



SHENBOWHOUAXUEYICONG

# 生物化学译丛

第 1 辑

生物化学译丛

(第一辑)

上海第一医学院  
复旦大学、上海师范大学 编

上海科学技术文献出版社出版

(上海高安路六弄一号)

总发行所上海发行所发行  
上海新华印刷厂印刷

开本: 787×1092 1/16 印张: 6 字数: 152,000

1980年5月第1版 1980年5月第1次印刷

印数: 1—6000

书号: 13192·6 定价: 0.77元

《科技新书目》153—97

## 出版说明

生物化学是一门研究生物体内化学组成和化学变化的科学，近年来发展很快，无论在理论上或是技术上，都取得了很大的进展，已渗透到生物科学的各个领域。为了适应我国科学技术的发展，让有关同志了解国外生物化学发展情况，我们出版了本“生物化学译丛”。

“生物化学译丛”拟不定期出版，它以综述、专论、方法、简讯等形式，介绍国外有关生物化学的动态、进展、成就，以及新技术、新方法等，供生物科学、医学、农业科学和生产单位的科研人员、教师、学生、医务人员及其他有关人员参考。

为了把本“译丛”办好，希望广大读者对本刊不足之处和要求，提出宝贵意见。

# 目 录

✓ 酶标记免疫测定.....	( 1 )
✓ 动脉粥样硬化：低密度脂蛋白受体学说.....	(18)
18-羟皮质酮 .....	(29)
ATP 和 $MgCl_2$ 对 tRNA 自磷酸纤维素上亲和洗脱氨酰-tRNA 合成酶的影响.....	(37)
来自 <i>C. utilis</i> 的亮氨酸 tRNA <sup>L1</sup> 的核苷酸顺序 .....	(41)
✓ 表面活性物质对牛血清蛋白的极谱催化氢电流的影响.....	(49)
染色质的重组及其功能.....	(51)
人前列腺中锌与类固醇激素的关系.....	(52)
甲硫氨酸脑啡肽和亮氨酸脑啡肽在脑和外周组织中的分布.....	(55)
由磷脂酰肌醇专一性磷脂酶 C 所引起的质膜酶的专一性释放.....	(61)
↓ 用一种化学探测剂抑制效应的动力学分析识别人红细胞的 $Cl^-$ 运转位点.....	(64)
用聚乙烯醇固定叶绿体光系统.....	(68)
→ DNA 顺序测定的新方法 .....	(70)
✓ 质粒 DNA 的快速筛选 .....	(77)
✓ 噬菌体和质粒 DNA 的一种简便分离法——适于分子无性繁殖后的“筛选检验” .....	(81)
✓ 劳雷(Lowry)蛋白质测定法的几种改进 .....	(83)
✓ 制备人网织红细胞的亲和层析法.....	(85)
类病毒 RNA 碱基排列的测定 .....	(87)
大肠杆菌 B 株限制性内切酶( <i>R. EcoB</i> )识别的碱基顺序 .....	(88)
✓ RNA 一级结构测定的新方法 .....	(89)
限制酶与体内 DNA 重组 .....	(90)
和核酸共价结合的蛋白质.....	(91)
真核生物 rRNA 基因的多样性 .....	(92)
ATP 酶的简便分析法 .....	(92)

# 酶标记免疫测定

把抗原-抗体反应用作一种分析工具,由于它的高度灵敏性及特异性,使得生物医学在许多方面都有了变革性的发展。为了观察抗原、抗体之间所发生的反应,曾经建立过许多方法。“经典”的方法包括血凝试验、补体结合试验及免疫扩散等,较新建立的方法是将抗原或抗体加上标记物来进行测定。由于实验的目的及方法不同,可选用不同性质的标记物,其中应用最广的标记物是:荧光色素和放射性同位素。将荧光染料结合到抗体上的免疫荧光测定法,广泛应用于组织学及细胞学研究中的抗原定位,近年也开始用于定量测定。但此法需用昂贵的荧光显微镜及暗视野设备,并且尚难达到准确地抗体定量;将放射性同位素标记到抗原或抗体上的放射免疫测定法(radio-immunoassay 简写 RIA),由于将灵敏性与特异性巧妙地结合起来,能够精确地测定生物体液中浓度极低的生物学上重要的化合物。因而自从 Yelow 及 Berson 与 Elkins 创始以来,不到 20 年,已迅速发展,取得了大量新的科学知识。虽然 RIA 是一种用途很广、十分优秀的实验方法,但因它需要特殊的仪器设备,标记物因放射性同位素迅速衰变而不够稳定,并且对人体健康可能有损伤等缺陷,在使用上受到一定限制。

在应用荧光免疫测定法及 RIA 法测定微量的抗原(或抗体),用抗原(或抗体)与酶结合在组织化学上进行相应抗体(或抗原)的定位以及固相 RIA 等方法的基础上,于 1971 年分别由荷兰的 Van Weeman 与 Schurrs 及瑞典的 Engvall 与 Perlmann 提出了酶免疫测定法(enzyme-immunoassay, 简写 EIA),或称之酶标免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, 简写 ELISA)。即将酶代替放射性同位素作为标记物结合到抗原或抗体上,所形成的酶/抗体(或抗原)复合物可与待测的相应抗原或抗体特异地定量的结合,这样待测抗原(或抗体)的微量变化,直接反应到与之特异结合的酶标记的抗体(或抗原)量的变化。由于酶的高度催化活性,酶量的微小差异,它所催化底物的分解量就会有显著的不同。选择适当的底物,如果它在被降解后最终产物有颜色,那么就可以方便地通过目测或光电比色测定酶活性而间接进行抗原(或抗体)的定量。并且由于抗原-抗体反应是在固相载体上进行,更使得测定操作简便易行。

尽管 EIA 目前的精确度尚未达到 RIA 的高度,但它具有灵敏度高,重复性好;试剂较稳定,对健康无害;结果可用目测或用简便的分光光度计测定;操作可以自动化或用成套装配的规格化的试剂和材料等优点,并且它与 RIA 一样有广泛的潜在的应用范围,因此,不多几年就已得到广泛应用和迅速发展,甚至有人认为 EIA 有可能在不久的将来会超过 RIA。

## EIA 的类型与一般原理

酶标记免疫测定法是由放射免疫测定法衍变产生的。目前已应用的具体测定方法种类

甚多,但多半与 RIA 方法类似。根据待测抗原(或抗体)与酶标记的抗体(或抗原)反应后,是否需要将结合的及游离的酶标记物先行分离而后进行酶活性测定,可将 EIA 分为两大类:

