方法将在第二章介绍。

已有许多免疫学方法用于检测血清中的抗体,ELISA 至

少与其他方法有一样的敏酶性,特别优于放射免疫法,酶标抗体可以长期保存,并且无辐射危害,而且所需设备价廉。然而,ELISA 并非总是简单易行,其可靠性也受某些因素的干扰,因此,在本书的第一章将讨论影响 ELISA 的因素。

全书共二十章,介绍了应用 ELISA 检测各种临床标本时的优缺点、影响因素及结果的分析。有些方面的内容尚未包括,如乙型肝炎病毒和爱兹病病毒的血清学。ELISA 试剂很难制备的和已有商品试剂盒供应的内容书中不作介绍。

目 录

前言	(1)
第一章 ELISA 实验技术	(1)
第二章 酶标抗体	(18)
第三章 质量控制和标准化	(31)
第四章 风疹病毒	(42)
第五章 疱疹病毒	(51)
第六章 呼吸道病毒	(71)
第七章 柯萨奇 B 组病毒	(79)
第八章 轮状病毒	(89)
第九章 产气荚膜杆菌和葡萄球菌肠毒素 及沙门氏菌	(103)
第十章 白喉和破伤风抗毒素	(109)
第十一章 空肠弯曲菌	(116)
第十二章 布氏杆菌	(122)
第十三章 军团菌	(132)
第十四章 性病	(141)
第十五章 肺炎支原体	(150)
第十六章 弓浆虫	(161)

第十七章	钩端螺旋体.....	(174)
第十八章	真菌.....	(184)
第十九章	寄生虫.....	(198)
第二十章	酶放大反应.....	(213)
附录一	常用缓冲液配方表.....	(223)
附录二	英文缩写(英汉对照).....	(225)

第一章 ELISA 实验技术

自从 1970 年初开始应用 ELISA 以来,至今已有大量的文献报道用 ELISA 检测各种各样的抗原和抗体,并且以代一些其他的常规检测方法,这不仅是因为 ELISA 敏感和特异,而且还简单,并可以自动化进行。图 1-1 和图 1-2 所示二种最基本类型的 ELISA——竞争和非竞争 ELISA。

一、选择方法

在应用 ELISA 时,首先果清楚下面内容:

1. 是检测抗体还是抗原?
2. 检测的结果是定性还定量?
3. 是否需要检测特异抗体的类型?
4. 所用抗体/单克隆抗体的亲合力/亲和力怎样?

(一)检测抗原

最常用于检测抗原的方法是非竞争性的双抗体夹心法(图 1-1),其次是竞争法(图 1-2),但竞争法在具体实验中有些困难;特别是检测微生物的抗原,因为其需标记抗原,这对于某些抗原是很难做到的,甚至是不可能的,另外在竞争法中,酶标记的抗原与标本直接混合在一起,许多标本中含有酶抑制剂或蛋白 A 样物质(如粪便),其可影响 ELISA 结果。

非竞争 ELISA

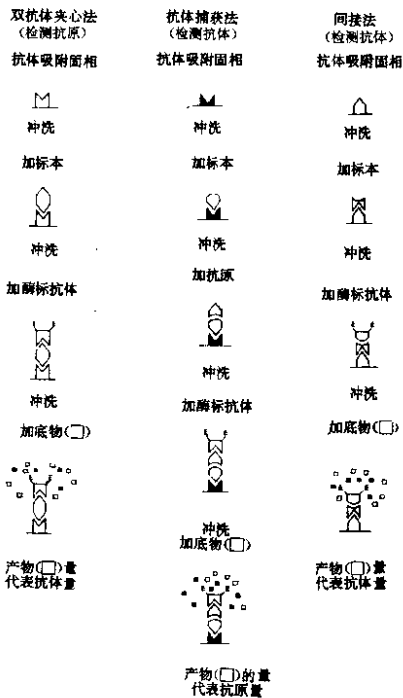
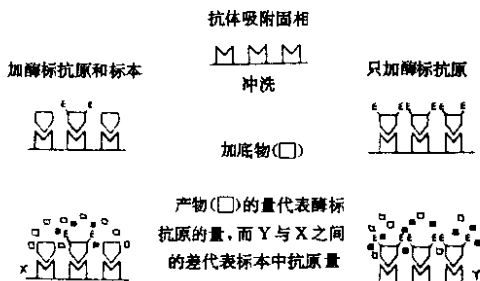


图 1-1 非竞争法

竞争 ELISA

检测抗原



检测抗体

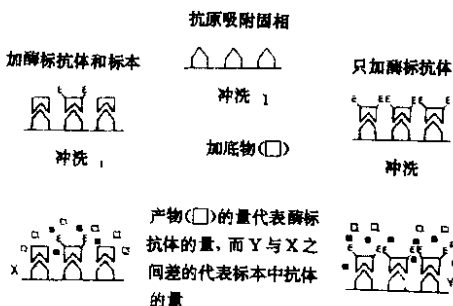


图 1-2 竞争法

(二)检测抗体

检测抗体种类常用的方法是检测抗体种类的捕获法(图 1-1),这个方法常用于检测特异性 IgG, IgA 和 IgM。这个方法的第一步是因相捕获所需要检测的一个种类的抗体,接下来是检测捕获的抗体是否是特异抗原的抗体。间接 ELISA 在检测 IgG 时比较简单,但不适用于检测其他种类的抗体,因为血清中如果有特异 IgG 存在将与 IgM 或 IgA 等竞争结合抗原。

