

中国生物化学会专题讨论会文集 (1)

免疫活性细胞与免疫方法进展

葛锡锐 编

科学出版社

中国生物化学会专题讨论会文集(1)

免疫活性细胞与免疫方法进展

葛锡锐 编

科学出版社

1982

内 容 简 介

本文集是由“免疫技术在分子生物学和细胞生物学中的应用研究”专题讨论会的综述性文章组成,一共十三篇。主要内容有常用细胞免疫的方法、免疫电泳、放射免疫、酶标记等等;核酸免疫化学;免疫化学在探测蛋白质分子溶液构象中的应用;免疫活性细胞、抑制细胞和巨噬细胞;细胞分离和淋巴细胞的激活;免疫杂交瘤法。本书可供医学和生物学的科研工作者和有关的大专院校师生参考。

207/3

中国生物化学会专题讨论会文集(1)

免疫活性细胞与免疫方法进展

葛锡锐 编

责任编辑 赵甘泉

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1982年9月第一版 开本:787×1092 1/16

1982年9月第一次印刷 印张:11

印数:0001—3,900 字数:252,000

统一书号:14031·36

本社书号:2687·14

定价: 1.75 元

前 言

中国生物化学会于一九八〇年九月十五日到十九日,在成都召开了一次题为“免疫技术在分子生物学和细胞生物学中的应用研究”的小型学术讨论会议。这是计划中于一九八〇年召开的四次小型会议之一。四川医学院事先做了不少准备工作,全部会程五天,安排极为紧凑,秩序井然,到会的七十多人,都一致称颂。生物化学界前辈四川医学院蓝天鹤教授,不辞辛苦,亲自主持大会;免疫学界前辈谢少文教授,兼程赴会指导,并作精湛的评述,均为会议生色不少。

过去的二十年左右,无疑为免疫学兴旺发达的年代。抗体的分子结构、补体各组分的逐步发现、*B*和*T*细胞的识别及其功能、淋巴细胞膜的细微结构等重要进展,都是此一期间的成果。免疫学由此进入分子水平,正在为很多综合性生物学现象提供确切解释的路途上前进。

现代免疫学是建立在生物化学、细胞生物学、生理学、遗传学等生物学的分支的基础之上的综合性学科,同时又是医药卫生等应用学科的理论基础。我国在二、三十年代已经播下了它的种子。此后,由于众所周知的原因,进展缓慢,有时甚至停顿。粉碎“四人帮”以后,免疫学的应用和理论研讨均获得重视,前进的趋势已经形成,今后的进展会比以往迅速。此次会议就“细胞免疫”和“免疫方法”二方面进行了广泛的交流,各专家所作综述共十三篇,特以《免疫活性细胞与免疫方法进展》为题,汇集成册,公开发行,供更多的读者参考。至于专题讨论会宣读的论文四十余篇,其摘要已由中国生物化学会编印成“论文摘要汇编”,为节省篇幅,这里不再重印。

沈 昭 文

1981年1月29日

编 者 的 话

应中国生物化学会之邀,参加了在成都召开的“免疫技术在分子生物学和细胞生物学中的应用研究”专题讨论会的审编工作。这次会议是我国免疫学工作者的一次盛会,所邀请的绝大多数专家都作了颇有参考价值的综述报告。其中,我国著名免疫学家,近八十高龄的谢少文教授在《常用细胞免疫方法的讨论》一文中,收集了国内发表的部分有关文献,对其优缺点、今后方向、应用的可能性等作了精辟的分析,深信对于开展实验室和临床的细胞免疫研究有很大推动作用。

免疫电泳、放射免疫和酶标记等方法已在国内普遍开展,这里除较系统地就其原理、方法和应用作一般介绍外,以作者们的亲身体会就甾体激素和小肽分子的放射免疫方法作了较深入的专题记述。尤其是作者们又介绍了一些更为灵敏的方法,如光放射技术和超敏酶放射免疫测定等,有可能测定毫微微克的抗原分子,这些方法比只能测到微微克水平的放射免疫和酶标记法要灵敏 100—1000 倍,可供读者参阅。书中还有《核酸免疫化学及其应用》和《免疫化学在探测蛋白质分子溶液构象中的应用》的专题文章,据本人了解,国内的免疫书籍中尚属罕见,对有志从事这方面工作的同志将有所裨益。

本书还就免疫活性细胞,尤其是抑制细胞和巨噬细胞等作了专题讨论。对免疫活性细胞结构与功能的深入了解和研究,一直是免疫学中一个极其重要的中心研究课题,至今尚有不少问题未弄清,值得进一步探索。在细胞免疫工作中最常遇到的是细胞分离问题和淋巴细胞的激活问题,这里也请有关专家作了专题介绍。免疫杂交瘤法是近年来免疫学中兴起的一项新技术,目前已有一些文章开始介绍这方面工作,这里登载了一篇。

在本书的出版过程中,承中国生化学会袁士龙同志从组织、编辑、校对等各方面给以大力支持;又承中国科学院生物化学研究所洪焜、王美娟等同志对本书的插图、参考文献进行加工,使本书得以早日问世,谨向他们致以热忱的感谢。

葛 锡 锐

1981年1月

目 录

I. 分子免疫学部分

免疫技术在蛋白质定性定量上的应用·····	孙芝琳 王道若 刘秉文 (1)
免疫化学在探测蛋白质分子溶液构象上的应用·····	曾庆镒 (19)
核酸免疫化学及其应用·····	胡世真 (29)
酶免疫测定技术进展·····	林性玉 张惠珠 (39)
甾体激素的放射免疫测定·····	丁 霆 朱忠义 (49)
小肽放射免疫分析近况·····	陆以信 张明芬 潘家秀 (67)

