



酶联免疫检测实验的原理和技术要点

一、基本原理

1971 年 Engvall 和 Perlmann 发表了酶联免疫吸附剂测定 (enzymelinkedimmunosorbentassay, ELISA) 用于 IgG 定量测定的文章, 使得 1966 年开始用于抗原定位的酶标抗体技术发展成液体标本中微量物质的测定方法。这一方法的基本原理是: ①使抗原或抗体结合到某种固相载体表面, 并保持其免疫活性。②使抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体, 这种酶标抗原或抗体既保留其免疫活性, 又保留酶的活性。在测定时, 把受检标本 (测定其中的抗体或抗原) 和酶标抗原或抗体按不同的步骤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其他物质分开, 最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例。加入酶反应的底物后, 底物被酶催化变为有色产物, 产物的量与标本中受检物质的量直接相关, 故可根据颜色反应的深浅刊物定性或定量分析。由于酶的催化频率很高, 故可极大地地放大反应效果, 从而使测定方法达到很高的敏感度。

二、主要的检测模式

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 3 种必要的试剂: ①固相的抗原或抗体, ②酶标记的抗原或抗体, ③酶作用的底物。根据试剂的来源和标本的性状以及检测的具备条件, 可设计出各种不同类型的检测方法。

(一) 双抗体夹心法

双抗体夹心法 (图 15-4) 是检测抗原最常用的方法, 操作步骤如下:

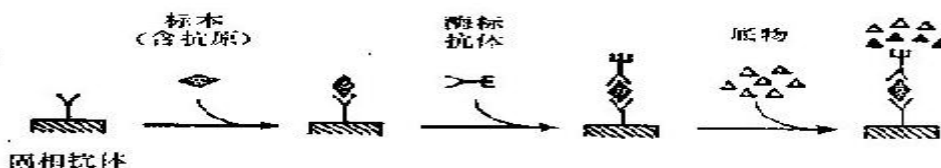


图 15-4 双抗体夹心法测抗原示意图

(1) 将特异性抗体与固相载体连接，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：使之与固相抗体接触反应一段时间，让标本中的抗原与固相载体上的抗体结合，形成固相抗原复合物。洗涤除去其他未结合的物质。

(3) 加酶标抗体：使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物质的量正相关。

(4) 加底物：夹心式复合物中的酶催化底物成为有色产物。根据颜色反应的程度进行该抗原的定性或定量。

根据同样原理，将大分子抗原分别制备固相抗原和酶标抗原结合物，即可用双抗原夹心法测定标本中的抗体。

(二) 双位点一步法

在双抗体夹心法测定抗原时，如应用针对抗原分子上两个不同抗原决定簇的单克隆抗体分别作为固相抗体和酶标抗体，则在测定时可使标本的加入和酶标抗体的加入两步并作一步（图 15-5）。这种双位点一步不但简化了操作，缩短了反应时间，如应用高亲和力的单克隆抗体，测定的敏感性和特异性也显著提高。单克隆抗体的应用使测定抗原的 ELISA 提高到新水平。

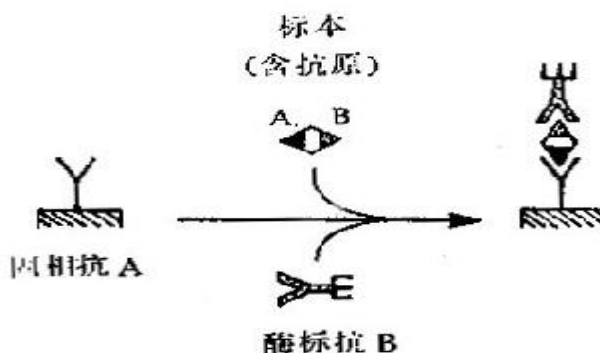


图 15-5 双位点一步法示意图

在一步法测定中，应注意钩状效应（hook effect），类同于沉淀反应中抗原过剩的后带现象。当标本中待测抗原浓度相当高时，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，所得结果将低于实际含量。钩状效应严重时甚至可出现假阴性结果。

（三）间接法测抗体

间接法（图 15-6）是检测抗体最常用的方法，其原理为利用酶标记的抗抗体以检测已与固相结合受检抗体，故称为间接法。操作步骤如下：

（1）将特异性抗原与固相载体连接，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：其中的特异抗体与抗原结合，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。其他免疫球蛋白及血清中的杂质由于不能与固相抗原结合，在洗涤过程中被洗去。

（3）加酶标抗体：与固相复合物中的抗体结合，从而使该抗体间接地标记上酶。洗涤后，固相载体上的酶量就代表特异性抗体的量。例如欲测人对某种疾病的抗体，可用酶标羊抗人 IgG 抗体。

