

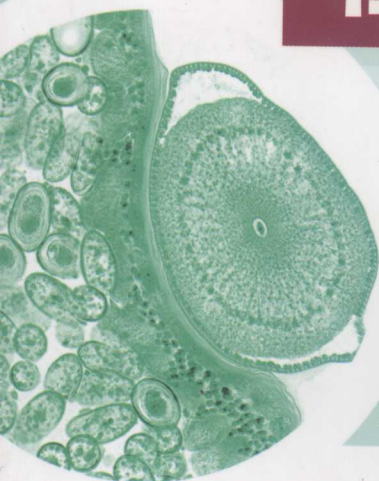
临床检验操作技术系列丛书

LINCHUANG JIANYAN CAOZUO
JISHU XILIE CONGSHU

陈占良 丑广程/主编

免疫学

检验分册



M IANYIXUE JIANYAN
FENCE

 军事医学科学出版社

· 临床检验操作技术系列丛书 ·

免疫学检验分册

主 编 陈占良 丑广程

副主编 王玉红 赵彦琴 车虎森

陈 浩

军事医学科学出版社

· 北 京 ·

图书在版编目(CIP)数据

临床检验操作技术系列丛书——免疫学检验分册/陈占良,丑广程主编.

—北京:军事医学科学出版社,2006.9

ISBN 978-7-80121-886-5

I. 临… II. ①陈… ②丑… III. ①临床医学-医学检验-手册

②免疫学-医学检验-手册 IV. R446.1-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 105005 号

出版:军事医学科学出版社

地址:北京市海淀区太平路 27 号

邮编:100850

联系电话:发行部:(010)63801284

63800294

编辑部:(010)66884418,66884402 转 6213,6216,6315

传真:(010)63801284

网址:<http://www.mmsp.cn>

印装:廊坊市金盛源印务有限公司

发行:新华书店

开本:850mm×1168mm 1/32

印张:11.125

字数:285 千字

版次:2007 年 4 月第 1 版

印次:2007 年 4 月第 1 次

定价:22.00 元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换

内 容 提 要

本书共分七章,全面细致地阐述了目前临床免疫学检验实用技术和方法的检测原理、试剂、标本采集、操作步骤、临床意义和注意事项等。对检验医学工作者进一步掌握临床免疫学检验的基础知识和基本技能,具有较大的参考价值。

《临床检验操作技术系列丛书》编委会

总 主 编 宋卫青

副总主编 (以姓氏笔画为序)

于修文 于维林 丑广程

朱召明 孙明强 李世荣

李 慧 吴振军 辛苏宁

陈占良 施俊英 赵 超

徐 力 梁 冰 梁淑新

《临床检验操作技术系列丛书》

总前言

临床检验医学目前正以日新月异的速度飞快发展,新技术、新方法、新仪器不断推出。各医疗卫生单位的医学检验部门在疾病的诊疗方面发挥着举足轻重的作用,特别是电子计算机技术及生物医学工程技术的发展与应用,更促进了许多新的医学检验项目的应运而生,而大量的检验数据的复杂处理也带动了医学检验信息管理系统的发展与运用,从而将检验医学推向了一个新的阶段。

为了进一步推进各医疗单位的医学检验技术的发展,规范临床检验操作,提高各医疗单位对临床医学实验室的管理水平,使各级各类临床实验室实现又好又快的发展,我们组织专家编写了《临床检验操作技术系列丛书》,本书包括七个分册,分别为质量管理、体液与脱落细胞检验、微生物学检验、生物化学检验、血液学检验、免疫学检验、分子生物学检验与新技术分册。各分册的内容均以比较成熟并得到公认的临床检验技术为主,同时增加了许多新的方法和技术。本丛书的编写着重于实用性与先进性兼顾,法规性与参考性并存,力求文字简明,表达准确,便于掌握。但由于篇幅较大,编著人员较多,内容与行文风格难免有不协调之处,希望各单位的检验工作者多提宝贵意见,以便再版时修正。

