

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.12.026

# 基于酶促反应动力学的无标准品 ELISA 抗体滴度定量方法\*

方成<sup>1</sup>, 陈卓<sup>2</sup>, 刘立<sup>1</sup>, 梅志强<sup>1</sup>

(武汉轻工大学:1. 医学院移植工程实验室;2. 生物与制药工程学院, 湖北武汉 430023)

**[摘要]** **目的** 建立无标准品的酶联免疫吸附测定(ELISA)抗体滴度定量方法。**方法** 对血清抗体 ELISA 检测设置非特异、阴性对照、特异和总抗体检测组。显色早期的时间-吸光度数据经线性拟合的斜率即吸光度变化速度, 分别记为  $v_0$ 、 $v_C$ 、 $v_S$ 、 $v_T$ 。基于底物过量时  $v$  值与待测抗体浓度(C)呈直线关系, 设计  $v$  值函数计算待测样本与阴性对照样本的抗体浓度倍比。以鱼胶原蛋白免疫昆明小鼠的血清特异 IgG 抗体检测进行实例分析。**结果** 函数  $C/C_0 = (v - v_0)/(v_C - v_0)$  可计算待测样本与阴性对照样本的特异抗体浓度倍比(滴度)。**结论** 该动力学 ELISA 抗体滴度检测方法适用于无标准品半定量分析。

**[关键词]** 酶促反应动力学; 酶联免疫吸附测定; 抗体滴度

**[中图分类号]** R446.61

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)12-1662-02

## Antibody titre quantitation method by ELISA without standard substance based on kinetics of enzyme-catalyzed reactions\*

Fang Cheng<sup>1</sup>, Chen Zhuo<sup>2</sup>, Liu Li<sup>1</sup>, Mei Zhiqiang<sup>1</sup>

(1. Transplant Engineering Laboratory, Medical School; 2. School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish an antibody titre quantitation method by ELISA without standard substance. **Methods** The test groups of non-specific, negative control, specific and total antibodies were set for detecting sera antibodies by ELISA. After linear fitting of the time-absorbance data of early developing, the fitted slopes were used as the velocity of absorbance changing, which were denoted by  $v_0$ ,  $v_C$ ,  $v_S$ ,  $v_T$ . Based on that the  $v$ -value and the concentration (C) of determinand were linear relationship while the substrate was excessive, the function with parameter of  $v$ -values for reflecting the multiple proportions of antibodies concentrations between specific and negative control groups could be deduced. The assessment of specific IgG antibodies in sera of KM mice immunized with fish collagen was used as an instance. **Results** The function  $C/C_0 = (v - v_0)/(v_C - v_0)$  could calculate the multiple proportions (titre) of antibodies concentrations between specific and negative control groups. **Conclusion** The above method of antibody titre quantitation is suitable for semi-quantitative analysis without standard substance.

**[Key words]** kinetics of enzyme-catalyzed reactions; enzyme-linked immunosorbent assay; antibody titre

酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是将抗体、抗原的特异性反应与酶对底物的催化效应相结合的一种高特异性和高敏感性的实验技术<sup>[1]</sup>。在临床诊断、医学研究、食品安全、植物资源、环境监测及生态学等领域广泛应用<sup>[2]</sup>。ELISA 定量检测试剂盒一般配备已知浓度标准品, 通过建立标准曲线进行定量分析<sup>[3-4]</sup>。可是无标准品半定量检测是探索性研究常使用的方法, 许多研究工作处于无标准品, 或只比较样品差异度而无需标准品的状态。如果仅以吸光度(absorbance, A)值的差异代表浓度(concentration, C)差异是有缺陷的, 因为二者并非线性关系<sup>[5-6]</sup>。A 值来自于某时点(即终点法), 使用其定量 C 值的标准曲线呈 S 型, 符合四参数函数, 须使用标准品才能建立<sup>[5-6]</sup>。动力学定量方法则基于酶促反应最大速度与酶浓度成正比的原理<sup>[7-9]</sup>, 通过测量反应初期底物浓度饱和时 A 值的变化速度来检测样品的浓度<sup>[10-11]</sup>。其标准曲线呈直线, 在 ELISA 定量检测中具有更高的稳定性与准确性, 目前其应用较少<sup>[6]</sup>。本研究以血清抗体检测为例, 建立无标准品的动力学 ELISA 抗体滴度定量方法。

