

酶联免疫吸附测定试验 (ELISA) 的操作要点

吴 娟

(北京大学人民医院 北京肝炎试剂研制中心 100044)

【摘要】目的 探讨酶联免疫吸附测定试验的操作要点。临床 ELISA 测定现通常为采用手工操作的以微孔板条为固相的测定模式, 测定操作非常简单, 一般涉及到标本的收集保存、试剂准备、加样、温育、洗板、显色、比色、结果判断和结果报告及解释等方面, 其中任一步骤的不当都会影响测定结果, 且尤以加样、温育和洗板等步骤为甚, 现将操作中的体会分述如下。

【关键词】ELISA; 测定试验; 操作要点

1 标本的收集和保存

用于 ELISA 测定的临床标本最为常用的是血清(浆), 有时因为特定的检测目的, 也用到唾液、脑脊液、尿液、粪便等标本。目前临床上使用血清标本测定的标志物一般有传染性病原体的抗原和抗体、肿瘤标志物、激素、特种蛋白、细胞因子和治疗药物等。

用于传染性病原体的抗原和抗体的血清标本的收集则没有时间和体位方面的影响, 只是在处理和保存方面要考虑以下几个方面:

(1) 要注意避免出现严重溶血。血红蛋白中含有血红素基团, 其有类似过氧化物的活性, 因此, 在以 HRP 为标记酶的 ELISA 测定中, 如血清标本中血红蛋白浓度较高, 则其就很容易在温育过程中吸附于固相, 从而与后面加入的 HRP 底物反应显色, 从而产生非特异性发应。

(2) 样品的采集及血清分离中要注意避免细菌污染, 一则细菌的生长, 其所分泌的一些酶可能会对抗原抗体等蛋白产生分解作用; 二则对用相应酶作标记的测定方法产生非特异性干扰。

(3) 血清标本宜在新鲜时检测, 放置时间过长均可产生假阳性反应, 如在冰箱中保存过久, 可发生聚合, 在间接法中可使本底加深。血清标本如是以无菌操作分离, 则可以在 2-8℃ 下保存一周, 如为有菌操作, 则建议冰冻保存。标本的长时间保存, 应在 -70℃ 以下。

(4) 冰冻保存的血清标本须注意避免因停电等造成的反复冻融。标本的反复冻融所产生的机械剪切力将对标本中的蛋白等分子产生破坏作用, 从而引起假阴性结果。此外, 冻结血清溶解后, 蛋白质局部浓缩、分布不均, 应充分混匀、轻缓、避免气泡, 可上下颠倒混合, 不要在混匀器上强烈振荡。

(5) 标本在保存中如出现细菌污染所致的混浊或絮状物时, 应离心沉淀后取上清检测。反复冻融会使抗体效价跌落, 所以测抗体的血清标本如需保存作多次检测, 宜少量分装冰存。保存血清自采集时就应注意无菌操作, 也可以加入适当防腐剂。

2 试剂的准备

在临床实验室, 对试剂准备一般不太注意, 通常的做法是, 在实验时将试剂从冰箱中拿出来即用, 而忽略了这种做法

有可能影响后面温育时间不够的问题, 其直接的后果是对一些弱阳性标本的检测出现假阴性。因此在 ELISA 测定中试剂的准备最为关键的是:

(1) 在实验开始前, 将试剂盒先从冰箱中取出, 在室温下放置 20 分钟以上后, 再进行测定, 以使试剂盒在使用前与室温平衡。这样做的目的, 主要是为了在后面的温育反应步骤中, 能使反应微孔内的温度能较快地达到所要求的高度, 以满足测定要求。

(2) 目前的 ELISA 试剂盒中的洗板液均需在实验室使用时对所提供的浓缩液稀释配制, 因此稀释时所用的蒸馏水或去离子水应保证质量。

(3) 当试剂盒以 OPD 为底物时, 则底物溶液应在反应显色前临时配制。

3 加血清样本及反应试剂

在 ELISA 中一般有 3 次加样步骤, 即加标本、加酶结合物、加底物。

在现在的 ELISA 商品试剂盒中, 血清样本的加入几乎是唯一的要使用微量加样器加入样本的步骤。使用微量加样器加样必须注意的关键点是:

(1) 加样不可太快, 要避免加在孔壁上, 不可溅出和产生气泡;

