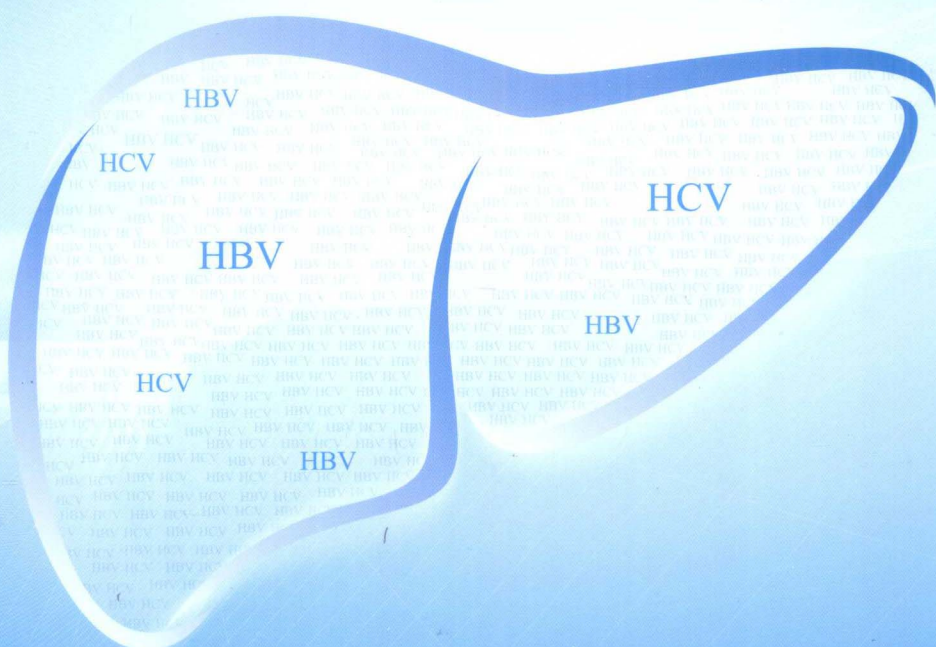


乙型肝炎和丙型肝炎

实验诊断与致癌机制

Laboratory Diagnosis and Carcinogenesis Mechanism
of Hepatitis B & Hepatitis C



主编 刘锡光 白东亭 贾继东

Laboratory Diagnosis and Carcinogenesis Mechanism
of Hepatitis B & Hepatitis C

乙型肝炎和丙型肝炎 实验诊断与致癌机制

主 编 刘锡光 白东亭 贾继东

副主编 祁自柏 刘 忠 卢银平 马 红

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

乙型肝炎和丙型肝炎实验诊断与致癌机制/刘锡光等主编. —北京: 人民卫生出版社, 2011. 4

ISBN 978-7-117-13929-8

I. ①乙… II. ①刘… III. ①乙型肝炎—实验室诊断
②丙型肝炎—实验室诊断③乙型肝炎—致癌因素④丙型肝炎—致癌因素 IV. ①R512.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 014423 号

门户网: www.pmph.com	出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com	护士、医师、药师、中医师、卫生资格考试培训

版权所有, 侵权必究!

乙型肝炎和丙型肝炎实验诊断与致癌机制

主 编: 刘锡光 白东亭 贾继东

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

010-59787586 010-59787592

印 刷: 北京汇林印务有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 21

字 数: 511 千字

版 次: 2011 年 4 月第 1 版 2011 年 4 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-13929-8/R · 13930

定 价: 42.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)

作者 (以姓氏笔画为序)

- 马 红 首都医科大学附属友谊医院
王佑春 中国药品生物制品检定所
王 缦 上海科华生物工程股份有限公司
孔凡忠 国家食品药品监督管理局认证中心
卢银平 华中科技大学协和医院
白东亭 中国药品生物制品检定所
刘功成 郑州安图绿科生物工程有限公司
刘 忠 Bentley and liu Biomedical consulting co. LTD
刘晓明 武汉市普爱医院
刘锡光 湖北中医药大学医学检验与技术学院
许四宏 中国药品生物制品检定所
安娟娟 国家食品药品监督管理局
医疗器械技术评审中心
祁自柏 中国药品生物制品检定所
杨小昂 河南省医学科学研究院
李桂林 郑州安图绿科生物工程有限公司
吴 星 中国药品生物制品检定所
何永贵 湖北省荆州市第一人民医院
张亚南 首都医科大学附属天坛医院
张德太 华中科技大学协和医院
陈 华 上海科华生物工程股份有限公司
陈华云 广州中山达安公司
周 宓 武汉大学生命科学院
周 诚 中国药品生物制品检定所
胡佳杰 湖北中医药大学医学检验与技术学院
胡 蕊 河北医科大学第二附属医院
贾继东 首都医科大学附属友谊医院
徐志学 武汉市临床检验中心
康熙雄 首都医科大学附属天坛医院
董志宁 广州中山达安公司
穆海东 上海裕隆生物科技有限公司