II. 细胞免疫学部分

常用细胞免疫方法的讨论·····	谢少文 (85)
凝集素的性质及其在免疫学上的应用·····	孙 册 (91)
免疫活性细胞的表面标志·····	邵国英 朱炳法 (103)
抑制细胞在免疫调节中的作用·····	吴慧君 (121)
巨噬细胞及其功能·····	南国华 黄文长 (132)
免疫活性细胞及其分离纯化·····	朱炳法 邵国英 (144)
免疫活性细胞的杂交及其应用·····	葛锡锐 (161)

免疫技术在蛋白质定性定量上的应用

孙芝琳 王道若 刘秉文

(四川医学院)

- 一、引言
- 二、免疫电泳测定法
 - 1. 对流免疫电泳
 - 2. 电泳免疫扩散
 - 3. 双向免疫电泳
 - 4. 线形免疫电泳
- 三、放射免疫测定法
 - 1. 基本原理
 - 2. 基本方法
 - 3. 放射免疫测定法在蛋白质定量分析上的应用
- 四、酶连接免疫吸附测定法
 - 1. ELISA 的原理
 - 2. ELISA 法操作中的几个问题
 - 3. ELISA 在蛋白质定性定量上的应用

一、引言

蛋白质的测定,方法虽然很多,但大都从化学的角度对其定性定量。自从人们认识到蛋白质本身就是一类优良的抗原物质后,应用免疫技术测定可溶性蛋白质就广泛地引起了生物化学家的重视。就免疫技术论,从最初的试管沉淀反应,到琼脂凝胶中的扩散试验;由直接的沉淀反应到间接的凝集反应(如间接血凝、间接乳胶凝集);由琼脂扩散试验又发展到免疫电泳;几十年来由直接的抗原抗体反应检测法到标记如荧光、放射性同位素、酶标记的抗原抗体检测法等等。方法一步一步的改善,灵敏度一步一步的提高,检测水平也由微克(μg)发展到微微克(pg)水平。

本文仅就免疫电泳、放射免疫测定法及酶免疫测定法(主要是酶连接免疫吸附测定法)的方法学基础,试验中注意问题,优缺点及其在蛋白质抗原、抗体的检测和应用上作一扼要复习。

二、免疫电泳测定法

可溶性蛋白质抗原与相应抗体在凝胶中可形成抗原-抗体复合物的沉淀线,这一特性很早就用于蛋白质的定性定量分析,如1948年 Ouchterlony 提出的双向免疫扩散法(DID)主要用于抗原定性,以及1963年 Mancini 等提出的单向圆周扩散法(SRID)用于抗原定量。1953年 Grabar 和 Williams 首先将电泳技术与双向免疫扩散相结合,发展为免疫电泳(IE),提高了对抗原检测的分辨力。上述方法至今仍广泛应用。近年来结合生物化

学分离技术进展,主要针对提高分辨力和灵敏度,又发展了一些新的免疫电泳方法,这方面的工作已有不少文献综述^[4-6],以下简单介绍其中几种。

1. 对流免疫电泳

对流免疫电泳 (Countercurrent immunoelectrophoresis, CIE) 是抗原与抗体在凝胶中同时进行电泳的一种定性或半定量方法,由 Bussard 首先提出。在琼脂或琼脂糖凝胶板相隔一定距离的孔中,负极端加抗原,正极端加抗体,在 pH8.6 进行电泳,抗原由负极向正极移动,抗体借电渗作用缓慢地由正极向负极移动,抗原抗体相遇形成沉淀线。由于抗原抗体分子在电场作用下定向移动,限制了自由扩散,提高了相互作用抗原抗体的浓度,从而提高了灵敏度。CIE 一般较双向免疫扩散提高灵敏度约 10—16 倍,以测定甲胎蛋白 (AFP) 为例,最低检出量为 0.25—0.5 微克/毫升。电泳时间一般仅需 30—60 分钟。CIE 操作简单、快速、灵敏度高、不需要特殊仪器设备,短期可进行大量样品检测,近年来不仅广泛用于临床常规与普查,如 AFP, HBsAg 的检测,同时在蛋白质分离纯化过程中也是一种很好的监测手段。由于抗原-抗体复合物沉淀线,可因抗原或抗体过剩而溶解, CIE 有时出现假阴性反应。

用增强抗原抗体复合物沉淀的可见度以提高 CIE 法的灵敏度,属于这一类的试剂,常用的有 1% 鞣酸、0.5% 磷钨酸、右旋糖酐、聚乙烯醇以及特异性第二抗体等。如 Hamada 等^[7]用过氯酸提取人血清 CEA 为抗原,与羊抗 CEA 抗血清进行 CIE,未出现沉淀线,在第一次 CIE 后,用生理盐水充分洗去凝胶中的游离抗原、抗体蛋白质后,再于正极端抗体孔中加入第二抗体(即兔抗羊 γ -球蛋白),进行第二次 CIE,即可观察到沉淀线,与 CEA 放射免疫测定法对比,这种简单的半定量法测定 CEA 水平灵敏度近 10 毫微克/毫升。

