

# 《免疫化学》补充教材

(研究生用)

第九章：

免疫化学诊断原理

化学教研室

江世益编写

(2571-8510-1)

## 《免疫化学》补充教材

### 第九章 免疫化学诊断原理

抗原与抗体的反应是具有高度的特异性和敏感性。因此，抗原与抗体反应可广泛应用于临床免疫学诊断。根据抗原与抗体反应的物理化学性质与免疫化学性质，在临床免疫化学诊断方面可分成沉淀检测、凝集试验、补体结合试验、中和试验以及标记免疫测定等。

#### 一、沉淀检测 (precipitin assay)

可溶性抗原与相应抗体在溶液中相互接触可导致形成肉眼可见的抗原抗体复合物沉淀。沉淀的形成主要原因是由于抗原与抗体分子表面的疏水基团相互接近而有效地排出它们之间的水分子以达到不溶性的沉淀产生。免疫复合物的形成通常分两步进行。反应的第一步是抗原与相应抗体的特异性结合，进行的过程较快，一般受抗原与抗体分子间的力，如范德华斯力，氢键，疏水基团/亲水基团之间的相互作用力等因素控制。反应的第二步是形成肉眼可见的免疫复合物晶格，这一过程决定于下列各种因素，如抗原与抗体的比例、盐浓度、溶液的pH值、反应时的温度，抗原/抗体的绝对浓度以及抗原与抗体反应的亲和力等。因此，依据抗原和抗体的沉淀反应特性，可用已知抗原/抗体来检测未知抗体/抗原的存在及其含量，以达到诊断疾病的目的。

免疫沉淀检测方法较多，但操作简便可行，准确度高，重现性好。因此，在临床免疫测定中应用较广。

#### (一) 界面环状沉淀检测 (interfacial ring test)

界面环状沉淀法可快速检测可溶性抗原/抗体，该法是将抗原溶液置于抗体溶液液面上，抗原分子可从抗体液层上向抗体溶液内部扩散进去形成浓度梯度，至抗原与抗体比例适中时，即形成抗原抗体复合物沉淀环。此方法可在各种规格大小不一的试管中进行；也可在毛细管中进行。如检测患者血清中C-反应蛋白(CRP)时，可用纯C-多糖或用抗C-反应蛋白血清在毛细管中进行沉淀测定。通常将抗血清充盈毛细管的三分之一，然后在抗血清液面上放置等体积抗原溶



液，沉淀反应在瞬时间即开始，但整个反应过程较长，约数小时，甚至在4℃过夜，以环状沉淀的大小读取结果。

## (二) 单向免疫扩散检测 (single radial immunodiffusion, SRID)

单向免疫扩散检测法是使抗原与抗体的沉淀反应在凝胶介质(琼脂或琼脂糖)中进行。通常用一定量的抗血清与等量融化的3%琼脂混合制成1mm厚免疫板，并在板上打成一定数量、大小一致的小孔，孔径3mm，将一定量的抗原(待检的病人血清，或各种不同浓度的标准抗原/参考血清)分别加入小孔中，然后将免疫板放入具有一定湿度的小盒内，置于37℃下反应24~48小时。待抗原向小孔四周扩散后，即形成白色沉淀环。常有两种方法用于定量测定抗原浓度：(1) Mancini-Heremans的终点测定法。即当抗原与抗体的扩散反应达到完全后，将所测量到的沉淀环直径数值与相应标准抗原的浓度作图，可得一直线(图9-1)。(2) Fahey-McKelvey的时间测定法。当标准抗原与抗体的扩散反应经过一定的准确时间(18~24小时)后，即测量形成的沉淀环大小，将所测得的沉淀环直径数值与相应标准抗原浓度的对数作图，得到一条近似的直线(图9-2)。由此可知，在上述两种测量方法中，终点测定法就较精确了，但费时，如测定IgG所需时间可达120小时(图9-3)，而时间测定法的可靠性较差，但可达到95±3%的重复性，在正常允许的±9%误差范围内。此外，当然还存在着其它一些误差，如琼脂变形或裂口，抗原或抗体过量以及抗原会溢出小孔等等。

在临床免疫化学检验中，常用单向免疫扩散法测定血清中IgG、IgA、IgM、IgD或IgE，以及补体C3、C4等含量。

由于各类Ig的分子量大小不等因此，同样浓度的IgG、IgA或IgM在琼脂中扩散时，其扩散速度也各异，IgG扩散得快，形成的沉淀环也大；IgM的分子量最大，因此扩散速度慢，形成的沉淀环也较小；IgA介于两者之间。本周氏蛋白分子量仅40,000，故形成的沉淀环最大。由于形成之沉淀环大小与抗原/抗体浓度相关。因此，在临床检验时，先应调整抗体和抗原各自的最适宜浓度。抗体最适浓度

