

双抗夹心法酶联免疫吸附试验影响因素探析*

何莉¹, 孙海², 胡松², 莫春芬², 郭慧杰², 赖翼¹, 刘阳², 邹强², 罗兴燕^{2△} (成都医学院:

1. 检验医学院; 2. 科研实验中心, 成都 610500)

【摘要】目的 探析双抗夹心法酶联免疫吸附试验中牛血清清蛋白封闭, 吐温 20 及浓度, 样品与检测抗体的加样方式及孵育温度对酶联免疫吸附试验检测结果的影响。**方法** 双抗夹心法酶联免疫吸附试验检测人白细胞介素(IL)-1Ra 细胞因子作为模型, 检测封闭条件, 吐温 20 及其不同浓度, 样品与检测抗体分开孵育及共同孵育, 酶联孵育温度对标准品浓度与 OD 值关系的影响。**结果** 酶联免疫吸附试验不封闭、洗液吐温浓度为 0.05% 且孵育温度为 37℃ 的 $R^2=0.9957$; BSA 封闭的 $R^2=0.9811$; 洗液中吐温浓度 0.005% 时 $R^2=0.9915$, 0.5% 时 $R^2=0.9868$; 样品和检测抗体一同孵育 1 h 或 2 h 的 R^2 分别为 0.9645 和 0.8742; 孵育温度为 25℃ 的 $R^2=0.9961$ 。**结论** BSA 封闭步骤对低浓度的样品检测灵敏度不强; 样品和检测抗体及酶稀释液中必须含有吐温 20 且浓度在 0.05% 条件下最合适; 样品和检测抗体共同孵育会影响对高浓度样品的检测; 37℃ 和 25℃ 的孵育温度条件下的酶联免疫吸附试验检测灵敏度没有差异, 但 25℃ 孵育可以降低 OD 值背景。

【关键词】 影响因素; 标准操作流程; 双抗夹心法酶联免疫吸附试验

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.07.004 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)07-0873-03

Exploration and analysis on influence factors in double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay* HE Li¹, SUN Hai², HU Song², MO Chun-fen², GUO Hui-jie², LAI Yi¹, LIU Yang², ZOU Qiang², LUO Xing-yan^{2△} (1. School of Laboratory Medicine; 2. Center for Scientific Research, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610500, China)

【Abstract】Objective To explore and analyze the influence of blocking of bovine serum albumin, tween 20 and its concentration, sample adding mode of sample and detecting antibody and incubating temperature on the detection results of the double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **Methods** Detecting human IL-1Ra cytokines by the double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay was used as a model to measure the influence of the closure condition, tween 20 and its different concentrations, separated incubation and co-incubation of sample and detecting antibody, incubation temperature on the relation between standard substance concentration and OD value. **Results** R^2 was 0.9957 when the enzyme-link was not closed, the concentration of tween 20 was 0.05% and incubating temperature was 37℃; R^2 by blocking BSA was 0.9811; when the concentration of tween 20 was 0.005% or 0.5%, R^2 was 0.9915 and 0.9868 respectively; R^2 when the sample and the detection antibody were incubated together for 1 h or 2 h was 0.9645 and 0.8742 respectively; R^2 was 0.9961 when incubating at 25℃. **Conclusion** The BSA blocking step does not improve the detection sensitivity for low concentration samples; the sample, detection antibody and enzyme diluent must contain Tween 20 and the concentration less than 0.05% is most appropriate; the co-incubation of sample and detection antibody could affect the detection of the high concentration of sample; the enzyme-linked detection sensitivity has no difference under the conditions of incubation temperature of 37℃ and 25℃, but the background of OD value could be reduced in incubation at 25℃.