### 1 材料与方 法

**1.1 材料** 雄性封闭群昆明小鼠 6 只, 8~9 周龄, 体质量 35~40 g, 由湖北省实验动物中心提供(许可证号 SCXK 鄂

2008-0005)。辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体购自 Santa Cruze 公司, 底物四甲基联苯胺(TMB)购自碧云天公司, iMARK 酶标仪购自 Bio-Rad 公司。

### 1.2 方 法

**1.2.1 检测方法**及分组设计 在 96 孔酶标板上设置非特异抗体、阴性对照、特异抗体和总抗体 4 组检测孔。特异抗体检测孔以酸溶性鱼胶原蛋白溶液(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )4  $^{\circ}\text{C}$  包埋 12 h, 洗板以 3% 牛血清清蛋白溶液封闭后, 加入经胶原蛋白免疫的小鼠( $n=3$ )血清样本(1:25); 总抗体孔免除抗原包埋及封闭步骤, 目的是将总抗体包埋并作为强阳性对照。阴性对照孔加入的血清样本来自生理盐水注射小鼠( $n=3$ ), 目的是显示阴性样本的反应性抗体水平; 非特异抗体孔则免除抗原包埋步骤, 使用生理盐水注射的小鼠血清, 目的是侦测非特异染色水平。每组每样本设 3 复孔, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h, 洗板后加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体, 洗板后加入底物 TMB 显色。用 iMARK 酶标仪读取 655 nm A 值。

**1.2.2 显色动力学曲线及其拟合** 显色底物加入完毕开始计时, 立即置于酶标仪进行检测, 获得每组检测孔的时间-A 值数据。以最小二乘法原理对初期显色动力学数据进行线性拟合<sup>[12]</sup>。线性拟合的斜率即为 A 值变化速度( $v = \Delta A/s$ )。

\* 基金项目: 湖北省教育厅科研计划资助项目(Q20121808)。 作者简介: 方成(1972-), 副教授, 博士研究生, 从事免疫生物学与免疫药理学研究。

**1.2.3 动力学法 ELISA 定量曲线的处理** 动力学法 ELISA 定量的理论基础是底物过量时酶促反应速度与酶浓度成正比<sup>[7]</sup>。而反应体系中与待测物特异性结合的标记酶浓度与待测物的浓度成正比。因此底物过量时 A 值变化速度( $\nu$ )与待测抗体浓度(C)呈直线关系(图 1)。由于非特异染色的存在,即待测抗体浓度为 0 时其  $\nu$  值不为零,该直线并不通过原点。为排除非特异染色的影响,设非特异组 A 值变化速度为  $\nu_0$ ,令  $x = \nu - \nu_0$ ,则可得通过原点的直线  $C = kx$ (图 1)。设阴性对照组 A 值变化速度为  $\nu_C$ ,抗体浓度为  $C_C$ ,则  $k = C_C / (\nu_C - \nu_0)$ 。故  $C = [C_C / (\nu_C - \nu_0)] \times (\nu - \nu_0)$ ,公式变换得  $C / C_C = (\nu - \nu_0) / (\nu_C - \nu_0)$ ,即用  $\nu$  值可计算待测样本抗体浓度与阴性对照样本抗体浓度的倍比关系,表示了能产生阳性结果的最大稀释倍数(滴度)。数据处理使用 Prism(4.00)软件。