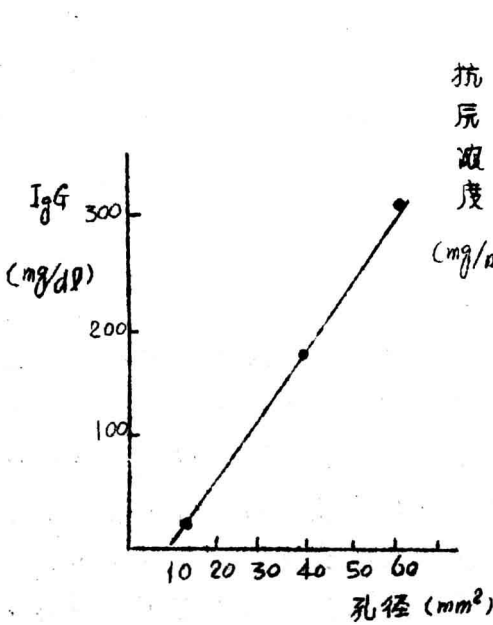


图 9-1 单向免疫扩散—终点测定法的标准曲线

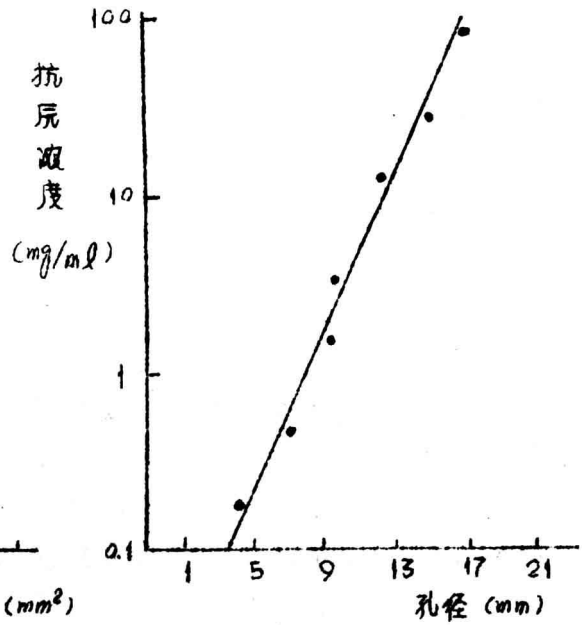


图 9-2 单向免疫扩散—时间测定法的标准曲线

应使免疫扩散后沉淀环边缘清晰，且能测出血清中 Ig 的正常值与最大限度的异常值。若抗体浓度过高时，形成的沉淀环小，会降低其检测灵敏度；相反，浓度过低，不易检测抗原的高限浓度。选择抗原的浓度，也应注意到不宜过高或过低，因为形成的沉淀环大小与抗原浓度成正比，过低时，反应后的沉淀环太小，不易测定；过高时，沉淀环太大，浪费了抗血清。

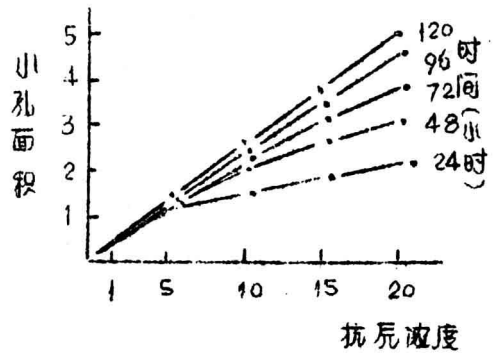


图 9-3 单向免疫扩散法中形成沉淀环大小与时间关系

常用 Fahey-Mckelvey 法测定血清中 Ig 或补体含量。即将加有一系列经倍比稀释的标准抗原和待测 Ig 血清的免疫板置于湿盒

内，于37℃下放置18小时后，取出并测量沉淀环直径，所得的标准抗原沉淀环直径值与相应各标准抗原浓度的对数值在半对数纸上作图，得一直线，再测量出待测血清中I<sub>g</sub>的沉淀环直径数值，从图中查知其含量。

(三) 双向免疫扩散检测 (double immunodiffusion in two dimensions)

双向免疫扩散法最早由Ouchterlony创立，故又称Ouchterlony法。该法是将抗原与抗体分别加入同一凝胶板中两个相隔一定间距的小孔内，两者进行相互扩散，当抗原与抗体浓度之比达适宜时，彼此相遇后即可形成一白色弧状沉淀线。但沉淀线形成除与抗原或抗体浓度有关外，还与它们的特异性密切相关。当两抗原的决定簇相同，则与抗体形成的两条沉淀线相吻合(图9-4, A)；若两抗原的决定簇完全不相同，则所形成的沉淀线呈互不相关的交叉线(图9-4, B)；若两种抗原决定簇中，其中有部分决定簇相同时，则形成的两条部分吻合或部分交叉的带有马刺状(Spur)沉淀线(图9-4, C)。从形成沉淀线的形态，清晰度以及位置等可了解抗体/抗原的各种性质。若形成的沉淀线正居二小孔之间，说明抗原和抗体的浓度适宜，故扩散速度相似；反之，若抗原和抗体浓度相似，但扩散速度不同，或它们的浓度不同，而扩散速度相似，则形成

