

文章编号:1673-1689(2006)02-0097-05

直接酶联免疫吸附法检测猪血清 IgG 的影响因素

罗磊, 丁霄霖

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 直接酶联免疫吸附法检测猪血清中 G 型免疫球蛋白(IgG), 最小检测量为 10 ng, 最适检测范围纯 IgG 为 10~60 ng, 猪血清 IgG 为 10~40 ng。酶标抗体最适稀释度为 1/3500。酶标板内与酶标板间平行测定变异系数均小于 5%。

关键词: 直接酶联免疫吸附法; G 型免疫球蛋白(IgG); 猪血清

中图分类号: Q 503

文献标识码: A

Investigation and Optimization of Factors on Measuring IgG in Porcine Serum by Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

LUO Lei, DING Xiao-lin

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: This paper studied the method of measuring Immunoglobulin G in porcine serum by Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. ELISA's smallest measurement limit was 10 ng. The best measurement ranges were 10~60 ng for pure IgG and 10~40 ng for porcine serum IgG. The best titer of Peroxidase Conjugate Antibody was 1/3500. Variation coefficient of parallel determination in same and different boards were all less than 5%.

Key words: Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Immunoglobulin G (IgG); Porcine Serum

酶联免疫吸附法(ELISA)是以塑料板(聚苯乙烯或聚乙烯)为载体固定抗原或抗体,通过免疫酶的结合和底物显色过程进行定性定量检测的方法,它是固相酶免疫检测的一种。根据免疫吸附剂的制备和操作步骤不同 ELISA 可分为直接法、间接法、双抗体夹心法、竞争法、抑制性测定法和桥联法^[1-3]。

直接法用于检测抗原或抗体的总浓度,简便实用,灵敏可靠。其示意图如下:

免疫球蛋白是对抗原刺激应答中, B 淋巴细胞

图 1 直接酶联免疫吸附检测抗原示意图

Fig. 1 The Sketch Map of Measuring Antigen by Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

产生的能与相应抗原特异性的结合,产生各种免疫效应(生理效应)的一类球蛋白。1964 年国际卫生

收稿日期:2004-11-18; 修回日期:2005-04-25.

作者简介:罗磊(1976-),男,河南南阳人,工学博士.

组织将这一类球蛋白统一命名为免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig),与过去命名的抗体(Antibody, Ab)通用。猪血中免疫球蛋白含量很高,其中以G型免疫球蛋白(简称IgG)为主,占血清总蛋白质量分数的17%,免疫球蛋白总量质量分数的80%^[2,4-5]。

服用免疫球蛋白,能够以异体免疫的方式提高人体免疫力。大量研究报道了口服Ig可以有效地预防和治疗婴幼儿及成人由大肠杆菌和轮状病毒引发的腹泻,无任何副作用。因此人们越来越重视免疫球蛋白在保健食品中的应用。由于酶联免疫吸附是以特异性吸附为基础,样品蛋白如果发生变性就不会被吸附,得以检测的都是具有活性的蛋白质,因此ELISA可以测定蛋白质的活性,这对于研究具有生物活性的蛋白质十分重要。ELISA能够检测ng级样品,灵敏可靠,所以酶联免疫吸附可以检测IgG含量极少的样品并监测其活性的变化情况^[6-8]。

1 材料与方 法

1.1 仪器与材料

酶标板(硬板:聚苯乙烯):华美生物工程公司生产;微量移液器(20~200 μ L, 50~1 000 μ L):大龙医疗设备有限公司生产;DL302调温调湿培养箱(37 $^{\circ}$ C):上海昊淙五金厂生产;冰箱(4 $^{\circ}$ C):上菱公司生产;MK3酶标仪:上海雷勃仪器厂生产;TGL16台式高速冷冻离心机:中科院武汉科学仪器厂生产。

兔抗猪酶标抗体、猪IgG标样购自Sigma公司,过氧化氢尿素购自Lancaster公司,3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)购自Sino公司,小牛血清购自杭州四季清公司,其它药品均为分析纯。

猪血采自无锡肉联厂,4 $^{\circ}$ C 8 000 r/min离心10 min,除去血球和纤维蛋白原,得到血清。

1.2 试剂

1) 包被稀释液(0.05 mol/L NaCO₃ - NaHCO₃ 缓冲液, pH 为 9.6): NaCO₃ 1.5 g, NaHCO₃ 2.9 g, (牛血清白蛋白 5 g 或白明胶 1 g), 加双蒸水至 1 000 mL, 调 pH 值至 9.6

