

医学情报资料

酶联免疫吸附技术资料汇编（专辑）

4—5

1979

西安市医学科学研究所情报室

前 言

酶联免疫吸附技术是继免疫荧光技术与放射免疫分析法发展起来的一种新的免疫学技术，它不仅可以检测抗体，还可以检测抗原。具有敏感性高、特异性强、简便、容易观察结果、便于大规模检测的特点；应用范围和程度可与放射免疫分析法相比拟。目前，已开始应用于生物学和医学的许多领域中。它是免疫学中令人瞩目的、有发展前途的一种新技术，有可能代替补体结合试验、血凝试验、免疫荧光技术及放射免疫分析法。

总后勤部卫生部为了推广和普及酶联免疫吸附技术，委托第四军医大学，会同军事医学科学院于今年五月底举办了《全军酶联免疫吸附技术短期学习班》。为尽快介绍这一新技术，征得该教学组同意，将学习班讲稿略加整理、汇编付印，作为本期的专刊。共分两部分：第一部分为有关酶联免疫吸附技术讲课与实习的内容，为保持原讲稿的系统性与完整性，在汇集时对重复的内容未作改动。第二部分为参考资料，为加深对本技术及其应用的理解，增加了几篇译文，以供参考。由于时间仓促，加之我们水平所限，错误之处在所难免，尚希多多给予指正。

西安市医学科学研究所情报室

1979年7月20日

医学情报资料

一九七九年第四—五期 (总55—56期)

酶联免疫吸附技术资料汇编 (专辑)

目 录

第一部分

酶联免疫吸附技术及其应用	汪美先 (1)
酶联免疫吸附试验	朱关福 (13)
硷性磷酸酶与辣根过氧化物酶	陈谦禄 (22)
免疫血清的制备	陈仁馨 (55)
免疫球蛋白G (IgG) 的提取	李恩善 (66)
酶标记物的制备与纯化	吴灿理、薛采芳 (74)
免疫酶测定法及其影响因素	吴灿理 (84)
酶联免疫吸附测定间接法实习指导	
实验一 酶标记抗体的制备	薛采芳 (95)
实验二 白喉抗毒素的测定	李恩善 (96)
实验三 兔抗猪囊虫抗体的测定	吴灿理 (103)
实验四 流行性乙型脑炎抗体的测定	陈仁馨 (105)
实验五 应用ELISA间接法检测腺病毒抗体	朱关福 (107)

附 录

免疫酶技术常用试剂	薛采芳 (116)
商品酶免疫测定法检测人血清中胰岛素的评价及其临床应用	吴灿理摘译 (12)
发光免疫测定法—以化学发光追踪的固相免疫测定法	吴灿理摘译 (12)
第Ⅷ因子相关抗原酶免疫测定法	李恩善摘译 (54)
测定人甲胎蛋白的酶免疫分析法	吴灿理译 (73)

第二部分

免疫酶技术·····	吴灿理 (1)
辣根过氧化物酶标记抗体组织化学技术在病理学中的应用·····	王伯云 (12)

译 文:

酶联免疫吸附试验·····	陈香蕊译、朱关福校 (23)
酶免疫试验及其在病毒诊断中的应用·····	朱关福、柴瑞珍摘译 (32)
酶联免疫吸附测定(ELISA) 微板法应用的文献复习·····	吴灿理译、丁喜成校、汪美先审 (35)

文 摘:

甲胎蛋白双抗体酶免疫测定法·····	吴灿理 摘译 (61)
酶联免疫吸附测定、Ⅱ、用酶标记抗原和抗体包被的试管定量测定蛋白质抗 原免疫球蛋白G·····	吴灿理 摘译 (68)

实验研究

辣根过氧化物酶标记抗体各种因素的探讨·····	薛采芳等 (64)
-------------------------	-----------

附 录

酶联免疫吸附技术参考文献·····	(70)
-------------------	------

酶联免疫吸附技术及其应用

第四军医大学微生物学教研室 汪美先

近20年来,随着免疫学理论的进展,免疫学实验技术也有很大的进展,主要表现抗原与抗体球蛋白的纯化,操作技术的微量化、自动化、标准化,以及荧光素、放射性同位素、酶标记抗体球蛋白技术的应用,大大提高了检测技术的敏感性和特异性。目前广泛应用的免疫荧光技术不易对抗体作定量测定,结果需依靠在荧光显微镜下肉眼观察判定,容易存在主观因素;而用放射性同位素标记抗体或抗原法敏感性高,能定量测定,但标记的同位素很快衰变,因此这种结合物的有效期很短,并且需要复杂的仪器。此外,放射性同位素对试验人员健康有损害,所以必须由经过严格训练的人员去操作。

酶联免疫吸附检测法 (Enzyme—Linked Immunosorbent Assay = ELISA) 又称酶免疫分析法 (Enzyme Immunoassay = EIA) 是Engvall和Perlmann及Van Weeman和Schuurs首先于1971年提出的一种用酶标记抗原或抗体的方法。此法将抗原、抗体的免疫反应和酶的高效催化作用原理有机地结合起来,可敏感地检测体液中微