## 一、非均相的(heterogeneous) EIA

这类方法必需先将结合或游离的酶标记物分离,而后测定酶活性来确定待测抗原(或抗体)的含量。目前应用的 EIA 大多属于这种类型,具体方法种类较多,根据测定的免疫反应物种类不同,又可分为:

### (一) 测定抗原

1. 竞争法(图 1) 将含有特异性抗体的免疫球蛋白结合于固相载体表面,然后与含有待测抗原和酶标抗原的混合物按不同比例一起保温。被结合的酶标抗原量,可根据酶作用底物的降解百分率测知。由于待测抗原与酶标抗原竞争性地与抗体结合,如待测液中含有较多的抗原,则被结合的酶标抗原量就少。仅加酶标抗原的底物降解量与同时加酶标抗原及待测抗原的底物降解量之差,就是待测抗原量。这种操作与经典的 RIA 相同。与本法类似的有序贯饱和法,它与竞争法不同点是在未标记的抗原与抗体先充分反应之后,然后再加入酶标抗原。

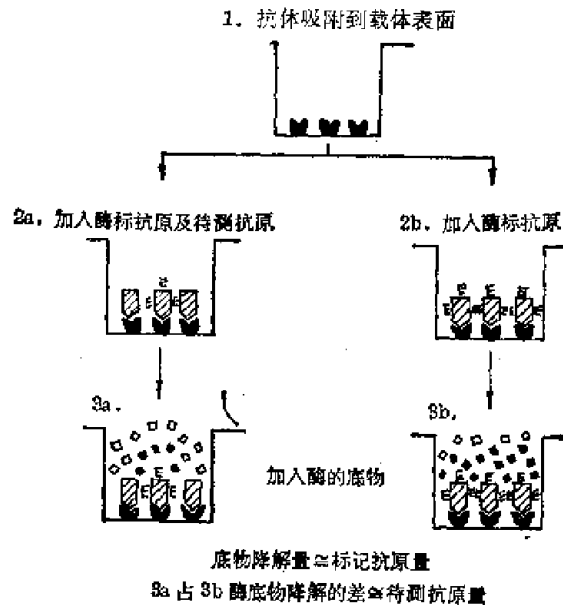


图 1 酶标抗原竞争法测定抗原的原理

E = 酶

2. 双抗体法(图 2) 用含有特异性抗体(第一抗体)的免疫球蛋白来致敏载体表面,然后将含有抗原的溶液与致敏表面一起保温,洗掉过剩溶液,再加入酶标特异抗体(第二抗体),此酶标抗体与已被“捕获”到致敏表面的抗原相结合,洗去过剩的酶标抗体,最后加入酶的底物,根据酶活性来测定结合的第二抗体的数量,这也就是待测抗原的数量。本法的优点之一是不需要纯化的抗原,这一点对于测定含量甚微不易获得的蛋白质抗原极为重要。并且所用的酶标记的抗体的纯化也不是绝对必要的,可以用抗血清中的 IgG 部分制备酶标抗体结合物。但用本法测定的抗原必需是多价的(至少必需为两价)。本法类似于双侧放射免疫法(“two-site” immunoradiometric procedure)。

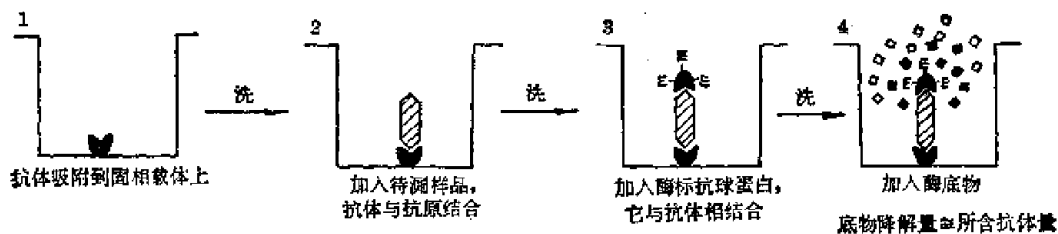


图 2 检测抗原的双抗体法原理

E = 酶

3. 免疫酶测定试验 (immunoenzymetric assay) (图 3) 将待测可溶性抗原与过量的标记抗体反应后, 加入过量的固相抗原, 让固相抗原再与所余下的游离标记抗体反应, 然后再分离除去固相物, 测定上清液中与可溶性抗原相结合的酶活性, 即可测知待测抗原的含量。

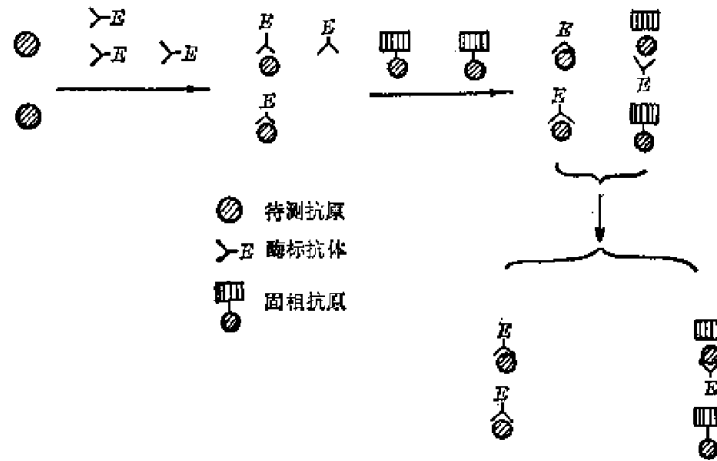


图 3 免疫酶测定试验原理

## (二) 测定抗体

1. 间接法 (图 4) 将抗原结合到固相支持物 (载体) 上 (致敏), 并把已致敏的载体与含待测抗体的血清一起保温。然后, 洗去过剩的血清, 再加入酶标记的抗球蛋白, 这种酶标抗体便与载体表面的抗原-抗体复合物结合, 通过测定结合上去的酶所降解底物的量, 可测知已结合上去的酶标抗体的量, 从而间接测得待测抗体的量。

