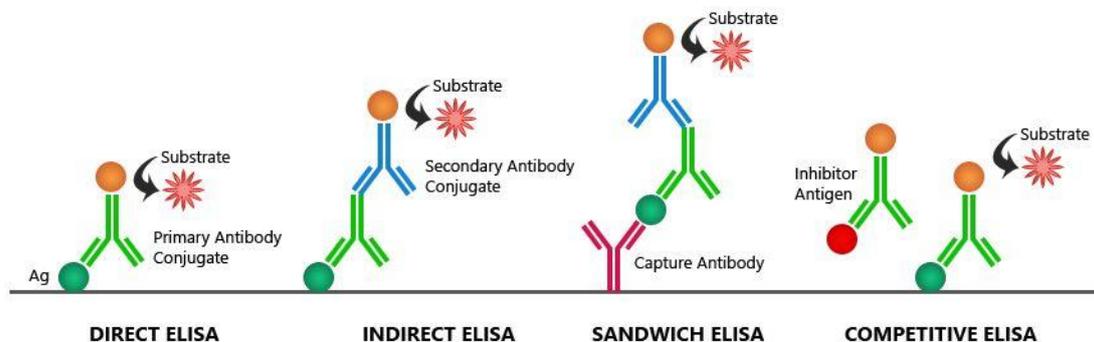


## ELISA实验

酶联免疫吸附分析（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA）是瑞典斯德哥尔摩大学的Engvall和Perlmann于70年代开发的一种免疫分析方法。它是目前商业应用最为成熟的免疫分析方法之一，在医学实验，临床诊断，生物制药方面的运用也极为广泛。很多厂家都开发了针对各种蛋白质、生物标记物、病毒和细菌的酶联免疫吸附分析检测试剂盒。免疫分析是一种利用特定抗体与抗原或半抗原发生的高选择性高特异性识别和结合原理，对待测抗体或者抗原进行分析测定的方法。这种方法的特点是对于待测样品的前处理要求较小，因为抗体对抗原存在特异性免疫识别，包被在96孔板（酶标板）上的抗体可以直接从待测样品中抓取需要检测的蛋白或者病毒等抗原而不会被待测样品中的其他物质所影响，所以特别适合于对于人体的体液和血液进行直接检测。酶联免疫吸附分析（下称ELISA）是免疫分析的一种，分三个部分组成：免疫识别，信号输出和数据处理。免疫识别是在聚苯乙烯制成的96孔板上包被抗体，而后利用抗体识别待测的抗原（通常是疾病的蛋白质生物标记物，病毒，细菌等等，从复杂待测液中将抗原吸附到96孔板表面。接着用带有辣根过氧化酶（Horseradish Peroxidase, HRP）、荧光或放射性标记的抗体通过直接或者间接的方式输出识别信号。最后利用信号强度，标准样品浓度梯度等信息计算出待测样中目标抗原的浓度。根据免疫识别和信号输出方式的不同，ELISA可以分为双抗体夹心法、直接免疫竞争法和非直接免疫竞争法等等。



其中双抗体夹心法在商业应用上最常见：

### （1）抗体包被

在96孔板上包被抗体。由于酶标板是由聚苯乙烯制成，其含有的苯环与抗体的氨基酸残基具有类似 $\pi$ - $\pi$ 堆积作用的引力，结合静电和疏水作用，可以将抗体吸附于其表面。然后，将未吸附的抗体用缓冲液清洗后，加入含有明胶或牛血清蛋白（Bovine Serum Albumin, BSA）的封闭液以封闭酶标板上未结合抗体的部分。加入封闭液的目的，是防止其他蛋白因静电或疏水作用吸附在96孔板上，造成假阳性信号，干扰后续实验的进行。

### （2）免疫识别

在96孔板上包被抗体后，加入待测样，并在37°C环境下孵育一段时间，通常是1-2小时。此时酶标板上的抗体与待测抗原进行特异性识别结合。此处抗体的质量是关键，好的抗体既能特异性高效地结合抗原又不受待测样中其他生物大分子、蛋白质和无机盐等成分的影响。