2. 电泳免疫扩散

电泳免疫扩散 (Electroimmunodiffusion, EID) 又称“火箭”电泳 (Rocket immunoelectrophoresis) 是 1966 年 Laurell^[8] 提出的一种免疫定量方法。抗原在含单价抗体的琼脂凝胶中电泳,在 pH8.6 条件下,抗原向正极移动,而凝胶中的抗体移动很慢,抗原抗体反应出现圆锥形的沉淀峰,随着电泳进行,未反应的抗原继续向前移动,顶端的沉淀峰为过剩抗原所溶解,前沿又形成新的沉淀峰,这一过程反复进行,直至抗原全部消失,此时沉淀峰的高度(或沉淀峰的面积)与抗原浓度呈正比关系,用标准抗原在相同实验条件下进行 EID,以峰值高度与抗原浓度绘制标准曲线,从标准曲线即可计算出未知抗原的含量。(图 1) EID 可以在混合抗原中借助于单价抗血清对其中的抗原定量,且沉淀峰值较 SRID 沉淀环直径大,灵敏度较高,误差较小,一般电泳时间仅需 3—4 小时,最低检测量为 0.5—1 微克/毫升。

对 EID 的改进如:

(1) 与放射自显影结合:不少实验室报道^[9]测定血清 AFP 时,于电泳样品中同时加入^[125]I-AFP 电泳后,用生理盐水漂洗,凝胶干燥后进行放射自显影测量火箭峰值。灵敏度提高到 10—20 毫微克/毫升。这种方法已广泛用于肝癌的早期诊断。

(2) 加大抗原量以提高灵敏度: EID 的灵敏度受到加样品量的限制,一般加样仅

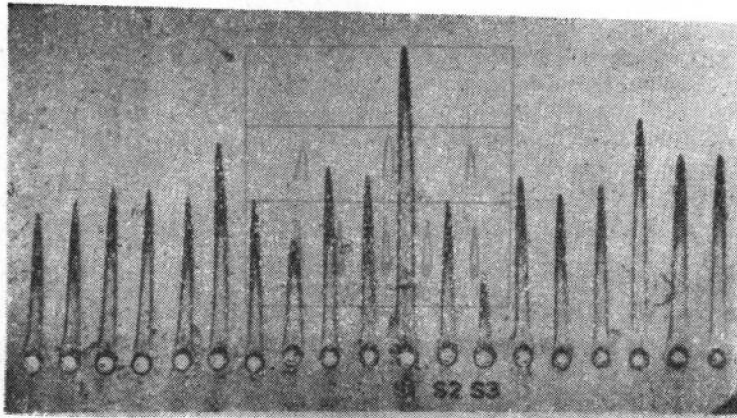


图1 火箭电泳图

S_1, S_2, S_3 为标准抗原,其余为待测抗原。

10—30 微升, Krøll^[10] 改用桥形样品管, 加抗原量可达 0.1—10 毫升。对清蛋白定量一般为 1—5 毫微克/毫升, 若样品用量为 10 毫升, 清蛋白最低检测量可达 0.1 毫微克/毫升。中国科学院生物化学研究所报道^[11], 用桥形免疫定量法测定 AFP, 样品管内加待测抗原, 加样后将样品管 A'B' 端放在凝胶板的 AB 孔内(见图 2), 用 0.02M, pH8.6 巴比妥缓冲液, 1.5—2 伏/厘米电泳 24 小时, 即出现火箭峰。0.5—2.0 毫升样品管可检出 AFP 浓度为 2—10 毫微克/毫升, 使普通免疫电泳的灵敏度达到放射免疫测定水平。如果把这一技术与放射火箭自显影原理结合, 测定 AFP 的灵敏度可达 0.4 毫微克/毫升水平。

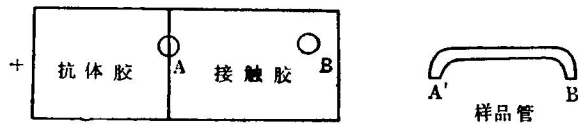


图2 桥形免疫定量板示意图。

(3) 改变抗原的化学特性: 某些蛋白质等电点与抗体分子接近, 在常用 EID 条件下, 这类抗原可以同时向正负极移动, 不能形成可定量的火箭峰。一般采用不改变抗原性的条件下改变抗原的化学特性, 以增加分子表面负电荷, 从而增加向正极的电泳迁移度, 以达到免疫电泳定量的目的。如 Weeke^[12] 用 KCNO 处理免疫球蛋白, 使分子中的氨基甲酰化, Slater^[13] 用甲醛处理免疫球蛋白, 封闭分子中带正电荷的氨基, 均能使免疫球蛋白形成正极可定量的沉淀峰。此外, Lou 等^[14] 用双功能基试剂戊二醛, 使免疫球蛋白分子与清蛋白分子交联, 交联分子可以保持两者的抗原性, 但免疫球蛋白分子却具有近似清蛋白的电泳迁移度, 可以用抗免疫球蛋白血清进行 EID 定量。

(4) 免疫选择技术 (Immunoselection)^[15], 是 EID 与特异性吸收相结合, 用于对免疫球蛋白的重链或轻链分析定量技术。如重链病人血清中重链可被选择性定性或定量(见图 3)。电泳时凝胶 A 中的抗轻链抗体与病人血清 (t) 和正常人血清 (n) 中完整的免疫球蛋白分子结合, 出现沉淀峰, 而不与重链结合。随着电泳进行, 重链向凝胶 B 迁移, 同时由于电渗作用, 凝胶 C 中的抗重链抗体向凝胶 B 移动, 在凝胶 B 中重链与其抗体相遇, 即形成火箭峰。