序

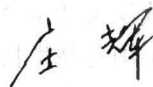
近年来,随着分子生物学的迅速发展,乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)感染的实验室诊断技术有了很大进展,例如乙型肝炎的实验室诊断,已从单纯的 HBV 血清学标志物的定性检测发展到定量检测;由 HBV 去氧核糖核酸(HBV DNA)定性检测,发展到 HBV DNA 实时荧光定量聚合酶链反应法、基因型、基因亚型和耐药变异检测等。丙型肝炎的实验室诊断也由单纯的抗-HCV 和 HCV 核糖核酸(HCV RNA)定性检测,发展到实时荧光定量聚合酶链反应法、基因型、亚型和抗原检测。在检测技术上也有很大改进,如现行的 HBV DNA 和 HCV RNA 实时荧光定量聚合酶链反应法的灵敏度大大提高;定量的线性范围更广;精密性和重复性更好;无操作引起的污染;高度自动化操作,检测速度快,减少了人为误差等。目前,乙型和丙型肝炎的实验室检测不仅仅用于筛查和诊断,还广泛用于指导临床治疗。此外,近年来,对 HBV 和 HCV 致癌机制研究也取得了重大进展。

《乙型肝炎和丙型肝炎实验诊断与致癌机制》一书正是在这一背景下,由刘锡光、白东亭、贾继东教授主编,祁自柏研究员、刘忠博士、卢银平博士和马红教授任副主编,联合 20 位富有理论和实践经验的专家编著而成。全书共 10 章约 60 余万字,内容丰富、新颖,可读性强,充分反映了当今乙型肝炎和丙型肝炎实验室诊断及 HBV 和 HCV 致癌机制研究的最新进展。

我衷心祝贺本书的及时面世。我相信,本书的出版必将推动我国乙型肝炎和丙型肝炎的防治工作,为我国“科教兴国”作出贡献。

中国工程院院士

中华医学会肝病学会名誉主任



2010 年 2 月 8 日

前言

《肝炎实验诊断指南》已出版 6 年了,这些年来肝炎实验诊断又有长足进展:在当代广泛应用的实验诊断技术方面我国积累了较成熟的经验;而且新近研发出的实验诊断新技术百花齐放争奇斗艳;我国体外诊断试剂的监督管理及质量控制已规范化,有章可循,中国药品生物制品检定所和国家食品药品监督管理局在本书中公布了我国体外诊断试剂的注册管理,生产管理条例,生产和质量控制技术指导原则,以及乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒的体外诊断试剂国家标准品。

这些年来肝炎领域有两大新的问题值得关注:一是乙型肝炎和丙型肝炎致癌机制的研究成果;二是聚乙二醇干扰素和核苷类药物的大量临床实践,使肝炎治疗取得了突破性的进展,为此,世界上几个主要的国家都公报了他们 2007~2009 年的肝炎实践指南。前者是以 zur Hausen 等一批科学家对感染性疾病致癌机制的进一步阐明,这是一项划时代的成果(zur Hausen 因为证实了 HPV 致癌机制而获胜 2009 年诺贝尔奖),对 HBV、HCV 在乙型肝炎和丙型肝炎中的致癌作用阐明得更细致、准确、全面。还介绍了感染性人类癌症的发展阶段;与感染相关的肿瘤类型;细胞干扰因子(CIF)等。本书尽作者所能,将这些观点向大家汇报,希望进一步推动这个领域的深入研究。后者在本书的附录中将中、美、日等国或地区最新版的乙型肝炎和丙型肝炎实践指南汇编在一起,供大家学习参考。慢性乙型肝炎防治指南 2010 年更新版要点(讨论稿,中国),为非最终稿。

