

# 浅析 ELISA 的基本原理与注意事项

魏东, 黄智鸿, 赵月平, 徐彤, 李秀娟, 庞向红, 刘丽丽 (河北北方学院, 河北张家口 075000)

**摘要** 介绍了酶联免疫吸附测定法(ELISA)的概况与基本原理,分析了在 ELISA 中需要注意的事项。

**关键词** ELISA; 原理; 问题

**中图分类号** S859.83 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)06-02357-02

## Analysis of Basic Principles and Attentions in ELISA

WEI Dong et al (Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000)

**Abstract** The general situations and basic principles of ELISA were introduced, and the problems need attention ELISA were analyzed.

**Key words** ELISA; Principle; Problem

酶联免疫吸附测定法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)是免疫学诊断中的一项新技术,不但应用于多种病原微生物所引起的传染病、寄生虫病及非传染病等方面的免疫学诊断,也应用于分子抗原和抗体的测定,其应用范围日益扩大,已逐渐成为 21 世纪生物医学领域研究的主流。因此,该方法在科学试验中是较常用的方法之一,但仍存在一些问题亟待解决与需要注意的问题。ELISA 操作简单,但影响其取得成功的因素较多,如材料选择是否合适、操作步骤是否正确等,其中一个因素的改变可能会影响到其他条件的改变,最终影响结果的准确性。鉴于此,笔者在介绍 ELISA 概况与基本原理的基础上,分析了在实际操作步骤中需要注意的问题,以期今后试验的准确性提供一定的参考与借鉴。

## 1 ELISA 的概况

ELISA 是 20 世纪 70 年代初期由荷兰学者 Van Weeman 与 Schurrs 和瑞典学者 Engvall 与 Perlman 几乎同时提出的。最初 ELISA 主要用于病毒和细菌的检测,20 世纪 70 年代后期开始广泛应用于抗原、抗体的定性、定量测定,范围涉及到一些药物、激素、毒素等半抗原分子的定量检测。国内外已有不少将酶免疫技术应用于检测食品中农药、兽药残留的报道,使其在现代医学和食品检验学中得到广泛应用。由于 ELISA 检测所需仪器化程度低、操作简便,特别是对样本预处理要求简单,易于推广,具有准确、灵敏、快速、特异、经济等特点,国际上许多权威机构将其列为优先发展的分析技术之一<sup>[1-3]</sup>。

## 2 ELISA 的基本原理

ELISA 的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性,酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性,又保留酶的活性。在测定时,受检标本(测定其中的抗体或抗原)与固相载体表面的抗原或抗体发生反应。通过洗涤,可使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开,再加入酶标记的抗原或抗体,也通过反应而结合在固相载体上,这时固相上的酶量与标本中受检物质的量呈一定比例,加入酶反应底物后,底物被酶催化成为有色产物,产物的量与标本中

受检物质的量直接相关,故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。ELISA 的基本原理见图 1。由于酶的催化效率较高,间接地放大了免疫反应的结果,使测定方法达到较高的灵敏度。根据试剂的来源、标本的情况及检测的具体条件,可设计出各种不同类型的检测方法。用于临床检验的 ELISA 主要双抗体夹心法测抗原、双抗原夹心法测抗体、间接法测抗体、竞争法测抗体、竞争法测抗原、捕获包被法测抗体、ABS-ELISA 法 7 种方法。

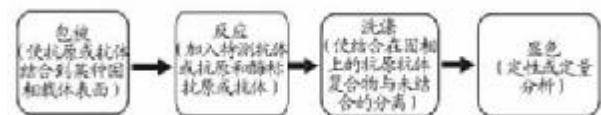


图 1 ELISA 的基本原理

Fig.1 Basic principles of ELISA

## 3 ELISA 操作中需注意的问题

**3.1 材料** 材料的选择最为关键,一些试剂在配置后不宜放置过久,如稀释液、包被液、缓冲液等只能满足一阶段试验的要求;但有些试剂(如显色液)必须现配现用。因此,在进行试验之前,必须制定详细的计划,严格按照计划操作,尽可能减少对试验结果的影响。同时,应选择质量优良的检测试剂,严格按照试剂说明书进行操作,操作前应将试剂在室温下平衡 30~60 min。酶标板有很多类型,价格不等,进口板质量较好,如丹麦 NUNC 公司生产的 96 孔可拆酶标板质量较好,而国产板价格较便宜,但并不是越贵的酶标板质量越好,笔者通过大量试验证实,针对不同的反应,应选择不同的酶标板,因此,在进行试验时,应选择一种最合适的酶标板。

