

· 研究论文 ·

# 同源与异源分析对 ELISA 检测灵敏度和特异性的影响

施海燕<sup>1,2</sup>, 朱国念<sup>1\*</sup>, 郑尊涛<sup>3</sup>, 沈晋良<sup>2</sup>

(1. 浙江大学 农药与环境毒理研究所, 浙江 杭州 310029; 2. 南京农业大学 农药系, 农业部  
病虫害监测与治理重点开放实验室, 江苏 南京 210095; 3. 农业部 农药检定所, 北京 100026)

**摘要:**以获得的抗 2 甲 4 氯抗体及其包被抗原为研究对象, 比较了同源和异源分析的灵敏度和特异性, 并试图进一步揭示抗体的识别机制。结果表明: 异源分析, 特别是半抗原结构异源可大幅度提高检测灵敏度; 同源分析和异源分析对于类似化合物的特异性无明显差异。

**关键词:**同源分析; 异源分析; 灵敏度; 特异性;

中图分类号: S481.8

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2005)04-0349-04

## Effect of Homologous Assay and Heterologous Assay on the ELISA Detective Sensitivity and Specificity

SHI Hai-yan<sup>1,2</sup>, ZHU Guo-nian<sup>1\*</sup>, ZHENG Zun-tao<sup>3</sup>, SHEN Jin-liang<sup>2</sup>

(1. Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;  
2. Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Disease and Insects, Ministry of Agriculture, Department of Pesticide Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;  
3. Institute for Control of Agrochemical, Ministry of Agriculture, Beijing 100026, China)

**Abstract:** The detective sensitivity and specificity of homologous assay were compared with heterologous assay on MCPA. And the recognition mechanism of antibody was described. The result showed that heterologous assay, especially heterology in structure of hapten would largely improve the sensitivity of ELISA assay. And there was no efficiency difference in specificity for the analogous compound.

**Key words:** homologous assay; heterologous assay; sensitivity; specificity

同源分析 (homologous assay) 是指用同一种半抗原制备的人工抗原与相应的抗体进行免疫分析。异源分析 (heterologous assay) 是指用同一种分析物的不同半抗原所得的抗体分别与不同半抗原所制备的包被抗原或标记抗原进行的免疫分析。异源分析可从半抗原分子的结构、间隔臂或活性基团的引入位点、间隔臂的长度和结构等方

面考虑。在免疫化学分析中, 同源分析的报道较多, 异源分析的报道较少, 国外则以 Hammock<sup>[1-4]</sup> 在异源分析方面研究得较多。而有关抗体识别机制方面的问题, 涉及得就更少了<sup>[5,6]</sup>。识别机制的认识与研究, 对于半抗原的选择与设计、免疫分析方法建立及交叉反应的避免与解释都有理论指导作用和现实意义。笔者以 2 甲 4 氯为例, 对

收稿日期: 2005-04-05; 修回日期: 2005-08-30.

作者简介: 施海燕 (1977-), 女, 浙江台州人, 硕士, 助教, 主要从事农药残留研究; \* 通讯作者: 朱国念 (1957-), 男, 浙江诸暨人, 博士, 教授. 联系电话: 0571-86971220; 传真: 0571-86435873; E-mail: zhugn@zju.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30390944) 资助项目.

同源分析、异源分析进行了研究,并对识别机制问题作了初步探讨。

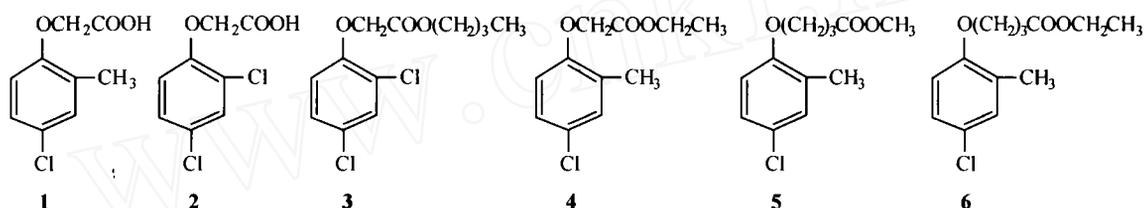
## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料 抗 2 甲 4 氯抗体 (M-A<sub>b</sub>、MC-A<sub>b</sub>、MB-A<sub>b</sub>),包被抗原 (M-OVA、MC-OVA、MB-OVA、2,4-D-OVA),其中 M、MC、MB 分别代表 2 甲 4 氯 (MCPA)、6-(2-甲基-4-氯苯氧乙酰)氨基己酸、4-(2-甲基-4-氯苯氧乙酰)氨基丁酸, M-A<sub>b</sub>、

MC-A<sub>b</sub>、MB-A<sub>b</sub> 分别为用 M-BSA、MC-BSA、MB-BSA 免疫兔子获得的抗体,BSA 为牛血清蛋白, OVA 为卵清蛋白。