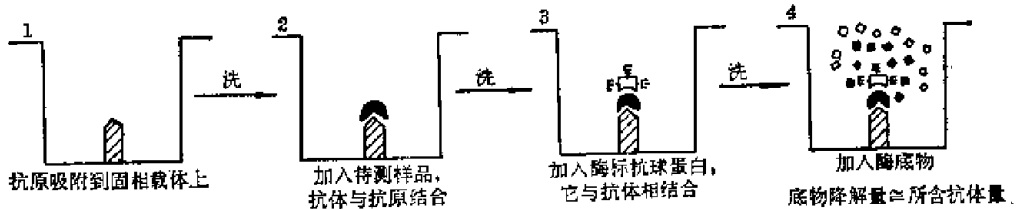


图 4 酶标抗球蛋白测定抗体的原理

此法需要纯化的抗原, 但其用途很广, 因为用一种酶标抗人球蛋白结合物, 一般就可以测定人的各种抗体。只有在更精密的研究中, 要用酶标抗人 IgG、IgM 或 IgA 结合物来测定属类特异性的抗体 (Class-specific antibody)。

2. 其他 亦可用竞争法及免疫酶测定法来测定抗体。即用标记与未标记的抗体竞争固相的抗原; 或用标记的抗原与抗体反应, 然后加入固相抗体与所多余的标记抗原反应, 然后分离测定酶活性。

## 二、均相的 (homogeneous) EIA

这种类型测定法不需要分离游离及结合的酶标记物, 直接以酶标记物与抗体结合, 然后按酶活性的变化来进行测定。它主要用来测定半抗原。Roberstein 等最先应用本法时是用溶菌酶为标记来测定吗啡及其衍生物 (图 5) 的。将溶菌酶标记到吗啡上, 此结合物与吗啡

抗体共同培养,如在待测液中含有吗啡,则此吗啡与酶标吗啡竞争地与抗体结合,未与抗体结合的酶标吗啡具有酶活性,而与抗体结合后的酶标吗啡则失去酶活性,根据两种情况下酶活性之差,可测知待测液中的吗啡含量。即结合物中的酶活性,在被它标记的免疫反应物与特异的配体(Couterpart)结合后会有改变,因而不用物理方法分离体系中的反应物,就可直接测定酶活性变化来求得抗原或抗体的量。因此这种测定法称为均一的酶免疫测定法。

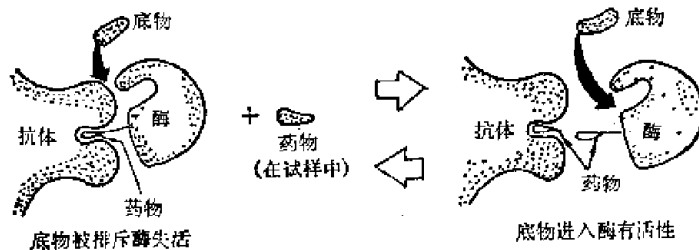


图5 均相的酶免疫测定原理实验所用有关材料

## 实验所用有关材料

### 一、标记酶

没有一种酶能够理想地应用于各种 EIA 的标记,在设计具体实验体系时,必需对标记酶进行选择,选择的标准主要有:

- (1) 酶制剂的纯度高;
- (2) 纯酶的转换率高;
- (3) 酶产物的测定方法灵敏度大;
- (4) 酶反应的测定方法易行、迅速;
- (5) 在测定液中没有干扰酶活性的因素及类似酶活性的因素;
- (6) 酶与其他分子结合后,还保留着它具有催化活性的部分;
- (7) 酶结合物稳定,易于应用及保存,并且费用不大。

以上第1、2、3点对实验结果的灵敏度有决定性影响,因此必需十分注意,其他几点则影响实验的特异性与实用程度,也应予以考虑,如有干扰酶活性的因素,则可在实验设计中注意将其消除。

目前在 EIA 中已选用为标记物的酶有:

辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase EC 1.11.1.7)

硷性磷酸酶(Alkaline phosphatase EC 3.1.3.1)

$\beta$ -D-半乳糖苷酶( $\beta$ -D-galactosidase EC 3.2.3.1)

葡萄糖氧化酶(Glucose oxidase EC 1.1.3.4)

葡糖淀粉酶(Glucoamylase EC 3.2.13)

碳酸酐酶(Carbonic anhydrase EC 4.2.1.1)

乙酰胆硷酯酶(Acetylcholine esterase EC 3.1.1.7)

以上几种酶用于非均相 EIA 的标记。

溶菌酶(Lysozyme EC 3.2.1.17)

苹果酸脱氢酶(Malate de hydrogenase EC 1.1.1.37)

6-磷酸葡萄糖脱氢酶(Glucose-6-phosphate de hydrogenase EC 1.1.1.49)

触酶(Catalase EC 1.11.1.6)

以上几种酶均用于均相 EIA 的标记。

上述大多数酶的反应物是用光电比色计(或目测)来测定,但  $\beta$ -D-半乳糖苷酶也可用荧光光度计测定。葡糖淀粉酶、乙酰胆碱酯酶及溶菌酶则分别用荧光光度计、扫描计数计及比浊计测定。其中应用最广的标记酶是辣根过氧化物酶(HRP)、硷性磷酸酶(AKP),这两种酶在实验中的效能大致相似。HRP的价格低廉,最后反应生成的颜色鲜明,但其底物 5-氨基水杨酸可能有致癌性,所以有人提出应用 AKP 更为安全,尽管它的价格稍贵。

## 二、酶-抗原(或抗体)结合物

### (一) 交联法

酶与蛋白质交联的方法有多种,其中用双功能团试剂戊二醛交联的方法应用最多,已由各种不同实验证明为稳定可用的方法。对戊二醛与蛋白质交联的反应机制了解尚不充分,认为蛋白质中赖氨酸残基是最可能与戊二醛进行反应的基团,目前认为可能是赖氨酸残基中的  $\epsilon$ -氨基与戊二醛反应形成 bis-schiff 硷的蛋白质衍生物(图 6)

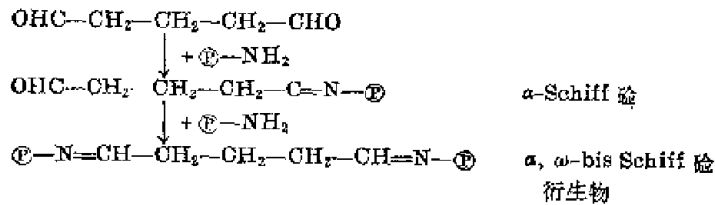


图 6 戊二醛和蛋白质通过形成 Schiff 硷结合的反应机制

注: Ⓢ-NH<sub>2</sub> 代表蛋白质及其游离氨基

然而,由于戊二醛在溶液中不是简单的二醛,易于形成多聚体,因此,有人提出了不同的反应机制,即戊二醛先醇醛缩合生成  $\alpha, \beta$ -不饱和醛,然后其双键再与氨基反应(图 7)。

