

关于 ELISA 若干问题的分析

张贵生

摘要: 简要分析了在 ELISA 检测技术应用中遇到的空白对照的设立方法、阴性对照的标准、酶标反应板的差异及孵育以及酶标仪的调零与比色、cut-off 值的确定、阳性与阴性灰带率、ELISA 检测试剂的标准化等一些新问题,重点探讨了 ELISA 检测技术中传统计算 cut-off 值的方式所存在的缺陷与形成原因,并提出了适宜的计算 cut-off 值的方式。

关键词: ELISA; 空白对照; 阴性对照; cut-off 值

中图分类号: R392.33

文献标识码: A

文章编号: 1003-9961(2009)09-0724-05

Analysis on problems in application of ELISA ZHANG Gui-sheng. Center for Disease Control and Prevention of Taiyuan Railway Bureau, Taiyuan 030013, Shanxi, China

Corresponding author: ZHANG Gui-sheng, Email: zhgsh6725@163.com

Abstract: This paper analyzes the problems in the application of ELISA on the establishment of blank control, the standard of negative control, the differences of ELISA plate, the incubation of the ELISA plate, zero setting and color selection of ELISA reader, the determination of cut-off value, positive and negative gray zone rate and the standardization of ELISA reagent.

Key words: enzyme-linked immunosorbent assay; blank control; negative control; cut-off value

自从 1971 年 Engvall 和 Perlmann 命名 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), 并且最先应用 ELISA 进行了 IgG 定量测定以来, ELISA 检测方法已经在疾病预防控制和临床检验医学领域内, 得到了广泛地应用, 但是, 随着分子生物学技术和 ELISA 检测技术及 ELISA 检测仪器设备的快速发展, 目前在 ELISA 检测方法中遇到一些新的问题, 需要我们以科学谨慎的态度, 在实践中, 不断地去思考、研究和探索。

1 空白对照^[1]

在 ELISA 检测方法中, 应当设有显色反应试剂空白对照和酶联反应试剂空白对照, 即在酶标反应板的孔中, 未加任何酶联反应试剂, 仅加入显色反应试剂, 以此酶标反应板孔作为显色反应试剂空白对照; 在酶标反应板的孔中, 以生理盐水或者稀释液替代检测标本, 参与酶联反应的全部处理过程, 以此酶标反应板孔作为酶联反应试剂空白对照。通过对显色反应试剂空白对照 A 值和酶联反应试

剂空白对照 A 值的检测, 可以准确地反映出本次 ELISA 试验的显色反应试剂和酶联反应试剂的稳定状况。

但是, 在目前国产的 ELISA 试剂盒中, 其 ELISA 检测技术操作说明书, 一般只要求设立显色反应试剂空白对照, 并且将显色反应试剂空白对照作为空白对照, 当作酶标仪调零的依据。笔者从长期的检测中发现显色反应试剂空白对照 A 值和酶联反应试剂空白对照 A 值是存在显著性差异的, 因而, 目前国产的 ELISA 试剂盒 ELISA 检测技术操作说明书所使用的空白对照设立方法, 存在着一定的问题, 是值得商榷的, 因为空白对照的设立, 对于 cut-off 值的确定, 具有决定性的作用。

2 阴性对照^[2,3]

在 ELISA 检测方法中, 阴性对照是一项至关重要的技术指标。阴性对照, 是代表受检样品中并不含有的, 或者是在该检测方法最低检出限之下的待检因子的基准水平, 是计算确定 cut-off 值过程中唯一的可变量。

从理论上而言, ELISA 检测试剂盒中的阴性对照, 应当是与待检样品具有同源性和同质性, 而又不含有待检因子, 并且能够客观地比较和鉴别处理因素(在血清学试验中, 指特异性的抗原与抗体的

作者单位: 山西省太原铁路局疾病预防控制中心, 山西 太原 030013
作者简介: 张贵生, 男, 山西省人, 主要从事医学病原微生物检验工作
通信作者: 张贵生, Tel: 0351-2266167, Email: zhgsh6725@163.com
收稿日期: 2008-12-24