【Key words】 influence factors; standard operating procedure; double antibody sandwich ELISA

双抗夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA)是最典型的免疫分析法^[1], 被广泛用于检验医学工作中疾病诊断、食品安全、环境分析等领域^[2-5]。抗原抗体结合的特异性, 酶催化反应的专一性^[6], 生物素和亲和素级联放大效应都极大地提高了双抗夹心法 ELISA 检测的灵敏度, 对检测物的快速诊断提供了重要保证。ELISA 从标本制备到结果检测的任何一个步骤都影响了最终结果的判断。目前已有大量文献报道影响 ELISA 的操

作因素和控制方法^[7-8], 极大程度上帮助了科研人员建立相应样品的 ELISA 检测体系^[9-10]。但并没有文献系统地验证双抗夹心法 ELISA 的影响因素, 本文以人白细胞介素(IL)-1RaELISA 为模型, 从是否封闭, 洗液中吐温浓度, 样品和检测抗体加样方式及孵育温度等实验条件探析双抗夹心法 ELISA 条件的影响因素, 为科研人员建立一个标准操作流程提供参考, 避免 ELISA 过程人为因素和错误理解影响了对实验结果

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81302786; 81402944); 四川省教育厅科研资助项目(15ZB0233; 15ZB0235); 成都医学院自然科学基金资助项目(CYZ14-001)。

作者简介: 何莉, 女, 本科, 检验技士, 主要从事临床检验学研究工作。△ 通讯作者, E-mail: luoxingyan2006@163.com。

的判定。

1 材料与方法

1.1 试剂 人 IL-1Ra 包被抗体(R&D, USA), 人 IL-1Ra 检测抗体(R&D, USA), 人细胞因子 IL-1Ra (R&D, USA), HRP-Avidin (eBioscience, USA), 磷酸盐缓冲液(PBS)粉末(中杉, 北京), 吐温 20 (Amresco, USA)。

1.2 主要仪器及耗材 酶联免疫检测仪(BioTek, USA), 小型台式离心机(Thermo, USA), 移液器(Eppendorf, 德国), 96 孔可拆酶标板(Costar, USA)。

1.3 实验方法

1.3.1 包被抗体 用 PBS 将人 IL-1Ra 包被抗体稀释到工作浓度(4 $\mu\text{g/mL}$), 混匀后将包被抗体稀释液加入到 ELISA 板中, 每孔体积为 50 μL , 轻微晃动 ELISA 板使液体均匀铺在板底, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜(12 h)。

1.3.2 洗板 洗板前配制好 PBST 洗液(PBS 中含不同浓度吐温 20)。孵育后第 1 次洗板前, 将微孔中原有的液体吸走, 在干净滤纸上拍干后, 每孔加入 400 μL 的洗液, 不静止即吸出拍干。第 2 次洗板, 在每孔中加入 400 μL 的洗液, 静止放置 3 min 后再吸出拍干。重复第 2 次洗板 3 次。最后 1 次拍干后, 应马上加入下一步的液体, 避免板底干燥。操作过程中需注意不能刮擦 ELISA 板的底部。

1.3.3 封闭 用 0.05% PBST 溶解 BSA, 浓度为 0.5%。溶解完全后, 加入洗板后的微孔板中, 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

1.3.4 加样 本次实验选用人 IL-1Ra 细胞因子的标准品作为检测样品, 样品从 78~10 000 pg/mL 2 倍梯度稀释。同时设置不加细胞因子为阴性对照孔。将不同浓度的抗原和阴性对照分别加入对应的孔中, 100 微升/孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 或 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

1.3.5 加检测抗体 样品孵育时间结束后按照步骤 2 洗板, 同时稀释检测抗体到工作浓度(0.2 $\mu\text{g/mL}$), 100 微升/孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 或 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h(样品与检测抗体一起加入组, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 或 2 h)。

1.3.6 加入酶标亲和素 HP-Avidin 按照说明书 1:1 000 稀释酶标亲和素, 稀释后 100 微升/孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 或 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h。