MCPA (99%, 1)、2,4-D (99%, 2)、2,4-D 丁酯 (2,4-D butylate, 99%, 3)、2 甲 4 氯乙酯 (MCPA ethylate, 99%, 4)、2 甲 4 氯丁酸甲酯 (MPCB methylate, 99%, 5)、2 甲 4 氯丁酸乙酯 (MPCB ethylate, 97%, 6),均为国家标准品公司产品。其结构式分别为:



酶标二抗 (山羊抗兔 IgG-HRP,上海华美生物工程公司);磷酸盐缓冲液 (PBS) (0.01mol/L pH 7.4)、碳酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH 9.6)、洗涤液 (PBST) (0.01mol/L, pH 7.4, PBS-0.05% 吐温-20)、封闭液 (含质量分数为 2% 牛奶的 PBS 溶液)、底物溶液 (0.05 mol/L 柠檬酸磷酸氢二钠溶液, pH 5.5)、底物 (邻苯二胺)、终止液 (2 mol/L 硫酸溶液)。

1.1.2 主要仪器设备 酶标仪 (BIO-RAD550 型),自动酶标洗板机 (DEM-型,北京拓普分析仪器有限责任公司),移液枪。

### 1.2 实验方法

1.2.1 工作浓度的确定 用方阵试验法选择各组抗原抗体 (包括同源和异源) 的最适工作浓度<sup>[7]</sup>。用 0.05 mol/L、pH 9.6 的碳酸盐缓冲液将

包被抗原稀释成不同浓度后包被在酶标板上,每一种包被浓度设置不同的抗体浓度,然后按间接非竞争性 ELISA 法<sup>[7]</sup>的步骤操作。酶标仪读取各孔 OD<sub>490</sub> 值。当 OD<sub>490</sub> 值为 1.0 左右时,抗原抗体用量较少的抗原抗体的浓度即为它们的工作浓度。

1.2.2 标准曲线的建立 在各组选择好的工作浓度下,按间接竞争性 ELISA 法操作<sup>[7]</sup>。再根据抑制率与农药浓度的半对数作图,分别得到同源分析和异源分析 2 甲 4 氯的标准曲线,并求得抑制中浓度 (IC<sub>50</sub>) 和检测限 (IC<sub>10</sub>)。

1.2.3 抗体特异性测定 采用间接竞争性 ELISA 法测定<sup>[7]</sup>。求出农药与其他类似化合物的定量检测用标准曲线和抑制中浓度 (IC<sub>50</sub>),并用式 (1) 计算类似物对农药的交叉反应率 (CR)。交叉反应率越低,反应的特异性越强。

$$CR(\%) = \frac{\text{抑制率为 50\% 的农药浓度}}{\text{抑制率为 50\% 的类似化合物浓度}} \times 100 \quad (1)$$

## 2 结果与分析

### 2.1 2 甲 4 氯同源、异源分析的工作浓度及检测灵敏度

从表 1 中可以看出,同一包被抗原,不同抗体进行分析时的 IC<sub>50</sub> 值及检测限差异不大,说明抗体的间隔臂差异对检测灵敏度影响不大;不同包被抗原,相同抗体进行分析时,以 2,4-D-OVA 为包被抗原时的 IC<sub>50</sub> 值最低,分别比以 M-OVA、

MC-OVA 和 MB-OVA 为包被抗原低 3 倍、30 倍和 25 倍以上,这表明半抗原结构异源可大幅度提高检测灵敏度;半抗原间的间隔臂差异对检测灵敏度有一定影响,间隔臂短有利于分析灵敏度的提高。这可能是由于抗体对 MC-OVA 或 MB-OVA 的强亲和力降低了 2 甲 4 氯与相应抗体的结合,降低了 2 甲 4 氯在竞争过程中的竞争能力,从而降低了检测灵敏度。

Table 1 The  $IC_{50}$  and limit of detection of MCPA with homologous and heterologous assay

