

综述与专论

酶联免疫吸附法的新进展

胡 昌 勤

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

提 要

ELISA (酶联免疫吸附法) 试验近两年来的进展情况可分为 5 部分: a. 抗原包被技术, b. 提高 ELISA 的灵敏度, c. 提高 ELISA 的特异性, d. ELISA 的实验设计与理论, e. ELISA 的应用。从中可以看出 ELISA 的进展趋势。

关键词 免疫测定, 酶免疫测定, 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immuno-sorbent assay, ELISA) 作为一项基本的免疫测定方法, 近年来得到迅速发展。ELISA 技术已经在各领域被普遍应用。据分析以 ELISA 为代表的固-液抗原-抗体反应体系, 今后大有取代经典的以同位素标记为基础的液-液抗原-抗体反应体系。本文对近年来 ELISA 实验技术的进展情况进行综述。

1 抗原包被技术

抗原包被 (coating) 的质量是影响固-液抗原-抗体反应的重要因素。ELISA 使用的微孔板通常为聚苯乙烯板, 它和蛋白类抗原有较强的相互作用。目前蛋白类抗原的包被技术已经相当成熟。包被技术的改进主要集中在对和聚苯乙烯亲和力较弱的抗原, 如半抗原、短肽、完整细胞及多糖类抗原等的包被上。

半抗原通常以半抗原-载体结合物的形式包被, 这样既能克服半抗原在微孔板上不易吸附的弱点, 又为抗原-抗体反应提供了合适的空间环境。我们在对头孢菌素半抗原的分析时发现, 半抗原通常也存在多个抗体结合位点, 且各位点在与抗体的结合过程中所起的作用不同。

因此和载体结合后, 主要抗体结合位点的结构及空间构象不能有太大的改变。否则和抗体的结合作用将减弱。Tiefenauer 等对类固醇类半抗原的研究得出相同的结论。蛋白质是最常见的半抗原载体。但用半抗原-蛋白质做包被抗原存在两个主要问题: a. 包被抗原制备的重现性不好, 且贮存中不稳定。b. 易和抗血清(体)发生交叉反应。Verschoor 等^[1]报道, 尼龙(如尼龙 6)可做为半抗原的载体。由 DCC (dicyclohexylcarbodiimide) 为交联剂制备的半抗原-尼龙结合物不仅在室温放置稳定; 用苯酚-乙醇溶解后即可在微孔板上包被。Ordroneau 等^[2]利用戊二醛 (glutaraldehyde, GA) 将含有氨基的半抗原直接与微孔板连接, 并以此为基础建立了可行的 ELISA 操作程序。虽然上述两项研究均克服了用半抗原-蛋白质包被的弱点, 但使用后半抗原-尼龙可能更方便。

短肽类抗原在微孔板上的吸附情况差异很大, 某些短肽极难包被。Zouali 等^[3]报道, 利用 UV 辐射处理微孔板可增加短肽在微孔板上的亲合力。包被的情况可用生物素-抗生物素-过氧化物酶技术 (avidin-biotin-peroxidase assay)^[4]

来检测。对某些来源困难的短肽,可将其羧基直接与经修饰的微孔板共价连接^[7],该方法不仅减少了抗原在包被过程中的丢失,且使得 ELISA 的重现性及灵敏性都有所提高。

对小分子抗原包被的另一新进展反映在对金属元素的包被上。抗金属元素抗体是近年来的新发现,Clarke^[6]采用电子束镀膜法(electronbeam evaporation)实现了对金属铍的包被,并对抗-铍抗体进行了 ELISA 分析,该包被技术是否具有普遍意义有待于进一步的证实。

ELISA 还可用于分析细胞膜表面抗原。虽然某些细胞经空气干燥即可吸附到微孔板表面,但通常需用戊二醛固定细胞。Carroll 等^[8]报道,戊二醛的最适浓度(可有效固定细胞,但不引起抗体非特异吸附)和微孔板的材质及检测细胞的特性有关;其最适浓度范围(0.05%—0.025%)非常窄。这些结果有助于对实验条件的选择。