本书供肝炎实验室工作人员和临床医生,医学院校师生,国内各体外诊断试剂生产厂家或公司工作人员,各大医院、疾病控制中心、肿瘤防治工作人员和社区医院医护人员学习参考。

有不少作者都是单位某部门的领导或骨干,他们日理万机还要利用业余时间甚至于开夜车为本书撰稿。卢银平博士负责版权的授权工作。还有出版社的编辑日以继夜地为本书审稿,大家都是尽力为我国肝炎防治做一些有益的工作,为广大读者提供一顿丰富的大餐,在此,我们向亲爱的作者和编辑们深深鞠躬,并道一声:谢谢!您们辛苦了!

由于我们能力和时间有限,贻误之处在所难免,请广大读者和业内人士多加批评指正!

刘锡光 白东亭 贾继东

2010 年 2 月 3 日

目 录

第一篇 乙型肝炎和丙型肝炎的实验诊断技术

第一章 当代广泛应用的实验诊断技术

第一节 酶联免疫技术	3
一、临床免疫检验技术发展史	3
二、酶联免疫技术(ELISA)的原理	4
三、酶联免疫技术(ELISA)的类型	9
四、酶联免疫技术(ELISA)在 HBV 和 HCV 标志物检测中的应用	12
第二节 胶体金技术	21
一、胶体金技术概述	21
二、胶体金技术的原理和分类	22
三、胶体金技术的应用领域	24
四、前景展望	28
第三节 确认技术	28
一、HBsAg 确认试验	28
二、HCV 确认试验	30

第二章 新技术在乙型肝炎和丙型肝炎实验诊断中的应用

第一节 化学发光技术	37
一、化学发光免疫分析技术的原理	37
二、化学发光免疫分析的特点	37
三、化学发光免疫分析的分类	37
四、化学发光免疫检测试剂在肝炎检测中的应用	38
第二节 时间分辨荧光免疫分析法	38
一、时间分辨荧光免疫分析法的原理	38
二、时间分辨荧光免疫分析法的特点	38
三、时间分辨荧光免疫分析法在肝炎病毒诊断中的应用	39
第三节 核酸检测技术	40
一、核酸的定量检测技术	40
二、核酸的定性检测技术	41
第四节 生物芯片在肝炎诊断中的应用	44

一、生物芯片介绍	45
二、生物芯片在肝炎诊断中的应用	51
三、生物芯片存在的问题和前景	53
第五节 HBV 耐药性分析	53
一、HBV 耐药突变的分子生物学	53
二、HBV 耐药性突变株的分子检测方法	55
三、HBV 耐药突变检测相关产品	58
第六节 其他新技术	59
一、液相芯片检测技术	59
二、均相免疫分析检测技术	60
三、PCR 阻断联合荧光探针检测 HBV 基因前 C 区 G1896A 突变株的方法	61

第二篇 我国体外诊断试剂的监督管理及质量控制

第三章 我国体外诊断试剂的注册和生产管理

第一节 体外诊断试剂的注册管理	72
一、我国体外诊断试剂注册管理的历史沿革	72
二、目前我国体外诊断试剂的注册管理	74
三、对今后体外诊断试剂注册管理的思考	79
第二节 体外诊断试剂的生产管理	80
一、我国体外诊断试剂现状	80
二、国内外体外诊断试剂管理异同	82
三、各国相关法规汇总	83
四、对目前《体外诊断试剂生产企业质量管理体系考核评定标准》中某些条款的理解及思考	84
第三节 体外诊断试剂质量体系有效覆盖判定原则	87
一、体系考核范围有效覆盖判定原则及补充说明	87
二、体系考核范围有效覆盖判定原则的设计原理	89

第四章 体外诊断试剂生产及质量控制技术指导原则

第一节 酶联免疫法试剂生产及质量控制技术指导原则	106
一、基本原则	107
二、原材料质量控制	107
三、试剂盒各组分的生产	109
四、质量控制	110
第二节 发光免疫分析试剂生产及质量控制技术指导原则	110
一、基本原则	111
二、原材料质量控制	111
三、试剂盒各组分的生产	113
四、质量控制	115

