

## 荧光底物在酶联免疫吸附试验中的应用\*

于善谦 张若平

(复旦大学病毒研究室、上海)

### 提要

碱性磷酸酶底物，对硝基酚磷酸二钠（PNPP），在酶联免疫吸附试验（ELISA）中已普遍使用。本实验用一种荧光底物，4-甲基聚缴花酮磷酸酯做间接 ELISA 反应（FS-ELISA），同前者进行了比较。当用 0.1ml 的黄瓜花叶病毒（CMV），浓度为 0.1ng/ml 包被时，在紫外光下仍可看到反应所产生的荧光。FS-ELISA 对 CMV 测定的敏感度比用 PNPP 底物时高 100 倍。最后对该方法用于定性和半定量检测抗原的问题进行了讨论。

酶联免疫吸附试验（ELISA）已被广泛用于血清学试验中，其灵敏度远超过以前许多血清反应方法，几乎可达到放射免疫方法同等的灵敏度。近年来又有一些提高 ELISA 灵敏度的方法，如生物素与抗生物素系统（简称 AB-ELISA）。然而所用的碱性磷酸酶或过氧化物酶等的底物都是以可见的颜色反应作为检验指标。带有荧光素的酶底物已被用于真菌孢子及菌丝中某些酶活性的微量测定<sup>[1,2]</sup>。本实验报道酶荧光底物在 ELISA 反应中的应用。

### 材料与方法

**病毒制剂：** 黄瓜花叶病毒 CMV-Ca 分离株为花椰菜分离的一个株系。在三生烟上繁殖，7—10 天后采收，按照 Habil 等方法<sup>[3]</sup>，在超离心沉淀之前先用聚乙二醇（MW6000）沉淀纯化，然后依照其步骤纯化。最后悬浮于 0.05mol/L pH7.8 的磷酸缓冲液中。

**抗血清制备：** 用上述抗原按常规方法免疫家兔三次，第三次免疫后 10 天采血。琼脂双扩散法效价为 1/64。

**ELISA：** 用间接法<sup>[4]</sup>，所用试剂为 PBS (8.0g NaCl, 3.5g NaHPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2g KCl, 加蒸馏水至 1000ml)。PBS-Tween80 (1000ml PBS 加 0.5ml Tween 80)。包被液 (1.59g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.93g NaHCO<sub>3</sub> 加水至 1000ml, pH9.6) 底物缓冲液为 0.2mol/L 的甘氨酸缓冲液 pH10.4，其中每 100ml 中含 0.2g MgCl<sub>2</sub> 和 0.02g ZnCl<sub>2</sub>。病毒稀释液为 PBS 加 2% PVP。封闭液为 1% 牛血清白蛋白的 PBS 溶液，60℃ 灭活 30 分钟。底物：(1) 对-硝

\* 本文承王鸣岐教授审阅修改，特此致谢。

本文 1986 年 10 月 21 日收到。

基酚磷酸二钠 (P-Nitrophenol-phosphate Disodium, 简称PNPP, Sigma公司), 用前以底物缓冲液配成  $1\text{ mg/ml}$ 。(2) 荧光底物4-甲基聚微花酮-磷酸酯(4-Methylumbelliferal-phosphate 简称4MUP, Sigma公司)。用前以底物缓冲液配成  $0.05\text{ mmol/L}$  溶液。第二抗体羊抗兔酶联免疫球蛋白(碱性磷酸酶, Sigma公司), 用前配成  $1:1000$  及  $1:2000$  的溶液。所用病毒以病毒稀释液稀释成每毫升含  $1000\text{ ng}$ ,  $100\text{ ng}$ ,  $10\text{ ng}$ ,  $1\text{ ng}$ ,  $0.1\text{ ng}$ 。实验操作步骤与 Dietzgen<sup>[4]</sup> 相同。用40孔聚苯乙烯板(上海塑料制品厂), 每孔加样量  $100\mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$  下作用60分钟。对照包括加病毒不加第一抗体; 不加病毒; 两者都不加; 以卵白代替病毒以及只加底物, 其他步骤与实验样品相同。PNPP底物的黄色反应在普通光下观察。荧光底物4MUP的反应结果在  $253.7\text{ nm}$  波长的紫外分析灯下观察, 以半定量法记载结果。