### （3）洗板

将未结合的抗原洗掉，加入该抗原所对应的识别抗体并在37°C下继续培养1-2小时，接着将未连接上抗原的抗体洗掉。

### （4）酶标信号输出

加入带有辣根过氧化物酶（Horseradish Peroxidase, HRP）标记的酶标二抗，用于和标准抗体结合。在培养30分钟后洗掉未连接的二抗，并加入显色剂显色。根据显色的结果判断抗原的浓度。一般认为，抗原浓度与显色后的发光强度呈正相关。

第三步和第四步这样设计有一部分是考虑了商业成本和标记技术。按ELISA的原理，抗原结合到抗体表面后需要有个信号输出的方式，比较直接的方式是再用酶、荧光或者放射性标记的抗体去识别已经吸附在酶标板上的抗原。这里直接和抗原进行特异性识别的抗体通常叫做一抗。识别抗体的抗体称为二抗。由于某些一抗的价格昂贵，对其进行酶标的效果也不佳，商业试剂盒往往不直接在一抗上标记，而是选用可以识别这种特异性抗体的二抗进行标记。二抗往往制造成本便宜，标记技术成熟，可以保证有稳定的信号输出。

以上所介绍的传统双抗体夹心法以外，还可以采用免疫竞争的方法进行ELISA分析实验。在具体操作上，既可以让待测抗原和标记过的抗原与酶标板上的一抗发生免疫竞争，又可以让一抗抗体和酶标一抗竞争已经吸附在96板上的抗原。在竞争方式上又分为直接竞争和间接竞争两种。

#### （1）直接免疫竞争法

以抗原竞争抗体为例，在上述免疫夹心法操作步骤的第（2）步加入待测抗原后，立刻加入酶标抗原，使之与待测抗原竞争识别酶标板上的抗体。当待测抗原浓度越高，能够连上酶标板上抗体的酶标抗体就越少，输出的信号就越少。这样待测样浓度与酶显色信号就呈逆相关。

#### （2）间接免疫竞争法

间接竞争法则是在加入待测抗原培养1小时后，洗掉未吸附的抗原，再加入酶标抗原反应培养30分钟，并洗去未连接的抗原，加入显色剂显色。此时待测样浓度与酶显色信号亦为逆相关。

## 结果判断

### 定性测定

定性测定的结果判断是对受检标本中是否含有待测抗原或抗体作出"有"或"无"的简单回答，分别用"阳性"、"阴性"表示。"阳性"表示该标本在该测定系统中有反应。"阴性"则为无反应。用定性判断法也可得到半定量结果，即用滴度来表示反应的强度，其实质仍是一个定性试验。在这种半定量测定中，将标本作一系列稀释后进行试验，呈阳性反应的最高稀释度即为滴度。根据滴度的高低，可以判断标本反应性的强弱，这比观察不稀释标本呈色的深浅判断为强阳性、弱阳性更具定量意义。

在间接法和夹心法ELISA中，阳性孔呈色深于阴性孔。在竞争法ELISA中则相反，阴性孔呈色深于阳性孔。

### 定量测定

ELISA操作步骤复杂，影响反应因素较多，特别是固相载体的包被难达到各个体之间的一致，因此在定量测定中，每批测试均须用一系列不同浓度的参考标准品在相同的条件下制作标准曲线。测定大分子量物质的夹心法ELISA，标准曲线的范围一般较宽，曲线最高点的吸光度可接近2.0，绘制时常用半对数值，以检测物的浓度为横坐标，以吸光度为纵坐标，将各浓度的值逐点连接，所得曲线一般呈S形，其头、尾部曲线趋于平坦，中央较呈直线的部分是最理想的检测区域。测定小分子物质常用竞争法，其标准曲线中吸光度与受检物质的浓度呈负相关。标准曲线的形状因试剂盒所用模式的差别而略有不同。ELISA测定的标准曲线注意图中横坐标为对数关系，这更有利于测定系统的表达。

The end



### • 一站式蛋白抗体发现服务

重组蛋白 · 抗体 · 噬菌体文库 · 诊断原料

武汉国家生物产业基地 · 光谷抗体发现与筛选公共服务平台