表1 三种免疫标记技术的优缺点比较

项 目	酶联免疫吸附分 析 法	放射免疫分析法	免 疫 荧 光 技 术
敏 感 性	高	高	一般较低
特 异 性	依赖抗原的制备	依赖抗原的制备	高
可 重 复 性	满 意	满 意	满 意
结 果 判 定	客 观	客 观	一般有主观因素
抗 原 制 备	复 杂	复 杂	容 易
结 合 物	评 价 中	标 准 化	标 准 化
现场 (基层) 使用	容 易 推 广	不 易 推 广	可 能 推 广
操作自动化	可 能	可 能	困 难
试验价格	低 廉	昂 贵	昂 贵
试剂保存时间	长	短	长
对实验人员健康损害	无 或 微 小	存 在	无 或 微 小

量的特异性抗原和抗体。本技术具有敏感性高、特异性强、简便、容易观察结果，便于大规模检测的特点。它的应用范围和程度可与放射免疫分析法相比拟，这不仅充实了血清学试验，并有可能代替补体结合、血凝试验、免疫荧光技术及放射免疫分析法。因此，它是免疫学中令人注目的，有发展前途的一种新的技术。

一、原 理

(一) 用酶标记的抗球蛋白检测抗体（间接法）

间接法(Indirect method)是将抗原吸附于固相载体表面——常用聚苯乙烯等塑料小管、塑料盘或小球等，在这种致敏的载体中加入含有特异性抗体的被检血清，经一定时间孵育后，在固相载体表面形成抗原抗体复合物，经洗涤除去多余的抗体成分。然后加入酶标记的抗球蛋白结合物，它与吸附在固相表面的抗原抗体复合物相结合，再加入酶的底物，在酶的催化作用下，底物发生反应（降解或氧化还原），产生有色产物，通过分光光度计，可测出酶底物的降解量，从而便可推知存在于血清标本中的抗体量(图1)。

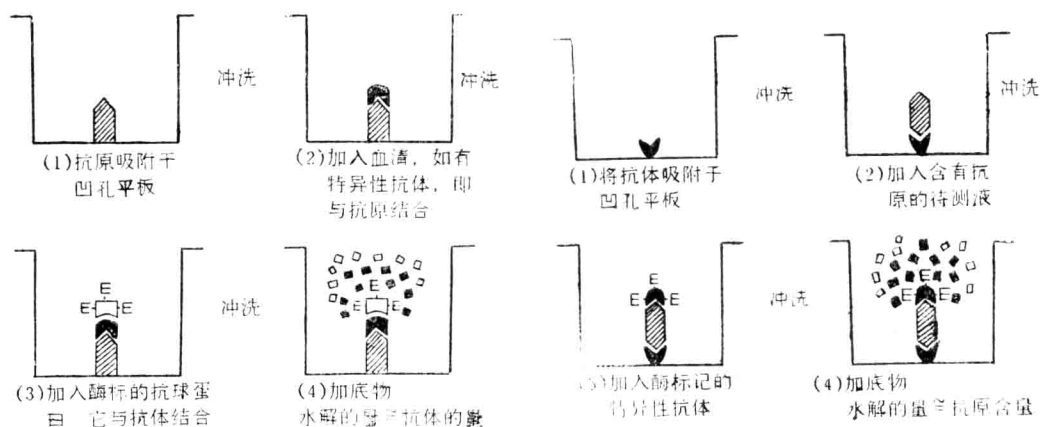


图1 ELISA间接法测抗体

图2 ELISA双抗体夹心法测抗原

(二) 用酶标记特异性抗体检测抗原（双抗体夹心法）

双抗体夹心法(Double antibody sandwich method)是检测抗原的方法。它与间接法不同的是将含有特异性抗体的免疫球蛋白吸附于固相载体表面，然后加入含有抗原的溶液，一起孵育，使抗原与抗体在固相载体表面形成复合物，洗涤除去多余的抗原，再加入酶标记的特异性抗体，经孵育后，使与固相载体表面的抗原结合，再洗涤除去多余的酶抗体结合物，最后加入酶的底物，经催化作用产生有色产物，通过分光光度计检测光密度值，可测知酶底物的降解量，并推知出标本中抗原的含量(图2)。

(三) 用酶标记的抗原检测抗原（竞争法）

竞争法(Competitive method)是将含有特异性抗体的免疫球蛋白吸附于两份相同的固相载体(1)与(2)中，然后分别加入：(1)酶标记的抗原和未知抗原，(2)

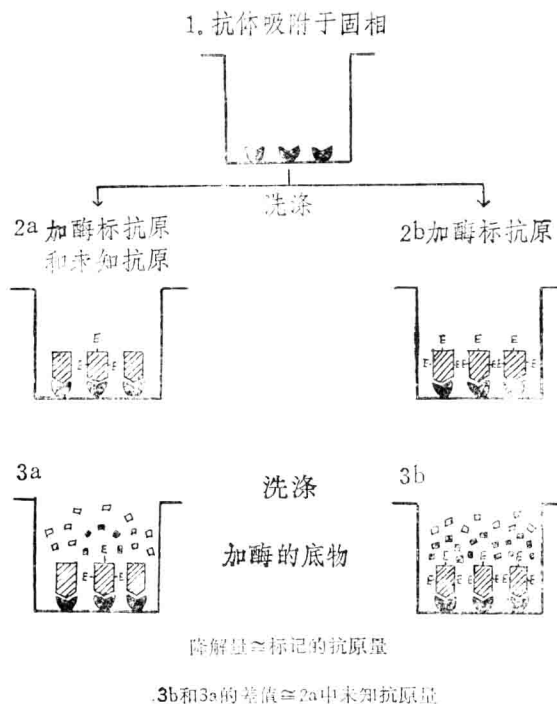


图3 ELISA竞争法测抗原

(一) 固相载体

作为固相载体的物质目前多用聚苯乙烯 (Polystyrene) 等塑料小管, 塑料微量多孔平底血凝盘或塑料小球。尤其是聚苯乙烯微量血凝盘具有稳定、价廉、容易获得、操作方便、使用试剂少、适于大规模应用等优点。当每升溶液中含有 1~10 毫克特异性抗原或抗体时, 在固相载体表面经 4℃ 过夜后, 便能得到满意的吸附。由于聚苯乙烯等对蛋白质的吸附为物理吸附作用, 而不是共价键结合, 因而抗原或抗体在固相载体与液相之间有一平衡, 所以在洗涤、孵育过程中应注意程序的标准化问题。