2) 封闭液(5%小牛血清/PBS): 临用时用样本稀释液配制。

3) 洗涤液(PBS-Tween20, pH 7.4): NaCl 8.0 g, KH₂PO₄ 0.2 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9 g, KCl 0.2 g, Tween 20 0.5 mL, 加双蒸水至 1 000 mL, 调 pH 值至 7.4。

4) 样本稀释液(PBS, pH 7.4): NaCl 8.0 g, KH₂PO₄ 0.2 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9 g, KCl 0.2 g, 加双蒸水至 1 000 mL, 调 pH 值至 7.4。

5) 底物液(TMB-过氧化氢尿素溶液):

底物液 A(3,3',5,5'-四甲基联苯胺, TMB): TMB 60 mg, 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide 简称 DMSO) 10 mL, 溶解。

底物液 B(0.1 mol/L 柠檬酸-0.2 mol/L 磷酸氢二钠缓冲液 pH 5.0~5.4): Na₂HPO₄ 14.60 g, 柠檬酸 9.33 g, 0.75%过氧化氢尿素 6.4 mL, 加三蒸水至 1 000 mL, 调 pH 5.0~5.4。

将底物液 A 200 μ L 和底物液 B 按 10 mL 混合即成 TMB-过氧化氢尿素溶液, 临用时配置。

6) 中止液(2 mol/L H₂SO₄): 水 600 mL, 浓 H₂SO₄ 120 mL(缓慢滴加并不断搅拌), 加水至 1 000 mL。

1.3 试验方法

直接酶联免疫吸附法测定 IgG 流程如下:

IgG 纯品或待测样品, 用包被液适当稀释, 100 μ L/孔, 每样三孔, 4 $^{\circ}$ C 吸附过夜

↓
PBS-Tween20 洗涤 3 次, 每次 3 min
↓
5%小牛血清封闭游离位点, 200 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 温育 40 min(或 4 $^{\circ}$ C 吸附过夜)

↓
PBS-Tween 20 洗涤 3 次, 每次 3 min
↓
加入酶标抗体, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h(以不加酶标抗体的为阴性对照)

↓
PBS-Tween 20 洗涤 5 次, 每次 3 min
↓
加入 TMB-过氧化氢尿素溶液, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 10~15 min

↓
加入中止液, 50 mL/孔, 20 min 内测 A₄₅₀

试验用标记抗体的酶为辣根过氧化物酶, 底物中的过氧化物为过氧化氢尿素(Urea Hydrogen Peroxide, CH₆N₂O₃), 供氢体(DH₂)为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB), 检测波长为 450 nm^[4-6]。

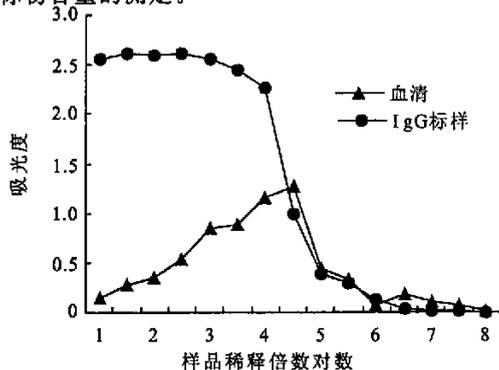
2 结果与分析

2.1 血清浓度对 ELISA 测定的影响

血清是一种复杂的蛋白质体系, 其中 IgG 含量

约占血清蛋白总量质量分数的 18%,因此直接酶联免疫吸附测定血清中 IgG 时其它蛋白质将对试验结果产生影响。从图 1 可以看到,检测样品为纯 IgG 时,当稀释倍数小于 1 000,ELISA 测定的吸光度基本保持不变。随着样品稀释倍数的增加,吸光度开始略微下降,当稀释倍数大于 10 000 时,吸光度迅速下降,直到稀释度达到 100 000 倍以后,下降速度开始放慢,IgG 稀释倍数大于 1 000 000 后吸光度就很小了。这说明在稀释倍数达到 10 000 以前,纯 IgG 样品包被量始终处于过饱和状态,酶标板可吸附量达到最大,所以吸光度基本保持不变。随着稀释度的增加,IgG 添加量开始小于酶标板的可吸附量,吸光度随之下降,当添加量减少到一定程度,低于 ELISA 检测限,吸光度变得很小。