多糖类抗原通常需经化学修饰以增强和微孔板的亲和力。但利用真空过滤技术(vacuum filtration)^[8]可使之直接吸附到硝酸纤维素膜(NC)上。包被在 NC 上的抗原可由酶免疫法检测从而避免了化学修饰过程中抗原性的改变。

Smith 等^[9]最近尝试在经聚四氟乙烯处理的盖玻片上包被抗原,并取得对 HIV 抗体的检测成功,该方法耗用的试剂量仅为 5—10 μ l,因此花费比所有其它 ELISA 都低。

2 提高 ELISA 的灵敏度

ELISA 的检出线虽然已经达到 10^{-8} — 10^{-12} g,但对某些测定仍需有更高的灵敏度。传统 ELISA 中显色剂发色团的吸光度是限制 ELISA 灵敏度提高的主要因素。虽然改用荧光标记或其它化学发光物标记抗体替代酶标记抗体可以提高灵敏度,但它们的应用受到设备条件的限制。提高 ELISA 灵敏度的主要途径是采用酶放大系统。已经有多种酶放大系统,较新的系统有 Bobrow 等^[10]的 CARD (catalyzed reporter deposition) 法,利用与抗体偶联酶的

一级反应,去引发已经包被到微孔板上的二级反应系统,以实现放大作用。Lejeune 等^[11]利用亲和色谱技术发展了一个新的酶放大系统。用二种免疫亲和树脂,在色谱过程中形成酶₁-抗体-抗原-酶₂复合物。二种酶的联级放大作用使检测灵敏度大大提高。该方法测定人生长激素的检出限低于 10^{-15} mol。另外在以 NAD^+ / NADH 循环为基础的酶放大系统中,加入氨基脲试剂可以增加 NAD/NADH 的循环,使该放大系统的灵敏度进一步提高^[12]。酶放大系统的突出问题是实验误差较大,方法复杂。

在不增加设备条件的情况下,改变传统 ELISA 的操作程序也可以提高灵敏度。Naser 等^[13]介绍的 SIMIT (single incubation multilayer immune technique) 技术,利用抗体和抗-抗体能形成多层复合物的特性,将预先混合好的抗体,抗抗体-酶一步加入到包被好的微孔板中,经保温洗涤后,即可测定结果。该方法可以使 ELISA 的检测水平提高 10—20 倍。如果和振荡-保温系统^[14]结合,还可以大大简化 ELISA 的操作步骤,缩短检测时间。因此很有实用价值。

3 提高 ELISA 的特异性

ELISA 中可发生多种非特异吸附作用,但主要的非特异反应是由于抗体反应体系选择不当所致。不合适的抗体反应体系(如大鼠抗体和小鼠抗体反应系统)引起的非特异反应可导致 ELISA 出现假阳性结果。选择适当的抗体组合(如羊 IgG 和兔 IgG 反应系统)可明显地减少这种非特异反应的发生。实践中通常采用一些简单的预处理,如用固定化的抗生物素蛋白预先处理抗血清,去除抗体和抗生物素蛋白间的非特异作用;用小鼠的非特异免疫球蛋白预处理血清,减弱其它抗体和小鼠抗体(单克隆抗体)的非特异结合;避免这种非特异反应的发生。此外在设计一个具体的 ELISA 检测系统时,还应考虑不同封闭蛋白的封闭效果、实验用水的纯度^[15]、缓冲液的种类及实验中的某些处理步骤等一些细节的影响作用。总之,设计特

定的实验方法检测特定物质是 ELISA 试验的发展方向。

开发新的免疫试剂,提高免疫试剂的质量是提高 ELISA 特异性的另一途径。高选择性的单克隆抗体的应用明显地改善了抗体和异质抗原间的交叉反应,筛选高选择性的单克隆抗体技术已经很成熟。目前已能筛选构象特异性单克隆抗体^[16]。单克隆抗体将逐步取代多克隆抗体(血清)在 ELISA 中被应用。新开发的细菌 IgG 结合蛋白 H 已在 *E. coli* 中克隆并表达^[17]。蛋白 H 可选择性的和人 IgG 结合,但没发现能与 IgM, IgA 和 IgE 结合。它的另一突出特点是和牛 IgG 没有交叉反应,从而避免了对细胞培养物检测时由牛血清带来的干扰。因此是一个非常有价值的免疫试剂。