聚苯乙烯等固相载体吸附蛋白质的条件:

1. 溶液 pH 一般为 pH9.0 左右 (如 pH9.5 的碳酸盐缓冲液), 有人试验认为溶液 pH7.3~9.0 吸附效果相同, 但吸附的时间需延长。如 pH 在 6.0 以下, 则非特异性吸附增多。

2. 孵育时间和温度 选用塑料血凝盘加入抗原或抗体后, 孵育致敏 (吸附) 时间一般为 4℃ 过夜。而加入血清和酶标记抗体 (结合物) 的孵育时间则为 37℃ 2 小时。每一新系统的最适孵育时间和温度通过试验容易确定。若缩短孵育时间, 则结果的精确度就可下降。

3. 蛋白质浓度 每孔 (管) 加入量一般为 0.1~100 μg/ml, 增加蛋白质浓度并不能增加吸附量。

4. 蛋白质种类 各种蛋白质在固相载体表面的吸附能力不同, 对聚苯乙烯微量血凝盘较满意的吸附物质如表 2。

5. 洗涤操作 这项步骤很关紧要, 为的是防止重叠反应。所有血凝盘或小管都要保证

酶标记抗原。经孵育后, 再分别加入底物。被结合的酶标记抗原的量, 由酶催化底物反应产生有色产物的量来确定, 如待检溶液中抗原越多, 被结合的酶标记抗原的量越少, 有色产物就越多。根据有色产物量的变化求出未知抗原的量, 即等于 (1) 与 (2) 底物降解量的差值 (图 3)。

二、试验条件

酶联免疫吸附分析法的 基本要求是: (1) 抗原或抗体能牢固地吸附于固相载体的表面, 并保持其免疫活性。

(2) 酶与抗原或抗体结合, 而且结合后仍保持酶的活性和免疫活性。(3) 底物酶解成可溶性稳定的有色产物, 这三项要求是通过材料准备来实现的。

表 2 适合吸附于聚苯乙烯微量血凝盘的检材

病毒:		
流感病毒		
麻疹病毒		
风疹病毒		
单纯疱疹病毒		感染组织培养的提取物
巨细胞病毒		
柯萨奇B病毒		
流行性乙型脑炎病毒		感染鼠脑的提取物
细菌:		
螺旋体		
霍乱弧菌		脂多糖和“O”抗原
沙门氏杆菌		脂多糖和酚水提取物
布氏杆菌		琼脂斜面上打碎的菌体
梅毒螺旋体		感染家兔的螺旋体,经超声波处理
原虫:		
溶组织内阿米巴		溶解的、超声波处理的原虫,未污染的培养物。
疟原虫		超声波处理的感染红细胞
锥 虫		感染动物或培养虫体溶解后超声波处理
弓浆虫		溶解物或培养物
蠕虫:		
旋 毛 虫		感染大鼠的打碎的幼虫
曼氏裂体吸虫		超声波处理的虫卵或成虫的提取物
丝 虫		成虫盐水浸出液
其他:		
免疫球蛋白		18%硫酸钠沉淀物
特异性抗体		经亲和层析提取物
D N A		小牛胸腺提取物

相同的方式严格清洗。每次洗涤时,应先倒空血凝盘,然后以洗涤瓶在每孔中注满吐温磷酸缓冲液,静置或缓缓振荡五分钟,再倒空,如此反复三次,然后将血凝盘甩干,再加入下一步的试剂。

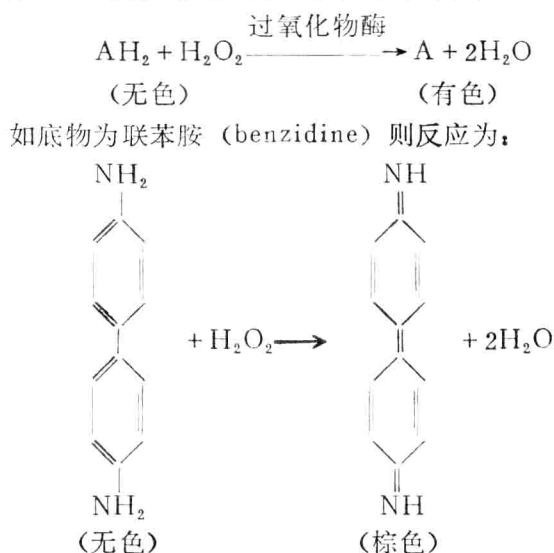
(二) 酶与底物

凡无毒性又能呈现组织化学反应的酶,原则上都可用作免疫学标记。选择酶的要求是:分子量小、稳定、易得,价廉、纯度高、活性强、易于与抗原和抗体结合,而又不明显影响酶的活性和免疫活性,在体液中应不存在,也没有抑制物。目前,常用的有辣根过氧化物酶及硷性磷酸酶,也有用葡萄糖氧化酶等。

