

酶 免 疫 测 定 技 术

杨利国 胡少昶 魏平华 郭爱珍 编著



南 京 大 学 出 版 社

酶免疫 测定技术

陈树强 潘永强 曹宇峰 张世斌 编著



科学出版社 北京

酶免疫测定技术

杨利国 胡少昶 编著
魏平华 郭爱珍

南京大学出版社

1998·南京

内 容 提 要

本书共分十章,系统地介绍了酶免疫测定技术的基本原理和操作方法。主要内容有酶免疫测定方法的分类;酶、抗体、非免疫识别物质及其偶联物的制备、纯化和质量评定;抗原-抗体反应的动力学和固相化;各种方法的原理、操作步骤和注意事项;酶免疫测定的数据处理和结果表达以及质量控制与常见错误分析,并附有关参数与试剂配制方法等。

本书介绍的酶免疫测定方法可用于检测生物体内各种微量有机物质(包括半抗原、抗原及其抗体),适用于从事妇产科学、微生物学、病毒学、内分泌学、药理学、药理学、生理学、生物化学、动物学、植物学、畜牧学、兽医学等生物科学工作的科研、教学、生产与临床以及实验室工作人员参考。

酶 免 疫 测 定 技 术

杨利国 胡少昶 编著

魏平华 郭爱珍

责任编辑 荣翠琴

*

南京大学出版社出版

(南京大学校内 邮政编码:210093)

江苏省新华书店发行 中国人民解放军通信工程兵学院印刷厂印刷

*

开本 850×1168 1/32 印张 16.5 字数 412 千

1998年7月第1版 1998年7月南京第1次印刷

印数 1-2000册

ISBN 7-305-03062-7/Q·26

定价 38.50 元

(南大版图书若有印、装错误可向承印厂退换)

前 言

EIA 是继 RIA 之后发展起来的新技术。RIA 技术在生物科学实验分析技术领域具有划时代的意义,为生物科学的研究和发展提供了“核武器”,以致其发明者在 70 年代曾荣获世界著名的诺贝尔奖。然而科学技术是在不断发展的,RIA 也不例外,有其局限性。EIA 技术正是在 RIA 技术的发展过程中取其精华、去其糟粕而诞生并逐渐成长起来的。

在建立 EIA 方法之前,我们曾从事过动物生殖激素的 RIA 工作,因此,对 RIA 技术有较深刻的体会。第一,国内用于建立 RIA 方法常用的放射性同位素只有 ^3H 和 ^{125}I 两种。用 ^3H 作标记物所建立的方法灵敏度和重复性不甚理想,用 ^{125}I 作标记时,不仅标记物的保存时间不长,而且受放射性碘源质量的限制,此外,还要求有严格的放射防护设备和专用实验室。第二,进行 RIA 工作时,放射废物的处理是一项令人头疼的事情,常常受环境保护条例的约束。第三,RIA 技术在医学临床和畜牧生产以及其他行业中的推广应用,尚未取得突破性进展。鉴于以上原因,我们从 1984 年开始,对非放射性同位素标记技术产生了浓厚的兴趣。

1985 年 8 月,学校给了我们去泰国参加“第二届国际家畜繁殖与保健酶免疫测定技术培训班”的机会。回国后,又得到农业部和学校的大力支持和资助。从那以后,便与 EIA 技术结下了“不解之缘”。

由于校、系领导的关怀和兄弟院校的支持以及本教研室同仁的帮助,在较短的时间内我们成功地建立了半抗原 EIA 方法,以后又陆续建立了蛋白质和肽类激素的 EIA 方法。鉴于国内对 EIA 技术的兴趣越来越高,我们从 1987 年开始,在全国农业院校

范围内先后举办了三次 EIA 技术培训班,还专为研究生开设了“EIA 技术原理和方法”课程。1991 年下半年在德国国家畜繁殖与行为研究所内分泌研究室进行合作科研期间,有幸请教了具有丰富 EIA 技术实践经验的 Elsaesser 博士,并与他一道建立了抑制素和猪生长激素 EIA 方法。

在数年的教学和科研实践中体会到,EIA 技术涉及的基础学科的确较广,如免疫学、生物化学、有机化学、无机化学和各专业学科等。从事专业研究和临床或生产应用的人员进行 EIA 工作时,若要从这些基础学科中查找与 EIA 有关的资料,并非易事。因此在本书中,我们根据十余年的实践经验,除了系统介绍 EIA 技术的原理、方法和某些方法的操作步骤外,还比较详细地介绍了与 EIA 技术有关的生物化学、免疫学和酶学等领域内的基础知识。同时还从实用角度,详细介绍了与 EIA 技术有关的某些技术的操作步骤,并在附录中例举了某些常用制剂的性质和配制方法,以及 EIA 常用缩略语和有关换算公式等内容。其目的,一是想启发读者在掌握 EIA 技术及其有关技术原理的基础上,自己设计新方法。二是为那些急于建立并应用 EIA 技术的人员提供参考实例,以便他们在较短的时间内就能运用或建立 EIA 方法。诚然,这仅是一厢情愿,实际效果如何,还请读者评论。书中错误之处,万望读者来函指正。