(2) 每次加标本应更换吸头, 以免发生交叉污染, 有些测定需用稀释的血清, 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, 再在其中加入血清标本, 然后在微型振荡器上振荡 1 分钟以保证混合。

加酶结合物、加底物, 可以使用多道微量加样器, 使加液量准确均一、加液过程迅速完成。也可使用试剂盒提供的滴瓶直接滴加。滴加时, 除了要注意滴加的角度外, 滴加的速度也很重要。滴加太快, 很容易出现重复滴加或加在两孔之间的现象。

4 温育

温育是 ELISA 测定中影响测定成败最为关键的一个因素。ELISA 属于固相免疫测定, 抗原、抗体的结合反应在固相上进行, 要使液相中的抗原或抗体与固相上的特异性抗体或抗原完全结合, 必须在一定温度条件下反应一定的时间。温育所需时间与温度成反比, 即温度越高, 由所需时间相对较短。

最为常用的温度有37℃和室温,其次是43℃和2-8℃,通常目前国内ELISA商品试剂盒的反应温育时间为37℃30分钟至1小时。关于温育,在实际测定操作中一定要注意以下几点:

(1) 要保证在设定的温度下有足够的反应时间。一般来说,加完样本或反应试剂后,将微孔板从室温拿至水浴箱或温箱中时,孔内温度从室温升至37℃,需要一定的时间,尤其是在室温比较低以及非水浴的状态下,这段升温时间可能还比较长,而在临床实验中,很少有人注意这个问题,通常是将微孔板一放入温箱即开始计时,这样就很容易造成在实际测定中温育时间不够,弱阳性样本测不出来的问题。为保证37℃下足够的温育时间,临床实验室可自行确定本实验室不同季节(不同室温下)微孔板从室温拿至温箱后需要多长时间孔内温度才能达到37℃,从而适当延长板条在温箱中的放置时间。

(2) 温育温度的选择。在有的ELISA试剂盒的说明书中,指出温育温度可有两种,例如,一种是37℃下1小时,另一种则为43℃下45分钟。从免疫测定的抗原抗体反应的本质来看,在较低的温度下反应较长的时间最为完全,如2-8℃下反应24小时。较高的反应温度,由于分子运动的加快,反应时间缩短,这一点对分子含量较多的强阳性样本测定没有问题,但对分子含量少的弱阳性样本则有漏检的可能。因此,我们建议在临床ELISA测定中尽量使用较低温育较长反应时间的条件。

(3) “边缘效应”的排除。以前在使用96孔板的ELISA测定中,常发现有“边缘效应”,即外周孔显色较中心孔深。聚苯乙烯本身为不良热导体,在实验室的常规ELISA测定中,将板从室温置于37℃温箱,板孔升温时,在外周孔与中心孔之间可能存在一热力学梯度。因此反应板不宜叠放,以保证各板的温度都能迅速平衡。使用水浴或在将反应溶液加入至板孔中时,将板和溶液均加热至温育温度(如37℃),或将ELISA板置于水浴箱中,ELISA板底应贴着水面,使温度迅速平衡。为避免蒸发,板上应封盖。让反应板漂浮在水面上。若用保温箱,需用湿盒,内垫湿纱布,将板放在湿纱布上。湿盒应先放在保温箱中预热至规定温度。就可以很容易地排除“边缘效应”,并且可提高测定的重复性。

5 洗板

洗涤在ELISA虽不是一个反应步骤,但也决定着实验的成败。ELISA就是靠洗涤来达到分离游离的和结合的酶标记物的目的。通过洗涤以清除残留在板孔中没能与固相抗原(抗体)结合的物质,以及在反应过程中非特异性的吸附于固相载体的干扰物质,以保证ELISA测定的特异性。

在临床实验室中,ELISA测定的洗板一般有两种方式,即手工和洗板机洗板。为保证微孔板的均一性使结果准确可靠,最好选用洗板机洗板。若手工洗板,要注意浸泡时间和洗液不要互相流动。

6 显色

显色是ELISA中的最后一步温育反应,此时酶催化无色的底物生成有色的产物。反应的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呈色加强。适当提高温度有助于加速显色进行。