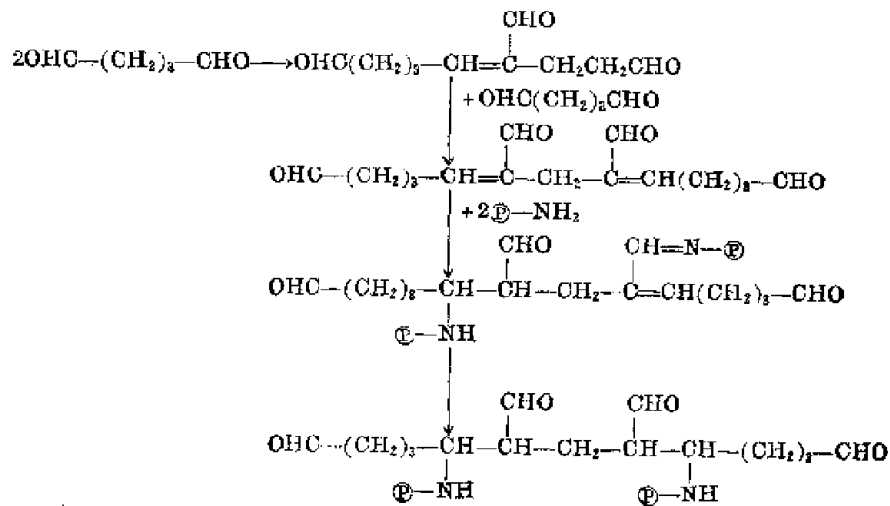


图 7 戊二醛与蛋白质的反应机制

用戊二醛交联的具体操作方法有二：一是将酶和蛋白质(抗原或抗体)一步进行反应，称之一步法。本法已广泛用于制备 AKP、葡萄糖氧化酶、乙酰胆碱酯酶及 HRP 的结合物；另一是酶先与戊二醛反应，然后与戊二醛结合的酶再与蛋白质交联，称为二步法。这仅用于制备 HRP 的结合物。

经过交联反应形成结合物时，由于蛋白质的活性基团被结合或在反应中受到影响，酶活性与免疫活性都有部分损失。有的资料报道了有关戊二醛交联反应的效能，AKP 与 IgG 结合仅保留了反应前酶活性的 60~70%，及反应前免疫活性的 1~10%。用 HRP 形成结合物的产量低，酶活性仅保留 2~10%。免疫活性用一步法交联时人绒毛膜促性腺激素(HCG)可保存 20~30%，而用两步法则仅存有 5%。也曾有报道指出抗 HBs Ag 的抗体活性大约有 50% 与 HRP 交联，但结合物的酶活性却很低(小于 1%)。有人比较了用一步法及两步法制备的 HCG-HRP 结合物，证明两步法制得的结合物试验时具有较高的灵敏度。

目前认为，因为商品 HRP 在制备时酶分子上大部分的  $\alpha$ - 和  $\varepsilon$ -氨基已被封闭，故含游离氨基很少，而 Ig 上的游离氨基很多，如用一步法加入戊二醛(GA)后，随机结合的结果，容易形成 Ig 的聚合物，故酶-Ig 结合物产率低，且多半由 2~3 分子的 Ig 与一分子酶组成，故分子量较大(50 万以上)，对细胞穿透力小，且酶与抗体活性丧失较多。如用二步法，当过量的 GA 加入 HRP 液时，酶分子上具有的少量游离氨基仅与 GA 上的一个活性醛基结合，而不发生酶与酶的聚合，而 GA 上的另一个醛基，则与随后加入的 Ig 分子上的氨基结合，形成 HRP-Ig 结合物，故结合物的分子量较小(25 万以下)，穿透性较大，酶活性和抗体活性丢失较小。故目前用戊二醛为交联剂来使 HRP 与 Ig 结合时多用二步法。

过碘酸交联法也较常用，本法主要用于 HRP 与糖蛋白的糖基交联，对蛋白质活性基团影响较小，结合物的 HRP 酶活性可高达反应前的 70%。近来，本法还成功地用于葡萄糖氧化酶与抗体的交联。有人将同一个酶(HRP)及同一个抗体(抗-Ig)，用不同方法制备成结合物在 EIA 中进行比较，发现过碘酸制备的结合物在灵敏度上优于戊二醛两步法制成者。但在一般实验中仍多用戊二醛法交联。如选用过碘酸法交联时，所用的蛋白质至少有一个必需是糖蛋白。

除上述两种方法外，还有双顺丁烯亚胺(dimaleimide)法及 MBS (*m*-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester)法等，尚待进一步应用与评价。

## (二) 结合物的纯化

交联反应后，反应体系中还存在未被标记的抗原(或抗体)与未结合的酶。前者会降低 EIA 的灵敏度，后者会增高 EIA 的空白值。当酶活性在固相载体上进行测定时，如有大量未结合的酶存在，则对固相载体的清洗要求更为严格，因此应将结合物进行纯化以除去在交联反应中未结合的酶与免疫反应物。此外，不同组成或不同分子量的结合物在测定中会有不同的灵敏度，故也应进行分部分离。在 RIA 中已证实，同位素标记的抗原的纯化对试验的灵敏度、精确度都很重要，可以推想在 EIA 中这具有相同的重要性。纯化的方法可根据不同的酶与免疫反应物进行选择。现将目前应用的纯化方法列于表 1。

## (三) 结合物的性质

抗原(或抗体)与酶结合后，可能由于其抗原决定簇或结合位置的丧失，或由于它和结合体(Partner)的亲和力下降，而表现免疫学性质的改变，这会影响 EIA 的特异性及灵敏度。曾有人比较了同一抗血清用 RIA 及 EIA 所得的标准曲线，两者大致是平行的(图 8)，这间

表1 酶-蛋白质结合物纯化方法

纯化方法	结合物类型		
凝胶过滤	Sephadose 6-B	$\beta$ -半乳糖苷酶-Ig $\beta$ -半乳糖苷酶-胰岛素 AKP-Ig HRP- $\alpha_2$ H球蛋白	
	Sephadex G-200	HRP-Ig AKP-Ig AKP-AFP 葡萄糖氧化酶-Ig 葡萄糖氧化酶-AFP AKP-触珠蛋白	
		Sephadex G-100	HRP-Ig
		Biogel P-150	葡萄糖淀粉酶-胰岛素
Ultragel AcA-44		HRP-Ig	
密度梯度离心	HRP-HCG AchE-HCG		
盐析	HRP-Ig		
亲和层析	HRP-HPL		