本书初稿经本校周燮教授审阅,特此致谢。

杨利国

南京农业大学动物科技学院

1997 年 8 月

目 次

第一章 概论

第一节 EIA 技术基本原理	(1)
----------------	-----

第二节 EIA 研究历史和发展动态	(2)
-------------------	-----

第三节 EIA 技术的优缺点	(7)
----------------	-----

一、EIA 技术的优越性	(7)
--------------	-----

(一) 灵敏度高	(8)
----------	-----

(二) 特异性强	(8)
----------	-----

(三) 对仪器设备要求不高,测定成本低	(8)
---------------------	-----

(四) 方法快速、简便	(8)
-------------	-----

(五) 试剂保存时间较长	(9)
--------------	-----

(六) 自动化程度高	(9)
------------	-----

(七) 方法种类多	(9)
-----------	-----

(八) 无放射性同位素污染	(9)
---------------	-----

二、EIA 技术的潜在危害性	(10)
----------------	------

(一) 准备建立 EIA 方法时可能遇到的危险	(10)
-------------------------	------

(二) EIA 操作过程中的危害性	(10)
-------------------	------

第四节 EIA 技术在生物科学中的应用前景	(12)
-----------------------	------

一、在医学与兽医学领域的应用前景	(12)
------------------	------

(一) 疾病诊断	(12)
----------	------

(二) 流行病学调查	(13)
------------	------

(三) 妊娠诊断	(13)
----------	------

(四) 排卵期预测	(13)
-----------	------

二、在畜牧学科中的应用前景	(13)
---------------	------

(一) 灵敏度	(28)
(二) 特异性	(29)
(三) 准确性	(29)
(四) 操作速度和简便性	(29)
第二节 根据抗原 - 抗体反应动力学分类	(30)
一、竞争性 EIA	(30)
二、非竞争性 EIA	(31)
第三节 根据抗原和抗体在反应体系中的存在方式分类	(31)
一、固相 EIA 方法	(31)
✓(一) ELISA 法	(32)
(二) DASS 法	(32)
二、液相 EIA 方法	(33)
(一) 双抗体法	(33)
(二) HEIA 法	(34)
第四节 根据反应体系与检测体系之间的关系分类	(34)
一、直接法	(36)
二、间接法	(36)
第五节 建立 EIA 方法应具备的条件	(36)
一、基本条件	(37)
(一) 免疫原	(37)
(二) 标准品	(37)
(三) 抗体	(38)
(四) 分离技术	(38)
(五) 酶标记物	(38)
(六) 酶底物系统	(38)
(七) 检测酶活性的仪器	(39)
(八) 加样器及其他设备	(39)

(九) 缓冲液	(39)
二、自动化操作条件	(39)
(一) 自动加样设备	(40)
(二) 自动清洗仪	(40)
(三) 自动读数器	(40)
主要参考文献	(40)
第三章 酶与底物系统	(42)
第一节 酶促反应基本原理	(42)
一、酶的催化特性	(43)
二、单底物酶的催化特性	(44)
三、复合底物酶促反应的动力学	(47)
四、米-曼氏常数的测定方法	(48)
五、酶活性的抑制	(52)
第二节 影响酶促反应的因素	(54)
一、温度	(54)
二、溶液 pH	(55)
三、缓冲液成分和离子强度	(56)
四、固相载体	(56)
第三节 酶活性测定	(60)
一、酶活性与纯度的关系	(60)
二、配对酶的活性测定	(61)
三、循环酶系统中酶活力的测定	(62)
四、酶活性的光度测定	(63)
第四节 EIA 中常用的酶及其底物系统	(64)
一、用于 AA 型 EIA 中的酶	(67)
(一) 辣根过氧化物酶	(67)
(二) β -半乳糖苷酶	(85)
(三) 碱性磷酸酶	(88)