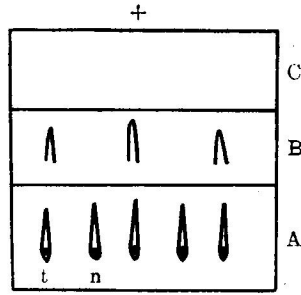


图3 免疫选择火箭电泳图 n. 正常人血清, t. 病人血清。

3. 双向免疫电泳

双向免疫电泳 (Two dimensional immunoelectrophoresis. 2-D EID) 又称交叉免疫电泳 (Crossimmunoelectrophoresis) 是, 1965 年 Laurell^[46] 在 Ressler 工作的基础上提出的。抗原先在琼脂凝胶中进行第一向电泳, 抗原按电泳迁移度在凝胶中分离, 然后在抗体凝胶中成 90° 进行第二向电泳, 与 EID 原理相同, 形成多个火箭沉淀峰(图 4) 每一个沉淀峰代表一种抗原, 根据沉淀峰的数目、位置、形状、峰值与标准抗原比较等可以对未知抗原定性与定量。由于很少有两种抗原电泳迁移度相同, 沉淀峰的高度和形状也相同的情况, 所以 2-D EID 的电泳图谱具有很高的分辨力。由于 2-D EID 的高分辨力, 它主要用于抗原定

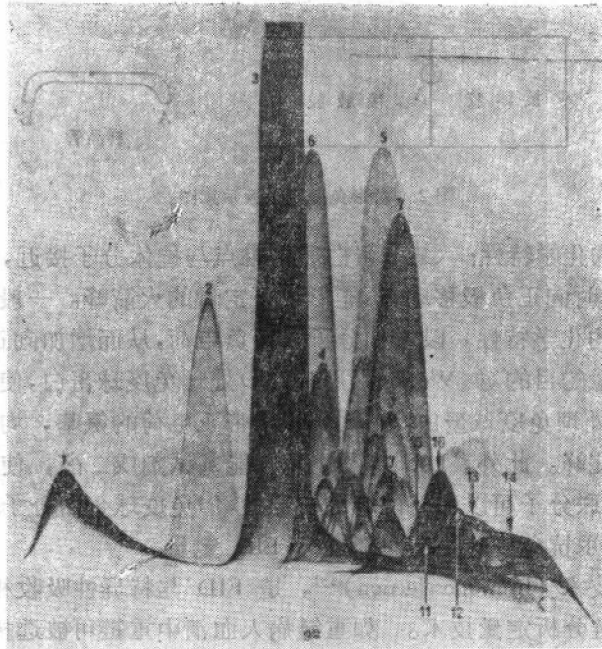


图 4-a 人血清蛋白-抗人血清蛋白双向免疫电泳图。

图中数字表示部分蛋白质沉淀峰。如 1. 清蛋白标准, 2. 前清蛋白, 3. 清蛋白, 4. α_1 -脂蛋白, 5. α_2 HS 糖蛋白, 6. α_1 抗胰蛋白酶球蛋白, 7. 触球蛋白, 8. α_1 易沉淀糖蛋白, 9. GC 球蛋白, 10. α_2 巨球蛋白, 11. β_1 -A(C_3), 12. β_1 -C(C_3), 13. IgA, 14. IgM, 15. 血液结合素, 16. 转铁蛋白, 17. β -脂蛋白。

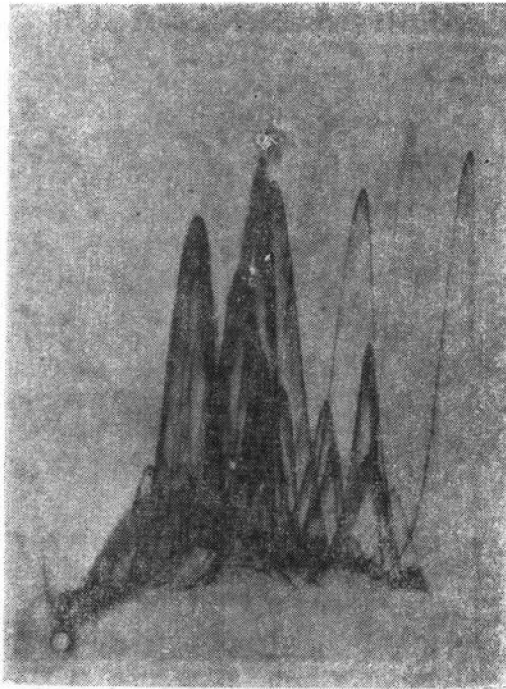


图 4-b 白色念珠菌抗原-抗白色念珠菌抗体双向免疫电泳图。图中显示 67 个沉淀峰

性鉴定,2-D EID 中混合抗原各组分含量不同,不可能使每一组抗原抗体均达到最适比例,所以在一次电泳图谱中难于对多数或全部组分定量。

目前对2-D EID 技术亦有不少改进,应用较多的是与聚丙烯酰胺凝胶电泳^[17]或聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦相结合^[18],以这些电泳分离为第一向。近来还应用非离子去污剂,如2% Triton x-100 提取膜蛋白,同时在进行2-D EID 时凝胶中亦保持一定的 Tritonx-100 浓度,使水不溶性膜蛋白与抗膜蛋白抗体反应,这样可对人红血球细胞膜,肝细胞膜蛋白进行分析^[19,20]。

