

竞争抑制ELISA标准曲线的拟合方法

众所周知，对于具有多个表位的抗原而言，双夹心 ELISA (Double Sandwich ELISA) 可应用于目标抗原或抗体的定量检测。而对于小分子抗原或半抗原，因缺乏可作夹心法的两个以上的结合位点，因此不能用双抗体夹心法进行测定。此时，可以采用竞争抑制法模式来检测其中靶分子的含量。竞争抑制 ELISA 又叫封闭 ELISA，其主要原理是将标本中的抗原和一定量的酶标抗原竞争与固相抗体结合。标本中抗原量含量愈多，结合在固相上的酶标抗原愈少，最后的显色也愈浅，也就是说，最终显色的结果与待检抗原或抗体的干扰程度成负相关。小分子激素、药物等 ELISA 测定多用此法。

对于很多习惯了双夹心法 ELISA 检测的实验人员而言，在面对竞争抑制 ELISA 数据时常常会遇到不知如何分析的问题，上次我们已就经典的双夹心 ELISA 标准曲线的绘制和拟合进行了详细讲解 ([双夹心法标准曲线的拟合方法](#))，因此，接下来我们将以 Cloud. Clone 公司的 CEA924Ge，氰钴胺素(CNCbl) 检测试剂盒的一次质检标准品吸光度值为例，详细地介绍一下用 EXCEL 软件进行竞争抑制 ELISA 标准曲线的拟合步骤。

如图 1 所示，实验人员从最高 10000 pg/mL 浓度的标准品 (第 F1 孔)，经倍比稀释至 123.5 pg/mL 浓度 (第 B1 孔)，阴性对照孔为单独的标准品稀释液 (第 A1 孔)，可以看出对于竞争抑制 ELISA 法来说，一般而言阴性对照孔的吸光度值最大。

| 20'colorin g time | 1 | 20'colorin g time | 1 | Log of Conc. | Conc. of STD(pg/m L) |
|----------------------|-------|----------------------|-------|-----------------|----------------------------|
| A | 3.747 | A | 3.747 | | |
| B | 2.103 | B | 2.103 | 2.091667 | 123.5 |
| C | 1.411 | C | 1.411 | 2.568671 | 370.4 |
| D | 0.878 | D | 0.878 | 3.0457531 | 1111.1 |
| E | 0.513 | E | 0.513 | 3.5228744 | 3333.3 |
| F | 0.159 | F | 0.159 | 4 | 10000 |
| G | | G | | | |
| H | | H | | | |

图 1. 标准品吸光度值参考

图 2. 标准品吸光度纠正值

与双夹心法 ELISA 不同的是，竞争抑制 ELISA 的标准品吸光度值并不需要减去阴性对照孔的本底吸光度值。以标准品的各孔吸光度值为 x 轴，标准品相

应浓度取 Log_{10} 后的值(如图 2 所示的绿色突出显示部分)为 y 轴作 XY 散点图, 得到一条 5 点曲线, 其中 X 轴为吸光度 (Optical Density), Y 轴为浓度的对数值 (Log. of Concentration), 如图 3 所示。

接着, 在该曲线中任选一点以右键打开, 选择”添加趋势线(R)”, 图表上便会弹出一个对话框。在”类型”选项中选择”多项式(P)”并将”阶数(P)”设定为 2 阶。最后, 在”选项”中勾选”显示公式(E)”和”显示 R 平方值(R)”(如图 4 及图 5 所示), 点确定, 便会出现标准曲线的对应公式及 R2 值(如图 6 所示)。