加入底物后的反应温度和时间应按规定力求准确。

在目前的以HRP作为标记酶的商品ELISA试剂盒中,如以TMB为底物,则提供的底物为A和B两瓶应用液;一般试剂盒显色反应条件为37℃或室温反应15-30分钟。从理论上说,37℃30分钟才可以使HRP的底物催化反应完全(注意弱阳性血清)。此外,在加入底物开始显色反应前,最好是先检查一下底物溶液的有效性。TMB受光照的影响不大,可在室温中至于操作台上,边反应边观察结果。但为保证实验结果的稳定性,宜在规定的适当时间阅读结果。而以OPD为底物,则需避光进行。TMB的终止液有多种,酸性终止液会使蓝色转变成黄色,此时可用特定的波长(450nm)测读吸光值。

7 比色

ELISA的比色测定由酶标仪进行。有的同行可能认为,既然由酶标仪进行,那么此时便可以万事大吉了,其实不然,因为当代较为先进的酶标仪,均有较多的功能,使用不当,会得到令人难以理解的结果。如使用酶标仪比色测定后,有许多的阴性测定孔的吸光度值为负数;或测定假阳性率大大增加等。这主要是没有正确地理解和使用酶标仪所致。此处强调下面几点:

(1) 酶标仪不应安置在阳光或强光照下,室温宜在15-30℃,使用前先预热仪器15—30分钟,测读结果更稳定。各种酶标仪性能不同,使用前应仔细阅读说明书。

(2) 比色前应先使用洁净的吸水纸拭干板底附着的液体,然后将板正确放入酶标比色仪的比色架中。比色时应设空白孔,各孔的吸光度需减去空白孔的吸光度,然后进行计算。

(3) 比色测定时,一定要注意酶标仪的波长是否已调至合适或所用滤光片是否正确。比色结果的表达以光密度(optical density OD)或吸光度(absorbance A)来表示,通常的表示方法是“A450nm”或“OD450nm”。

(4) 单波长或双波长比色选择的问题。双波长比色测定具有能排除由微滴板本身、板孔内标本的非特异性吸收、指纹、刮痕、灰尘等对特异显色测定吸光度的影响的优点,一般不必设空白孔。如在使用双波长比色时,仍设空白孔,就可能会造成测定孔吸光度为负数的现象。由于ELISA测定中单个空白孔的非特异吸收具有一定程度的不确定性,也就是说每次测定或同次测定空白孔位置的不同均有可能得到不同吸光度测定值,故而在ELISA测定比色时,最好是使用双波长比色。

8 结果判断

临床ELISA测定按其表示测定结果的方式分为定性和定量测定两大类。定性测定只是对标本中是否含有待测抗原或抗体作出“有”或“无”的结论,分别用“阳性”和“阴性”来表示。可见定性测定通常是用于传染性病原体的抗原或抗体的测定,以判断特定病原体感染的存在与否。

目前国内在临床上应用的ELISA试剂盒绝大部分是用于传染性病原体的抗原或抗体的定性测定,也有少部分用于FP、hCG、细胞因子等因子等的定量测定。ELISA定性测定的“阴性”和“阳性”的判定依据是试剂盒所确定的阳性判定值(Cut off)。

下面再解释一下在ELISA定性测定结果判定中常用的一些缩写：

(1) S/C0：其中S为sample(样本)或specimen(标本)的简写，表示的是标本测定的吸光度值，C0为cut off值的简写。除竞争抑制法外，其它ELISA定性测定模式中，当S/C0值大于或等于1时，标本的测定为阳性，小于1时为阴性。

(2) S/N或P/N：其中S同(1)，N为Negative(阴性对照)的简写，P为Patient(患者)的简写。较早的试剂盒很多都使用S/N或P/N 2.1为阳性判定标准，现仍有一些试剂盒使用这种方式。这种方式与S/C0方式无根本性区别，只不过是前者将阴性对照(N)的2.1倍视为Cut off值而已。

9 结果报告及解释

临床ELISA测定结果的报告较为简单。定性测定报阴性或阳性即可；定量测定则报出具体的数值。结果的解释比较起来要复杂的多，它要求实验室技术人员对所测定的项目有较为全面的知识基础。现在检验不再是单纯的实验室测定，而已成为一门临床医学学科，即检验医学，这就要求从事医学检验工作的检验医师，对所做的测定项目除了知其然，还要知其所以然。

综上所述，尽管ELISA测定的操作步聚非常简单，但有可能影响测定结果的因素却较多，分布在测定操作的各步之中，尤以加样、温育和洗板为甚。为了帮助大家分析查找测定中出现问题的可能原因，特对常见问题及原因归纳总结