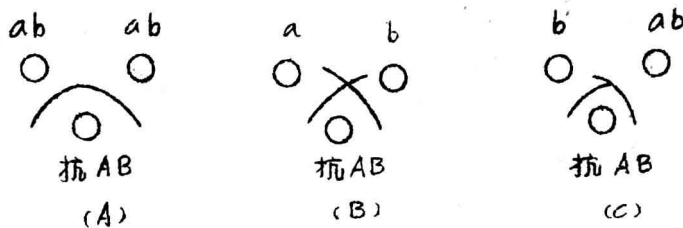


图9-4 双向免疫扩散

的沉淀线往往偏于扩散速度慢的或浓度低的小孔。若抗原/抗体的浓度大大超过抗体/抗原时，则沉淀线不清晰，变得模糊，这是由于沉淀线向浓度低的一方扩展之故。因此，扩散程度大小决定了抗原/抗体

分子量大小以及它们浓度之高低。

应用双向扩散法，可以测定抗原浓度，以及判定抗体效价。如在琼脂板上的中心小孔中加入固定浓度的抗体，周围小孔中分别加入经对倍稀释后的已知浓度抗原（1：2，1：4，……），或待测抗原，经双向扩散后，根据标准抗原出现的沉淀线位置可半定量测定未知抗原浓度。也可以在中心孔中加入固定浓度的抗原，周围孔中加入对倍稀释的抗体，视出现沉淀线的位置以断定抗体效价。

双向免疫扩散法在临床免疫化学中应用较广，如检测乙型肝炎病毒的表面抗原（HB<sub>S</sub>Ag）、表面抗体（HB<sub>S</sub>Ab）、e抗原（HB<sub>e</sub>Ag）以及e抗体（HB<sub>e</sub>Ab），也可检测肝病者血清中是否有甲胎蛋白的存在以诊断患有肝癌的可能性。

#### （四）免疫电泳（Immunoelectrophoresis, IEP）

免疫电泳法是由Grabar和Williams（1953）首先创立。该法是在凝胶介质中将电泳与扩散两技术相结合的一种免疫化学方法，用以研究抗原和抗体。

免疫电泳是先使血清在琼脂（或琼脂糖）中进行电泳。在一定电场强度下，由于血清中各种Ig的分子大小以及荷电状态和荷电量均有差异，因而泳动速度也不同，加上电泳过程中电渗作用的影响而使各自组分得到分离。然后在电泳轴的平行方向挖一长槽，加入抗血清，使进行第二步的抗原与相应抗体的扩散相遇，出现沉淀弧线（图9-5）。



中心孔：加入抗原  
长槽：加入抗体

图9-5 免疫电泳示意图

免疫电泳常用巴比妥缓冲液（pH8.6，离子强度0.05）预先配成1.2%琼脂凝胶（或0.8%琼脂糖凝胶），其中加入0.02% NaN<sub>3</sub>，作防腐。实验时，先将1.2%琼脂热熔，再浇在置于水平台上

的载玻片上，待凝胶冷却并凝固后，在凝胶板中央打一小孔，孔径3mm，并在小孔下方与电泳轴平行方向开一条长槽。小孔中加入抗原/待检血清，置于电泳槽中（电极溶液为巴比妥缓冲液，pH8.6，离子强度0.05），在4~6 v/cm电场强度下电泳1~1.5小时。电泳后，将长槽内琼脂挑去并加入抗血清，置于湿盒内放置24小时，可观察到在一定位置上出现的沉淀弧线。

在临床诊断中，免疫电泳常用于诊断M-蛋白血症（指 malignant/monoclonal），确认该异常蛋白属于那一亚类 $I_g$ ，或那一型的轻链（k或 $\lambda$ 型），同时也可用免疫电泳检测多克隆多丙种球蛋白血症中同时存有高含量的 $I_gG$ 、 $I_gA$ 和 $I_gM$ 。

#### (五) 电免疫扩散法 (electroimmunodiffusion, EID)

抗原与相应抗体在琼脂介质中依靠它们之间互相扩散相遇而能形成复合物沉淀，但当通以电流后，使在一定电场强度下，加速抗原与抗体扩散相遇而形成复合物沉淀，这种检测方法称做电免疫扩散法。由于操作方法不同，电免疫扩散法可分成：