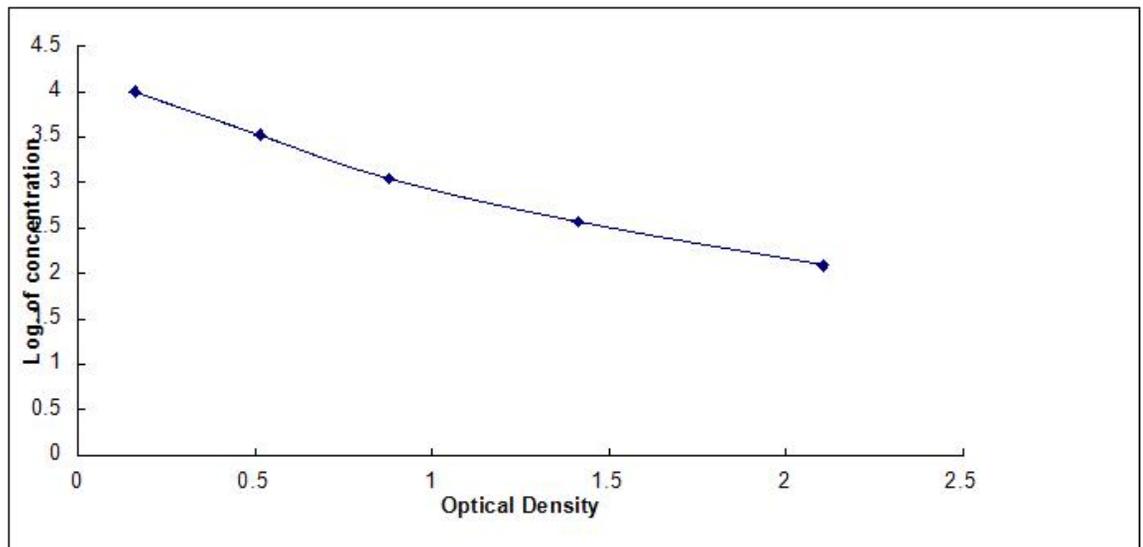


图 3 标准曲线示例图

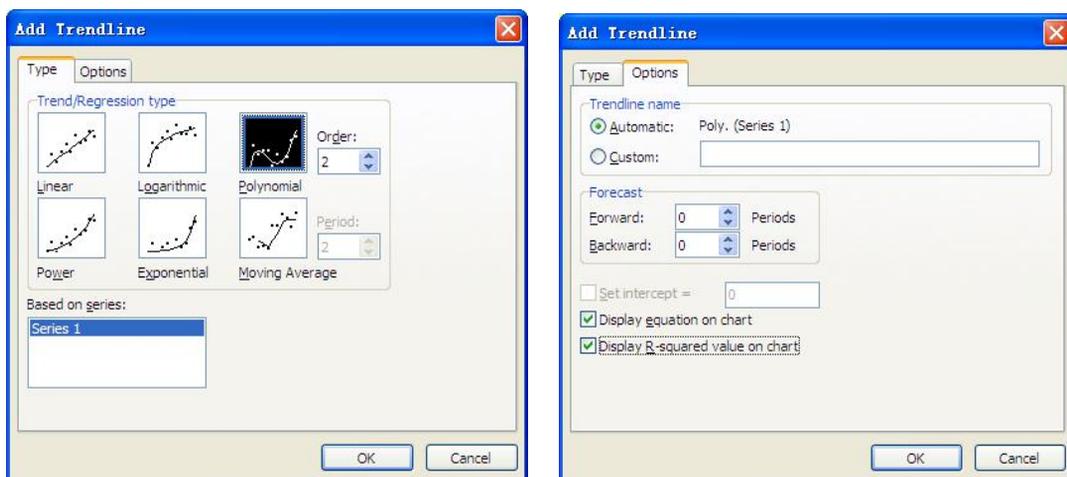


图 4. 添加拟合公式的过程示意图

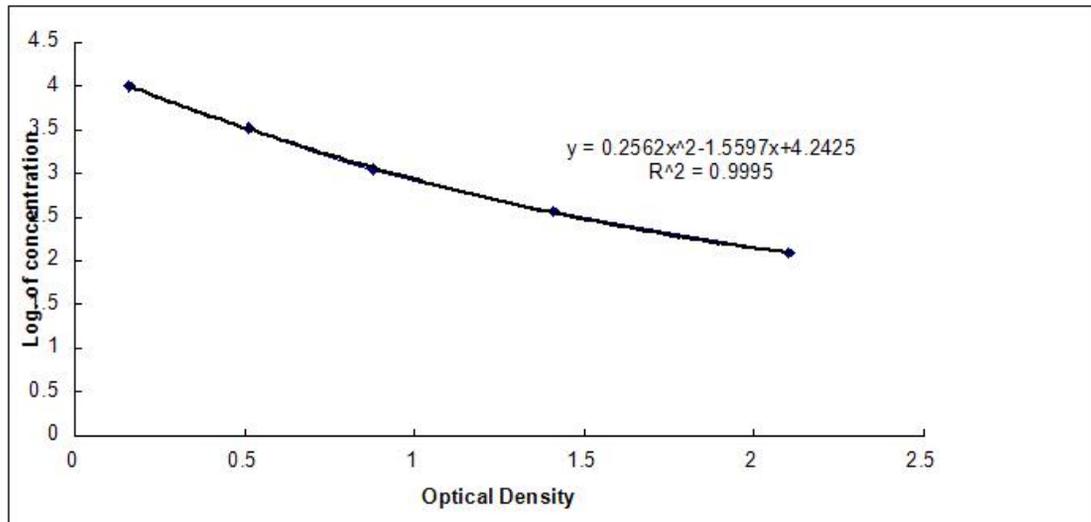


图 5 典型带拟合公式的标准曲线示意图

在了解了竞争抑制 ELISA 标准曲线的绘制方法之后，我们如何判断一条标准曲线是否良好呢？一般而言，合格的竞争抑制 ELISA 标准曲线应具备以下三点：

1. 标准品浓度越高，则得到的吸光度值越低，即样品中分析物浓度与吸光度呈负相关；
2. R^2 值应至少大于 0.95，并且越接近 1 越好；
3. 阴性对照孔的吸光度值应大于 0.8。

接下来，我们将绘制和分析竞争抑制 ELISA 标准曲线过程中常见的问题及相应的解决方案总结如下：



表 1. 竞争抑制 ELISA 标准曲线的常见问题及解决方案

| 常见问题 | 可能原因 | 解决方案 |
|--------------------|--------------|------------------------|
| 阴性对照孔 OD 值偏低 | 阴性对照孔被其它孔污染 | 使用加样器要更换新的吸头、使用新的容器和覆膜 |
| R ² 值偏低 | 标准品溶解不充分 | 进行正确的标准品溶解 |