ELISA 和其它分析技术的结合,不仅可区别异质抗原间的交叉反应,而且已发展成专门的分析方法。如和电泳技术的融合——免疫印迹技术;和层析技术的融合——层析-ELISA 技术。前者利用电泳技术分离混合抗原,后者通常利用层析技术分离混合半抗原。免疫印迹技术已相当成熟,Harper 等对此已有详细的综述。而层析-ELISA 技术的应用还不普遍,一个重要的原因是半抗原转移技术还不成熟。

Mann 等^[18]最近报道了一个称之为特异性部位免疫测定(active site-specific immunoassay)法,该方法利用酶(抗原)对底物的特异性和抗体对抗原(酶)的特异性为双重识别,大大提高了检测的专属性。对酶(受体)类抗原的检测提供了新的测定方法。

4 ELISA 的实验设计与理论

ELISA 可用于含量分析。测定时微孔板上要同时设有标准样品和待测样品。测试结果的准确性与待测样品的重复数有关。增大待测样品和标准样品的重复数,可提高测定结果的精度;但同时也减少了一块微孔板上能测定的样品数目。Bunch 等^[19]利用统计学原理,对 ELISA 中待测样品和标准样品在 96 孔微孔板中不同配置引起的误差情况进行了分析。实验

中可以根据各自的实验误差要求选择最佳配置。此外,根据 Pruslin 等^[15]的建议,在含量分析中还应特别留意实验空白值的合理性及做为二抗的抗体-酶用量是否合适。以提高测定结果的精确性。

ELISA 实验设计的另一研究焦点集中在对抗体亲和力(affinity)的测定上。ELISA 可以方便地测定抗原-抗体复合物的解离常数(K_d)。尤其当抗体的亲和力较低,其它方法不易测定时,ELISA 更显出其优越性。亲和力测定的 ELISA 方法以 Friguét 法较为成熟。最近的研究,如抗原中抗原决定簇的密度对亲和力测定的影响^[20];包被抗原对液相中抗原-抗体反应的影响^[21]等,已促使 Friguét 法更加完善。ELISA 测定的亲和力结果已经接近真值。在完善经典测定方法的同时,也有人试图采用新的途径测定亲和力。Hoylaerts 等^[22]利用类似于在二底物酶动力学研究中应用的数学处理方法,在液相中有抗体存在的情况下分析溶液中抗原和包被抗体的结合作用。反应强度和液相中抗体浓度的双倒数曲线呈直线。由不同包被量抗体得出的一组直线的交点即为 K_d 。该方法的主要问题是低浓度情况下常带来试验误差,这种偏差在双倒数做图时又被放大,因此影响对 K_d 值的精确测定。

Chapman 等^[23]对液相中抗体和固相抗原的结合作用进行了分析。分析结果表明这种结合服从 Langmuirian 等温方程,因此被称为 Langmuirian 吸附。用 Langmuirian 吸附理论可以很好地解释竞争 ELISA 的试验结果。

5 ELISA 的应用

近年来几项 ELISA 应用研究很值得一提。Pfund 等^[16]建立的构象敏感性免疫测定(conformation-sensitive immunoassay)法可用于鉴定构象特异性单克隆抗体。其基本原理为包被蛋白(抗原),利用变性技术使包被蛋白变性,然后利用传统的 ELISA 比较单克隆抗体和变性蛋白及正常蛋白的作用情况。当单克隆抗体仅能与正常蛋白作用,而不能与变性蛋白作用;

或仅能与变性蛋白作用,而不能与正常蛋白作用时,该单克隆抗体为构象特异性抗体。Inagaki 等^[24]利用该原理发展了一个对转移生长因子 α (transforming growth factor α , TGF α) 的非常特异的分析方法。在三明治 ELISA (Sandwich ELISA) 中,利用包被的兔抗 TGF α 抗体吸附样品中的 TGF α , 并使吸附后的 TGF α 构象改变;此时原先不外露在 TGF α 表面的 10—33 位氨基酸序列外露,利用筛选到的仅于该位点结合的单克隆抗体与之作用,从而解决了 TGF α 和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF) 间的交叉反应问题。