(1) 对流免疫电泳 (Counter immunoelectrophoresis, CIE)。

(2) 火箭电泳 (rocket immunoelectrophoresis, RIE)。

(3) 交叉免疫电泳 (Crossed immunoelectrophoresis)。关于电免疫扩散法原理见第八章。在临床诊断中，对流免疫电泳常用于检测下列各种疾病，如脑脊液中隐球菌特异抗原、脑膜炎双球菌特异抗原和嗜血杆菌特异抗原；纤维蛋白原，癌胚抗原 (CEA) 以及甲胎蛋白等。火箭电泳常用于检测血清 $I_g$ 或 $SI_gA$ 及补体C3等，而交叉免疫电泳用于 $I_gG$ 和C3定量研究，特别用于了解C3的稳定性。

#### (六) 浊度法 (nephelometry)

在稀溶液中，抗原与相应抗体发生特异性反应而出现微小沉淀颗粒，使溶液变得浑浊。在一定的入射光源照射下，能产生散射光，其散射光的强度与溶液浊度成正比，这种依据浊度强弱而产生散射光大小来测定抗原含量的方法称做浊度法（图9-6）。

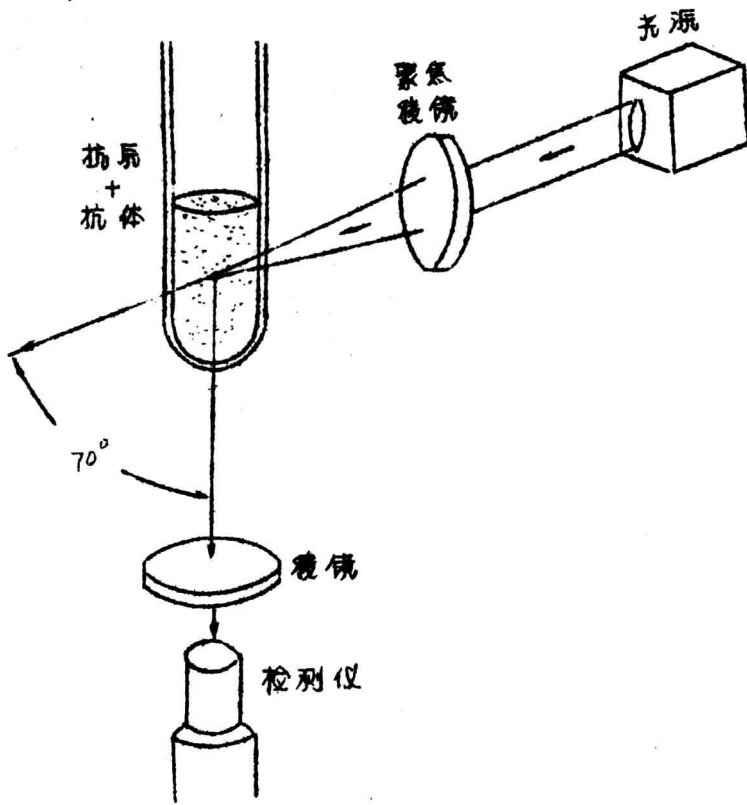


图 9 - 6 浊度法示意图

在抗体过量的条件下，加入抗原后，先有几秒钟的迟滞现象，接着迅速出现浑浊，表明抗原与抗体发生特异性反应，形成 $0.1\sim 1\mu\text{m}$ 颗粒，继而渐渐缓慢下来，并在 $10\sim 30$ 分钟后趋于稳定状态。

在一系列含有一定量的抗体溶液中，分别加入不同量的标准抗原，可以形成一系列大小不同的抗原抗体聚集颗粒，因此其浊度各异，通过浊度计可测得各散射光强度，得到一标准曲线。用同法测定未知抗原，可从标准曲线中求知其含量。

用浊度法定量测定生物体液内抗原是一种既快又简单的方法，但因仪器价格昂贵，还未能普遍推广使用。

### 三 凝集试验

凝集反应是抗原与抗体反应的二级反应，它与沉淀反应的主要差



别在于抗原不是可溶性的，而是呈颗粒状，大多数的颗粒状抗原比抗体分子大100~1000倍。因此，少量抗体分子就足够与抗原起反应，出现可见的凝集团状物。关于凝集反应的机理有几种说法：一种理论认为由于颗粒抗原表面所带的电荷使颗粒之间相互排斥，然后当抗原颗粒与一定数目的抗体分子相遇后，使抗原分子表面电荷发生改变以致颗粒之间相互聚合而发生凝集。另一种晶格学说较为令人信服，它认为颗粒抗原表面的决定簇通过一定数目的抗体分子的Fab区域而相互连接形成晶格。而在抗原过量或抗体过量的状态下，都不能形成晶格，因此也不出现凝集反应。凝集反应与沉淀反应一样，分两步进行，即结合反应与聚集反应，而第一步的结合反应迅速，而第二步的聚集反应较缓慢，然后可以用加热孵育，振荡等，促使颗粒之间频繁接触，达到增加聚集反应速度。上述这种由颗粒抗原直接与抗体反应发生凝集现象，在免疫诊断学上称做直接凝集反应。除了颗粒抗原与抗体直接反应出现凝集现象外，也可将一些可溶性抗原吸附在一定大小的与免疫无关的惰性颗粒载体表面上，在电解质存在的条件下，同样可以与相应抗体发生凝集反应，这种凝集现象在免疫诊断学上称做间接凝集反应。常用的惰性颗粒载体有红细胞（羊红细胞，O型人红细胞等），聚苯乙烯胶乳颗粒，羧化胶乳颗粒等。相反，也可将可溶性抗体吸附在惰性颗粒载体上，再与抗原结合，在适当电解质存在下，产生肉眼可见的凝集反应。所以在间接凝集反应中又有正向间接凝集反应与反向间接凝集反应之分。