（4）加底物显色：颜色深度代表标本中受检抗体的量。

本法只要更换不同的固相抗原，可以用一种酶标抗抗体检测各种与抗原相应的抗体。

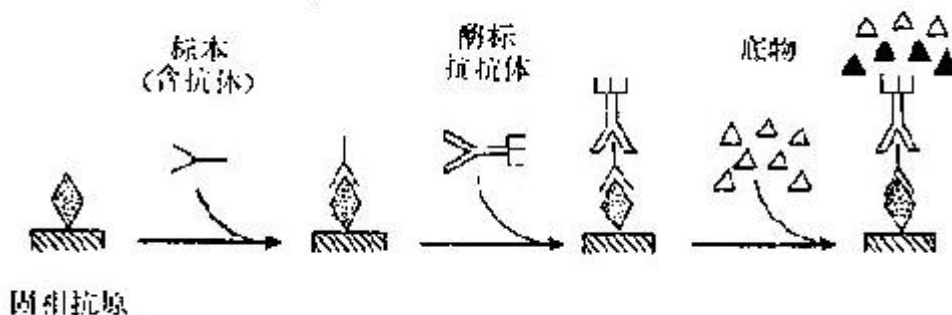


图 15-6 间接法测抗体示意图

（四）竞争法

竞争法（图 15-7）可用于测定抗原，也可用于测定抗体。以测定抗原为例，受检抗原和酶标抗原竞争与固相抗体结合，因此结合于固相的酶标抗原量与受检抗原的量呈反比。操作步骤如下：

（1）将特异抗体与固相载体连接，形成固相抗体。洗涤。

（2）待测管中加受检标本和一定量酶标抗原的混合溶液，使之与固相抗体反应。如受检标本中无抗原，则酶标抗原能顺利地与固相抗体结合。如受检标本中含有抗原，则与酶标抗原以同样的机会与固相抗体结合，竞争性地占去了酶标抗原与固相载体结合的机会，使酶标抗原与固相载体的结合量减少。参考管中只加酶标抗原，保温后，酶标抗原与固相抗体的结合可达最充分的量。洗涤。

（3）加底物显色：参考管中由于结合的酶标抗原最多，故颜色最深。参考管颜色深度与待测管颜色深度之差，代表受检标本抗原的量。待测管颜色越淡，表示标本中抗原含量越多。

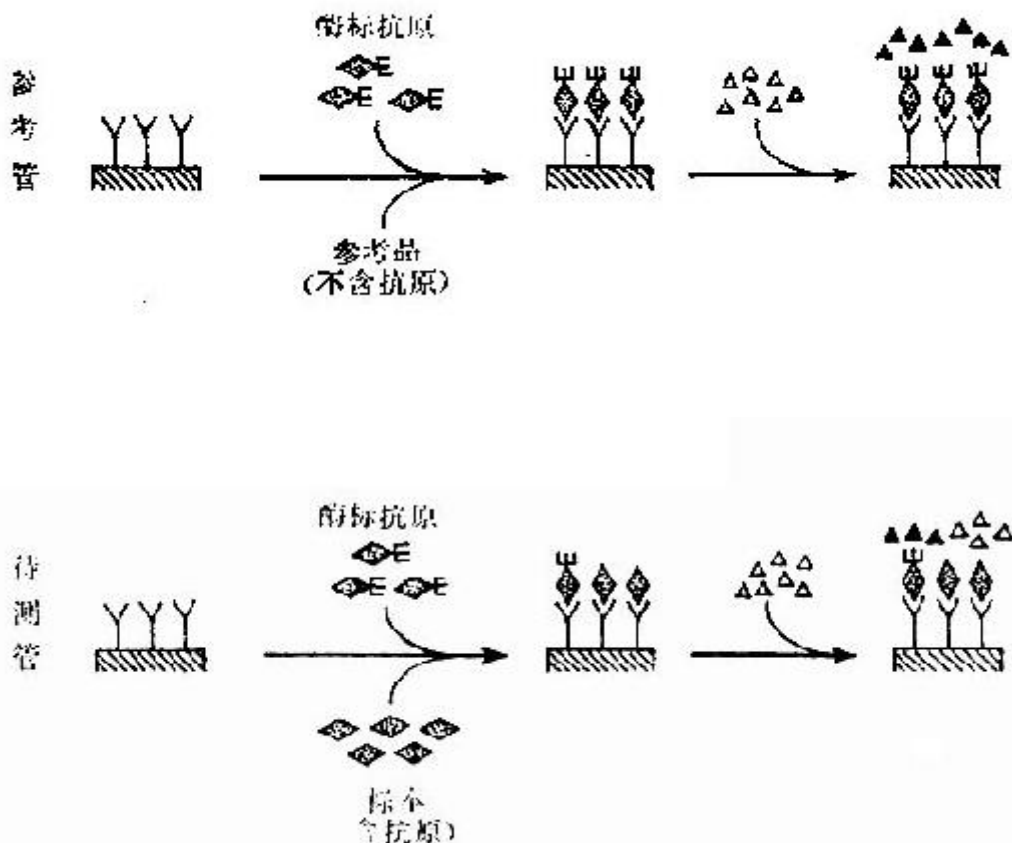


图 15-7 竞争法测抗原示意图

(五) 捕获法测 IgM 抗体

血清中针对某些抗原的特异性 IgM 常和特异性 IgG 同时存在，后者会干扰 IgM 抗体的测定。因此测定 IgM 抗体多用捕获法（图 15-8），先将所有血清 IgM（包括异性 IgM 和非特异性 IgM）固定在固相上，在去除 IgG 后再测定特异性 IgM。操作步骤如下：