1.3.7 底物液反应 OPD 底物反应液预混液(OPD 3.69 mmol/L, 柠檬酸 2.4 mmol/L, Na_2HPO_4 5.12 mmol/L), 临用前加入过氧化氢(25 mL 的 OPD 底物反应液中加入 40 μL 的 30%过氧化氢), 混匀后加入到洗板后的微孔板中每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 或 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 0.5 h。孵育时间完成后, 每孔加 100 μL 2 mol/L H_2SO_4 终止反应。

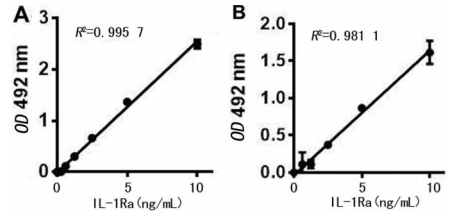
1.3.8 酶标仪检测吸光值 OPD 的最佳吸收峰在 492 nm, 设置酶标板检测波长 492 nm 检测各孔的 OD 值。

1.4 统计学处理 计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用软件 GraphPad Prism 6 (GraphPad, USA)。组间差异采用 SPSS 14.0 one-way ANOVA 分析及 Dunnett's t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牛血清清蛋白封闭对 IL-1Ra ELISA 体系的灵敏度提高无作用 牛血清清蛋白在 ELISA 反应中可以防止酶的分解和非特异性吸附, 但是封闭是不是对所有的 ELISA 体系都是必

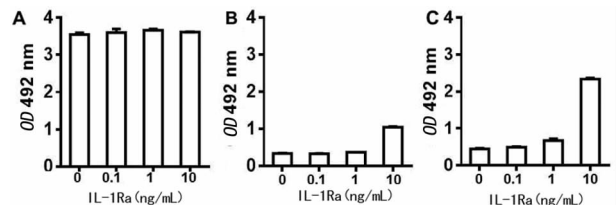
需的呢? 本 ELISA 体系采取包被后不封闭及封闭(0.5% BSA, 1 h)两种方式检测人 IL-1Ra 细胞因子(78~10 000 pg/mL, 2 倍梯度稀释), 其他步骤按照常规操作, 孵育温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。实验的 OD 值与标准品浓度用 Graphpad 作图并得到线性回归系数 R^2 (图 1)。对比两种方式检测结果显示, BSA 封闭的 OD 值偏小(图 1B), $R^2 = 0.9811$ 小于不封闭组 $R^2 = 0.9957$ (图 1A)。原因可能是高浓度下的牛血清清蛋白可能会影响低浓度的标准品与抗体结合, 导致检测的灵敏度降低。



注: A 为不封闭组; B 为 ELISA 孔加 5% BSA 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h。

图 1 BSA 对双抗夹心法 ELISA 检测人 IL-1Ra 细胞因子检测灵敏度没有提高作用

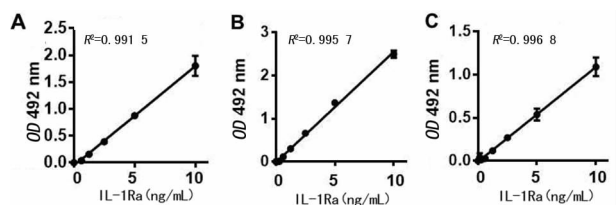
2.2 吐温 20 及浓度对 ELISA 的影响 图 2A 显示, 当抗体的稀释液和洗板液中含吐温 20, 不同浓度标准品的 OD 值差异无统计学意义($P = 0.5923$)。但当样品和检测稀释液中含有吐温 20 (图 2B), 检测的 OD 值与浓度相关。抗体稀释液和洗液中共有吐温 20 时, OD 值与浓度的梯度关系最好(图 2C)。说明吐温 20 在稀释样品和检测抗体时必须加入到 ELISA 体系, 但是注意包被抗体不能加入吐温, 否则会导致结果都呈阴性。



注: A 为样品和检测抗体的稀释、洗板液不含吐温 20; B 为洗板液不含吐温 20, 样品和检测抗体稀释液中含 0.05% 吐温 20; C 为样品和检测抗体稀释液、洗板液中均含 0.05% 吐温 20。