注: Ig—免疫球蛋白 HCG—人绒毛膜促性腺激素  
AchE—乙酰胆碱酯酶 HPL—人胎盘催乳素

出一分子  $\beta$ -半乳糖苷酶与 0.6 分子的 Ig 结合或与 4 分子的 Fab' 片段结合或与 2, 4, 6.5 或 10 个皮质醇结合均不影响其酶活性。当半抗原与  $\beta$ -半乳糖苷酶或与苹果酸脱氢酶(MDH)结合, 酶的  $K_m$  值及最大反应速度 ( $V_{max}$ ) 与游离酶相似, 可见对酶活性亦无影响。另外, 结合物的酶活性可能受到它与抗体结合的影响, 大多数结合物中的半抗原与抗体结合后酶活性受到抑制, 但也见到相反的情况, 如吗啡通过—SH 基与 MDH 结合, 该酶活性就不受吗啡抗体的抑制, 但如通过酪氨酸或酶的氨基与之结合时, 酶活性就受吗啡抗体的抑制, 并且其抑制程度取决于结合物中半抗原/酶的比率。有报告指出 MDH 与甲状腺素( $T_4$ )衍生物

表2 结合物的保存方法及稳定性

结合物中所含的酶	贮存方法	有效时间	备注
HRP	冻干后, 室温保存	18 个月	包括 HRP 与各种类固醇激素及各种蛋白质的结合物, 其免疫活性与酶活性均未丧失 同上 不加防腐剂*
HRP	冻干后, -20℃	3 年	
AKP	溶液, 4℃	$> \frac{1}{2}$ 年* $\geq 1$ 年	
$\beta$ -半乳糖苷酶	溶液, 4℃	$\geq 1$ 年	
$\beta$ -半乳糖苷酶	溶液, 4℃	$>$ 数月	
葡萄糖氧化酶	溶液, 4℃	$\geq \frac{1}{2}$ 年	
溶菌酶	溶液, 4℃	$\geq \frac{1}{2}$ 年	

\* AKP 结合物一般是用浓缩溶液, 加入一定浓度的人血清白蛋白为稳定剂(0.5%、1%或3%), 用 0.02% NaN, 为防腐剂, 置冰箱保存。

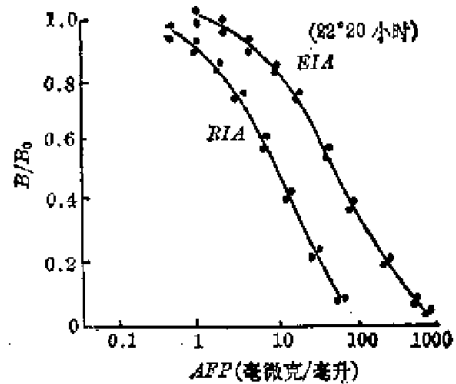


图8 由 RIA 及 EIA 所得的浓度-效应曲线的比较。两种实验均用序贯饱和法, 均在最适条件下进行测定, 仅标记物不同。B/B<sub>0</sub> 表示标记的  $\alpha$ -FP 在加入某一定量  $\alpha$ -FP 后与抗体的结合量 (B) 与未加入  $\alpha$ -FP 时的结合量 (B<sub>0</sub>) 的比值。标记抗原: RIA, EIA; 毫微克/毫升: 1.5, 10; 抗体稀释: 1/270000, 1/30000。

接说明免疫反应物与酶结合后, 对其免疫性能影响不大。

酶与免疫反应物结合也会影响其酶活性, 但对于结合的免疫反应物的数量与酶活性受影响程度间的关系所知甚少。有报告指

结合后酶的  $K_m$  增加,酶活性受抑制,关于两者之间的结合部位,目前还未见报道。

#### (四) 结合物的稳定性

至今尚未见到专门研究结合物稳定性的资料,大多数作者都是在实验过程中附带进行观察,并且判断稳定性的标准也是含混的。现将目前已见报道的观察结果列如表 2。

### 三、免疫反应物——抗原、抗体

#### (一) 纯度要求

抗原、抗体的标准化是提高 EIA 准确性的关键,这可应用参比血清(reference serum)来达到。抗体的参比标本是高效价的混合血清,这种参比血清最好分装冻干保存。每一组测定都应包括这种阳性参比血清及阴性参比血清的稀释物为对照,这样使得各组结果有同一的标准,可以相互比较。

抗原则要求尽可能纯化,否则就难达到标准化,最好用参比制品为基准来表示粗制品的生物学活性。如果用某些生化特性如蛋白质含量来表示,因为它与生物活性常无一定的关系,常会导致误解。抗原制剂要求一定的稳定性,冷冻干燥保存常不影响抗原活性,抗原分装冻干保存,就可使一批抗原在较长时间内应用。这样才能保证实验结果的重复性。

#### (二) 浓度选择

如果在测定时,固相载体上能包被较多的抗原,这样在与抗血清保温时,就能与较多的抗体结合,可以扩大实验的测定范围,然而这是难以达到的,因为抗原在固相载体上的包被量是有限的,在保温过程中,已包被上去的抗原还会有部分再游离,并游离释出的量与包被的总量有关。释出的游离抗原还能抑制抗体与包被在载体上的抗原反应。为研究在包被过程中加入抗原量与特殊性抗体结合的影响,曾用不同浓度的抗原液来包被试管进行观察比较(图 9)。

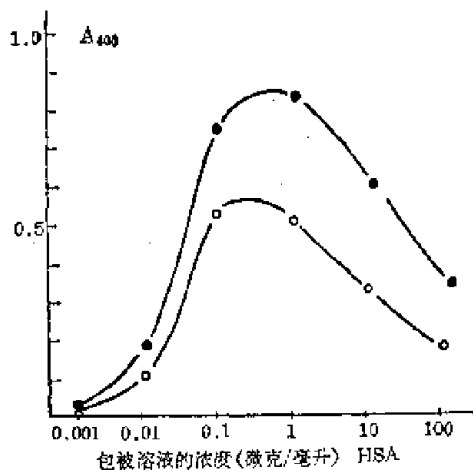


图 9 抗原滴定。试管用不同浓度的抗原(人血清白蛋白, HSA)包被,再与稀释的抗血清(抗 HSA 血清)保温,然后与酶标-抗 IgG 保温。●为用  $10^{-5}$  稀释的抗-HSA 血清进行反应,测定酶活性时保温 15 秒所得的光密度;○为用  $10^{-7}$  稀释的抗-HSA 血清进行反应,测定酶活性时保温 120 秒所得的光密度。