在间接凝集反应中，除了正向、反向间接凝集反应外，还有一种常用的试验法，叫做间接凝集抑制反应，它是先将可溶性抗原与相应抗体结合，这时抗体就不再与包被抗原的惰性颗粒载体起凝集反应。

在免疫化学诊断中，凝集反应方法简便、快速、准确。如用已知抗体鉴定细菌菌种或分型、人类红细胞ABO型的分型鉴定，沙门氏菌感染诊断用的肥达氏反应，类风湿因子（RF）的测定以及在SLE中的抗核因子（ANF）测定等均属于凝集试验。

### 三 补体反应

在临床诊断中，测定补体含量以及补体的活性已越显得重要，如

目前已用特异性抗血清来测定经典途径中的C1q、C3、C4等含量和旁路途径中的B因子、D因子和备解素等补体分子含量。因此，在临床上常作为系统性红斑狼疮(SLE)肾炎，急性/慢性肾小球肾炎等疾病诊断指标。如SLE病人的C3、C4和B因子均较正常值低，急性肾小球肾炎的C3与B因子均低于正常值而C4却高于正常值。因此，同时测定患者C3、C4和B因子含量可帮助鉴别急性肾小球肾炎和SLE肾炎。

此外，在临床免疫诊断中，还常依据补体反应的特点测定血清中总补体活性和检测血清中抗原/抗体。常用的测定方法有50%溶血试验和补体结合试验。

#### (一) 50%补体溶血试验(CH50)

当兔抗羊红细胞与羊红细胞结合后，遇到补体即可使羊红细胞发生溶血。依据这一特点可建立测定血清中总补体的活性方法。方法的第一步是抗羊红细胞抗体与羊红细胞结合，制成致敏羊红细胞，第二步用致敏羊红细胞去检测补体。将患者新鲜血清经稀释成一系列不同浓度后，分别加入致敏羊红细胞，则出现不同程度的溶血，用分光光度计测定释放出的血红蛋白量。目前常用的方法是用50%补体溶血试验测定总补体活性，即求出使50%致敏羊红细胞发生溶血时的血清最小用量。因为在541nm波长下，用吸光值(或溶血程度)为纵坐标，以加入的1:1000新鲜血清为横坐标作图，可得呈“S”型的溶血曲线(图9-7)，从曲线斜度中可见在50%溶血时，曲线最陡，表示新鲜血清的用量稍有变化时，溶血程度即有稍大的改变，即敏感性大。

有几种方法可以计算人血清中CH50值，常用Von Krogh方程，它可以“S”型补体滴定曲线转换成近似直线。“S”型曲线可由Von Krogh方程描述为

$$X = K \left( \frac{Y}{1-Y} \right)^{1/n}$$

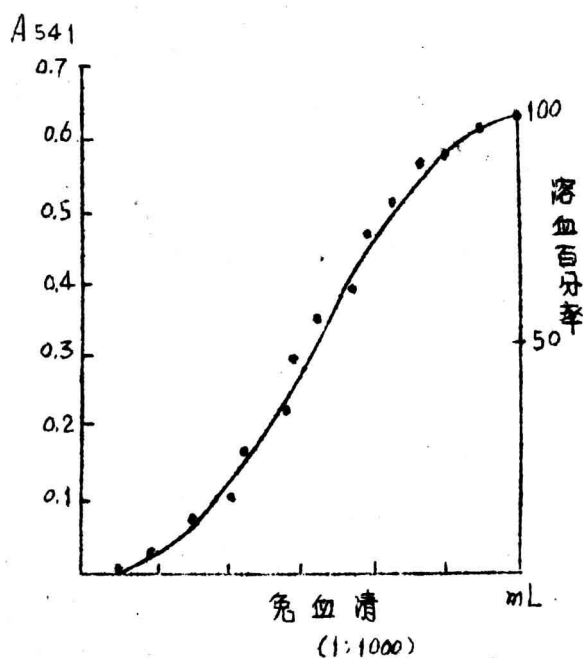


图 9 - 7 溶血曲线

X 表示加入经稀释的新鲜血清 (补体) 毫升数 ;