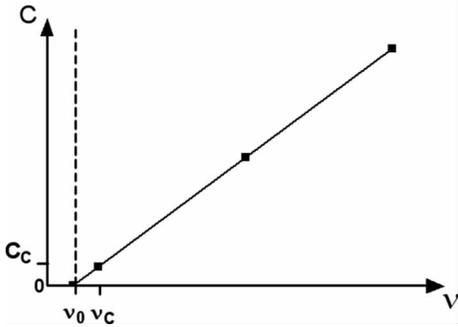


图 1 非特异组( $\nu_0, 0$ )与阴性对照组( $\nu_C, C_C$ )在动力学坐标内的分布

**2 结果**

**2.1 显色动力学曲线** 检测实验样本获得非特异抗体、阴性对照、特异抗体、总抗体 4 组检测孔的时间-A 值数据系列(图 2),可以发现 5 min 内时间-A 值数据线性趋势较好,而 5 min 后呈现非线性变化,尤其 10 min 后变化趋势差异较大。如果使用终点法以 A 值代表待测抗体浓度具有极大的随意性,在无标准品时也不可能进一步做定量分析。

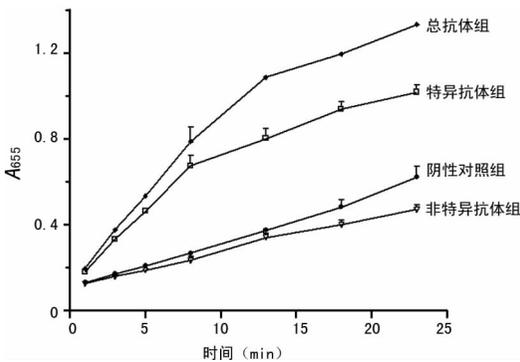


图 2 各组时间-A 值曲线

**2.2 动力学曲线拟合** 根据酶促反应动力学,底物浓度相对催化酶过量时,酶促反应以最大速度进行,反应速度与催化酶量呈正比。对图 2 动力学曲线取底物过量的显色早期,线性趋势较好的 5 min 内数据进行线性拟合(图 3)。非特异抗体、阴性对照、特异抗体、总抗体 4 组时间-A 值拟合直线的相关系数  $r^2$  均大于 0.99;直线斜率即  $\nu$  值的拟合结果分别为  $1.55 \times 10^{-2}$ 、 $1.95 \times 10^{-2}$ 、 $7.05 \times 10^{-2}$ 、 $8.45 \times 10^{-2}$ 。

**2.3 A 值变化速率比反映抗体滴度** 根据滴度计算公式,使用拟合  $\nu$  值计算各组样本的抗体滴度。阴性对照组为 1.00,特异抗体组为 13.75,总抗体组为 17.25。

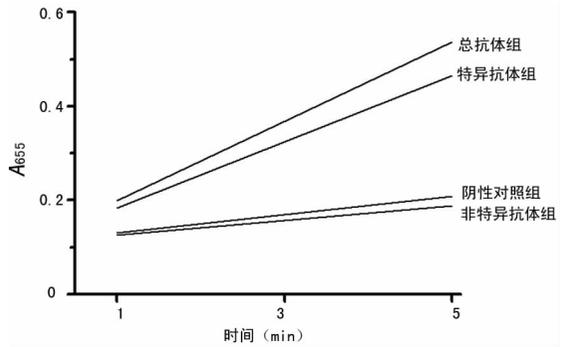


图 3 各组 5 min 内时间-A 值数据线性拟合

**3 讨论**

上述动力学 ELISA 抗体滴度检测方法解决了 2 个定量障碍。首先排除了以 A 值差异代替浓度差异的缺陷,可以准确反映浓度倍比差异。其次适用于无标准品检测,可获得样品能产生阳性结果的最大稀释度。对广泛存在的无标准品半定量分析是可取的方法,具有较好的稳定性与准确性。

阴性对照组与非特异抗体组的数据是基础性的,  $(\nu_C - \nu_0)$  值决定了 1 倍滴度。本研究中非特异抗体孔免除抗原包埋步骤,使用生理盐水注射小鼠的血清样本,目的是排除血清样本的非特异性黏附,具有校正特异性结合基线的作用。阴性对照孔抗原包埋步骤如常,以生理盐水注射小鼠血清加入,目的是显示阴性样本的反应性抗体水平。本研究建立的方法中非特异组的 A 值变化速度必须小于阴性对照组的  $(\nu_0 < \nu_C)$ 。阴性对照血清尚存在能与抗原结合的低水平特异性抗体或交叉抗体,这是普遍存在的正常情况<sup>[13]</sup>。如果出现  $\nu_0 \geq \nu_C$ ,需高度怀疑检测抗体的特异性强度,分析并排除导致样品非特异黏附增强的因素。