另一项用来改进淋巴细胞转化试验 (lymphocyte transformation test) 的 ELISA 方法^[25]是利用制备的 5-溴脱氧尿苷 (bromodeoxyuridine, BrdUrd) 抗体,检测细胞复制过程中 BrdUrd 的渗入量,进而测定经抗原处理的淋巴细胞的增殖情况。检测结果与传统的利用 H^3 -TdR 的测定结果相同,但由于所用的设备条件简单,因此使用起来更为方便。

综上所述: ELISA 技术的发展主要表现为完善和改进已有的测定方法,发展新的测定方法,使测定结果更灵敏,准确,使用范围更广泛。对新型免疫试剂的开发研究,尤其是利用基因工程,蛋白质工程开发出的超高效免疫试剂,如已开发的既有酶活性又能和抗体结合的变茶儿酚酶/蛋白 A 融合蛋白,将使 ELISA 应用起来更加方便,可靠。这将是今后发展的主要方向。

参 考 文 献

- 1 Verschoor J A, Vermeulen N M J, Visser L. Haptenated nylon-coated polystyrene plates as a solid phase for ELISA. *J Immunol Methods*, 1990; 127: 43
- 2 Ordronneau P, Abdullah L H, Petrusz P. An efficient enzyme immunoassay for glutamate using glutaraldehyde coupling of the hapten to microtiter plates. *J Immunol Methods*, 1991; 142: 169
- 3 Boudet F, Theze J, Zouali M. UV-treated polystyrene microtitre plates for use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides. *J Immunol Methods*, 1991; 142: 73
- 4 Griesmann G E, McCormick D J, Lennon V A. An avidin-biotin-peroxidase assay to detect synthetic peptides bound to polystyrene plates. *J Immunol Methods*, 1991; 138: 25
- 5 Andersen J S, Lauritzen E, Lind K *et al.* Covalently linked peptides for enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods*, 1990; 131: 99
- 6 Clarke S M. A novel enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of beryllium antibodies. *J Immunol Methods*, 1991; 137: 65
- 7 Carroll K, Lannon B, O'Kennedy R. Optimal fixation of cells for use solid-phase ELISA. *J Immunol Methods*, 1990; 129: 71
- 8 Feng S H, Rubinstein L J, Stein K E. A simple method for coating native polysaccharides onto nitrocellulose. *J Immunol Methods*, 1991; 137: 261
- 9 Smith K O, Ludwig M J, Stigall B W *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for HIV antibody by a glass slide technique. *J Immunol Methods*, 1991; 136: 239
- 10 Bobrow M N, Harris T D, Shaughnessy K J *et al.* Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification, Application to immunoassays. *J Immunol Method*, 1989; 125: 279
- 11 Lejeune R, Thunus L, Gomez F *et al.* Subfemtomole enzyme immunoassay for human growth hormone using affinity chromatography and enzyme amplified detection. *Anal Biochem*, 1990; 189: 217
- 12 Brooks J L, Mirhabibollahi B, Kroll R G. Increased sensitivity of an enzyme-amplified colorimetric immunoassay for protein A bearing *Staphylococcus aureus* in foods. *J Immunol Methods*, 1991; 140: 79
- 13 Naser W L. Single incubation multilayer immune technique. *J Immunol Methods*, 1990; 129: 151
- 14 Mushens R E, Scott M L. A fast and efficient method for quantification of monoclonal antibodies in an ELISA using a novel incubation system. *J Immunol Methods*, 1990; 131: 83
- 15 Pruslin F H, To S E, Winston R *et al.* Caveats and suggestions for the ELISA. *J Immunol Methods*, 1991; 137: 27
- 16 Pfund W, Bourdage J S. The conformation-sensitive immunoassay: a membrane based ELISA system for identifying antibodies sensitive to alterations of protein conformation. *Mol Immunol*, 1990; 27: 495
- 17 Akesson P, Cooney J, Kishimoto F *et al.* Protein H, A novel Ig G binding bacterial protein. *Mol Immunol*, 1990; 27: 523
- 18 Mann K G, Williams E B, Krishnaswamy S *et al.* Active site-specific immunoassays. *Blood*, 1990; 76: 755
- 19 Bunch D S, Rocke D M, Harrison R O. Statistical design of ELISA protocols. *J Immunol Methods*, 1990; 132: 247
- 20 Holland G P, Steward M W. The influence of epitope density on the estimation of the affinity of antibody for complex antigens. *J Immunol Methods*, 1991; 138: 245
- 21 Hetherington S. Solid phase disruption of fluid phase equilibrium in affinity assays with ELISA. *J Immunol Methods*, 1990; 131: 195