本丛书的编者均为从事临床一线检验工作的中青年专家,他

前 言

随着现代医学的发展,临床检验技术日新月异,新技术、新方法、新项目不断涌现,使检验项目越来越多,临床应用范围愈来愈广。为了使广大检验医学工作者进一步了解和掌握临床免疫血清学检验新方法、新进展,我们编写了此书。其中主要对近年来新的免疫学检验新方法和新技术设备的临床应用情况做了较为详尽的叙述。

本书在编写上,力求突出先进性和实用性,全面细致地阐述了目前临床免疫学检验实用技术和方法的检测原理、试剂、标本采集、操作步骤、临床意义及注意事项等。本书对检验医学工作者进一步掌握临床免疫学检验的基本知识和基本技能,提供了更大的学习空间和操作指导。

我们在编写过程中,查阅和参考了大量的文献资料,对所列检验项目,尽量做到全面、新颖。同时,由于篇幅所限,对参考文献不能一一列出,在此对编写过程中作出了贡献的广大同仁和前辈们表示深深的感谢,对本书的编辑及所有付出辛勤劳动的同志们表示深深的感谢!

由于水平所限,加之编写时间仓促,本书一定会存有疏漏和不妥之处,望广大同仁及医学界前辈们不吝批评指正。

编 者

2006 年 7 月 15 日

目 录

第一章 实用临床免疫学检验技术	(1)
第一节 酶联免疫吸附技术	(1)
第二节 经典的免疫学反应	(17)
第三节 免疫荧光抗体技术	(33)
第四节 免疫印迹和免疫斑点技术	(45)
第五节 金免疫技术与免疫金银染色	(48)
第六节 发光免疫分析技术	(54)
第七节 免疫电泳技术	(58)
第八节 临床免疫学实验室检验质量控制	(59)
第二章 非特异免疫功能检测	(73)
第一节 中性粒细胞功能测定	(74)
第二节 溶菌酶测定	(78)
第三节 C-反应蛋白测定	(80)
第四节 纤维结合蛋白测定	(83)
第五节 循环免疫复合物检测	(85)
第三章 体液免疫功能检测	(89)
第一节 免疫球蛋白含量测定	(89)
第二节 补体测定	(107)
第四章 细胞免疫功能测定	(126)
第一节 淋巴细胞亚群检测分析	(128)
第二节 T细胞花环试验	(133)
第三节 B细胞测定	(140)
第四节 移植的免疫学检查	(144)
第五节 自然杀伤细胞的免疫功能检测	(150)

第五章 自身抗体测定	(155)
第一节 非器官特异性自身抗体检测	(158)
第二节 组织器官特异性抗体检测	(196)
第六章 肿瘤标记物的免疫学检测	(248)
第一节 甲胎蛋白	(249)
第二节 癌胚抗原	(256)
第三节 癌抗原 125	(262)
第四节 癌抗原 15-3	(268)
第五节 糖链抗原 19-9	(273)
第六节 前列腺特异抗原	(279)
第七节 神经元特异性烯醇化酶	(283)
第七章 感染的免疫学检测	(287)
第一节 甲型肝炎病毒的血清学检测	(287)
第二节 乙型肝炎病毒的血清学检测	(291)
第三节 丙型肝炎病毒的血清学检测	(307)
第四节 丁型肝炎病毒的血清学检测	(310)
第五节 戊型肝炎病毒的血清学检测	(315)
第六节 庚型肝炎病毒的血清学检测	(319)
第七节 人类免疫缺陷病毒抗体检测	(321)
第八节 梅毒的血清学检测	(324)
第九节 肥达外裴试验	(330)
第十节 流行性出血热抗体血清学检测	(334)
第十一节 EB 病毒抗体的血清学检测	(335)
第十二节 囊虫抗体的血清学检测	(337)
第十三节 结核菌抗体的血清学检测	(338)
第十四节 抗链球菌素“O”血清学检测	(340)
第十五节 TORCH 感染的血清学检测	(342)

