

第五次作业

1. ELISA的非特异性干扰有哪些, 其机制是什么?

2. 推导固定化抗体-抗原-荧光标记抗体体系(非竞争免疫分析)测定抗原浓度的关系式

3. 推导标记抗原竞争免疫分析方法中定量分析公式

问题分析: 1. ELISA的非特异性干扰(物)可以分为内源性物质和外源性物质。内源性物质主要是(未受污染的)样品中所含有的非特异性干扰物, 它产生于被采样生物体的生命过程, 主要包括类风湿因子、补体、嗜异性抗体、嗜靶抗原自身抗体、医源性诱导的抗鼠Ig(s)抗体、交叉反应物质和其它物质等。外源性物质主要是样品采集、贮存、处理过程中因操作不当, 而从外界环境中引入的能干扰ELISA结果的污染物, 或是样品分解产生的能干扰ELISA结果的产物, 主要包括血样溶血过程中产生的(具有过氧化物酶活性的)血红蛋白、样品采集或储存不当而引入的细菌、样品保存过久而形成的IgG多聚体或AFP二聚体、样品凝集不全而残留的纤维蛋白原、抗凝剂(如肝素, EDTA)、酶抑制剂(如叠氮化钠可抑制ELISA系统中辣根过氧化物酶活性)、快速分离血清的分离胶。^[1-2]

非特异性干扰通常有如下途径: (1) 自身作为抗原, 与ELISA使用的一抗或二抗结合, 如类风湿因子、交叉反应物质(类地高辛物质、类AFP物质等)、纤维蛋白原; (2) 能将ELISA使用的一抗和二抗连接起来, 从而造成干扰, 如补体、嗜异性抗体、医源性诱导的抗鼠Ig(s)抗体; (3) 能与样品中的待测抗原结合, 从而导致ELISA无法测定到这些被结合的待测抗原, 如嗜靶抗原的自身抗体; (4) 自身具有催化显色反应的活性, 或自身就是ELISA使用的催化显色反应的酶, 这类物质会影响显色反应的快慢, 如血红蛋白具有类似于辣根过氧化物酶的活性, 以及细菌可能有内源性辣根过氧化物酶; (5) 自身具有抑制(或激活)ELISA使用的催化显色反应的酶的作用, 这类物质同样会影响显色反应的快慢。^[1-2]

2. 设混合前固定化抗体的结合位点浓度为 $c_0(\text{Ab}_1) = c_0$, 待测抗原的决定簇浓度为 $c_0(\text{Ag}) = c_x$, 混合后与抗原决定簇结合的抗体结合位点浓度为 $[\text{Ab}_1\text{Ag}] = c_y$, 则它们结合的反应式 $\text{Ab}_1 + \text{Ag} \rightleftharpoons \text{Ab}_1\text{Ag}$, 得平衡常数为 $K = \frac{[\text{Ab}_1\text{Ag}]}{[\text{Ab}_1][\text{Ag}]} = \frac{c_y}{(c_0 - c_y)(c_x - c_y)}$, 从而得 $c_x = \frac{c_y}{K(c_0 - c_y)} + c_y$ 。假设接下来(洗脱后)加入的荧光标记抗体远远过量(即 $c_0(\text{Ab}_2^*) > c_0(\text{Ag})$), 那么结合的 Ab_1Ag 将全部转化为 $\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*$, 从而 $[\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*] \approx [\text{Ab}_1\text{Ag}] = c_y$ 。设荧光的量子产率为 λ , 则产生的荧光光子“浓度”(光子数) $[I] = \lambda[\text{Ab}_1\text{AgAb}_2^*] = \lambda c_y$, 代入浓度方程, 可得 $c_x = \frac{[I]}{K(\lambda c_0 - [I])} + \frac{[I]}{\lambda}$, 若直接作 $c_x - [I]$ 图, 得到的是增长的“S”型曲线。

3. 设混合前固定化抗体的结合位点浓度为 $c_0(\text{Ab}) = c_0$, 待测抗原和标记抗原的决定簇浓度分别为 $c_0(\text{Ag}) = c_{x1}$, $c_0(\text{Ag}^*) = c_{x2}$, 混合后与两种抗原决定簇结合的抗体结合位点浓度分别为 $[\text{AbAg}] = c_{y1}$, $[\text{AbAg}^*] = c_{y2}$ 。假设这两种抗原除标记基团外, 其余部分(包括抗原决定簇)结构相同, 抗原决定簇的数目也相同, 且标记基团不影响抗原-抗体结合, 则它们与抗体结合的平衡常数也相同。若抗原大大过量, 则固定化抗体的结合位点基本能达到饱和, 从而有 $c_0 = c_{y1} + c_{y2}$ 。此时根据反应式 $\text{Ab} + \text{Ag} \rightleftharpoons \text{AbAg}$, $\text{Ab} + \text{Ag}^* \rightleftharpoons \text{AbAg}^*$, 得第一个反应的平衡常数为 $K = \frac{[\text{AbAg}]}{[\text{Ab}][\text{Ag}]} = \frac{c_{y1}}{(c_0 - c_{y1} - c_{y2})(c_{x1} - c_{y1})}$, 第二个反应的平衡常数为 $K = \frac{[\text{AbAg}^*]}{[\text{Ab}][\text{Ag}^*]} = \frac{c_{y2}}{(c_0 - c_{y1} - c_{y2})(c_{x2} - c_{y2})}$ 。两式相除, 可得 $\frac{c_{y1}(c_{x2} - c_{y2})}{c_{y2}(c_{x1} - c_{y1})} = 1$, 即 $\frac{c_{x2}}{c_{x1}} = \frac{c_{y2}}{c_{y1}}$, 两式联立得 $c_{x1} = \frac{c_{x2}c_{y1}}{c_{y2}} = \frac{c_{x2}(c_0 - c_{y2})}{c_{y2}}$ 。再设荧光的量子产率为 λ , 则产生的荧光光子“浓度”(光子数) $[I] = \lambda[\text{AbAg}^*] = \lambda c_{y2}$, 代入浓度方程, 可得 $c_{x1} = \frac{c_{x2}(\lambda c_0 - [I])}{[I]} = c_{x2}(\frac{\lambda c_0}{[I]} - 1)$, 若直接作 $c_x - [I]$ 图, 得到的是减小的“S”型曲线。

Reference

[1] Zhang, J. J. *Clin. Trans. Lab. Med.* **2005**, 7(1), 37.

张建伟. 临床输血与检验 **2005**, 7(1), 37.

[2] 导致 ELISA 测定结果出错的元凶你知道吗? - 公司新闻. 丁香通. <http://fanketech.biomart.cn/new/s/2878992.htm> (Accessed April 11, 2020).