1.辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase) 过氧化物酶广泛分布于植物中,

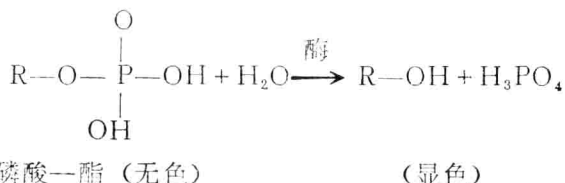
从植物辣根中提取的称为辣根过氧化物酶，这是一种含有铁卟啉的结合蛋白质，分子量约为4万，由多条同功酶组成，等电点在pH5.5~9.0之间。它的活性高，标记抗体能长期保存，比较容易获得（上海生物化学研究所产品）。酶的一级结构还不清楚，约有300个氨基酸，4个双硫键及含有甘露糖、木糖等糖类。由于酶含有铁卟啉，在403nm波长下可呈最大的吸收。酶的纯度常以RZ（为德文Reinheit Zahl的缩写）表示，即在波长403nm下光密度与波长275nm下光密度的比值。高纯度的制品RZ应>3.0（酶活性应>250单位/毫克），RZ值越小，含杂蛋白越多，如RZ为0.6的制品中约75%的蛋白质不是酶。

过氧化物酶的活性可由分解 H_2O_2 ，将联苯胺等物质氧化产生有色产物来测定：



过氧化物酶的活性单位，以一定条件下降解一定量 H_2O_2 或产生一定量有色产物而定。可作为过氧化物酶底物的有：（1）邻苯二胺（O-phenylenediamine 简称O·P·D），产物桔黄色，可溶性，敏感性高。（2）邻联茴香胺（O-dianisidine简称O·D）产物深桔黄色，可溶性。（3）5-氨基水杨酸（5-Amino-salicylic acid简称5-AS）产物紫棕色，部分溶解，敏感性较差。（4）邻联甲苯胺（O-tolidine简称O·T），产物为兰色，部分溶解，不稳定，但反应快，颜色显明。

2. 硷性磷酸酶（Alkaline phosphatase）这是一种磷酸—酯酶，其作用为催化磷酸—酯水解，放出无机磷酸而显色：



也可通过磷酸—酯水解产生磷酸与钼酸反应生成磷钼酸，在还原剂（如1-氨基-2-萘酚—4-磺酸）作用下产生兰色的产物钼兰进行测定。

常用的底物有4-硝基酚磷酸盐（4-Nitrophenyl phosphate），价廉，无毒性，它的水解产物呈现清晰的黄色。最大吸收峰在400nm处。

(三) 抗体球蛋白

在酶标记过程中, 抗体的活性将有所降低, 故需选用纯度高、效价高、与抗原亲和力强的抗体球蛋白; 这样可以减少非特异性染色, 提高敏感性, 而且可稀释使用, 以节省价格昂贵的酶。因此常需用亲和层析法提纯抗体。

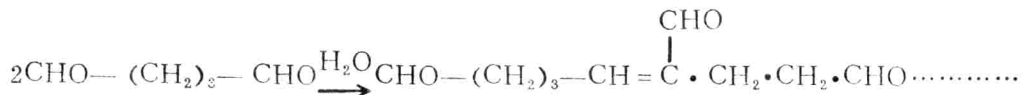
(四) 抗原

纯化抗原是提高酶联免疫吸附试验的敏感性与特异性的关键。若抗原为可溶性物质或蛋白质微粒, 例如小病毒等比较容易直接吸附于固相载体表面。但较大的病毒、细菌或寄生虫等则难于吸附, 需要将它们用超声波打碎或用化学方法提取抗原成分, 才能供作试验。有些抗原含有多种杂蛋白, 则须先用密度梯度离心等方法加以除去, 否则易出现非特异性反应。抗原用前必须经过检查, 首先抗原要能吸附于固相载体表面, 然后要确定合适的抗原稀释度, 并要求不出现前带现象, 阳性和阴性血清结果差距要大, 一般要求差10倍。

(五) 结合剂

理想的结合剂应当是产率高, 结合物稳定, 不影响酶的活性和免疫球蛋白的活性, 不产生干扰物质, 操作简便。目前用于使酶和抗体交联的大多使用双功能试剂。以戊二醛 (glutaraldehyde) 为交联剂的较多, 其次有用氟二硝基苯 (fluorodinitrobenzene) 加过碘酸钠 (NaIO_4) 还有用二氟二硝基苯酮等。

戊二醛商品为25%水溶液, 其醛基与酶及免疫球蛋白上的自由氨基共价结合。标记免疫球蛋白的质量与戊二醛的纯度有关。戊二醛纯品 (单体) 在280nm波长具有最大的吸收值, 保存时间长的戊二醛由于醛基可自身缩合:



而失去结合剂的作用。缩合的戊二醛在235nm出现最大的吸收。为了使结合物的产量提高 ($\text{OD}_{235\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ 的比值要小), 所以应该用新鲜的戊二醛。保存时间长的戊二醛, 其缩合物增加, 如保存两年的制品所含杂质 (缩合物) 要比新鲜制品多15倍。对这种不纯的制品可通过重蒸馏或用Sephadex G—10过滤提纯。由于过氧化物酶上的活性氨基少, 用戊二醛标记的结合物产率低, 一般只有2~4%的酶与免疫球蛋白结合, 比过碘酸钠法产率低。