图 2 吐温 20 在 ELISA 体系中的作用

为了进一步探讨吐温 20 在 ELISA 体系中的最佳浓度, 设计不同浓度(0.005%~0.5%)的吐温 20 实验组, 观察吐温 20 的浓度对实验检测结果的影响, 结果显示, 吐温 20 浓度为 0.05% 的线性关系系数 R^2 ($R^2 = 0.9957$) 最好, ELISA 结果最好最理想。这与 ELISA 常用吐温 20 浓度相一致。见图 3。

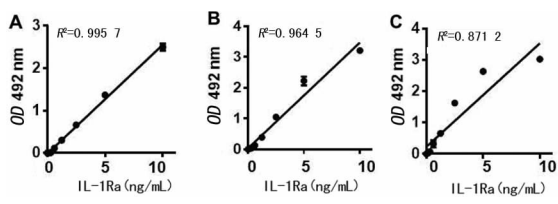


注: A 为吐温 20 浓度 0.005%; B 为吐温 20 浓度 0.05%; C 为吐温 20 浓度 0.5%。

图 3 吐温 20 最优浓度在 ELISA 体系中的选择

2.3 样品和检测抗体共同孵育对 ELISA 的影响 双抗夹心法 ELISA 常规检测方法是样品、抗体试剂单独加。但某些试

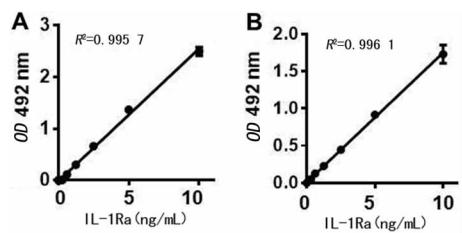
试剂盒推荐样品和检测抗体一起加来缩减步骤从而加快检测的时间,ELISA 体系能否在不增加检测抗体用量的情况下提高或不影响 ELISA 检测的灵敏度呢? 本文同时在 ELISA 体系中设计样品和检测抗体一起加或增加孵育的时间。结果显示(图 4),样品和检测抗体一起加入并不能提高 ELISA 检测的敏感性,随着时间增加样品的 OD 值与标准品浓度的线性相关系数降低 $R^2=0.871\ 2$,在较高浓度下呈现平台趋势。可能是由于游离的样品预先和游离的检测抗体结合后,空间体积变大导致样品和检测抗体结合的概率减小。因此,不建议 ELISA 中样品和检测抗体一同加入,造成结果不准确。



注:A 为样品和检测抗体单独孵育,各 1 h;B 为样品和检测抗体共同孵育 1 h;C 为样品和检测抗体共同孵育 2 h。

图 4 样品及检测抗体共同孵育对 ELISA 的影响

2.4 孵育温度对 ELISA 的影响 双抗夹心法 ELISA 应用了抗原抗体特异性结合,酶与底物专一性反应。其中孵育的温度是一个关键的因素,37 ℃ 是 ELISA 检测常用的孵育温度,但降低温度是否可以减小非特异性结合从而降低背景以减小干扰? 图 5 显示,25 ℃ 孵育温度下 ELISA 的 OD 值普遍偏低,但线性相关系数 R^2 显示其检测的灵敏度并不受温度降低的影响。



注:A 为 37 ℃ 孵育;B 为 25 ℃ 孵育。

图 5 孵育温度对 ELISA 的影响

3 讨 论

双抗夹心法 ELISA 被科研人员广泛应用于快速检测待测样品的工具。虽然已有很多抗原检测的 ELISA 试剂盒开发,但并不是所有样品都有可供使用的试剂盒,若待检样品没有相应试剂盒,或者有些试剂盒的价格比传统方法检测的价格贵,不利于经费紧张的科研人员大量检测样品,这些情况下科研人员会选择传统手工的 ELISA 方法完成检测,其技术条件要求科研人员要根据不同的样品和抗体类型建立一个标准操作流程。