第一章

实用临床免疫学检验技术

第一节 酶联免疫吸附技术

一、概 述

(一) 标记免疫技术

免疫技术是利用抗原抗体反应进行的检测方法,即应用制备好的特异性抗原或抗体作为试剂,以检测标本中的相应抗体或抗原。它的特点是具有高度的特异性和敏感性。

将试剂抗原或试剂抗体用可以微量检测的标记物(例如放射性核素、荧光素、酶等)进行标记,则在与标本中的相应抗体或抗原反应后,可以不必测定抗原抗体复合物本身,而测定复合物中的标记物,通过标记物的放大作用,进一步提高了免疫技术的敏感性。此技术称为标记免疫技术。

1. 标记免疫技术一般分为两类 一类用于组织切片或其他标本中抗原或抗体的定位。属于免疫组化技术(immuo histochemical technique)范畴。

另一类用于液体标本中抗原或抗体的测定,称为免疫测定(immuoassay)。

2. 标记免疫技术发展史 首先被用作标记免疫技术中标记物的是荧光素。

1941年 Coons 建立的荧光抗体技术(fluorescent antibody tech-

nique)使组织和细胞中抗原物质的定位成为可能。

放射性核素作为标记物在免疫技术中的应用又开创了特异性的超微量测定。

1956年 Yalow 和 Berson 建立的放射免疫测定 (radioimmunoassay, RIA) 很快普遍应用于体液中的激素、微量蛋白及药物的测定。

酶用作免疫技术标记物是从抗原定位开始的。

1966年 Nakene 和 Pierce 利用酶使底物显色的作用而得到与荧光抗体技术相似的结果。

70年代初,酶标抗体技术开始应用于免疫测定,其后得到迅速发展。

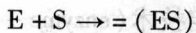
荧光抗体技术、放射免疫分析和酶免疫技术,即经典的三大标记技术。另外,化学发光免疫技术和金免疫技术等也有了很大的发展。

根据标记物是否为放射性物质分为放射性免疫测定和非放射性免疫测定两大类。

(二) 酶免疫标记技术

免疫酶技术就是将抗原和抗体的免疫反应和酶的催化反应相结合而建立的一种新技术。酶与抗体或抗原结合后,既不改变抗体或抗原的免疫学反应的特异性,也不影响酶本身的酶学活性,即在相应而合适的作用底物参与下,使基质水解而呈色,或使供氢体由无色的还原型变为有色的氧化型。这种有色产物可用肉眼、光学显微镜和电子显微镜观察,也可以用分光光度计加以测定。呈色反应显示了酶的存在,从而证明发生了相应的免疫反应。所以,这是一种特异而敏感的技术,可以在细胞或亚细胞水平上示踪抗原或抗体的所在部位,或在微克、甚至纳克水平上对其进行定量。

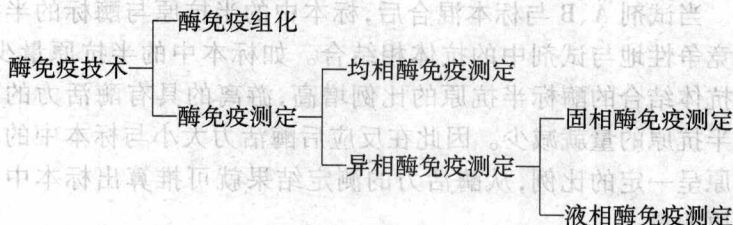
基本原理(EIA):酶是一种有机催化剂,很少量的酶即可导致大量的催化过程,所以极为敏感。它的催化过程有两种基本形式:



E 为酶, S 为酶作用的底物, P 为底物分解后的产物, D1 为供氢体, D2 为 D1 的氧化型。如 P 或 D 为有色化合物, 即可用呈色反应显示酶的存在。

常用的酶及其底物: 到目前为止, 所应用的酶大多是辣根过氧化物酶, 其次有碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、A - D - 半乳糖酶, 每种酶通过与自己的特殊作用底物反应, 而产生不同的颜色。