**3.2 加样** 在 ELISA 中操作最多的是加样,涉及每一步骤。目前加样一般都使用微量加样器,按规定的量加入板孔中。加样时首先注意应将所加物加在板孔底部,避免加在孔壁上,不可溅出,不可产生气泡。在加入不同物质时应更换吸嘴,以免发生交叉污染。另外,在显色时,最好使用多道微量加样器,使加液过程迅速完成,因为显色对时间的要求较高,最好是同一时间显色,加样时间越统一,结果误差越小。

**3.3 稀释** 在整个 ELISA 操作中,包被抗原、血清、抗体、酶标二抗等都需要稀释,可以说稀释关系到检测的精确性。在稀释过程中,要注意使用同一类产品,即同一微量加样器、吸嘴和容器,保证所稀释液体容量一致。稀释可在试管中按规定的稀释度稀释后再加样,也可在板孔中加入稀释液,再加

**基金项目** 张家口科技局课题(0701046C)。

**作者简介** 魏东(1971-),男,河北张家口人,硕士,助理研究员,从事兽药残留检测工作。

**收稿日期** 2008-10-14

入标本,然后在微型振荡器上振荡 1 min,以保证混和均匀。

**3.4 孵育** 实验室常用的孵育温度一般为 37 ℃ 与 4 ℃ (冰箱温度)。37 ℃ 常用恒温箱,酶标板应放在湿盒内,湿盒要选用传热性良好的材料(如金属等),在盒底垫湿纱布,最后将酶标板置于湿纱布上,若无湿盒,可选用与 ELISA 板规格一样的细胞培养板的盖子盖住酶标板或用塑料贴封纸或保鲜膜覆盖板孔,但无论使用哪种方式,酶标板均不宜叠放,以保证各板的温度能迅速平衡。孵育时间一般为 1.0 ~ 1.5 h,若人为延长孵育时间,则易导致非特异性结合紧附于反应孔周围,难以清洗彻底;必要时,个别步骤(如封闭时间)就需要检测不同的孵育时间,以确定最佳孵育时间。如采用 4 ℃ 孵育,则应将酶标板包好,以免试剂与外界反应或蒸发。

**3.5 洗涤** 在 ELISA 过程中,洗涤虽不是一个反应步骤,但也决定试验的成败。ELISA 是靠洗涤达到分离游离的和结合的酶标记物的目的,以清除残留在板孔中未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地吸附于固相载体的干扰物质。聚苯乙烯等塑料对蛋白质的吸附是普遍

性的,在洗涤时应把这种非特异性吸附的干扰物质洗涤下来。可以说,在 ELISA 操作中,洗涤是最主要的关键技术,应引起操作者的高度重视,操作者应严格按照要求洗涤,掌握洗涤技术,保证洗液注满各孔,洗板后最好在吸水纸(选择干净、无或少尘的吸水材料)上轻轻拍干,严格遵守洗涤时间,不得马虎。

**3.6 显色** 显色是 ELISA 中的最后一步反应,这时酶催化无色底物,生成有色产物。反应温度和时间仍是影响显色的因素。在一定时间内,阴性孔可保持无色,而阳性孔则随时间的延长而加强呈色。适当提高温度有助于加速显色。在定量测定中,加入底物后的反应温度和时间应按规定力求准确。定性测定的显色可在室温进行,时间一般不需要严格控制,有时可根据阳性对照孔和阴性对照孔的显色情况,适当缩短或延长反应时间,及时判断。目前,国内常用的显色剂是 OPD 和 TMB。在室温下即可进行操作,且目视判断效果良好。这两种显色剂的操作规范与注意事项见表 1。