第三节 核酸扩增法试剂生产及质量控制技术指导原则	116
一、基本要求	116
二、原材料	116
三、生产工艺	117
四、质量控制	117
第四节 金标类诊断试剂生产及质量控制技术指导原则	118
一、基本原则	118
二、原材料质量控制	118
三、试剂盒的制备	120
四、质量控制	120
第五节 生物芯片类诊断试剂生产及质量控制技术指导原则	121
一、基本原则	121
二、原材料质量控制	122
三、试剂盒各组分的生产	125
四、半成品质量控制	126
五、成品质量控制	126

第五章 国家标准品

第一节 乙型肝炎病毒表面抗原标准品	127
一、乙型肝炎病毒表面抗原国际标准品	128
二、乙型肝炎病毒表面抗原国家标准品	129
第二节 乙型肝炎病毒表面抗体标准品	131
一、乙型肝炎病毒表面抗体国际标准品	132
二、乙型肝炎病毒表面抗体国家标准品	132
第三节 乙型肝炎病毒核心抗体试剂国家标准品	134
一、检测方法和临床意义	134
二、乙型肝炎病毒核心抗体国家标准品	135
第四节 乙型肝炎病毒 e 抗体试剂国家标准品	137
一、检测方法和临床意义	137
二、乙型肝炎病毒 e 抗体国家标准品	138
第五节 乙型肝炎病毒 e 抗原试剂国家标准品	139
一、检测方法和临床意义	139
二、乙型肝炎病毒 e 抗原国家标准品及应用	140
第六节 乙型肝炎病毒基因试剂国家标准品	141
一、检测方法和临床意义	141
二、国产和进口荧光 PCR 检测试剂的差异	142
三、乙型肝炎病毒 DNA 国家定量标准品的研制	143
第七节 丙型肝炎病毒抗体试剂国家标准品	145
一、简介	145
二、酶联免疫法类抗 HCV 试剂国家标准品	146

三、胶体金法抗 HCV 试剂国家标准品	148
第八节 丙型肝炎病毒基因试剂国家标准品	149
一、丙型肝炎病毒基因(HCV RNA)试剂国际标准品	149
二、丙型肝炎病毒基因(HCV RNA)试剂国家标准品	150

第三篇 乙型肝炎和丙型肝炎的致癌机制

第六章 感染性人类癌症的发展阶段

一、早期阶段(1882~1911)	154
二、挫折和成功阶段(1912~1950)	155
三、对肿瘤病毒体特异性功能理解的形成(1950~1965)	156
四、第一个人类肿瘤病毒吗?	157
五、艰难的 20 世纪 70 年代	157
六、理论重现之路	158

第七章 与感染相关的肿瘤简介

一、与感染相关的肿瘤类型	161
二、与人类癌症相关感染的全球分布	161
三、机体对可能导致癌症感染的反应:细胞干扰因子(CIF)概念	163

第八章 乙型肝炎及其病毒

第一节 历史	170
第二节 流行病学和临床症状	170
第三节 分类学和病毒基因组结构	172
第四节 病毒基因产物和功能	174
一、核心抗原	174
二、多聚酶	174
三、HBX 抗原	174
第五节 免疫的作用	175
第六节 HBV 在肝细胞肝癌中的作用	178
第七节 HBx 与 HCCs	181
第八节 HBs 转基因鼠与 HCCs	185
第九节 化学致癌物与 HBV 感染的相互作用	186
第十节 HBV 介导的 HCC 发生机制	188
第十一节 预防和控制	190

第九章 丙型肝炎及其病毒

第一节 历史	192
第二节 流行病学	192
第三节 病毒基因组结构、转录、翻译、基因功能和分类学	193
第四节 感染、传播和病毒 DNA 驻留	193
第五节 致病机制和免疫的相互作用	194