| Homologous or heterologous | Coating antigens | Antibodies | Working concentration/ $mg \cdot L^{-1}$ |            | $IC_{50}/mg \cdot L^{-1}$ | The limit of detection $IC_{10}/mg \cdot L^{-1}$ |
|----------------------------|------------------|------------|--|------------|---------------------------|--|
|                            |                  |            |  |            |                           |  |
|                            |                  |            | Coating antigens                         | Antibodies |                           |  |
| Homologous                 | M-OVA            | M-Ab       | 1.00                                     | 2.00       | 1.08                      | 0.05   |
| Am heterologous            | M-OVA            | MC-Ab      | 2.00                                     | 8.00       | 1.20                      | 0.07   |
|                            | M-OVA            | MB-Ab      | 2.00                                     | 8.00       | 1.50                      | 0.06   |
| Homologous                 | MC-OVA           | MC-Ab      | 0.50                                     | 0.50       | 14.45                     | 0.12   |
| Am heterologous            | MC-OVA           | M-Ab       | 0.25                                     | 0.25       | 9.44                      | 0.09   |
|                            | MC-OVA           | MB-Ab      | 0.50                                     | 0.50       | 10.60                     | 0.07   |
| Homologous                 | MB-OVA           | MB-Ab      | 0.50                                     | 0.50       | 7.94                      | 0.04   |
| Am heterologous            | MB-OVA           | M-Ab       | 0.50                                     | 0.25       | 7.24                      | 0.02   |
|                            | MB-OVA           | MC-Ab      | 0.50                                     | 1.00       | 21.40                     | 0.03   |
| Structure heterologous     | 2,4-D-OVA        | M-Ab       | 0.50                                     | 0.50       | 0.30                      | 0.01   |
|                            | 2,4-D-OVA        | MC-Ab      | 1.00                                     | 2.00       | 0.41                      | 0.02   |
|                            | 2,4-D-OVA        | MB-Ab      | 1.00                                     | 2.00       | 0.64                      | 0.01   |

## 2.2 抗体的特异性比较

从亲和性试验结果可知,针对同一包被抗原,属 M-Ab 亲和性最强,MC-Ab 与 MB-Ab 差异不

大。因此本文仅对 M-Ab 和 MB-Ab 的特异性(抗体的特异性通常用 CR 表示)作了比较,结果见表 2。

Table 2 The specificity of antibodies of MCPA

|                    |                 |                           | Analogous compound |       |                |               |                |               |
|--------------------|-----------------|---------------------------|--------------------|-------|----------------|---------------|----------------|---------------|
|                    |                 |                           | MCPA               | 2,4-D | 2,4-D butylate | MCPA-ethylate | MCPB-methylate | MCPB-ethylate |
| Homologous assay   | M-OVA/M-Ab      | $IC_{50}/mg \cdot L^{-1}$ | 1.08               | 31.60 | 2.73           | 0.76          | 1.19           | 1.32          |
|                    |                 | CR (%)                    | 100.0              | 3.4   | 39.6           | 142.1         | 99.1           | 81.8          |
|                    | MB-OVA/MB-Ab    | $IC_{50}/mg \cdot L^{-1}$ | 7.94               | 123.0 | 8.85           | 1.30          | 3.32           | 3.75          |
|                    |                 | CR (%)                    | 100.0              | 6.5   | 89.7           | 610.8         | 239.2          | 211.7         |
| Heterologous assay | MB-OVA/M-Ab     | $IC_{50}/mg \cdot L^{-1}$ | 7.24               | 30.20 | 9.50           | 0.78          | 1.39           | 1.35          |
|                    |                 | CR (%)                    | 100.0              | 24.0  | 76.2           | 933.0         | 520.9          | 536.3         |
|                    | M-OVA/MB-Ab     | $IC_{50}/mg \cdot L^{-1}$ | 1.50               | 5.53  | 0.86           | 0.46          | 0.91           | 0.53          |
|                    |                 | CR (%)                    | 100.0              | 27.1  | 174.4          | 329.7         | 164.8          | 285.7         |
|                    | 2,4-D-OVA/M-Ab  | $IC_{50}/mg \cdot L^{-1}$ | 0.30               | 5.83  | 2.50           | 0.13          | 0.32           | 0.20          |
|                    |                 | CR (%)                    | 100.0              | 5.1   | 12.0           | 230.8         | 93.8           | 147.1         |
|                    | 2,4-D-OVA/MB-Ab | $IC_{50}/mg \cdot L^{-1}$ | 0.64               | 3.61  | 1.16           | 0.24          | 0.48           | 0.40          |
|                    |                 | CR (%)                    | 100.0              | 17.7  | 55.2           | 266.7         | 133.3          | 160.0         |

从表 2 结果可以看出,无论是同源还是异源分析,各种类似化合物的交叉反应情况为:2甲 4 氯乙酯 > 2甲 4 氯丁酸乙酯 > 2甲 4 氯丁酸甲酯 > 2,4-D 丁酯 > 2,4-D; 而前三者的交叉反应率都超出 100%,即  $IC_{50}$  值较 2甲 4 氯低,可见,它们与抗体的亲和力都比 2甲 4 氯的强,可能是因为它们间隔臂较长,从而有利于抗原决定簇与抗体的结合。2,4-D 丁酯和 2,4-D 的交叉反应率相对低