用氟二硝基苯加过碘酸钠法主要是将过氧化物酶表面的糖分子部分氧化成醛基, 然后与免疫球蛋白的氨基结合, 这样就提高了酶和免疫球蛋白的结合率。据报导, 过碘酸钠法可将70%的酶与抗体球蛋白结合, 而抗体球蛋白99%能被酶结合上。

(六) 酶标记抗体—结合物 (酶联免疫球蛋白)

酶标记免疫球蛋白中, 难免存在游离酶、游离免疫球蛋白、酶聚合体和/或免疫球蛋白聚合体。游离酶虽不严重影响特异性反应, 但能出现背景着色, 游离球蛋白对标记球蛋白有竞争作用, 可降低特异性反应的强度, 因此需要以硫酸铵盐析法、Sephadex G—200 (或G—150) 凝胶过滤等法加以提纯。

鉴定酶与免疫球蛋白是否已经结合, 以及结合物有无酶的活性和免疫活性, 可用抗免疫球蛋白作琼脂扩散和/或免疫电泳, 然后对沉淀线以酶的底物显色, 显色后以生理

盐水浸泡颜色不退,作为酶活性的鉴定。也可用相应的阳性血清作实际鉴定。经提纯和鉴定的酶联免疫球蛋白,可过滤除菌封入安瓶,贮于4℃。结合物也可冻干保存,但不耐反复冻融。目前最方便的保存法,是加入30~40%甘油,置于4℃保存,浓的结合物,可保存1~2年;但稀释1:10后,只能保存数周,所以配成的用液要在12小时内用完。

(七) 标准化

提高酶免疫检测质量的关键在于适当的标准化,这可根据使用的参考制品而获得。在测定抗体时,应采用由一组具有高滴度抗体效价的混合血清作为参考制品,最好分装小瓶后,冷冻真空干燥保存。在每一批试验时,都应包括稀释的这种阳性参考血清和稀释的阴性参考血清。

抗原的标准化较为困难,除非采用纯化抗原。如用粗制抗原,最重要的是它们的活性。即便是抗原本身不纯,但可根据参考品试验方式表示。而生物化学的鉴定(如蛋白含量),每不能经常地表示其生物学活性,如果仅以此来表示,常导致错误。

(八) 结果判定

1. 目测法 将塑料盘置于白色背景上,用肉眼观察结果。每批试验都需要阳性和阴性标本作对照。如颜色反应超过阴性对照,即为阳性结果。若用不同稀释度的标本作试验,也可获得滴度。

2. 分光光度计检测法 在准备的空白对照的调零下,可获得精确的结果。结果以吸收值来表示。测定抗体吸收值的范围,可根据正常人群的吸收值来确定,选用对照水平以上的某吸收值作为指标。如超过这一数值,则可判为阳性;如低于这一数值,则判为阴性。“阳性”与“阴性”者的值常有轻微的重叠,根据参考标本制备用双抗法检测的有关抗原的标准曲线,从此标准曲线上可读出未知标本的值。所有血清可用一系列稀释度来滴定,然后选择一吸收值为阳性标准,产生这一吸收值的血清稀释度,即为其“滴度”。

三、在检验诊断中的应用

(一) 细菌学中的应用

酶联免疫吸附分析法在应用于测定传染病的抗体,具有重大发展前途,本法能相当准确地测出人体沙门氏菌抗“O”抗体,其敏感性比肥达氏反应要高,而且重复性良好。也有应用本法检测霍乱免疫后的各类免疫球蛋白抗体;还发现本法可用于研究艾氏大肠杆菌和布氏杆菌的抗体。

最近报导本法也可能广泛地应用于食品细菌学的检查,例如检测葡萄球菌肠毒素等。其检测葡萄球菌肠毒素的敏感性估计可与放射免疫分析法和反向间接血凝试验相比拟。检测白喉抗毒素较单向放射免疫扩散法敏感一万倍,较家兔皮肤试验法敏感10倍。

结核杆菌的检验诊断历来主要依靠细菌学提供的证据。有报告用本法检测46例细菌学确诊的结核血清和48例对照血清,检出相应抗体的结果如表3。

下表结果表明:1:100血清稀释度在结核病人和对照血清之间有明显的差异。肺外结核病人血清的ELISA值低于肺结核病人。

表 3 结核病人血清酶联免疫吸附试验检测抗体的结果

血 清	肺 结 核	肺 外 结 核	对 照 血 清
血清份数	37	9	48
1 : 1 0 0 稀释血清平均ELISA值	0.374	0.210	0.112
1 : 5 0 0 稀释血清平均ELISA值	0.194	0.085	0.071
ELISA 值比对照平均值高的百分率 (试验血清分数)			
1 : 1 0 0 稀释血清	84 (31)	67 (6)	8 (4)
1 : 5 0 0 稀释血清	62 (23)	33 (3)	2 (1)

1:500血清稀释时, 偶有出现不同的比例结果。作者认为由于所用的复合抗原, 强阳性血清中可能含有某些对分枝杆菌共同抗原交叉反应的抗体, 在低稀释度时即可出现。也可能对照人群中有些以前接种过卡介苗或某些具有对分枝杆菌共同抗原的非分枝杆菌抗原, 从而使之轻度致敏。如采用特异性抗原, 还可能增加试验特异性。作者认为, 已证明本法是检测结核杆菌抗体的一种满意方法, 重复性好, 适用于测定大量血清标本, 且可能采用自动化。