反应)之间差异的物质。人用 ELISA 检测试剂盒中的阴性对照,理论上,就应该是具有人源性和人质性的物质,比如,待检样品为人血清,则阴性对照应该为不含有待检因子,并且能够客观地比较和鉴别处理因素的正常人血清。

在目前国外的 ELISA 试剂盒中,阴性对照一般以复钙人血浆(recalified human plasma)为原料进行纯化制备。复钙人血浆,即指在不含有待检因子的正常人血浆中,加入钙离子制剂,使血浆中的纤维蛋白凝固,然后除去纤维蛋白凝块,经过这样处理而得到的清液,其组成成分与正常人血清相似,可以满足作为阴性对照的技术要求,经过这种工艺处理而得到阴性对照,一般需加入抗生素和防腐剂,以利于阴性对照的稳定保存。但是,由于阴性对照中防腐剂的存在,对于酶联反应中酶的活性产生一定的抑制作用,因而,使得阴性对照的显色反应有所减弱,对于 cut-off 值的确定,产生一定的影响。

在目前国内的 ELISA 试剂盒中,有的试剂盒生产厂家采用动物血清及其制品(如牛血清白蛋白等)稀释配制阴性对照,或者将动物血清及其制品与正常人血清混合配制阴性对照,或者采用不含蛋白质或蛋白质含量较低的缓冲液代替不含有待检因子的正常人血清作为阴性对照,这些做法,虽然使得阴性对照的 A 值有所降低,甚至使得酶标反应所产生的阴性对照的 A 值比不含有待检因子的正常人血清反应所产生的 A 值低很多,为了避免假阳性的出现,这些 ELISA 试剂盒检测技术操作说明书,一般规定,如果阴性对照的 A 值 < 0.05 ,那么阴性对照的 A 值按照 0.05 计算。这些国内 ELISA 试剂盒生产厂家制备阴性对照的方法,无论在理论上,还是在实践中,存在着一定的问题,是值得反思的,因为,从本质上而言,阴性对照首先应该是与待检样品具有同源性和同质性,而又不含有待检因子的物质。

3 酶标反应板^[4]

在目前 ELISA 试剂盒中,试剂盒生产厂家一般采用以聚苯乙烯原料制备的板条作为酶标反应板,由于聚苯乙烯原料的来源、纯度、聚合度以及制备工艺的不同,不同厂家生产的聚苯乙烯酶标反应板的质量差异很大。此外,在制备 ELISA 试剂盒的生产过程中,酶标反应板的板孔底部不可避免地留有机械划痕、灰尘微粒和操作手印,这些因素的存在,对酶标反应的比色、cut-off 值的确定,无疑会产生一

定的干扰。

另外,由于聚苯乙烯本身并不是热的良导体,在酶标反应的孵育保温的过程中,会造成酶标反应板的各个板孔之间受热不均,产生干扰效应。

4 边缘效应

在目前 ELISA 试剂盒中,试剂盒生产厂家一般采用 96 孔酶标反应板作为酶标反应的载体。在酶标反应的孵育升温过程中,由于 96 孔酶标反应板的周边板孔与中心板孔底部表面的热力学特征的不同,聚苯乙烯本身又不是热的良导体,结果造成 96 孔酶标反应板的周边板孔与中心板孔之间存在有热力学梯度的干扰,导致在酶标反应的显色过程中,酶标反应板的周边板孔显色比中心板孔深,形成边缘效应。使用水浴或在将酶标反应试剂加入至酶标反应板板孔之前,将酶标反应板和酶标反应试剂均孵育至孵育温度(如 37 °C),这样可以在一定程度上消除“边缘效应”,并且可提高 ELISA 测定的重复性。

5 延时孵育

在目前 ELISA 试剂盒中,试剂盒生产厂家一般都明确规定了酶标反应的孵育时间,笔者发现加完待检样本和/或酶标反应试剂后,将酶标反应板从室温移至水浴箱或温箱中时,酶标反应板孔内温度从室温升至 37 °C,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,超过了 ELISA 试剂盒生产厂家明确规定的酶标反应的一般孵育时间。