Y 为溶血百分率 ;

K 为常数 ;

n 表示在标准羊红细胞和兔抗血清条件下等于  $0.2 \pm 10\%$  , 将上述方程转换成对数, 即为

$$\lg X = \lg K + \frac{1}{n} \lg \frac{Y}{1-Y}$$

若在 50% 溶血时,  $\frac{Y}{1-Y} = \frac{50\%}{1-50\%} = 1$

$$\lg X = \lg K + \frac{1}{n} \lg 1 ,$$

$$\lg X = \lg K ,$$

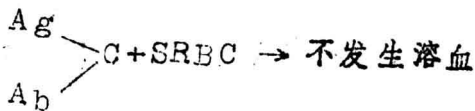
则  $X = K$

因此， $K$ 表示在50%溶血时的溶血单位，其数值即为加入的新鲜血清毫升数。

在临床上，某些疾病如SLE肾小球性肾炎，急性肾小球肾炎，免疫复合物疾病，急性血清病，遗传性C2缺陷，混合型冷球蛋白血症(IgM-IgG)，阵发性冷血红蛋白尿，淋巴瘤等的CH50数值降低，表示这些患者的血清补体活性减小。但也有些疾病如糖尿病，急性风湿热，甲状腺炎，类风湿性关节炎，痛风、伤寒热，急性心肌梗塞，皮炎等的CH50数值升高，但临床意义还不清楚，看来似乎因体内补体合成过剩之故。

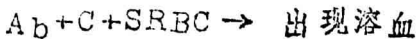
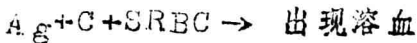
#### (二) 补体结合试验 (Complement fixation, CF)

补体结合试验用于检测抗原或抗体时较为灵敏。补体结合试验的原理主要在于某些免疫复合物具有结合/固定补体的能力，而这些结合的免疫复合物当消耗了补体之后，再加入致敏羊红细胞，则不发生溶血现象。



$Ag$ ~抗原， $Ab$ ~抗体， $C$ ~补体， $SRBC$ ~致敏羊红细胞

若反应系统中只有抗原(或只有抗体)单独存在，此时加入一定量补体，并加入致敏羊红细胞后，就会出现溶血现象。



显然，每一抗原抗体复合物仅能结合一定量的补体。若此反应系统中存在过量补体，虽然已有抗原抗体复合物存在，但当加入致敏羊红细胞后，仍可出现溶血现象。因此，在测定时必须对补体的效价进行测定，常以豚鼠血清作补体使用，一旦确知豚鼠血清中补体效价，



则必须稀释豚鼠血清至适宜浓度后，才可使用。

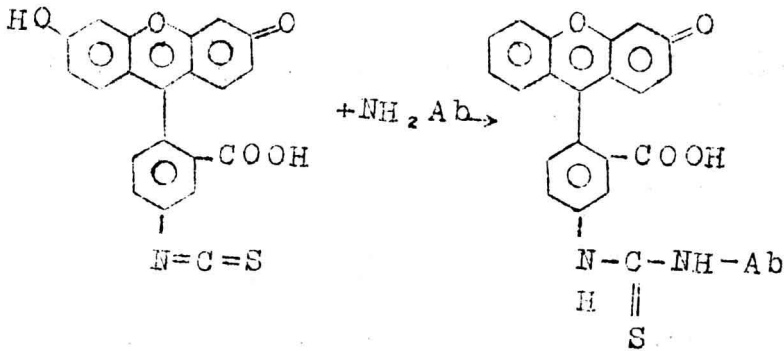
#### 四 标记免疫测定 (labeled immunoassays, LIA)

为了提高利用抗原检测抗体 (或用抗体检测抗原) 方法的灵敏度和特异性，目前在临床检验中，常采用标记免疫技术。如免疫荧光法，免疫酶标法、放射免疫法和化学发光免疫检测法等。

##### (一) 免疫荧光法

免疫荧光法是利用某些荧光素，如异硫氰荧光黄 (fluorescein isothiocynata FITC) 与抗体通过化学反应结合制成荧光抗体，但使其仍保持原抗体的免疫活性，然后将荧光抗体与被测抗原发生特异性结合，形成的免疫复合物在一定波长光的激发下可产生荧光。因此，借助荧光显微镜来检测或定位未知抗原。

被标记的抗体应先进行纯化。常用的抗体多属 IgG，因此，首先按照纯化 IgG 的步骤将抗血清中的 IgG 部分提纯。标记抗体的荧光素，除 FITC 外，还有四乙基罗丹明 (rhodamine B200, RB200) 等。现介绍 FITC。FITC 的分子量为 389，最大吸收光谱为 490~495 nm，其发射光谱为 520~530 nm，所发射的荧光呈黄绿色亮光。当 FITC 与抗体结合时，主要靠色素中硫碳酰胺键与 IgG 中赖氨酸的  $\epsilon$ -氨基结合。