(二) 病毒学中的应用

1. 病毒抗体的检测 采用抗Ig血清与硷性磷酸酶或辣根过氧化物酶结合, 以检测一部分病毒的抗体是切实可行的。对于流行性乙型脑炎病毒等抗体, 用血凝抑制、中和及酶联免疫吸附检验法检验, 已证明有良好的相关性。并还可检测流感、腺病毒、柯萨奇B病毒、单纯疱疹、麻疹、风疹及巨细胞病毒感染病人血清中的抗体, 证明与对照的正常人血清有明显差异。本法在病毒诊断方面的优越性, 在于它能检测任何抗体, 并适用于大规模标本的检测。

表 4 流行性乙型脑炎病人血清用血凝抑制、酶联免疫吸附及中和试验检测结果

病 人 血 清	急 性 期 血 清			恢 复 期 血 清		
	血凝抑制	ELISA	中和试验	血凝抑制	ELISA	中和试验
1	640	0.62	2,200	2,560	1.35	4,400
2	640	0.65	2,200	2,560	1.6	4,400
3	40	0.37	280	320	0.76	2,200
4	80	0.67	550	640	1.3	2,200
5	10	0.49	69	2,560	1.7	4,400
6	20	0.43	140	80	1.1	550
7	10	0.11	63	640	0.58	3,500

- 注 1. 使抗原吸附血凝盘表面是用放置 4℃冰箱过夜方法。
 2. 加入稀释被检血清后, 于室温 (25℃) 放置 2 小时。
 3. 加入稀释的酶标记抗球蛋白结合物在室温作用 2 小时。
 4. 加入酶底物溶液后室温作用 30 分钟。
 5. 以 400nm (毫微米) 波长分光光度计检测的光密度值。

表5 各种病毒性疾病病人不同稀释度血清酶联免疫
吸附法检测的光密度值

抗 原	血 清	血 清 稀 释 度			
		1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800
腺 病 毒	+	1.1	0.93	0.69	0.47
	-	0.18	0.1	0.14	0.14
柯萨奇B病毒	+	0.59	0.34	0.29	0.16
	-	0.19	0.14	0.08	0.04
单纯疱疹病毒	+	0.73	0.71	0.49	0.38
	-	0.02	0.02	0	0
麻 疹 病 毒	+	1.3	1.15	0.9	0.78
	-	0.4	0.35	0.27	0.18
巨 细 胞 病 毒	+	1.02	0.87	0.57	0.49
	-	0.05	0.06	0.09	0.07

注：1. 酶联免疫吸附分析法操作步骤同前表。

2. 每份阳性血清是从确诊的病人采得。

2. 病毒抗原的检测 除人疱疹病毒外，本法检测人类病毒尚未见报导。最近已有用双抗法检测乙型肝炎表面抗原的报导。采用山羊抗乙型肝炎抗体(抗—HBs)免疫球蛋白致敏(吸附)血凝盘底面，用酶标记的同样山羊抗—HBs免疫球蛋白检出结合的相应抗原。大多数乙型肝炎病人都可检出，但存在着假阳性或假阴性。还需要进一步的研究。

最近，有报导用本法检测两种植物病毒抗原，测定南芥菜花叶病毒(*Arabis mosaic virus*)的最低浓度达80毫微克/毫升，测定洋李痘疱病毒(*Plum pox virus*)的最低浓度为10毫微克/毫升，对两种病毒的反应都是特异性的。作者认为本法简易、敏感性高、特异性强、适用现场检验。有助于流行病学调查，尤其对病毒浓度低，引起症状不明显的病毒，更为适用。

此外，用本法可快速检出生殖道与眼部的衣原体。也可检测梅毒病人的抗体，具有简单、快速、可靠，其敏感性与荧光螺旋体吸收试验相同，而且有特异性高的特点。应用本法检测五日热立克次氏体(*R. quintan*)感染引起的战壕热病人的抗体，较补体结合试验及反向凝集试验敏感，而且比放射免疫分析法稳定。还可用于检测念珠菌抗原，检测念珠菌病与第状菌病病人的抗体。

(三) 寄生虫学中的应用

1975年应用本法于原虫感染和蠕虫感染以来，主要有以下的报导。

1. 微量血凝盘检验法用于疟疾的小规模血清流行病学研究，其结果有可能识别那些区域是地方性流行区，那些是已根除的地区。用试管全量法调查了伊朗和坦桑尼亚的疟疾病人，几乎所有的疟疾病人都可能被检出。初步表明，本法与间接血凝试验有相似的结果，而较免疫荧光法为优，但也与间接血凝试验一样不能检出早期感染的缺点。本法试

验中,虽在几种人体疟原虫之间有交叉反应,但某些间日疟患者对恶性疟原虫抗原可呈阴性反应。

2. 以溶组织内阿米巴作为抗原,用微量血凝法检测结果,证明对照血清的ELISA值低于阿米巴肝脓肿病例,并证明其重复性很高,对阿米巴痢疾的研究正在进行。

3. 用本法检验血吸虫病的抗体,以纯化抗原可增进其特异性。并也证明其重复性良好,适用于流行病学调查。应用双抗体法检测血吸虫病循环抗原,几乎所有病人都有较高的数值,而对照者的数值大多较低。测定循环抗原,可作为现有感染或新近感染的一个有用的指标,并可能具有考核化疗的价值。