一、逃逸宿主防御的机制	194
二、宿主免疫反应	195
第六节 HCV 在肝细胞癌中的作用	195
第七节 HCV 在淋巴组织增生疾病中的作用	199
一、混合的冷球蛋白血症(mixed cryoglobulinemia)	199
二、绒毛淋巴细胞所致的脾淋巴瘤	199
三、非霍奇金淋巴瘤(NHL)	200
第八节 预防和控制	200
第十章 肝细胞癌发生机制的研究进展	
第一节 乙型肝炎病毒感染与肝细胞癌	202
一、HBV 基因组的致癌机制	202
二、HBV 基因产物的致癌机制	204
第二节 丙型肝炎病毒感染与肝细胞癌	205
一、HCV 核心蛋白致细胞癌变发生的可能机制	205
二、HCV NS3 蛋白的致癌机制	208
第三节 肝细胞增殖与肝细胞癌	210
第四节 细胞凋亡与肝细胞癌	210
第五节 癌基因和抑癌基因与肝细胞癌	211
第六节 生长因子与肝细胞癌	213
第七节 microRNA 与 HCC	214
附录一 肝损害筛选、诊断和处理的实验室指南	217
前言	217
一、肝功能和肝损害的实验室检测指南	218
二、肝炎血清标志物和核酸的检测	231
三、急性肝损伤	237
四、慢性肝损伤	244
五、肝硬化	253
六、肝细胞癌	254
附录二 日本病毒性肝炎诊断及治疗方案(2009)	272
附录三 丙型肝炎防治指南(中国,2004)	278
前言	278
一、丙型肝炎的病原学	278
二、丙型肝炎的流行病学	278
三、丙型肝炎的自然史	279
四、HCV 传播的预防	280
五、丙型肝炎的临床诊断	280
六、丙型肝炎的实验室诊断	281
七、丙型肝炎的病理学诊断	282

八、抗病毒治疗的目的和药物	282
九、抗病毒治疗的适应证	283
十、抗病毒治疗的禁忌证	284
十一、抗病毒治疗应答的类型及影响因素	284
十二、慢性丙型肝炎治疗方案	285
十三、抗病毒治疗的不良反应及处理方法	286
十四、丙型肝炎患者的监测和随访	287
十五、提高丙型肝炎患者对治疗的依从性	287
附录四 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)	289
一、病原学	289
二、流行病学	289
三、自然史	290
四、预防	291
五、临床诊断	292
六、实验室检查	293
七、影像学诊断	294
八、病理学诊断	294
九、治疗的总体目标	294
十、抗病毒治疗的一般适应证	295
十一、干扰素 α (IFN α)治疗	295
十二、核苷(酸)类药物治疗	296
十三、免疫调节治疗	298
十四、中药及中药制剂治疗	299
十五、抗病毒治疗推荐意见	299
十六、特殊情况的处理	300
十七、抗炎、抗氧化和保肝治疗	302
十八、抗纤维化治疗	302
十九、患者随访	302
英汉专业词汇	310
Laboratory Diagnosis and Carcinogenesis Mechanism of Hepatitis B Virus & Hepatitis C Virus	316
跋	323

第一篇

乙型肝炎和丙型肝炎 的实验诊断技术



第一章

当代广泛应用的实验诊断技术

实验诊断技术最早可追溯到公元前 400 年,当时,希腊名医 Hippocrates 利用感官直视法观察病人尿液标本,以辅助对疾病的诊断,开创了最原始的实验诊断技术。当代广泛应用的临床诊断技术主要可分为临床血液学诊断、临床生物化学诊断、临床微生物学诊断、临床免疫学诊断和临床分子生物学诊断。

自从 17 世纪后期荷兰人列文·胡克发明显微镜之后,人们便开始利用显微镜观察血液中的红细胞、白细胞、血小板等成分,开创了最早的血液学诊断技术。19 世纪末发明了染色技术,使细胞形态更容易识别。1990 年发现了人类红细胞的 ABO 血型,开始用于输血安全控制。1929 年发明了骨髓穿刺技术,骨髓也可被吸取、涂片和染色,用于血细胞的分类和诊断疾病。1934 年, Moldvan 首先报道了细胞计数装置,1956 年, Coulter 发明了第一台商品化的细胞计数器。1969 年,第一台现代意义上的流式细胞仪诞生。近年来,流式细胞仪制造水平、性能和自动化程度的提高,使流式细胞仪已逐渐从研究领域进入临床实验室,为疾病诊治和发病机制的研究提供了有力的手段。1918 年,“临床化学”的概念由 Lichtwitz 首先提出。20 世纪初,开始了对血液和尿液标本中的化学成分进行检测。20 世纪 30 年代以后,随着光电比色法的应用,临床化学的实验室分析发生了根本的改变,至今仍然占有重要地位。50 年代以后,酶活力的测定使得临床化学分析步入一个新的台阶,同工酶和酶谱分析技术大大提高了诊断灵敏度和特异性。传统的临床生化检测在糖类、脂类、血清蛋白、血清酶、电解质等方面对人体各种物质进行监测,对维持人体代谢平衡,正常发挥各组织和器官的正常功能起到了重要作用。而药代动力学的发展,治疗性药物检测已在指导临床合理用药,提高药物效果,减少药物副作用,以及研究药物在体内的代谢规律等方面都具有重大的作用。