## 结果与讨论

PNPP底物及4-MUP底物反应的结果分别列入表1和表2中。由表1可见PNPP底物在病毒浓度为  $10\text{ ng/ml}$  时有可见的黄色反应, 低于该浓度看不到反应。表2表明4MUP底物在病毒浓度为  $0.1\text{ ng/ml}$  时就可以看到兰色荧光反应, 荧光强度随着病毒浓度的增

表1 用PNPP底物做间接酶联免疫吸附试验  
Table 1 Indirect ELISA with substrate PNPP

试 验 Assay		病 毒 浓 度 Virus concentration (ng/ml)				
		0.1	1	10	100	1000
酶联抗兔球蛋白 Anti-rabbit IgG	1:1000	-*	-	+	++	+++
对照 Control**		-	-	-	-	-
酶联抗兔球蛋白 Anti-rabbit IgG	1:2000	-	-	+	+	++
对照 Control**		-	-	-	-	-

\* “-”示无反应, “+”示有反应及反应强度。

\* “-” no reaction, “+” Reaction and the intensity of reaction.

\*\* 对照自左至右: 无兔抗体; 无病毒; 无兔抗体及病毒; 以卵蛋白代替病毒; 只加底物。

Control, from left to right; no rabbit antibody; no virus;

Both no rabbit antibody and virus; Replaced virus with ovalbumin;  
substrate only.

加而增加。第二抗体酶联抗兔球蛋白的稀释度为  $1:1000$  比  $1:2000$  时反应更为灵敏。图1示在紫外灯的反应板, 白色的反应孔表示有荧光反应。当第一抗体即兔抗病毒的抗血清稀释至  $1:1024$ , 第二抗体  $1:1000$  以及底物浓度分别为  $1\text{ mg/ml}$  的PNPP和  $0.05\text{ mM}$  的4-MUP的条件下, 各组对照均无反应。新配的荧光底物的自然荧光极微弱, 与对照组相同。因此可以相信, 凡比对照的荧光强度强的即为正反应。如果荧光底物配好后放置在常温下时间过长, 底物的自然荧光会增强, 所以最好每次用前新配, 或者在  $4^\circ\text{C}$

表2 用4-MUP底物做间接酶联免疫吸附试验  
Table 2 Indirect ELISA with substrate 4-MUP

试 验 Assay	酶联抗兔球蛋白 Anti-rabbit IgG	病 毒 浓 度 Virus concentration(ng/ml)				
		0.1	1	10	100	1000
酶联抗兔球蛋白 Anti-rabbit IgG	1:1000	+	++	++	+++	++++
对照 Control**		-	-	-	-	-
酶联抗兔球蛋白 Anti-rabbit IgG	1:2000	-	+	+	++	+++
对照 Control**		-	-	-	-	-

\*及\*\*同表1

The explanation was the same as table 1

下放置时间不要超过48小时，以免自然水解而增加本底的荧光。此法适用于定性和半定量的病理快速诊断，实验表明它对病毒CMV的敏感度比PNPP底物高出100倍。可与敏感度较高的AB-ELISA方法相当，但荧光底物ELISA（简称FS-ELISA）方法更为简便易行。荧光比色计也可以定量检测反应产物的荧光强度<sup>[2]</sup>，但对这种微量方法需要特制的微量荧光比色计才能配套使用。