4. 使用纯化抗原,检测包囊虫病具有高度特异性与敏感性;如用不纯抗原则存在交叉反应。

5. 用本法研究感染猪旋毛虫病人的特异性抗体的免疫球蛋白类属,它与间接血凝法一样敏感,并较免疫荧光法敏感。对于大规模过筛检查猪群也是有用的。

此外,也有报导应用于利什曼病,美洲及非洲锥虫病等的研究,均证明与间接血凝试验及免疫荧光法结果一样良好,而本法则较简易。

(四) 免疫病理学中的应用

1. 用本法检测兔IgG定量及人IgE定量,它的敏感范围在1—100微克/升之间。

2. 用本法检测红斑狼疮中的DNA抗体,虽出现一定的不稳定性,但其结果是令人抱有希望的。

3. 用酶标记抗原或标记抗球蛋白法,定量检测甲胎蛋白也获得良好的结果。

4. 最近用本法检测免疫凝固素(Immunocoaglutinin=IKS),在自身免疫性疾病、细菌及寄生虫感染时,免疫凝固素都有升高,有些病例升高达5万倍。

(五) 血液学中的应用

用酶免疫双抗体法检测血浆中的第Ⅷ因子相关抗原,它与目前采用的复杂的电泳一样有用,而且更适用于大规模的标本检查。初步试验表示,本法同样可用于检测纤维蛋白降解产物。

(六) 内分泌学中的应用

用酶免疫竞争法成功地用于研究检测人体绒毛膜促性腺激素,促黄体激素及雌激素。证明酶免疫法几乎与放射免疫法同样敏感,至少在人绒毛膜促性腺激素的检测中可得到高度的精确度,但要应用于实验室常规,还有一些问题需要解决。

四、展 望

早期的经验已显示酶联免疫吸附分析法的优点。预计本法将沿着两方面发展:一方面是在中心实验室向代替放射免疫分析法发展,这就要求高度精确的技术以及与自动化结合。用一个分配器,一个分光光度计,一个洗涤装置及一个传送机械,就可装配成一条流水作业,每天可检查4000份标本。可应用于激素分析,血液因子测定,或甲胎蛋白的过筛试验等。另一方面是向适于基层和现场检验发展,要求简便(用肉眼或简单的仪器读取结果),节约,精确度略低,可统一提供一种内装有试剂和简单仪器的检测箱。

目前用微量血凝聚苯乙烯盘的检测法可能广泛地应用于早期妊娠和传染病早期快速诊断的过筛试验,对布氏杆菌,沙门氏杆菌,霍乱弧菌等的抗体及葡萄球菌肠毒素等的检出已看出苗头。对检测疟疾,血吸虫病等的初步结果看来也很有希望。在兽医和农业方面的诊断也有广阔前途。

在方法学上近年来又有进展,除间接法、双抗体(夹心)法及竞争法外,主要的还有:

(一) **双夹心法** (Double sandwich method) 用酶标记抗体检查多种大分子抗原。操作原则是: (1) 将抗体(例如豚鼠免疫血清)吸附于固相载体表面,洗去未吸附的抗体,加入含待测抗原的标本,使起致敏固相作用,洗去未起反应的样品,再加入不同种动物制出的相同抗体(例如家兔免疫血清),使起反应。(2) 洗涤后,加入酶标抗体相应第二抗体的动物球蛋白(例如羊抗兔球蛋白),使起作用;洗涤后,加入酶的底物,产生的颜色变化与标本中抗原量成比例。本法不仅可以免去标记每种抗体,还可提高试验的敏感性。

(二) **酶抗酶法** (Enzyme-anti enzyme method) 利用抗酶抗体与酶的免疫反应,使酶间接结合于抗原。操作原则是: (1) 将抗原吸附于固相载体表面,洗去未吸附的抗原,加入待检抗体的标本(例如兔血清),孵育后洗涤,加入同种球蛋白(例如羊抗兔球蛋白); (2) 孵育后洗涤,再加入抗酶抗体(抗酶免疫兔血清),孵育后洗涤,加入酶,起免疫性结合反应,洗涤后,加入酶底物,产生的颜色变化与标本中抗体量成比例。若测定的是人血清,则因不能制作人抗酶血清,所以还需要加上一层动物抗人抗体。例如:抗原—人血清(待检抗体)—兔抗人球蛋白—羊抗兔球蛋白—抗酶兔免疫血清—酶—底物。本法可提高试验的敏感性,但因制作理想的抗酶抗体不容易,试验中干扰因素又较多,每影响结果的准确性,因此目前较少使用。

(三) **免疫酶测量试验** (Immuno—enzymometric assay) ——利用酶标记抗体检测待检标本中的抗原。本法主要用于检查难以制作成酶标记的抗原或半抗原。操作原则是: (1) 使待检抗原的标本与过量酶标记抗体起作用,然后加入过量的固相抗原,使与剩余的游离酶标记抗体起反应,除去固相,测量酶的活性,它与待测抗原的浓度相关。

(四) **均相酶免疫试验** (Homogeneous enzyme immunoassay) 又称酶放大免疫试验 (Enzyme multiplied immunoassay technique,简称EMIT) 本法是利用竞争原理检测小分子的半抗原,乃将样品(含小分子半抗原),酶标记半抗原及相应抗体混合起反应,然后测酶的作用,如样品中没有半抗原,则酶标半抗原与抗体结合,酶的作用受抑制,故又有称为酶抑制免疫试验。若样品中有半抗原,就与抗体结合,则游离的酶标记半抗原上的酶就能起作用,说明待检样品中半抗原的量与酶降解底物的量成正比。本法比ELISA法敏感性低,但用本法可不经提纯或分离手续,能快速地检出小量体液中的药物、激素等的浓度,也可检测小分子的毒素,如葡萄球菌肠毒素等。