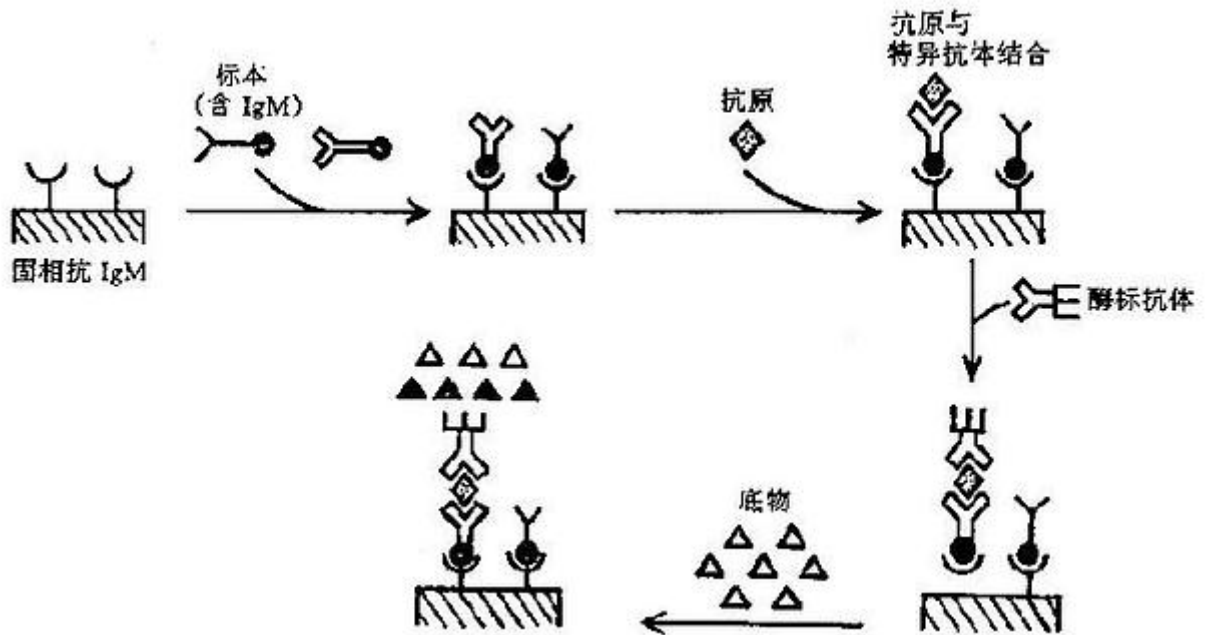


图 15-8 捕获法测 IgM 抗体示意图

- (1) 将抗人 IgM 抗体连接在固相载体上，形成固相抗人 IgM。洗涤。
- (2) 加入稀释的血清标本：保温反应后血清中的 IgM 抗体被固相抗体捕获。洗涤除去其他免疫球蛋白和血清中的杂质成分。
- (3) 加入特异性抗原试剂：它只与固相上的特异性 IgM 结合。洗涤。
- (4) 加入针对特异性的酶标抗体：使之与结合在固相上的抗原反应结合。洗涤。
- (5) 加底物显色：如有颜色显示，则表示血清标本中的特异性 IgM 抗体存在，是为阳性反应。

(六) 应用亲和素和生物素的 ELISA

亲和素是一种糖蛋白，可由蛋清中提取。分子量 60kD，每个分子由 4 个亚基组成，可以和 4 个生物素分子紧密结合。现在使用更多的是从链霉菌中提取的链霉亲和素 (streptavidin)。生物素 (biotin) 又称维生素 H，分子量 244.31，存在于蛋黄中。用化学方法制成的衍生物，生物素一羟基琥珀亚胺酯 (biotin-hydroxysuccinimide, BNHS) 可与蛋白质、糖类和酶等多种类型的大小分子形成生物素化的产物。亲和素与生物素的结合，虽不属免疫反应，但特异性强，亲和力大，两者一经结合就极为稳定。由于 1 个亲和素分子有 4 个生物素分子的结合位置，可以连接更多的生物素化的分子，形成一种类似晶格的复合体。因此把亲和素和生物素与 ELISA 偶联起来，就可大提高 ELISA 的敏感度。

亲和素一生物素系统在 ELISA 中的应用有多种形式，可用于间接包被，亦可用于终反应放大。可以在固相上先预包被亲和素，原用吸附法包被固相的抗体或抗原与生物素结合，通过亲和素一生物素反应而使生物素化的抗体或抗原在相化。这种包被法不仅可增加吸附的抗体或抗原量，而且使其结合点充分暴露。另外，在常规 ELISA 中的酶标抗体也可用生物素化的抗体替代，然后连接亲和素一酶结合物，以放大反应信号。桥联法 ABC-ELISA (avidinbiotincomplex-ELISA) 夹心法测抗原的过程见图 15-9。