当测定样品为血清时,随着稀释度的增加,吸光度却出现一个吸收峰,其表现异于 IgG 纯品。这说明在血清这样复杂的蛋白质体系中,其它蛋白质将和 IgG 争夺酶标板上的结合位点,并且在浓度较大时,某些蛋白质与酶标板的结合能力强于 IgG,因此出现了稀释度较小时,吸光度随稀释倍数增加而变大的情况。到达最大吸光值以后,随着稀释度的增加,酶标板的结合位点足以结合血清中所有的蛋白质,因此 IgG 得以全部结合,吸光度也开始随稀释度增加而减小。从图 1 可以看出,血清的最大吸光值比相同浓度下纯 IgG 的吸光度小,这是由于血清中其它蛋白质要占据一部分结合位点,因此 ELISA 测定血清中 IgG 时,其最佳包被量要小于纯 IgG。因此,在用直接 ELISA 法检测血清这样含有多种蛋白质的复杂体系时,必须选择适当的稀释倍数,浓度高时可能产生假阴性结果,影响对样品中目标物含量的测定。



注: IgG 标样起始质量浓度为 10 mg/mL, 酶标抗体稀释度为 1/4000

图 1 样品浓度对 ELISA 测定的影响

Fig. 1 The effect of sample concentration on ELISA measure

2.2 酶标抗体稀释度的选择

试验所用的酶标抗体是 Sigma 公司的产品,根据其说明书,将此酶标抗体用在 ELISA 测定时其稀释度可达到 1/45 000,但在实际试验中发现其活性并不能达到这一指标。如图 2 所示,当酶标抗体稀释倍数超过 4 000,吸光度迅速下降,可见此时具有活性的酶标抗体数量开始小于酶标板所吸附 IgG 的量,酶标抗体添加量的不足会造成系统敏感度下降,易产生假阴性结果;而稀释倍数小于 4 000 时,吸光度增加较小,可见 1/4 000 酶标抗体可以满足试验的需要,过高的浓度会造成酶标抗体不必要的浪费,同时检测时显色速度过快,系统稳定性变差,检测符合率降低。因此用 ELISA 法测定血清中 IgG 时,必须选择合适的稀释度。本试验中,酶标抗体合适的稀释度约为 1/4 000。

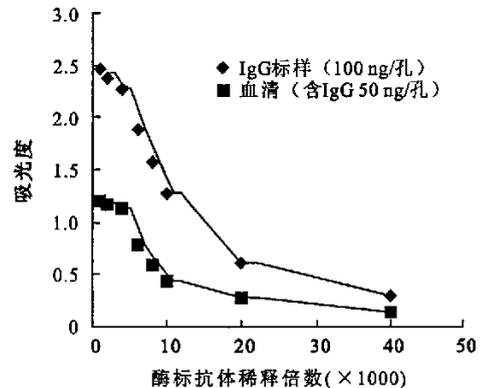


图 2 酶标抗体稀释度对 ELISA 测定的影响

Fig. 2 The effect of peroxidase conjugate antibody's titer on ELISA measurement

2.3 酶联免疫吸附检测参数棋盘法优化

在初步确定酶标抗体稀释度和待测血清包被量范围的基础上,对 ELISA 检测参数进行棋盘法优化(见图 3、4)。棋盘法是以不同浓度的包被物质,可采用梯度稀释的方法,然后用一定梯度的抗体与之温育,经比色测定选择合适的抗原包被液和酶标抗体稀释浓度,通常要求在此条件下阳性孔光吸收值 > 1.0 , 阴性孔吸收值 $< 0.2^{[4]}$ 。从试验结果可以看出酶标抗体稀释度采用 1/3 500 较为合适。在包被物质方面,纯 IgG 和血清样品(以其中 IgG 含量计算)的包被量为 20~40 ng 时较好。