竞争法检测抗体有二种方式,一是将标记的抗体和标本同时加入反应孔内,但标记的抗体和标本中的抗体必须是结合抗原的不同决定簇;另一方法是先加标本,冲洗后再加标记的抗体。竞争法检测抗体比间接法容易判断结果,并且比较敏感和特异。

二、方 法

不论选用哪种方法,ELISA 都包括 6 个步骤:

1. 抗原或抗体吸附于固相。
2. 加标本和试剂。
3. 孵育和冲洗。
4. 加酶标抗原或抗体。
5. 加适当的底物。
6. 检测和分析结果。

虽然 ELISA 方法在理论上十分简单,但在每一个步骤都有注意的事项,不论是新设计的 ELISA 还是沿用其他 ELISA 方法都会出现一些具体问题。本章主要阐述这些问题及解决的方法。

(一)固相选择

ELISA 可用许多不同类型的固相,如纤维素类、聚丙烯酰胺和琼脂糖等颗粒性材料,这些材料与共价键与抗原或抗体结合,但其有缺点,除含铁的颗粒外,其他材料在 ELISA 冲洗步骤都要离心。如果固相用微量板或微量管,大颗粒或透明小杯就不需离心,这些固相都是用聚苯乙烯、聚乙烯和尼龙材料制成的。固相可以预先用 γ 射线处理,也可以不用处理。最常用的是 96 孔微量板,许多检测仪器都是接 96 孔板设计的。

在选择用相对应该注意的是不同的固相,其结合抗原或抗体的能力差别很大,例如,一块微量板上的不同孔,同一批号的不同板,不同批号的板以及不同型号的板在吸附能力上都有差别(图 1-3),虽然目前所用的固相板质量比较稳定,很少出现问题,但使用时也应注意这一点。

图 1-3 还表明了不同材料的固相板和是否经过射线处理的固相板在吸附能力上的差别。试验方法是应用双抗体夹心法检测轮状病毒抗原。经射线处理的聚苯乙烯板具有最大的吸附力,而未经射线处理的聚苯乙烯板吸附力最弱,聚乙烯板介于二者之间。这个结果只是用双抗体夹心法检测轮状病毒抗原时证明的,采用其他方法检测的结果尚不清楚。

由于固相板在各个方面存在一些差异,因此,选择的固相板不仅需要专用于 ELISA 的固相板,而且还要考虑板的吸附能力和各孔的均质性。一般商品固相板并不能保证特别好的均质性和强吸附力,但也可用于 ELISA 的固相。然而在建立一个新的实验方法时,固相板所有的孔都应用同样的试剂进行鉴定,板内各孔的差异和板之间的差异应小于 10%,最好

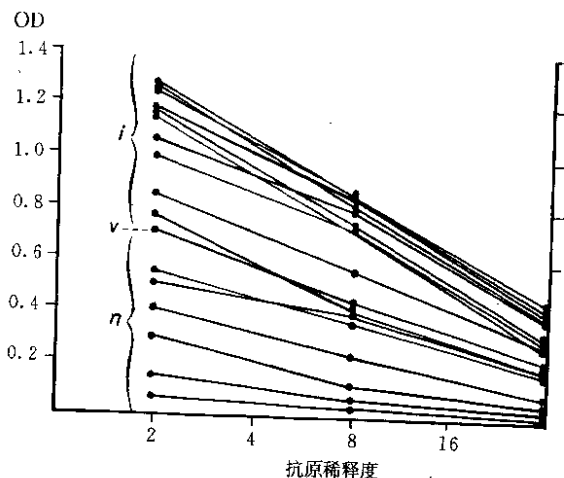


图 1-3 双抗体夹心法检测轮状病毒抗原时不同的
微量板吸附能力的比较

n. 未照射聚苯乙烯板 v. 未照射的聚乙烯板 i. 照射的聚苯乙烯板
小于 5% (见第三章质量控制), 这在某些实验是很难达到的, 特别是一些非蛋白性的抗原吸附于固相。另外, 即使一块板内的变异情况在允许范围之内, 但也可出现板内有些孔高和低值差别过大, 因此避免使用这样的板。如果试验的所有板都有此现象, 那么就要注意是否有其他因素引起这种现象 (如冲洗过程、孵育条件、加样过程和检测方法)。