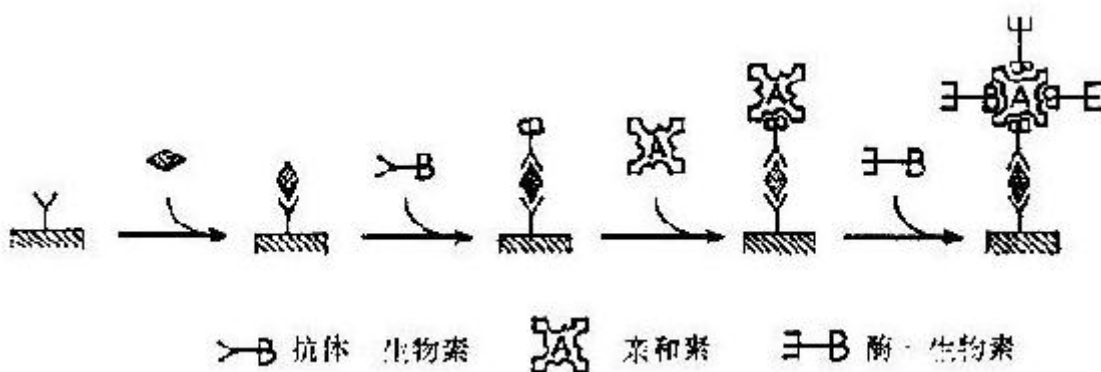


图 15-9 桥连法 ABC-ELISA 夹心法测抗原示意图

三、ELISA 操作的主要技术要点

ELISA 的技术要点包括三个方面：试剂的制备、反应条件的选择和操作的标准化。

(一)、试剂的制备

ELISA 的主要试剂为固相的抗原或抗体、酶标记的抗原或抗体和与标记酶直接关联的酶反应底物。以下叙述这些试剂的原料和制备方法。

1、固相载体

可作 ELISA 中载体的物质很多，最常用的是聚苯乙烯。聚苯乙烯具有较强的吸附蛋白质的性能，抗体或蛋白质抗原吸附其上后保留原来的免疫活性。聚苯乙烯为塑料，可制成各种形式。在 ELISA 测定过程中，它作为载体和容器，不参与化学反应。加之它的价格低廉，所以被普遍采用。

ELISA 载体的形状主要有三种：小试管、小珠和微量反应板。小试管的特点是还能兼作反应的容器，最后放入分光光度计中比色。小珠一般为直径 0.6cm 的圆球，表面经磨砂处理后吸附面积大增加。如用特殊的洗涤器，在洗涤过程中使圆珠滚动淋洗，效果更好。最常用的载体为微量反应板，专用于 ELISA 测定的产品也称为 ELISA 板，国际通用的标准板形是 8×12 的 96 孔式。为便于作少量标本的检测，有制成 8 联或 12 联孔条的，放入座架后，大小与标准 ELISA 板相同。ELISA 板的特点是可以同时进行大量标本的检测，并可在特定的比色计上迅速读出结果。现在已有多种自动化仪器用于微量反应板型的 ELISA 检测，包括加样、洗涤、保温、比色等步骤，对操作的标准化极为有利。

良好的 ELISA 板应该是吸附性能好，空白值低，孔底透明度高，各板之间和同一板各孔之间性能相近。聚苯乙烯 ELISA 板由于配料的不同和制作工艺的差别，各种产品的质量差异很大。因此每一批号的聚苯乙烯制品在使用前须检查其性能。常用的检查方法为：以一定浓度的人 IgG（一般为 10ng/ml）包被 ELISA 板各孔后，每孔内加入适当稀释的酶标抗人 IgG 抗人 IgG 抗体，保温后洗涤，加底物显色，终止酶反应后分别测每孔溶液的吸光度。控制反应条件，使各读数在 0.8 左右。计算所有读数的平均值。所有单个读数与平均读数之差应小于 10%。

与聚苯乙烯类似的塑料为聚氯乙烯。作为 ELISA 固相载体，聚氯乙烯板的特点为质软板薄，可切割，价廉、但光洁度不如聚苯乙烯板。聚氯乙烯对蛋白质的吸附性能比聚苯乙烯高，但空白值有时也略高。

为比较不同固相在某一 ELISA 测定中的优劣，可用以下方法加以检验：用其它免疫学测定方法选出一个典型的阳性标本和一个典型的阴性标本。将它们分别进行一系列稀释后，在不同的固相载体上按预定的 ELISA 操作步骤进行测定，然后比较测定结果。在哪一种载体上阳性结果与阴性结果判别最大，这种载体就是这一 ELISA 测定的最合适的固相载体。

除塑料制品外，固相酶免疫测定的载体还有两种材料：一是微孔滤膜，如硝酸纤维素膜、尼龙膜等，这类测定形式将在本章第五节“膜载体的酶免疫测定”中介绍。另一种载体是以含铁磁性微粒制作的，反应时固相微粒悬浮在溶液中，具有液相反应的速率，反应结束后用磁铁吸引作为分离的手段，洗涤也十分方便，但需配备特殊的仪器。