2.4 直接酶联免疫吸附最适 IgG 测定范围

为了准确的测定样品中 IgG 的含量,有必要确定 ELISA 最适检测范围。从棋盘法试验结果可以看出(见图 5、6),当酶标抗体稀释度为 1/3 500 时,纯 IgG 在包被量在 20~60 ng、血清 IgG 在 10~40

ng 时其吸光度的线性关系比较好,在此基础上进一步研究 ELISA 测定 IgG 时样品包被量的最适范围。由试验结果可以看出(见图 5、6)纯 IgG 包被量在 10~60 ng,血清 IgG 包被量在 10~40 ng 时吸光度与样品包被量相关性非常好,在此范围内标准曲线相关系数可达 0.99 以上。因此在直接 ELISA 测定血清 IgG 时,应先进行预试验,找到合适的样品稀释倍数。本试验中 IgG 包被量应保持在 20~40 ng,此时测定结果最为准确。

统误差对试验结果的影响,在八块酶标板上各作十二次平行试验(纯 IgG 50 ng,酶标抗体稀释度 1/3 500),从试验结果可以看出(见表 1、2),同一块酶标板上平行试验的变异系数均小于 5%,酶标板间(平均值)的变异系数也小于 5%,因此系统误差对试验结果造成的影响很小,直接 ELISA 法测定的结果是可靠的。

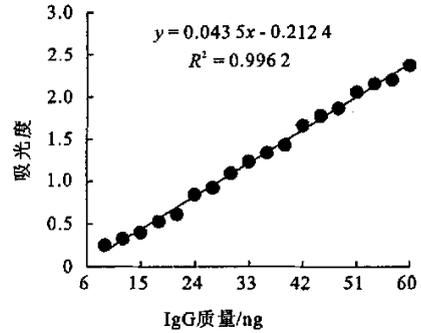


图 5 直接 ELISA 纯 IgG 最适检测范围

Fig. 5 The best measurement range of pure IgG by direct ELISA

图 3 直接 ELISA 检测纯 IgG 参数棋盘法优化

Fig. 3 The chessboard optimization of measuring pure IgG parameter by direct ELISA

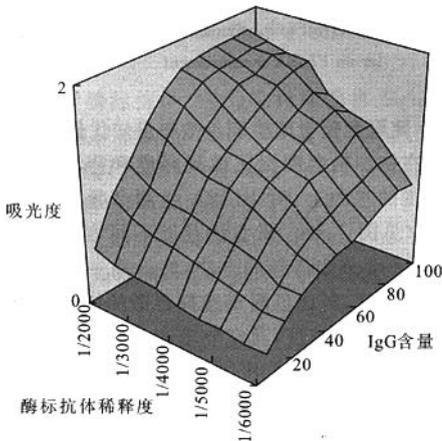


图 4 直接 ELISA 检测血清 IgG 参数棋盘法优化

Fig. 4 The chessboard optimization of measuring serum IgG parameter by direct ELISA

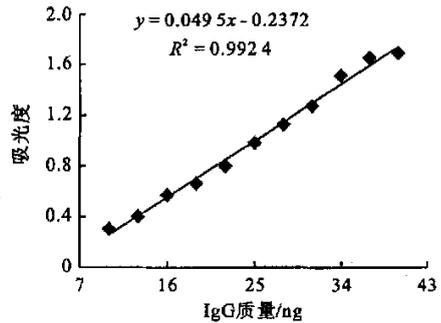


图 6 直接 ELISA 血清 IgG 最适检测范围

Fig. 6 The best measurement range of serum IgG by direct ELISA

3 结论

直接酶联免疫吸附法非常灵敏,检测限可达 10 ng,因此可以检测 IgG 含量极少的样品。纯 IgG 包被量在 10~60 ng,血清 IgG 在 10~40 ng 时吸光度与样品包被量之间有非常好的线性关系,在此范围内标准曲线相关系数可达 0.99 以上。考虑到吸光度的要求,最适 IgG 包被量为 20~40 ng。

直接酶联免疫吸附测定 IgG 时酶标板内与酶标板间(平均值)平行试验变异系数均小于 5%,因此试验系统误差对试验结果造成的影响很小,直接 ELISA 法测定结果可靠。

2.5 酶联免疫吸附稳定性

为了研究直接酶联免疫吸附法检测 IgG 时系

表 1 直接 ELISA 测定 IgG 稳定性(板内差异)
Tab. 1 The Stability of IgG measurement by Direct ELISA (Same Board)