**3.7 读板** 比色前应先洗净的吸水纸拭干酶标板底附着

表 1 OPD 和 TMB 的操作规范与注意事项

Table 1 Operation principles and attentions of OPD and TMB

显色剂 Color agent	操作规范 Operation principles	注意事项 Attention	颜色反应 Color reactant
OPD	现配现用,一般显色 10 ~ 30 min 后颜色不再加深,再延长反应时间,可使本底值增高	有致癌性,在配制时一定要注意皮肤不能接触,OPD 底物液受光照会自行变色,显色反应应避光进行,显色反应结束时加入终止液终止反应	显色由橙黄色转向棕黄色
TMB	TMB 经 HRP 作用后,约 40 min 达显色顶峰,随即逐渐减弱,至 2 h 后即可完全消退至无色。TMB 的终止液有多种,如叠氮钠和十二烷基硫酸钠(SDS)等酶抑制剂均可使反应终止	为保证试验结果的稳定性,宜在规定时间内阅读结果。受光照的影响不大,可在室温中置于操作台上观察结果	呈蓝色,维持较长时间不褪色,目视效果良好

的液体,以减少比色受干扰,然后将板正确放入酶标仪的比色架中。酶标仪应安置在避光环境下,操作室温宜在 15 ~ 30 ℃,在使用前应先预热酶标仪 15 ~ 30 min,可使结果更加稳定;同时,又因酶标仪品种性能有所不同,在使用中应详细解读说明书,严格按照规程操作。

#### 4 结语

ELISA 现已成为实验室中最为常见的试验,涉及面较广,其试验步骤较简单,但往往由于忽视其中的一些环节,最终会影响整个试验结果。因此,试验时要严格按照试验步骤

进行操作,对每一个环节进行优化,提高试验结果的精确性,从而保证试验结果的真实性和客观性。

#### 参考文献

(上接第 2356 页)

- [9] 翁升. RP-HPLC 法测定苯噻啉片含量[J]. 华夏医学, 2007, 20 (6): 1205 - 1206.
- [10] SHANKER K, FATIMA A, NEGI A S. RP-HPLC Method for the Quantitation of Glabridin in Yashti-madhu (*Glycyrrhiza glabra*) [J]. Chromatographia, 2007, 65: 11 - 12.
- [11] LUCZKIEWICZ M, CISOWSKI W. The RP-HPLC analysis of anthocyanin [J]. Chromatographia, 1998, 48: 360 - 364.
- [12] 唐坤. 反相高效液相色谱法测定倍他司汀片含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26 (4): 502 - 504.
- [13] KOTTI M E, VLESSIDIS A G. Chemometric procedure for the study of

- [1] VANDERLANN M. Immunoassays for trace chemical analysis: monitoring toxic chemicals in humans, food, and the environment [M]. ACS Washington, D C, 1991: 2 - 13.
- [2] CONAWAY J E. New trends in analytical technology and methods for pesticide residue analysis [J]. J AOAC Int, 1991, 74 (5): 715 - 717.
- [3] 周新民, 陈连顺, 王捍东, 等. SMD 残留检测的 ELISA 方法的建立和初步应用[J]. 畜牧与兽医, 2003, 35 (10): 8 - 11.
- [4] fractionated wastewater ingredients using RP-HPLC/diode array spectrophotometer [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004, 7 (379): 5 - 6.
- [14] SZEPESEY L, HÁDA V. Influence of column characteristics on retention and selectivity in RP-HPLC [J]. Chromatographia, 2001, 7 (54): 1 - 2.
- [15] CAROLE NEVEU, DANIEL MOLLÉ. Heterogeneity of caprine beta-casein elucidated by RP-HPLC/MS: Genetic variants and phosphorylations [J]. Journal of Protein Chemistry, 2002, 11 (21): 8.
- [16] YU X, ZHAO R, LIU G Q. A novel method for the preparation of C<sub>18</sub> ester-bonded RP-HPLC packings [J]. Chromatographia, 2000, 10 (52): 7 - 8.