一般很少有人注意这个问题,大多数 ELISA 试剂盒操作者将酶标反应板一放入水浴箱或温箱就开始计时,按照试剂盒生产厂家明确规定的酶标反应的一般孵育时间来终止酶标反应,这样极易造成实际孵育时间不够,弱阳性样本检测不出来的问题。因此,为保证弱阳性样本不被漏检,酶标反应板能够获得足够的孵育时间,ELISA 试剂盒操作者可将小温度计放置于水浴箱或温箱内酶标反应板板孔反应溶液中,通过测量观察板孔内反应溶液的温度的方法,自行确定本实验室在不同室温下酶标反应板需要多长时间,才能使酶标反应板孔内反应溶液的温度达到 37 °C,从而确定适当延长酶标反应板板条在温箱中的放置时间。

6 调零问题^[3]

在目前 ELISA 试剂盒中,不同的试剂盒生产厂

家采用不同的调零方式。有的厂家采用以空气读空白的调零方式,例如,生物梅里埃中国有限公司的中文版《人类免疫缺陷病毒抗原抗体诊断试剂盒(酶联免疫法)使用说明书》上提示:以空气读空白(不放板架和板条),在 450 nm(单波长)、或 450 nm 和 620 ~ 700 nm(底物是 TMB)参考波长进行读数。有的厂家采用以蒸馏水读空白的调零方式,有的厂家采用以显色反应试剂空白对照读空白的调零方式。根据我们长期的检测,发现以上 3 种读空白的调零方式,是存在显著性差异的。其中以空气读空白的调零方式,最为稳定,这可能是由于酶标仪所处的工作环境相对稳定所致,即酶标仪所处的工作环境中空气的温度、湿度、风速、洁净度等指标相对恒定。而其他两种读空白的调零方式,则由于每次调零时,所采用的蒸馏水或者显色反应试剂有所差异,而产生较大的变异。

7 酶标仪比色

酶标比色仪(酶标仪),通常指专用于测读 ELISA 结果吸光度的光度计。针对固相载体形式的不同,各有特制的适用于板、珠和小试管的设计。许多国外的 ELISA 试剂公司配套供应相应的酶标仪。

酶标仪的主要性能指标有:测读速度、读数的准确性、重复性、精确度和可测范围、线性范围等等。优良的酶标仪的读数一般可精确到 0.001,准确性为 $\pm 1\%$,重复性达 0.5%。例如,若某酶标反应板孔测得的 A 值为 1.083,则该孔相对于空气的真实 A 值应为 1.083 ± 0.01 (1.073 ~ 1.093),重复测定数次,其 A 值均应在 1.083 ± 0.05 (1.078 ~ 1.088) 之间。

酶标仪的可测范围视各酶标仪的性能而不同。普通的酶标仪在 0.000 ~ 2.000,新型号的酶标仪上限拓宽达 2.900,甚至更高。超出可测上限的 A 值常以“*”或“over”或其他符号表示。应注意可测范围与线性范围的不同,线性范围通常小于可测范围。例如,某一酶标仪的可测范围为 0.000 ~ 2.900,而其线性范围仅 0.000 ~ 2.000,这在定量 ELISA 中制作标准曲线时应予注意。

酶标仪不应安置在阳光或强光照射下,操作时室温宜在 15 ~ 30 °C,使用前先预热仪器 15 ~ 30 min,这样测读结果更稳定。

测读 A 值时,要选用对显色反应产物敏感的吸光峰所在波长的滤光片,如显色反应底物为 TMB,则选用 450 nm 波长的滤光片。有的酶标仪,可用双

波长方式测读,即每孔先后测读两次,第一次在最适波长(W1),第二次在不敏感波长(W2),两次测定间不移动 ELISA 板的位置。例如显色反应底物为 TMB,则选用 450 nm 为 W1,630 nm 为 W2,最终测得的 A 值为两者之差(W1 - W2)。双波长方式测读,可减少由酶标反应板板孔底部不可避免地留有的机械划痕、灰尘微粒和操作手印等所造成的光干扰。

另外,由于 ELISA 测定中单个空白孔的非特异吸收上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,建议最好是使用双波长比色。