因为本研究对照动物与免疫动物并非配对设计,在拟合动力学曲线产生  $\nu_0$  与  $\nu_C$  两项数据时,宜将样本数据合并处理。而特异抗体、总抗体检测可以每血清样本独立定量,最终能获得组均数与标准差;如果样本数据合并处理则可减少计算量,只获得组均数。阴性对照组和特异抗体组也可以各自设立非特异组,则滴度计算公式为  $C_s / C_c = (\nu_s - \nu_{s0}) / (\nu_c - \nu_{c0})$ 。通常情况下  $\nu_{s0}$  与  $\nu_{c0}$  值应该近乎相等。

在动力学曲线拟合时,基于酶促反应动力学原理,数据系列的选取应符合严格的线性趋势。根据动力学线性拟合结果认定  $\nu$  值。可以认为数据产生时间越早越好<sup>[10]</sup>,至少 2 个点检测(即两步法),一般在 5 min 内完成<sup>[6]</sup>。期间需连续振板,保证底物及产物分布匀散<sup>[14-15]</sup>。样本总抗体检测并非必须设置,因为滴度(T 值)的产生并不依赖样本总抗体数据。但使用该指标计算  $(T_{\text{special}} - T_{\text{control}}) / T_{\text{total}}$ ,可以反映特异性抗体数量占总抗体数量比例,用来衡量体液免疫反应的相对强度,亦具有一定的分析价值。

**参考文献**

[1] 焦奎,张书圣. 酶联免疫分析技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社,2004:1-2.  
 [2] 伏旭,李培武,贺莉,等. 酶联免疫吸附检测法的应用研究进展[J]. 氨基酸和生物资源,2012,34(3):41-44.  
 [3] 周钦,贾继宗,刘剑,等. 水痘-带状疱疹病毒抗原的 ELISA 定量检测方法的建立[J]. 中国免疫学杂志,2013,29(5):542-545,552.

胃癌患者的情绪调节和人格特征变化情况。可以通过与患者及其家属积极交流和沟通,引导患者采用正确的宣泄方式缓解自己的心理不良反应。充分发挥社会支持的精神力量,让家属、朋友及同事等多与患者交谈,多给予患者鼓励,一方面培养患者外向乐观的精神,另一方面避免患者思维停留在病情之中,从而出现过度焦虑或者抑郁<sup>[11]</sup>。通过教会患者放松练习、引导性想象、腹式呼吸等稳定患者的情绪,并通过社会支持、鼓励人际交往等对患者进行解决应激性问题指导,从而帮助患者对自己的情绪进行合理管理。有研究发现,自信心与人格特征、情绪调节方式有密切相关性<sup>[12]</sup>。可以通过健康知识讲座、相同病情患者之间的经验分享,以及展望未来等培养患者的自信心<sup>[13-14]</sup>。