现代临床微生物学实验诊断技术是以巴斯德创建巴氏消毒法为起点的,随后德国医师 Koch 发现了微生物是致病因子并发明了固体培养基培养技术和细菌染色技术,使他与巴斯德一并成为微生物学的奠基人。到 20 世纪初,许多细菌病的病原体被一一发现,相继分离了炭疽芽胞杆菌、结核分枝杆菌、霍乱弧菌、白喉棒状杆菌、破伤风芽胞杆菌、伤寒沙门菌、脑膜炎奈瑟菌、鼠疫耶尔森菌、痢疾志贺菌等众多细菌,大大推动了近代微生物学和临床医学的发展。自从 1929 年 Fleming 发现青霉素以来,人们发现了几乎能抗所有细菌的许多种类的抗生素。临床微生物学的主要任务是:研究感染性疾病的病原体特征;提供快速、准确的病原体诊断;指导合理使用抗菌药。而随着近年来抗生素的滥用,已经引起了严重的医疗问题。据卫生部统计,我国每年约有 8 万人直接或间接死于滥用抗生素,由此造成的机体损伤以及病菌耐药性更是无法估量。滥用抗生素使我们为战胜疾病付出的代价越来越高,因此,开展科学的临床微生物学诊断已成为目前防止抗生素滥用现象继续扩大的当务之急。

临床免疫学诊断的历史最早可追溯到公元前 741~713 年(我国唐代开元年间),当时人们利用天花痂粉吹入正常人鼻孔中预防天花。19 世纪末,俄国和比利时科学家分别发现了细胞免疫和体液免疫现象。20 世纪初到 20 世纪 60 年代,各国的科学家陆续发现了 B 细胞和 T 细胞的功能,解释了抗体的结构,同时建立了经典的抗原抗体反应——凝集反应。1975 年单克隆抗体技术的创立,是免疫学发展史上的一个新的里程碑,从此以后各种免疫学技术得到了迅速的发展。免疫学检验分为细胞免疫检验(免疫活性细胞及其功能检测)和体液免疫检验(抗原、抗体、补体等检测),由于后者具有很高的灵敏度和特异性,且容易实现批量化操作,目前已被广泛地应用于临床诊断和基础研究。自 1941 年 Coons 建立荧光抗体检测技术(fluorescent antibody technique)以来,又陆续发展了放射免疫测定(radioimmunoassay,RIA)、酶免疫测定(enzyme immunoassay,EIA)。荧光抗体技术、放射免疫分析技术、酶免疫分析技术是经典的三大标记技术。1977 年,Halman 将化学发光反应体系与免疫系统相结合创建了化学发光免疫分析法(chemiluminescence immunoassay,CLIA)以检测抗原抗体,将免疫诊断技术又向前推进了一步。CLIA 技术以其高灵敏度,宽检测范围,无环境污染等众多优势正得到越来越广泛的应用。此外,面向快速化、家庭化的免疫金标技术近年来发展也十分迅速。

早在 19 世纪后期,人们便已经开始认识到核酸这类物质。到 20 世纪 20 年代,人们又测定了核酸的结构,并将核酸分为 DNA 和 RNA。到 1944 年,又证明了 DNA 是遗传的物质基础。1955 年 Watson 和 Crick 发现了 DNA 的双螺旋结构并解释了 DNA 的遗传机制之后,遗传学正式进入分子生物学水平。1985 年,聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)技术的问世,引起了分子生物学的一场革命。随着人类基因组计划的完成,分子生物学和基因诊断技术在医学领域的应用越来越广泛,成为临床实验诊断技术的又一个新的发展方向。