由图 9 可见在载体上包被的抗原浓度过高或过低,都不能满意地测定低浓度抗体,因此在设计具体实验体系时,应注意选择最适抗原包被量,及用棋盘滴定法(Chequer-board titration)来选择抗原、抗体相互反应的最适浓度。此外,在设计中还必需注意抗原与抗体的相对用量。用间接法为例,包被于试管上的抗原必需超过被测抗体的量,这样才能保证与待测样品中全部特异性抗体结合。同理,随后加入的酶标抗球蛋白也要过量,才能保证实验的准确性。

在大多数实验,仅能得到抗原的混合物或应用抗血清中全部免疫球蛋白,在这种情况下为选择合适的包被量,对每一批新的抗原或抗体都要用棋盘滴定法,找出阳性血清与阴性血清反应结果能看出明显差别的抗原或抗体稀释度。如果能得到纯化的抗原或特异性抗体,则

可测出确切的包被量,在以后的实验中即可沿用此量。

#### 四、固相载体

在 EIA 中包括两种类型的固相载体:一是疏松的小球状物。应用最早的是纤维素微晶(microcrystalline cellulose),其后陆续有应用琼脂糖。也曾有人用过聚丙烯酰胺凝胶(Biogel P-300)、孔径一定的玻璃珠(Controlled poreglass)为固相载体,或用乙酰氯甲酸酯(ethyl chloroformate)、戊二醛为聚合剂使免疫反应物相互交联而成为固态。最近 Kamefusa 等报道用硅碎片(Silicon pieces)为载体,它具有制作简易,价格低廉且比聚苯乙烯的物理吸附稳定等优点。另一种类型是将抗原或抗体吸附到塑料管或平板上,在管的内壁或平板的并孔表面上进行免疫反应及酶促反应,这样可避免离心分离、溶液转移等操作,简化了方法,便于使用,已得到广泛应用。

以上两种类型各有优缺点,前者抗原、抗体是通过共价键与固相小珠结合,用 Axén 法活化琼脂糖小珠后与抗原的结合方式如图 10。上述方式形成的结合物稳定,但在化学处理过程中,操作较复杂,条件也较剧烈,故酶易于失活,且在测定过程中,分离、清洗这些浮悬的小珠要经过多次离心,操作较繁琐费时。

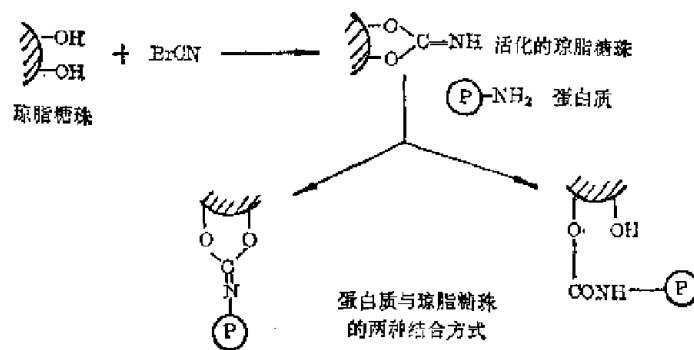


图 10 蛋白质与琼脂糖珠的结合方式

用聚苯乙烯塑料为固相载体,蛋白质主要是通过物理吸附而粘在载体的表面,其详细机理目前尚不了解。这种物理吸附是不够稳定的,在测定中保温及清洗均会使相当部分被吸附的抗原或抗体再游离。因此,试验的条件必需严格一致,才能提高测定结果的准确性及重复性。目前正在注意比较不同聚苯乙烯及其他塑料表面的吸附性能。每用一批新的试管,它对抗原或抗体的吸附能力都要用标准抗原、抗血清及结合物进行棋盘滴定法来测定。

除了载体物质的性质之外,抗原的吸附也受到反应时间、温度、pH 等影响,经过较长时间的吸附(4°C,过夜),可使在聚苯乙烯表面的包被量更一致。包被试管或平板以在临实验前制备者为佳,最好避免将已包被有抗原或抗体的试管或平板长期保存。

聚苯乙烯塑料试管法及微量平板法虽比较简便,已广泛应用,但并不是任何抗原或抗体均能满意地吸附其上,Voller 等总结了可以满意地吸附到聚苯乙烯微量平板上的物质(表 3)。在应用一种新的抗原或抗体时,应先行试验,以观察是否可选用这种载体。

表 3 可满意地吸附到聚苯乙烯微量平板上的物质

种 类	名 称	来 源
病 毒	风疹(rubella)	从感染组织培养中提取
	单纯疱疹(herpes simplex)	
	巨细胞病毒(cytomegalovirus)	
	麻疹(measles)	
	流感(influenza)	
	柯萨基 B(coxsackie B)	
	日本乙型脑炎 (Japanese B encephalitis)	从感染的鼠脑中提取
细 菌	密螺旋体(treponema)	得自感染兔超声处理的脏器
	布鲁氏菌属(brucella)	由琼脂斜面获得裂解的菌
	沙门氏菌属(salmonella)	脂多糖和酚水提取物
	霍乱弧菌(cholera vibrios)	脂多糖和合成的 "O" 抗原
原 生 动 物	溶组织阿米巴(antamoeba histolytica)	破裂的感染红细胞 从感染动物或培养获得的溶解、裂解的幼虫 溶解产物或培养的原生动物
	疟疾(malaria parasites)	
	锥虫(trypanosomes)	
	弓浆(型)虫(toxoplasma gondii)	
蠕 虫	旋毛虫(trichinella spiralis)	从感染鼠获得裂解的幼虫
	曼氏裂体吸虫(schistosoma monsoni)	成虫或超声处理的虫卵提取物
	丝虫(filarial parasites)	成虫, 盐水提取物
其 他	免疫球蛋白 特异抗体 DNA	18%Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 沉淀 亲和层析纯化 牛胸腺提取

## 实验结果的表示方法与鉴定

### 一、结果的表示方法

#### (一) 参比标准样品

根据参比标准样品在相同条件下制得的标准曲线, 查出待测样品的含量。如图 11 表示用间接法测定抗-HSA 抗体的 EIA 标准曲线。

在标记抗原竞争法中, 可用标记抗原的最大酶活性为100%, 在加入标准未标记抗原后, 以其酶活性降低的百分率做曲线, 在以后的测定中, 就从曲线上查得待测抗原的数量, 如图 12。

