

影响酶联免疫吸附试验结果的操作因素

季育华¹, 陶义训²

(1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院检验科, 上海 200025; 2. 上海市临床检验中心, 上海 200126)

关键词: 酶联免疫吸附试验; 手工操作; 影响因素

酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 是利用酶标记物作为指示物, 以抗原-抗体的特异性结合反应为基础, 在酶标记物同抗原-抗体结合后, 由于酶的催化放大作用, 使得 ELISA 既保持抗原-抗体反应的特异性, 又体现酶催化放大的敏感性。整个反应过程的完成是在非均相反应体系中, 即固相免疫吸附。为此反应的每一步都经过洗涤程序, 不仅除去未反应物质, 还除去某些非特异的干扰物质, 从而进一步提高了检测的特异性^[1]。

ELISA 具有试剂保存期长、实验废弃物对环境污染小以及操作简便等特点, 所以是目前临床免疫学检验常用的技术之一, 尤其是采用 96 微孔板的 ELISA。ELISA 的手工操作模式每完成一次测试必然涉及以下 8 个步骤, 即样本收集保存、试剂准备、加样、温育、洗涤、显色、比色、结果判定与报告, 其中任一步骤操作不当都会影响测定的结果^[2,3]。为此将手工操作 ELISA 中可能影响的因素分述如下。

一、待测样本的处置

用于 ELISA 检测的临床样本大多为血清 (血浆), 特定的检测项目可选择唾液、尿液以及粪便等为检测样本, 因其自身的质量问题会严重影响检测的结果。当样本中蛋白质浓度过高, 易出现因非特异性吸附等造成检测结果的假阳性, 而过分稀释的样本则因抗原-抗体间反应的减弱而导致假阴性, 若样本中可能存在的内源性过氧化物酶等还会干扰显色反应。克服或减少这些问题的首要办法是调整好检测样本的适宜浓度, 尤其是在出现假阳性时, 适当稀释可减少非特异性吸附或显色干扰, 但必须避免由此降低 ELISA 检测的敏感性。同时, 在常规检测样本处置过程中应注意: (1) 样本采集

应新鲜, 避免溶血, 因为样本的污染或溶血可导致血红蛋白的释放或大量的过氧化物酶的产生, 血红蛋白可吸附样本中的待检抗体, 影响血清抗体检测效价, 过量的过氧化物酶也容易干扰显色反应; (2) 保存样本不宜反复冻融, 随着反复冻融, 蛋白质分子 (抗原或抗体) 易发生构型改变而影响抗原-抗体的结合; (3) 同一份样本如需检测多个项目, 应遵循先免疫后生化, 因为 ELISA 的灵敏度 (\geq ng/ml) 高于生化, 以避免样本间的污染; (4) 冻存的样本解冻必须完全并与以混匀, 因为样本冷冻时, 其蛋白质会发生分布的改变, 混匀动作要轻以避免气泡出现, 适宜上下颠倒混匀, 勿在匀浆器上剧烈震荡; (5) 特殊样本应作充分离心后取其上清部分。

二、反应用试剂的准备

应选用优质的商品试剂。在具体使用时, 如忽略某些环节, 会影响到最终的检测结果。如临床实验室在做 ELISA 检测时, 将冰箱储存的试剂、板条等取出并随即打开就用, 一冷一热水化层的形成可能影响试剂的原始浓度及试剂中溶质分子的均匀分布。同时因为试剂溶液的温度太低, 会影响以后温育所设定的时间, 即在一定温度中反应时间不能保证, 出现反应不充分的假阴性等。为此从 4℃ 冰箱取出的试剂等应置室温 20~30 min (温度平衡) 后启用, 根据蛋白质在冷冻过程中出现蛋白分子分布改变的特点, 试剂正式启用前应当作充分混匀。其他需用试剂, 必须按照试剂使用说明进行规范操作, 包括所需的蒸馏水、去离子水的新鲜和高质量, 自行配制的缓冲液等必须调整其 pH 值和离子强度等。