2、抗原和抗体

在 ELISA 实施过程中，抗原和抗体的质量是实验是否成功的关键因素。本法要求所用抗原纯度高，抗体效价高、亲和力强。

ELISA 所用抗原有三个来源：天然抗原、重组抗原和合成多肽抗原。天然抗原取材于动物组织或体液、微生物培养物等，一般含有多种抗原成分，需经纯化，提取出特定的抗原成分后才可应用，因此也称提纯抗原 (purified antigen)。重组抗原 (recombinant antigen) 和多肽抗原 (peptide antigen) 均为人工合成品，使用安全，而且纯度高，干扰物质少。因此虽然制备合成抗原具有较高的技术难度且要求较为昂贵的仪器设备和试剂，其应用仍十分普遍，特别是对那些天然抗原不易得到的试验，更显出其独到之处。

用于 ELISA 的抗体有多克隆的和单克隆的。抗血清成分复杂，应从中提取 IgG 才可用于包被固相或酶标记。含单克隆抗体的小鼠腹水中的特异性抗体含量较高，有时可适当稀释后直接进行包被。制备酶结合物用的抗体的质量往往要求有较高的纯度。经硫酸铵盐析纯化的 IgG 可进一步用各种分子筛层析提纯。也可用亲和层析法提纯特异性 IgG，如用酶消化 IgG 后提取的 Fab 片段，则效果更好。

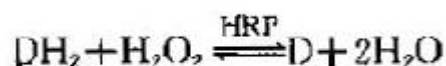
3、免疫吸附剂

固相的抗原或抗体称为免疫吸附剂。将抗原或抗体固相化的过程称为包被 (coating)。由于载体的不同，包被的方法也不同。如以聚苯乙烯 ELISA 板为载体，通常将抗原或抗体溶于缓冲液 (最常用的为 pH9.6 的碳酸缓冲液) 中，加于 ELISA 板孔中在 4℃ 过夜，经清洗后即可应用。如果包被液中的蛋白质浓度过低，固相载体表面有能被此蛋白质完全覆盖，其后加入的血清标本和酶结合物中的蛋白质也会部分地吸附于固相载体表面，最后产生非特异性显色而导致本底偏高。在这种情况下，如在包被后再用 1%~5% 牛血清白蛋白包被一次，可以消除这种干扰。这一过程称为封闭 (blocking)。包被好的 ELISA 板在低温可放置一段时间而不失去其免疫活性。

4、酶和底物

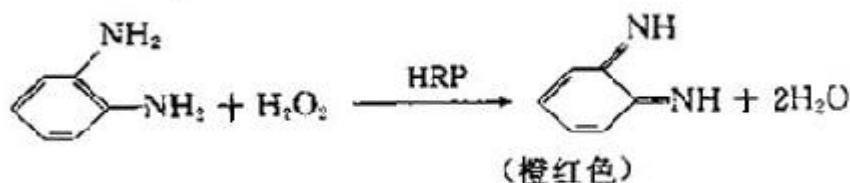
ELISA 中所用的酶要求纯度高、催化反应的转化率高、专一性强、性质稳定、来源丰富、价格不贵、制备成的酶标抗体或抗原性质稳定，继续保留着它的活性部分和催化能力。最好在受检标本中不存在与标记酶相同的酶。另外它的相应底物应易于制备和保存，价格低廉，有色产物易于测定，光吸收高。ELISA 中最常用的酶为辣根过氧化酶（HRP）和从牛肠粘膜或大肠杆菌提取的碱性磷酸酶（AP）。

HRP 在蔬菜作物辣根中含量很高，纯化方法也不复杂。它是一种糖蛋白，含糖量约 18%；分子量为 44kD；是一种复合酶，由主酶（酶蛋白）和辅基（亚铁血红素）结合而成的一种卟啉蛋白质。主酶为无色糖蛋白，在 275nm 波长处有最高吸收峰；辅基是深棕色的含铁卟啉环，在 403nm 波长处有最高吸收峰。HRP 催化下列反应：



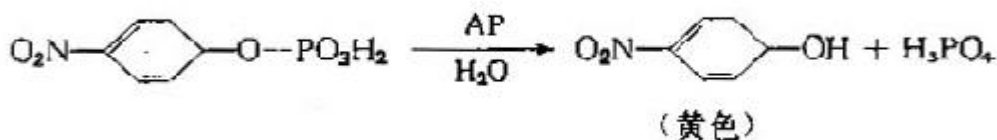
上式中 DH_2 为供氢体， H_2O_2 为受氢体。HRP 对受氢体的专一性很高，除 H_2O_2 外，仅作用于小分子醇的过氧化物和尿素的过氧化物。后者为固体，作为试剂较 H_2O_2 方便。许多化合物可作为 HRP 的供氧体，在 ELISA 中常用的供氢体底物为邻苯二胺（orthopenylenediamine, OPD）、四甲基联苯胺（3, 3', 5, 5' -tetramethylbenzidine, TMB）和 ABTS [2, 2' -azino-bis(3-ethyl-benzthiazolinesulfonate-6)]。