1. 酶免疫技术的分类



酶免疫技术是以酶标记的抗体或抗原为主要试剂的方法, 是标记免疫技术的一种。

酶免疫组化技术与荧光抗体技术相似, 酶标记抗体与组织切片上的抗原起反应, 然后与酶底物作用, 形成有色沉淀物, 可以在普通光学显微镜下观察。酶作用的产物电子密度发生一定的改变, 则可用电子显微镜观察, 称为酶免疫电镜技术。

酶免疫测定根据抗原抗体反应后是否需要分离结合的与游离的酶标记物而分为均相 (homogenous) 和异相 (heterogenous) 两种类型。

(1) 均相法: 抗原抗体反应后不需要分离结合的与游离的酶标记物。

均相酶免疫测定:

①酶扩大免疫测定技术:酶扩大免疫测定技术(enzyme - multiplied immunoassay technique, EMIT)是最早取得实际应用的均相酶免疫测定方法,主要检测小分子抗原或半抗原,在药物测定中应用较多。

EMIT 的基本原理是半抗原与酶结合成酶标半抗原,保留半抗原和酶的活性。

当酶标半抗原与抗体结合后,所标的酶与抗体密切接触,使酶的活性中心受影响而活性被抑制。

EMIT 试剂盒中的主要试剂为: A. 抗体, B. 酶标半抗原, C. 酶的底物。

检测对象为标本中的半抗原。

当试剂 A、B 与标本混合后,标本中的半抗原与酶标的半抗原竞争性地与试剂中的抗体相结合。如标本中的半抗原量少,与抗体结合的酶标半抗原的比例增高,游离的具有酶活力的酶标半抗原的量就减少。因此在反应后酶活力大小与标本中的半抗原呈一定的比例,从酶活力的测定结果就可推算出标本中半抗原的量。

②克隆酶供体免疫测定:利用重组 DNA 技术制备 β -半糖苷酶的两个片段,大片段称为酶受体(enzyme acceptor, EA),小片段称为酶供体(enzyme donor, ED)。两个片段本身均不具酶活性,但在合适的条件下结合在一起就具有酶活性。利用这两相片段的特性建立的均相酶免疫测定称为克隆酶供体免疫测定(cloned enzyme donor immunoassay, CEDIA)。

CEDIA 的反应模式为竞争法,测定原理为:标本中的抗原和 ED 标记的抗原与特异性抗体竞争结合,形成两种抗原抗体复合物。ED 标记的抗原与抗体结合后由于空间位阻,不再能与 EA 结合。反应平衡后,剩余的 ED 标记抗原与 EA 结合,形成具有活性的酶。加入底物测定酶活力,酶活力的大小与标本中抗原含量成

正比。

CEDIA 主要用于药物和小分子物质的测定。

(2) 异相法: 抗原抗体反应后需要分离结合的与游离的酶标记物。

异相法中抗原和抗体如全部在液体中反应, 称液相酶免疫测定。

异相法中如将抗原或抗体制成固相制剂, 这样在与标本中抗体或抗原反应后, 只需经过固相的洗涤, 就可以达到抗原抗体复合物与其他物质分离的目的, 称固相酶免疫测定, 即酶联免疫吸附测定 (ELISA)。

(三) 酶联免疫吸附测定

是酶联接免疫吸附剂测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 的简称。它是固相酶免疫测定技术。是酶免疫测定 (enzyme immunologic assay, EIA) 方法之一。是目前应用最广的酶免疫技术。

1971 年 Engvall 和 Perlmann 发表了 ELISA 用于 IgG 定量测定的文章, 使得 1966 年开始用于抗原定位的酶标抗体技术发展成液体标本中微量物质的测定方法。