#### (二) 酶促反应产物的吸光率

在严格控制实验条件下, 实验结果也可直接用吸光率来表示, 此方法最为简便, 例如在抗体测定中, 测定大量感染的个体, 确定正常个体的吸光率范围, 选定一最高值, 在以后的测定中高于此值的为阳性(即感染个体, 表示抗体水平升高), 在这个水平以下为阴性。阳性与阴性个体的测定值可能稍有交错。例如图 13 表示一组无恰加斯氏病的巴西人的吸光率, 可见实际上所有数值均低于 0.4, 故选定高于 0.4 的吸光率为阳性结果。图中所示的恰加斯氏病患者的吸光率除 1 例之外, 都高于阴性水平。Voller 等也曾用此法对疟疾流行及非流行区进行了调查。

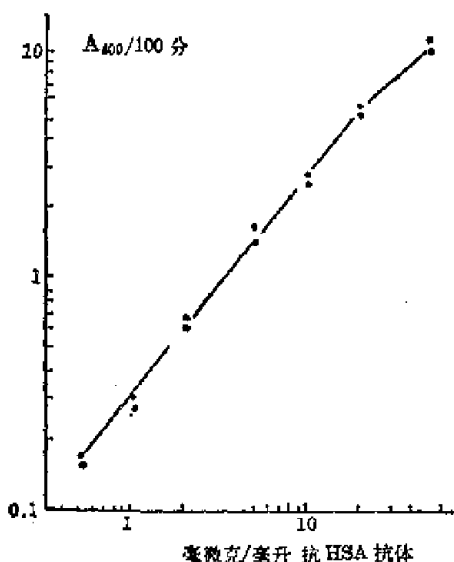


图 11 测定特异性抗体的标准曲线(以 5.2 毫克/毫升 HSA 抗体的标准血清稀释而成)

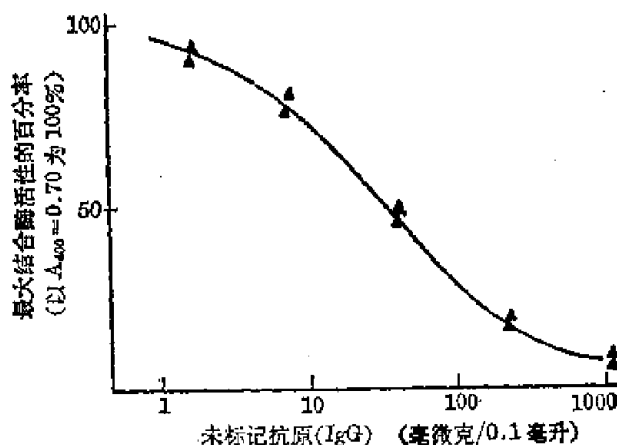


图 12 剂量-反应曲线(dose-response curve)表示未标记标准 IgG 制剂对酶标 IgG 的抑制。

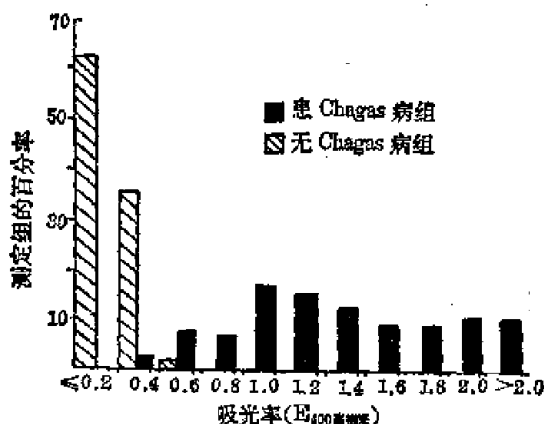


图 13 用枯氏锥体虫(*trypanosama cruzi*)抗原做 EIA 所得患 Chagas 病和未感染恰加斯氏病巴西人的测定结果。

### (三) 样品的滴度

所有血清样品在经过一系列稀释后进行滴定,然后选定一个吸光率,稀释到生成该吸光率时,样品的稀释度即称为“滴度”。

## 二、实验结果的鉴定

### (一) 准确性

是指大批测定结果的平均值与所测样品真正数值相符合的程度。EIA 的准确性与试剂免疫学的特异性及纯度如何;样品的处理与测定正确与否及选用的标准合适否均有关。此外,在反应体系中各试剂间的相互作用及免疫交叉反应也可影响测定结果的准确性。

鉴定 EIA 的准确性应包括以下试验:

(1) 免疫学特异性的检测：如抗原的纯度及抗血清的质量一般可用免疫扩散及免疫电泳进行检测，对每个新的实验体系，因其条件不同，都应重新检测。

(2) 与公认的测定体系比较：一般以 RIA 为高灵敏度抗原/半抗原测定法的代表，而以免疫荧光法为抗体测定法的代表，把这两种测定法的结果与 EIA 结果进行比较，来鉴定 EIA 的准确性(图 14)。

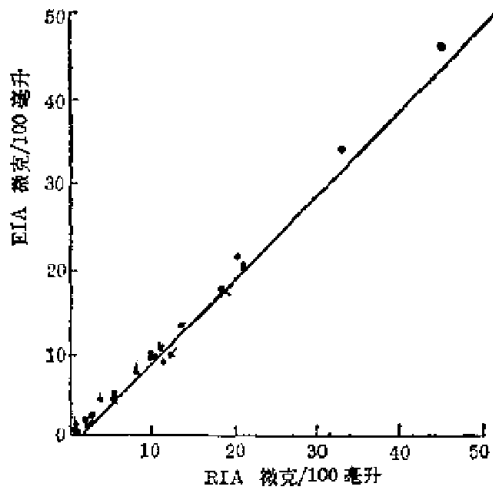


图 14 用 EIA 及 RIA 法测定的血浆皮质醇水平比较  
 $y = 1.0x - 0.12$   $r = 0.99$   $n = 28$   $p < 0.001$