三、加样

ELISA 反应中除最初的包被外, 一般需要进

行 4~5 次加样。虽然通常定性测定中有时不强调加样量的准确性,但要求加样量全盘一致,结果可重复再现。譬如规定为加样 1 滴,那么使用的滴管口径必须相同,滴加的姿势保持准确,使得每 1 滴液体的体积基本相同。定量测定中,必须要求其加样量的准确性。通常使用微量移液器,那么微量移液器的状态,使用的姿势都有讲究。加样放液不宜太快,将所加液于板条微孔的下 1/3 处放注,避免仅加在上部的孔壁导致假吸附,加样不宜溢出也不宜有气泡。每次加样完毕应当更换吸嘴。制备各种工作试剂液时,预先准备的空试管内应先加好稀释液,然后再加被稀释物,并作充分混匀后方可使用。

四、温育

温育,即将加完样本或酶标记抗体等试剂后的 96 孔反应板放置水浴或保温中作用的过程。温育是 ELISA 检测结果成败的最关键之举,抗原-抗体发生特异性结合反应需要依赖反应液的质量与反应时的温度和时间;标记酶催化底物反应的完成与温度和时间关系密切。为了使 ELISA 测定中免疫学反应和标记酶的催化反应能够顺利,通常都需要调整一个适宜的反应环境,包括反应液的离子强度、pH 值以及温度。

一般情况下,温度越高 ($\leq 45^{\circ}\text{C}$) 或试剂的浓度越高,其分子运动就加快,达到反应完成的时间就会缩短。但是随着反应温度的增高,反应液中蛋白质(抗原或抗体)容易发生变性,使抗原-抗体复合物形成减少,影响实验的敏感性,尤其那些不适宜过高温度的抗原或抗体。同时提高温度缩短反应时间,对于分子含量比较低的部分弱阳性样本,因为反应不完全而导致假阴性(漏检)。因此确定准确的温度、温育时间及试剂浓度等非常重要。实际操作中应注意:(1) 要保证在设定的温度环境中足够的反应时间,当将加完样本(试剂)的微孔反应板从室温移入水浴或温箱中时,有否考虑到从室温升温到 37°C 所需的时间? 尤其季节性的影响因素? 事实上使用水浴的则明显优于使用温箱的,若温箱中添加湿盒的使用,即在盒内放置浸透水的纱布,并在 37°C 温箱中预温 30 min 以上可获得与水浴同样的效果;(2) 温育过程中每块反应板不能重叠放置,防止温度扩散的不均匀性。所以,建议一定按试剂盒操作要求,不随意改变有关条件。并且提倡使用 37°C 温育时间长些,而不要为了缩短时间在 45°C 情况下温育。

五、洗涤

洗涤是 ELISA 不同于均相免疫学检测技术的一大特征。洗涤在整个 ELISA 反应过程中虽不是一个反应步骤,却决定着 ELISA 结果的成与败。洗涤的目的就是洗去反应液中未与固相抗原或抗体发生结合的物质以及在反应过程中非特异吸附于固相载体或抗原-抗体复合物的干扰性物质,以保证 ELISA 测定的特异性。

自来水不能作为洗涤液,必须按照操作要求配置洗涤液。因为固相载体-聚苯乙烯等塑料对蛋白质分子的吸附现象是普遍性的,在 ELISA 测定反应中一方面要尽可能地避免非特异性吸附发生,另一方面通过洗涤将可能发生的非特异性吸附的干扰物质加以清除,所以洗涤液通常为含有一定浓度 Tween 20 的缓冲液。Tween 20 是一种非离子去垢剂,既含亲水基团,又含疏水基团,在洗涤中的作用机制是借助其疏水基团与经疏水性相互作用被动吸附于聚苯乙烯固相上蛋白分子的疏水基团形成疏水键,从而削弱蛋白分子与固相的吸附,同时在其亲水基团与液相中水分子的结合作用下,促进蛋白质分子脱离固相而进入液相,最终被洗脱。那么原先固相上吸附的抗原-抗体复合物会否也被洗脱? 事实在此环境中已吸附于固相的抗原-抗体复合物是不被轻易洗脱的,因为抗原或抗体在包被时是处于碱性条件中,而抗原-抗体复合物的形成则利用有效的分子空间,洗涤时的液体 pH 值为中性。如果非离子去垢剂的浓度过高或洗涤液的 pH 值近碱性,也可能使包被于固相的抗原或抗体被洗脱。