(四) 葡萄糖氧化酶(GO 酶)	(95)
(五) 脲酶	(99)
二、用于活性调节 EIA 方法中的酶	(101)
(一) 溶菌酶	(101)
(二) 苹果酸脱氢酶	(105)
(三) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(GPD 酶)	(107)
(四) 核糖核酸酶(RNA 酶)	(110)
主要参考文献	(110)
第四章 抗体理化特性和制备方法	(114)
第一节 抗体的性质	(114)
一、抗体的概念和分类	(114)
(一) 抗体的概念	(114)
(二) 抗体的分类	(114)
二、抗体的化学性质和基本结构	(117)
三、哺乳动物的抗体	(121)
四、禽类抗体	(122)
第二节 抗体形成的基本原理	(123)
一、产生抗体的细胞	(124)
二、抗体的产生及其一般规律	(126)
三、抗体生成的调节和免疫耐受	(128)
(一) 免疫调节	(128)
(二) 免疫耐受	(130)
第三节 多克隆抗体的制备	(131)
一、制备多克隆抗体的条件	(131)
(一) 免疫原	(131)
(二) 佐剂	(133)
(三) 用于免疫的动物	(133)
二、免疫操作程序	(134)

(一) 免疫原与佐剂的乳化	(135)
(二) 注射乳化液的方法(初次免疫)	(136)
(三) 加强免疫	(137)
(四) 血液收集	(137)
第四节 单克隆抗体的制备	(139)
一、单克隆抗体的生产原理	(141)
二、制备单克隆抗体的操作流程	(143)
(一) 免疫动物和骨髓瘤细胞系的选择	(143)
(二) 脾脏细胞和饲养细胞的制备	(147)
(三) 融合和融合剂	(149)
(四) 杂交瘤细胞的筛选与选择培养基的配制	(150)
(五) 抗体检测	(153)
(六) 杂交瘤细胞的克隆化	(153)
(七) 单克隆抗体的生产	(156)
(八) 杂交瘤细胞的冷冻保存	(156)
(九) 体外免疫法制备单克隆抗体	(157)
第五节 IgG 的分离和 F _{ab} 片段的制备	(157)
一、多克隆抗血清中免疫球蛋白的分离	(158)
(一) 污染蛋白质的选择性沉淀	(158)
(二) 盐析	(159)
(三) 离子交换层析法	(162)
(四) 亲和层析法提纯 IgG	(167)
二、从卵黄中分离 IgY	(176)
三、单克隆抗体的纯化	(176)
四、免疫球蛋白的纯度和质量鉴定	(177)
五、F _{ab} 片段的制备和纯化	(177)
(一) 水解蛋白质的常用方法	(178)
(二) F _{ab} 片段和 F _{ab'} 片段的纯化	(180)

第六节 抗体的半抗原化	(181)
一、抗体半抗原化的原理	(181)
二、抗体半抗原化的方法	(183)
主要参考文献	(186)
第五章 两种物质的偶联	(189)
第一节 偶联的基本原理	(189)
一、偶联方法简介	(189)
二、偶联条件的选择	(191)
(一) 被偶联的两种物质的浓度及其相对比率	(191)
(二) 偶联剂的选择	(196)
(三) 缓冲液的选择	(197)
第二节 两种大分子物质的偶联	(198)
一、化学偶联	(198)
(一) 戊二醛法	(199)
(二) 过碘酸钠法	(204)
(三) 对苯醌法	(211)
(四) 邻苯二甲酰亚胺法(OPDM 法)	(213)
(五) BSNHS 法	(220)
(六) TDIC 法	(221)
(七) FNPS 法	(223)
(八) CDI 法	(224)
(九) NHS 法	(225)
(十) NHS-FBA 法	(230)
(十一) SPDP 法	(232)
二、免疫学偶联	(233)
(一) 各种抗体的制备	(235)
(二) 免疫复合物的制备	(236)

(三) 免疫复合物中酶与抗体克分子比例的计算 ...	(238)
三、化学-生物学偶联	(239)
第三节 大分子与小分子的偶联	(242)
一、建立偶联方法的基本要求	(243)
(一) 载体蛋白和半抗原分子中反应基团的选择 ...	(243)
(二) 偶联剂的选择	(246)
(三) 偶联条件的选择	(247)
(四) 蛋白质分子中的基团数及其估算方法	(251)
(五) 半抗原与蛋白质偶联比率的确 定	(252)
二、各种半抗原与蛋白质的偶联	(253)
(一) 分子中含羧基或可羧化的半抗原的偶联	(253)
(二) 含氨基或可还原硝基半抗原的偶联	(256)
(三) 含巯基半抗原的偶联	(257)
(四) 含羟基半抗原的偶联	(258)
(五) 含醛基或酮基半抗原的偶联	(260)
(六) 其他半抗原的偶联	(260)
第四节 偶联物的纯化和保存	(263)
一、偶联物的纯化原理	(263)
(一) 离心法	(264)
(二) 透析法	(264)
(三) 层析法	(265)
二、偶联物的保存原理	(266)
三、大分子-大分子偶联物的纯化和保存	(268)
(一) 过氧化物酶-IgG 的纯化和保存	(268)
(二) 其他酶标记物的纯化和保存	(269)
四、半抗原-大分子偶联物的纯化和保存	(270)
第五节 偶联物的质量评定	(271)
一、浓度测定	(271)