4. 线形免疫电泳

线形免疫电泳 (Line immunoelectrophoresis) 是一种对抗原可同时定性、定量技术。1969年 Krøll^[21] 首先应用。将抗原、抗体分别加入琼脂凝胶中,制成含抗原凝胶与含抗体凝胶。不同的抗原凝胶并列为负极端,将抗体凝胶与抗原凝胶连接,抗体凝胶为正极端。在电场作用下,抗原根据其浓度和电泳迁移度向抗体凝胶中移动,结果生成多条平行的沉淀线(图5)相同抗原的平行沉淀线发生融合,由此可定性鉴定。在一定条件下沉淀线与抗体凝胶底线的距离与抗原浓度呈正比关系,可以定量。其优点是抗原加于凝胶中,所加样品用量较一般免疫电泳多,灵敏度较2-D EID 高,并且只需进行一次电泳即可。但由于需制备几种不同的抗原胶和抗体胶,操作步骤稍多,同时抗原和抗体用量多,在应用中不如2-D EID 广泛。

上述几种类型的免疫电泳方法,均可以与同位素标记、酶标记、酶染色及特殊染色法结合。目前已广泛应用。

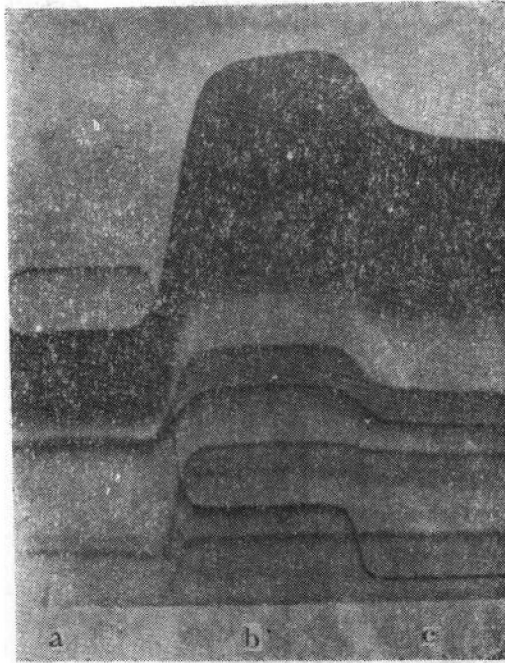


图5 线形免疫电泳对脑脊液蛋白质的定性和定量。

抗原胶: a. 含 40% CSF(V/V), b. 含 0.3% 血清+9% CSF(V/V), c. 含 0.3% 血清 (V/V)
 抗体胶: 含兔抗人血清蛋白抗体 3% (V/V)。

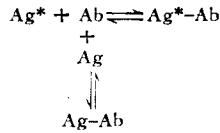
综上所述,免疫电泳分析操作简单,容易掌握,不需要特殊仪器设备,具有高度特异性、高分辨力和灵敏度。虽然这类方法需制备抗血清,抗血清用量也较大,方法的稳定性稍差和难标准化,但它在生物科学、医学等理论研究及实际应用中,仍是一类重要的蛋白质定性和定量的分析方法。

三、放射免疫测定法

1959年 Berson 及 Yalow^[22,23] 在研究胰岛素免疫特性的基础上,利用标记与未标记抗原与一定量抗体竞争性结合的原理,创立了放射免疫测定法。用这种方法能测定 10^{-9} — 10^{-12} 克/毫升水平的蛋白质及多肽。放射免疫测定法具有专一性强、灵敏度高、标本用量少、方法简便、可成批大量测定等优点,为多肽、蛋白质的超微量测定开辟了广阔道路,极大地推动了多肽、蛋白质激素的理论研究与实际应用。放射免疫是定量分析方法发展史上的一个重要里程碑^[24]。目前认为,凡具有抗原性及半抗原性的物质都可用这种方法测定。

1. 基本原理

定量抗体 (Ab) 加入过量非标记抗原 (Ag) 及标记抗原 (Ag*) 中,这两种抗原即按质量作用定律定量地竞争性与抗体结合,形成抗原-抗体复合物 (Ag-Ab 及 Ag*-Ab)。



此反应是可逆的。当 Ag^* 和 Ab 的量保持相对恒定, 则 Ag^*-Ab 复合物的生成量受 Ag 量的制约。若待测 Ag 量少则 Ag^*-Ab 复合物生成量多; 反之, 若 Ag 量多, 则 Ag^*-Ab 复合物生成量少; 即 Ag^*-Ab 复合物的生成量与 Ag 量呈一定函数关系(图 6)。 Ag^*-Ab 复合物可借不同方法从上述反应系统中分离出来定量测定。根据在各种不同浓度标准抗原下所形成 Ag^*-Ab 复合物量的多少绘出标准曲线, 从而测出未知抗原的含量。

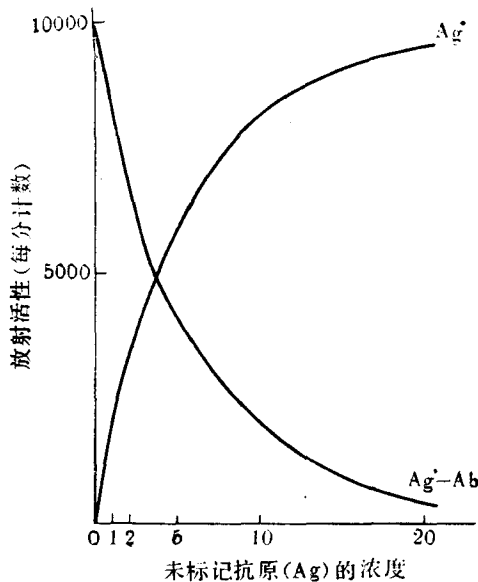


图 6 标准曲线

未标记抗原 (Ag) 浓度增加, 引起 Ag^*-Ab 复合物下降, 游离标记抗原 Ag^* 增加。

2. 基本方法^[24-26]