OPD 为在 ELISA 中应用最多的底物，灵敏度高，比色方便。其缺点是配成应用液后稳定性差，而且具有致突变性。TMB 无此缺点。TMB 经酶作用后由无色变蓝色，目测对比鲜明；加酸停止酶反应后变黄色，可在比色计中定量；因此应用日见增多。ABTS，虽然灵敏度不如 OPD 和 TMB，但空白值很低。HRP 催化 OPD 的反应如下：



HRP 的纯度用 RZ (ReinheitZahl, 意为纯度数) 表示, 是 403nm 的吸光度与 280nm 的吸光度之比, 高纯度的 HRP 的 $RZ \geq 3.0$ 。应注意的是酶变性后, RZ 可不变而活力降低, 故重用酶制剂时更重要的指标为活力。酶活力以单位表示: 1min 将 $1 \mu\text{mol}$ 的底物转化为产物的酶量为 1 个单位。

在 ELISA 中另一常用的酶为碱性磷酸酶。从大肠杆菌提取的 AP 分子量为 80kD, 酶作用的最适 pH 为 8.0; 用小牛肠粘膜提取的 AP 分子量为 100kD, 最适 pH 为 9.6。一般采用对硝基苯磷酸酯 (p-nitrophenylphosphate, p-NPP) 作为底物。它可制成片状试剂, 使用方便。产物为黄色的对硝基酚, 在 405nm 有吸收峰。用 NaOH 终止酶反应后, 黄色可稳定一段时间。反应式如下:



在 ELISA 中应用 AP 系统, 其敏感性一般高于应用 HRP 系统, 空白值也较低。但由于 AP 较难得到高纯度制剂, 稳定性较 HRP 低, 价格较 HRP 高, 制备酶结合物时得率较 HRP 低等原因, 国内在 ELISA 中一般均采用 HRP。

除 HRP 和 AP 以外, 在商品 ELISA 试剂中应用的酶尚有葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶和脲酶等。 β -半乳糖苷酶的底物常用 4-甲基伞基- β -D 半乳糖苷

(4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside), 经酶水解后产生荧光物质 4-甲基伞酮

(4-methylumbelliferone), 可用荧光计检测。荧光的放大作用大大提高了方法的敏感度。AP

也可应用可产生荧光的伞基磷酸酯作底物。其缺点是需要荧光计测定, 而且如用固相载体直接作为测定容器, 此载体不可发出荧光。脲酶的特点是酶作用后反应液发生 pH 改变, 可使指示剂变色; 另外, 在人体内没有内源酶 (酶的化学发光底物见第十八章)。

5、结合物

酶标记的抗原或抗体称为结合物 (conjugate)。抗原由于化学结构不同, 可用不同的方法与酶结合。如为蛋白质抗原, 基本上可参考抗体酶标记的方法。制备抗体酶结合物的方法通常有以下几种。

1)、戊二醛交联法戊二醛是一种双功能团试剂，可以使酶与蛋白质或其他抗原的氨基通过它而偶联。戊二醛交联可用一步法（如连接 AP），也可用二步法（如连接 HRP）。举例如下：

2~5mg 纯抗体与 5mgAP 混合于 0.1mol/LpH6.8 的磷酸缓冲液 1ml 中，4℃ 下对同上缓冲液透析平衡。磁力搅拌下，缓慢加入 1%戊二醛 0.05ml，在室温下放置 2 小时。在 4℃ 下对 0.05mol/LpH8.0Tris 缓冲液透析平衡，即得酶标抗体。

辣根过氧化物酶可溶解于 50% 饱和度硫酸铵中。用上法交联后可用 50% 饱和度硫酸铵沉淀酶标抗体，弃去上清中游离酶。

戊二醛一步法操作简便、有效，而且重复性好。缺点是交联时分子间的比例不严格，大小也不一，影响效果。

制备 HRP 抗体结合物也可用二步法，即先将 HRP 与戊二醛作用，透析除去戊二醛，在 pH9.5 缓冲液中再与抗体作用而形成酶标抗体。此法的效率可高于一步法 10 倍左右。

2)、过碘酸盐氧化法本法只用于 HRP 的交联。该酶含 18% 碳水化合物，过碘酸盐将其分子表面的多糖氧化为醛基。用硼氢化钠 (NaBH_4) 中和多余的过碘酸。酶上的醛根很活泼，可与蛋白质结合，形成按摩尔比例结合的酶标结合物。有人认为此法为辣根过氧化物酶交联最有效的方法。但也有只认为由于所用试剂较为剧烈，各批实验结果不易重复。