于下表中。

表：临床ELISA测定中可能会出现的问题及可能的原因

问题	可能的原因(非试剂盒本身的原因)
1. 弱阳性质控样本检测不出	温育时间或温度不够；显色反应时间太短；所用配制缓冲液的蒸馏水有问题。
2. 测定的重复性(相同样本两次测定结果不一致)	这是典型的测定操作所引起的问题，包括(1)加样本及试剂量不准，孔间不一致；(2)加样过快，孔间发生污染；(3)加错样本；(4)加样本及试剂时，加在孔壁上部非包被区；(5)不同批号试剂盒中组分混用；(6)温育时间、洗板、显色时间不一致；(7)孔内污染杂质；(8)血清标本未完全凝固即加入，反应孔内出现纤维蛋白凝固或残留血细胞，易出现假阳性反应。
3. 白板(阳性对照不显色)	(1)漏加酶结合物；(2)洗板液配制中出现问题，如量筒不干净，含酶抑制剂(如叠氮钠)等；(3)漏加显色剂A或B；(4)终止剂当显色剂使用。
4. 全部板孔均有显色	(1)洗板不干净；(2)显色液变质；(3)底物的吸光受酶污染；(4)洗板液受酶等污染。

表：临床ELISA测定中可能会出现的问题及可能的原因
优质的试剂，良好的仪器和正确的操作是保证ELISA检测结果准确可靠的必要条件。ELISA的操作因固相载体的形成不同而有所差异，国内医学检验一般均用板式。严格遵照规定操作，必能得出准确的结果。

(上接11页)花大量的时间在常规的药物供应上，即使是与临床接触最多的临床药师，也难把主要精力放在查房、参加会议、查阅病历、提供药物咨询、开展药物监测、建议调整和监察药物不良反应等工作上。

3.2.2 人员编制不足 我国医院的药剂人员编制大多低于国家规定的8%，这样原本人手就少，更加无力进行费时费力的PC工作了。目前，医院药剂科主任和科室业务骨干必须先转变观念，提高认识，培养人才，积极组织力量，克服困难，稳步开展PC工作。

3.2.3 工作场所有限 PC工作，需要登记病人病历，向医护人员和病人提供用药咨询服务，收集用药信息等活动都需要在治疗现场，这就必须在各病区设有药师的工作场所，这个条件目前我国医院还普遍达不到。

3.2.4 相关劳动报酬得不到补偿和回报 药师向病人提供PC付出了比常规工作更多精力和时间，但是这种付出往往得不到经济上的补偿和回报，长此以往，必然会影响药师工作积极性和医院的投资无法收回，难保此项工作的长久坚持下去。

3.3 信息资源方面的障碍

3.3.1 医疗信息不足 向病人提供PC的药师不仅要能够及时获得药物的知识和最新信息，更重要的是要能够取得病人的医疗文件(既往病史、病程记录、治疗单等)，但是药师往往不容易得到这方面的信息。因此，开展PC工作要解决医疗信息的共享问题(借助电脑无纸化管理及局域网加以实现)。

3.3.2 药师缺乏编写医疗文件的经验。药师应当为每位病人建立正规的病历，详细记录病人的药物治疗情况、用药时间和用药前后化验的结果(疗效和反应等)，但是目前药师普遍缺乏编写常规医疗文件的训练和经验。

4 结语

21世纪药师的基本任务就是实施PC，许多药学领域的领导者已经接受了PC的概念，并且正在计划和实施将药房从单纯的调配功能向临床专业的转化^[5]。未来的药师应该既懂得药物又了解临床，通过充分发挥药师的专业特长，保证理想的用药效果，尽可能使得每一位病人在接受药物治疗以后能够保持正常的机体功能和精神状态，生活健康幸福^[6]。

参考文献

- [1] 张新萍、郭海平、杨智敏.《药学监护与临床》，中国医院药学杂志，1997，16(10):469.
- [2] 胡普红、蔡秦.《美国的药学服务》，中国药房，1998，9(6):283-285.
- [3] 高世嘉.《药学发展的新阶段——药师监护》，中国药学杂志，1998，30(2):97.
- [4] 唐镜波.《药学监护的发展与策略》，中国药房，1999，6(1):7.
- [5] 黄仲义.《医院药学的变革与未来》，中国药房，2001，9(5):213.
- [6] 张均、魏水易.《医院药学工作模式与药学保健》，药学实践杂志，1999，13(2):114-118.