尽管临床诊断技术可分为血液学诊断、生化诊断、微生物诊断、免疫学诊断和分子生物学诊断五大类,但随着现代临床诊断技术的发展,一方面各类诊断技术之间的分类越来越细,分支学科越来越多,另一方面也产生了一些交叉综合科学,不断推动着实验室诊断技术的发展。例如,1991 年 Sano 等首次将 PCR 技术引入免疫反应,将抗原抗体反应的高度特异性和 PCR 技术的高灵敏度、高自动化、操作简单等特点结合起来,形成了免疫-PCR 技术(immuno-PCR),开创了免疫诊断技术的新时代。近十几年来,生物芯片(biochip)技术发展迅速。生物芯片是一门多学科的综合技术,可以将生命研究中若干不连续的过程集中在一块大小几厘米的芯片上,并使这些分散的过程连续化与微型化,以此实现大量生物样品和数据的快速、自动及并行处理。生物芯片可同时放置成千上万种生物分子(如核酸、蛋白质、生物细胞等),并同时进行多种生物化学反应,可在分子生物学水平上迅速读取相关信息。生物芯片技术以其高信息量、高通量、灵敏、准确、快速等特点,已于近十几年来显示出了巨大的威力。

第一节 酶联免疫技术

一、临床免疫检验技术发展史

临床免疫检验技术的出现最早可追溯至 19 世纪末。1896 年,Widal 建立免疫凝集试

验,亦即著名的肥达试验(Widaltest);1897年,Kraus建立免疫沉淀试验;1902年Ascoli建立了环状沉淀试验;1946年Oudin报道了试管单向免疫扩散试验;1965年Mancini又提出了平板单向免疫扩散试验,这种试验的出现使得以前只能进行定性测定的免疫试验进入到了定量的时代;Grabar和Williams 1953年首先报道的免疫电泳,其后,又出现了对流免疫电泳、火箭免疫电泳和免疫固定电泳(immunofixation electrophoresis,IFE)等。

作为经典的免疫测定技术,免疫沉淀和免疫凝集试验存在着许多缺点,如测定范围狭窄($10\sim 100\mu\text{g/ml}$)、灵敏度低,而且繁琐费时,不能自动化等。而作为现代免疫测定技术的标记免疫测定技术则能解决这些临床测定问题。1941年Coons建立的荧光素标记抗体技术(fluorescent antibody technique),为定位组织和细胞中的抗原物质提供了一个直接而又有效的手段。在20世纪40年代以前,免疫测定技术基本上都是定性或半定量测定方法,到60年代初,才出现完全的定量测定方法,即放射免疫试验(radioimmunoassay,RIA)。高灵敏放免测定技术的出现,解决了以前难以测定的微量生物活性物质如激素的临床检测问题,其发明者之一Yalow因此而获得了1977年的诺贝尔生理学 and 医学奖。尽管放免测定技术的出现是免疫测定技术发展史上的一个里程碑,但由于其有试剂半衰期短、实验废液难以处理、污染环境等缺点,使得其现已在逐步退出在临床常规检验中的应用,而采用非放射性核素标记物建立标记免疫测定技术成为发展主流。

1966年,美国的Nakane和Pierce以及法国的Avrameas和Uriel同时报道了酶免疫测定技术。其将酶替代荧光素,用于抗原在组织中的定位,可通过光学显微镜和电子显微镜来观察。60年代末,在酶免疫组织化学的基础上,Engvall和Perlmann以及Van Weeman和Schuurs等发展了一种酶标固相免疫测定技术,即酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA),这种简单方便的免疫测定技术出现后,不但成为了一种非常简便的研究工具,而且迅速地应用于各种生物活性物质及标志物的临床检测,并在临床应用中逐步取代了放免技术。其后,1972年Rubenstein等又建立了一种无需分离洗涤步骤的均相(homogeneous)酶免疫测定技术——酶放大免疫分析技术(enzyme multiplied immunoassay technique,E-MIT),这种测定技术主要限于小分子物质如药物等的测定应用。1975年单克隆抗体技术的建立是免疫学发展史上的一个重大里程碑。将单克隆抗体应用于免疫测定,极大地提高了免疫测定的灵敏度和特异性。80年代,研究人员使用胶体金作为抗体的标记物,建立简便快速的免疫渗滤层析试验。进入90年代,使用不同测定原理的各种自动化免疫分析仪不断应用于临床检验,给我们实验室的日常工作不但带来了很大的便利,而且其测定较之人工操作更为稳定和准确。近几年,基因工程免疫测定试剂和基因工程抗体的发展,又一次拓宽了免疫测定技术的发展途径。目前在免疫测定技术中,技术成熟应用广泛的当属ELISA。