按以上方法制备的结合物一般混有未结合的酶和抗体。理论上结合物中混有游离酶不影响 ELISA 中最后的酶活性测定，因经过洗涤，非特异性吸附于固相上的游离酶已被洗去。但游离的抗体则会与酶标抗体竞争相应的固相抗原，因而减低结合到固相上的酶标抗体量。因此制备的结合物应予以纯化。纯化的方法较多，分离大分子混合物的方法均可应用。硫酸铵盐析法操作简便，但效果不如用 SephadexG-200 凝胶过滤的好。

（二）、最适工作浓度的选择

在建立某一 ELISA 测定中，应对包被抗原或抗体的浓度和酶标抗原或抗体的浓度予以选择，以达到最合适的测定条件和节省测定费用。下面以间接法测抗体和夹心法测抗原为例，介绍最适工作浓度的选择方法。

A、间接法测抗体

1. 酶标抗体工作浓度的选择

(1) 用 100ng/ml 人 IgG 进行包被，洗涤。

(2) 将酶标抗人 IgG 用稀释液作一系列稀释后分别加入已包被的孔中，保温、洗涤。

(3) 加底物显色。加酸终止反应后，读取吸光度 (A)，绘制曲线如图 15-10。读取 A 值在 1.0 时的酶标抗体稀释度，作为酶标抗体的工作浓度。该酶标抗人 IgG 的工作浓度应为 1/1600。

2. 棋盘滴定法选择包被抗原工作浓度

(1) 用包被液将抗原作一系列稀释后进行包被，洗涤。

(2) 将强阳性参考血清、弱阳性参考血清和阴性参考血清用稀释液作 1:100 稀释，加样，保温，洗涤。

(3) 加按工作浓度稀释的酶标抗人 IgG 抗体，保温，洗涤。

(4) 加底物显色。加酸终止反应后读取 A 值。

(5) 选择强阳性参考血清的 A 值为 0.8 左右、阴性参考血清的 A 值小于 0.1 的包被抗的的稀释度作为工作浓度。表 15-1 为本例的测定结果，表中数字为 A 值。从表中可见 1:200 为最合适的工作浓度。

表 15-1 间接 ELISA 法包被抗原工作浓度的选择

各类血清	抗原稀释度				
	1:100	1:200	1:400	1:800	
1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	
强阳性	1.20	1.04	0.84	0.68	0.42
弱阳性	0.64	0.41	0.30	0.22	0.19
阴性	0.23	0.13	0.08	0.66	0.05
稀释液	0.09	0.02	0.02	0.02	0.04

B、夹心法测抗原

在夹心法 ELISA 法中可用棋盘滴定法同时选择包被抗体和酶标抗体的工作浓度，举例如下(表 15-2)：

表 15-2 夹心 ELISA 包被抗体和酶标抗体工作浓度的选择

包被抗体的浓度及酶标 抗体稀释度	参考抗原		
	强阳性 (25ng/ml)	弱阳性 (1.5ng/ml)	阴性
10 μ g/ml			
1:1000	1.17	0.15	0.09
1:5000	0.46	0.03	0
1:25000	0.12	0	0
1 μ g/ml			
1:1000	>2	0.25	0.10
1:5000	0.91	0.12	0.01
1:25000	0.25	0.01	0
0.1 μ g/ml			
1:1000	0.42	0.13	0.13
1:5000	0.11	0.03	0.02
1:25000	0.03	0	0

(1) 抗体免疫球蛋白用包被缓冲液稀释至蛋白浓度为 10、1 和 0.1 μ g/ml，分别在 ELISA 板上进行包被，每一浓度包括三个纵行，洗涤。

(2) 在一个横行各包被孔中加入强阳性抗原液，另一横行加入弱阳性抗原液，第三横行加入阴性对照液，保温，洗涤。

(3) 将酶标抗体用稀释液稀释成三个浓度，例如 1:1000、1:5000 和 1:25000。分别加入每一包被浓度的一个纵行中，保温，洗涤。

(4) 加底物显色。加酸终止反应后，读取 A 值。

(5) 以强阳性抗原的 A 值在 0.8 左右、阴性参考的 A 值小于 0.1 的条件作最适条件，据此选择包被抗体和酶标抗体的工作浓度。从表 15-2 可看出包被抗体浓度可选用 1 μ g/ml，酶标抗体

的稀释度可选为 1:5000。为了进一步节省试剂，可以此浓度为基点，缩小间距再做进一步的棋盘滴定。

四、测定方法的标准化

要使 ELISA 测定得到准确的结果，不论是定性的还是定量的，必须严格按照规定的方法制备试剂和实施测定。主要试剂的制备要点已如前述，其他一般性试剂，如包被缓冲液、洗涤液、标本稀释液、结合物稀释液、底物工作液和酶反应终止液等，配制时不可掉以轻心。缓冲液可于冰箱中短期保存，使用前应观察是否变质。蒸馏水的质量在 ELISA 中也至关重要，最好使用新鲜重蒸馏的。不合格的蒸馏水可使空白值升高。