一些,这是因为抗体对抗原决定簇中某些基团(-Cl)的识别。另一方面,对于同一种类似化合物,看不出同源分析和异源分析在交叉反应上的区别。

## 3 讨论

在报道的免疫化学分析中,以同源分析为主,

但从一些文献中可知,虽然异源分析可能会增加抗原抗体在工作浓度,但分析灵敏度往往可以提高几倍、几十倍,甚至几百倍。1984年, Hammock<sup>[1]</sup>研究了异源分析(包被抗原和免疫抗原间隔臂长度和引入位点的异源性)对杀虫剂苯甲酰苯基脲(benzoylphenylurea)检测灵敏度和特异性的影响,结果表明异源分析能提高检测灵敏度,而且间隔臂引入位点的异源分析要比改变臂长度的异源分析灵敏得多。1992年,他对莠去津的异源分析(间隔臂长度和引入位点的异源)进行了研究,也得出了相同的结论<sup>[2]</sup>。2003年,他研究了间隔臂的异源对有机磷农药倍硫磷免疫分析灵敏度的影响,指出间隔臂的异源分析通常是用来消除抗体对间隔臂部分的识别,因为抗体对间隔臂的强亲和力会降低其与目标化合物的结合,从而降低检测灵敏度;包被抗原间隔臂长度的异源对灵敏度没有明显的影响,而半抗原结构的差异(仅将-H改为-CH<sub>3</sub>-)可大大提高ELISA分析灵敏度<sup>[3]</sup>。

作者以2甲4氯为研究对象,分别比较了它们的同源分析和异源分析的灵敏度和特异性。结果表明,异源分析特别是半抗原结构异源可大幅度提高检测灵敏度(以2,4-D-OVA为包被抗原时的IC<sub>50</sub>值和检测限最低,分别比以M-OVA、MC-OVA和MB-OVA为包被抗原时高出3倍、30倍和25倍以上)。这与Hammock等<sup>[2]</sup>(研究了酶标半抗原的异源性对三嗪类除草剂的灵敏度的影响,指出半抗原结构的异源对灵敏度的影响很大,仅一个甲基的差异就能使检测灵敏度提高8倍)和Gerdes等<sup>[4]</sup>(研究了2,4-D的置换免疫分析,以MCPA-BSA代替2,4-D-BSA作为包被抗原进行分析,使灵敏度提高了1000倍,检测限由原来的100 μg/L降为0.1 μg/L)的结论相符。而对于间隔臂异源分析,适当降低包被抗原与抗体的亲和力(即减少包被抗原的间隔臂长度),有利于提高检测灵敏度。由此可见,并不是抗原抗体反应的亲和力越强,灵敏度就越高,而是农药与包被抗

原在竞争反应中的竞争能力起关键作用。要阐明这一现象的机理,尚有待更深入的实验研究。

从特异性实验结果可知,无论是同源还是异源分析,各种类似化合物的交叉反应情况为:2甲4氯乙酯 > 2甲4氯丁酸乙酯 > 2甲4氯丁酸甲酯 > 2,4-D丁酯 > 2,4-D,说明抗体对C1原子基团和-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>有较强的识别,关于这个理论,Dunbar<sup>[5]</sup>、Goodrows<sup>[6]</sup>等对三嗪类除草剂的研究中均提到过;类似化合物碳链的增加,亦可加强抗体对化合物的识别,从而降低抗体的特异性。

## 参考文献:

- [1] Wie S I, Hammock B D. Comparison of coating and immunizing antigen structure on the sensitivity and specificity of immunoassays for benzoylphenylurea insecticides[J]. J Agric Food Chem, 1984, 32: 1294-1301.
- [2] Schneider P, Hammock B D. Influence of the ELISA format and the hapten enzyme conjugate on the sensitivity of an immunoassay for S-triazine herbicides using monoclonal antibodies[J]. J Agric Food Chem, 1992, 40: 525-530.
- [3] Kim Y J, Cho Y A, Hammock B D, et al. Synthesis of haptens for immunoassay of organophosphorus pesticides and effect of heterology in hapten spacer arm length on immunoassay sensitivity[J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 475: 85-96.
- [4] Gerdes M, Meusel M, Spener F. Development of a displacement immunoassay by exploiting cross-reactivity of a monoclonal antibody[J]. Anal Biochem, 1997, 252: 198-204.
- [5] Dunbar B, Riggle B, Niswender G. Development of enzyme immunoassay for the detection of triazine herbicides[J]. J Agric Food Chem, 1990, 38: 433-437.
- [6] Goodrow M H, Harrison R O, Hammock B D. Competitive inhibition ELISA for the S-triazine herbicides: Assay optimization and antibody characterization[J]. J Agric Food Chem, 1991, 39(1): 122-128.
- [7] SHI Haiyan(施海燕), WU Huiming(吴慧明), CHENG Jingli(程敬丽), et al. 2甲4氯人工抗原的合成与鉴定[J]. Chin J Pestic Sci(农药学学报), 2004, 6(2): 20-24.

(Ed. JIN S H)