放射免疫测定必需具备以下三个基本条件。

(1) **抗原的纯化和标记** 制备高纯度的抗原是放射免疫测定的重要条件。一般抗原纯度不应低于 90%。从生物组织或体液中提取的蛋白质或多肽(分子量 >5000 者)抗原性强, 但不易得到高纯度制品。近年来国外已用人工合成法制备高纯度抗原。ACTH、 α -MSH、 β -MSH、加压素、催产素、血管紧张素 I 及 II、降钙素及胰泌素均已人工合成。类固醇、小肽、核苷酸、前列腺素、维生素、药物等低分子物质本身不具抗原性, 需与蛋白质或聚合多肽共价结合才具有免疫原性。

标记抗原的质量是放射免疫测定的关键。供标记抗原用的同位素有 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 及 ^{14}C 。类固醇、前列腺素等用 ^3H 及 ^{14}C 标记。绝大多数多肽及蛋白质均含酪氨酸, 因此常用 ^{125}I 或 ^{131}I 标记。放射性同位素碘较 ^3H 及 ^{14}C 比放射活性高。据 Midgley^[29] 计算, 每个蛋白质分子标上两个原子的同位素, 其比放射活性(居里/毫克分子) ^3H 标记的为 58.4,

^{125}I 为 4340, ^{131}I 为 32400。由于第一, ^{125}I 的 γ 辐射较 ^{131}I 低, 又没有 β 辐射, 因而 ^{125}I 标记抗原损伤较 ^{131}I 的少; 第二, ^{125}I 的半衰期 (60 天) 较 ^{131}I 的 (8 天) 长; 第三, ^{125}I 的丰度较高, 在 95% 以上; 第四, 计数效率较高, 因此常用 ^{125}I 标记。

标记碘常用氯胺 T 法^[30]。为减少氯胺 T 对标记蛋白质的损伤 (如使 SH 基氧化), 加入氯胺 T 的量及反应时间均应限制。亦可采用乳过氧化物酶标记法。此法标记条件缓和、可减少蛋白质损伤, 提高标记率。

抗原标记后应立即纯化。常用的方法有纤维素柱^[23]及滑石粉^[33]吸附法、离子交换树脂法^[34]、凝胶过滤法^[30]、电泳法^[25]及透析法等。

(2) 抗体的制备 放射免疫测定除需标记抗原外, 还需专一性强、与抗原亲和力高和效价高的抗血清。这是放射免疫测定的另一关键。放射免疫测定的特异性及灵敏度均直接与抗体的质量有关。

放射免疫测定用的抗血清事先应进行鉴定。采用不同稀释度抗血清与标记抗原进行结合反应, 根据结合率可绘出抗血清稀释曲线 (图 7)。对抗原亲和力高的抗血清, 其稀释曲线应呈 S 型。曲线上部由于抗血清稀释度小, 抗体量多, 所有标记抗原均被结合, 因而较平坦; 曲线下部由于抗血清稀释度大, 抗体量极少, 标记抗原几乎不被结合。应选择与标记抗原 20—70% 结合时曲线较陡部分的稀释度作放免测定用。此时抗体的浓度不足以结合所有标记抗原, 容许标记与未标记抗原与抗体发生竞争性结合反应。

抗血清对抗原的亲和力是影响放射免疫测定灵敏度的重要因素。特别在测定浓度较低 (微微克/毫升) 抗原时更需选用高亲和力的抗血清。抗体稀释曲线的陡度可作为判断抗血清亲和力大小的依据。曲线陡度愈大, 抗血清的亲和力愈高; 曲线愈平坦, 则亲和力

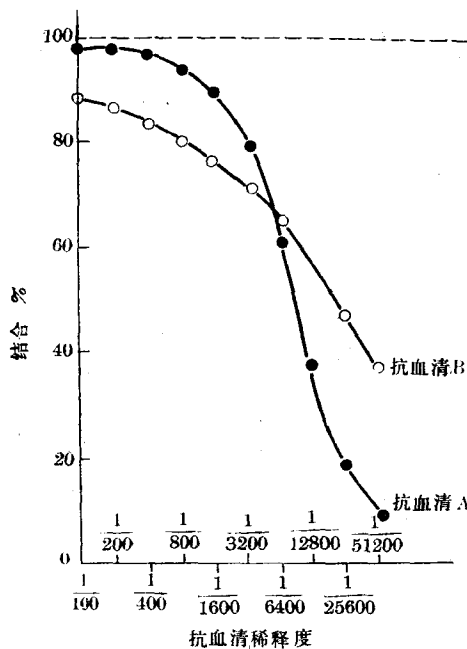


图 7 未加标记抗原时抗血清的稀释曲线

抗血清 A: 曲线呈 S 型, 下降陡度明显, 表示该抗血清对抗原 (Ag^*) 具较高的亲和力。
 抗血清 B: 曲线较平坦, 表示该抗血清对抗原具较低的亲和力。