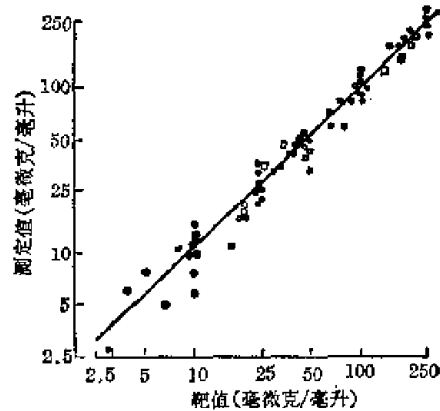


图 15 68 个不同血清样品中加入  $\alpha$ -FP 的回收率  
 • 纯抗原 ○ 羊水 □ 脐带血清 ■ 孕妇血清

(3) 回收实验：这种实验对于了解样品液对测定结果可能具有的影响很有帮助，如 Belanger 在测定  $\alpha$ -FP 中用纯抗原、脐带血清、孕妇血清及异常血清样品做回收试验(图 15)，在 68 个血清样品( $\alpha$ -FP 值为 5~250 毫微克/毫升)加入不同量标准  $\alpha$ -FP 后得到的回收率是 99.5%，变异系数为 10.6%，以此来进一步说明该实验的准确性与特异性。

(4) 用一般所得的生理及病理数值来校准，如健康成人血清  $\alpha$ -FP 值低，而妊娠及各种肝病时可升高，EIA 所得结果也是如此。

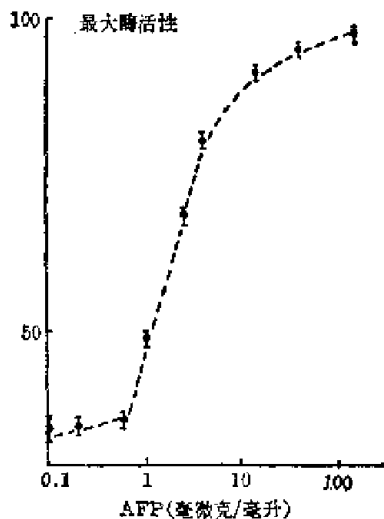


图 16  $\alpha$ -FP 标准曲线：表示两组八次实验所得结果的重复性  
 横杠代表每一项测定值的  $\pm 2S.D$

(5) 用不同批实验结果做比较来鉴定。

### (二) 精确度

是在用同一样品做一系列不同浓度测定时其结果的变动范围。用不同的测定方法所得到的结果之间，由于其对精确度的计算方法不同，常不能严格地进行比较，但可作为评价对比的参考。对一个实验方法精确度的测定有助于选择该测定方法的实用范围。如图 16 表示用免疫酶测定法所得的标准曲线，在 0.7~15 毫微克/毫升范围内该曲线坡度陡、重复性好，故确定在该实验条件下的测定范围为 0.7~15 毫微克/毫升。

### (三) 灵敏度

EIA 的灵敏度取决于抗原-抗体间的亲和力，因而受到抗血清质量的影响，并且也取决于抗原或半抗原的分子量与性质，为此在不同的抗原与半抗原之间是难于严

格进行比较的。具体试验条件如测定方法的类型(包括保温时间、温度等)及测定试样的种类、稀释度、标记物交联的方法、标记分子的大小以及其测定、纯化容易与否等等都对灵敏度有明显影响。

曾对不同类型的抗原测定法进行过一些比较,如 Van Weeman 与 Schuurs 比较了竞争法、免疫酶测定法及双抗体法测定 HCG 的结果,发现前二种方法灵敏度相似,双抗体法的灵敏度则低 20~40 倍,有人比较了竞争法与双层双抗体法(double sandwich method)测定  $\alpha$ -FP 的结果,认为其灵敏度相同。一般说,EIA 的灵敏度是高的,对许多抗原的测定,其灵敏度可达 1~10 微克/升(表 4)。

表 4 EIA 测定抗原与半抗原及其灵敏度

抗原/半抗原	测定类型 <sup>a</sup>	酶 <sup>b</sup>	交联剂 <sup>c</sup>	分离方法 <sup>d</sup>	灵敏度
触珠蛋白	1	AP	G <sub>1</sub>	SP:PT	2 微克分子/升
B 型肝炎表面抗原	3	P	G <sub>2</sub>	SP:PP	3 微克/升
IgE	1	AP	G <sub>1</sub>	SP:PT	10 微克/升
IgG	1	AP	G <sub>1</sub>	SP:CL	25 微克/升
	1	AP	G <sub>1</sub>	SP:PT	1 微克/升
	1	P	G <sub>2</sub>	SP:PA	10 毫克/升
	1	P	G <sub>2</sub>	SA:SP:PA	0.2 毫克/升
	1	P	G <sub>2</sub>	SP:CP	0.2 毫克/升
	2	GO	G <sub>1</sub>	SP:CP	50 微克/升
	3	P	SB	SP:AG	50 微克/升
	3	BG	DM	SP:AG	0.4 毫微克
	3 <sup>e</sup>	BG	DM	SP:AG	50 微微克
胰岛素	1	AP	G <sub>1</sub>	SP:PT	75 单位/升
	1	GA	G <sub>1</sub>	SP:DX	0.3 毫单位/升
	1	BG	DM	SP:DX	0.2 毫单位/升
	1	BG	MBS	SA	0.5 微单位
	1	P	SB	SP:PT	5 毫单位/升
胎盘催乳素	1	P	G	SA:SP:CL	2 毫微克
妊娠相关 $\alpha$ -巨球蛋白	3	P	G <sub>1</sub>	SP:PT	0.2 毫克/升
孕酮	1	BG	CDI	SA:SP:CP	0.15 毫微克
促甲状腺素	1	AP	G <sub>1</sub>	SA	10 毫单位/升
霍乱外毒素	4	AP	G <sub>1</sub>	SP:PT	60 微克/升
脂多糖	4	AP	G <sub>1</sub>	SP:PT	1.3 毫克/升
血清白蛋白	1	GA	FNPS	SP:AG	
癌胚抗原	1	AP	G <sub>1</sub>	SP:PT	20 微克/升
HCG	1	P	G <sub>1</sub>	SP:CL	1000 国际单位/升
	1	P	G <sub>1</sub>	SA:SP:CL	100 国际单位/升
	1	P	TDC	SP:AG	
	2	P	TDC	SP:AG	
	1	P	G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub>	SA:SP:CL	10 国际单位/升
	2	P	G <sub>1</sub>	SP:AG	200 国际单位/升
	2	P	G <sub>2</sub>	SP:AG	10 国际单位/升
	3	P	G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub>	SP:CL	200 国际单位/升
	1	AC	G <sub>1</sub>	SP:PP	<10 国际单位/升
皮质醇	1	BG	MA	SA	1 微克/升
	1	BG	MA	SA:SP:CL	1.5 微克/升