- 22 Hoylaerts M. F, Bollen A, Broe M E D. The application of enzyme kinetics to the determination of dissociation constants for antigen-antibody interactions in solution. *J Immunol Methods*, 1990; 126: 253
- 23 Chapman V, Fletcher S M, Jones M N. A simple theoretical treatment of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application to the detection of human blood group antigens. *J Immunol Methods*, 1990; 131: 91
- 24 Inagaki H, Katoh M, Kurosawa-Ohsawa K *et al.* A new sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for transforming growth factor α (TGF α) based upon conformational modification by antibody binding. *J Immunol Methods*, 1990; 128: 27
- 25 Huang P L T, Kolk A H J, Eggelte T A *et al.* Measurement of antigen specific lymphocyte proliferation using 5-bromo-deoxyuridine incorporation. *J Immunol Methods*, 1991; 140: 243

三链 DNA 的形成、结构测定及可能的生物学作用

郭 军 张平城 白春礼

(中国科学院化学研究所, 北京 100080)

提 要

对三链核酸的历史发展进行了简单的回顾。对三链 DNA 的形成条件、制备方法、结构测定手段和量子生物学方法分别加以评述, 指出了近期及今后的研究趋向。简单地讨论了三链核酸可能的生物学作用, 指出它具有特异性裂解正常 DNA 分子的功能并可阻断、诱导基因转录, 在治疗遗传性、病毒性疾病方面可能具有较大应用价值。

关键词 三链 DNA, 三链核酸, 三螺旋, Hoogsteen 碱基对, H-DNA

在过去相当长一段时间内, 三链 DNA 的生物学研究一直是一个比较受冷落的课题。1991 年 6 月 7 日, Moffat 在美国《Science》杂志发表了题为“三链 DNA 终于走向成熟”的文章^[1]。对三链 DNA 的当时最新动向做了简评, 认为三链 DNA 在充当“分子剪刀”以及阻断基因转录方面可能会具有较大的应用价值。Dervan, Helene 及 Hogan 三个研究小组已用第三股 DNA 来专一性地切断 DNA 的结合部位; Moffat 文中还提出, 至少在试管实验中, 三链 DNA 的形成可以选择性地抑制目标基因的转录。这些研究可以说是三链 DNA 领域的重要的转机, 因而引起人们的广泛的重视。

下面大致上从三链 DNA 的形成、结构测定、相应的量子生物学计算及可能的生物学作用等方面将一些有代表性的研究成果分类综

述。由于 DNA 与 RNA 结构及生物学作用的密不可分, 文中也提及了一些 DNA 和 RNA 杂交形成的三链结构的研究工作。

1 三链 DNA 的形成

早在 1957 年, Davis, Felsenfield 及 Rich 等 3 人就提出了三链核酸结构的概念, 他们以二条 poly(U) 和一条 poly(A) 链合成出一种三链物质。但当时并未引起人们的注意。主要原因当然是因为当时 Watson-Crick 双螺旋模型刚提出不久, 它解释了很多遗传现象, 而三螺旋模型却对此无能为力。此外还由于这种三链结构是由 RNA 形成而非 DNA。于是除了少数物理化学家外, 人们对这种实验室合成出