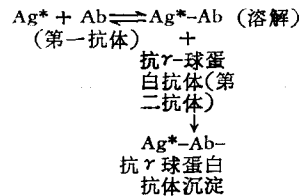
愈低^[25,26]。

抗血清的特异性是决定放射免疫测定特异性的关键。较好的抗血清只对一种专一的抗原发生结合反应,而不应或极少与其他抗原发生交叉反应。

(3) 结合 (B) 及游离 (F) 标记抗原的分离 这是放射免疫测定的另一不可缺少的步骤。分离方法很多,常用的有以下几种类型。

(i) 吸附游离抗原的分离法: 活性炭、滑石粉及某些离子交换树脂能吸附游离抗原,不能吸附结合抗原。本法主要用于分离分子量较小的多肽及蛋白质抗原。TSH、FSH、LH 及某些酶蛋白,分子量较大,不能被吸附因而不能用这种方法分离。使用较多的有活性炭-右旋糖酐法^[35],滑石粉法^[36]及阴离子交换树脂法^[37]等。

(ii) 除去结合抗原的分离法: 应用最多的是双抗体法,又称免疫沉淀法。放射免疫系统中生成的 Ag^*-Ab 复合物是可溶性的。用抗体 (Ab , 第一抗体)再免疫另一种动物产生第二抗体。第二抗体能与第一抗体及其 Ag^*-Ab 复合物共沉淀,从而达到其与游离抗原分离的目的。在实际应用中,



常用某种动物的 γ -球蛋白为第一抗体免疫另一种动物制备第二抗体 (抗 γ -球蛋白抗体)。双抗体法分离效果良好,不受反应液体积的影响,很少夹带游离抗原。其主要缺点是易受其他蛋白质干扰,其次是抗体用量较大。

此外还有盐析法^[25]、有机溶剂沉淀法^[25] (如 80% 乙醇、二氧杂环己烷 (dioxan)^[39]、12.5% 聚乙烯醇^[40])沉淀 Ag^*-Ab 复合物作胰岛素、ACTH、TSH 等的测定。这些方法对盐或有机溶剂的浓度要求严格。浓度过低, Ag^*-Ab 复合物沉淀不全;浓度过高可引起游离抗原共沉淀。

(iii) 固相法: 用物理或化学方法将抗体结合在固相物质上,与抗原反应后 Ag^*-Ab 复合物即被吸附在固相物上,而游离抗原 (Ag^*) 仍留在反应液中,通过离心或洗涤即可将二者分开。这类方法称为固相法。

固相法于 1966 年首先由 Catt^[41] 提出。抗体结合在固相物质上的方法有两种: 第一,物理涂敷法^[41]。在 pH9.0—10.0 的碳酸盐缓冲液中,抗体能较牢固地吸附在聚乙烯、聚苯乙烯或聚丙烯管的内壁上。抗体的涂敷可按以下步骤进行。用 0.1M pH9.0—10.0 碳酸钠-碳酸缓冲液稀释抗血清(1/5000—1/50,000)。取 0.5—5.0 毫升稀释抗血清入各小塑料管中,在室温下放置 12—16 小时后,吸出抗血清,用生理盐水及保温液洗去未被吸附的抗体。涂敷抗体试管可在 4℃ 或 -20℃ 储存数月。第二,化学结合法^[42]。用化学方法,通过共价键将抗体结合在固相载体上。其优点为结合牢固,不因 pH 及离子强度的改变而分解。常用的固相载体有葡聚糖凝胶、琼脂糖凝胶、纤维素及聚丙烯酰胺凝胶等。固相载体需经偶联剂活化才能与抗体结合。戊二醛可使聚丙烯酰胺凝胶的酰胺基与抗体的氨基形成稳定的共价键。溴化氰可活化多糖类载体的羟基使之与抗体的氨基相连。

由于抗体结合在固相载体上,因而简化了游离与结合抗原的分离程序,缩短了反应时间,使固相法成为一种简易、快速、很有发展前途的放射免疫测定法,已广泛应用于多种蛋白质的测定。

(iv) 电泳法^[23]: 由于结合与游离抗原在电场中的迁移率不同,因而利用电泳方法可将二者分开。作为电泳支持物有纸、醋酸纤维膜、琼脂糖凝胶及聚丙烯酰胺凝胶等,已用于胰岛素、生长素等的测定。

还有用凝胶过滤法分离的,但操作繁杂,实际应用较少。

3. 放射免疫测定法在蛋白质定量分析上的应用^[24-28]

放射免疫测定法除用于蛋白质测定以外,已应用于类固醇、活性肽、维生素、核苷酸、前列腺素以及药物等非蛋白质类物质的测定^[24-28]。就蛋白质而言,除激素蛋白质外,还可应用于酶、血浆蛋白质、免疫球蛋白、特异性抗体蛋白、特异性抗原、毒素蛋白以及其他蛋白质。截至目前为止,测定的生理活性物质估计至少有 300 种以上,而且还在不断扩大。现将放射免疫测定技术在蛋白质定量上的应用情况列于表 1。

表 1 放射免疫测定法在多肽及蛋白质测定上的应用^[24-28,41-45]