但是,酶联免疫吸附检验法在技术上还存在如下问题:

1. 吸附抗体或抗原用的聚苯乙烯血凝盘或管的质量问题。某些工作者报告所用的血凝盘(管)不够理想,尤以抗体吸附时,则遇到的问题较多。每批塑料盘(或管)事先应

作予试验。

2. 抗体——酶结合物的制备方法还需改进。

3. 若标记抗体不纯，固定方法不妥，试剂浓度过高及洗涤不彻底都可影响结果。

4. 本法特异性评价的资料还不够完善，因此出现非特异性反应时不易解释。最近曾证实病人的脑组织中及呼吸道分泌物的炎症细胞中存在内源性过氧化物酶 (endogenous peroxidase) 的活力。此种酶的活力常不易除去，当除去时对病毒抗原有破坏作用。此外，葡萄糖氧化酶等也有影响。

商 品 酶 免 疫 测 定 法

检测人血清中胰岛素的评价及其临床应用

(摘 要)

作者等报导，使用胰岛素酶免疫测定检测箱（日本东京Mochida药剂有限公司出品），根据“夹心法”的原理，以抗一胰岛素血清包被的小珠和过氧化物酶标记的抗一胰岛素血清，进行人血清中胰岛素的酶免疫测定。用5—氨基水杨酸作为酶反应的底物。血清中胰岛素的量少至每升含5个毫国际单位的胰岛素尚可测出。重复性令人满意。但浓度很高的胰岛素原和氢供体（如还原型谷胱甘肽）会影响测定的结果。作者等用酶免疫测定法测定的值和用双抗体放射免疫测定法测定的值高度相关（ $r = 0.938$ ， $P < 0.001$ ， $n = 216$ ）。作者推荐将此法用于临床实验室。

吴灿理译自 Clin.Chem.25/1, 35—38, 1979。

发光免疫测定法——以化学发光追踪的固相免疫测定法

(摘 要)

作者发展了一种利用化学发光的鲁米诺 (Luminol, 即氨基苯二酰一胂) 反应以血红素作催化剂的发光免疫测定法 (Luminescence immunoassay, LIA)。用商品供应的山羊抗兔IgG—辣根过氧化物酶 (作为血红素的来源) 结合物，在抗原包被的塑料管中，定量测定兔抗人血清白蛋白。用LIA测定抗体的范围远比酶免疫测定法为宽。出现与测定活性的时间短而稳定，使此法适于自动化。在目前情况下，LIA比相同的酶免疫测定法敏感性稍低，但逐日的重复性较好。

吴灿理译自 J.Immunological Methods, 25: 127—135, (1979)。

酶 联 免 疫 吸 附 试 验

军事医学科学院 朱关福

一、酶免疫试验在血清学试验中的地位

免疫血清学试验是一项有关抗原、抗体的古老而又不断发展的方法，它被用于定性或定量检查复杂生物体液中的成分。人们熟知的沉淀试验、凝集试验、补体结合试验及中和试验等都是利用抗原抗体反应特异性而建立的诊断方法。为提高方法的敏感性，人们采用各种标记措施使结果放大，这包括：被动血凝试验(Passive hemagglutination test)及被动血凝抑制试验(Passive hemagglutination inhibition test)——将抗原或半抗原结合于血细胞；病毒免疫试验(Viroimmunoassay)——将小分子或蛋白质贴附于噬菌体；免疫荧光试验(Fluroimmunoassay)——在抗体上标记以荧光色素；自旋免疫试验(Spin immunoassay)或自由基试验(Free radical assay technique)——在小分子上结合以含不成对电子的稳定自由基如氧化亚氮(nitroxide)，这种方法的敏感性不如放射免疫试验，最近加用致敏的脂粒体(Liposome)称为膜免疫试验(Membrane immunoassay)，显著提高了敏感性。放射免疫试验(Radio immunoassay)——用放射性同位素如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 标记抗原、半抗原或抗体；酶免疫试验(Enzyme immunoassay)，将合适的酶结合于抗原、半抗原或抗体。

在标记免疫试验中目前研究及应用较广的是免疫荧光试验及放射免疫试验，但这两者在有些方面不如酶免疫试验；酶是触媒剂，作用快速、敏感，许多酶能在一分钟内催化形成 10^6 产物分子，这种放大作用使酶免疫试验的敏感性比免疫荧光试验要高得多，

三 种 标 记 免 疫 试 验 的 比 较

比 较 项 目	酶 免 疫 试 验	放 射 免 疫 试 验	免 疫 荧 光 试 验
敏 感 性	高	高	通 常 较 低
特 异 性	高	高	高
标 记 物 保 存 时 间	长	短	长
操 作 条 件	一 般 实 验 室	需 有 防 护 设 备	需 在 暗 室 中 看 结 果
观 察 结 果	可 用 肉 眼 定 性 观 察， 应 用 分 光 光 度 计 可 作 定 量 检 查	应 用 液 体 闪 烁 仪 或 γ 计 数 器 作 定 量 检 查	应 用 荧 光 显 微 镜 作 定 性 检 查。
自 动 化 操 作	易 行，成 本 较 低	可 行，成 本 较 高	较 难