1. 基本原理

(1) 抗原或抗体的固相化: 使抗原或抗体结合到某种固相载体表面, 并保持其免疫活性。

(2) 抗原或抗体的酶标记: 使抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体, 这种酶标抗原或抗体既保留其免疫活性, 又保留酶的活性。在测定时, 把受检标本 (测定其中的抗体或抗原) 和酶标抗原或抗体按不同的步骤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其他物质分开, 最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例。

(3) 酶作用底物: 底物被酶催化变为有色产物, 产物的量与标

本中受检物质的量直接相关,可根据颜色反应的深浅对标本中的抗原或抗体进行定性或定量分析。

故在这种测定方法中有 3 种必要的试剂:①固相的抗原或抗体;②酶标记的抗原或抗体;③酶作用的底物。

此项技术自 20 世纪 70 年代初问世以来,发展十分迅速,目前已被广泛用于生物学和医学科学的许多领域。ELISA 可用于测定抗原,也可用于测定抗体。其敏感性达 ng/ml 水平。

2. ELISA 的试剂盒组成

(1) 已包被抗原或抗体的固相载体(免疫吸附剂)。

(2) 酶标记的抗原或抗体(结合物)。

(3) 酶的底物

①HRP 酶的底物(HRP 对氢受体的专一性很高,仅作用于 H_2O_2 、小分子醇的过氧化物和尿素过氧化物(urea peroxide))。

邻苯二胺(OPD):OPD 氧化后的产物呈橙红色,用酸终止酶反应后,在 492 nm 处有最高吸收峰,灵敏度高,比色方便,是 HRP 结合物最常用的底物。

四甲基联苯胺(TMB):TMB 性质较稳定,可配成溶液试剂,只需与 H_2O_2 溶液混合即成应用液。TMB 经 HRP 作用后产物显蓝色。酶反应加 2 mol/L 硫酸终止液后,TMB 产物由蓝色呈黄色,可在比色计中定量,最适吸收波长为 450 nm。

②碱性磷酸酶(AP)。底物一般采用对硝基苯磷酸酯作为底物。产物为黄色的对硝基酚,在 405 nm 波长处有吸收峰。用 NaOH 终止酶反应后,黄色可稳定一时间。

(4) 阴性对照品和阳性对照品、参考标准品。

(5) 结合物及标本的稀释液。

(6) 洗涤液。

(7) 酶反应终止液。

二、临床主要 EIA 方法的应用类型

(一) ELISA 间接法

间接法是检测抗体最常用的方法。

【原理】

利用酶标记的抗抗体以检测已与固相结合受检抗体。故称为间接法。优点是只要变换包被抗原就可利用同一酶标抗抗体建立检测相应抗体的方法(图 1-1)。

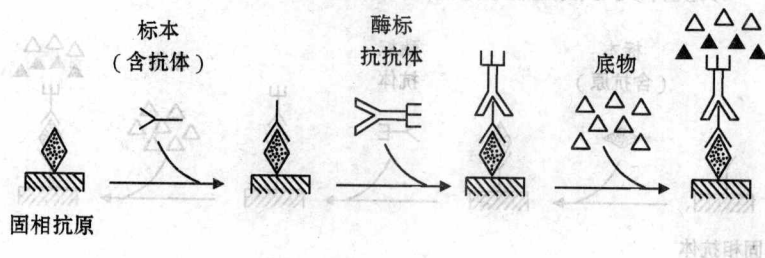


图 1-1 ELISA 间接法原理示意图

【操作步骤】

1. 将特异性抗原与固相载体连接,形成固相抗原。洗涤除去未结合的抗原及杂质。

2. 加稀释的受检血清。其中的特异抗体与抗原结合,形成固相抗原抗体复合物。经洗涤后,固相载体上只留下特异性抗体。其他免疫球蛋白及血清中的杂质由于不能与固相抗原结合,在洗涤过程中被洗去。

3. 加酶标抗抗体(二抗)与固相复合物中的抗体结合,从而使该抗体间接地标记上酶。洗涤后,固相载体上的酶量就代表特异性抗体的量。

4. 加底物显色。颜色深度代表标本中受检抗体的量。