正确的洗涤方式是,先将孔内的液体吸出或甩干后加入洗涤液,每孔注满勿外溢 ($300\ \mu\text{l}$ /孔),放置 2~3 min,再将孔内液体吸出或甩干并于吸水纸上拍干后重复上述洗涤步骤。洗涤的次数并非越多越好,而应当严格遵照操作说明进行。

六、显色

酶是生物催化剂,当标记酶遇到相应的底物时则会催化底物发生反应。大多数情况下 ELISA 商品多选用辣根过氧化物酶 (HRP) 和碱性磷酸酶 (ALP),少数商品则选用葡萄糖氧化酶、 β -D 半乳糖苷酶或尿酶等。HRP 可催化的底物为过氧化氢,参加反应的显色供氢体有邻苯二胺 (OPD)、邻联甲苯胺 (OT)、联苯胺及 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 等。其中 OPD 的反应产物是橙红色的,经酸终止后在波长 $492\ \text{nm}$ 处有最高吸收峰,敏感

度较高,比色操作简便。但 OPD 难溶于水,见光易变质,使用前现配,反应过程中须避光。OPD 具一定毒性作用。TMB 的反应产物为蓝色,目视对比鲜明,TMB 性质稳定,对人体无毒。实际应用中 TMB 经 HRP 作用后,约 40 min 显色达高峰,随即逐渐减弱,至 2 h 后即可完全消退至无色。若显色反应完毕及时添加终止液,如叠氮钠(NaN_3)、十二烷基硫酸钠(SDS)等酶抑制剂,可使蓝色维持长达 12~24 h。若选用各类酸性终止液,则会使蓝色转变为黄色。TMB 作底物时的产物检测波长为 450 nm。ALP 作为标记酶,其底物一般采用对硝基苯磷酸酯(pNPP),产物为黄色的对硝基苯酚,加入 NaOH 终止液可使得黄色更稳定,吸收波长是 405 nm。

酶催化底物反应至显色完全需要一定时间,而时间的长短与反应时温度有关。通常试剂盒说明书中有规定的时间与温度,应严格遵守。

七、比色

酶标仪本质上是一台专用于微孔板的可见光范围的光电比色计。其对各微孔所测得的值便决定了 ELISA 检测项目的结果正确与否。前面提及了不同酶催化特定底物,而不同底物进一步生成的显色产物不同,它们最有效吸收的可见光波长是不同的。如同是 HRP,催化底物显色剂为 OPD 时,比色时选择的波长为 492 nm,催化底物显色剂换成 TMB 时,比色时的波长应 450 nm。同时因产物呈现颜色等关系,滤光片的选择也会有具体要求。所以,建议按照试剂盒操作说明执行。酶标仪有不同的类型,应严格按照说明书操作和保养。

八、结果的判定与报告

严格依据试剂盒提供的临界值(Cutoff)或其他定性结果的表示法,如阳性孔值/阴性孔值(P/N)的比值等。因为最后 Cutoff 值的确定已尽可能地避免假阳性或假阴性的结果出现。厂商提供试剂的同时,说明书上列出的 Cutoff 值是建立在一系列科学试验及统计学研究的基础上,不应随意更改。定量测定需要制备标准曲线,根据标准曲线计算结果。ELISA 测定结果的报告比较简单,定性测定报告阴性或阳性,定量测定应当报出具体数值。ELISA 测定结果的解释比较复杂,要求技术人员对所测定的项目有较为全面的知识基础,还需要结合临床具体实际。

综上所述,ELISA 测定的应用非常广泛,其操作步骤虽然简便,但可能影响 ELISA 检测结果的因素也非常之多,分布在完成反应全过程中的每一个环节,尤其是加样、温育和洗板等环节中更甚。以上提出的问题供操作时注意以避免错误,提高检测质量。

参 考 文 献

- [1] 陶义训. 免疫学和免疫学检验[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1988. 143-152.
- [2] 焦 奎, 张书圣. 酶联免疫分析技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004. 119-133
- [3] 李金明. 临床酶免疫测定技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2005. 55-110

(收稿日期: 2006-08-07)

(本文编辑: 姜 敏)