要注意,在使用酶标仪测读 ELISA 反应结果之前,酶标反应板必须用吸水纸吸干后,才能置于酶标仪中进行比色,否则吸光度易出现负值或损坏酶标仪。

8 cut-off 值^[5,6]

cut-off 值是 ELISA 试剂盒判定测定结果唯一依据。在目前所使用的 ELISA 测定结果判定方法中,通常采用酶标仪自动扣除显色反应试剂空白对照 A 值或者人工减去显色反应试剂空白对照 A 值的方法,即在使用酶标仪测读 ELISA 反应结果之前,首先以显色反应试剂空白对照 A 值调零,然后依次测定其余各孔的 A 值,或者首先以空气读空白的方式调零,依次测定阴性对照、阳性对照和待检样品各孔的 A 值,然后在计算阴性对照均值、阳性对照均值和待检样品 cut-off 值时,人工减去显色反应试剂空白对照 A 值。

通过扣除显色反应试剂空白对照 A 值后得到的阴性对照均值来计算待检样品 cut-off 值的方法,存在着一定的问题,值得思考。

首先,由于聚苯乙烯原料的来源、纯度、聚合度以及制备工艺的不同,不同厂家生产的聚苯乙烯酶标反应板的质量差异很大;在制备 ELISA 试剂盒的生产过程中,酶标反应板的板孔底部不可避免地留有机机械划痕、灰尘微粒和操作手印,各个板孔底部的光干扰情况各有不同;各个板孔在 96 孔酶标反应板上的位置各有不同,所受到的边缘效应各不一样,因此,每个酶标反应板的板孔的非特异吸收,有一定程度的不确定性,也就是说每次测定或同次测定同一酶标反应板的板孔,因位置的不同均有可能得到不同吸光度测定值。因而,以显色反应试剂空

白对照 A 值调零或者在计算阴性对照均值、阳性对照均值和待检样品 cut-off 值时,人工减去显色反应试剂空白对照 A 值的方法,在理论上,存在有一定的缺陷。

其次,根据我们长期的跟踪,发现这种通过扣除显色反应试剂空白对照 A 值后得到的阴性对照均值来计算待检样品 cut-off 值的方法,经常会导致弱阳性样本的漏检。以检测 HBsAg 为例,假定显色反应试剂空白对照 A 值为 0.042,假定以空气读空白的方式调零,按照直接测定得到的阴性对照均值 A 值来计算待检样品 cut-off 值的方法为方法甲,按照通过扣除显色反应试剂空白对照 A 值后得到的阴性对照均值来计算待检样品 cut-off 值的方法为方法乙,当以空气读空白的方式调零直接测定得到的阴性对照均值为 ≤ 0.050 时,那么按照方法甲来计算,得到待检样品的 cut-off 值为 0.105,按照方法乙来计算,得到待检样品的 cut-off 值为 0.147;当以空气读空白的方式调零直接测定得到的阴性对照均值为 $0.050 \sim 0.070$ 时,那么按照方法甲来计算,得到待检样品的 cut-off 值为 $0.105 \sim 0.147$,按照方法乙来计算,得到待检样品的 cut-off 值依然为 0.147;当以空气读空白的方式调零直接测定得到的阴性对照均值为 0.070 时,那么按照方法甲来计算,得到待检样品的 cut-off 值为 0.147,按照方法乙来计算,得到待检样品的 cut-off 值依然为 0.147;当以空气读空白的方式调零直接测定得到的阴性对照均值为 $0.070 \sim 0.092$ 时,那么按照方法甲来计算,得到待检样品的 cut-off 值为 $0.147 \sim 0.193$,按照方法乙来计算,得到待检样品的 cut-off 值依然为 0.147;当以空气读空白的方式调零直接测定得到的阴性对照均值为 > 0.092 时,那么按照方法甲来计算,得到待检样品的 cut-off 值为 > 0.193 ,按照方法乙来计算,得到待检样品的 cut-off 值为 > 0.147 ;当以空气读空白的方式调零直接测定得到的阴性对照均值为 0.010 时,那么按照方法甲来计算,得到待检样品的 cut-off 值为 0.210,按照方法乙来计算,得到待检样品的 cut-off 值依然为 0.164。通过上述数据计算,可以看到,当以空气读空白的方式调零直接测定得到的阴性对照均值为 < 0.092 时,方法甲判断弱阳性样本的能力强,方法乙判断弱阳性样本的能力弱,容易造成弱阳性样本的漏检。因此,建议以空气读空白的方式调零直接测定得到的阴性对照均值为 < 0.092 时,采用方法甲,即以空气读空白的方式调零,按照直接测定得到的阴性对照均值