(二) 包被抗原或抗体

抗原或抗体被动吸附于固相, 其可能是固相与抗原或抗体分子之间的疏水作用而引起的结合, 一般吸附过程是没有问题的, 但在某些实验中很难吸附足够量的抗原或抗体。有一

些预处理固相板的方法可以改善吸附能力,如厂家用射线照射,使用者用乙醇、盐酸、戊二醛或多聚赖氨酸处理板,这些都是比较适用的方法。但有些研究人员不赞成预处理板。Salonen 和 Vaheri 用盐酸、乙醇和戊二醛预处理板不能促进吸附,并且只用戊二醛预处理时还降低结合于固相上的蛋白抗原性。我们的经验是戊二醛和盐酸预处理板不仅促进吸附,而且还能降低非特异反应。用多聚赖氨酸可增强某些多糖抗原的吸附,硫酸鱼精蛋白可促进 DNA 的吸附。包被缓冲液时吸附也有影响,常用的缓冲液有碳酸盐缓冲液(pH 值 9.6)、磷酸盐缓冲液(PBS, pH 值 7.2, 0.1mol/L NaCl)和 Tris 盐缓冲液(0.1mol/L Tris. HCl, pH 值 8.5, 0.1mol/L NaCl)。缓冲液还影响某些方法的敏感性,在用类脂和病毒壳抗原包被时,有必要加入脱氧胆酸钠。将包被的抗体 Fc 段部分变性可以增加敏感性,变性是将抗体溶于 0.5mol/L 的谷氨酸/盐酸缓冲液(pH 值 2.5, 0.1mol/L NaCl)中,室温下放置 10 分钟,然后用 0.5mol/L 的 Tris. HCl 缓冲液中和。

有些单克隆抗体很难吸附于固相,需要试用一些缓冲液和缓冲液的浓度与 pH 值,另外,还要注意包被的条件和包被抗原或抗体的浓度。后面将讨论这两个问题。

(三)最适反应浓度

ELISA 所用试剂最适反应浓度与孵育时间和温度有关(后面将讨论)。通过调节试剂的浓度、孵育时间及温度确定实验方法,使其适用于常规检测,但条件变化将影响实验。

例如用间接法检测抗体时,首先要确定包被抗原和标本的稀释度,这就需用棋盘滴定法滴定。滴定时用已知的强阳性、弱阳性和阴性的标本。对照组在试验时非常重要,特别是

选用的阴性对照,并且在确定实验方法时应具有足够数量的阴性对照。

酸标抗体可以选择几个稀释度,厂家推荐的稀释度只适用于厂家的方法,但是在自己的方法中所用的稀释度接近于厂家推荐的稀释度。

如果包被的抗原或抗体是蛋白质,那么其浓度在 $1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ 之间。包被的最适浓度应选用可得到最高阳性和阴性比值($P:N$)的稀释度,并且阳性对照血清的光密度至少达 0.8。在某些实验中,检测标本中含有高浓度的抗原或抗体,其稀释曲线顺似图 1-4,在这种情况下有必要滴定标本或用标本的几个稀释度准确地检测抗原或抗体的量。酶标抗体的使用浓度是用最适稀释度包被的抗原和标准阳性与阴性对照血清确定。酶标抗体的稀释曲线类似于图 1-4,酶标抗体的使用浓度应是得到最大的 $P:N$ 比值,并且是得到最大光密度时的最高稀释度。

(三)选用试剂

由于存在各种各样的影响因素,使一些实验很难得到高的 $P:N$ 比值。

1. 包被试剂的选择:包被所用的抗原或抗体非常重要,不同来源的抗原变化较大。在有些方法中可用粗制抗原,而有些方法需纯化的抗原。可溶性或难溶性抗原(包括整外细胞)均可应用,但可溶性抗原吸附的均质性好。在某些情况下通过调整缓冲液的 PH 值可使难溶的抗原溶解。包被的抗原应具备稳定性质,并且保持其抗原特异性。有些方法用的抗原是从感染病毒的细胞悬液中提取,而阴性对照抗原则是从未感染病毒的细胞悬液中以同样的方法提取的抗原。值得注意的是某

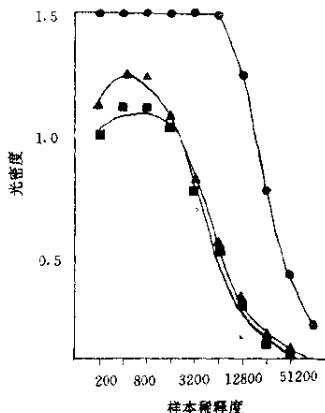


图 1-4 双抗体夹心法检测了 3 份轮状病毒抗原
所显示的“钩状”效应

些病毒感染的细胞膜上表达的抗原与未感染病毒的细胞膜抗原不同。在实验中用阴性对照抗原可以发现标本中存在的非特异性反应物质。

当用抗体包被固相时,最好选用 IgG 部分,如选用全血清包被,那么应该用较高的稀释度,以便排出非特异性因素。用单克隆抗体包被时,其吸附效果差。用抗体的 Fab₂ 段包被固相可以排除抗体 Fc 段产生的非特异反应(类风湿因子)。已包被的固相板在贮存时,包被的抗原或抗体可以从板上游离下来,这与贮存温度、抗原或抗体的性质及缓冲液有关。由于不同来源或不同批次的抗原或抗体变化较大,因此,技师控制