二、酶联免疫技术(ELISA)的原理

(一) ELISA 的原理

ELISA的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性,酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性,又保留酶的活性。在测定时,待检标本(测定其中的抗体或抗原)与固相载体表面的抗原或抗体起反应,用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开,再加入酶标

记的抗原或抗体,也通过反应而结合在固相载体上,此时固相上的酶量与标本中待检物质的量呈一定的比例。加入酶反应的底物后,底物被酶催化成为有色产物,产物的量与标本中待检物质的量直接相关,故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。由于酶的催化效率很高,间接地放大了免疫反应的结果,使测定方法达到很高的敏感度。

ELISA 是以免疫学反应为基础,将抗原、抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合起来的一种敏感性很高的试验技术。由于抗原、抗体的反应在一种固相载体——聚苯乙烯微量滴定板的孔中进行,每加入一种试剂孵育后,可通过洗涤除去多余的游离反应物,从而保证试验结果的特异性与稳定性。在实际应用中,通过不同的设计,具体的方法步骤可有多种,比较常用的是 ELISA 间接法、双抗体夹心法和双抗原夹心法。

ELISA 的基本原理有三个:第一是抗原或抗体能以物理性地吸附于固相载体表面,并保持其免疫学活性;第二是抗原或抗体与酶连接形成酶结合物,而此种酶结合物仍能保持其免疫学和酶学活性;第三是酶结合物与相应抗原或抗体结合后,可根据加入底物的颜色反应来判定是否有免疫反应的存在,而且颜色反应的深浅是与标本中相应抗原或抗体的量成正比例的,因此,可以按底物显色的程度显示试验结果。

由于 ELISA 法一方面是建立在抗原与抗体免疫学反应的基础上,因而具有特异性。而另一方面又由于酶标记抗原或抗体是酶分子与抗原或抗体分子的结合物,它可以催化底物分子发生反应,产生放大作用,正因为此种放大作用而使本法具有很高的敏感性。因此,ELISA 法是一种既敏感又特异的方法。

(二) ELISA 法试剂

ELISA 中有三个必要的试剂:免疫吸附剂、酶结合物和酶的底物等。完整的 ELISA 试剂盒包含以下各组分:已包被抗原或抗体的固相载体(免疫吸附剂),酶标记的抗原或抗体(结合物),酶的底物,阴性对照品和阳性对照品(定性测定中),参考标准品和控制血清(定量测定中),酶结合物及标本的稀释液、洗涤液、酶反应终止液。

1. 免疫吸附剂 免疫吸附剂(immunoabsorbent):为已吸附抗原或抗体等生物分子材料的固相载体,是 ELISA 试剂盒最关键的试剂,一般在低温($2\sim 8^{\circ}\text{C}$)干燥的条件下可保存 6 个月以上。

(1) 固相载体:固相载体在 ELISA 测定过程中作为吸附剂和容器,不参与化学反应。可做 ELISA 中载体的材料很多,最常用的是聚苯乙烯。聚苯乙烯具有较强的吸附蛋白质的性能,抗体或蛋白质抗原吸附其上后仍保留原来的免疫学活性,加之它的价格低廉,所以被普遍采用。ELISA 载体的形状主要有三种:微量滴定板、小珠和小试管。以微量滴定板最为常用,专用于 ELISA 的产品称为 ELISA 微量滴定板或 ELISA 微孔板,国际上标准的微孔板为 8×12 的 96 孔式。为便于作少量标本的检测,有制成 8 联孔条或 12 联孔条的,放入座架后,大小与标准 ELISA 板相同。ELISA 板的特点是可以同时进行大量标本的检测,并可在特制的比色计上迅速读出结果。现在已有多种自动化仪器用于微量滴定板型的 ELISA 检测,包括加样、洗涤、保温、比色等步骤,对操作的标准化极为有利。聚苯乙烯经射线照射后,其吸附性能特别是对免疫球蛋白的吸附性能增加,应用于双抗体夹心法可使固相上抗体量增多,但用于间接法测抗体时空白值较大。良好的 ELISA 板应该是吸附性能好,空白值低,孔底透明度高,各板之间、同一板各孔之间、同一板各孔之间性能相近。

(2) 包被用抗原和抗体:用于包被固相载体的抗原按其来源不同可分为天然抗原、重组