人细胞因子 IL-1Ra 与 IL-1 β 比例失衡在疾病发展过程中的扮演了一个重要的角色,但细胞因子 IL-1Ra 检测的试剂盒价格偏贵。本文以人 IL-1Ra 双抗夹心法 ELISA 体系的优化为例从封闭,吐温 20 及浓度,样品和检测抗体加样方式及孵育温度探讨了传统 ELISA 中常见的问题,可以为科研人员的 ELISA 体系优化提供参考。实验结果显示了 BSA 封闭并不能提高检测的灵敏度,反而影响了低浓度样品的检测。因此,只要抗体的活性高,也可以不用封闭这一常用的步骤。吐温 20

是阴离子表面活性剂,防止了抗原抗体的非特性结合同时也防止后面的抗体或样品吸附到微孔板上,因此 ELISA 包被抗体时一定不能含有吐温 20,但是包被以后的步骤中的缓冲液都需要含有吐温 20,其浓度在 0.05% 为最优。孵育温度可以选择 25 ℃,这样可以降低检测的背景而又可以保持其在 37 ℃ 下的检测灵敏度。ELISA 检测试剂盒为了快速得到检测结果,其说明书将样品和检测抗体一同孵育而减少检测的步骤。本文仿效试剂盒说明书将配制好的样品和检测抗体共孵育,在检测抗体浓度不变的情况下,其线性回归系数明显减低,特别是样品浓度较大情况下,OD 值和浓度不是线性增长关系。原因可能是由于游离的样品和检测抗体先结合后形成空间位阻效应,影响了样品和包被抗体的结合。因此,不建议将 ELISA 步骤中样品和检测抗体一同孵育。影响 ELISA 的因素还有很多,例如酶标板的选择,包被抗体的 pH 避免与包被缓冲液的 pH 相等)等小细节。

综上所述,ELISA 测定的应用非常广泛,虽然其操作步骤简单,但影响 ELISA 检测的因素也非常多,分布在 ELISA 反应全过程的每一个环节,科研人员要根据实验样品和抗体建立一个标准的操作流程,才能得到稳定的实验结果。

参考文献

- [1] Lee YM,Jeong Y,Kang HJ,et al. Cascade enzyme-linked immunosorbent assay (CELISA)[J]. Biosens Bioelectron, 2009,25(2):332-337.
- [2] Mohr AL,Ofsa B,Keil AM,et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of use of the synthetic cannabinoid agonists UR-144 and XLR-11 in human urine[J]. J Anal Toxicol,2014,38(7):427-431.
- [3] 高翔,卢仁泉,郭林. 一种血浆肿瘤型 M2-丙酮酸激酶检测方法——酶联免疫吸附试验的临床评价[J]. 检验医学,2010,25(7):547-549.
- [4] 朱慧莉,黎锡流. 酶联免疫吸附法(ELISA)在乳制品检测中的应用[J]. 食品工业,2001(5):44-45.
- [5] 匡科,董玉莲,董丽华. 酶联免疫吸附分析法及其在环境分析中的应用[J]. 广州化工,2006,34(6):36-37.
- [6] Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[J]. Clin Chem,2005,51(12):2415-2418.
- [7] Pierangeli SS,Harris EN. A protocol for determination of anticardiolipin antibodies by ELISA[J]. Nat Protoc,2008,3(5):840-848.
- [8] 李宁. 影响酶联免疫吸附试验测定的关键环节[J]. 检验医学与临床,2006,7(7):314-315.
- [9] 玉崧成,王威,李艳平,等. 定量测定硫酸软骨素的双抗体夹心 ELISA 的建立[J]. 检验医学,2011,26(3):143-146.
- [10] 张健,简敏华,蒋玲丽,等. 双抗体夹心 ELISA 测定人广泛型线粒体肌酸激酶方法的建立[J]. 检验医学,2013,28(10):913-916.