A 值来计算待检样品 cut-off 值,较为适宜,见表 1。

表 1 待检样品计算 cut-off 值分析表⁽¹⁾

阴性对照均值	≤ 0.050	$0.050 \sim 0.070$	0.070	$0.070 \sim 0.092$	0.010
方法甲	0.105	$0.105 \sim 0.147$	0.147	$0.147 \sim 0.193$	0.210
方法乙	0.147	0.147	0.147	0.147	0.164

注:(1)以检测 HBsAg 为例,假定显色反应试剂空白对照 A 值为 0.042

在 ELISA 技术发展的早期,由于分子生物学技术的限制,包被试剂为天然抗原或抗体,其分离提取纯度有限,干扰杂质较多;酶标反应试剂也为天然抗原或抗体,存在有同样的干扰因素,同时,阴性对照采用的是与待检样品具有同源性和同质性而又不含有待检因子的人血清,干扰因素较多,而且,用于测读 ELISA 结果的酶标比色仪,为手工操作,其测读速度、读数的准确性、重复性、精确度和可测范围、线性范围等主要性能指标较为粗糙,只能精确到 0.01,因而,酶标反应的阴性对照均值比较高,根据我们长期的检测,发现阴性对照均值一般在 $0.10 \sim 0.25$ 之间,在这样的 ELISA 技术条件下,采用方法乙作为计算待检样品计算 cut-off 值的方式是适宜的。

随着分子生物学技术和 ELISA 检测技术及 ELISA 检测仪器设备的快速发展,目前包被试剂为重组抗原和合成多肽抗原,其分离提取纯度高,特异性好,干扰杂质大为减少;酶标反应试剂发展为高纯度的单克隆抗体,干扰因素大为降低,同时,阴性对照改为采用经过标准化处理的复钙人血浆,干扰因素较少,而且,用于测读 ELISA 结果的酶标比色仪,已经实现自动化,其测读速度、读数的准确性、重复性、精确度和可测范围、线性范围等主要性能指标得到了极大的提高,优良的酶标仪的读数一般可精确到 0.001,准确性为 $\pm 1\%$,重复性达 0.5%,阴性对照均值一般在 $0.035 \sim 0.070$ 之间,在这样的 ELISA 技术条件下,采用方法甲作为计算待检样品计算 cut-off 值的方式才是适宜的,这样可以尽可能地避免弱阳性样本的漏检。

9 阳性与阴性灰带

灰带概念是把定量分析的正常值范围引入定性分析后建立的概念,即将 cut-off 值上下的一段区域定为阳性可疑,需重复实验或换试剂重测以确定其阴阳性,如仍落在灰带区域范围内,则报告阳性。

阳性与阴性灰带率,既是 ELISA 试剂盒中评价酶联反应试剂本身的质量稳定状况的评价指标,也

是判断 ELISA 试验结果有效性时是不可或缺的评价指标,也是判断待检样本中是否有需要复检的可疑样本范围(Sample retest range),及各批/次试验时可疑样本的占有率的依据。

在目前国外的 ELISA 试剂盒中,一般都有阳性与阴性灰带率指标的详细要求,例如,在美国雅培公司的乙型肝炎 ELISA 试剂盒中,阳性与阴性灰带率指标要求如下:HBsAg 定为 0.0%,意思是:不应当有阳性或阴性“灰带”样本;其余各项目都是 10.0%,即待检样本判为“可疑”的范围为 $S/C.O. = 1.00 \pm 10\%$,处于该灰带的样本需要复检。而在目前国内的 ELISA 试剂盒中,试剂盒生产厂家一般都对阳性与阴性灰带率指标避而不谈,存在着一定的问题,是值得关注的。