分类	已用放射免疫测定的项目
激素: 下丘脑 垂体 甲状腺 甲状旁腺 胰腺 胃肠道 胎盘 肾脏 血管活性肽 其他	TRH, LRH, GRH, P 物质 GH, ACTH, TSH, FSH, LH, α -MSH, β -MSH, ADH, 催乳素, 催产素, 神经垂体系 (Neurophysin), 脂解素, 松弛素(relaxin) 降钙素 甲状旁腺素 胰岛素, 胰岛素原, C-肽, 胰多肽, 胰高血糖素, GRH 胃泌素, 胰泌素, 肠抑胃素, 舒血管肠肽, 肠高血糖素, 胃动素, 缩胆促胰素, 胃泌素四肽 HCG, HCG- β 亚基, HPL, HCS. 肾素, 红细胞生成刺激素 缓激肽, 血管紧张素 I 及 II. 表皮生长因子, 7S 神经生长因子, 生长素介质-C
酶	胃蛋白酶, 胰蛋白酶, 糜蛋白酶, C-酯酶, 羧肽酶 A, 凝血酶原, 凝乳酶, 凝乳酶原, 碳酸酐酶 I 及 II, 果糖 1,6-二磷酸酶, 胶原酶, 胰凝乳酶, 胰凝乳酶原, 多巴脱羧酶, 多巴羟化酶, 碱性磷酸酶, 胶原脯氨酸羟化酶, 淀粉酶, 乳酸脱氢酶, 磷酸肌酸激酶, 胞浆素, 胞浆素原等
血浆蛋白质	清蛋白, 纤维蛋白, 纤维蛋白原, 肌红蛋白, 铁蛋白, 甲状腺素结合球蛋白, 皮质激素结合蛋白, IgA, IgG, IgE, IgD, IgM, 本周蛋白, 载脂蛋白 AI, AII, 载脂蛋白 C _I , C _{II} , C _{III} , 备解素, 反应素, Rh 因子, 白细胞趋化因子, 补体。
抗体	抗 RhoD 球蛋白, 抗甲状腺球蛋白, 抗反应素抗体, 抗 Rh 抗体, 抗 DNA 抗体, 抗血友病因子, 抗地高辛抗体, 溴抗体, 抗真球类病毒抗体, 抗百日咳免疫球蛋白, IgE 抗体, 风湿因子, 链球菌抗体
抗原	乙型肝炎相关抗原, 甲型肝炎相关抗原, 过敏原, 草履虫表面抗原, 牛痘抗原, 热稳定肾上腺特异抗原, 人组织相关抗原, 血吸虫抗原, 葡萄球菌肠毒素 B, 肿瘤病毒特异抗原, 甲胎蛋白, 癌胚抗原, 哺乳动物 C 型病毒蛋白, 异位激素
其他蛋白质	β_2 -微球蛋白, 胶原蛋白, 蛇毒, β -血栓球蛋白, 糖蛋白, 人脑 100S 蛋白, 核蛋白体微粒, 唾液素等。

四、酶连接免疫吸附测定法

由于放射免疫测定法试剂较贵,某些同位素的半衰期短,需要复杂的设备来判读结果,在运送和操作过程中还必须有特殊的防护措施等问题,因此放射免疫测定法通常都在设备条件较好的实验中心进行。

酶免疫测定法,避免了放射免疫测定法的缺点。酶标记的试剂价廉、高度稳定、半衰期长;酶免疫测定法的灵敏度接近或稍低于放射免疫测定法,在结果的判读上可用肉眼观察或使用较简单的设备就可获得比较客观的结果。

酶免疫测定法是建立在抗原或抗体可以与酶连接,所形成的结合物既保留了免疫学的活性,又保留了酶的活性的基础上。这一设想首先为Avrameas^[46]和Nakane^[47]等的化学性结合工作所证实。其后Sternberger^[48]更证实酶与抗酶的抗体的结合也完全可能。

在酶免疫测定法中,早年的作者感兴趣的是肉眼测定和抗原定位。以后Nakane提出间接酶免疫法测定抗体,其原理与间接免疫荧光技术极其相似。Sternberger等首先用间接法定量地测定抗体水平。

酶免疫测定法发展的第二阶段是将可溶性抗原或抗体连接到不溶性的固相物质上,这一方法就是目前称为“酶连接免疫吸附测定法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay,简称ELISA)”的基础。Engvall^[49~51]、Van Weemen和Schuurs^[52,53]是ELISA的最初几位作者,目前ELISA已应用到检测可溶性蛋白质抗原和抗体各个方面。

关于ELISA的原理和应用,国内外文献里已有多篇综述^[54~62]。1978年我国卫生部与世界卫生组织在北京、上海两地联合举办了二期酶连接免疫吸附测定法的短训班,ELISA这一新技术已在国内许多单位相继建立^[63,64]。下面再就其原理、应用及一些进展作一复习。

1. ELISA 的原理

ELISA有多种试验方法。常用的有测定抗体的间接法、测定抗原的双抗体夹心法、竞争法以及测定IgM的新近建立的反向间接法等。分述如下:

(1) 间接法(图8) 本法用以测定抗体,按下述步骤进行。

- (i) 将有关抗原吸附到固相物质上,然后洗涤。
- (ii) 加入待测的试验血清,孵育,然后洗涤。
- (iii) 加入酶标记的抗球蛋白,使之反应,再洗涤。
- (iv) 加入酶的底物。底物降解导致颜色改变。颜色改变的程度和速度与第(ii)步试验血清中抗体的含量成比例。

(2) 双抗体夹心法(图9) 本法用以测定抗原,按下述步骤进行。

- (i) 将含有特异性抗体的免疫球蛋白或纯化的特异抗体(针对待测的抗原)吸附到固相物上,然后洗涤。
- (ii) 将疑为含有特异性抗原的待检试验溶液与致敏的固相物一起孵育,然后洗涤。
- (iii) 将固相物再与酶标记的特异抗体一起孵育,然后洗涤。
- (iv) 加入酶的底物。颜色改变与第(ii)步加入的试验溶液中抗原含量成比例。