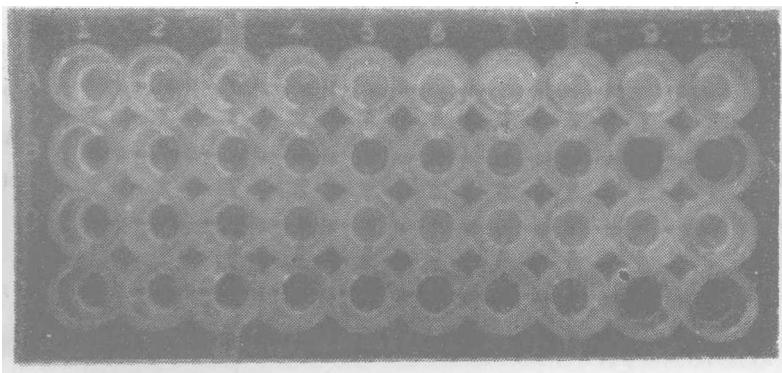


图1 FS-ELISA微量反应板(紫外灯下)

A、B、酶联抗兔IgG稀度1:1000; C、D、稀度1:2000。

A、C、试验孔1-10每二孔为一种病毒浓度，依次为，0.1, 1.0, 10, 100, 1000ng/ml。

B、D、对照孔：1.无兔抗体，2.无病毒，3.5.无兔抗体及病毒，6.7.用卵蛋白代替病毒，4.8.只有底物，6.10.空白。白色孔示有荧光反应。

Fig1. Micro-place of FS-ELISA(under the UV-light). Fluorescent reaction was showed in white wells, but not in black wells. The conditions of the reactions were as following, Anti-rabbit IgG was diluted to 1:1000 (line A and B) and 1:2000 (line C and D). The virus concentrations of 0.1, 1, 10, 100, 1000ng/ml were used for coating each two wells of the well 1-10 on the line A and C, respectively. Controls were placed in line B and D, and the well number 1: no rabbit antibody; 2: no virus; 3 and 5: both no rabbit antibody and virus; 6 and 7: virus was replaced by ovalbumin; 4 and 8: only substrate; 9 and 10: blank.

## 参考文献

- [1] Yu, S.Q., Trione, E.J., and Ching, T.M., 1984, *Mycologia* 76(4) : 608-6-3.
- [2] Yu, S.Q., Trione, E.D., 1983, *Phytopathology* 73 : 1423-1428.
- [3] Habili, N. and Franchi, R.I.B., 1974, *Virology* 57 : 392-401.
- [4] Dietzger, R.G. and Sander, E., 1982, *Archives of Virology* 74 : 197-204.

## THE APPLICATION OF FLUORESCENT SUBSTRATE IN ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

Yu Shan-qian Zhang Ruoping

(Virology Laboratory, Fudan University, Shanghai)

The substrate, p-nitrophenolphosphate disodium (PNPP), of alkaline phosphatase has been commonly used in enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The fluorescent substrate, 4-methylumbelliferal phosphate, used in the indirect ELISA procedure (FS-ELISA) was compared with the substrate PNPP used in same indirect ELISA procedure. The fluorescent reaction could be observed under the UV-light at 253.7nm emission wavelength when coating was done with 0.1 ml suspension of cucumber mosaic virus at the minimum concentration of 0.1 ng/ml. The lowest concentration of CMV detected by FS-ELISA in this test is hundred times lower than that by ELISA with the substrate PNPP. The FS-ELISA procedure is suitable for qualitative and semi-quantitative detection of antigens.

## 石浜明 (A. Ishihama) 来华讲学

### AKIRA ISHIHAMA PROFESSOR WAS INVITED TO GIVE LECTURES IN CHINA

应中国教育委员会和武汉大学的邀请，日本生化学会理事、日本国立遗传学研究所分子生物学系主任石浜明教授于今年5月4日至5月23日来华访问。在武汉大学就原核基因转录的分子机制、RNA多聚酶、RNA多聚酶的启动子选择性、转录的调节机制，以及动物病毒的基因组、转录与复制的分子机制等进行了系统讲授并介绍了最新研究成果。在课堂内外与病毒系师生开展了广泛的交流讨论。参观了该系生化研究室并进行了多次座谈。此外还访问了广州市医药卫生研究所。石浜明教授的来访受到一致好评。他曾多次去英国、丹麦等地讲学，他认为对比起来，中国学生最为勤奋，从这点看，中国的生命科学研究前景是非常光明的。

(武汉大学病毒及分子生物系 林栖凤供稿)