| | 标准品稀释不正确 | 进行正确的标准品梯度稀释 |
| | 加样不精确 | 检查和校正移液器 |
| | 重复利用吸头、容器和覆膜 | 使用加样器要更换新的吸头、使用新的容器和覆膜 |
| 标准品吸光度 值偏低 | 标准品溶解不充分 | 进行正确的标准品溶解 |
| | 标准品稀释不正确 | 进行正确的标准品梯度稀释 |
| | 加样不精确 | 检查和校正移液器 |
| | 温育时间不正确 | 保证充足的温育时间 |
| | 温育温度不正确 | 试剂要平衡至室温并保证准确的温育温度 |
| | 酶标记物或底物失效 | 通过混合酶标记物和底物，颜色应迅速显现来检查 |
| | 没有加入终止液 | 按照说明书实验操作步骤加入终止液 |

最后，我们将传统的双夹心 ELISA 和竞争抑制 ELISA 在绘制和分析标准曲线过程中的一些不同点进行了总结，以方便实验人员来对比分析。

表 2. 双夹心和竞争抑制 ELISA 标准曲线的区别

| ELISA 类型 | 双夹心 | 竞争抑制 |
|-----------|----------|-----------|
| 标准曲线点数 | 7 | 5 |
| 标准曲线 Y 轴 | 标准品浓度 | 标准品浓度的对数 |
| 阴性对照孔吸光度值 | 各孔需要减去该值 | 各孔不需要减去该值 |
| 吸光度值与浓度关系 | 正相关 | 负相关 |

更多相关信息，请登陆 <http://www.cloud-clone.us/>。