标记好的荧光抗体需除去游离荧光素以及进一步除去未结合荧光素的抗体或结合过量荧光素的抗体，达到纯化荧光抗体，这样得到的荧光抗体，其标上去的荧光素的分子数呈均一性，消除了可能产生的非

特异性荧光染色。常用 FITC 对蛋白质的摩尔比值 (F/P) 来监视过量的 FITC 标记。F/P 的摩尔比值表示为每一摩尔 IgG 蛋白质所结合的 FITC 的摩尔数。

$$F/P = \frac{\mu\text{gFITC}/\text{ml}}{\text{mgIgG}/\text{ml}} \times \frac{160000 \times 10^3}{389 \times 10^6}$$

$$= 0.41 \times \frac{\mu\text{gFITC}/\text{ml}}{\text{mgIgG}/\text{ml}}$$

式中：16000 为 IgG 分子量，389 为 FITC 分子量，F/P 值在 1 ~ 3 范围内。如标记 IgM，则：

$$F/P = 2.31 \times \frac{\mu\text{gFITC}/\text{ml}}{\text{mgIgM}/\text{ml}}$$

在免疫荧光法中，可以直接用荧光素标记抗体，去检测未知抗原；也可以让未知/已知抗体与已知/未知抗原先结合成复合物，再用荧光素标记抗抗体（第二抗体），用荧光第二抗体来检测未知/已知第一抗体或已知/未知抗原。前一方法称为直接法，后一方法称为间接法。

在临床诊断中，常用直接法检定肾小球肾炎，系统性红斑狼疮等；用间接法测定抗核抗体，抗胃壁细胞抗体等。

## (二) 免疫酶标法

免疫酶标法是近二十年中新发展起来的一门免疫技术它是采取抗原与抗体的特异反应与酶连接，然后通过酶与底物反应产生颜色反应，用于定量测定。目前所用的方法称为酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)，其方法简单，方便迅速，特异性强，且在免疫化学测定中推广极快。

ELISA 法是由抗原/抗体先结合到固相载体上，但仍保留其免疫活性；另用一种抗体/抗原与酶结合成结合物，它也保留其原免疫活性与酶活性，当结合物与固相载体上的抗原/抗体反应后，再加上

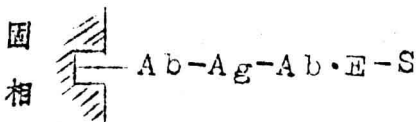
酶的相应底物，即起催化水解或氧化还原反应而呈颜色，其所生成的颜色深浅却与欲测的抗原/抗体含量成正比，通过比色即可定量测定抗原/抗体。

ELISA 法分成间接法、双抗体夹心法与竞争法。

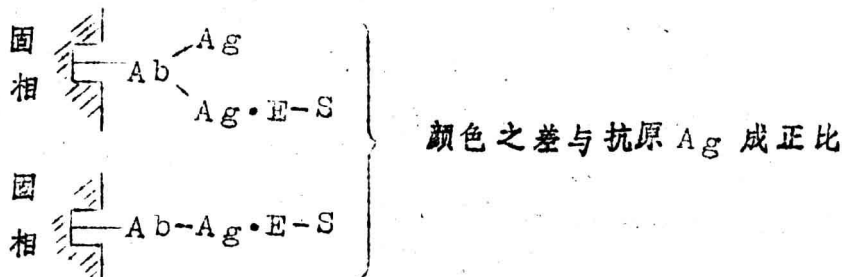
1. 间接法：主要用于测定抗体。先将抗原 ( $A_g$ ) 吸附于固相载体上，加上待测血清 ( $Ab$ )，继加经酶标的抗人球蛋白抗体 (抗  $Ab \cdot E$ )，最后加上底物 ( $S$ )，使呈颜色，依据呈现的颜色深浅可定量测定患者血清中待检抗体含量。



2. 双抗体夹心法：主要测定大分子抗原。先将抗体 ( $Ab$ ) 吸附于固相载体上，加上待检抗原 ( $Ag$ )，继加经酶标的抗体 ( $Ab \cdot E$ )，最后加上底物 ( $S$ ) 使呈现颜色，同样依据出现的颜色深浅来定量测定抗原。



3. 竞争法：测定小分子抗原。先将特异性抗体 ( $Ab$ ) 分别吸附于相同的两份固相载体上，并再分别加入待检抗原 ( $Ag$ ) 与酶标抗原 ( $Ag \cdot E$ ) 的混和物以及单独的酶标抗原 ( $Ag \cdot E$ )，最后都加入底物 ( $S$ )，由于底物仅与酶标抗原反应呈色，故两者呈色之差与抗原含量成正比。



