

圆斑酶联免疫吸附试验简介

侯林浦¹ 王枢群²

为了克服ELISA技术中的缺点,1982年先后有不同的研究者报道了一种新的免疫诊断技术。Herbrink等称为抗原斑点试验(Antigen Spot Test),Howker等称为免疫结合圆斑分析(Dot-immunobinding assay),Huet等称为斑点免疫测定(Spot-immuno detection),而Pappas等则称为圆斑ELISA(Dot-ELISA)。本文作者认为称为圆斑ELISA较好,可简写成D-ELISA。

方法:圆斑ELISA是用硝基纤维素纸(Nitrocellulose paper)代替ELISA中的聚苯乙烯板作固相载体,由于硝基纤维素纸结合蛋白质要比聚苯乙烯吸附的牢固,因而得以克服ELISA方法中存在的不足。根据D-ELISA方法的特点,必然会在地方病、流行病学调查研究中得到广泛地应用。下面将这一技术根据试验步骤作一介绍。

1. 纸的准备:取硝基纤维素纸或新鲜活化的重氮苯氧基甲基纸,可根据需要裁成不同形状和大小,如用圆片可用打孔器打成不同直径尺寸,一般可用5mm直径。在蒸馏水中轻微搅动洗涤5分钟后室温干燥,或不经洗涤直接应用也可,关键是注意所有操作均用镊子取纸,绝对避免用手直接接触硝基纤维素纸膜。

2. 点样:用微量注射器将一小滴抗原或抗体滴于纸上,抗原浓度依不同抗原而异,可根据不同情况选择适当的缓冲液作稀释液,对于复杂的抗原采用0.1~1mg/ml的量是适宜的,对于不太复杂的抗原,其浓度可相应减少。点好样后将纸片干燥,可贮存数星期活性不丢失。点样时注意,使其圆斑尽量小,因此溶液体积不宜大,一般可用1~2 μ l即可,如果抗原溶液非常稀,可以连续在同一位置上滴加数次,但每次滴加一定要在前次滴加的斑点干后。

3. 封闭:将干燥好的纸片浸于封闭液中轻轻振摇大约15分钟,也可将纸片放入带孔穴的塑料板的孔穴内,每个孔穴加封闭液。封闭液的配制可用0.1M Tris-HCl PH7.4的缓冲液,内含0.25%(W/V)明胶和0.5% Nonidetp40,也可用含牛血清白蛋白或兔血

清、羊血清的缓冲液作封闭液,封闭15分钟。

4. 第一次孵育:吸出封闭液后加入待测样品(根据需要可用封闭液作稀释液,将样品作成不同的一个或一系列稀释度),室温孵育30~120分钟。

5. 洗涤:吸去各孔中的待测样品,用含 Nonidetp40或 Tween 20的缓冲液洗纸片三次,每次洗涤都轻轻振摇,当第三次洗涤纸片时,在吸出液体之前纸片应放在缓冲液中孵育10分钟。

6. 加入结合物孵育:吸出洗涤液以后,加入适当稀释度的结合物,结合物的稀释仍用封闭液,孵育30~120分钟。

7. 洗涤:吸去结合物,重复第五步所述的洗涤过程。

8. 显色:用4-氯-1-萘酚及H₂O₂效果最佳,也可用联大茴香胺或3,3'-二氨基联苯胺。4-氯-1-萘酚的配制方法如下,按3mg 4-氯-1-萘酚溶于1ml甲醇中的比例配成贮存液,可贮于4°C暗处,这种贮存液当有黄色呈现时即弃之,一般这种贮存液可存1~2个星期。临用前用10ml 50mM Tris-HCl PH7.4的缓冲液(内含200mM NaCl)加2ml贮存液,再加H₂O₂到最终浓度为0.01%(V/V)。

9. 结果判断:显色后经水洗,根据斑点颜色的强弱来判断。

应用:本方法主要用于免疫诊断和检测单克隆抗体,具有简便、快速的特点,一般说来,凡适用于ELISA方法测定的试验均可应用本文介绍的方法。不论是用间接法检测抗体、双抗体夹心法检测抗原,还是用直接法检测抗原或抗体均可适用。Pappas等用于检测利什曼病患者血清抗体,作快速诊断效果良好,患者效价在1:512~1:524280之间,98%的病人(41/42)呈阳性,仅有2%(1/50)为假阳性。我们用直接法检测HBsAg也得到良好的效果。

1 中日友好医院

2 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所