板号	孔号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1.748	1.562	1.583	1.71	1.741	1.751	1.759	1.63
2	1.798	1.554	1.622	1.567	1.772	1.704	1.805	1.722
3	1.916	1.717	1.745	1.649	1.777	1.785	1.806	1.719
4	1.964	1.583	1.673	1.74	1.651	1.745	1.806	1.677
5	1.91	1.599	1.622	1.571	1.782	1.716	1.852	1.81
6	1.849	1.638	1.606	1.62	1.613	1.625	1.926	1.679
7	1.848	1.74	1.676	1.607	1.638	1.65	1.891	1.688
8	1.84	1.684	1.585	1.692	1.585	1.724	1.618	1.646
9	1.872	1.657	1.552	1.615	1.677	1.713	1.782	1.749
10	1.879	1.548	1.634	1.608	1.739	1.577	1.887	1.693
11	1.817	1.597	1.601	1.567	1.708	1.72	1.681	1.726
12	1.774	1.659	1.702	1.721	1.638	1.681	1.753	1.649
平均值	1.851 25	1.628 167	1.633 417	1.638 917	1.693 417	1.699 25	1.797 167	1.699
标准偏差	0.062 038	0.064 358	0.055 688	0.062 369	0.068 752	0.057 9	0.088 384	0.050 082
变异系数(CV)	3.35%	3.95%	3.41%	3.81%	4.06%	3.41%	4.92%	2.95%

表 2 直接 ELISA 测定 IgG 稳定性(板间差异)
Tab. 2 The Stability of IgG measurement by Direct ELISA (Different Board)

	平均值	标准偏差	变异系数(CV)
板间差异	1.705 073	0.080 606	4.73%

由于血清中其它蛋白质将同 IgG 争夺酶标板的吸附位点,因此样品稀释度较低时会产生假阴性结果,所以必须选择合适的血清稀释度(1/50 000~1/100 000)。对于其它由多种蛋白质组成的复杂样品,也必须进行预试验以确定合适的稀释度。

酶联免疫吸附检测所用酶标抗体活性应在预试验中进行检测,以确定最适稀释度。稀释度过高会造成系统敏感度下降,易产生假阴性结果;而稀释度过低会造成酶标抗体不必要的浪费,同时检测时显色速度过快,系统稳定性变差,检测符合率低^[5]。

酶联免疫吸附检测时首先以空白孔系统调零,

若空白孔出现明显颜色反应,或经空白调零后,系统检测出大量负值,整个系统测定无效。每一样品平行的测定值应基本一致,若差别较大(OD 值超过其均值的 0.5~1.5 倍),该样本应重作^[4]。

底物对 OD 值影响很大,由于 TMD 在水中溶解度很小,所以 TMD—过氧化氢尿素底物 A、B 液应在临用时混合并尽快使用,放置过久会造成 TMD 析出,降低反应时的 OD 值。

酶联免疫吸附样品制备好以后,其吸光值随放置时间延长而逐渐变小,因此制备好的样品应在 20 min 内测定。

缓冲液的 pH 值在 7.4 以下,非特异性吸附会增加。在包被蛋白过程中,为减少非特异性吸附,一般在洗涤液或样品稀释液中加入 0.5% 牛血清白蛋白或 0.1% 白明胶,并在洗涤液中加入 0.05% Tween-20^[4]。

参考文献:

[1] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社, 2000. 3.
 [2] 王重庆. 分子免疫学基础[M]. 北京:北京大学出版社, 1997. 10.
 [3] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社, 1994. 9.
 [4] 王世中. 免疫化学技术[M]. 北京:科学出版社, 1980. 3.
 [5] 北京医学院微生物教研组编. 试验免疫学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1980. 3.
 [6] 钟盛林. 口服免疫球蛋白治疗婴幼儿腹泻病[J]. 实用儿科临床杂志, 1998(1): 46-47.
 [7] 杨玉芬. 新生仔猪免疫人工乳配方的研制及其生产效果的研究[J]. 内蒙古农业大学学报, 2003, 24(1): 34-38.
 [8] 蒋守群. 免疫球蛋白源对新生仔猪存活率、生长性能、血液因子和免疫因子的影响[J]. 饲料工业, 2000, 21(5): 11-15.

(责任编辑:杨萌)