常用的 ELISA 法是间接法与双抗体夹心法，它们只需用酶标记抗体分子。

标记用的酶有辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP)、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶与半乳糖苷酸酶等。常用辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。以下着重讨论辣根过氧化物酶。

辣根过氧化物酶的辅基为氧化血红素，其  $\lambda_{\max} = 403\text{nm}$ ；而酶的蛋白部分之  $\lambda_{\max} = 275\text{nm}$ ，因此其纯度 RZ (Reinheit Zahl,  $A_{403}/A_{275}$ ) 为 3.0 时，表示最佳。若 RZ 越小，表示非酶蛋白部分越多。

用辣根过氧化物酶标记抗体的方法有戊二醛法和过碘酸盐法。在戊二醛法中，主要因戊二醛中的醛基可与酶分子及抗体分子中的氨基形成结合物。戊二醛法可分为“一步法”与“两步法”两种。“一步法”是将抗体、酶和戊二醛同时混和使形成结合物；“两步法”是先将戊二醛与酶结合，然后再与抗体结合。但“一步法”中因抗体分子的氨基数目比酶多，故抗体分子本身有可能相互聚合，则就影响抗体和酶活性。“两步法”就克服了这一缺点，它是先由酶分子与戊二醛结合，形成酶-戊二醛结合物，使戊二醛另一个醛基再与抗体分子的氨基结合，最后形成酶标抗体。显然，“两步法”较“一步法”优越，故目前常采用“两步法”酶标抗体。

由于酶分子中氨基较少，故在戊二醛法中仅 2~4% 的酶可标记到抗体分子上。因此，产率较低。用过碘酸盐法可克服这一缺点，使酶分子中的含糖部分用过碘酸盐氧化成醛基，然后再与抗体分子上氨基结合，这样可大大提高标记抗体的产率。

结合物中酶和 IgG 的定量测定，可用吸光光度法测定、计算。

$$\text{酶量 (mg/ml)} = A_{403} \times 0.4$$

$$\text{IgG 量 (mg/ml)} = (A_{280} - A_{403} \times 0.3) \times 0.62$$

则它们的摩尔比值为：



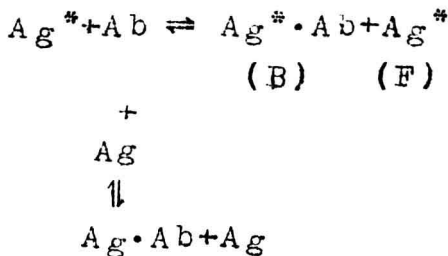
$$\begin{aligned} \text{摩尔比值} &= \frac{\text{酶量 (mg/ml)}}{\text{酶分子量}} \div \frac{\text{I}_g\text{G (mg/ml)}}{\text{I}_g\text{G分子量}} \\ &= \frac{\text{酶量 (mg)} \times 4}{\text{I}_g\text{G量 (mg)}} \end{aligned}$$

酶分子量为 40000 ; I<sub>g</sub>G 分子量为 160000 。

在 ELISA 测定中，碱性磷酸酶的常用底物为 4-硝基酚磷酸盐 (p-nitrophenyl phosphate)，而辣根过氧化物酶的底物较多，有 5-氨基水杨酸 (5AS)，邻联甲苯胺 (OT) 和 邻苯二胺 (O-PD)，其中 O-PD 优于前两者，但具有致癌性。近年来有报道认为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 作为过氧化物酶的底物，优点较多，无致癌性，且灵敏度又较高。

### (三) 放射免疫法 (radioimmunoassay, RIA)

放射免疫法是在 60 年代初才发展起来的一门新的免疫测定技术，它是将免疫反应的特异性以及同位素的灵敏性、精确性相结合。在被检样品中加入射线性强度较低，且有一定安全性的放射性同位素后，再进行测定。由于它具有特异性高，敏感性强，精确度高，用样量少等优点，故在临床检测中颇受欢迎。RIA 的测定原理与其它竞争抑制反应相类似，是由同位素标记的抗原 (A<sub>g</sub><sup>\*</sup>)，未标记的抗原 (A<sub>g</sub>) 与特异性抗体 (Ab) 相互竞争结合，其反应过程如下：



若 A<sub>g</sub><sup>\*</sup>、Ab 量一定，且 A<sub>g</sub><sup>\*</sup> + A<sub>g</sub> 大于 Ab 上可结合的位点数目，则 A<sub>g</sub><sup>\*</sup> 与 A<sub>g</sub> 要相互竞争与 Ab 结合成 A<sub>g</sub><sup>\*</sup>·Ab 直至反应达平衡，所形成的复合物 A<sub>g</sub><sup>\*</sup>·Ab 的量随着与 A<sub>g</sub><sup>\*</sup> 相竞争的 A<sub>g</sub> 量而改变，即 A<sub>g</sub>