(一) 紫外吸收法	(272)
(二) 双缩脲法	(274)
(三) Folin-酚法	(274)
(四) 微量凯氏定氮法	(275)
(五) 染料结合法	(275)
(六) 荧光法	(276)
二、纯度鉴定和结构分析	(276)
三、偶联物中两种分子偶联比率的估算	(279)
(一) 分光光度法	(279)
(二) 同位素示踪法	(283)
(三) 根据偶联物的分子量估算偶联比率	(284)
(四) 其他方法	(284)
四、酶标记物中酶活性和免疫活性的测定	(284)
主要参考文献	(286)
第六章 用于EIA的非免疫识别物质	(292)
第一节 亲和素/生物素系统	(292)
一、亲和素化学本质及理化特性	(292)
二、亲和素的提取和纯化	(294)
(一) 从蛋清中提取	(294)
(二) 从阿维丁链球菌中提取	(295)
三、亲和素和生物素的含量测定	(295)
四、生物素的活化	(296)
(一) 生物素-对硝基苯酯的合成	(296)
(二) 生物素-N-羟基琥珀酰亚胺酯的合成	(298)
(三) 己酰胺基-BNHS酯的合成	(299)
(四) 生物素-重氮苯胺的合成	(300)
(五) 生物素-酰肼的制备	(301)
(六) 生物素-溴乙酰肼的合成	(301)

五、生物素与蛋白质的偶联	(301)
第二节 葡萄球菌 A 蛋白	(302)
一、基本特性	(303)
(一) SPA 的理化特性	(303)
(二) SPA 的生物活性	(304)
二、SPA 的提取和纯化	(306)
(一) 菌种	(306)
(二) 细菌的培养	(307)
(三) SPA 的提取	(308)
(四) SPA 的纯化与纯度鉴定	(309)
三、含 SPA 葡萄球菌的固相化方法	(309)
(一) TCA 热固定法	(310)
(二) 福尔马林固定法	(310)
四、SPA 与蛋白质(酶)的偶联方法	(310)
(一) SPDP 法	(311)
(二) 过碘酸钠法	(311)
五、葡萄球菌 G 蛋白	(312)
(一) 基本特性	(312)
(二) SPG 与各种动物 IgG 的结合能力	(312)
第三节 凝集素	(312)
一、凝集素的基本特性	(312)
二、ConA 的提取和纯化	(315)
三、凝集素酶标记物的制备	(316)
第四节 胶固素	(316)
一、胶固素和补体的理化特性和生物学特性	(317)
二、胶固素的提取和纯化	(318)
(一) 酵母菌体悬液的制备	(318)
(二) 胶固素的提取	(318)

(三) 胶固素的纯化	(319)
三、胶固素纯度鉴定和活性测定	(319)
(一) 纯度鉴定	(319)
(二) 活性测定	(319)
四、胶固素酶标记物的制备	(320)
主要参考文献	(320)
第七章 抗原抗体反应动力学和固相化	(323)
第一节 抗原抗体反应动力学	(323)
一、抗原抗体反应的理化特性	(323)
二、影响抗原-抗体复合物稳定性的因素	(325)
三、抗体 EIA 最适工作浓度、滴度和亲和常数测定	(326)
四、抗原-抗体作用动力学	(332)
五、亲合力的概念及其在 EIA 中的意义	(333)
六、免疫测定中的交叉反应性、特异性和多特异性	(337)
七、酶免疫测定的免疫反应动力学	(340)
(一) AM 型酶免疫测定的动力学	(340)
(二) AA 型酶免疫测定的动力学	(344)
第二节 免疫反应物和非免疫识别物的固相化	(348)
一、固相化的基本原理	(349)
(一) 物理吸附	(349)
(二) 化学偶联	(349)
二、塑料固相载体的特性和使用	(350)
(一) 蛋白质与塑料的相互作用	(351)
(二) 抗原与塑料的非共价吸附	(354)
(三) 抗体或抗原在塑料上的共价连接	(357)
(四) 用桥分子将抗原或抗体连接到塑料载体上	(360)
(五) 半抗原的固相化	(362)