测定的实施中，应力求各个步骤操作的标准化，下面以板式 ELISA 为例，介绍有关注意事项。

（一）加样

在 ELISA 中除了包被外，一般需进行 45 加样。在定性测定中有时不强调加样量的准确性，例如规定为加样一滴。此时应该使用相同口径的滴管，保持准确的加样姿势，使每滴液体的体积基本相同。在定量测定中则加样量应力求准确。标本和结合物的稀释液应按规定配制。加样时应将液体加在孔底，避免加在孔壁上部，并注意不可出现气泡。

（二）保温

在 ELISA 中一般有二次抗原抗体反应，即加标本后和加结合物后，此时反应的温度和时间应按规定的要求，保温容器最好是水浴箱，可使温度迅速平衡。各 ELISA 板不应叠在一起。为避免蒸发，板上应加盖，或将板平放在底部垫有湿纱布的湿盒中。湿盒应该是金属的，传热容易。如用保温箱，空湿盒应预先放在其中，以平衡温度，这在室温较低时更为重要。加入底物后，反应的时间和温度通常不做严格要求。如室温高于 20℃，ELISA 板可避光放在实验台上，以便不时观察，待对照管显色适当时，即可终止酶反应。

（三）洗涤

洗涤在 ELISA 过程中不是反应聚，但却是决定实验成败的关键。洗涤的目的是洗去反应液中没有与固相抗原或抗体结合的物质以及在反应过程中非特异性吸附于固相载体的干扰物质。聚苯乙烯待塑料对蛋白质的吸附作用是普遍性的。因此在 ELISA 测定的反应过程中应尽量避免非特异性吸附，而在洗涤时又应把这种非特异性吸附的干扰物质洗涤下来。在标本和结合物的稀释液和

洗涤液中加入聚山梨酯（吐温，Tween）一类物质即可以达到此目的。聚山梨酯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，常作为助溶剂。根据脂肪酸的种类而对聚山梨酯编号，结合月桂酸的为聚山梨酯 20，在 ELISA 中最为常用。它的洗涤效果好，并具有减少非特异性吸附和增强抗原抗体结合的作用。

洗涤如不彻底，特别在最后一次，如有酶结合物的非特异性吸附，将使空白值升高。另外，在间接法中如血清标本内的非特异性 IgG 吸附在固相上而未被洗净，也将与酶标抗体作用而产生干扰。

ELISA 板的洗涤一般可采用以下方法：①吸干孔内反应液；②将洗涤液注满板孔；③放置 2min，略作摇动；④吸干孔内液，也可倾去液体后在吸水纸上拍干。洗涤的次数一般为 3~4 次，有时甚至需洗 5~6 次。

（四）比色

如阴性对照颜色极浅，在定性测定中一般可采用目视比色。如用比色计测定结果，准确性决定于 ELISA 板底的平整与透明度和比色计的质量。

五、ELISA 实验中用到的仪器和材料

1. 聚苯乙烯微量细胞培养板（平板，40，96 孔）。
2. 酶联免疫检测仪
3. 辣根过氧化物酶羊抗兔 IgG，工作稀释度 1:1000。
4. 包被液：0.05mol/L pH9.6 碳酸缓冲液，4℃，保存，Na₂CO₃ 0.15 克，NaHCO₃ 0.293 克，蒸馏水稀释至 100 ml。
5. 稀释液：0.01mol/L pH7.4 PBS—Tween—20，4℃，保存。NaCl 8g，KH₂PO₄ 0.2g，Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g，Tween—20，0.5ml。蒸馏水加至 1000ml。
6. 洗涤液：同稀释液
7. 封闭液：0.5%鸡卵清蛋白，pH7.4 PBS。
8. 邻苯二胺溶液（底物）：临用前配制 0.1M 柠檬酸 (2.1g/100ml)，6.1ml 0.2M Na₂HPO₄·12H₂O (7.163g/100ml) 6.4ml，蒸馏水 12.5ml，邻苯二胺 10mg，溶解后，临用前加 30%H₂O₂ 40 微升。
9. 终止液：2mol/L H₂SO₄。

六、主要的操作步骤

1. 包被抗原：用包被液将抗原作适当稀释，一般为 1~10 微克/孔，每孔加 200 微升，37℃ 温育 1 小时后，4℃ 冰箱放置 16~18 小时。
2. 洗涤：倒尽板孔中液体，加满洗涤液，静放三分钟，反复三次，最后将反应板倒置在吸水纸上，使孔中洗涤液流尽。
3. 加封闭液 200 微升，37℃ 放置一小时。
4. 洗涤同 2。
5. 加被检血清：用稀释液将被检血清作几种稀释，每孔 200 微升。同时作稀释液对照。37℃ 放置 2 小时。
6. 洗涤同 2。
7. 加辣根过氧化物酶羊抗兔 IgG，每孔 200 微升，放置 37℃ 1 小时。
8. 洗涤同 2。
9. 加底物：邻苯二胺溶液加 200ml，室温暗处 10--15 分钟。
10. 加终止液：每孔 50 微升。
11. 观察结果：用酶联免疫检测仪记录 490nm 读数。



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编：201109

联系：市场部

电话：5446 0832 800-988-1995

E-mail:master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