综上所述,胃癌患者的内外向、神经质、宣泄调节、抑郁调节是影响心理弹性水平的重要因素,与心理弹性水平密切相关,应采取多角度干预措施提高心理弹性水平。

### 参考文献

- [1] 张佳佳,李敏,彭李,等.大学生心理弹性与人格特征、情绪调节方式及中性情绪面孔知觉的关系[J].中国临床心理学杂志,2011,19(3):347-349.
- [2] Schwabish SD. Cognitive adaptation theory as a means to PTSD reduction among cancer pain patients[J]. J Psychosoc Oncol,2011,29(2):141-156.
- [3] Yu XN, Lau JT, Mak WW, et al. Factor structure and psychometric properties of the Cormor-Davidson Resilience Scale among Chinese adolescents[J]. Compr Psychiatry, 2011, 52(2):218-224.
- [4] 劳贤邦,黄庆娟.自控镇痛泵在胃癌根治术后应用的效果分析及护理对策[J].护士进修杂志,2013,28(19):1805-1806.
- [5] 朱凤娟,刘莉.疾病不确定感对进展期胃癌患者化疗期间心理护理需求指标影响[J].中国误诊学杂志,2011,11(8):1792.
- [6] 赵明,王玉.肺癌患者心理弹性与情绪调节方式和人格特征的相关性研究[J].中华现代护理杂志,2013,19(31):3847-3849.
- [7] Skaali T, Fossa SD, Dahl AA. A Prospective study of cognitive complaints in patients with testicular cancer[J]. Clin Genitourin Cancer,2011,9(1):6-13.
- [8] Muszer K, Bailer J. Effect of personality disorders on course and treatment outcome of behaviour therapy in an outpatient sample[J]. Psychother Psychosom Med Psychol, 2011, 61(7):303-310.
- [9] Meyer BM. Developing an alternative workflow for peripherally inserted central catheter placement [J]. J Infus Nurs, 2012,35(1):34-42.
- [10] Grassi L, Rossi E, Caruso R, et al. Educatiomi intervention in cancer outpatient clinics on routine screening for emotional distress: an observational study [J]. Psychooncology,2011,20(6):669-674.
- [11] 付立萍,张玉芬,张荣泽,等.肺癌患者姑息治疗中负性情绪对生活质量的影响[J].重庆医学,2013,42(15):1734-1736.
- [12] Lin J, Zeng RM, Li RN, et al. Aberrant DNA methylation of the P16, MGMT, and hMLH1 genes in combination with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T genetic polymorphism and folate intake in gastric cancer [J]. Genet Mol Res,2014,13(1):2060-2068.
- [13] de Vries AC, Kuipers EJ. Commentary: metformin use is associated with reduced gastric cancer risk[J]. Aliment Pharmacol Ther,2014,39(10):1239.
- [14] Kim YI, Cho SJ. Commentary: metformin use is associated with reduced gastric cancer risk-authors' reply[J]. Aliment Pharmacol Ther,2014,39(10):1239-1240.

(收稿日期:2014-10-05 修回日期:2015-01-28)

(上接第 1663 页)

- [4] Johnson KA. Fitting enzyme kinetic data with KinTek Global Kinetic Explorer [J]. Methods Enzymol, 2009(467):601-626.
- [5] 金树根,孙学华,雷燕,等.疗效评价中酶联免疫吸附试验数据处理的方法学研究[J].中西医结合肝病杂志,2013,23(2):103-106.
- [6] 尹利民.动力学法在酶联免疫吸附试验定量检测中的应用[J].检验医学与临床,2012,9(7):852-853.
- [7] 居乃琥.酶工程手册[M].北京:中国轻工业出版社,2011:190.
- [8] Seibert E, Tracy TS. Fundamentals of enzyme kinetics [J]. Methods Mol Biol,2014(1113):9-22.
- [9] Wolfenden R, Snider MJ. The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts [J]. Acc Chem Res, 2001,34(12):938-945.
- [10] Tang Q, Leyh TS. Precise, facile initial rate measurements [J]. J Phys Chem B,2010,114(49):16131-16136.
- [11] Scholey JM. Compare and contrast the reaction coordinate diagrams for chemical reactions and cytoskeletal force generators[J]. Mol Biol Cell,2013,24(4):433-439.
- [12] 方成.剂量效应曲线差值的非线性拟合模型研究[J].武汉工业学院学报,2013,32(3):18-21.
- [13] Budd R, Harley E, Quarshie A, et al. A re-appraisal of the normal cut-off assignment for anticardiolipin IgM tests [J]. J Thromb Haemost,2006,4(10):2210-2214.
- [14] 吴正铜,韦理关.酶联免疫吸附试验在实验室应用中的质量控制[J].检验医学与临床,2013,10(9):1147-1149.
- [15] Szabo A, Zhou HX. Role of diffusion in the kinetics of reversible enzyme-catalyzed reactions[J]. Bull Korean Chem Soc,2012,33(3):925-928.

(收稿日期:2014-12-08 修回日期:2015-02-26)