10 国药准字制度和批批检制度

目前,尽管国家已经加强了 ELISA 检测试剂生产厂家和流通市场的管理工作,对于 ELISA 检测试剂的生产实行国药准字制度和批批检制度,国内 ELISA 检测试剂的质量水平有了极大的提高,但是,与国外品牌 ELISA 检测试剂相比,仍然有一定的差距。国家尚未对 ELISA 检测试剂的成分含量和 ELISA 检测的技术操作步骤颁布国家标准,这样就造成了不同厂家生产的同一种类的 ELISA 检测试剂,尽管这些 ELISA 检测试剂都已经通过了国家批批检,取得了国药准字,但是,这些 ELISA 检测试剂的成分含量和 ELISA 检测的技术操作步骤各有不同,检测待检因子的敏感性、特异性和重复性以及 ELISA 检测试剂的稳定性各有差异,这是目前国内 ELISA 检测技术面临的最现实、最严峻的问题。因此,国家相关部门应该深入调研,参考国外品牌 ELISA 检测试剂的各种标准规范,尽快颁布具有前瞻性的 ELISA 检测试剂的成分含量和 ELISA 检测的技术操作步骤的国家标准,以利于 ELISA 检测试剂生产厂家和 ELISA 检测实验室有法可依、有规可循,紧跟国际潮流,尽快赶上国外 ELISA 检测技术的发展水平,及早实现与国际接轨。

总之,在目前的 ELISA 检测技术及 ELISA 检测仪器设备条件下,酶标仪具备双波长比色测读 ELISA 结果吸光度条件的 ELISA 检测实验室应该尽可能地采用使用双波长比色,这样可减少各种因素

所造成的光干扰和非特异吸收,提高 ELISA 检测的敏感性和特异性;酶标仪只具备单波长比色测读 ELISA 结果吸光度条件的 ELISA 检测实验室,则尽可能地采用方法甲作为计算待检样品计算 cut-off 值的方式,这样可以尽可能地避免弱阳性样本的漏检,提高 ELISA 检测的敏感性和特异性。

综上所述,在分子生物学技术和 ELISA 检测技术及 ELISA 检测仪器设备的快速发展、日新月异的年代背景下,我们只有打破传统经典的束缚,在实践中,以科学谨慎的态度,不断地去思考、研究和探索,才能不断地迎接挑战,解决遇到的新问题。

参考文献

- [1] Wei XS, Xu YY, Xue MX, et al. The evaluation and selection strategy for HIV antibody diagnostic reagents [J]. *Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine*, 2006, 8(1): 41 - 42. (in Chinese)
魏祥松, 徐育云, 薛敏曦, 等. HIV 抗体诊断试剂的评价及选用策略[J]. *临床输血与检验*, 2006, 8(1): 41 - 42.
- [2] Yang SW, Li R, Huang KJ, et al. The false positive of HBsAg detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the solution [J]. *Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine*, 2006, 29(5): 273 - 274. (in Chinese)
杨寿旺, 李睿, 黄建可, 等. 酶联免疫吸附法检测 HBsAg 的假阳性和解决方法[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2006, 29(5): 273 - 274.
- [3] Li YH, Liu SF, Huang YX, et al. The preparation and application of the serum for internal quality control of ELISA detection of anti-HIV [J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2002, 30(1): 44 - 46. (in Chinese)
李裕惠, 刘素芳, 黄玉仙, 等. ELISA 检测抗-HIV 室内质控血清的制备和应用[J]. *微生物学免疫学进展*, 2002, 30(1): 44 - 46.
- [4] Yang CX, Li ZS, Zhao XP. The quality evaluation of the HBsAg ELISA kits [J]. *Chinese Journal of Blood Transfusion*, 2004, 17(2): 92 - 93. (in Chinese)
杨晨曦, 李宗生, 赵秀萍. ELISA HBsAg 检测试剂的质量评价[J]. *中国输血杂志*, 2004, 17(2): 92 - 93.
- [5] Wu MY, Liu GZ. *Medical Immunology* [M]. Fourth Edition, Hefei: *China University of Science and Technology Press*, 2003. (in Chinese)
吴敏毓, 刘恭植. *医学免疫学* [M]. 第4版, 合肥: 中国科学技术大学出版社, 2003.
- [6] Ji Y. The evaluation of immunodiagnostic reagents [M]. Beijing: *People's Medical Publishing House*, 2002. (in Chinese)
季阳. *免疫诊断试剂的评价* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.